

Терапевтический эффект мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из пуповины человека, у пациента с синдромом Криглера–Найяра I типа

Г.Т. Сухих¹, А.В. Дегтярева^{1,2}, Д.Н. Силачев^{1,3}, К.В. Горюнов¹, И.В. Дубровина¹, Л.В. Ушакова¹, Д.Н. Дегтярев^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Therapeutic effect of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells in a patient with Crigler–Najjar syndrome type I

G.T. Sukhikh¹, A.V. Degtyareva^{1,2}, D.N. Silachev^{1,3}, K.V. Gorunov¹, I.V. Dubrovina¹, L.V. Ushakova¹, D.N. Degtyarev^{1,2}

¹Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia;

²Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia;

³Belozersky Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology of the Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Представлены результаты внутривенной трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из пуповины человека, ребенку с синдромом Криглера–Найяра I типа в течение первых 2 лет жизни. Целью терапии явилось уменьшение продолжительности фототерапии при поддержании безопасного уровня билирубина в сыворотке крови.

В представленном наблюдении фототерапия была начата ребенку в возрасте 5 сут жизни, когда уровень билирубина составил 340 мкмоль/л, и проводилась в течение 16–18 ч ежедневно в неонатальном периоде. В дальнейшем продолжительность фототерапии была уменьшена до 14–16 ч. При этом уровень билирубина варьировал от 329 до 407 мкмоль/л. В возрасте 2 мес жизни было принято решение о проведении терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, на фоне которой отмечалось значительное снижение продолжительности фототерапии до 2 ч в день. В течение всего периода наблюдения, составляющего 2 года к моменту написания данной статьи, ребенок получил 6 введений мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Положительный эффект развивался в течение 4–7 дней после введения и сохранялся в течение 2–3 мес. Во время и после трансплантации не было отмечено побочных эффектов или осложнений.

Таким образом, внутривенная трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток является эффективной технологией лечения синдрома Криглера–Найяра I типа, уменьшающей потребность в проведении фототерапии, значительно улучшающей качество жизни пациентов и продлевающей жизнь с нативной печенью.

Ключевые слова: новорожденные дети, синдром Криглера–Найяра, гипербилирубинемия, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, фототерапия.

Для цитирования: Сухих Г.Т., Дегтярева А.В., Силачев Д.Н., Горюнов К.В., Дубровина И.В., Ушакова Л.В., Дегтярев Д.Н. Терапевтический эффект мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, полученных из пуповины человека, у пациента с синдромом Криглера–Найяра I типа. Рос вестн перинатол и педиатр 2019; 64:(4): 26–34. DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-26-34

The article presents the results of intravenous transplantation of allogeneic multipotent mesenchymal stromal cells, derived from a human umbilical cord, to a child with Crigler–Najjar syndrome type I during the first 2 years of life. The therapy is aimed at reduction of the duration of phototherapy while maintaining a safe level of serum bilirubin.

In this study, a five-day-old child with the bilirubin level of 340 μmol/l was treated with phototherapy for 16–18 hours daily in the neonatal period. Then, phototherapy was reduced to 14–16 hours. The level of bilirubin varied from 329 to 407 μmol/l. At the age of 2 months, it was decided to use multipotent mesenchymal stromal cells with a significant decrease in the duration of phototherapy up to 2 hours a day. During the observation period (2 years at the time of writing this article) the child received 6 injections of multipotent mesenchymal stromal cells. A positive effect developed within 4–7 days after administration and persisted for 2–3 months. There were no side effects or complications during and after transplantation.

Thus, intravenous transplantation of multipotent mesenchymal stromal cells is an effective treatment of Crigler–Najjar syndrome type I; it reduces the need for phototherapy, significantly improves the quality of life of the patients and prolongs their life with native liver.

Key words: newborns, Crigler–Najjar syndrome, hyperbilirubinemia, multipotent mesenchymal stromal cells, phototherapy.

For citation: Sukhikh G.T., Degtyareva A.V., Silachev D.N., Gorunov K.V., Dubrovina I.V., Ushakova L.V., Degtyarev D.N. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stem cells in a patient with Crigler–Najjar syndrome type I. Ros Vestn Perinatol i PEDIATR 2019; 64:(4): 26–34 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-26-34

Синдром Криглера–Найяра – тяжелая негемолитическая желтуха с повышением уровня в крови непрямого билирубина вследствие врожденной недостаточности фермента глюкуронилтрансферазы. Заболевание имеет аутосомно-рецессивный тип

наследования с частотой примерно 1 случай на 1 млн новорожденных детей в равной степени у мальчиков и девочек. Впервые данный синдром был описан в Иране в 1952 г. американскими педиатрами (Crigler John F. и Victor A. Sad Najjar) под названием неге-

молитическая наследственная гипербилирубинемия с ядерной желтухой [1]. В основе данного синдрома лежит полный или почти полный дефицит фермента глюкуронилтрансферазы, обусловленный мутацией гена *UGT1A1* (кодирующего UDP полипептид А1 семейства гликозилтрансфераз) [2]. Синдром Криглера–Найара I типа характеризуется полным отсутствием активности данного фермента и, как следствие, накоплением в организме в большом количестве неконъюгированного (непрямого) билирубина, способного проникать через гематоэнцефалический барьер и вызывать необратимые изменения в клетках головного мозга [3–5]. При синдроме Криглера–Найара I типа для снижения концентрации неконъюгированного билирубина и предотвращения билирубиновой энцефалопатии используются следующие терапевтические подходы: фототерапия, трансплантация гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток. Радикальный метод лечения заключается в трансплантации печени.

Фототерапия успешно снижает уровень билирубина в сыворотке крови, однако пациенты нуждаются в длительном ее проведении, как правило, не менее 12 ч в сутки, что значительно снижает качество их жизни и сопряжено с побочными эффектами [6].

