

На правах рукописи



ШЕРАЛИЕВ

Аслан Рахимджонович

**ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛЕЧЕНИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ
АУТОЛОГИЧНОГО КОСТНОГО МОЗГА
У ПАЦИЕНТОВ С ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ**

14.01.17 – хирургия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: **Поликарпов Алексей Александрович**
доктор медицинских наук

Научный консультант: **Гранов Дмитрий Анатольевич**
академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «__» _____ 2021 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.116.01 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А. М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197758, г. Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70 и на сайте центра: <https://rccrst.ru/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук



Генералов Михаил Игоревич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Цирроз печени (ЦП) – терминальная стадия хронического заболевания, вызванный вирусными гепатитами (В, С), алкогольной и неалкогольной жировой болезнью печени, аутоиммунным заболеванием или в результате ферментопатии, атрезии желчных протоков. Это сопровождается тяжелым хроническим воспалением, некрозом гепатоцитов и фиброзом печени. Заболевание необратимо прогрессирует, приводит к декомпенсации функции печени и смерти (Александров В.Н. и др., 2014; Ивашкин В.Т. и др., 2016; Goldberg D. et al., 2017). В настоящее время единственным способом решения этой проблемы является ортотопическая трансплантация печени (ОТП) (Гранов А.М. и др., 2012; Готье С.В., 2017; Pais R. et al., 2016).

Однако трансплантация, как вид оказания высокотехнологичной медицинской помощи населению РФ остается на одном из последних мест по темпам развития, охватывая лишь незначительную часть жителей страны, нуждающихся в пересадке различных органов, уступая США и Европейскому Союзу в десятки раз по числу выполненных операций из расчета на 1 млн. населения (Готье С.В., 2017; Fayek S.A. et al., 2016). В Российской Федерации по-прежнему существует значительный дефицит донорских органов. Так, согласно XII сообщению регистра Российского трансплантологического общества по итогам 2019 г. показатель донорства печени в Российской Федерации составляет 4,0 на 1 млн. населения. В период 2012-2019 гг. в РФ наблюдается увеличение числа пациентов в листе ожидания трансплантации печени в 4,2 раза (с 488 до 2 060 человек). Показатель смертности в период ожидания трансплантации печени в РФ в 2019 г. составил 8,2% (170 пациентов (Готье С.В. и др., 2020)). Все инвазивные лечебные методики, выполняемые до трансплантации печени направлены на профилактику геморрагических осложнений портальной гипертензии вследствие прогрессирования цирроза печени (Котив Б.Н., Дзидзава И.И. и др., 2015; Бугаев С.А. и др., 2017).

Таким образом, в условиях ограниченности трансплантологической помощи и отсутствия эффективного лекарственного препарата, улучшающего синтетическую функцию печени, актуальным является поиск и разработка новых технологий терапии и поддержки пациентов с конечной стадией заболевания печени (Скурихин Е.Г. и др., 2020). Данная проблема актуальна, в том числе и для кандидатов на ОТП. Наиболее вероятным методом снижения смертности от печеночной недостаточности в «листе ожидания» на ОТП может стать методика клеточных и биологических технологий, что вероятно послужит хорошим «мостом» к пересадке печени. Клетки костного мозга (КМ) в первую очередь безопасно и успешно применяются в лечении гематологических заболеваний (Sassoli C. et al., 2018). Экстрапечёночные стволовые клетки экзогенного и эндогенного происхождения могут колонизировать печень и экспрессировать специфический маркер гепатоцитов (Yang X. et al., 2020). В эксперименте исследователями показано увеличение уровня общего белка и альбумина и снижение уровня печеночных ферментов. Также, при сравнении

внутрипортального и внутривенного способа введения стволовых клеток с целью улучшения регенерации печеночной ткани наиболее эффективным оказался способ введения, обеспечивающий непосредственную доставку стволовых клеток в печень (Коткас И.Е., Земляной В.П., 2020).

После множества экспериментов *in vitro* и *in vivo*, положено начало клиническим исследованиям и были проведены испытания I, II фазы, где доказана безопасность и эффективность применения СК при ЦП (Khan A.A. et al., 2008; Nikeghbalian S. et al., 2011; Pai M. et al., 2012; Tao Y.C. et al., 2018).

Так, показана определенная эффективность при системном внутривенном введении моноклеарных клеток (МНК) КМ человека (Shuji Terai et al., 2006). При внутрипортальном и внутриартериальном введении ГСК (CD34⁺, CD133⁺) в печень продемонстрировано увеличение объема органа перед предстоящей расширенной гемигепатэктомией (Jan Schulte am Esch et al. 2008). В случае ЦП отмечено снижение уровня общего билирубина и повышения уровня альбумина сыворотки крови (Levicar N. et al., 2008; Pai M. et al. 2008).

И все же количество известных клинических исследований ограничено, в связи с чем остается актуальным вопрос о способах получения ГСК, методологии их доставки и оценки клинической эффективности.

Таким образом, работа является весьма актуальной и имеет немаловажное практическое значение в гепатохирургии, регенеративной медицине, трансплантации и в технологии миниинвазивного хирургического лечения печеночной недостаточности.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является разработка и клиническое применение новой технологии лечения пациентов с циррозом печени моноклеарными клетками аутологичного костного мозга.

Задачи исследования

1. Разработать методику безопасного получения костного мозга у пациентов со значимым ЦП и коагулопатией.
2. Изучить возможности аппаратной сепарации жизнеспособных моноклеарных клеток аутологичного костного мозга для последующего внутрипортального введения.
3. Разработать способ безопасной интрапортальной доставки моноклеарных клеток аутологичного костного мозга при ЦП.
4. Определить оптимальную скорость внутрипортального введения аутологичной клеточной суспензии с учетом патофизиологических особенностей портального кровотока при ЦП.
5. Изучить результаты интрапортального введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга у пациентов с печеночной недостаточностью.

Научная новизна исследования

Впервые использована методика таргетной интрапортальной доставки МНК в печень. В процессе данного исследования показана безопасность получения КМ методом трепан-аспирации с высоким содержанием жизнеспособных моноклеарных клеток (МНК) аутологичного костного мозга (свыше 90%) для последующего внутрипортального введения (патент RU

2671560 С1 от 02.11.2018) пациентам с ЦП. Впервые обоснована методика оптимального введения МНК, что в свою очередь позволяет добиться персонализированного лечения, обеспечивающего индивидуальный подход к пациенту исходя из патофизиологических особенностей портального кровотока.

Практическая значимость исследования

По окончании данного исследования создана и внедрена в клиническую практику минимально инвазивная технология внутриворотальной терапии моноклеарными клетками аутологичного костного мозга у пациентов с печеночной недостаточностью (циррозы). Показана возможность использования разработанной технологии для лечения печеночной недостаточности у больных в «листе ожидания» трансплантации печени.

Методология и методы исследования

Теоретической и методологической основой исследования послужили работы отечественных и зарубежных ученых в области хирургии, трансплантации, регенеративной медицины и клеточной биологии. При разработке и клиническом применении новой технологии лечения печеночной недостаточности использованы общие и частные методы исследования, в частности сравнительный анализ пациентов получающих стандартную консервативную медикаментозную терапию и лечение с применением клеточных технологий (внутрипортального введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга).

Объект исследования – пациенты с печеночной недостаточностью различного генеза на цирротической стадии заболевания. Для репрезентативности исследования в зависимости от получаемой методики лечения пациенты разделены на две группы (исследуемая, контрольная) и были сопоставлены по характеру и тяжести заболевания. Работа основана на анализе результатов полученных у 32 пациентов: 17 в исследуемой группе и 15 больных в группе контроля. Пациенты из исследуемой группы были отобраны из амбулаторного центра трансплантации ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» МЗ РФ и анализированы проспективно. Пациенты из группы контроля наблюдались в амбулаторном порядке с 2014 по 2019 года в двух учреждениях: СПб ГБУЗ поликлиника № 104, амбулаторный центр трансплантации ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» МЗ РФ и анализированы ретроспективно. Все пациенты стратифицированы по диагнозу, гендерному признаку и тяжести печеночной недостаточности шкале MELD – Na (model of end – stage liver disease – Na) и СТР (Child-Turcotte-Pugh). Исследование носит не рандомизированный характер.

