

ISSN 1995-1191

# ВЕСТНИК

ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ  
И ИСКУССТВЕННЫХ  
ОРГАНОВ



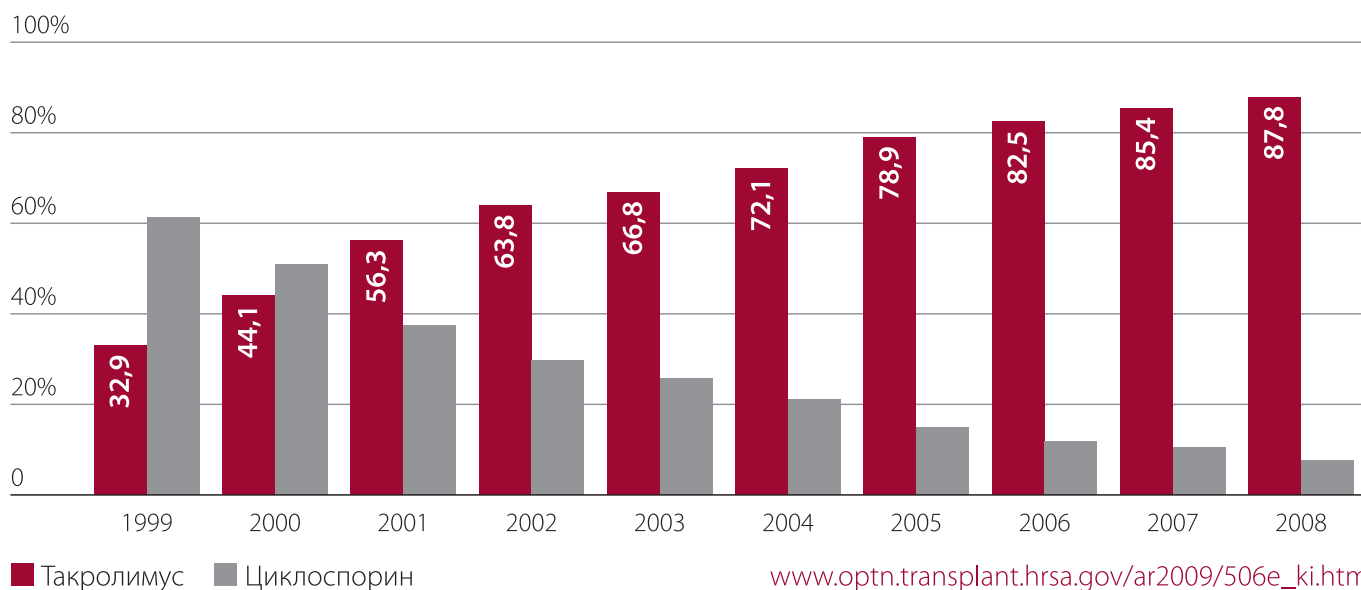
ТОМ XIII

№3–2011

# 9 ИЗ 10 ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ В США ПОЛУЧАЮТ ПРОГРАФ С ЦЕЛЬЮ ПРОФИЛАКТИКИ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА



Динамика назначения такролимуса и циклоспорина при выписке из стационара после трансплантации почки в США (SRTR)



Имеются противопоказания и побочные эффекты, перед назначением Прографа для получения полной информации необходимо ознакомиться с утвержденной инструкцией по медицинскому применению препарата.

Регистрационное удостоверение:  
ЛС-000923 от 28.05.2009 г.,  
ЛС-000922 от 21.07.2009 г.

 **ПРОГРАФ®**  
такролимус, капсулы

 **astellas** | **TRANSPLANT**

Представительство «Астеллас Фарма Юроп Б. В.» Россия, 109147, Москва, ул. Марксистская, 16. Тел. (495) 737-07-55

ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ  
ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ  
«РОССИЙСКОЕ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»

# ВЕСТНИК

## ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ

Научно-практический рецензируемый журнал  
включен в перечень ведущих научных изданий,  
выпускаемых в Российской Федерации, в которых  
рекомендована публикация основных результатов  
диссертационных исследований на соискание  
ученых степеней докторов и кандидатов наук

том XIII № 3–2011

### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**Главный редактор – С.В. Готье**

В.Ю. Абрамов  
Э.М. Балакирев  
Д.А. Гранов  
В.В. Горбунов  
И.М. Ильинский  
Г.П. Иткин  
Э.Н. Казаков  
И.Д. Кирпатовский  
А.В. Колсанов  
М.Г. Минина  
Б.Л. Миронков (ответственный секретарь)  
Я.Г. Мойсюк  
Н.А. Онищенко  
Д.В. Перлин  
В.Н. Попцов  
О.Н. Резник  
В.И. Севастьянов  
М.Л. Семеновский  
Н.А. Томилина  
О.М. Цирульников  
А.В. Чжао  
О.П. Шевченко  
Д.В. Шумаков  
Е.В. Яновская (зав. редакцией)

### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

С.Ф. Багненко (Санкт-Петербург)  
А.А. Баранов (Москва)  
Л.С. Барбараш (Кемерово)  
Л.А. Бокерия (Москва)  
Н.П. Бочков (Москва)  
А.В. Ватазин (Москва)  
Р.Х. Галеев (Казань)  
Э.И. Гальперин (Москва)  
А.М. Гранов (Санкт-Петербург)  
Ю.А. Завершинский (Екатеринбург)  
А.М. Караськов (Новосибирск)  
Н.О. Миланов (Москва)  
М.И. Перельман (Москва)  
Л.М. Рошаль (Москва)  
Г.Т. Сухих (Москва)  
М.Ш. Хубутия (Москва)  
В.И. Чиссов (Москва)  
А.Г. Чучалин (Москва)  
Т.И. Шраер (Кемерово)  
П.К. Яблонский (Санкт-Петербург)

**Адрес редакции:** Россия, 123182, Москва, ул. Щукинская, 1.  
Тел. /факс 8 (499) 193 87 62  
E-mail: [transplant2009@mail.ru](mailto:transplant2009@mail.ru)

## ТРЕБОВАНИЯ К ПУБЛИКАЦИЯМ

- Статья должна иметь визу руководителя и сопроводительное письмо учреждения (с круглой печатью).
- В конце статьи должны быть собственноручные подписи всех авторов, полностью указаны фамилия, имя, отчество, занимаемая должность, точный почтовый адрес или e-mail, телефон лица, ответственного за переписку.
- Статья (текст, рисунки и таблицы, подписи под рисунками, список литературы, реферат 10–12 строк на русском и английском языках, ключевые слова, не более 5) присылается в редакцию в одном экземпляре.
- Статья (текст, рисунки и таблицы, подписи под рисунками, список литературы, реферат) должна быть напечатана на одной стороне стандартного листа формата А4 (210×297 мм), шрифт Times new Roman, размер не менее 12, через 1,5-ный интервал между строками, поля шириной 2,5 см.
- Таблицы, рисунки и подписи к рисункам должны помещаться в отдельном файле. Места расположения рисунков и таблиц обозначаются на полях. Ссылки на рисунки и таблицы в тексте статьи обязательны.
- К статье обязательно должен прилагаться диск RW с текстом статьи в формате «doc» или «rtf» с рисунками или фотографиями.
- Объем рукописи оригинальной статьи не должен превышать 10 страниц (без учета реферата, таблиц, рисунков, списка литературы), описание клинического случая – не более 8 страниц, краткие сообщения и письма в редакцию – не более 4 страниц, лекции, обзоры – 15 страниц.
- Оригинальная статья должна содержать следующие разделы: титульная страница, введение, цель работы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы или заключение, список литературы, иллюстративный материал, реферат на русском и английском языках.
- При представлении в печать экспериментальных работ авторы должны руководствоваться Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Обязательно следует указывать вид, пол, количество животных, методы обезболивания и умерщвления животных.
- Титульная страница должна содержать фамилии, инициалы авторов статьи, название статьи, полное наименование учреждения, в котором проводилась работа.
- Если имеется несколько авторов, работающих в разных учреждениях, то приводится список этих учреждений с цифровыми ссылками принадлежности авторов к определенному учреждению.
- Требования к рисункам, представленным на магнитных носителях  
Черно-белые штриховые рисунки: формат файла TIFF (расширение \*.tif), любая программа, поддерживающая этот формат, режим – bitmap, разрешение – 600 dpi, ширина рисунка не более 180 мм, высота рисунка не более 230 мм. Каждый рисунок должен быть представлен в виде отдельного файла, озаглавленного «Рис. 1», «Рис. 2» и т. д., с указанием автора и названия статьи.
- Библиографические ссылки в тексте статьи даются в квадратных скобках в соответствии с пристатейным списком литературы. В оригинальных статьях цитируют не более 20 источников, в обзорных – не более 50. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.
- В соответствии с ГОСТом 7.1-84 пристатейную литературу оформляют следующим образом.  
В списке литературы источники указывают в алфавитном порядке (сначала работы отечественных авторов, затем – зарубежных). Все работы одного автора нужно указывать по возрастанию годов издания. Статью, написанную коллективом авторов (более четырех), помещают в списке литературы по фамилии первого автора, при этом указывают еще двух авторов, а далее ставят «и др.», для англ. – «et al.».  
Литературу указывают с названием статьи. Все источники должны быть пронумерованы в общем алфавитном порядке, а их нумерация должна строго соответствовать нумерации в тексте статьи.
- Редакция оставляет за собой право сокращать и исправлять принятые работы.  
Статьи, отосланные авторам для исправления, должны быть возвращены в редакцию не позднее чем через месяц после получения. При возвращении статьи в более поздний срок соответственно меняются дата ее поступления в редакцию и сроки опубликования.
- Нельзя направлять в редакцию работы, напечатанные в иных изданиях или посланные в другие журналы.
- Все статьи направляются на рецензирование. При получении положительной рецензии решение о принятии статьи к публикации выносится на основании ее значимости, оригинальности, достоверности представленных материалов членами редколлегии журнала.
- Рукописи, не оформленные в соответствии с указанными правилами, не рассматриваются.
- Плата за публикацию научных работ не взимается.

Статьи направлять в редакцию журнала по адресу:  
123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1, ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова»,  
«Вестник трансплантологии и искусственных органов»  
E-mail: [transplant2009@mail.ru](mailto:transplant2009@mail.ru)

Перепечатка опубликованных в журнале материалов допускается только с разрешения редакции.  
При использовании материалов ссылка на журнал обязательна.

Присланные материалы не возвращаются.

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

Редакция не несет ответственности за достоверность рекламной информации.

Издание зарегистрировано в Госкомпечати РФ, № 018616 от 23.03.99 г.

### Подписной индекс

в каталоге «Газеты и журналы» – **80248.**

Подписано к печати 12.09.11.

Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «Триада». ИД № 06059 от 16.10.01 г.  
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 504,  
тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30  
E-mail: [triada@stels.tver.ru](mailto:triada@stels.tver.ru)  
<http://www.triada.tver.ru>

Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография.  
г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91. Заказ

# СОДЕРЖАНИЕ

## СТРАНИЦА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

В.И. Шумаков (09.11.1931 – 27.01.2008 г.)

## КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Динамика содержания CD34/CD45-позитивных клеток в периферической крови пациентов после ортотопической трансплантации и резекции доли печени

*Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Курабекова Р.М., Луговская С.А., Наумова Е.В., Муратова Н.Ш., Цирульникова И.Е., Готье С.В.*

Диагностика острого отторжения по пункционным биоптатам аллотрансплантированной печени

*Шкалова Л.В., Можейко Н.П., Ильинский И.М., Мойсюк Я.Г., Цирульникова О.М., Готье С.В.*

Фармакоэкономические преимущества стратегии общей профилактики цитомегаловирусной инфекции у пациентов после трансплантации почки

*Ряженев В.В., Горохова С.Г.*

Исследование антибиотико- и фагочувствительности нозокомиальных штаммов микробов, выделенных от пациентов трансплантологической клиники

*Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Спирина Т.С., Прудникова С.А., Ромашкина Л.Ю.*

Оптимизация хирургического лечения больных с аортальными пороками и выраженной систолической дисфункцией левого желудочка

*Мехтиев Э.К., Семеновский М.Л., Попцов В.Н., Вавилов П.А., Евлюхин Д.В.*

Ретроградная перфузия головного мозга как метод его защиты во время гипотермической остановки кровообращения при операциях на восходящем отделе и дуге аорты

*Тарабарко Н.Н., Семеновский М.Л., Акопов Г.А., Попцов В.Н.*

Использование новых наборов реагентов для выявления и описания дополнительных аллелей

*Логинова М.А., Трофимова Н.П., Парамонов И.В.*

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Двухфазная динамика воздействия мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) костного мозга на печень при моделировании фиброзирующего гепатита

*Онищенко Н.А., Лондуп А.В., Газизов И.М., Деев Р.В., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е., Аврамов П.В.*

# CONTENTS

## 5 EDITORIAL

6 V.I. Shumakov (09.11.1931 – 27.01.2008)

## CLINICAL RESEARCHES

8 Dynamics of CD34/CD45 positive cells concentration in peripheral blood of patients after orthotopic liver transplantation and partial liver resection

*Shevchenko O.P., Tsiurulnikova O.M., Kurabekova R.M., Lugovskaya S.A., Naumova E.V., Muratova N.Sh., Tsiurulnikova I.E., Gautier S.V.*

15 The diagnosis of liver allograft acute rejection in liver biopsies

*Shkalova L.V., Mogeiko N.P., Iljinsky I.M., Moysyuk Y.G., Tsiurulnikova O.M., Gautier S.V.*

20 Pharmacoeconomic benefits of cytomegalovirus infection prophylactic strategy for renal transplant recipients

*Ryazhenov V.V., Gorokhova S.G.*

26 The study of antibiotic- and fagosensitivity of nosocomial strains bacteria isolated from transplanted patients

*Gabrielan N.I., Gorskaya E.M., Spirina T.S., Prudnikova S.A., Romashkina L.Y.*

33 Optimization of surgical treatment of patients with aortic valve diseases and severe left ventricular systolic dysfunction

*Mekhtiev E.K., Semenovskiy M.L., Poptsov V.N., Vavilov P.A., Evlyukhin D.V.*

41 Retrograde cerebral perfusion as method of brain protection during operations on ascending and transverse aorta with hypothermic circulatory arrest

*Tarabarko N.N., Semenovskiy M.L., Akopov G.A., Poptsov V.N.*

46 The use of new reagent kits for detection and description of additional alleles

*Loginova M.A., Trofimova N.P., Paramonov I.V.*

## EXPERIMENTAL RESEARCHES

51 Two-phase dynamics of bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC) action on liver at modeling of fibrotic hepatitis

*Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Gazizov I.M., Deev R.V., Shagidulin M.Y., Krashennikov M.E., Avramov P.V.*

Выживание клеток печени, иммобилизованных на 3D-матриксах при моделировании печеночной недостаточности  
*Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Шмерко Н.П., Андриянова А.А., Аврамов П.В., Немец Е.А., Севастьянов В.И., Готье С.В.*

Новый тип тканеинженерной конструкции кератопротеза на основе аллогенной модифицированной донорской роговицы и культивированных фибробластов кожи человека  
*Борзенко С.А., Васильев А.В., Шипунова А.В., Дашинимаев Э.Б., Мороз З.И., Комах Ю.А., Ковшун Е.В.*

**ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ**

Возможная роль протеасом печени в реализации механизмов трансплантационной толерантности  
*Божок Г.А., Карпова Я.Д., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Богомяжкова Ю.В., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П.*

Применение вспомогательных насосов для восстановления функции миокарда у пациентов с хронической сердечной недостаточностью  
*Иткин Г.П., Трухманов С.Б., Шемакин С.Ю., Поццов В.Н., Шумаков Д.В., Готье С.В.*

Основные патогенетические механизмы инфекции мочевых путей и уросепсиса после аллогенной трансплантации почки  
*Крстич М., Ватазин А.В., Прокопенко Е.И.*

**ЮБИЛЕИ**

Поздравляем Алексея Сергеевича Иванова  
 Поздравляем Эдуарда Израилевича Гальперина

**НОВЫЕ КНИГИ**

59 Survival of liver cells, immobilized on 3D-matrixes, in liver failure model  
*Shagidulin M.U., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Iljinsky I.M., Mogeiko N.P., Shmerko N.P., Andriyanova A.A., Avramov P.V., Nemets E.A., Sevastjanov V.I., Gautier S.V.*

67 New biokeratoprosthesis complex based on modified allogenic donor corneas and cultured postnatal human skin fibroblasts  
*Borzenok S.A., Vasilyev A.V., Shipunova A.V., Dashinimaev E.B., Moroz Z.I., Komakh Y.A., Kovshun E.V.*

**LITERATURE REVIEWS**

73 Possible role of liver proteasomes in the realization of mechanisms of transplantation tolerance  
*Bozhok G.A., Karpova Ya.D., Lyupina Yu.V., Legach E.I., Bogomyagkova Yu.V., Bondarenko T.P., Sharova N.P.*

82 The use of ventricle assist devices to restore myocardial function in patients with chronic heart failure  
*Itkin G.P., Trukhmanov S.B., Shemakin S.Yu., Poptsov V.N., Shumakov D.V., Gautier S.V.*

87 Main pathogenetic mechanisms in urinary tract infections and urosepsis after allogenic kidney transplantation  
*Krstić M., Vatazin A.V., Prokopenko E.I.*

**ANNIVERSARY**

93 Alexei Sergueevich Ivanov  
 94 Eduard Izrailevich Galperin

95 **NEW BOOK EDITIONS**

## *Глубокоуважаемые коллеги!*

9 ноября 2011 г. исполняется 80 лет со дня рождения академика В.И. Шумакова, основателя современной отечественной трансплантологии и науки об искусственных органах. В этот день в Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова состоится всероссийская конференция, посвященная памяти этого большого ученого – II Шумаковские чтения «Трансплантология и искусственные органы».