Эффективность аллогенной трансплантации донорских гепатоцитов была показана на моделях животных, а также у пациентов с врожденными метаболическими заболеваниями, в том числе при синдроме Криглера–Найара I типа [7, 8]. Однако эффект при использовании этого метода не превышал 2 лет.

С учетом необходимости применения иммуносупрессивной терапии и технических трудностей с получением донорского материала данный подход не получил широкого применения.

Использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток – альтернативный подход для лечения метаболических нарушений. В ряде работ было показано, что при внутривенном введении эти клетки избирательно накапливаются в печени [9], могут дифференцироваться в гепатоциты и участвовать в регенерации печени [10, 11]. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки легко выделяются из плодных оболочек или плацентарного остатка пуповины, высвобождаемых после физиологических родов, и могут быть получены в необходимом количестве в относительно короткие сроки [12]. Накопленный в настоящее время опыт использования в клинической практике мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток свидетельствует об их безопасности, и, кроме того, не требует проведения иммуносупрессивной терапии [13].

В данном исследовании представлены результаты внутривенной трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из пуповины ребенку с синдромом Криглера–Найара I типа в течение первых 2 лет жизни. Целью терапии было уменьшение продолжительности фототерапии при поддержании безопасного уровня билирубина.

Методы исследования

Выделение и трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки получали из тканей послеродовой пуповины в ФГБУ «НМИЦАГиП им. В.И. Кулакова». Данная процедура была одобрена комитетом по этике данного учреждения. Все матери были соответствующим образом проинформированы и подписали свое согласие. Материнская кровь была проверена на наличие маркеров инфекционных заболеваний, включая ВИЧ I и II, гепатит В, гепатит С и сифилис в соответствии с действующими нормативными требованиями Национального комитета по биоэтике Российской Федерации и директивами ЕС 2004/23/ЕС и 06/86/ЕС. От каждого образца брали куски 8–10 см и промывали фосфатно-буферным физиологическим раствором, содержащим 200 ед/мл пенициллина и 0,2 мг/мл стрептомицина. После этого проводили первичный осмотр полученных образцов, в ходе которого были исследованы чистота и любые признаки наличия инфекций. Образцы, отвечающие принятым критериям, погружали в 0,5% раствор коллагеназы I типа (Gibco), разрезали на 2–3 мм, помещали в 50 мл стерильные пробирки и инкубировали 3–4 ч при температуре 37 °С, 5% CO₂ и 90% влажности. После инкубации образцы центрифугировали (3000 об/мин) в течение 3 мин, ресуспендировали в культуральной

© Коллектив авторов, 2019

Адрес для корреспонденции: Сухих Геннадий Тихонович – акад. РАН, проф., директор НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, ORCID: 0000-0002-7712-1260
e-mail: gtsukhikh@mail.ru

Дегтярева Анна Владимировна – д.м.н., зав. отделом педиатрии института неонатологии и педиатрии НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова; проф. кафедры неонатологии Института здоровья детей Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, ORCID: 0000-0003-0822-751X

Силачев Денис Николаевич – к.б.н., зав. лабораторией клеточных технологий НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова; ст. науч. сотр. НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, ORCID: 0000-0003-0581-9755

Горюнов Кирилл Владимирович – мл. науч. сотр. лаборатории клеточных технологий НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, ORCID: 0000-0002-8776-7196

Дубровина Ирина Вадимовна – ст. науч. сотр. лаборатории клеточных технологий НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, ORCID: 0000-0003-0061-3627

Ушакова Любовь Витальевна – невролог, к.м.н., Научно-консультативное педиатрическое отделение, врач-невролог отделения хирургии, реанимации и интенсивной терапии новорожденных НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова, ORCID: 0000-0002-9409-5404

Дегтярев Дмитрий Николаевич – д.м.н., проф., зам. директора по научной работе НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова; зав. кафедрой неонатологии Института здоровья детей Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, ORCID: 0000-0001-8975-2425.
117997 г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4

среде DMEM-F12 (ПанЭко, Россия), содержащей однозаменимые аминокислоты (GIBCO, США) 1X glutamax (gibco, США), пенициллин-стрептомицин (Gibco, США) 10 тыс. ед/мл, высаживали на полистирольные матрасы (Corning, США) и инкубировали в течение 2–3 дней. Затем среда была заменена на культуральную, состоящую из DMEM-F12 и среды MesenPRO RS с добавкой в пропорции 1:1. По достижении 70–80% конфлюэнтности клетки открепляли с помощью трипсина. Собранные клетки пересаживали на культуральные матрасы (Corning T-150, США) для дальнейшего наращивания клеточной массы. Клетки культивировали до третьего пассажа, а затем использовали для трансплантации пациенту. Перед трансплантацией оценивали жизнеспособность клеток, окрашивая аликвоту трипановым синим и анализируя с помощью счетчика клеток Countess II (Life sciences, США). После обследования клетки инкубировали с гепарином 10 ед/мл в течение 10 мин, снова отмывали. Трансплантацию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток проводили внутривенно в объеме 10 мл физиологического раствора в течение 10 мин, доза составляла $3 \cdot 10^6$ клеток/кг.