Сбор данных переменных значений осуществлялся при помощи программы Excel версии 16.16 пакет Microsoft Office 2016. Последующий статистический анализ полученных переменных значений проводился при помощи программного обеспечения IBM SPSS Statistics версия 25.

Для оценки изменений показателей в динамике и отличия среднего значения использовался t-критерий Стьюдента для парных выборок. При статистической обработке определяли средние арифметические величины и ошибку репрезентативности ($M \pm m$). Для определения достоверного различия в группах

использовался непараметрический критерий Манна – Уитни (U), а также таблица сопряженности с оценкой критерия Хи-квадрат Пирсона (χ^2). В ходе анализа выживаемости в исследуемой и группе контроля использована функция дожития Kaplan – Maier с последующим сравнением при помощи статистической гипотезы Log Rank (Mantel – Cox). Для уточнения связи между независимыми переменными значениями использовался корреляционный анализ Пирсона.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Билатеральный забор костного мозга из заднего бугра гребня подвздошной кости является безопасным у пациентов с выраженным ЦП, коагулопатией и позволяет получить большой объем костномозгового аспирата.
2. Методика аппаратной сепарации моноклеарной фракции костного мозга позволяет достичь высокой жизнеспособности моноклеарных клеток и ГСК (CD34⁺).
3. Способ внутривенного введения моноклеарных клеток у пациентов с ЦП является минимально инвазивной и не сопровождается осложнениями.
4. Методика портофлоуметрии перед введением моноклеарных клеток позволяет определить скорость таргетной доставки клеточной суспензии в печень без потери их по порто-кавальным коллатералям во время введения.
5. Технология внутривенного введения моноклеарных клеток позволяет улучшить клинико-лабораторные проявления хронической печеночной недостаточности у пациентов с циррозом печени на этапе ожидания донорского органа.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены на следующих конференциях в том числе с международным участием: III Российский национальный конгресс «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2017); International Society Cell and Gene Therapy (ISCT) Annual Meeting, Poster session. (Montreal, 2018); Всероссийская конференция с международным участием «StemCellBio-2018: Фундаментальная наука как основа трансляционной медицины» (Санкт-Петербург, 2018); IV Российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация донорство органов» (Москва, 2019).

По теме диссертации получен патент на изобретение РФ: А.Р. Шералиев, Д.А. Гранов, О.А. Герасимова, И.И. Тилеубергенов, А.А. Поликарпов, А.С. Полехин, А.В. Моисеенко «Способ замедления прогрессирования цирроза печени у реципиентов в листе ожидания трансплантации печени», RU 2671560 С1 от 02.11.2018.

Одобрена и выполнена научно-исследовательская работа (НИР) в рамках государственного задания Министерства Образования и Науки России: «Разработка технологии терапии печёночной недостаточности моноклеарными клетками аутологичного костного мозга».

Внедрение в практику

Разработанная методика применена для повышения синтетической функции печени у пациентов в «листе ожидания» на трансплантацию печени.

Улучшено качество жизни пациентов, а также снижена смертность от печеночной недостаточности в периоде до ОТП.

Публикации

Материалы диссертации отражены в 5 публикациях из которых 2 статьи в рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно разработан дизайн исследования.

1. Диссертант курировал пациентов на госпитальном и амбулаторном этапе.
2. Принимал участие в заборе аутологичного костного мозга у пациентов с последующей экстракорпоральной подготовкой костномозгового аспирата для лабораторного этапа изоляции моноклеарных клеток.
3. Осуществлял трепан-биопсию печени под ультразвуковой навигацией.
4. Провел статистический анализ полученных результатов.

Объем и структура диссертации

Диссертация включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, который состоит из 195 источников, в том числе 40 отечественных и 155 иностранных. Работа изложена на 128 страницах машинописного текста, иллюстрирована 28 таблицами и 37 рисунками.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Дизайн исследования

Перед началом исследования получено одобрение локального этического комитета ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава Российской Федерации, а методы, положенные в основу диссертации рассмотрены и одобрены проблемной комиссией. Работа проводилась с соблюдением всех этических норм согласно Хельсинкской декларации 1964 г. У всех отобранных больных из исследуемой группы получено добровольное информированное согласие для участия в исследовании с описанием процедуры предложенного лечения. Для научной работы изначально отобрано 42 пациента с последующим анализом медицинской документации (история болезни, амбулаторная медицинская карта). Пациенты были отобраны согласно разработанному нами критериям включения и исключения. На основании этого 10 больных исключены из группы контроля. Больные были разделены на две группы. В первую группу (исследуемая) вошли пациенты, которым выполнена трепан-аспирация костного мозга с последующим внутривенным введением МНК аутологичного КМ на фоне стандартной консервативной терапии. Во вторую группу (контрольная)

вошли пациенты, которые получали только стандартную консервативную, симптоматическую терапию (гепатопротекторы, диуретики).

У пациентов с циррозом печени в исследуемой группе выполнен забор аутологичного КМ и последующее внутриворотальное введение полученных МНК. Оценена безопасность процедуры трепан-аспирации костного мозга, внутриворотального введения МНК аутологичного костного мозга, а также эффективность применения технологии на основании изменения качества жизни пациентов согласно опроснику SF-36, биохимических параметров крови, гистологического исследования и оценки печеночной недостаточности по прогностическим шкалам MELD – Na, СТР.

У пациентов из группы контроля ретроспективно оценены биохимические параметры крови и тяжесть печеночной недостаточности по шкалам MELD – Na, СТР. В этих группах вышеперечисленные критерии оценивались на протяжении 24 мес. наблюдения.

В исследуемой группе биопсия печени выполнялась до и после процедуры из одного и того же сегмента печени при тромбоцитах свыше $75 \times 10^9/\text{л}$ и МНО менее 1,5. Морфологическая оценка в том числе ИГХ исследование выполнялась до и после внутриворотального введения МНК. В ходе наблюдения за пациентами в группах исследования и контроля анализировалась выживаемость.

Сравнительная характеристика больных в исследуемой и контрольной группе

Средний возраст в исследуемой и контрольной группе составил $53,7 \pm 1,3$ и $51,5 \pm 3,1$ года соответственно. Статистического значимого различия в возрасте между группами не отмечалось ($p > 0,05$).

На основании таблицы 1 различий в тяжести печеночной недостаточности по шкале MELD – Na в исследуемой и группе контроля не отмечено ($p > 0,05$). Однако в исследуемой группе присутствовали пациенты с тяжестью печеночной недостаточности 19 баллов и выше (11,8%). Статистического различия среднего значения MELD – Na между исследуемой и группой контроля не было ($t = 0,57$, $p > 0,05$).

Пациенты в исследуемой и группе контроля сопоставлены по шкале СТР тяжести печеночной недостаточности. На основании таблицы 2, больные были сопоставимы по классу А и В печеночной недостаточности шкалы СТР и достоверных различий между ними не было ($p > 0,05$). Однако, группы достоверно различались по наличию пациентов тяжести класса С в исследуемой группе ($p < 0,05$). Анализ всей выборки пациентов показал статистическое различие среднего балла по шкале СТР между исследуемой и группой контроля ($t = 3,38$, $p < 0,05$), что указывает на более значимую тяжесть больных в исследуемой группе (таблица 2).

Таким образом, на основании таблиц 1, 2 в группу исследования в отличии от группы контроля входили пациенты с тяжестью СТР класс С ($n = 3$, 17,7%) и MELD – Na свыше 19 баллов ($n = 2$, 11,8%). По остальным параметрам исследуемая и контрольная группы сопоставимы.