Первые Шумаковские чтения состоялись 9 октября 2010 г. в рамках V Всероссийского съезда трансплантологов и были посвящены проблемам сердечно-сосудистой хирургии и трансплантации сердца. В программе II Шумаковских чтений – актуальные проблемы и достижения клинической трансплантологии, современные аспекты регенеративной медицины, вопросы создания искусственных и биоискусственных органов и систем.

К 80-летию В.И. Шумакова выходит в свет и будет представлена читателям книга «Иммуносупрессия при трансплантации солидных органов», которую авторы посвятили памяти Учителя.

В.И. Шумаков обладал неукротимой волей и энергией, исключительной широтой научного видения, что позволяло ему формировать направление, задавать темп работы коллектива сотрудников – врачей и ученых. Его научное наследие огромно. Безусловно, программа одной конференции не позволит отразить всего многообразия научных направлений, которые удалось заложить и разработать академику В.И. Шумакову и у истоков которых он стоял.

Сегодня нет среди нас этого великого человека, но есть Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов, который носит его имя. Есть научная школа – целая плеяда зрелых и молодых ученых, разрабатывающих начатые им проекты, развивающих заложенные Валерием Ивановичем основы, продолжающих его дело.

Есть сотни наших сограждан, излеченных руками этого великого хирурга, продолжающих полноценную жизнь благодаря его труду, а также тому, что операции по пересадке жизненно важных органов перестали быть исключительно редкими и выполняются регулярно как один из видов оказываемой в нашей стране высокотехнологичной медицинской помощи.

В.И. Шумаков внес неоценимый вклад в развитие отечественной медицинской науки и практики, и память об этом замечательном человеке будет жить в делах, продолжаемых его учениками и последователями, в сердцах спасенных им пациентов.

*С уважением  
главный редактор журнала,  
директор ФГУ «Федеральный научный центр  
трансплантологии и искусственных органов  
им. академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ,  
член-корреспондент РАМН,  
профессор*



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters.

*С.В. Готье*

## В.И. ШУМАКОВ (09.11.1931 – 27.01.2008)



*9 ноября 2011 г. исполняется 80 лет со дня рождения академика В.И. Шумакова, основателя современной отечественной трансплантологии и науки об искусственных органах. Более 33 лет, с июля 1974-го по январь 2008 г., В.И. Шумаков бессменно возглавлял институт трансплантологии и искусственных органов, который теперь носит его имя.*

Валерий Иванович Шумаков родился 9 ноября 1931 г. в Москве в семье инженера-строителя. В 1956 г. он окончил с отличием 1-й Московский медицинский институт имени И.М. Сеченова Минздрава СССР. В 1956–1959 гг. В.И. Шумаков обучался в аспирантуре при кафедре топографической анатомии и оперативной хирургии 1-го Московского медицинского института имени И.М. Сеченова, по окончании которой успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Хирургическое исправление недостаточности митрального клапана». В 1959–1963 гг. В.И. Шумаков работал младшим научным сотрудником академической группы академика Б.В. Петровского во Всесоюзном научно-исследовательском институте клинической и экспериментальной хирургии Минздрава СССР, в 1963–1966 гг. – старшим научным сотрудником, в 1966–1969 гг. – заведующим лабораторией искусственного сердца и вспомогательного кровообращения, в 1969–1974 гг. – руководителем отдела трансплантации и искусственных органов того же института. В 1965 г. Валерий Иванович успешно защитил докторскую диссертацию на тему «Протезирование клапанов сердца».

В июле 1974 г. приказом министра здравоохранения СССР Б.В. Петровского В.И. Шумаков назначен

директором ранее созданного Института пересадки органов и тканей АМН СССР. В 1978 г. институт был переименован в НИИ трансплантологии и искусственных органов Минздрава СССР; В.И. Шумаков бессменно возглавлял его вплоть до января 2008 г.

Под руководством В.И. Шумакова Институт прошел большой путь, стал ведущим научно-исследовательским центром, разрабатывающим биологические и клинические проблемы трансплантологии, обладающим многофункциональной клинической базой, оснащенной современным оборудованием, где выполняется широкий спектр трансплантологических и других высокотехнологичных операций. По инициативе и при непосредственном участии В.И. Шумакова стало активно разрабатываться новое направление: разработка, создание и применение искусственных органов, которое неразрывно связано с дальнейшим прогрессом трансплантологии.

14 января 2009 г. приказом министра здравоохранения и социального развития РФ Т.А. Голиковой Институт переименован в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России.

В.И. Шумакова как ученого отличала широта творческих устремлений, исключительная четкость изложения мысли, глубокое и всестороннее изучение проблемы, а его рекомендации по лечению больного всегда были обоснованы с патогенетических и физиологических позиций. Ему принадлежит ведущая роль в становлении клинической трансплантологии в нашей стране, в разработке, создании и внедрении в клиническую практику искусственных органов (клапанов сердца, кардиостимуляторов, искусственного сердца, искусственного левого желудочка, аппаратов вспомогательного кровообращения и др.). Его научное наследие необычайно велико и многогранно. В.И. Шумаков – автор трех научных открытий, более 20 монографий, более 450 научных работ, более 200 изобретений как в области клинической медицины, так и на стыке медицины и точных наук. В 1995 г. под его редакцией вышло первое в России «Руководство по трансплантологии». Наиболее значимые научные работы В.И. Шумакова: «Моделирование физиологических систем организма», «Консервация органов», «Методы, режимы и оптимальное управление процессами консервации и восстановления деятельности сердечного трансплантата», «Вспомогательное кровообращение», «Искусственное сердце», «Искусственные органы», «Физиологические проблемы трансплантологии и применение искусственных ор-



ганов», «Трансплантация печени», «Трансплантация островковых клеток поджелудочной железы», «Модификация хирургической техники пересадки сердца», «Отторжение трансплантированного сердца», «Трансплантация сердца», «Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца» и др.

Валерий Иванович Шумаков был действительным членом Российской Академии наук, членом Российской Академии медицинских наук, Российской Академии медико-технических наук и Российской Академии естественных наук.

В.И. Шумакову принадлежит инициатива организации и создания журнала «Вестник трансплантологии и искусственных органов», главным редактором которого он был со дня основания журнала (1994 г.) до конца своих дней.

В.И. Шумаков являлся президентом межрегиональной общественной организации «Научное общество трансплантологов», председателем научного совета по трансплантологии и искусственным органам РАМН, главным трансплантологом МЗ РФ, председателем Экспертного совета МЗ РФ, членом правления Всероссийского общества сердечно-сосудистых хирургов, членом международного общества хирургов, почетным членом Французского общества трансплантологов, членом международного общества искусственных органов, членом международного общества пересадки сердца и легких, членом международного общества трансплантологов, членом Американского общества торакальных хирургов, членом Американского общества искусственных органов, членом Европейского общества искусственных органов, членом Европейского общества сердечных и торакальных хирургов, членом Европейского общества сердечно-сосудистых хирургов; в течение 20 лет являлся координатором работ в рамках Межправительственного соглашения между СССР и США по искусственному сердцу и вспомогательному кровообращению.

Деятельность В.И. Шумакова отмечена правительственными наградами и получила широкое общественное признание.

В 1971 г. Валерий Иванович в составе коллектива ведущих отечественных ученых-клиницистов во главе с академиком Б.В. Петровским был удостоен своей первой правительственной награды – Государственной премии СССР за разработку и внедрение в клиническую практику пересадки почки.

12 марта 1988 г. В.И. Шумаков осуществил первую успешную пересадку сердца в СССР. В 1998 г. академик РАН и РАМН В.И. Шумаков и группа сотрудников руководимого им института награждены премией Совета Министров за разработку и внедрение в клиническую практику пересадки сердца.

Государство и общественность высоко оценили заслуги заслуженного изобретателя РСФСР (1978), Героя Социалистического Труда (1990), почетного гражданина города Москвы (1997): В.И. Шумаков

награжден орденом «За заслуги перед Отечеством» III степени (1995), II степени (1999), орденом Святого апостола Андрея Первозванного (2001).

Заслуженный деятель науки РФ В.И. Шумаков был награжден также многочисленными общественными премиями, наградами, почетными медалями и орденами: премией имени академика Б.П. Петровского «Выдающемуся хирургу мира», памятной медалью имени академика П.К. Анохина, орденом «Слава России», орденом Сергия Радонежского III степени, орденом «Ломоносов», «Звезда Вернадского» I степени и др.

В.И. Шумаков явился основателем и лидером мощной научной школы – им подготовлено более 50 докторов и 120 кандидатов медицинских и биологических наук. Его ученики – врачи, биологи, инженеры, математики и физики – работают в разных регионах России и ближнего зарубежья. В разные годы их всех объединяло горячее желание участвовать в решении проблем кардиохирургии и трансплантации жизненно важных органов, способствовать разработке и применению искусственных органов. Валерий Иванович Шумаков стал для них Учителем. Обладая необычайной целеустремленностью, неукротимой волей и энергией, широтой научного видения, он задавал темп, направление и одновременно предоставлял своим ученикам свободу творческого поиска, зажигал, закалял и формировал их профессионализм.

В настоящее время ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России является головным научным учреждением, которое осуществляет координацию исследований по проблемам трансплантации органов и тканей, проводимых в стране, а также подготовку врачебных и научных кадров. Сегодня усилия руководства и коллектива направлены на обеспечение преемственности научно-практической деятельности института, развитие направлений, заложенных В.И. Шумаковым, создание и расширение инновационных проектов в области клинической трансплантологии и смежных наук.

Сохраняя и развивая традиции, заложенные В.И. Шумаковым, мы убеждены, что наша созидательная деятельность в области развития клинической трансплантологии, создания новых технологий, сохранения здоровья людей – это лучшая дань его памяти.

*Коллектив ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития России  
и редакция журнала  
«Вестник трансплантологии  
и искусственных органов»*

## ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ CD34/CD45-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И РЕЗЕКЦИИ ДОЛИ ПЕЧЕНИ

Шевченко О.П.<sup>1</sup>, Цирульникова О.М.<sup>1</sup>, Курабекова Р.М.<sup>1</sup>, Луговская С.А.<sup>2</sup>, Наумова Е.В.<sup>2</sup>, Муратова Н.Ш.<sup>1</sup>, Цирульникова И.Е.<sup>1</sup>, Готье С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва

<sup>2</sup> ГОУ ДПО «Российская медицинская академия постдипломного образования», кафедра клинической лабораторной диагностики, г. Москва

В работе приводятся данные по содержанию CD34/CD45+-клеток в крови детей-реципиентов и взрослых родственных доноров печени. Исследовано 15 пар реципиентов (возраст: 4–60 месяцев) и доноров (29 ± 5 лет). Все дети страдали циррозом печени в исходе врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы. Содержание CD34/CD45+-клеток в венозной крови реципиентов до операции было выше, чем таковое у доноров. Уровень CD34/CD45+-клеток у реципиентов не коррелировал с полом, возрастом, весом и ростом, но коррелировал с некоторыми биохимическими параметрами, отражающими функции печени. Содержание CD34/CD45+-клеток в венозной крови реципиентов не изменялось после трансплантации печени. У доноров резекция доли печени не вызывала статистически значимых изменений ни в абсолютном, ни в относительном содержании CD34/CD45+-клеток в крови. Представленные данные позволяют полагать, что ни трансплантация, ни резекция доли печени не оказывают значимого влияния на содержание CD34/CD45+-клеток в периферической крови.

*Ключевые слова:* дети – реципиенты печени, родственные доноры печени, стволовые клетки костного мозга, мобилизация стволовых клеток.

## DYNAMICS OF CD34/CD45 POSITIVE CELLS CONCENTRATION IN PERIPHERAL BLOOD OF PATIENTS AFTER ORTHOTOPIC LIVER TRANSPLANTATION AND PARTIAL LIVER RESECTION

Shevchenko O.P.<sup>1</sup>, Tsiurulnikova O.M.<sup>1</sup>, Kurabekova R.M.<sup>1</sup>, Lugovskaya S.A.<sup>2</sup>, Naumova E.V.<sup>2</sup>, Muratova N.Sh.<sup>1</sup>, Tsiurulnikova I.E.<sup>1</sup>, Gautier S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Number of CD34/CD45+ cells were determined in blood of pediatric recipients and adult living-related liver donors. It has been investigated 15 pairs of recipients (aged from 4 to 60 months) and donors (29 ± 5 years). All the children had liver cirrhosis caused by congenital and inherited diseases of hepatobiliary system. Concentration of CD34/CD45+ cells in venous blood of recipients was higher than in donors. In recipients level of CD34/CD45+ cells did not correlate with sex, age, weight and height but did correlate with some biochemical parameters related to liver function. After liver transplantation number of CD34/CD45+ cells did not change in peripheral blood of recipients. In donors partial liver resection did not cause statistically significant changes in number or concentration of CD34/CD45+ cells in blood. Presented data suggests that neither liver transplantation nor liver resection has remarkable influence on number of CD34/CD45 + cells in peripheral blood.

*Key words:* pediatric liver transplantation, living-related liver donor, bone marrow stem cells, mobilization of stem cells.

Статья поступила в редакцию 6.06.11 г.

**Контакты:** Курабекова Ривада Мусабековна, старший научный сотрудник лаборатории клинич. и экспер. биохимии ФНЦТИО.  
Тел. (499) 190-53-41, e-mail: kourabr@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

В исследованиях последних лет было обнаружено, что гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) способны мобилизоваться в периферическую кровь у больных с циррозом печени, а также в ответ на резекцию и трансплантацию печени [10, 12, 14]. Гистологические исследования биоптата трансплантированной печени пациентов показали, что в структуре донорской печени обнаруживаются клетки с генотипом реципиента [5, 9]. Эти работы позволяют предполагать участие стволовых клеток костного мозга в восстановлении печени после ее повреждения или частичной гепатэктомии [4, 6]. Однако данные о роли и степени вклада стволовых клеток костного мозга в восстановление ткани и функций печени неоднозначны [2, 3, 7, 16], не всегда удается обнаружить сам факт мобилизации клеток костного мозга в кровотоки при гепатэктомии, при острой и хронической печеночной недостаточности [8, 15].

Гемопоэтические стволовые клетки находятся в костномозговых нишах, где происходит их деление и дифференцировка. В процессе созревания ГСК поступают в периферический кровоток, а затем опять возвращаются в костный мозг. Было показано, что мобилизация ГСК усиливается под действием различных фармакологических агентов, а также при таких состояниях, как стресс, воспаление или повреждение некоторых органов. Биологический смысл эффекта мобилизации ГСК до конца не ясен, предполагается, что он заключается в сохранении популяции стволовых клеток в условиях повреждающего воздействия различных факторов, а также в возможном участии этих клеток в восстановлении поврежденных органов, например, сердца или печени [13, 14].

Гемопоэтические клетки-предшественницы, обладающие фенотипом CD34/CD45+, являются наиболее изученной популяцией стволовых клеток костного мозга. В настоящее время эти клетки интенсивно исследуются как в экспериментальных работах на животных [17], так и в клинической практике в связи с их возможным использованием в клеточной терапии различных органов в качестве самого изученного и доступного клеточного ресурса [18]. Исследование динамики ГСК в периферической крови пациентов после трансплантации и резекции печени может помочь в понимании роли стволовых клеток костного мозга в процессах ее восстановления.