Фенотипирование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Для анализа экспрессии типичных белковых маркеров на клеточной поверхности прикрепленные к пластику клетки инкубировали с 0,25% трипсином (Gibco). Клетки отмывали в фосфатно-буферном физиологическом растворе и инкубировали в течение 10 мин с антителами из коммерческого набора MSC phenotyping kit (Miltenyi Biotec). Были использованы следующие моноклональные антитела человека: CD90-FITC (клон: DG3, изотип: IgG1 мыши), CD105-PE (клон: 43A4E1, изотип: IgG1 мыши), CD73-APC (клон: AD2 изотип: IgG1 мыши), CD45-PerCP (клон: 5v1, изотип: IgG2a мыши), CD14-PerCP (клон: TÜK4, изотип: IgG2a мыши), CD20 на PerCP (клон: LT20.B4, изотип: IgG1 мыши), CD34-PerCP (клон: AC136, изотип: IgG2a мыши); мышиные кон-

троли CD73-APC (клон: AD2, изотип: мышь IgG1), CD90-FITC (клон: DG3, изотип: мышь IgG1), CD105-PE (клон: 43A4E1, изотип: мышь IgG1). После инкубации в общей сложности 100 тыс. меченых клеток были проанализированы с помощью проточного цитометра FACSCANTO II (BD Biosciences USA). Клетки культивировали до третьего пассажа, затем собирали, промывали фосфатно-буферным физиологическим раствором и инкубировали с антителами, конъюгированными с флуорохромами. Уровни экспрессии CD90, CD105, CD73 были выше 95%, в то время как CD14, CD20, CD34 и CD45 не превышали 10% (рис. 1).

Измерение уровня билирубина. Исследование уровня билирубина выполняли 1–2 раза в день в течение 1-й недели жизни, затем каждые 3–5 дней в период стационарного лечения. После выписки исследование в среднем проводили 1 раз в 1–2 нед.

Для измерения билирубина сыворотки образцы крови собирали натошак из периферической вены в стерильные пробирки, содержащие активатор свертывания. В течение 1 ч после забора крови образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин и полученную сыворотку использовали для анализа. Уровни билирубина сыворотки определяли, используя автоматический биохимический анализатор («BioSystems», Испания) и коммерческий набор реактивов Bilirubin total («BioSystems», Испания). В данном методе билирубин реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, формируя окрашенный комплекс, который можно измерить спектрофотометрически. Предел детекции метода составлял 0,02 мг/дл = 0,34 мкмоль/л, а предел линейной зависимости – 20 мг/дл = 343 мкмоль/л.

Характеристика пациента и результаты исследования

Девочка Х. родилась у женщины 30 лет с отягощенным соматическим и акушерско-гинекологическим анамнезом. Женщина страдает наследственной

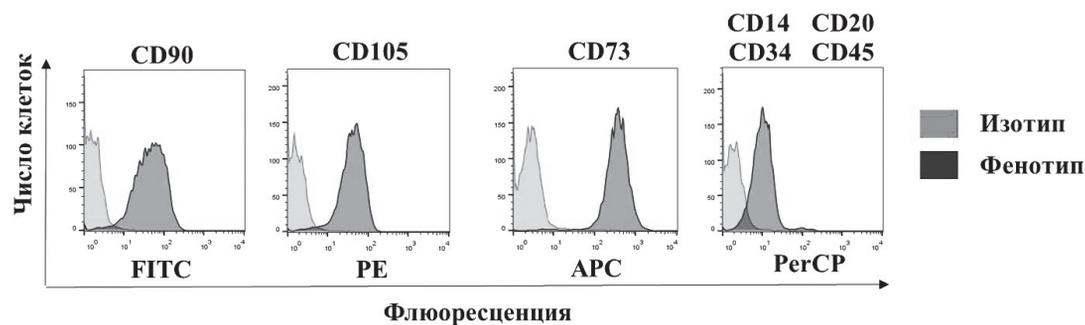


Рис. 1. Фенотипический анализ мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

Фенотип – результат инкубирования мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из тканей послеродовой пуповины с моноклональными антителами, конъюгированными с флуорохромами: CD90-FITC; CD105-PE; CD73-APC и CD45-, CD14-, CD20-, CD34-PerCP. Изотип – результат связывания моноклональных антител с антигенными детерминантами мыши, взятыми в качестве контроля: FITC, PE и APC – IgG1 мыши; PerCP – IgG1 и IgG2a мыши.

Fig. 1. Phenotypic analysis of multipotent mesenchymal stromal cells.

тромбофилией, хроническим тонзиллитом. Брак родственный (родители ребенка троюродные брат и сестра). Первая беременность закончилась прерыванием в 22–23 нед по медицинским показаниям в связи с гидроцефалией плода. Вторая беременность закончилась преждевременными родами в 28 нед, родилась девочка с массой тела 950 г и умерла в возрасте 4 сут жизни. Третья беременность закончилась родами в срок, родился здоровый мальчик с массой тела 3250 г. Настоящая беременность четвертая, протекала без особенностей. Роды 3, самостоятельные, в срок. Состояние ребенка при рождении удовлетворительное, оценка по шкале Апгар 8/8 баллов, масса тела 2950 г, длина 49 см, окружность головы 33 см, окружность груди 32 см.

Желтуха появилась на 2-е сутки жизни, уровень билирубина в сыворотке крови был 193 мкмоль/л с последующим нарастанием к 5-му дню жизни до 340 мкмоль/л. При обследовании выявлено повышение уровня билирубина за счет непрямой фракции в отсутствие снижения уровня гемоглобина. Функциональное состояние печени оставалось в пределах нормы. Дифференциальный диагноз проводился между врожденными и приобретенными причинами нарушения конъюгации билирубина. С 5-х суток жизни начата фототерапия в течение 16–18 ч ежедневно, попытки уменьшения продолжительности фототерапии сопровождались нарастанием уровня билирубина, в связи с чем был предположен синдром Криглера–Найяра. Диагноз подтвердился на основании результатов молекулярно-генетического обследования. В экзоне 2 гена *UGT1A1* была обнаружена мутация с.901G>A (p.Gly301Arg) в гомозиготном состоянии. В промоторной области гена *UGT1A1* было зарегистрировано увеличение числа «ta» повторов в гомозиготном состоянии.