Таблица 1 – Тяжесть печеночной недостаточности по шкале MELD – Na в исследуемой и контрольной группе

MELD – Na	Исследуемая группа (n=17)		Контрольная группа (n=15)		x ²	p	t, p
	абс.	%	абс.	%			
10-12 баллов	7**	41,2	7**	46,6	0,91	0,34	t=0,57 p=0,574
13-15 баллов	6**	35,3	7**	46,6	2,05	0,15	
16-18 баллов	2**	11,8	1**	6,6	0,21	0,65	
19 и выше баллов	2**	11,8	0**	0	3,14	0,07	
Примечание – ** – различия недостоверны							

Таблица 2 – Тяжесть печеночной недостаточности по шкале СТР в исследуемой и контрольной группе

Тяжесть состояния по шкале СТР	Исследуемая группа (n=17)		Контрольная группа (n=15)		x ²	p	t, p
	абс.	%	абс.	%			
Класс А (5-6 баллов)	5**	29,5	7**	46,6	3,68	0,057	t=3,38 p=0,002
Класс В (7-9 баллов)	9**	52,9	8**	53,3	0,11	0,74	
Класс С (10-15 баллов)	3*	17,7	0*	0	4,93	0,02	
Примечания – * – различия достоверны; ** – различия недостоверны.							

Методика получения и введения мононуклеарных клеток получение костного мозга

После госпитализации пациентов в клинику центра в первой половине дня в условиях операционной под местной анестезией и мониторингом основных витальных функций выполняли забор КМ методом билатеральной трепан-аспирации из заднего гребня подвздошной кости под местной анестезией. Использовался набор для биопсии костного мозга 14 G×70 mm или 14G×90 mm (BBL SC, TSUNAMI MEDICAL, Italy) в зависимости от выраженности подкожно-жировой клетчатки. Для аспирации применяли стандартный шприц объемом 20 мл, содержащий 4 мл предварительно разведенного в физиологическом растворе антикоагулянта (200 мл физиологического раствора + 5 мл – 25 000 ЕД гепарина). КМ собирался в стерильный трансфузиологический пакет-контейнер. Полученный материал сразу же транспортировался в изотермическом боксе в лабораторию для изоляции МНК, анализа клеточного состава и оценки жизнеспособности полученной суспензии клеток.

Изоляция мононуклеарных клеток аутологичного костного мозга

Процесс изоляции МНК аутологичного костного мозга (КМ) осуществлялся в лаборатории через 2 часа после процедуры забора КМ. Для получения МНК использован автоматизированный сепаратор костного мозга и компонентов крови Maco Press Smart (Maco Pharma, France). В дальнейшем,

осуществлялась оценка жизнеспособности полученных клеток и фенотипирование при помощи проточной цитофлуориметрии (Beckman Coulter, USA) маркерами CD45+ и CD34+. После получения данных о клеточном составе МНК, а также оценки их жизнеспособности суспензия помещалась в трансфузионный раствор, состоящий из физиологического раствора, раствора 20% человеческого альбумина, гепарина (2 500 ЕД) и транспортировалась в изотермическом боксе в рентгеноперационную.

Введение моноклеарных клеток аутологичного костного мозга

У пациентов с ЦП в связи с тромбоцитопенией и коагулопатией за день до операции вводили гемостатические препараты: раствор этамзилата натрия (Дацинон) 250 мг в/в 2 раза в сутки. При наличии асцита, с целью снижения рисков кровотечения вследствие пункции портальной вены выполняли лапароцентез, устанавливали дренаж (Multipurpose Pigtail Drainage Catheter Needle Set, Cook Medical, USA) и осуществляли последующую эвакуацию асцитической жидкости. Дренаж удаляли через сутки после операции предварительно убедившись в отсутствии кровотечения в брюшную полость.

Чрескожную катетеризацию воротной вены (ВВ) под местной анестезией выполняли в рентген-операционной. Методика катетеризации ВВ освоена, изучена и внедрена в рутинную практику клиники ранее (Гранов Д.А., Поликарпов А.А. и др., 2004; Таразов П.Г. и др., 2008; Гранов Д.А., Поликарпов А.А. и др., 2016).

Для портального доступа выполняли пункцию правой или левой долевой ветви воротной вены. Выбор места пункции на брюшной стенке осуществляли по результатам УЗИ таким образом, чтобы пункционный канал проходил мимо крупных сосудистых структур, желчных протоков, плеврального синуса, расширенной пупочной вены имея запас паренхимы не менее двух сантиметров. При пункции правой ветви воротной вены эта точка находится в области, ограниченной 6 и 9 межреберьями и передней и задней подмышечными линиями. Для пункции левой ветви воротной вены использовали субксийфидальный доступ.

Под местной анестезией делали насечку на коже длиной 0,2-0,3 см и через нее производили пункцию соответствующей ветви ВВ под ультразвуковым контролем в реальном масштабе времени эхопозитивной иглой 22 G (Cook Medical, USA). После удаления мандрена и получения из просвета иглы крови вводили G-образный проводник 0.35“ (Starter, Boston, USA). Иглу удаляли, а по проводнику в ВВ вводили дилатационный катетер размером 5 F (1F=0,33 мм, Cook Medical, USA) и выполняли ангиографию из ствола ВВ с 15-20 мл водорастворимого контрастного препарата (Omnipaque 350, Nyscomed, USA).

В процессе портографии оценивали коллатерали ВВ и выраженность портальной гипертензии. Далее, на металлическом проводнике (Storq, Cordis, USA) устанавливали прямой аортальный катетер с боковыми отверстиями 5 F (Cook Medical, USA) для определения оптимальной скорости селективной перфузии сегментарных ветвей воротной вены. Выполняли портофлоуметрию автоматическим инъектором с 15-20 мл водорастворимого контрастного препарата (Omnipaque 350, Nyscomed, USA). Введение водорастворимого

контрастного препарата осуществлялось с уровня ствола воротной вены с различной скоростью начиная с 0,3 мл/с и последующим ее постепенным увеличением до достижения селективной перфузии сегментарных ветвей ВВ.

После уточнения индивидуальной оптимальной скорости селективной перфузии сегментарных ветвей ВВ, через этот же катетер осуществляли инфузию суспензии МНК аутологичного КМ при помощи автоматизированного инъектора.

После введения суспензии клеток на проводнике меняли аортальный катетер на дилатационный 5 F и пломбировали пункционный канал до капсулы печени мелко нарезанной гемостатической губкой для снижения риска кровотечения. По завершению операции выполнялось ультразвуковое исследование брюшной полости с целью исключения кровотечения и подкапсульной гематомы.

Методика морфологического и иммуногистохимического исследования

В рамках исследования морфологическую оценку выполняли у 8 пациентов основной группы с наиболее низкими факторами кровотечения на основе клинико-лабораторных данных (тромбоциты свыше 75×10^9 /л, МНО менее 1,5) из одного и того же сегмента печени. Для морфологической оценки в динамике осуществлялась трепан-биопсия печени до введения МНК и далее в интервале от 1 до 2 месяцев. Для оценки пролиферации, регенерации изучалось количество двуядерных и митотических клеток, ИГХ – маркер Ki67, внутриклеточный альфа-фетапротеин. Для отслеживания стволовых клеток использовался маркер CD133⁺, CD34⁺.

Методы статистической обработки данных

Основные методы статистической обработки данных изложены в разделе «Методология и методы исследования».

Оценка безопасности инвазивного вмешательства

Оценка безопасности процедуры забора КМ и последующего введения МНК в ВВ производилась согласно классификации хирургических осложнений Clavien – Dindo. (Dindo D. et al., 2004)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка безопасности забора аутологичного костного мозга

Жизнеугрожающих осложнений в процессе билатерального забора аутологичного костного мозга из бугра заднего гребня подвздошной кости у пациентов в исследуемой группе не отмечалось. После процедуры у всех пациентов наблюдался незначительный болевой синдром (степень I по классификации Clavien-Dindo) в месте пункции и аспирации костного мозга с последующим его разрешением в течение 24 часов пребывания в стационаре. Дополнительная анальгезия после процедуры забора костного мозга пациентам не потребовалась. Во всех случаях осложнения в виде клинически значимой гематомы, невралгии или кровотечения из места пункции на фоне тромбоцитопении и коагулопатии не отмечались. В процессе билатеральной трепан-аспирации костного мозга объем костномозгового аспирата составил

от 200 до 380 мл (в среднем $272,9 \pm 10,9$). Подробное описание объемов костномозгового аспирата отражено в таблице 3.