Целью данного исследования явился анализ содержания и динамики CD34/CD45+-клеток в периферической крови реципиентов – детей раннего возраста до и после ортотопической трансплантации и родственных доноров до и после резекции доли печени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 15 пар реципиентов и родственных доноров до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после ортотопической трансплантации и резекции доли печени соответственно.

В исследование включены дети в возрасте от 4 до 60 месяцев (медиана составила 8 месяцев), из них 8 мальчиков и 7 девочек со средней массой тела  $9 \pm 4$  кг и ростом  $79 \pm 18$  см. Все дети страдали циррозом печени в исходе врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы: показаниями к трансплантации печени у 4 пациентов была терминальная стадия печеночной недостаточности в исходе атрезии желчевыводящих путей, у 3 пациентов – билиарной гипоплазии, у 3 – билиарного цирроза, у 2 – криптогенного цирроза, у одного больного – цирроза печени неясной этиологии, у одного – синдрома Alagille. Ретрансплантация печени произведена у одного пациента. В 14 случаях была проведена трансплантация левого латерального сектора печени и в одном случае – правой доли печени.

Возраст доноров в среднем составил  $29 \pm 5$  (от 21 до 40) лет; 6 мужчин и 9 женщин со средней массой тела  $67 \pm 13$  кг и ростом  $165 \pm 10$  см.

Материалом исследования служила венозная кровь. Количество CD34/CD45+-клеток в периферической крови определяли методом проточной цитометрии с помощью набора реагентов для определения стволовых клеток (Becton Dickinson, США) на цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Число CD34/CD45+-клеток выражали в абсолютном количестве клеток в микролитре крови и в процентах к общему количеству лейкоцитов.

Концентрацию СРБ в плазме крови определяли методом иммунотурбидиметрии с усилением латексом (Aptec Diagnostics nv, Бельгия).

Плановое лабораторное обследование пациентов включало общий и биохимический анализы крови.

Данные представлены как среднее арифметическое и стандартное отклонение при нормальном распределении значений, либо в виде медианы распределения и интервала значений для непараметрических выборок. Для анализа нормально распределенной выборки использовали парный критерий Стьюдента. Статистическую обработку данных, не отвечающих требованиям нормального распределения, проводили методами непараметрической статистики. При сравнении независимых выборок рассчитывали U-критерий Манна–Уитни. Коэффициент корреляции рассчитывали по Спирмену. Дисперсионный анализ повторных измерений проводили с помощью критерия Фридмана, для сравнения зависимых переменных применяли парный критерий Вилкоксона. Статистически значимыми считали различия, когда вероятность ошибки составляла не более 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены сравнительные данные о содержании CD34/CD45+–клеток в периферической крови реципиентов и доноров до операции. Количество CD34/CD45+–клеток составило 2,098 (1,097–11,363) /мкл крови реципиентов и было выше, чем у доноров доли печени – 1,340 (0,530–2,712) клеток/мкл ( $p < 0,005$ ) (рис. 1, а). Процентное содержание этих клеток от общего количества лейкоцитов в крови реципиентов составляло 0,042% (0,016–0,099) и также было выше, чем у доноров доли печени – 0,023 (0,008–0,046)% ( $p < 0,05$ ) (рис. 1, б). Более высокое содержание CD34/CD45+–клеток в периферической крови детей до операции по сравнению с таковым у взрослых здоровых доноров может быть связано с возрастом пациентов и/или с имеющимся у них заболеванием печени.

Для изучения взаимосвязи содержания CD34/CD45+–клеток в крови и различных клинических и биохимических параметров был проведен анализ корреляций между содержанием исследуемых клеток и полом, возрастом, весом, ростом пациентов, уровнем С-реактивного белка (СРБ), а также ряда рутинно определяемых биохимических параметров (содержание мочевины, глюкозы, креатинина, общего и свободного билирубина, альбумина, общего белка, гемоглобина, активности щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ, ГГТ, количества лейкоцитов и эритроцитов) в крови реципиентов и доноров доли печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции (табл. 1).

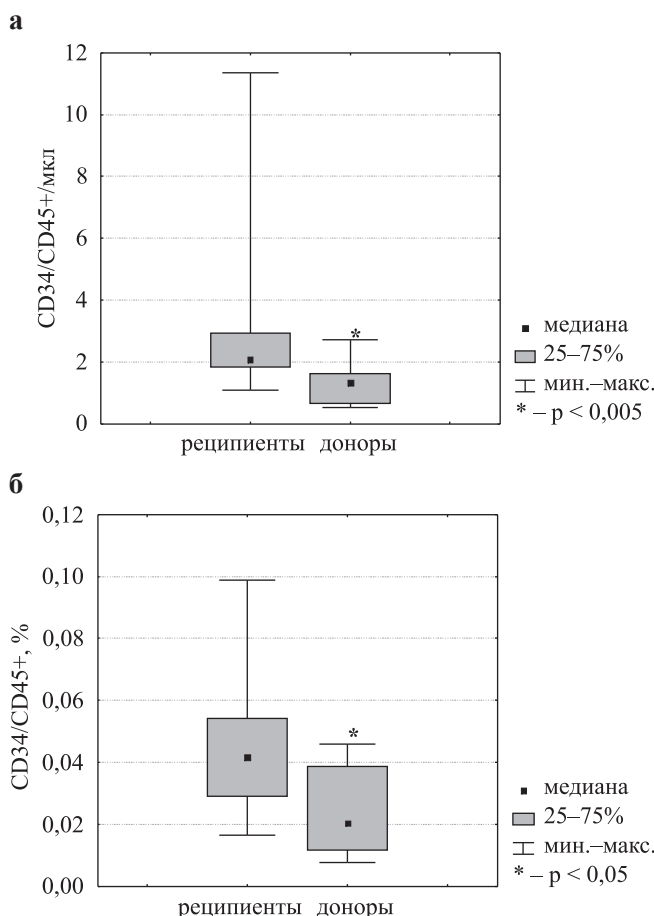


Рис. 1. Содержание CD34/CD45+–клеток (а) и процентное содержание этих клеток от общего количества лейкоцитов (б) в периферической крови реципиентов и доноров доли печени до операции

Таблица 1

**Значения биохимических параметров в крови реципиентов и доноров доли печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции**

Параметр	Реципиенты			Доноры		
	до операции	1–4	5–7	до операции	1–4	5–7
Дни						
СРБ, мг/л	10,7 (5,0–34,0)	24,0 (5,0–48,0)	10,7 (4,0–44,0)	5,0 (4,0–14,6)	–	34,0 (5,6–45,7)
Мочевина, ммоль/л	4,7 ± 2,2	10,0 ± 4,0	6,6 ± 3,0	4,8 ± 1,6	3,7 ± 1,1	5,0 ± 1,0
Глюкоза, ммоль/л	4,0 ± 1,0	5,3 ± 1,0	5,9 ± 3,8	4,9 ± 0,4	5,4 ± 0,8	5,9 ± 0,7
Креатинин, мкмоль/л	22,9 ± 13,2	44,1 ± 15,7	32,0 ± 6,5	80,7 ± 10,1	67,7 ± 11,8	69,8 ± 12,3
Альбумин, г/л	37,3 ± 5,5	36,9 ± 5,0	40,3 ± 6,0	44,5 ± 3,0	35,5 ± 2,6	40,6 ± 2,9
Своб. бил., мкмоль/л	131,9 (43,2–398,0)	38,8 (8,8–159,8)	19,8 (2,3–162,9)	1,5 (0,6–6,0)	2,3 (1,8–8,5)	1,4 (0,7–37,7)
Общ. бил., мкмоль/л	289,8 (73,8–652,0)	99,8 (22,8–398,0)	43 (14,3–313,0)	13,8 (7,9–89,0)	18,9 (14,0–41,9)	10,3 (5,6–100,0)
Общ. белок, г/л	76,8 ± 8,9	67,7 ± 8,2	76,9 ± 5,9	78,2 ± 6,9	63,3 ± 8,2	76,3 ± 5,1
Нб, г/л	89,9 ± 8,7	90,2 ± 21,4	86,1 ± 12,4	138,9 ± 12,4	116,2 ± 15,3	118,0 ± 19,5
ЩФ, Ед/л	401 (158–1013)	185 (80–329)	205 (72–667)	56 (40–322)	57 (44–111)	68 (42–476)
АЛТ, Ед/л	110 (55–212)	463 (193–920)	155 (44–425)	19 (11–26)	168 (94–877)	89 (25–524)
АСТ, Ед/л	183 (71–512)	346 (55–804)	77 (33–222)	18 (14–22)	132 (68–493)	48 (17–255)
ГГТ, Ед/л	61 (32–365)	41 (27–83)	109 (16–243)	14 (8–39)	18 (9–48)	62 (23–233)
WBC, 10 <sup>9</sup> /л	7,4 ± 3,8	12,3 ± 6,8	9,2 ± 3,7	5,9 ± 1,5	12,9 ± 5,9	6,5 ± 1,7
RBC, 10 <sup>12</sup> /л	3,5 ± 0,7	3,2 ± 0,6	3,1 ± 0,4	4,6 ± 0,3	3,9 ± 0,5	4,0 ± 0,6

Исследование показало, что у реципиентов не было статистически значимых корреляций между содержанием CD34/CD45+-клеток в крови и полом, возрастом, весом или ростом пациентов ни до, ни после операции. Согласно данным R.M. Lemoli и A. D'Addio [14], наблюдается отрицательная зависимость уровня ГСК от возраста, однако в нашем исследовании такой корреляции обнаружить не удалось. Нельзя исключить, что исследуемые нами возрастные интервалы (от 4 до 60 месяцев у реципиентов и от 21 до 40 лет у доноров) являются довольно узкими и недостаточными для получения корреляции. У доноров статистически значимая корреляция ( $p < 0,05$ ) была найдена между абсолютным количеством CD34/CD45+-клеток в крови до операции и полом ( $r = 0,63$ ). У мужчин-доноров уровень CD34/CD45+-клеток в крови до операции был выше, чем у женщин. Данных других авторов о различиях в количестве CD34/CD45+-клеток у лиц разного пола нам обнаружить не удалось.

Расчет коэффициентов корреляции уровня CD34/CD45+-клеток и величины различных биохимических параметров крови реципиентов и доноров доли печени показал наличие достоверных корреляций ( $p < 0,05$ ) у реципиентов до операции между уровнем CD34/CD45+-клеток и уровнем СРБ ( $r_s = -0,69$ ), альбумина ( $r_s = 0,64$ ), гемоглобина ( $r_s = 0,70$ ) и количеством эритроцитов ( $r_s = 0,73$ ) (табл. 2).

Наличие корреляций уровней ГСК с различными биохимическими параметрами, связанными с воспалением (СРБ) и с функцией печени (альбумин, гемоглобин, билирубин), может являться косвенным подтверждением взаимозависимости этих параметров. У доноров доли печени до операции такие корреляции не были выявлены, но в 1–4-й дни после операции выявлена связь с уровнем креатинина ( $r_s = 0,68$ ), свободного ( $r_s = 0,73$ ) и общего билирубина ( $r_s = 0,86$ ) и ГГТ ( $r_s = 0,68$ ) (табл. 3).

Таблица 2

**Коэффициенты корреляции содержания CD34/CD45+-клеток и биохимических параметров у реципиентов печени до операции ( $p < 0,05$ )**

Параметры	Коэффициент корреляции	
	CD34/CD45+/мкл	CD34/CD45+, %
СРБ, мг/л	-0,69	
Альбумин, г/л	0,64	
RBC, $10^{12}/л$	0,73	0,58
Гемоглобин, г/л	0,70	

Таблица 3

**Коэффициенты корреляции содержания CD34/CD45+-клеток и биохимических параметров доноров печени в 1–4-й дни после операции ( $p < 0,05$ )**

Параметры	Коэффициент корреляции	
	CD34/CD45+/мкл	CD34/CD45+, %
Креатинин, мкмоль/л	0,59	0,68
Своб. билирубин, мкмоль/л	0,73	
Общ. билирубин, мкмоль/л	0,86	0,71
ГГТ, Ед/л		0,68

У детей, страдающих врожденными и наследственными заболеваниями печени, количество CD34/CD45+-клеток до операции статистически не отличалось от такового в 1–4-й дни – 1,568 (0,325–3,021) клеток/мкл – и 5–7-й дни после трансплантации – 1,732 (0,427–5,298) клеток/мкл (рис. 2, а). Процентное содержание CD34/CD45+-клеток от общего количества лейкоцитов периферической крови до операции составляло 0,042% (0,016–0,099)

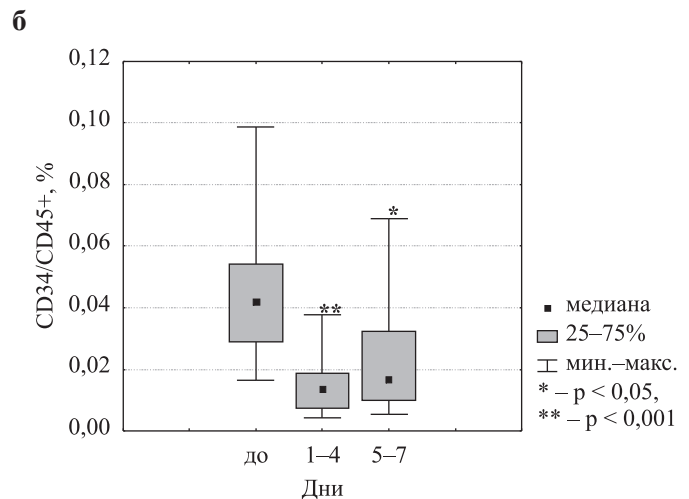
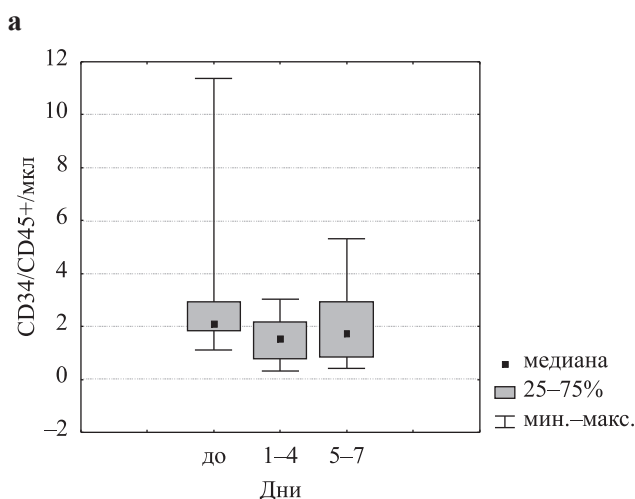


Рис. 2. Динамика содержания CD34/CD45+-клеток (а) и процентного содержания этих клеток от общего количества лейкоцитов (б) в периферической крови реципиентов доли печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции

и снижалось в 1–4-й дни после операции до 0,014% (0,004–0,038),  $p = 0,001$ . В 5–7-й дни после трансплантации процентное содержание CD34/CD45+-клеток также было ниже, чем до операции, и составляло 0,017% (0,005–0,069),  $p = 0,005$  (рис. 2, б). Количество лейкоцитов крови у реципиентов до операции составляло  $7,4 \pm 3,8 \times 10^9$  л, в 1–4-й дни после трансплантации их количество достоверно увеличивалось до  $12,3 \pm 6,8 \times 10^9$  л ( $p = 0,02$ ), а в 5–7-й дни после трансплантации возвращалось к уровню, близкому к исходному –  $9,2 \pm 3,7 \times 10^9$  л. Представленные результаты показывают, что обнаруженный факт снижения процентного содержания CD34/CD45+-клеток от общего количества лейкоцитов периферической крови реципиентов после трансплантации, по-видимому, в большей степени обусловлен увеличением общего количества лейкоцитов после операции, чем изменением абсолютного количества CD34/CD45+-клеток в кровотоке.

Анализ доступной литературы не позволил обнаружить сообщений о содержании CD34/CD45+-клеток в периферической крови у детей – реципиентов доли печени. Данные исследований о мобилизации ГСК в периферическую кровь после трансплантации и частичной резекции печени у взрослых пациентов противоречивы: согласно результатам работы R.M. Lemoli и др. [13], трансплантация печени вызывает мобилизацию ГСК у взрослых реципиентов трупной печени, С. Di Campli и др. [7] не удалось обнаружить мобилизации стволовых клеток костного мозга в периферический кровоток у взрослых пациентов с различными заболеваниями печени после частичной резекции печени. В нашей работе количество CD34/CD45+-клеток/мкл крови не менялось после трансплантации доли печени детям, однако наблюдалось снижение их процентного содержания в венозном кровотоке. Обнаруженное снижение

процентного содержания CD34/CD45+-клеток в периферической крови расценено нами как следствие увеличения общего количества лейкоцитов и поступления в кровь других популяций лейкоцитов после операции. Полученные нами результаты отличаются от данных, продемонстрировавших увеличение стволовых клеток в кровотоке после трансплантации печени взрослым реципиентам. Это может быть связано с тем, что, в отличие от исследований, проведенных у пациентов после трансплантации трупной печени, наши исследования проведены у детей после трансплантации доли печени живого родственного донора, которая проходит со значительно меньшим временем ишемии [1].