Сывороточная концентрация билирубина в период стационарного лечения варьировала от 245 до 407 мкмоль/л (рис. 2). В возрасте 55 дней жизни ребенок был выписан домой, где продолжал получать фототерапию в течение 14–16 ч ежедневно, что позволило избежать потенциально опасного уровня билирубина и предупредить билирубиновое поражение мозга.

В возрасте 8 нед жизни было принято решение о начале терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками. При проведении данной терапии мы ставили задачу уменьшить продолжительность фототерапии при поддержании потенциально неопасного уровня билирубина, составляющего менее 500 мкмоль/л.

Перед первым введением уровень билирубина составил 390 мкмоль/л, фототерапия проводилась в среднем 16 ч в день. Через 5 дней после первой трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток отмечалось снижение уровня билирубина с 390 до 156 мкмоль/л, что позволило уменьшить продолжительность фототерапии до 5 ч ежедневно под контролем уровня билирубина в сыворотке крови (рис. 3). В течение 7 нед фототерапия проводилась по 5 ч в день под контролем содержания билирубина каждую неделю; его уровень не превышал 500 мкмоль/л, варьировал от 290 до 412 мкмоль/л.

В возрасте 15 нед было проведено повторное введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, через 4 дня после которого продолжительность фототерапии сокращена до 4 ч в день (см. рис. 3). Полученный эффект сохранялся в течение 8 нед с постепенным увеличением уровня билирубина и повышением потребности в проведении фототерапии до 9 ч ежедневно, что определило показания к следующему введению. После третьего введения мультипотентных

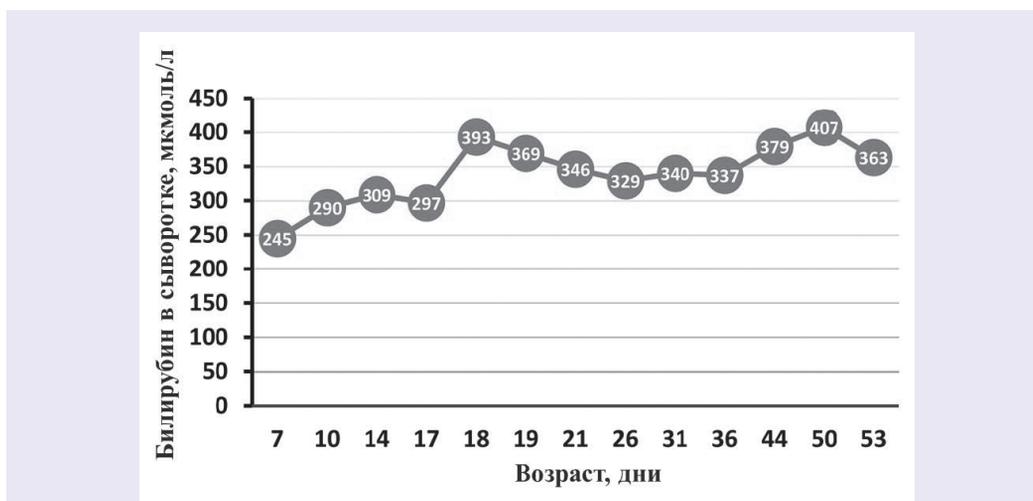


Рис. 2. Динамика концентрации общего билирубина в сыворотке крови в течение 55 дней жизни на фоне фототерапии в течение 16–18 ч в день.

Fig. 2. Dynamics of serum total bilirubin level during 55 days of life on phototherapy for 16–18 hours per day.

мезенхимальных стромальных клеток в возрасте 24 нед удалось значительно снизить потребность в фототерапии до 2 ч в день (см. рис. 3).

Следующее введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток было выполнено в возрасте 41 нед, когда отмечались очередной эпизод повышения уровня билирубина до 443 мкмоль/л и увеличение потребности в проведении фототерапии до 8 ч ежедневно. В течение следующих 22 нед до 64-й недели жизни уровень билирубина варьировал от 244 до 400 мкмоль/л на фоне фототерапии 4 ч в день. Пятое введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток осуществлено в 64 нед и шестое введение – в возрасте 85 нед, что позволило поддерживать продолжительность фототерапии на уровне 4 ч в день. Побочные эффекты как в раннем периоде после введения, так и в отдаленные сроки не выявлены.

В процессе динамического наблюдения ребенка мы осуществляли контроль за основными биохимическими показателями крови с определением уровня билирубина и его фракций, проводили ультразвуковое исследование органов брюшной полости, почек, сердца, головного мозга. При этом патологические изменения выявлены не были. Темпы психомоторного развития ребенка на протяжении всего периода наблюдения оставались в пределах нормы. В возрасте 2 лет физическое и психомоторное развитие ребенка соответствовало возрастной норме. Масса 11,8 кг, рост 86 см, окружность головы 48 см. При детальном неврологическом осмотре было выявлено, что обоняние, зрение и слух не нарушены. Фотореакции живые, симметричные. Страбизма, нистагма и бульбарных нарушений нет. Движения глазных яблок в полном объеме. Лицевая мускулатура симметричная. Положение головы, плеч

по средней линии. Объем активных и пассивных движений в норме. Мышечный тонус физиологический, симметричный. Сухожильно-периостальные рефлексы живые, симметричные, рефлексогенные зоны не изменены. Ребенок ходит самостоятельно, уверенно, бегаёт, прыгает на 2 ногах. Физиологические отправления в норме.