Жизнеспособность и фенотипическая характеристика полученных мононуклеарных клеток

После сепарации МНК их объем составил от 40,2 до 58,3 мл (в среднем $47 \pm 1,1$ мл). Парный корреляционный анализ Пирсона объема КМ и МНК показал наличие между ними положительной корреляции. Среднее значение ресуспензированного объема МНК в среде для последующей внутривенной инфузии составило $112,2 \pm 4$ мл.

Как видно из таблицы 3 количество жизнеспособных МНК варьировало от $0,7 \times 10^9$ до $5,84 \times 10^9$ (в среднем $2,3 \pm 0,3 \times 10^9$). Анализ при помощи проточной цитофлуориметрии во всех случаях показал высокую жизнеспособность клеток после процедуры сепарации МНК с разницей от 87,1 до 96,7% (в среднем $93,2 \pm 0,5\%$). Абсолютное количество жизнеспособных CD34⁺ клеток различались от $0,7 \times 10^6$ до $48,2 \times 10^6$ клеток (в среднем $11,5 \pm 3,4 \times 10^6$). Содержание жизнеспособных CD34⁺ клеток варьировало в пределах 98,1-99,6% (в среднем $98,3 \pm 0,3\%$). Во всех случаях отмечено крайне высокое содержание жизнеспособных CD34⁺ клеток после процесса сепарации на этапе внутривенного введения.

Таблица 3 – Описание полученных объемов КМ, МНК, жизнеспособности клеток и скорости оптимального введения МНК в ВВ

Пациенты	Объем КМ, мл	Объем МНК, мл	Ресусп. МНК, мл	Жизн. МНК, 10^9	Жизн. CD34 ⁺ 10^6	Жизн. МНК %	Жизн. CD34 ⁺ %	Скорость инфузии в ВВ (мл/сек)
1	256	51,8	93,8	1,63	12,74	96,3	99,4	0,8
2	288	46,4	86,5	5,84	48,2	92,5	98,2	0,3
3	296	46,7	127,2	1,96	4,95	92,7	98,5	1
4	320	53,1	96	4,32	28,62	93,6	98,4	1,5
5	258	47,4	129	2,21	10,6	92,8	98,5	0,3
6	250	47,2	105,7	1,6	7,65	87,1	98,3	1
7	256	47,1	105,6	1,24	2,54	94,9	99,3	1,5
8	240	48,3	127	2,8	1	91,2	98,6	2
9	200	47,2	123	4,5	1,7	95,1	98,2	0,8
10	210	40,2	116	0,7	0,4	93,3	98,1	3
11	330	45,2	119	1,6	6	93,1	98,7	3
12	300	43,6	90	1,7	9	90,4	98,3	0,8
13	380	42	111	1,3	5,7	95,3	98,2	0,6
14	260	40	103	2,5	2,7	96,1	99,5	4
15	312	52	129	2,6	9	96,7	99,6	1
16	224	58,3	96,8	2,61	45,24	94,2	99,6	1
17	260	42,5	149	1,5	0,7	90,2	93,3	2

Примечания – КМ – костный мозг; МНК – мононуклеарные клетки; ВВ – воротная вена; ресусп. МНК – ресуспензированные мононуклеарные клетки; жизн. МНК – жизнеспособные мононуклеарные клетки; жизн. CD34⁺ – жизнеспособные CD34⁺ клетки.

Внутрипортальное введение моноклеарных клеток

Для всех пациентов в каждом случае определена индивидуальная скорость селективной перфузии сегментарных ветвей ВВ при помощи портофлоуметрии (таблица 3). Это позволило избежать потерю клеток по коллатералям ВВ.

Оценка безопасности внутрипортального введения моноклеарных клеток

Во время катетеризации ВВ и процедуры введения МНК по описанной методике серьезных нежелательных явлений отмечено не было (I степень по Clavien-Dindo). Непосредственно перед процедурой катетеризации воротной вены у одного (5,9%) пациента отмечены признаки кровотечения из варикозных расширенных вен пищевода, что потребовало их внутрисосудистого склерозирования портальным доступом для достижения гемостаза (III-b степень по Clavien-Dindo) перед процедурой портофлоуметрии и введения МНК. Учитывая своевременную эффективную помощь до введения МНК, больной не был исключен из исследования, что позволило оценить отдаленный результат. Во всех случаях пациенты отмечали умеренный болевой синдром, связанный с процессом катетеризации ВВ (I степень по Clavien-Dindo), а именно на этапе пункции иглой. После завершения введения МНК выполнялась контрольная портография по результатам которой признаков нарушения проходимости воротного кровотока не отмечалось. Во всех случаях признаков внутрибрюшного кровотечения не было.

Отдаленные результаты наблюдения в исследуемой группе пациентов

На раннем этапе наблюдения двое пациентов выведены из исследования: у одного пациента наступление смертельного исхода на сроках до одного месяца послеоперационного наблюдения, второму пациенту выполнена ОТП через 4 месяца. Таким образом, отдаленные результаты получены по 15 пациентам из 17. В процессе отдаленного динамического наблюдения (24 мес.) у большинства пациентов сохранялись стабильные показатели общего билирубина, СТР и MELD – Na.

Суммарно в исследуемой группе пациентов среднее значение общего билирубина до процедуры введения МНК $35,9 \pm 4,0$ и $33,5 \pm 5,5$ мкмоль/л после. В динамике отмечено статистически не значимое ($p > 0,05$) снижение среднего значения общего билирубина, что свидетельствует об стабилизации ЦП. В исследуемой группе пациентов среднее значение АЛТ до процедуры $40,2 \pm 7,0$ и $35,4 \pm 6,5$ ед/л после. Статистически значимого увеличения или снижения не наблюдалось ($p > 0,05$). У большей части пациентов в исследуемой группе в динамике отмечена стабилизация уровня АСТ. Среднее значение АСТ до процедуры $46,0 \pm 6,7$ и $45,4 \pm 8,9$ ед/л после. Статистически значимого изменения не наблюдалось ($p > 0,05$).

У большей части пациентов в исследуемой группе в динамике отмечена стабилизация уровня МНО. Среднее значение МНО до процедуры $1,2 \pm 0,1$ и $1,2 \pm 0,2$ после. Статистически значимого увеличения или снижения не наблюдалось ($p > 0,05$). Так же отмечено увеличение уровня альбумина: среднее значение альбумина до процедуры $34,8 \pm 0,9$ и $36,6 \pm 1,2$ мкмоль/л после.

При статистическом анализе повышение уровня альбумина статистически незначимо ($p > 0,05$).

Отмечено статистически значимое снижение тяжести печеночной недостаточности по шкале СТР в группе исследуемых пациентов в отдаленном периоде с $7,5 \pm 0,3$ до $6,6 \pm 0,3$ балла ($p < 0,05$).

Получено статистически значимое снижение тяжести печеночной недостаточности по шкале MELD – Na в группе исследуемых пациентов в отдаленном периоде ($p < 0,05$). Среднее значение до процедуры $12,7 \pm 0,4$ и $11,3 \pm 0,6$ балла после.

По результатам оценки в динамике качества физического здоровья отмечено статистически значимое повышение баллов качества жизни физического здоровья по опроснику SF-36 ($p < 0,05$). В исследуемой группе пациентов среднее значение баллов физического здоровья до процедуры $38,6 \pm 2,3$ и $43,1 \pm 2,0$ после. Увеличение баллов в динамике указывает на улучшение физического здоровья согласно опроснику SF-36.

Отдаленные результаты наблюдения в группе контроля

В ходе ретроспективного анализа на протяжении 24 месяцев наблюдения за пациентами получены следующие результаты.

Выявлено статистически значимое повышение в динамике общего билирубина в сыворотке крови ($p < 0,05$), исходное среднее значение $35,6 \pm 7,2$ мкмоль/л и $90,1 \pm 23,9$ мкмоль/л в динамике.