Хотя в целом в исследованной нами группе детей-реципиентов не наблюдалось статистически значимых изменений в количестве ГСК в периферической крови после трансплантации доли печени, индивидуальные значения уровня CD34/CD45+-клеток у отдельных пациентов показывали наличие изменений. На рис. 3 представлены индивидуальные значения содержания CD34/CD45+-клеток в периферической крови реципиентов до и после трансплантации печени. У реципиентов печени преобладала тенденция к снижению содержания CD34/CD45+-клеток после трансплантации, хотя у ряда пациентов их уровень не изменялся, а у 2 реципиентов содержание этих клеток повышалось в 1–4-й и 5–7-й дни после трансплантации. Возможно, что увеличение содержания CD34/CD45+-клеток в периферической крови может отражать особенности течения послеоперационного периода либо быть проявлением индивидуальной реактивности. Для понимания причин различий в динамике содержания CD34/CD45+-клеток у различных пациентов необходимы дальнейшие исследования.

У взрослых здоровых доноров доли печени содержание CD34/CD45+-клеток в венозной крови до

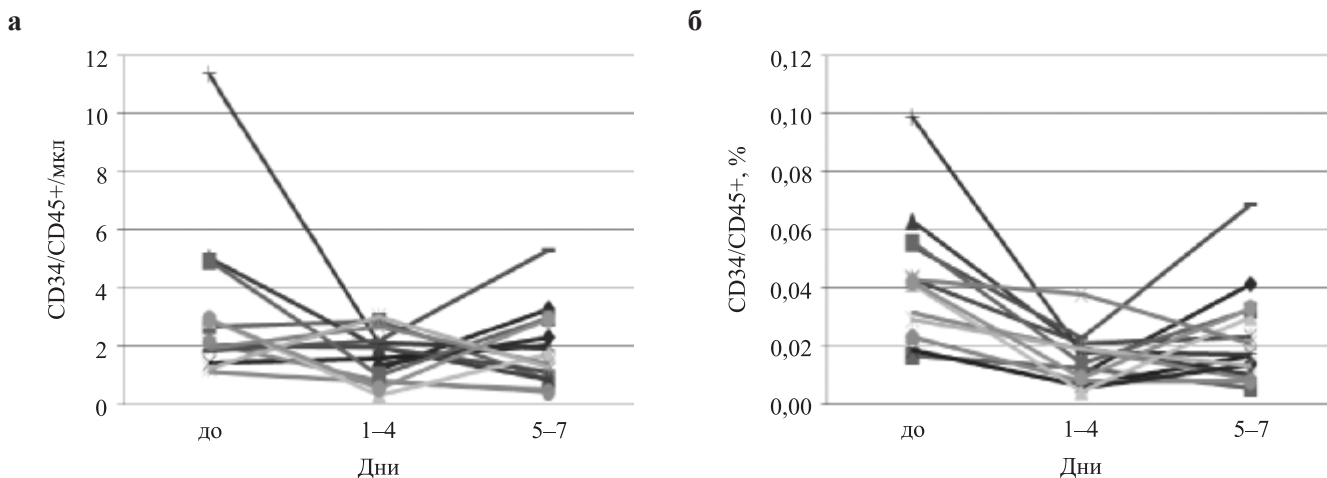


Рис. 3. Изменения индивидуальных значений содержания CD34/CD45+-клеток (а) и процентного содержания этих клеток от общего количества лейкоцитов (б) в периферической крови реципиентов доли печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции

операции составляло 1,340 (0,530–2,712) клеток/мкл и не отличалось от такового в 1–4-й дни после резекции доли печени – 1,135 (0,209–16,640) клеток/мкл. В 5–7-й дни после операции содержание CD34/CD45+-клеток у доноров составляло 1,596 (0,762–11,615) клеток/мкл и также не отличалось от такового до операции или в 1–4-й дни после резекции (рис. 4, а). Процентное содержание CD34/CD45+-клеток от общего количества лейкоцитов в венозной крови доноров составляло: до операции – 0,023 (0,008–0,046)%, в 1–4-й дни после операции – 0,009 (0,002–0,106)% и в 5–7-й дни после резекции доли печени – 0,022 (0,015–0,108)% (рис. 4, б). Статистический анализ не позволил выявить различий в процентном содержании CD34/CD45+-клеток от общего количества лейкоцитов у доноров до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции. Количество лейкоцитов крови у доноров до операции составляло  $5,9 \pm 1,5 \times 10^9$  л, достоверно увеличивалось до  $12,9 \pm 5,9 \times 10^9$  л в 1–4-й дни ( $p = 0,02$ ) и возвращалось к уровню, близкому к исходному –  $6,5 \pm 1,7 \times 10^9$  л, –

в 5–7-й дни после резекции. Несмотря на увеличение количества лейкоцитов в венозной крови доноров в 1–4-й дни после операции, процентное содержание CD34/CD45+-клеток от общего количества лейкоцитов у доноров не показало значимых изменений до и после операции.

На рис. 5 представлены индивидуальные значения содержания CD34/CD45+-клеток в периферической крови доноров до и после резекции доли печени. У большинства доноров печени уровни CD34/CD45+-клеток после операции практически не изменялись, но у трех пациентов наблюдалось заметное повышение этого показателя в 1–4-й и 5–7-й дни после операции. Возможно, что различная динамика уровня CD34/CD45+-клеток в периферической крови после резекции доли печени у доноров может быть проявлением индивидуальной реактивности и требует дальнейшего исследования.

Таким образом, в нашем исследовании резекция доли печени у здоровых доноров не приводила к мобилизации CD34/CD45+-клеток в периферическую

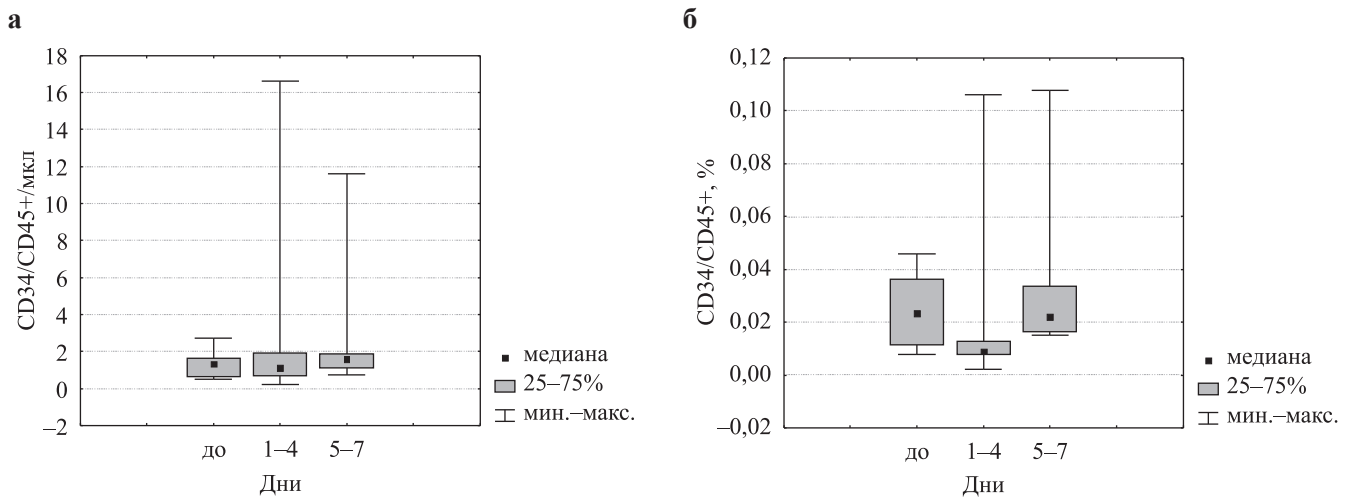


Рис. 4. Динамика содержания CD34/CD45+-клеток (а) и процентного содержания этих клеток от общего количества лейкоцитов (б) в периферической крови доноров доли печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции

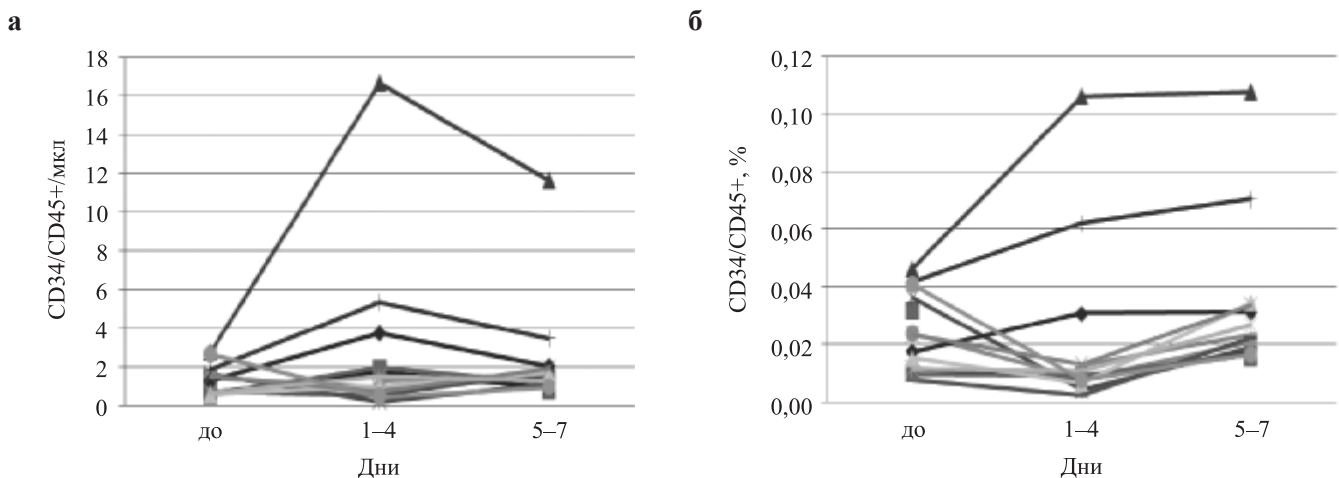


Рис. 5. Изменения индивидуальных значений содержания CD34/CD45+-клеток (а) и процентного содержания этих клеток от общего количества лейкоцитов (б) в периферической крови доноров фрагмента печени до операции, в 1–4-й и 5–7-й дни после операции

кровь пациентов. Представленные в нашей работе значения уровня CD34/CD45+-клеток у здоровых доноров согласуются с данными других авторов [6, 13]. В данных исследованиях было обнаружено повышение содержания CD34/CD45+-клеток в периферическом кровотоке после частичной резекции печени у пациентов с доброкачественными и злокачественными опухолями печени. В работе Gehling и др. [11] мобилизация ГСК была обнаружена у здоровых доноров после резекции доли печени, однако в этом исследовании определяли другую популяцию гемопоэтических клеток – CD133+-клетки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные результаты показывают, что содержание CD34/CD45+-клеток в периферической крови детей, страдающих циррозом печени в исходе врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы, выше, чем у здоровых взрослых доноров доли печени. Уровень исследуемых клеток в периферической крови детей-реципиентов до трансплантации и доноров в 1–4-й дни после операции коррелировал с биохимическими параметрами, связанными с функцией печени, такими как уровни альбумина, билирубина и гемоглобина.

Ортопеченная трансплантация доли печени родственными здоровыми донорами детям с терминальной стадией болезни печени не сопровождается достоверными изменениями количества CD34/CD45+-клеток в периферической крови. Резекция доли печени у здоровых доноров также не вызывает изменения уровня этих клеток. Таким образом, наши данные позволяют полагать, что ни трансплантация, ни частичная резекция доли печени сами по себе не вызывают мобилизацию CD34/CD45+-клеток в периферический кровоток, однако уровень этих клеток может быть связан с функцией печени. Изменение содержания исследуемых клеток у ряда пациентов после операции может отражать особенности течения послеоперационного периода либо быть проявлением индивидуальной реактивности и требует дальнейшего исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В., Константинов В.А., Цирульникова О.М. Трансплантация печени // М.: Медицинское информационное агентство, 2008. С. 1–246.
2. Курабекова Р.М., Муратова Н.Ш., Цирульникова И.Е. и др. Исследование мобилизации CD34+-клеток и уровня СРБ у реципиентов и доноров печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. XII. С. 130–131.
3. Курабекова Р.М., Цирульникова О.М., Шевченко О.П. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток при трансплантации и резекции печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. XII (4). С. 86–92.
4. Лондун А.В., Онищенко Н.А., Шагидулин М.Ю., Крашенинников М.Е. Стволовые/прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. XII (2). С. 100–107.
5. Baccarani U., Donini A., Risaliti A. et al. Replacement of liver venous endothelium // Lancet. 2001. Vol. 357 (9274). P. 2137.
6. De Silvestro G., Vicarioto M., Donadel C. et al. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery // Hepatogastroenterology. 2004. Vol. 51 (57). P. 805–810.
7. Di Campli C., Piscaglia A.C., Giuliani F. et al. No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute or chronic liver failure // Transplant Proc. 2005. Vol. 37 (6). P. 2563–2566.
8. Eguchi S., Kanematsu T. What is the real contribution of extrahepatic cells to liver regeneration? // Surg Today. 2009. Vol. 39 (1). P. 1–4.
9. Eguchi S., Takatsuki M., Yamanouchi K. et al. Regeneration of Graft Livers and Limited Contribution of Extrahepatic Cells After Partial Liver Transplantation in Humans // Dig Dis Sci. 2010. Vol. 55. P. 820–825.
10. Gaia S., Smedile A., Omede P. et al. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease // J. Hepatol. 2006. Vol. 45 (1). P. 13–19.
11. Gehling U.M., Willems M., Dandri M. et al. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors // J. Hepatol. 2005. Vol. 43 (5). P. 845–853.
12. Gehling U.M., Willems M., Schlagner K. et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis // World J. Gastroenterol. 2010. Vol. 16 (2). P. 217–224.
13. Lemoli R.M., Catani L., Talarico S. et al. Mobilization of Bone Marrow-Derived Hematopoietic and Endothelial Stem Cells After Orthotopic Liver Transplantation and Liver Resection // Stem Cells. 2006. Vol. 24 (12). P. 2817–2825.
14. Lemoli R.M., D'Addio A. Hematopoietic stem cell mobilization // Haematologica. 2008. Vol. 93 (3). P. 321–324.
15. Menegazzo M., Bagatella P., Marson P. et al. Reduced mobilisation of hematopoietic stem cells after hepatic resection for malignant liver disease // Pathol. Oncol. Res. 2008. Vol. 14 (4). P. 381–385.
16. Moritoki Y., Ueno Y., Kanno N. et al. Lack of evidence that bone marrow cells contribute to cholangiocyte repopulation during experimental cholestatic ductal hyperplasia // Liver Int. 2006. Vol. 26 (4). P. 457–466.
17. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice // Hepatology. 2004. Vol. 40 (6). P. 1304–1311.
18. Spahr L., Lambert J., Rubbia-Brant L. et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial // Hepatology. 2008. Vol. 48. P. 221–229.



## ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПО ПУНКЦИОННЫМ БИОПТАТАМ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Шкалова Л.В.<sup>1</sup>, Можейко Н.П.<sup>2</sup>, Ильинский И.М.<sup>2, 3</sup>,  
Мойсюк Я.Г.<sup>2, 3</sup>, Цирульникова О.М.<sup>2, 3</sup>, Готье С.В.<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России», Нижний Новгород

<sup>2</sup> ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ, Москва

<sup>3</sup> Кафедра трансплантологии и искусственных органов I МГМУ имени И.М. Сеченова, Москва

Проведено гистологическое исследование 80 пункционных биоптатов аллотрансплантированной печени, из которых в 34 подтвержден предполагаемый клинический диагноз острого отторжения. Гистологические изменения в биоптатах при различной степени острого отторжения оценивали по Banff-классификации 1995, 1997 гг. и сопоставляли с данными современной литературы. В статье обсуждается морфологическая значимость градации острого отторжения на раннее и позднее, анализируется изменение тактики лечения пациентов после постановки морфологического диагноза острого отторжения аллотрансплантированной печени.