Обсуждение

Синдром Криглера–Найяра I типа – очень редкое заболевание, первичный патологический дефект при котором локализуется в клетках печени, тогда как органом-мишенью является головной мозг. При этом заболевании накапливается непрямой билирубин – жирорастворимое соединение, способное проникать через гематоэнцефалический барьер, вызывая необратимые изменения клеток головного мозга – ядерную желтуху, нарушая процессы клеточного дыхания, синтез белка и ионного обмена. Было показано *in vitro*, что воздействие билирубина на культуру нейронов вызывает их апоптоз. При попадании в митохондрии билирубин ингибирует клеточное дыхание, нарушает структуру мембранных белков и тем самым вызывает выход в цитозоль митохондриальных цитохромов, ответственных за индукцию апоптоза [3, 4].

Консервативный метод лечения данного синдрома состоит в фототерапии, наиболее высокая потребность в которой существует в неонатальном периоде, что связано с более высокой чувствительностью гематоэнцефалического барьера [13]. Потенциально опасным считается уровень билирубина 340 мкмоль/л, тогда как у детей старше 1 мес жизни порог чувствительности гематоэнцефалического барьера повышается до 500 мкмоль/л. Интенсивность фототерапии в неонатальном периоде может

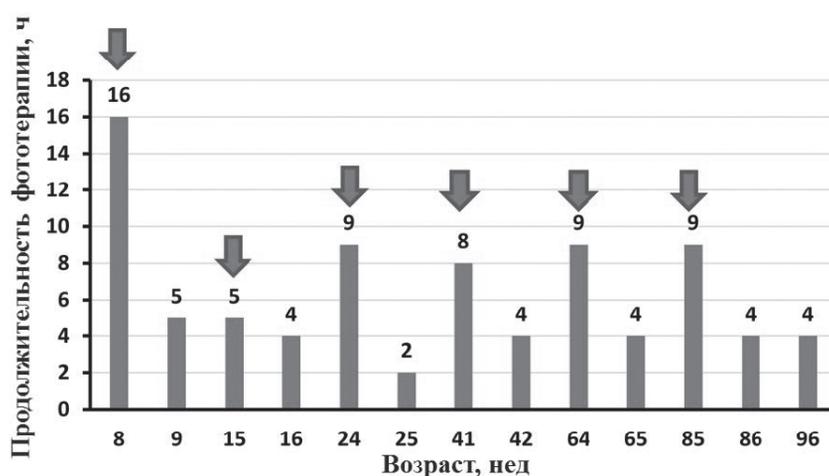


Рис. 3. Время фототерапии в течение терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками. Для снижения времени фототерапии проводили 6 трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (стрелки).

Fig. 3. Time of phototherapy during therapy by multipotent mesenchymal stromal cells.

достигать 18–20 ч в день, в дальнейшем уменьшается до 14–16 ч ежедневно [6]. Поскольку лечение симптоматическое, то должно осуществляться в течение всей жизни. Эффективность данного лечения уменьшается с возрастом пациента и может вызывать ряд побочных эффектов, таких как нарушение водного и солевого баланса, синдром «бронзового» ребенка, нарушение циркадного ритма и снижение общения матери и ребенка. Кроме того, фототерапия может быть связана с долгосрочными побочными эффектами, такими как фотостарение кожи, дисплазия невусов и рак кожи; кроме того, возможно возникновение аллергических заболеваний.

Радикальный метод лечения заключается в трансплантации печени, выполнение которой сопряжено с риском развития целого ряда интра- и послеоперационных осложнений, а также необходимостью пожизненной иммуносупрессивной терапии [5, 6]. В детской практике чаще используется родственная трансплантация, а это предполагает резекцию части печени у здорового донора. При синдроме Криглера–Найяра I типа трансплантацию печени рекомендуется осуществлять после 2-летнего возраста, что уменьшает риск развития осложнений.

В качестве альтернативного метода лечения рассматривается трансплантация гепатоцитов, в результате которой происходит приживление донорских клеток в различных органах реципиента и, как следствие, замещение недостающих метаболических функций. В настоящее время накоплен опыт использования трансплантации гепатоцитов при ряде метаболических заболеваний печени, таких как недостаточность орнитинтранскарбамилазы, альфа-1-антитрипсина, болезнь Вильсона–Коновалова, различные нарушения обмена гликогена и др. [8, 14].

Имеются клинические данные об успешном лечении синдрома Криглера–Найяра I типа гепатоцитами, полученными из трупной печени 5-летнего мальчика. После разовой трансплантации гепатоцитов в дозе $7,5 \cdot 10^9$ наблюдалось снижение уровня непрямого билирубина в крови на протяжении 11 мес [7]. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования подтвердили эффективность трансплантации гепатоцитов, однако эффект ограничен во времени и, как правило, не превышает 1,5 года; при этом уровни непрямого билирубина остаются выше физиологической нормы, а пациенты нуждаются в постоянной фототерапии, но в течение менее продолжительного времени. Кроме того, введение гепатоцитов (в большинстве случаев используют аллогенные клетки), как и при трансплантации печени, обуславливает необходимость иммуносупрессивной терапии. Ограничивающим фактором служит отсутствие гепатоцитов хорошего качества, так как их преимущественно получают из органов, не пригодных для трансплантации [8, 14]. Таким образом, применение терапии стволовыми клетками

имеет ряд преимуществ. Прежде всего, не требуется иммуносупрессивная терапия, а в качестве источника возможно использование фетальных прогениторных клеток гепатоцитов и мезенхимальных стромальных клеток. Фетальные прогениторные клетки гепатоцитов являются плюрипотентными предшественниками гепатобластов, гепатоцитов, а также эпителиальных клеток желчных протоков, поэтому способны замещать функциональную активность клеток печени [15]. Как свидетельствуют результаты, полученные в ряде лабораторий, прогениторные клетки могут быть легко выделены, способны встраиваться в поврежденные участки и формировать ткань печени [8, 14, 16].