Статистически значимого изменения в динамике АЛТ не получено ($p > 0,05$). Исходное среднее значение $68,9 \pm 12,9$ ед/л и в динамике $58,9 \pm 11,1$ ед/л. Статистически значимого изменения в динамике АСТ не отмечено ($p > 0,05$). Исходное среднее значение АСТ $84,3 \pm 16,7$ ед/л и $88,2 \pm 17,0$ ед/л в динамике. Исходное среднее значение МНО $1,1 \pm 0,1$ и $1,3, \pm 0,3$ в динамике. Статистический анализ показал значимое повышения МНО ($p < 0,05$).

Выявлено статистически значимое снижение в динамике альбумина в сыворотке крови ($p < 0,05$). Исходное среднее значение $39,6 \pm 1,0$ г/л и $34,5 \pm 1,3$ г/л в динамике.

Статистически значимого изменения в динамике креатинина в сыворотке крови не отмечено ($p > 0,05$). Исходное среднее значение $68,8 \pm 4,9$ мкмоль/л и $70,2 \pm 4,1$ мкмоль/л в динамике.

Получено статистически значимое в динамике отягощение печеночной недостаточности согласно шкале СТР ($p < 0,05$). Исходное среднее значение $6,6 \pm 0,2$ и $7,8 \pm 0,3$ балла в динамике.

Замечено нарастание тяжести печеночной недостаточности по шкале MELD – Na, что в свою очередь статистически значимо ($p < 0,05$). Исходное среднее значение $13,1 \pm 0,3$ и $15,5 \pm 1,1$ балла в динамике.

Сравнительная оценка основных показателей в исследуемой и контрольной группе

Сравнение показателя среднего значения общего билирубина в исследуемой и контрольной группах представлено на рисунке 1. В исследуемой

группе среднее значение общего билирубина составило $35,9 \pm 4,0$ мкМоль/л, а в контрольной $35,6 \pm 7,2$ мкМоль/л. Достоверных различий в исходном состоянии между группами не отмечено ($p > 0,05$). Через 24 мес. наблюдения отмечено значимое ($p < 0,05$) повышение уровня общего билирубина в группе контроля ($90,1 \pm 23,9$ мкМоль/л) по сравнению с исследуемой ($33,5 \pm 5,5$ мкМоль/л) в соответствии с графиком (рисунок 1).

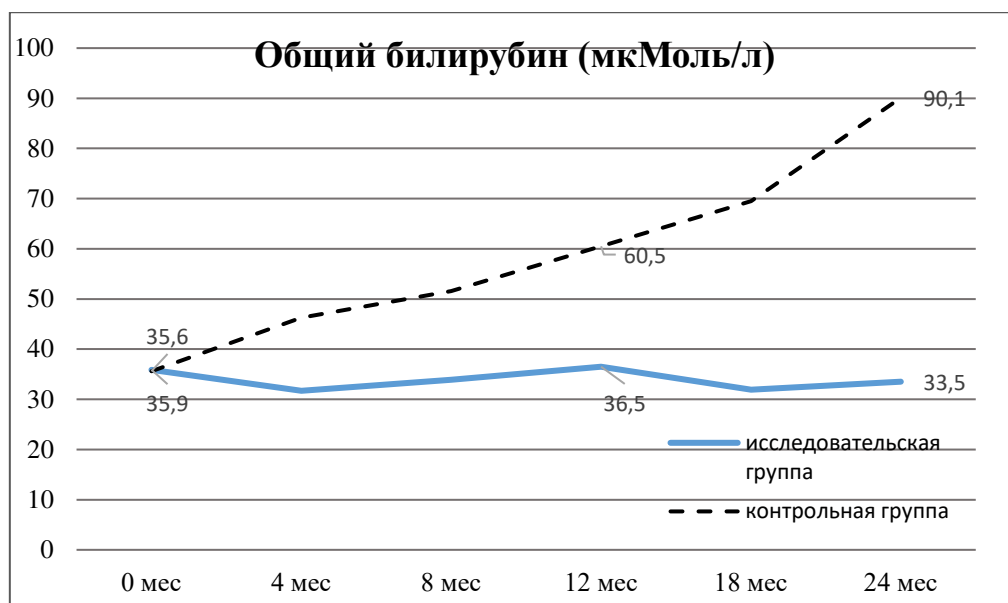


Рисунок 1 – Динамика изменения общего билирубина у пациентов в исследуемой группе после введения МНК и в группе контроля.

Статистически значимое снижение общего билирубина в исследуемой группе по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$

Сравнение динамики печеночной недостаточности по шкале СТР в исследуемой и контрольной группах представлено на рисунке 2.

Согласно графику на рисунке 2 в исследуемой группе среднее значение соответствовало $7,5 \pm 0,3$ балла за счет превалирования пациентов с тяжестью печеночной недостаточности класса «С» по сравнению с контрольной группой $6,6 \pm 0,2$ ($p < 0,05$). В динамике в исследуемой группе по сравнению с контрольной повышения баллов по шкале СТР не наблюдалось. В динамике в отличие от исследуемой группы ($6,6 \pm 0,2$ балла) у пациентов в группе контроля ($7,8 \pm 0,3$ балла) отмечалось значимое ухудшение тяжести печеночной недостаточности ($p < 0,05$).

Сравнение динамики печеночной недостаточности по шкале MELD – Na в исследуемой и контрольной группах представлено на рисунке 3. Исходя из графика на рисунке 3 в исследуемой и в группе контроля среднее значение балла тяжести печеночной недостаточности составило $12,7 \pm 0,4$ и $13,1 \pm 0,3$ балла соответственно. Достоверных различий в исходном состоянии по шкале MELD – Na между двумя группами не отмечено ($p > 0,05$). Однако, в динамике отмечено

нарастание баллов в группе контроля ($15,5 \pm 1,1$ балла) по сравнению с исследуемой группой ($11,3 \pm 0,6$ балла), что статистически значимо ($p < 0,05$).

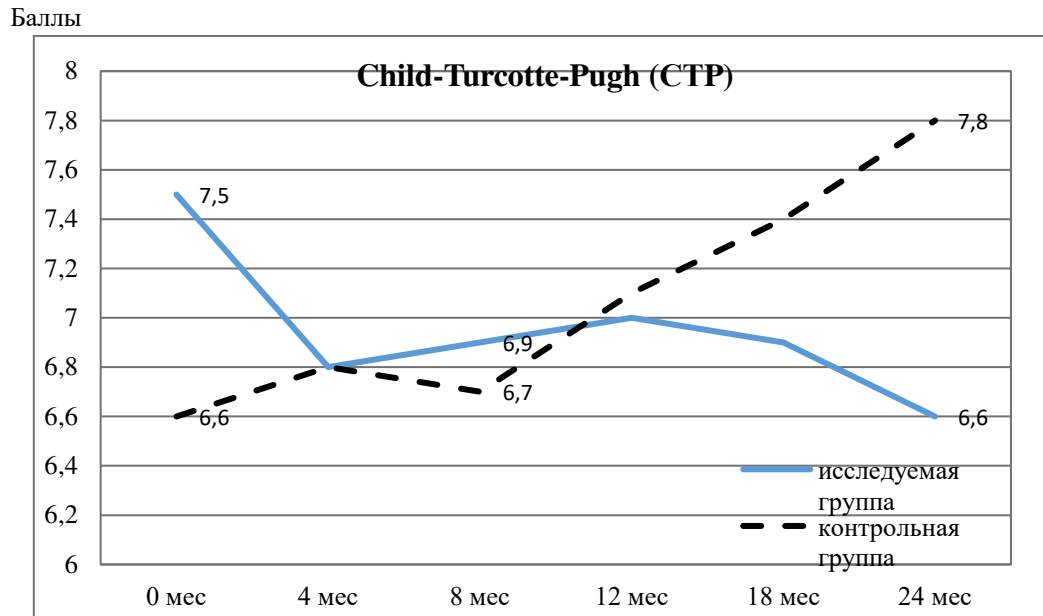


Рисунок 2 – Динамика изменения степени печеночной недостаточности по шкале СТР у пациентов в исследуемой группе после введения МНК и в группе контроля. Статистически значимое снижение баллов в исследуемой группе по сравнению с контрольной, $p < 0,05$