*Ключевые слова:* трансплантация печени, острое отторжение, морфология.

## THE DIAGNOSIS OF LIVER ALLOGRAFT ACUTE REJECTION IN LIVER BIOPSIES

Shkalova L.V.<sup>1</sup>, Mogeiko N.P.<sup>2</sup>, Iljinsky I.M.<sup>2, 3</sup>,  
Moysyuk Y.G.<sup>2, 3</sup>, Tsirulnikova O.M.<sup>2, 3</sup>, Gautier S.V.<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Federal State Institution Volga Regional Medical Center of Federal Bio-Medical Agency, Nizhny Novgorod

<sup>2</sup> Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

<sup>3</sup> Dept of Transplantology and artificial organs of Sechenov First Moscow Medical University, Moscow

We performed histological examination of 80 liver allograft biopsies, the diagnosis of acute rejection was proved in 34 cases. Histological changes in liver biopsies in different grades of acute rejection were estimated according to Banff classification 1995, 1997 and were compared with current literature data. The article deals with the question of morphological value of grading acute rejection on early and late, also we analyze changes in treatment tactics after morphological verification of liver allograft acute rejection.

*Key words:* liver allograft, acute rejection, morphology.

На сегодняшний день сроки выполнения пункционных биопсий аллотрансплантированной печени (АП) после ортотопической трансплантации не определены [3]. В связи с этим эпизоды острого отторжения АП нередко не диагностируются, могут протекать субклинически, поэтому крайне сложно установить истинное количество перенесенных пациентами острых кризов отторжения [1, 12].

Морфология острого отторжения в пункционных биоптатах АП в настоящее время оценивается согласно общепринятой Banff-классификации 1995, 1997 гг. [11–12]. Однако на современном этапе развития трансплантологии с учетом накопленного опыта и знаний становится очевидным, что проблема острого отторжения АП выходит за рамки критериев 15-летней давности.

*Статья поступила в редакцию 3.06.11 г.*

**Контакты:** Ильинский Игорь Михайлович, д. м. н., профессор, руководитель отделения клинической патологии ФНЦТИО.  
Тел. 89268118455, e-mail: iljinsky@mail.ru

В публикациях последних лет активно обсуждаются вопросы наибольшей достоверности отдельных морфологических признаков при остром отторжении [5, 16, 17], рассматривается необходимость разделения острого отторжения АП на раннее и позднее [15], изучаются корреляции между индексом активности острого отторжения (RAI) и ответом на стероиды, выживаемостью трансплантата [4, 9].

В связи с этим возрастает роль пункционной биопсии аллотрансплантированной печени в диагностике и определении тактики лечения острого отторжения [6, 7, 15].

**Цель нашей работы:** морфологическая диагностика острого отторжения АП на основании исследования пункционных биоптатов с использованием световой микроскопии; изучение гистологических изменений при раннем и позднем остром отторжении в АП, анализ изменения тактики лечения пациентов, оперированных в ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» в период с 2004-го по 2010 г., после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено гистологическое исследование 80 пункционных биоптатов АП больных, оперированных в ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» в период с 2004-го по 2010 г. Для трансплантации использовали печень трупных доноров со смертью головного мозга.

В исследованных биоптатах АП острое отторжение встретилось в 34 наблюдениях. Пункционные биопсии были выполнены в сроки от четырех суток до двух лет (в среднем  $164,44 \pm 29,86$  дня) после операции. Среди пациентов исследуемой группы было 13 мужчин и 11 женщин в возрасте от 21 года до 57 лет (средний возраст  $44,31 \pm 1,69$  года). У 16 пациентов биопсии были выполнены один раз, у 7 – два раза, у 1 – четыре раза. Во время эпизодов острого отторжения все пациенты находились на базовой иммуносупрессии прографом или сандиммуном неоралом.

Показанием к проведению пункционной биопсии в 32 наблюдениях послужило развитие дисфункции трансплантата в виде повышения уровня некоторых или всех стандартных показателей: общего билирубина, аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы, лейкоцитов и эозинофилов. В 2 наблюдениях биопсии были выполнены по протоколу.

Клиническая необходимость в проведении данного вида исследования возникала преимущественно в период от одного до шести месяцев после опе-

рации: до одного месяца – 20,6% ( $n = 7$ ); от одного до трех месяцев – 26,4% ( $n = 9$ ); от трех до шести месяцев – 26,4% ( $n = 9$ ), от шести месяцев до одного года – 17,6% ( $n = 6$ ), от одного года до двух лет – 9% ( $n = 3$ ).

Материал пункционных биопсий для световой микроскопии обрабатывали стандартными гистологическими методами, включавшими окраску срезов гематоксилином и эозином, трихромом по Массону с анилиновым синим и PAS-реакцию, с последующим изучением на микроскопе Leica DM 5000.

Острое отторжение пересаженной печени оценивали по Banff-классификации 1995, 1997 гг. с выделением трех степеней: легкой, умеренной и тяжелой.

Функцию печени на момент взятия биопсии оценивали по данным клинической лаборатории ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика Шумакова», где определение ферментов осуществлялось с использованием биохимического анализатора HITACHI 912 (Япония) и набора реактивов фирмы Roche (Германия), методами: IFCC (ACT, АЛТ), Jendrassik Grof (общий билирубин), Enzymatic (холестерин), DGKC (щелочная фосфатаза).

Результаты, представленные в работе, были обработаны с использованием методов вариационной статистики, включающих критерий Стьюдента, при помощи лицензионной программы STATISTICA/W (лиц. серии № 105, владелец НижГМА), программного обеспечения StatEx-2004.2, электронных таблиц Excel с достоверной вероятностью ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Гистологическое исследование

По результатам гистологического исследования, «неопределенное» отторжение (RAI 3 балла) встретилось в двух биоптатах (5,9%), острое отторжение легкой степени (RAI 4–5 баллов) – в 16 (47,2%), острое отторжение умеренной степени (RAI 6–7 баллов) – в 14 (41%) и острое отторжение тяжелой степени (RAI 8–9 баллов) – в двух (5,9%). Из них раннее острое отторжение наблюдалось в 13 биоптатах (38%) в сроки от четырех дней до двух месяцев и восьми дней после операции (в среднем через  $30,69 \pm 5,19$  дня), позднее острое отторжение – в 21 биоптате (68%) в сроки от трех месяцев до двух лет после операции (в среднем через  $247,24 \pm 38,41$  дня).

При раннем остром отторжении порталный воспалительный инфильтрат (рис. 1) состоял из смешанной популяции клеток (лимфоцитов, макрофагов, нейтрофилов и эозинофилов) в различных пропорциях. Деструктивные и воспалительные изменения желчных протоков и воспалительные изменения печеночных вен нарастали с тяжестью остро-

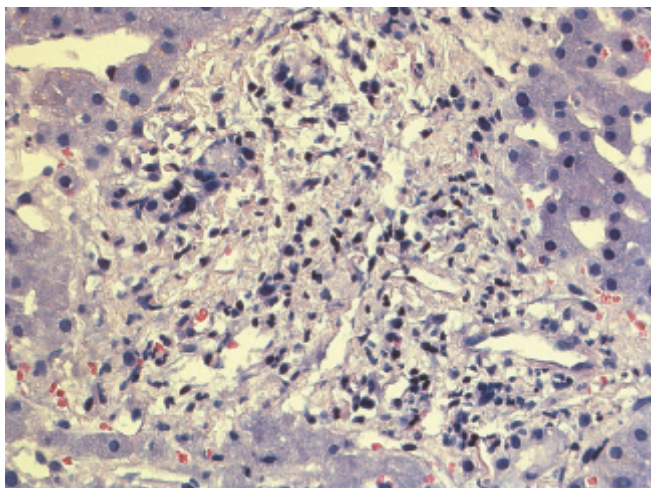


Рис. 1. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени на 28-е сутки после операции. Раннее острое отторжение легкой степени (RAI 5 баллов). Воспалительные и деструктивные изменения желчных протоков, смешанный воспалительный инфильтрат, не выходящий за пределы портального треугольника. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

го отторжения. Воспалительная реакция в мелких желчных протоках была наиболее выражена в биоптатах с холестазами. Эндотелиит печеночных вен портальных трактов варьировал от адгезии лимфоцитов в просветах вен (при легкой/умеренной степени острого отторжения) до субэндотелиальной лимфоидной инфильтрации с повреждением и разрывом эндотелиальной выстилки (при умеренной/тяжелой степени острого отторжения). Центральный перивенулит (рис. 2) с некрозом гепатоцитов перивенулярных зон встречался в отдельных случаях острого отторжения умеренной степени и во всех

биоптатах острого отторжения тяжелой степени, часто сочетался с эндотелиитом печеночных вен и с очаговыми некрозами гепатоцитов центров долек. Очаговая и диффузная белковая дистрофия гепатоцитов наблюдалась при легкой/умеренной степени острого отторжения. Баллонная дистрофия гепатоцитов встречалась только в биоптатах с тяжелой степенью острого отторжения. В своем исследовании, независимо от тяжести острого отторжения, мы не наблюдали признаков артериита и фиброза.

При позднем остром отторжении морфологические изменения АП в нашем исследовании не отличались от наблюдаемых изменений при раннем остром отторжении и нарастали с тяжестью патологического процесса (рис. 3, 4).

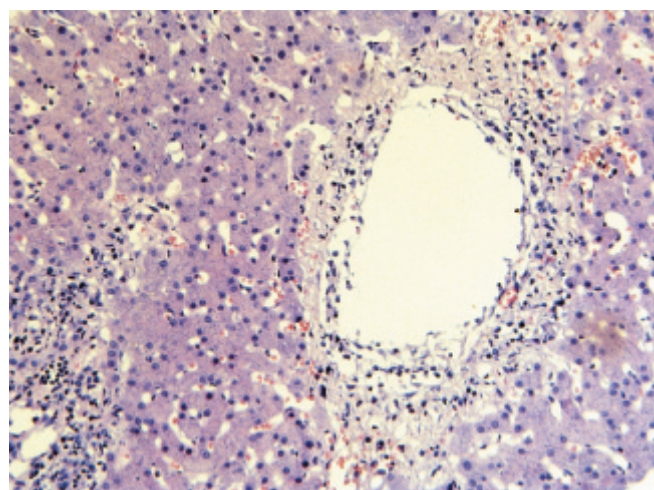


Рис. 2. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени на 18-е сутки после операции. Раннее острое отторжение умеренной степени (RAI 7 баллов). Центральный перивенулит. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

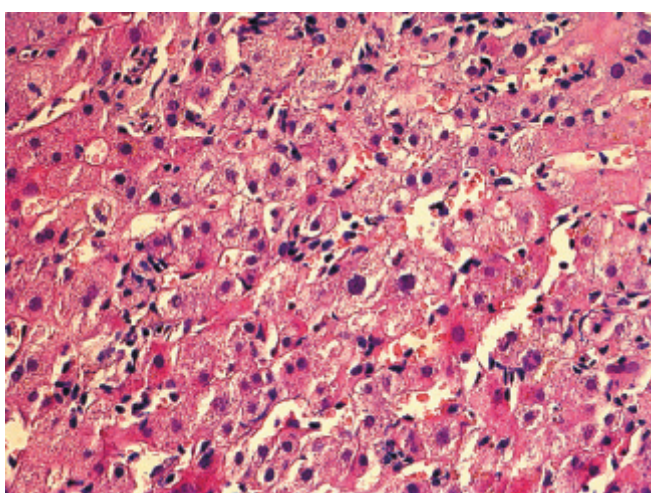


Рис. 3. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени через 6 месяцев после операции. Позднее острое отторжение умеренной степени (RAI 6 баллов). Диффузная белковая дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы гепатоцитов, расширение пространств Диссе с полнокровием синусоидов и скоплением в них лимфоцитов и нейтрофилов. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

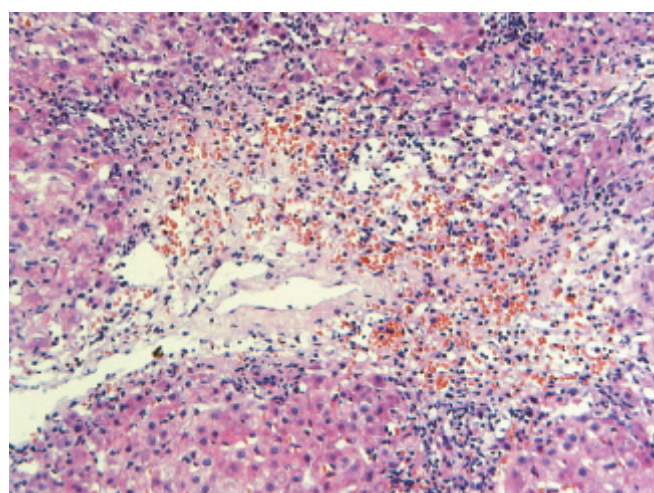


Рис. 4. Пункционная биопсия аллотрансплантата печени через 1 год 9 месяцев после операции. Позднее острое отторжение тяжелой степени (RAI 8 баллов). Выраженное портальное воспаление диффузного характера в сочетании с кровоизлияниями и очаговыми некрозами гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

В ходе исследования для статистической оценки из историй болезни пациентов исследуемой группы были выбраны показатели АСТ, АЛТ, общего билирубина, холестерина и щелочной фосфатазы на момент выполнения пункционной биопсии.

Различия между показателями АСТ, АЛТ, общего билирубина, холестерина, щелочной фосфатазы при различной степени острого отторжения во всех группах (легкая/умеренная, легкая/тяжелая и умеренная/тяжелая) и при сравнении их между собой в группах раннего и позднего острого отторжения оказались статистически не достоверными ( $p > 0,05$ ).

## 2. Изменение тактики лечения у пациентов после морфологического подтверждения острого отторжения аллотрансплантированной печени

Мы проанализировали изменение тактики лечения у пациентов после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения АП (табл.).

В группе пациентов с легкой степенью острого отторжения АП четыре криза отторжения оказались клинико-лабораторно значимыми, что потребовало проведения пульс-терапии, в результате которой был получен положительный терапевтический ответ (тенденция к снижению или полная нормализация клинико-лабораторных показателей функции трансплантата). У 12 пациентов этой группы лабораторные показатели восстановились самостоятельно.

У пациентов с тяжелой степенью острого отторжения АП во всех наблюдениях проводилась пульс-терапия с положительным терапевтическим ответом.

При умеренной степени острого отторжения АП у трех пациентов пульс-терапию не проводили, и

клинико-лабораторные показатели восстановились самостоятельно. У восьми пациентов (11 биоптатов) с умеренной степенью острого отторжения пульс-терапию проводили, из них у шести больных (7 биоптатов) был получен положительный терапевтический ответ, а у двух больных (4 биоптата) ответа на антикризовую терапию не было.

У пациентов с положительным ответом на антикризовую терапию ни в одном случае ортотопическая трансплантация печени не выполнялась по поводу цирроза печени в исходе хронического гепатита С.

Пациенты, не ответившие на антикризовую терапию, были оперированы с диагнозом цирроза печени в исходе хронического гепатита С, и на момент биопсии у них решался вопрос о дифференциальной диагностике между ранним острым отторжением и реинфекцией раннего гепатита С в АП. Однако морфологические изменения в пункционных биоптатах по всем критериям соответствовали острому отторжению, что склонило морфолога в пользу этого диагноза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования у 22 пациентов (34 биоптата) морфологически был подтвержден предполагаемый клинический диагноз острого отторжения АП. Чаще всего диагноз острого отторжения АП был поставлен в период от одного до шести месяцев после операции.

Гистологические изменения в АП при остром отторжении различной степени и в разные сроки после ортотопической трансплантации включали воспалительные и некротические процессы с классической триадой признаков: портальным воспалением, воспалением желчных протоков и вен, что соответствует данным литературы [6, 10–12].

Несмотря на то что некоторые авторы рассматривают центральный перивенулит как признак позднего острого отторжения [2, 13], в нашем исследовании при умеренной и тяжелой степени острого отторжения центральный перивенулит встречался с одинаковой частотой, независимо от времени возникновения острых кризов отторжения в АП.

Многие исследователи описывают прямую зависимость тяжести реакции острого отторжения АП от воспалительного повреждения печеночных венул и прилежащей к ним паренхимы печени [4, 7–9, 12, 14], что совпадает с результатами нашей работы.

В нашем исследовании гистологические изменения в АП при раннем и позднем остром отторжении были однотипными и нарастали с тяжестью острого отторжения.