В экспериментальной модели синдрома Криглера–Найяра была продемонстрирована более высокая терапевтическая эффективность фетальных прогениторных клеток гепатоцитов человека по сравнению со взрослыми гепатоцитами [17]. В 2008 г. для терапии синдрома Криглера–Найяра I типа 2-летней девочке была проведена трансплантация фетальных прогениторных клеток гепатоцитов с положительной динамикой снижения уровня билирубина в крови. Во время и после трансплантации клеток не было отмечено побочных эффектов и осложнений [18]. Таким образом, фетальные прогениторные клетки гепатоцитов могут быть эффективно использованы для терапии не прямой гипербилирубинемии, однако, несмотря на высокую терапевтическую эффективность, их применение неприемлемо с точки зрения морально-этических аспектов, а также установленных организациями-регуляторами законов [18].

В связи с этим в качестве замены фетальных прогениторных клеток гепатоцитов используются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Многочисленные клинические исследования показали высокую терапевтическую эффективность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в отношении заболеваний, связанных с аутоиммунными и метаболическими дисфункциями, в том числе при заболеваниях печени [19]. Клетки данного типа обладают высоким терапевтическим потенциалом в связи с их ангиогенными, противоапоптотическими, противofiброзными и иммуномодулирующими свойствами. Кроме того, привлекательны многообразие источников и доступность получения этих клеток из пуповины или плаценты. Накопленные в литературе данные отчетливо демонстрируют, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из перинатальных источников дают больший терапевтический эффект, чем взрослые мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки. Было показано, что сочетанная трансплантация этих клеток может усилить приживление гепатоцитов путем синтеза ростовых факторов, необходимых для выживания гепатоцитов и уменьшения

выработки аутоантител [20]. Так, в исследовании на крысах линии Gunn с гипербилирубинемией, у которых отсутствовал фермент глюкуронилтрансфераза, внутрибрюшинное введение альгинатных капсул, содержащих в себе аллогенные гепатоциты вместе с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга, приводило к более выраженному снижению уровня билирубина в крови, чем введение альгинатных капсул, содержащих только гепатоциты. Авторы объясняют данный феномен поддержкой выживания гепатоцитов за счет взаимодействия с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками [20].

В исследовании *in vitro* было показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки в определенных условиях культивирования могут экспрессировать гены, характерные для гепатоцитов, и проявлять их некоторые метаболические функции, претерпевая фенотипические изменения. Получены обнадеживающие данные как с применением мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток животных, так и в работах с клетками человека [21, 22]. Было показано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека, полученные от родильниц, под действием среды для дифференцировки гепатоцитов, содержащей фактор роста гепатоцитов, фактор роста фибробластов и эпидермальный фактор роста, в условиях *in vitro* начинали приобретать признаки гепатоцитов. Эти признаки заключались в синтезе мочевины, гликогена, активности цитохрома P450 и экспрессии карбамоилфосфатсинтетазы. Полученные из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток предшественники гепатоцитов трансплантировали мышам, которым предварительно удалили левую долю печени. Было отмечено, что прегепатоциты более эффективно приживляются в печени, образуя большие островки клеток. При этом обе группы (дифференцированные и нативные) образовывали функционально активные гепатоциты, синтезирующие альбумин и другие соединения [10, 11, 23].

В другой работе было продемонстрировано, что мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки пуповины дифференцируются в гепатоциты гораздо эффективнее, чем мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга [11]. Одно из недавних исследований показало перспективу применения аутологических мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, которые были получены из костного мозга пациентов, страдающих сердечной недостаточностью. Выделенные клетки культивировали на искусственном клеточном матриксе, состоящем из комбинации желатина и полилактата, в среде, содержащей вытяжку из печени больных, обогащенной фактором роста гепатоцитов. В итоге через 3 нед были зарегистрированы морфологические и функциональные изме-

нения в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках, которые проявились в изменении веретеновидной формы на кубоидальную и экспрессии альфа-фетопротеина, сывороточного альбумина, цитокератина-18 и активации системы цитохрома P450 [22].

Однако в случае обширного поражения ткани печени у пациентов, особенно у детей, необходимо принимать срочные меры и предпочтительнее использовать аллогенные недифференцированные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, которые за счет своих паракринных эффектов начнут поддержку поврежденной ткани печени. Многочисленные исследования свидетельствуют, что наиболее эффективный способ, по всей видимости, – системное введение аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. При этом, по данным наблюдений [24], мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки некоторое время задерживаются в большом количестве в легких и печени, после чего за счет направленной миграции попадают в поврежденные участки и, вероятно, под действием микроокружения оказывают свои протекторные эффекты. В условиях микроокружения печени мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки за счет паракринных механизмов оказывают свой терапевтический эффект, снижая воспалительную реакцию, защищая гепатоциты от дальнейшего разрушения, а также, вероятно, запуская конечную дифференцировку предшественников гепатоцитов или становясь гепатоцитами [11].

Помимо положительного терапевтического влияния на пораженную ткань печени, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки оказывают значительное нейропротекторное действие. Известно, что развивающаяся гипербилирубинемия при синдроме Криглера–Найяра I типа может стать причиной поражения клеток головного мозга, так как хронически высокий уровень непрямого билирубина постоянно создает риск повреждения нейронов [3, 25]. Было показано, что трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток снижает выраженность энцефалопатии у крыс с ядерной желтухой [26]. Эффективность трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток была также продемонстрирована для лечения ряда нейродегенеративных заболеваний и патологических состояний головного мозга [27]. Представленные данные послужили основой для использования таких клеток при лечении описанного нами пациента.