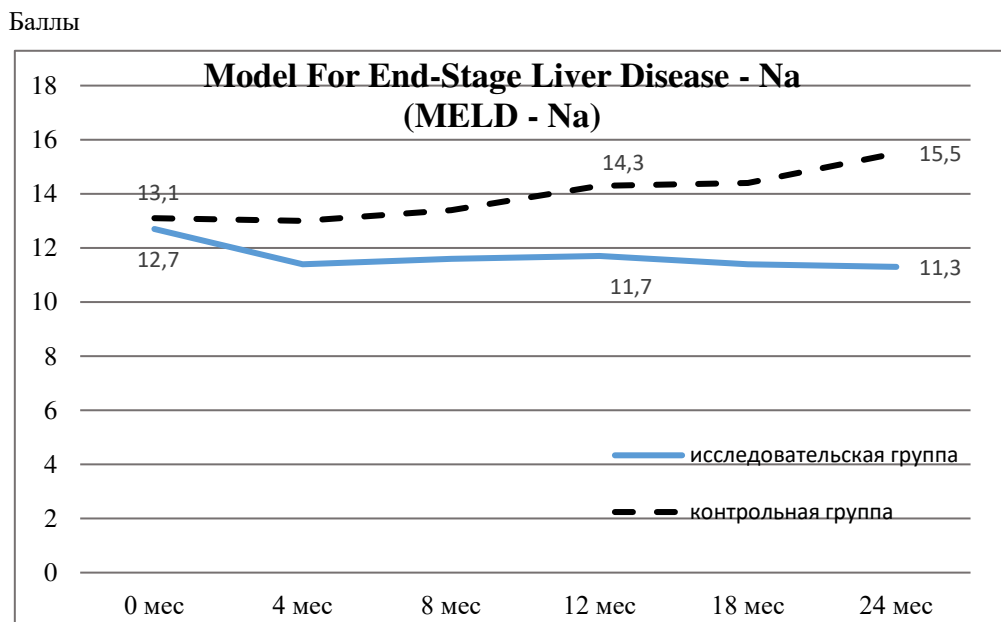


Рисунок 3 – Динамика изменения степени печеночной недостаточности по шкале MELD – Na у пациентов в исследуемой группе после введения МНК и в группе контроля. Отмечено статистически значимое снижение баллов в исследуемой группе по сравнению с контрольной, $p < 0,05$

Результаты морфологического и иммуногистохимического исследования в группе с МНК

По результатам морфологического исследования биоптатов печени у восьми пациентов до и после внутривенного введения МНК отмечено снижение лейкоцитарной инфильтрации, уменьшение жировой дистрофии печени. Количество двуядерных клеток до введения МНК в среднем составило $16 \pm 7,8$. После введения МНК отмечено их увеличение в среднем до $24,5 \pm 2,9$. Статистический анализ показал значимое увеличение ($p < 0,05$) в динамике двуядерных клеток после введения МНК в интервале от 1 до 2 мес. Разницы в количестве митотических клеток не отмечено.

При анализе ИГХ маркеров пролиферации гепатоцитов таких, как Ki67 и внутриклеточный АФП в динамике отмечено, что маркер АФП во всех случаях не экспрессировался. Однако, отмечалось увеличение экспрессии ИГХ маркера Ki67 до 12% (среднее значение 5%). Маркер Ki67 при сравнительной оценке статистически значимо не увеличивался ($p > 0,05$). Маркер ГСК CD133⁺ при ИГХ исследовании в биоптатах печени после введения МНК не экспрессировался (негативный), а маркер CD34⁺ экспрессировался только в эндотелии сосудов. Таким образом, для оценки пролиферации гепатоцитов помимо Ki67 необходим поиск других маркеров. Ранее описанный в публикациях маркер внутриклеточный АФП не показал свою эффективность в оценке регенерации гепатоцитов после применения МНК. Для поиска ГСК после их введения в печень вероятнее всего необходимо применение других ИГХ маркеров, либо выполнение биопсии печени в более ранние сроки после введения МНК.

Оценка выживаемости в исследуемой и контрольной группе

Оценка выживаемости осуществлялась путем анализа функции дожития Kaplan-Maier от момента постановки диагноза ЦП. Общая выживаемость рассчитана в отношении всех пациентов без исключения, которым выполнено внутривенное введение МНК аутологичного костного мозга, а также пациентам в группе контроля.

В ходе анализа в исследуемой группе после внутривенного введения МНК по сравнению с пациентами группы контроля 12 мес. и 24 мес. выживаемость составила 89,7%, 95,2% и 89,7%, 71,4% соответственно, что представлено на рисунке 4. После применения МНК 24 мес. общая выживаемость на 18,3% выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). График общей выживаемости функции Kaplan-Maier пациентов в группе исследования и контроля представлен на рисунке 5.

В исследуемой группе четверым пациентам выполнена ОТП после применения МНК: $n=1$ в 4 мес. (рецидивирующее кровотечение), $n=3$ после 24 мес. наблюдения.



Рисунок 4 – Результаты 12 мес. и 24 мес. выживаемости пациентов

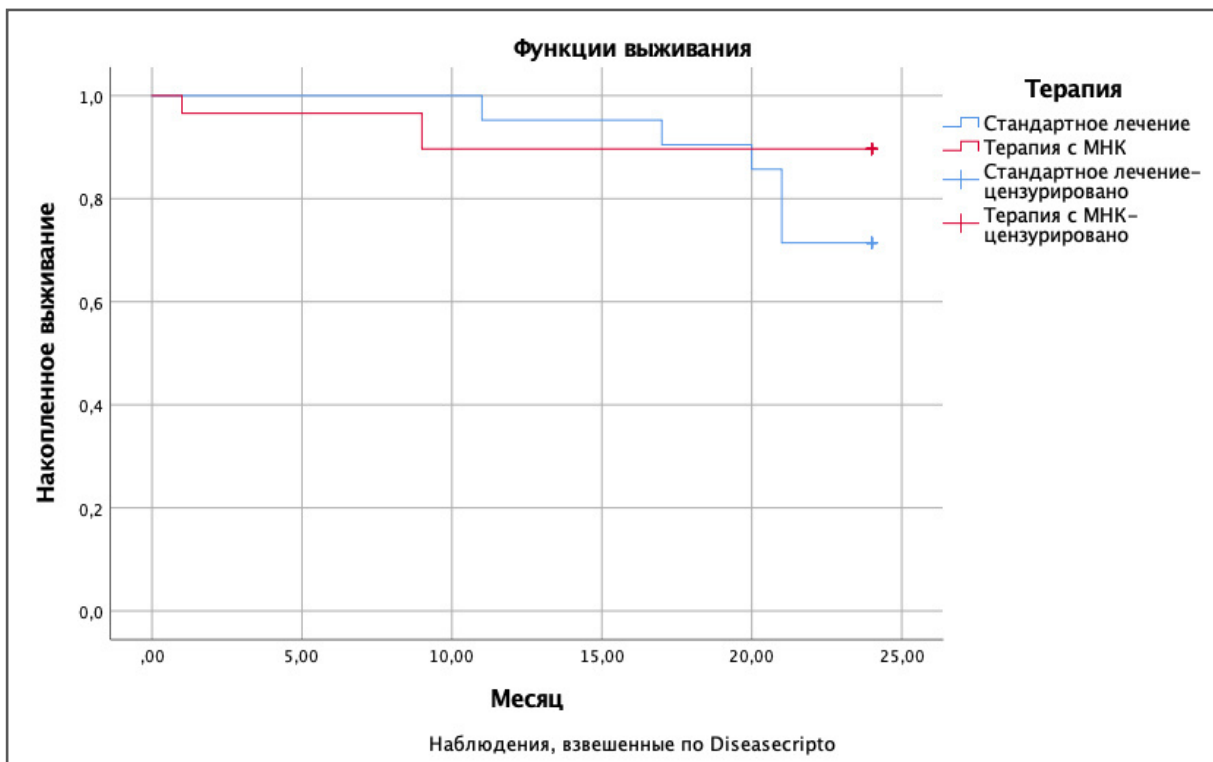


Рисунок 5 – График общей выживаемости Карлан-Маьер пациентов после терапии с МНК на фоне стандартной терапии в исследуемой группе и пациентов только после стандартного лечения в группе контроля в период наблюдения 24 мес. ($p < 0,05$)

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время единственным способом решения проблемы смертности от ЦП является трансплантация печени. Однако, в Российской Федерации, как и в других странах существует значительный дефицит донорских органов (Готье С.В. и др., 2017). Наряду с дефицитом донорских органов в РФ отмечается увеличение числа пациентов в листе ожидания. Так, на 2019 г. в РФ трансплантации печени ожидали 2 060 человек, что на 4,8 больше по сравнению с 2012 г.