Полученные нами результаты отличаются от данных Neil and Hübscher [15], описывающих при

Таблица

### Проведение пульс-терапии после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения аллотрансплантированной печени

	RAI		
	4–5 легкая степень	6–7 умеренная степень	8–9 тяжелая степень
Количество биоптатов	16	14	2
Без лечения пульс-терапией	12	3	0
Пульс-терапия из них:			
– ответ на пульс-терапию	4	11	2
– нет ответа на пульс-терапию	4 0	7 4	2 0

позднем остром отторжении мононуклеарный воспалительный инфильтрат (лимфоциты, плазматические клетки, макрофаги), фиброз, легкое повреждение желчных протоков, печеночных и центральных вен. В биоптатах с острым отторжением, независимо от тяжести и сроков возникновения острых кризов, мы ни разу не наблюдали фиброза.

Возможно, отсутствие различий в морфологической картине раннего и позднего острого отторжения в проведенном нами исследовании связано с небольшим количеством наблюдений, но не исключено, что деление на раннее и позднее острое отторжение по своей сути является клиническим понятием.

Так как именно некро-воспалительные изменения составляют основу острого отторжения АП, то в случаях обнаружения фиброза и/или мононуклеарной воспалительной инфильтрации [15] клинкоморфологически должно исключаться не позднее острое отторжение, а возвратное или *de novo* заболевание в трансплантате печени.

Результаты нашего исследования совпадают с данными литературы о тактике лечения пациентов после морфологического подтверждения диагноза острого отторжения АП [12].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пункционная биопсия играет важную роль в постановке диагноза острого отторжения АП и в определении дальнейшей тактики лечения. Чаще всего острое отторжение АП встречается в период от одного до шести месяцев после операции. Морфологическая градация острого отторжения АП по степени тяжести по-прежнему актуальна и определяет дальнейшую тактику лечения пациентов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В., Константинов Б.А., Цирульникова О.М. Трансплантация печени // Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. 248 с.
2. Abraham S.C., Freese D.K., Ishitani M.B. et al. Significance of central perivenulitis in pediatric liver transplantation // *Am. J. Surg. Patol.* 2008. V. 32 (10). P. 1479–1488.
3. Berenguer M., Rayon M., Prieto M. et al. Are post-transplantation protocol liver biopsies useful in the long-term? // *Liver Transpl.* 2001. Vol. 23. P. 234–241.
4. Demetris A.J., Ruppert K., Dvorchik I. et al. Real-time monitoring of acute liver allograft rejection using the Banff schema // *Transplantation.* 2002. V. 74 (9). P. 1290–1296.
5. Dixon L.R., Crawford J.M. Early histologic changes in fibrosing cholestatic hepatitis C // *Liver Transplantation.* 2007. V. 13 (2). P. 219–226.
6. Gornicka B., Ziarkiewicz-Wroblewskaa B., Bogdanskaa M. et al. Pathomorphological Features of Acute Rejection in Patients After Orthotopic Liver Transplantation: Own Experience // *J. Transplantation Proceedings.* 2006. V. 38 (1). P. 221–225.
7. Gouv A.S., van den Heuvel M.C., van den Berg A.P., Sloff M.J. et al. Significance of parenchymal changes of acute cellular rejection in predicting chronic liver graft rejection // *Transplantation.* 2002. V. 73 (2). P. 243–247.
8. Hassoun Z., Shah V., Lohse C.M., Pankratz V.S., Petrovic L.M. Centrilobular necrosis after orthotopic liver transplantation: association with acute cellular rejection and impact on outcome // *Liver Transpl.* 2004. V. 10 (4). P. 480–487.
9. Höroldt B.S., Burattin M., Gunson B.K. et al. Does the Banff rejection activity index predict outcome in patients with early acute cellular rejection following liver transplantation? // *Liver transplantation.* 2006. V. 12 (7). P. 1144–1151.
10. Hubscher S.G. Transplantation pathology // *Semin Liver Dis.* 2009. V. 29 (1). P. 74–90.
11. International Panel. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document // *Hepatology.* 1997. V. 25. P. 658–663.
12. International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection // *Hepatology.* 1995. V. 22. P. 648–654.
13. Krasinskas A.M., Demetris A.J., Poterucha J.J., Abraham S.C. The prevalence and natural history of untreated isolated central perivenulitis in adult allograft livers // *Liver Transpl.* 2008. V. 14 (5). P. 625–632.
14. Lovell M.O., Speeg K.V., Half G.A., Molina D.K. et al. Acute hepatic allograft rejection: a comparison of patients with and without centrilobular alterations during first rejection episode // *Liver Transpl.* 2004. V. 10 (3). P. 369–373.
15. Neil D.A.H., Hübscher S.G. Current views on rejection pathology in liver transplantation // *Transplant International.* 2010. V. 23 (10). P. 971–983.
16. Regev A., Molina E., Moura R. et al. Reliability of histopathologic assessment for the differentiation of recurrent hepatitis C from acute rejection after liver transplantation // *Liver Transplantation.* 2004. V. 10 (10). P. 1233–1239.
17. Stravitz R.T., Shiffman M.L., Sanyal A.J. et al. Effects of interferon treatment on liver histology and allograft rejection in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation // *Liver Transpl.* 2004. V. 10. P. 850–858.

## ФАРМАКОЭКОНОМИЧЕСКИЕ ПРЕИМУЩЕСТВА СТРАТЕГИИ ОБЩЕЙ ПРОФИЛАКТИКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Ряженев В.В., Горохова С.Г.

Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Развитие цитомегаловирусной инфекции у пациентов после трансплантации почки является серьезной клинической проблемой. Препаратами первой линии фармакотерапии при данном заболевании являются препараты ганцикловир и валганцикловир, однако клинико-экономические аспекты их применения в России изучены недостаточно. Проведенный фармакоэкономический анализ продемонстрировал экономическую обоснованность проведения общей профилактики ЦМВ-инфекции препаратом валганцикловир по сравнению со стратегией превентивной терапии.

*Ключевые слова:* трансплантация почки, ЦМВ-инфекция, фармакоэкономический анализ, анализ влияния на бюджет, показатель экономической рациональности затрат предыдущих периодов (ПРЕП).

## PHARMACOECONOMIC BENEFITS OF CYTOMEGALOVIRUS INFECTION PROPHYLACTIC STRATEGY FOR RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

Ryazhenov V.V., Gorokhova S.G.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

CMV infection is a major problem in kidney transplantation patients. Valcyte, Cimevene are the first line therapy of CMV infection. This pharmacoeconomic analysis shown economic benefits of Valcyte prophylaxis tactic compare preemptive strategy.

*Key words:* kidney transplantation, CMV infection, budget impact analysis, economic rational indicator of previous periods cost.

Одной из актуальных проблем современной медицины является хроническая почечная недостаточность (ХПН), развивающаяся вследствие почечных, сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний. В последние годы наблюдается рост числа больных в терминальной стадии ХПН. Продление жизни этим пациентам возможно только методами заместительной почечной терапии (гемодиализа), проведение которой связано со снижением качества жизни пациента, а также характеризуется высоким уровнем затрат. Альтернативой гемодиализу служит трансплантация почки.

За последние годы достигнут значительный прогресс в превращении трансплантации почки из высоко рискованного подхода к лечению ХПН в наи-

более практичный метод реабилитации больных в терминальной стадии данного заболевания. Этот успех обусловлен прогрессом в целом ряде областей, в т. ч. за счет эффективной антибактериальной терапии и путем профилактической или предупредительной противовирусной терапии.

Иммуносупрессивная терапия при трансплантации органов так или иначе всегда приводит к иммунодепрессивному состоянию организма, которое выражается в снижении или подавлении иммунологической реакции реципиента на чужеродные антигены. При этом резко возрастает риск активации оппортунистических инфекций [1, 4]. Показано, что инфекционная летальность реципиентов трупной почки в общей структуре причин смерти в тече-

*Статья поступила в редакцию 6.06.11 г.*

**Контакты:** Ряженев Василий Вячеславович, к. ф. н., доцент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии.

Тел. 8-925-098-30-16.

ние первого посттрансплантационного года составляла в 2003–2006 гг. около 35% (21 161 чел.) [10]. Серьезным инфекционным осложнением у пациентов после трансплантации почки является цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ-инфекция), которая вызывается вирусом из семейства герпесов (*Herpesviridae*, HHV5) [1, 4]. 40–90% реципиентов донорских органов являются носителями ЦМВ-инфекции и относятся к группе риска реактивации ЦМВ [3]. ЦМВ первично после трансплантации может встречаться с частотой 30–88% в зависимости от иммунологического статуса реципиента и донора [2]. В целом более чем у 75% пациентов после трансплантации солидных органов наблюдается репликация вируса [1]. ЦМВ-инфекция вызывает целый ряд прямых и непрямых эффектов, в том числе снижение долгосрочной выживаемости больных, нарушение функции трансплантата, его острое и/или хроническое отторжение. Важным моментом является тот факт, что нет прямой корреляции между уровнем вирусной нагрузки и клиническими проявлениями ЦМВ-инфекции. В ряде случаев у пациентов с инвазивной формой заболевания (особенно при ретинальной и гастроинтестинальной формах) вирусная нагрузка в крови не определяется [1]. В этой связи антивирусная профилактика может оказать благоприятное влияние на показатели выживаемости трансплантата, снижая риск его отторжения. Результаты клинических исследований, данные регистров, руководства по трансплантации подчеркивают необходимость предотвращения ЦМВ-инфекции с использованием эффективных противовирусных препаратов у пациентов с высоким риском ЦМВ-инфекции и ЦМВ-болезни.

Выделяют несколько стратегий контроля над ЦМВ-инфекцией после трансплантации солидных органов:

- общая профилактика,
- предупредительная (превентивная) терапия.

Общая профилактика подразумевает проведение профилактики у всех пациентов, превентивная терапия проводится только у пациентов с вирусной нагрузкой ДНК ЦМВ, большей или равной 400 000 копий/мл.

Для профилактики ЦМВ-инфекции у реципиентов почки используются такие противовирусные препараты как ганцикловир («Цимевен») и валганцикловир («Вальцит»), действие которых основано на угнетении активности ДНК полимеразы вируса. В метаанализе 34 исследований ( $n = 3850$ ) показано, что данные препараты обладают доказанной клинической эффективностью в отношении ЦМВ-инфекции [5]. Существующие различия в стратегиях применения препаратов «Вальцит» и «Цимевен» обоснованы степенью биодоступности действующих

веществ, продолжительностью курса терапии, отличием лекарственных форм (таблетированная и внутривенная), а также некоторыми другими особенностями применения данных лекарственных средств.

Каждая из перечисленных стратегий требует фармакоэкономического обоснования. Информация о клинико-экономической целесообразности важна для принятия решений, в том числе на государственном уровне. Учитывая сохраняющиеся высокие показатели заболеваемости ХПН в терминальной стадии, и соответственно, увеличивающееся количество пациентов после трансплантации почки, эффективные стратегии профилактики и лечения ЦМВ-инфекции могут дать дополнительные возможности в предотвращении острого и хронического отторжения трансплантата. Представляемая часть исследования предусматривает сравнение стратегий общей профилактики и превентивной терапии. С учетом того, что как сама процедура трансплантации почки, так и сопутствующие процедуры проводятся за счет ассигнований федерального бюджета, исследование проводилось с позиции государственного здравоохранения.

Таким образом, целью данной работы стала сравнительная оценка затрат при разных стратегиях лечения и профилактики ЦМВ-инфекции у пациентов после трансплантации почки.

## МЕТОДОЛОГИЯ

Клинико-экономический анализ стратегий лечения и профилактики ЦМВ-инфекции у пациентов после трансплантации почки проводился с применением метода моделирования в рамках анализа влияния на бюджет (Budget Impact Analysis, BIA) [6]. BIA представляет собой разновидность фармакоэкономического анализа, при котором оценивается целесообразность внедрения новой лечебной технологии по сравнению с имеющейся альтернативной стратегией лечения при определенной нозологии.

При разработке модели новой внедряемой стратегией считали стратегию общей профилактики, используемой альтернативной стратегией – превентивную терапию.

Кроме того, с целью оценки эффективности затрат на процедуру трансплантации почки нами был разработан и введен в экономическую модель показатель экономической рациональности затрат предыдущих периодов (ПРЭП). Указанный показатель отражает рациональность затраченных финансовых средств на медицинскую технологию, примененную в прошедших периодах. Причем данный показатель зависит от эффективности применения

дополнительной (профилактической, адьювантной или иной) терапии в текущем периоде времени. Так, например, применение дополнительной терапии в текущем периоде позволяет сохранить клинический результат, достигнутый в результате применения медицинской технологии в прошедшем периоде. В расчеты включали затраты на фармакотерапию препаратами «Вальцит» и «Цимевен», стоимость процедуры гемодиализа, а также федеральную квоту на трансплантацию почки.

Построение модели учитывало описанные выше особенности проводимой профилактики и фармакотерапии, результаты в достижении положительных и негативных исходов, вероятность их наступления. Вероятность событий устанавливали по данным клинического исследования по оценке эффективности общей профилактики и предупредительной терапии ЦМВ-инфекции ганцикловиром с последующим длительным наблюдением [9], а также экспертных оценок (табл. 1). С учетом того, что возможности перорального применения препарата ганцикловир ограничены низкой биодоступностью, а также необходимостью его частого приема, в качестве препарата выбора для профилактики ЦМВ-инфекции используется валганцикловир – препарат-предшественник ганцикловира, существенным преимуществом которого является высокая биодоступность образующегося из него ганцикловира. Валганцикловир в дозировке 900 мг, применяемый внутрь один раз в сутки, является биоэквивалентным препарату ганцикловир в дозировке 1000 мг внутрь, применяемому 3 раза в сутки, и демонстрирует одинаковую клиническую эффективность при профилактике ЦМВ-инфекции [11]. Исходя из этого, курс общей профилактики был рассчитан для препарата валганцикловир («Вальцит»). Курс превентивной терапии предполагал использование препарата ганцикловир («Цимевен») внутривенно. Предполагалось, что пациенты с острым или хроническим отторжением трансплантата почки будут подвергнуты повторной трансплантации, до проведения которой будут находиться на гемодиализе. Смерть как возможный клинический исход в модель не включали.

Таблица 1

**Эффективность стратегии ведения пациентов после трансплантации почки**

Стратегия	Развитие ЦМВ-инфекции	Выживаемость трансплантата
Общая профилактика, валганцикловир	17,8%	92,2%
Превентивная терапия, ганцикловир	50,7%	78,3%

**СТРУКТУРА МОДЕЛИ**

При анализе затрат проводилось сравнение 2 групп пациентов после трансплантации почки, по 100 человек в каждой: в 1-й группе всем пациентам проводилась общая профилактика препаратом «Вальцит» начиная с 10-х суток после трансплантации в стандартной дозе 900 мг 1 раз в сутки в течение 90 дней; во 2-й превентивная терапия проводилась только у пациентов с вирусной нагрузкой ДНК ЦМВ  $\geq 400\ 000$  копий/мл, в дозе 5 мг/кг в течение 1 часа путем в/в инфузии, через каждые 12 часов на протяжении 14 дней, далее по 5 мг/кг путем в/в инфузии в течение 1 часа, ежедневно на протяжении 7 дней в неделю. Общая продолжительность превентивной терапии составила 21 день. При определении дозы препаратов и продолжительности терапии были учтены данные клинических исследований [7, 8], а также режим дозирования, использованный в регистрационном исследовании препарата «Вальцит» [11].

Общая профилактика и превентивная терапия сравниваемых групп проводилась в период первых 100 дней после трансплантации. В дальнейшем 4 года осуществлялось контрольное наблюдение с целью оценки долгосрочных результатов выживаемости трансплантата. Предполагалось, что пациенты с хроническим или острым отторжением трансплантированного органа 3 года ожидают процедуры повторной трансплантации почки (данный временной параметр был установлен на основании экспертных оценок). В этот период всем пациентам после отторжения трансплантата проводится процедура гемодиализа 3 раза в неделю, 52 недели в год.