В рассмотренном наблюдении ребенка с синдромом Криглера–Найяра I типа фототерапия была начата в возрасте 5 сут, когда уровень билирубина составил 340 мкмоль/л, и проводилась в течение 16–18 ч ежедневно в неонатальном периоде. В дальнейшем продолжительность фототерапии была уменьшена до 14–16 ч. При этом уровень били-

рубина сохранялся на высоком уровне и варьировал от 329 до 407 мкмоль/л. Наш предыдущий опыт наблюдения пациента с данным синдромом в течение первого года жизни свидетельствует о высокой потребности в фототерапии, которая с возрастом не уменьшается [6].

В представленном наблюдении при достижении ребенком возраста 2 мес жизни было принято решение о проведении терапии мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, на фоне которой отмечалось значительное снижение продолжительности фототерапии. В течение всего периода наблюдения, составляющего 2 года к моменту написания данной статьи, ребенок получил 6 введений мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Положительный эффект развивался в течение 4–7 дней после введения и сохранялся в течение 2–3 мес. Во время и после трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток не было отмечено побочных эффектов или осложнений. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, в которых показано, что введение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при лечении синдрома Криглера–Найяра приводило к снижению уровня несвязанного билирубина уже на 10-й день после введения и удерживало его на низком уровне в течение 2 мес [18]. Трансплантация гепатоцитов от трупной печени продемонстрировала более низкую эффективность, так как уровень билирубина после трансплантации начал снижаться только на 11-е сутки и лишь к 30-м суткам стабилизировался и снизился с 495 до 274 мкмоль/л; одновременно в течение всего периода наблюдения пациент получал традиционную фототерапию [7].

Отсутствие длительного эффекта от трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток можно объяснить тем, что аллогенные клетки в течение нескольких месяцев элиминируются из организма реципиента. Наблюдаемый нами транзитный терапевтический эффект согласуется с данными других авторов, исследовавших длительные эффекты мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Хорошо известно, что при внутривенном введении основанная масса этих клеток мигрирует в паренхиматозные органы (легкие, печень) [9], где клетки остаются жизнеспособными в течение нескольких месяцев. Например, Н. Katagiri и соавт. [28] показали, что меченые мультипотентные мезенхи-

мальные стромальные клетки костного мозга человека при системном введении мышам, подвергшимся частичной резекции печени, появились в печени с последующей в течение месяца дифференцировкой в холангиоциты и гепатоциты. При этом недифференцированные меченые мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки обнаруживали вплоть до 4-й недели исключительно в зоне повреждения. Авторы также отмечают, что все клетки, дифференцировавшиеся из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, обладали функциональной активностью и синтезировали ряд специфических для печени факторов, таких как альбумин, α -1-антитрипсин [28]. Аналогичные результаты были получены на модели фульминантной печеночной недостаточности, при которой мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки человека встраивались в печеночную ткань, однако процент встраивания к 4-й неделе составлял не более 4% [29]. В клинических исследованиях было показано, что в условиях развития первичного билиарного цирроза трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека трижды через каждые 4 нед обеспечивала терапевтический эффект на протяжении 48 нед, что выражалось в значительном снижении уровня щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы (на протяжении 24 нед), при этом у 60% пациентов улучшился прогноз по шкале риска Мейо [30]. В других клинических исследованиях по лечению цирроза также отмечено терапевтическое действие мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в пределах от одного до нескольких месяцев при однократном введении и более пролонгированный эффект при многократной их трансплантации [17].

Заключение

Таким образом, трансплантация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток является эффективной технологией лечения синдрома Криглера–Найяра I типа, уменьшающей потребность в проведении фототерапии, значительно улучшающей качество жизни и продлевающей жизнь пациентов с нативной печенью. Важное преимущество перед родственной трансплантацией печени и трансплантацией аллогенных донорских гепатоцитов состоит в отсутствии необходимости использования иммуносупрессивных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Crigler J.F., Najjar V.A. Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus. *Pediatrics* 1952; 10: 169–180.
2. Servedio V., d'Apolito M., Maiorano N., Minuti B., Torricelli F., Ronchi F. et al. Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler–Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat* 2005; 25: 325–329. DOI: 10.1002/9322
3. Haustein M.D., Read D.J., Steinert J.R., Pilati N., Dinsdale D., Forsythe I.D. Acute hyperbilirubinaemia induces presynaptic neurodegeneration at a central glutamatergic synapse.