Таким образом, в условиях ограниченности трансплантологической помощи и отсутствия эффективного лекарственного препарата, повышающего синтетическую функцию печени, актуальным является поиск и разработка новых технологий терапии и поддержки пациентов с конечной стадией заболевания печени. Наиболее вероятным методом снижения смертности от печеночной недостаточности в «листе ожидания» является методика клеточных и биологических технологий, что вероятно послужит хорошим «мостом» к трансплантации печени в условиях её ограниченной доступности.

В процессе терапии СК костного мозга человека возникают три основных вопроса: способ их получения, путь введения-доставки и выбор популяции клеток для достижения лучшего терапевтического эффекта.

В нашем исследовании мы использовали КМ полученный методом трепан-аспирации из заднего бугра крыльев подвздошной кости как источник МНК содержащий суспензию ГСК и МСК. Такой метод был сочтен более безопасным, чем мобилизация СК из КМ путем введения гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) из-за риска спонтанного разрыва селезенки на фоне спленомегалии, наличии гиперспленизма и последующего аппаратного афереза крови из периферического доступа. Так по данным Tabilio A. et al. (1999), отмечен спонтанный разрыв селезенки в результате использования ГМ-КСФ. Хотя, метод аппаратного афереза является менее травматичным по сравнению с трепан-аспирацией КМ. В нашем исследовании с точки зрения безопасности использован метод билатеральной трепан-аспирации КМ из заднего бугра крыльев подвздошной кости. В процессе аспирации у 17 пациентов получен КМ в объеме от 200 до 380 мл (в среднем $272,9 \pm 10,9$ мл). Жизнеугрожающих нежелательных явлений не отмечено, следовательно такая методика получения МНК из КМ является безопасной у пациентов с ЦП на фоне коагулопатии и тромбоцитопении. Недостатками способа является необходимость применения местной или общей внутривенной анестезии, однако, с точки зрения соотношения возможности получения большого объема КМ и рисков хирургических осложнений метод оказался эффективным. В клинической практике, методика аппаратной изоляции МНК оказалась эффективной для получения популяции клеток с высокой жизнеспособностью. В нашем исследовании при использовании аппаратной сепарации (Maco Press Smart, Maco Pharma) удалось получить от 40,2 до 58,3 мл (в среднем $47 \pm 1,1$ мл) МНК фракции костного мозга с высокой жизнеспособностью клеток (МНК= $93,2 \pm 0,5\%$,

CD34⁺=98,3±0,3%). Полученный высокий показатель жизнеспособности и содержания клеток позволяет судить о эффективности способа получения КМ и методики сепарации. Применение аутологичных СК без культивирования позволило нивелировать иммуносупрессивную терапию и сократить время от момента получения до введения клеток. По литературным данным методики культивирования аутологичных клеток и их введения также показали удовлетворительный результат (Pai Madhava et al., 2008; Tao Y.C. et al., 2018; Chung S.J. et al., 2020; Feng Y. et al., 2020).

Литературные данные, касающиеся способа введения СК при ЦП противоречивы (Коткас И.Е. и др., 2018; Yannaki E. et al., 2006; Liang Peng et al., 2011; Newsome PN et al., 2018; Chung S.J. et al., 2020). Авторами описаны как упрощенный вариант введения – в периферическую вену, так и внутриартериальный, внутрипортальный путь введения. Нами был выбран интрапортальный способ введения МНК с целью достижения их наивысшей концентрации в печени на основании массивной перфузии воротным кровотоком. Для этого апробирована методика предоперационного планирования с целью интрапортального введения МНК. Предварительно выполненная многофазная контрастная мультиспиральная компьютерная томография печени позволила выбрать подходящую ветвь ВВ и исключить ее тромбоз для последующей катетеризации под ультразвуковой навигацией. Прямая портография после катетеризации ВВ позволила выбрать нужный уровень в ее бассейне для инфузии клеток. Такой алгоритм подготовки пациента позволяет детализировать информацию о нем и правильно подобрать точку вкола для последующей катетеризации ВВ. Выполненная портография с уровня ствола воротной вены позволяет визуализировать наличие венозных внепеченочных коллатералей (мезентериальные, умбиликальные вены, левая желудочная и пищеводные вены). Так, в нашем исследовании во всех случаях визуализировались венозные коллатерали вследствие портальной гипертензии. Другими исследователями для введения МСК в печень предложен вариант катетеризации ВВ через наружную яремную вену, как при выполнении операции TIPS, однако такой способ технически более сложен и более дорогостоящий (Коткас И.Е., Земляной В.П., 2020)

На момент начала исследования по результатам обзора литературы и данных мета-анализа, авторами не детализировалась и не обосновывалась скорость введения клеток и преимущества портального пути введения при наличии венозных коллатералей. Для уточнения необходимой оптимальной скорости внутрипортальной инфузии МНК нами выполнялась портофлоуметрия с различной скоростью введения раствора контрастного вещества, что позволило исключить потерю клеток по порто-системным венозным коллатералям и идентифицировать оптимальную скорость инфузии в ВВ. У пациентов скорость введения МНК варьировала от 0,3 до 4 мл/сек. Автоматизированный ангиографический инъектор позволил более точно дозировать скорость и время инфузии суспензии МНК. Такой подход позволил сделать вывод о необходимости принципа персонализации в вопросе таргетной доставки

МНК/СК в печень при портальном способе введения. Учитывая тот факт, что катетеризация ВВ при циррозе печени несет риск геморрагических осложнений, требуется профилактика их возникновения. В нашей работе, пациентам с этой целью производились: предоперационное эндоскопическое лигирование варикозных вен пищевода, анализ коагулограммы, эвакуация асцита перед пункцией ВВ, предоперационное и послеоперационное назначение гемостатических препаратов, выполнение контрольной портографии после введения МНК, пломбировка пункционного канала в паренхиме печени перед удалением венозного катетера из него с последующей экспозицией и ультразвуковым контролем. Серьезных нежелательных явлений во время и после процедуры не отмечено. В процессе отдаленного наблюдения за пациентами (24 мес.) признаков нарушения портального кровотока не было. Таким образом, методика интрапортального введения МНК аутологичного костного мозга у пациентов с печеночной недостаточностью безопасна и минимально инвазивна.

В отдаленном периоде наблюдения при анализе внутри исследуемой группы в динамике, у пациентов отмечены следующие изменения: общий билирубин сыворотки крови статистически значимо не менялся ($p > 0,05$), снижалась тяжесть печеночной недостаточности согласно шкалам СТР ($p < 0,05$) и MELD – Na ($p < 0,05$). В группе контроля наблюдалось обратное: статистически значимое увеличение общего билирубина ($p < 0,05$), МНО ($p < 0,05$), снижение альбумина сыворотки крови ($p < 0,05$), отягощение по шкалам СТР ($p < 0,05$) и MELD – Na ($p < 0,05$). Показатели АЛТ, АСТ и креатинин статистически значимо не менялись в обеих группах.

При сравнении динамики состояния пациентов в исследуемой группе и контрольной отмечено статистически значимое более благоприятное течение ЦП в исследуемой группе по ряду показателей: общий билирубин сыворотки крови $33,5 \pm 5,5$ против $90,1 \pm 23,9$ мкмоль/л ($p < 0,05$), СТР $6,6 \pm 0,3$ против $7,8 \pm 0,3$ балла ($p < 0,05$), MELD – Na $11,3 \pm 0,6$ против $15,5 \pm 1,1$ балла ($p < 0,05$).