**АНАЛИЗ ЗАТРАТ**

Общие затраты учитывали, исходя из стоимости фармакотерапии препаратами валганцикловир («Вальцит»), ганцикловир («Цимевен»), процедуры гемодиализа, а также стоимости федеральной квоты на трансплантацию почки. Затраты на препараты «Вальцит» и «Цимевен» рассчитывали, исходя из сведений о цене, зарегистрированной в соответствии с Распоряжением Правительства РФ № 1938-р от 11 ноября 2010 г. «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2011 год» для Московского региона по состоянию на 15 апреля 2011 года. Значения цен приведены в табл. 2. В связи с тем что цены на процедуру гемодиализа могут существенно отличаться в различных лечебных заведениях, нами был проведен анализ чувствительности результатов методом моделирования затрат с учетом изменения стоимости процедуры гемодиализа. Диапазон цен для



Таблица 2  
**Стоимость оказываемых медицинских услуг  
 в условиях разработанной модели, руб.**

Медицинская услуга	Стоимость услуги
«Вальцит» (валганцикловир) (таблетки, покрытые оболочкой, 450 мг, 60 шт.)	51 832,97
«Цимевен» (ганцикловир) (лиофилизат для приготовления раствора для инфузий, 500 мг, 1 шт.)	1379,06
Процедура гемодиализа	6000
Стоимость федеральной квоты	808 500

Таблица 3  
**Финансовые затраты  
 на медицинские услуги в условиях  
 разработанной модели, руб.**

Медицинская услуга	Общая профилактика	Превентивная терапия
Профилактика «Вальцитом»	15 549 891	–
Фармакотерапия «Цимевеном»	–	2 461 622,1
Гемодиализ*	22 464 000	61 776 000
Федеральная квота на повторную трансплантацию	6 468 000	17 787 000
Итого	44 481 891	82 024 622,1

\* При стоимости гемодиализа 6000 руб.

данной процедуры составил от 5000 до 7000 руб. Стоимость федеральной квоты на пересадку почки рассчитывали, исходя из суммы 808 500 руб., в соответствии с приложением № 3 Приказа Минздравсоцразвития России № 1248 от 31 декабря 2010 г. «О порядке формирования и утверждении государственного задания на оказание в 2011 году высокотехнологичной медицинской помощи гражданам Российской Федерации за счет бюджетных ассигнований федерального бюджета».

Ставку дисконтирования в расчеты не включали в соответствии с рекомендациями к проведению анализа влияния на бюджет [6]. На основании указанных цен была рассчитана стоимость ведения па-

циентов с хроническим или острым отторжением почечного трансплантата в сравниваемых группах (табл. 2 и 3).

## АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ

Показателем эффективности терапии была выживаемость трансплантата и вероятность развития ЦМВ-инфекции в течение временного горизонта исследования (табл. 1).

На первом этапе фармакоэкономического анализа было проведено сравнение затрат на общую профилактику и лечение ЦМВ-инфекции в группах по 100 человек при заданных в модели условиях. С учетом вероятности развития ЦМВ-инфекции и показателя выживаемости трансплантата оказывается, что затраты в группе общей профилактики составляют 44 481 891 руб., а в группе превентивной терапии – 82 024 622,1. Абсолютная разница в затратах при применении указанных стратегий составляет 37 542 731,1 руб. Это указывает на существенно меньшие затраты при проведении общей профилактики ЦМВ-инфекции препаратом «Вальцит» по сравнению со стратегией превентивной терапии.

С целью определения чувствительности затрат к изменению стоимости процедуры гемодиализа были проведены расчеты с учетом различных значений цены указанного медицинского вмешательства (табл. 4). Сохранение результата, т. е. меньшие затраты на стратегию общей профилактики по сравнению с превентивной терапией, подтверждает экономическую целесообразность проведения общей профилактики ЦМВ-инфекции.

Вторым этапом исследования стал анализ показателя экономической рациональности затрат предыдущих периодов, который демонстрирует эффективность использования финансовых ресурсов в прошедших периодах с учетом влияния текущей медицинской технологии. Моделирование проводилось на примере вышеописанных групп пациентов. Затраты прошедших периодов на процедуру трансплантации почки, которые учитывали стоимость федеральной квоты, в обеих группах были одинаковы и составили 80 850 000 руб. Однако проведение противовирусной фармакотерапии препаратами

Таблица 4  
**Моделирование затрат с учетом изменения стоимости процедуры гемодиализа, руб.**

	Стоимость процедуры гемодиализа				
	5 000	5 500	6 000	6 500	7 000
Общая профилактика	40 733 891 (40 737 891)	42 605 891 (42 609 891)	44 477 891 (44 481 891)	46 349 891 (46 353 891)	48 221 891 (48 225 891)
Превентивная терапия	71 717 622,1 (71 728 622,1)	76 865 622,1 (76 876 622,1)	82 013 622,1 (82 024 622,1)	87 161 622,1 (87 172 622,1)	92 309 622,1 (92 320 622,1)

Таблица 5

**Эффективность расходования федеральной квоты на трансплантацию почки по ПЭРП, руб.**

	Федеральная квота на трансплантацию почки	Эффективно расходующиеся средства по ПЭРП	Неэффективно расходующиеся бюджетные средства по ПЭРП
Общая профилактика (100 пац.)	80 850 000	74 382 000	6 468 000
Превентивная терапия (100 пац.)	80 850 000	63 063 000	17 787 000

Таблица 6

**Выбор стратегии с учетом различного влияния на бюджет общей профилактики и превентивной терапии ЦМВ-инфекции**

Стратегия	Кол-во пац.	Влияние на бюджет (руб.)	% пациентов без отторжения трансплантата почки
Общая профилактика	100	44 481 891	92
Превентивная терапия	100	82 024 622,1	78

«Вальцит» и «Цимевен» в текущем периоде влияют на эффективность уже затраченных средств федеральных квот в прошедших периодах. Так, в группе общей профилактики выживаемость трансплантата составила 92,2% (92 пациента в условиях модели), а в группе превентивной терапии – 78,3% (78 пациентов в условиях модели). Эффективно затраченные средства федерального бюджета в группе общей профилактики составили 74 382 000 руб., а в группе превентивной терапии – 63 063 000 руб. (табл. 5). Таким образом, применение стратегии общей профилактики препаратом «Вальцит» позволяет снизить нерациональные затраты федерального бюджета здравоохранения на 11 319 000 руб. в условиях разработанной модели.

Данные комплексного фармакоэкономического исследования наглядно демонстрируют экономическую целесообразность применения стратегии общей профилактики по сравнению с превентивной терапией. Снижение затрат при проведении общей профилактики в условиях разработанной модели составляет 37 542 731,1 руб. на 100 пациентов после трансплантации почки. То есть общая профилактика почти в 2 раза более выгодна, чем стратегии сравнения, и позволяет экономить значительные средства федерального бюджета.

Анализ структуры затрат демонстрирует, что значительное снижение расходов федерального бюджета в группе общей профилактики происходит за счет меньших затрат на проведение процедуры гемодиализа у пациентов после отторжения трансплантата (в 3 раза меньше, чем в группе сравнения). Помимо этого, в 2,75 раза снижаются расходы на повторную трансплантацию почки.

При анализе показателя экономической рациональности затрат предыдущих периодов выявлено, что применение стратегии общей профилактики позволяет снизить неэффективно используемые средства федерального бюджета прошедших периодов на 11 319 000 руб. в условиях модели.

При проведении анализа влияния на бюджет двух стратегий терапии ЦМВ-инфекции (табл. 6) очевидно экономическое преимущество общей профилактики, применение которой экономически обосновано высокой клинической эффективностью и значительно меньшими затратами федерального бюджета.

Таким образом, стратегия общей профилактики ЦМВ-инфекции является как клинически, так и фармакоэкономически обоснованной. Однако при этом следует принять во внимание, что последние клинические исследования (ИМРАСТ и др.) продемонстрировали клиническую эффективность более длительной профилактики ЦМВ-инфекции в течение 200 дней, что отражено в рекомендациях общества KDIGO (2009). Соответственно этому в некоторых европейских странах недавно были внесены дополнения в инструкцию по применению препарата «Вальцит». В России дополнения в нормативную документацию по показанию к проведению профилактики ЦМВ-инфекции в течение 200 дней ожидаются в августе 2011 г. Учитывая сказанное, потребуются проведение дополнительных фармакоэкономических исследований в этом направлении.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Инфекции в трансплантологии* / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2010. 384 с.
2. *Руководство по трансплантации почки* / Под ред. Г.М. Дановича. Тверь: Триада, 2004.
3. *Encyclopedia of Virology* (Second edition); 1999; Krance R.A. et al. Transplantation and virus infection. P. 1823–1833.
4. *Fishman J.A., Emery V., Freeman R., Pascual M. et al. Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status // Clin. Transplant. 2007. Vol. 21. P. 149–158.*
5. *Hodson E.M., Craig J.C., Strippoli G.F.M., Webster A.C. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. Cochrane Database of Systematic Reviews 2008, Issue 2.*

6. *Mauskopf J., Sullivan S., Annemans L. et al.* Principles of good practice for budget impact analysis: report of the ISPOR task force on good research practices – budget impact analysis // *Value Health*. 2007. Vol. 10. P. 336–347.
7. *Kalpoe J.S. et al.* Similar reduction of cytomegalovirus DNA load by oral valganciclovir and intravenous ganciclovir on pre-emptive therapy after renal and renal-pancreas transplantation // *Antivir. Ther.* 2005. Vol. 10 (1). P. 119–123.
8. *Khoury J.A. et al.* Prophylactic Versus Preemptive Oral Valganciclovir for the Management of Cytomegalovirus Infection in Adult Renal Transplant Recipients *AJT* 2006. Vol. 6. P. 2134–2143.
9. *Kliem V., Fricke L., Wollbrink T. et al.* Improvement in Long-Term Renal Graft Survival due to CMV Prophylaxis with Oral Ganciclovir: Results of a Randomized Clinical Trial *AJT* 2008. Vol. 8. P. 975–983.
10. *Opelz G.* CTS 2008 <http://ctstransplant.org>
11. *Paya C.V., Humar A., Dominguez E. et al.* Efficacy and safety of valganciclovir vs oral ganciclovir for prevention of CMV disease in solid organ transplant recipients PV16000 // *Am. J. Transplant.* 2004. P. 611–620.

## ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБИОТИКО- И ФАГОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ МИКРОБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЙ КЛИНИКИ

Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Спирина Т.С., Прудникова С.А., Ромашикина Л.Ю.

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»

Минздравсоцразвития РФ, Москва

Исследована антибиотико- и фагочувствительность наиболее этиологически важных нозокомиальных штаммов микробов – синегнойных палочек, клебсиелл, кишечных палочек, протеев, стафилококков. Установлена множественная резистентность штаммов бактерий как грамположительных, так и грамотрицательных, изолированных из 8 субстратов. В отношении синегнойной палочки чувствительность >40% отмечена у 40–50% штаммов к аминогликозидам – азтреонаму, амикацину, нетилмицину и только у 23–25% штаммов – к гентамицину и левофлоксацину (в среднем антибиотикочувствительность составила 27%). Все штаммы клебсиелл вырабатывали БЛРС и были чувствительны только к имипенему, меропенему и аминогликозидам.

Специфические бактериофаги лизировали 43–48% штаммов синегнойных палочек и клебсиелл, кишечные палочки, протеи, множественно резистентные штаммы стафилококков.

Предлагается внедрять использование бактериофагов в клиническую практику трансплантологических клиник.

*Ключевые слова:* антибиотикочувствительность, фагочувствительность, нозокомиальные микробы, множественнорезистентные штаммы.

## THE STUDY OF ANTIBIOTIC- AND FAGOSENSITIVITY OF NOSOCOMIAL STRAINS BACTERIA ISOLATED FROM TRANSPLANTED PATIENTS

Gabrielan N.I., Gorskaya E.M., Spirina T.S., Prudnikova S.A., Romashkina L.Y.

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

Antibiotic and fagosensitivity most etiologically important nosocomial strains of bacteria – *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.* were studied. Multiple drug-resistant bacteria as gram-positive and gram-negative, isolated from 8 substrates, had been demonstrated. With regard to the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* >40% was observed in 40–50% of the strains to aminoglycosides – aztreonam, amikacin, netilmicin, and only 23–25% of the strains – to gentamicin and levofloxacin (an average of antibiotic susceptibility was 27%). All strains of ESBL *Klebsiella* drew up and were sensitive only to imipenem, meropenem and aminoglycosides.

Specific phages lysed 43–48% of the strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus spp.*, multidrug resistant strains of *Staphylococcus spp.*

It is proposed to introduce the use of phages in clinical practice.

*Key words:* antibiotic-, fagosensitivity, nosocomial microbes, polyresistant strains.

Статья поступила в редакцию 14.06.11 г.

**Контакты:** Горская Елена Михайловна, д. м. н., ст. научный сотрудник бактериологической лаборатории.

Тел. 8-905-519-09-31, e-mail: egorskaya@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов условно-патогенной флоры, несмотря на все усилия, становится неконтролируемой. Неуклонный рост устойчивости госпитальной микрофлоры к антимикробным препаратам является проблемой общемирового масштаба. Данные российских многоцентровых исследований также свидетельствуют о высоком уровне резистентности возбудителей нозокомиальных инфекций к антимикробным препаратам [14, 17]. Низкая эффективность эмпирического использования антибиотиков сочетается с побочными явлениями или нежелательными реакциями в виде снижения иммунитета, подавления нормальной микрофлоры кишечника и последующим формированием дисбактериозов и гиповитаминозов. В ряде случаев неадекватное назначение антибиотиков угнетает кроветворение, приводит к серьезному нарушению работы почек, вызывает аллергические реакции. Увеличение частоты случаев инкурабельности нозокомиальных инфекций, как и любых инфекционных осложнений, связанных с оказанием медицинской помощи, стимулировало развитие направления по созданию и использованию для указанных целей биологических препаратов. Среди альтернативных антимикробных препаратов особый интерес вызывают бактериофаги. Одно из важных преимуществ бактериофагов – их специфичность. В то время как антибиотики подавляют бактерии многих видов – не только патогенную, но и нормальную микрофлору, – бактериофаги действуют только против конкретных возбудителей. Исследования показали, что бактериофаги активно проникают в очаг инфекции, тогда как лишь немногие антибиотики обладают такой способностью. При пероральном приеме препаратов фаговые частицы выделяются из крови через 1 час, из содержимого бронхов – через 1,5–2 часа, из мочи – через 2 часа [13]. В нашей стране бактериофаги разрешены для использования и активно применяются в различных областях медицины [1–12, 14, 16]. Наряду с моно- имеются комплексные препараты, представляющие собой набор фагов сразу к нескольким возбудителям: это пивалентный бактериофаг, секста-фаг, комплексный и комбинированный фаги для лечения гнойно-септических заболеваний, интести-бактериофаг против возбудителей кишечных инфекций. Клиническая практика показала эффективность использования бактериофагов при инфекционных заболеваниях желудочно-кишечного тракта, а также при воспалительных заболеваниях пазух носа, ротовой полости, верхних дыхательных путей, мочеполовой системы, холециститах, вызванных бактериями, чувствительными к фагам. Они не токсичны, не имеют противопоказаний к применению, могут быть использованы

в сочетании с любыми другими лекарственными препаратами, в том числе с антибиотиками. Фаги можно назначать беременным, кормящим матерям и детям любого возраста, включая недоношенных. Основным условием успешного применения является проверка выделенной культуры на чувствительность к соответствующему фагу. Однако бактериофаги могут быть использованы не только для лечения, но и для профилактики инфекционных заболеваний. В последнее время появились работы о применении специфических бактериофагов у хирургических пациентов [9, 11, 12].

**Цель исследования:** определение фаго- и антибиотикочувствительности нозокомиальных штаммов микробов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованию подвергся материал различных биосубстратов – крови, мочи, раны, сосудистых катетеров, дренажей брюшной полости, отделяемого зева и трахеи, бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) и фекалий – от 85 пациентов после ортотопической трансплантации сердца и печени, а также после операций аортокоронарного шунтирования, реконструктивных операций на клапанах сердца. Возраст пациентов – от нескольких месяцев до 67 лет. Посев материала проводился на стандартизированные питательные среды фирмы Pronadisa (Испания). Идентификация выделенных микроорганизмов осуществлялась с помощью биохимических тест-систем API фирмы BioMerieux (Франция) и высокочувствительных компьютеризированных аналитических систем BBL BD Crystal (USA). Исследование биологических свойств изолированных микроорганизмов (гемолизин-продукции, плазмокоагуляции и др.) проводили общепринятыми методами. Для диагностики бактериемии применялся способ культивирования гемокультур в автоматической системе BactAlert фирмы BioMerieux. У изолированных и идентифицированных штаммов определяли чувствительность к 22 антибиотикам разных групп (85 штаммов) Исследование чувствительности возбудителей к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом в соответствии со стандартами CLSI (ранее NCCLS). Для этого пропитанные антибиотиками бумажные диски фирмы Weston Dickinson накладывали на поверхность питательной среды Мюллера–Хинтона, засеянной исследуемым штаммом, и через 18–20 ч измеряли зоны задержки роста вокруг дисков. В зависимости от величины зон задержки роста микробов их делили на чувствительные, умеренно чувствительные или устойчивые к антибиотикам. Метициллин-резистентность как маркер множественной резистентности грамположительных бактерий к антибиотикам исследовали по чувствительности выделенных штаммов

к дискам с оксациллином и цефокситином. Бета-лактамазную активность – маркер множественной резистентности грамотрицательных бактерий определяли по чувствительности изолятов к дискам с цефотаксимом и цефотаксимом/клавуланатом, а также с цефтазидимом и цефтазидимом/клавуланатом. Кроме того, для учета антибиотикочувствительности выделенных микробов к антибиотикам использовали компьютерную систему Osiris фирмы BioRad (Франция) с экспертной программой, позволяющей учитывать природную резистентность микробов к антибиотикам, метициллинрезистентность и бета-лактамазную активность.