- J Physiol (Lond.) 2010; 588: 4683–4693. DOI: 10.1113/jphysiol.2010.199778
4. Hachiya Y., Hayashi M. Bilirubin encephalopathy: a study of neuronal subpopulations and neurodegenerative mechanisms in 12 autopsy cases. *Brain Dev* 2008; 30: 269–278. DOI: 10.1016/j.braindev.2007.08.013
 5. Володин Н.Н., Дегтярев Д.Н., Дегтярева А.В., Нароган М.В. Желтухи новорожденных. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2019; 192. [Volodin N.N., Degtyarev D.N., Degtyareva A.V., Narogan M.V. Neonatal jaundice. М.: GEOTAR-Media, 2019; 192. (in Russ.)].
 6. Дегтярев Д.Н., Иванова (Дегтярева) А.В., Сигова Ю.А. Синдром Криглера–Найара. Российский вестник перинатологии и педиатрии 1998; 4: 44–48. [Degtyarev D.N., Ivanova (Degtyareva) A.V., Sigova Yu.A. Crigler–Najjar syndrome. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii* (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics) 1998; 4: 44–48. (in Russ.)].
 7. Fox I.J., Chowdhury J.R. Hepatocyte transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4(Suppl 6): 7–13. DOI: 10.1016/j.jhep.2004.04.009
 8. Dhawan A., Mitry R.R., Hughes R.D. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29: 431–435. DOI: 10.1007/s10545-006-0245-8
 9. Silachev D.N., Kondakov A.K., Znamenskii I.A., Kurashvili Y.B., Abolenskaya A.V., Antipkin N.R. et al. The Use of Technetium-99m for Intravital Tracing of Transplanted Multipotent Stromal Cells. *Bull Exp Biol Med* 2016; 162: 153–159. DOI: 10.1007/s10517-016-3565-1
 10. Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(Suppl 2): 112–120. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2011.07024.x
 11. Alfaiji M., Eom Y.W., Newsome P.N., Baik S.K. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *J Hepatol* 2018; 68: 1272–1285. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.030
 12. Lim R. Concise Review: Fetal Membranes in Regenerative Medicine: New Tricks from an Old Dog? *Stem Cells Transl Med* 2017; 6: 1767–1776. DOI: 10.1002/sctm.16-0447
 13. Toyserkani N.M., Jørgensen M.G., Tabatabaieifar S., Jensen C.H., Sheikh S.P., Sorensen J.A. Concise Review: A Safety Assessment of Adipose-Derived Cell Therapy in Clinical Trials: A Systematic Review of Reported Adverse Events. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6: 1786–1794. DOI: 10.1002/sctm.17-0031
 14. Ribes-Koninckx C., Ibars E.P., Calzado Agrasot M.Á., Bonora-Centelles A., Miquel B.P., Vila Carbó J.J. et al. Clinical outcome of hepatocyte transplantation in four pediatric patients with inherited metabolic diseases. *Cell Transplant* 2012; 21: 2267–2282. DOI: 10.3727/096368912X637505
 15. Tolosa L., Pareja-Ibars E., Donato M.T., Cortés M., López S., Jiménez N. et al. Neonatal livers: a source for the isolation of good-performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell Transplant* 2014; 23: 1229–1242. DOI: 10.3727/096368913X669743
 16. Tsuchiya A., Kojima Y., Ikarashi S., Seino S., Watanabe Y., Kawata Y., Terai S. Clinical trials using mesenchymal stem cells in liver diseases and inflammatory bowel diseases. *Inflamm Regen* 2017; 37: 16. DOI: 10.1186/s41232-017-0045-6
 17. Tolosa L., López S., Pareja E., Donato M.T., Myara A., Nguyen T.H. et al. Human neonatal hepatocyte transplantation induces long-term rescue of unconjugated hyperbilirubinaemia in the Gunn rat. *Liver Transpl* 2015; 21: 801–811. DOI: 10.1002/lt.24121
 18. Kobayashi K., Suzuki K. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Based Therapy for Heart Failure – What Is the Best Source? *Circ J* 2018; 82: 2222–2232. DOI: 10.1253/circj.CJ-18-0786
 19. Kwon A., Kim Y., Kim M., Kim J., Choi H., Jekarl D.W. et al. Tissue-specific Differentiation Potency of Mesenchymal Stromal Cells from Perinatal Tissues. *Sci Rep* 2016; 6: 23544. DOI: 10.1038/srep23544
 20. Fitzpatrick E., Wu Y., Dhadda P., Hughes R.D., Mitry R.R., Qin H. et al. Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes. *Cell Transplant* 2015; 24: 73–83. DOI: 10.3727/096368913X674080
 21. Campard D., Lysy P.A., Najimi M., Sokal E.M. Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* 2008; 134(3): 833–848. DOI: 10.3390/cells1041061 Sep 07, 2014
 22. Bishi D.K., Mathapati S., Venugopal J.R., Guhathakurta S., Cherian K.M., Verma R.S., Ramakrishna S.A. Patient-Inspired Ex Vivo Liver Tissue Engineering Approach with Autologous Mesenchymal Stem Cells and Hepatogenic Serum. *Adv Healthc Mater* 2016; 5: 1058–1070. DOI: 10.1002/adhm.201500897
 23. Aurich H., Sgodda M., Kaltwasser P., Vetter M., Weise A., Liehr T. et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 2009; 58: 570–581. DOI: 10.1136/gut.2008.154880
 24. Jin S.-Z., Liu B.-R., Xu J., Gao F.-L., Hu Z.-J., Wang X.-H. et al. Ex vivo-expanded bone marrow stem cells home to the liver and ameliorate functional recovery in a mouse model of acute hepatic injury. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11(1): 66–73. DOI: 10.1016/S1499-3872(11)60127-6
 25. Falcão A.S., Silva R.F.M., Vaz A.R., Gomes C., Fernandes A., Barateiro A. et al. Cross-talk between neurons and astrocytes in response to bilirubin: adverse secondary impacts. *Neurotox Res* 2014; 26: 1–15. DOI: 10.1007/s12640-013-9427-y
 26. Amini N., Vousooghi N., Hadjighassem M., Bakhtiyari M., Mousavi N., Safakheil H. et al. Efficacy of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Neonatal Bilirubin Encephalopathy in Rats. *Neurotox Res* 2016; 29: 514–524. DOI: 10.1007/s12640-016-9599-3
 27. Uccelli A., Benvenuto F., Laroni A., Giunti D. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 2011; 24: 59–64. DOI: 10.1016/j.beha.2011.01.004
 28. Katagiri H., Kushida Y., Nojima M., Kuroda Y., Wakao S., Ishida K. et al. A Distinct Subpopulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Muse Cells, Directly Commit to the Replacement of Liver Components. *Am J Transplant* 2016; 16: 468–483. DOI: 10.1111/ajt.13537
 29. Kuo T.K., Hung S.-P., Chuang C.-H., Chen C.-T., Shih Y. R.V., Fang S.-C.Y. et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134: 2111–2121, 2121.e1–3. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.015
 30. Wang L., Li J., Liu H., Li Y., Fu J., Sun Y. et al. Pilot study of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell transfusion in patients with primary biliary cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28(Suppl 1): 85–92. DOI: 10.1111/jgh.12029

Поступила: 25.06.19

Received on: 2019.06.25

Конфликт интересов:

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

Conflict of interest:

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.