При оценке общего соматического статуса пациентов согласно опроснику качества жизни SF-36 отмечалось улучшение психического и физического здоровья ($p < 0,05$) в динамике. По данным морфологического и ИГХ исследования до и после внутриворотального введения МНК отмечено статистически значимое увеличение количества двуядерных клеток с $16,3 \pm 2,6$ до $24,5 \pm 2,9$ ($p < 0,05$), увеличение экспрессии ИГХ маркера Ki67 статистически не значимо. Разницы в количестве митотических клеток не отмечено. Маркер гемопоэтических стволовых CD133⁺ при ИГХ исследовании в биоптатах печени после введения МНК не экспрессировался (негативный), а маркер CD34⁺ экспрессировался только в эндотелии сосудов. Маркер АФП в нашем исследовании в отличие от данных Shuji Terai и др., (2006) не экспрессировался. В ходе анализа в исследуемой группе после внутриворотального введения МНК по сравнению с пациентами группы контроля согласно функции дожития Kaplan-Maier 12 мес. и 24 мес. выживаемость составила 89,7%, 95,2% и 89,7%, 71,4% соответственно. После внутриворотального введения МНК 24 мес. общая

выживаемость на 18,3% выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$). В группе исследования после применения МНК четверым пациентам (№ 1, № 4, № 6, № 16) выполнена ОТП на сроках 4 месяца и после 24 месяцев наблюдения.

Внутрипортальное введение МНК аутологичного КМ может быть выполнено пациентам с хронической печеночной недостаточностью в процессе ожидания трансплантации печени преимущественно с тяжестью печеночной недостаточности по шкале Child-Turcotte-Pugh класса А, В, С. Также может быть выполнено пациентам с хронической печеночной недостаточностью, которые отвергают опцию трансплантации печени и при наличии клинически значимых противопоказаний к ней.

Таким образом, в нашем исследовании впервые выполнен анализ результатов внутрипортального введения МНК на основе расширенной выборки пациентов по сравнению с литературными данными. Осуществлено сравнение с контрольной группой пациентов. В ходе работы обоснована и детализирована технология и скорость внутрипортального введения МНК/СК в отличие от ранее выполненных работ. Получены удовлетворительные результаты безопасности и эффективности в отдаленном периоде наблюдения (24 мес.) основываясь на ограниченной выборке пациентов.

Дальнейшее рандомизированное исследование на увеличенной выборке пациентов представляет большой научный интерес.

ВЫВОДЫ

1. Методика билатеральной трепан-аспирации костного мозга из заднего бугра гребня подвздошной кости, является безопасным способом получения 200-380 мл (в среднем $272,9 \pm 10,9$) костного мозга у пациентов с ЦП на фоне коагулопатии и тромбоцитопении без значимых нежелательных явлений и осложнений.
2. Апробированная аппаратная сепарация костного мозга позволила получить от 40,2 до 53,1 мл (в среднем $47 \pm 1,1$) МНК костного мозга с высокой жизнеспособностью клеток по результатам проточной цито-флуориметрии (МНК= $93,2 \pm 0,5\%$, CD34⁺= $98,3 \pm 0,3\%$). Абсолютное количество полученных жизнеспособных МНК составило от $0,7 \times 10^9$ до $5,84 \times 10^9$ клеток ($2,3 \pm 0,3 \times 10^9$), а CD34⁺ клеток варьировало от $0,7 \times 10^6$ до $48,2 \times 10^6$ ($11,5 \pm 3,4 \times 10^6$).
3. При прямой портографии в 100% случаях выявлены множественные венозные внепеченочные коллатерали (мезентериальные, умбиликальные вены, левая желудочная и пищеводные вены). Портофлоуметрия с различной скоростью введения раствора контрастного вещества, позволила исключить потерю клеток по порто-системным венозным коллатералям. Скорость введения МНК варьировала от 0,3 до 4 мл/сек в зависимости от выраженности портальной гипертензии и ЦП.
4. В ходе отдаленного наблюдения за пациентами, при сравнении исследуемой группы с контрольной, отмечено улучшение по ряду показателей в исследуемой группе: общий билирубин сыворотки крови $33,5 \pm 5,5$ против $90,1 \pm 23,9$ мкмоль/л ($p < 0,05$); СТР $6,6 \pm 0,3$ против $7,8 \pm 0,3$ балла ($p < 0,05$);

MELD – На $11,2 \pm 0,6$ против $15,5 \pm 1,1$ балла ($p < 0,05$). Согласно опроснику качества жизни SF-36 отмечалось улучшение психического и физического здоровья ($p < 0,05$) в динамике.

- После внутрипортального введения МНК в исследуемой группе по сравнению с пациентами группы контроля согласно функции дожития Kaplan-Maier 24 мес. выживаемость составила 89,7% и 71,4% соответственно ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Для получения аутологичного КМ методом трепан–аспирации и последующего применения в регенеративных целях следует использовать бугор заднего гребня подвздошной кости. Это безопасно и позволяет получить большой объем костномозгового аспирата.
- С целью сепарации КМ и получения МНК с высокой жизнеспособностью следует использовать систему аппаратной сепарации в течение 3 часов после получения КМ.
- Использование автоматизированного агниографического иньектора позволяет более точно дозировать скорость инфузии суспензии МНК.
- С целью профилактики и снижения рисков геморрагических осложнений при внутрипортальном введении МНК необходимо:
 - лигировать варикозные расширенные вены пищевода 2-3 степени и выше минимум за неделю до процедуры;
 - при наличии визуализируемого по УЗИ асцита выполнить дренирование и эвакуацию жидкости перед катетеризацией ВВ;
 - выполнить пломбировку канала в печени прежде, чем удалить катетер из ВВ.

СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- Шералиев, А.Р. Первый опыт внутрипортального введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга у пациентов в листе ожидания трансплантации печени / А.Р. Шералиев, Д.А. Гранов, Ш.Ф. Адылов, Д.А. Иволгин, О.А. Герасимова, А.А. Поликарпов, С.А. Чернова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19, № 5. – С. 118.
- Гранов, Д.А. Внутрипортальная терапия моноклеарными клетками аутологичного костного мозга у пациентов в листе ожидания трансплантации печени / Д.А. Гранов, А.Р. Шералиев, О.А. Герасимова, А.А. Поликарпов // Медицинский академический журнал. – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 32-40.
- Моисеенко, А.В. Возможности интервенционной радиологии до и после ортотопической трансплантации печени / А.В. Моисеенко, А.А. Поликарпов, Д.А. Гранов, П.Г. Таразов, С.В. Шаповал, А.Р. Шералиев, А.Г. Караханова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 75-79.

4. Гранов, Д.А. Опыт внутриворотного введения моноклеарных клеток аутологичного костного мозга у пациентов в листе ожидания трансплантации печени / Д.А. Гранов, А.Р. Шералиев, А.А. Поликарпов, И.И. Тилеубергенов, О.А. Герасимова, А.В. Моисеенко, А.С. Полехин, Г.А. Раскин // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 149.
5. Ivolgin, D. Intraportal injection of autologous bone marrow mononuclear fraction in patients on the waiting list of liver transplantation / D. Ivolgin, A. Seraliev, S. Adulov, O. Gerasimova, A. Polikarpov, D. Granov // Cytotherapy. – 2018. – Vol. 20, Iss. 5, S112. – P. 33

ПАТЕНТ

1. **Шералиев А.Р., Гранов Д.А., Герасимова О.А., Тилеубергенов И.И., Поликарпов А.А., Полехин А.С., Моисеенко А.В. Способ замедления прогрессирования цирроза печени у реципиентов в листе ожидания трансплантации печени. RU 2671560 С1 от 02.11.2018.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	– аланинаминотрансфераза
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
ВВ	– воротная вена
ГСК	– гемопоэтические стволовые клетки
ГЦР	– гепатоцеллюлярный рак
ИГХ	– иммуногистохимическое исследование
КМ	– костный мозг
МСК	– мезенхимные стволовые клетки
МНК	– моноклеарные клетки
ОТП	– ортотопическая трансплантация печени
ПБХ	– первичный билиарный холангит
СК	– стволовые клетки
ХВГ	– хронический вирусный гепатит
ЦП	– цирроз печени
СТР	– Child-Turcotte-Pugh
MELD – Na	– model for end-stage liver disease – Na