У 140 изолированных и идентифицированных штаммов определяли лизабильность специфическими бактериофагами. Фагочувствительность определялась к следующим коммерческим препаратам бактериофагов – синегнойному, секста-фагу, очищенному фагу клебсиелл пневмонии, пиополивалентному, комплексному, коли-протейному производства НПО «Микроген». Тестирование проводилось по методу Отта специфическими фагами в зависимости от вида выделенного микроба.

Все исследования проведены в течение 2010 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Чувствительность к антибиотикам 42 штаммов *Kl. pneumoniae*, изолированных из 8 биосубстратов, представлена в табл. 1.

Все 42 нозокомиальных штамма клебсиелл вырабатывали бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и были чувствительны только к имипенему, меропенему и аминогликозидам. Исключение составили 2 штамма из БАЛ, которые были резистентны к карбапенемам. Сниженную чувствительность к карбапенемам (50%) имели штаммы, выделенные из дренажей брюшной полости после абдоминальных операций. Активность азтреонама ко всем штаммам или отсутствовала, или была низкой. Отмечена крайне низкая чувствительность или ее отсутствие у всех штаммов к цефалоспорином (ЦС) и фторхинолонам (ФХ). Отмечена высокая чувствительность клебсиелл из всех субстратов к одному или нескольким аминогликозидам (АГ). Все штаммы клебсиелл характеризовались 100% чувствительностью к полимиксину и колистину. Защищенные бета-лактамы антибиотики – пиперациллин/тазобактам (ПИП/ТБ), цефотаксим/клавулановая кислота (цефотаксим/КК), цефоперазон/сульбактам

Таблица 1

**Чувствительность к антибиотикам *Kl. pneumoniae*, выделенных из ряда субстратов**

Антибиотики \ Субстрат	Кровь (n = 5)	Моча (n = 7)	Трахея+БАЛ (n = 2)	Рана (n = 6)	Дренажи бр. пол. (n = 6)	Зев (n = 8)	Фекалии (n = 7)
Пип/ТБ	0	14,3	0	16,7	16,7	25,0	28,6
Имипенем	80,0	71,4	0	66,7	50,0	87,5	71,4
Меропенем	20,0	0	0	66,7	50,0	62,5	71,4
Азтреонам	0	0	0	0	0	12,5	14,3
Цефутоксим	0	0	0	16,7	0	12,5	0
Цефамандол	0	0	0	0	0	0	0
Цефтриаксон	0	0	0	0	0	12,5	0
Цефотаксим	0	0	0	0	0	0	0
Цефотаксим/КК	0	0	0	0	0	0	0
Цефоперазон/СБ	0	14,3	0	0	0	12,5	14,3
Цефтазидим	0	0	0	0	0	12,5	28,6
Цефтазидим/КК	0	0	0	0	0	0	0
Цефепим	0	0	0	0	0	0	14,3
Офлоксацин	0	0	0	33,3	0	25,0	14,3
Моксифлоксацин	0	14,3	0	16,7	0	25,0	0
Ципрофлоксацин	0	0	0	16,7	0	25,0	0
Левифлоксацин	0	0	0	0	0	37,5	14,3
Гентамицин	40,0	14,3	100,0	33,3	33,3	50,0	28,6
Нетилмицин	20,0	14,3	100,0	50,0	50,0	50,0	28,6
Амикацин	60,0	0	100,0	50,0	66,7	50,0	57,1
Полимиксин	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Колистин	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Таблица 2

**Чувствительность к антибиотикам  
*Ps. aeruginosa*, изолированных из отдельных  
биосубстратов**

Антибиотики \ Субстрат	Кровь (n = 9)	Трахея+БАЛ (n = 3)	Рана (n = 8)	Дренажи бр. пол. (n = 7)	Фекалии (n = 5)
Пип/ТБ	11,1	0	37,5	0	40,0
Имипенем	11,1	33,3	12,5	28,6	40,0
Меропенем	22,2	33,3	12,5	14,3	40,0
Азтреонам	55,6	66,7	25,0	14,3	40,0
Цефуросксим	11,1	0	0	0	0
Цефамандол	0	0	0	0	0
Цефтриаксон	0	0	0	0	0
Цефотаксим	0	0	0	0	0
Цефотаксим/КК	0	0	0	0	0
Цефоперазон/СБ	33,3	0	12,5	14,3	20,0
Цефтазидим	22,2	0	37,5	0	40,0
Цефтазидим/КК	22,2	0	0	0	0
Цефепим	44,4	33,3	37,5	42,9	40,0
Офлоксацин	33,3	0	25,0	0	0
Моксифлоксацин	33,3	0	37,5	0	20,0
Ципрофлоксацин	22,2	0	50,0	14,3	R
Левифлоксацин	44,4	0	37,5	14,3	20,0
Гентамицин	22,2	0	50,0	14,3	40,0
Нетилмицин	44,4	0	62,5	28,6	40,0
Амикацин	33,3	0	50,0	42,9	80,0
Полимиксин	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Колистин	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

(цефоперазон/СБ) «не работали» – имела низкая чувствительность к ним клебсиелл.

Чувствительность к антибиотикам разных классов *Ps. aeruginosa*, изолированных из разных биосубстратов, показана в табл. 2.

Как видно из табл., *Ps. aeruginosa* – синегнойная палочка, вызывающая наиболее тяжелые инфекционные осложнения, – обладает множественной резистентностью к антибиотикам. Активность отмечена у азтреонама – 55,6; 100 и 66,7% соответственно в отношении штаммов, выделенных из крови, мочи, отделяемого трахеопульмонального дерева, цефтазидима и цефепима – только для штамма, изолированного из мочи. У штаммов, полученных из раны, ингибиторную активность проявил ципрофлоксацин и аминогликозиды – гентамицин, амикацин, нетилмицин (50–62,5%); из фекалий – только амикацин (80%). Средний уровень активности зарегистрирован у Пип/ТБ, карбапенемов, азтреонама,

цефоперазона/СБ, аминогликозидов к штаммам синегнойной палочки, выделенной из фекалий (40%).

В табл. 3 суммированы данные по антибиотико-чувствительности штаммов *Ps. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae*, выделенных из всех биосубстратов. В итоге, согласно антибиотикограммам, к имипенему были чувствительны 95% штаммов клебсиелл, меропенему – 67%, нетилмицину – 55%, амикацину – 80%, полимиксину и колистин – 100%. Таким образом, активность проявили 5 антибиотиков из 21, относящихся к карбапенемам и аминогликозидам (20%).

В отношении синегнойной палочки чувствительность >40% имела у 40–50% штаммов к азтреонаму, амикацину, нетилмицину, цефепиму; только у 23–25% штаммов – к гентамицину и левофлоксацину. Это значит, что среднюю степень активности к *Ps. aeruginosa* имели 4 антибиотика из 20 – амикацин, азтреонам, нетилмицин, цефепим. Полимиксин и колистин в 100% ингибировали псевдомонады и клебсиеллы.

Таблица 3

**Чувствительность к антибиотикам штаммов  
*Ps. aeruginosa* и *Kl. pneumoniae*, изолированных  
из всех биосубстратов**

Антибиотики	<i>Ps. aeruginosa</i> n = 34	<i>K. pneumoniae</i> n = 42
	M ± m	M ± m
Пип/ТБ	29,5 ± 9,2	20,3 ± 2,8
Имипенем	25,1 ± 5,7	75,3 ± 6,0
Меропенем	24,5 ± 5,3	61,8 ± 10,7
Азтреонам	50,3 ± 12,7	13,4 ± 0,9
Цефуросксим	Не определяли	14,6 ± 2,1
Цефамандол	0	0
Цефтриаксон	0	12,5
Цефотаксим	0	0
Цефотаксим/КК	0	0
Цефоперазон/СБ	20 ± 4,7	13,7 ± 0,6
Цефтазидим	49,9 ± 17,1	20,6 ± 8,1
Цефтазидим/КК	Не определяли	0
Цефепим	49,7 ± 10,2	14,3 ± 14,3
Офлоксацин	29,2 ± 4,2	24,2 ± 5,5
Моксифлоксацин	30,3 ± 5,3	18,7 ± 3,2
Ципрофлоксацин	28,8 ± 10,8	20,9 ± 4,1
Левифлоксацин	29,1 ± 7,1	25,9 ± 11,6
Гентамицин	31,6 ± 8,1	49,9 ± 11,5
Нетилмицин	43,9 ± 7,0	51,6 ± 11,7
Амикацин	51,6 ± 10,1	64 ± 7,7
Полимиксин	100	100
Колистин	100	100

Таблица 4

**Фагочувствительность микробов – возбудителей инфекционных осложнений  
к препаратам бактериофагов**

Субстрат	Микроорганизмы					
	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Кровь	5/3 (60)	–	–	–	7/3 (42,8)	9/8 (89,0)
Моча	–	1/1	1/1	–	14/4 (28,6)	2/0 (0)
Сосудистый катетер	–	–	–	–	5/3 (60,0)	6/2 (33,3)
Отделяемое раны	3/1 (33,3)	–	–	–	5/2 (40,0)	9/4 (44,4)
Отделяемое зева	5/4 (80,0)	–	–	–	14/4 (28,6)	1/0 (0)
Отделяемое трахеи или БАЛ	1/1	–	–	–	4/3 (75,0)	3/0 (0)
Дренаж брюшной полости	–	–	–	–	6/2 (33,3)	6/2 (33,3)
Фекалии	2/2 (100,0)	–	1/1	2/2 (100,0)	22/16 (72,7)	6/2 (33,3)

*Примечание.* В числителе – общее число штаммов, в знаменателе – количество чувствительных к фагам; в скобках указан % чувствительных штаммов.

Как видно из табл. 2, синегнойная палочка, вызывающая наиболее тяжелые инфекционные осложнения, обладает множественной резистентностью к антибиотикам. Наилучшая активность отмечена у азтреонама – 55,6; 100 и 66,7% соответственно в отношении штаммов, выделенных из крови, мочи, отделяемого трахеопульмонального дерева, цефтазида и цефепима – только для штамма, изолированного из мочи. У штаммов, полученных из раны, ингибиторную активность проявили ципрофлоксацин и аминогликозиды – гентамицин, амикацин, нетилмицин (50–62,5%); из фекалий – только амикацин (80%). Средний уровень активности зарегистрирован у Пип/ГБ, карбапенемов, азтреонама, цефоперазон/сульбактама, цефепима, аминогликозидов к штаммам синегнойной палочки, выделенной из фекалий (40%). Примечательно, что штамм *Ps. aeruginosa*, выделенный из сосудистого катетера, оказался панрезистентным – не чувствительным к антибиотикам всех классов, за исключением неприменяемых полимиксина и колистина.

Антибиотикограммы получены у 9 штаммов стафилококков, из которых 6 были метициллинрезистентными (MR) (66,6%).

Фагочувствительность определяли у 17 штаммов грамположительных бактерий и 123 – грамотрицательных (табл. 4).

Больше всего протестировано на фагочувствительность штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *S. aureus* – соответственно 77, 38 и 16. Лучшая чувствительность отмечалась у стафилококков (золотистого и коагулазоотрицательных) – 69%. Стафилококки, преимущественно изолированные из зева и крови, были гемолизинпродуцирующими. Эти микробы хорошо лизировались секста-фагом и комплексным бактериофагом. Из 77 штаммов клебсиелл 48% лизировались очи-

щенным бактериофагом *K. pneumoniae*, причем из 22 штаммов, выделенных из фекалий, чувствительными были 72,7%. 43% штаммов синегнойных палочек, выделенных из разных субстратов, были чувствительны к синегнойному фагу. 2 штамма протей и 2 штамма кишечной палочки полностью лизировались коли-протейным бактериофагом.

Все штаммы MR+ стафилококков лизировались комплексным и секста-фагами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты анализа антибиотикочувствительности 84 штаммов нозокомиальных микробов, изолированных из 8 биосубстратов пациентов с инфекционными осложнениями, свидетельствовали о множественной резистентности штаммов.

Все исследованные штаммы клебсиелл характеризовались продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС+). Это свойство является важным механизмом резистентности грамотрицательных бактерий к бета-лактамным антибиотикам. Многие карбапенемы и цефепимины (цефокситин и цефотетан) стабильны к гидролизу БЛРС. Наиболее часто БЛРС обнаруживаются у представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Клиническое значение имеет продукция БЛРС штаммами *K. pneumoniae* и *E. coli*. Штаммы – продуценты БЛРС наиболее часто обнаруживаются в отделениях реанимации и интенсивной терапии, трансплантации и др. Экологической нишей энтеробактерий является желудочно-кишечный тракт. Поэтому наиболее часто эти микробы оказываются причиной перитонита, холангита, абсцессов брюшной полости и инфекций мочевыводящих путей. По данным литературы, микробы – продуценты БЛРС резистентны к пенициллинам, цефалоспорином, азтреонаму,



ингибитор-защищенным бета-лактамам, аминогликозидам, триметоприму [17]. В наших исследованиях у нозокомиальных штаммов клебсиелл отмечена крайне низкая чувствительность или ее отсутствие к цефалоспорином 2–4-го поколений, ингибитор-защищенным цефалоспорином, пиперациллин/тазобактаму, а также азтреонаму и фторхинолонам. Только 2 класса препаратов из 22 антибиотиков были активны в отношении этих микроорганизмов. Это карбапенемы (имипенем – 95% и меропенем – 67%) и аминогликозиды (нетилмицин – 55% и амикацин – 80%, полимиксин и колистин – 100%). Все штаммы вырабатывали бета-лактамазы расширенного спектра.

Одним из доминирующих микробов, вызывающих тяжелые внутрибольничные инфекции, особенно у пациентов с иммуносупрессией, является синегнойная палочка. Возбудитель имеет мощный набор факторов патогенности – экзотоксины, в том числе цитотоксины, гемолизины, фосфолипазы, нейроминидазы, фактор проницаемости, протеолитические ферменты. Микробы длительно выживают во внешней среде, часто устойчивы к действию антисептиков и дезинфектантов. *Ps. aeruginosa* вызывает до 15–20% внутрибольничных инфекций и отличается множественной резистентностью к антибиотикам, передающейся R-плазмидами. Проведено большое *in vitro* исследование по изучению чувствительности к антибиотикам штаммов *Ps. aeruginosa*, выделенных в ОРИТ 21 лечебно-профилактического учреждения России от пациентов с нозокомиальными инфекциями. Установлено, что наибольшей активностью в отношении синегнойных палочек обладали меропенем, амикацин, цефтазидим. Резистентность к ним составила 3; 6,3 и 12,2% соответственно. Ниже была активность имипенема и ципрофлоксацина и еще ниже – гентамицина: к нему нечувствительны были 73,9% исследованных штаммов. Частота резистентности к пиперациллину и ПИП/тазобактаму составила 56,5 и 37,75% соответственно [15]. В наших исследованиях среднюю степень активности к *Ps. aeruginosa* имели 4 антибиотика из 20 – амикацин, нетилмицин, азтреонам, цефепим – чувствительными к ним были 40–50% штаммов. К карбапенемам (имипенему и меропенему) были чувствительны только 24–25% штаммов. Цефалоспорины, за исключением цефепима, фторхинолоны и ингибиторзащищенные антибиотики были малоактивны или неактивны. 66,6% штаммов стафилококков были метициллин-резистентными.

В связи с вышеизложенным – распространением множественнорезистентных штаммов, токсичностью препаратов при длительном их применении у тяжелых иммуносупрессированных пациентов – профилактика и лечение инфекционных осложне-

ний, вызванных клебсиеллами и синегнойными палочками, представляет сложную проблему.

Растет количество сообщений по использованию бактериофагов в терапии и профилактике инфекций, вызываемых МРШ бактерий. Многие ученые считают, что использование фагов для лечения и профилактики бактериальных инфекций должно быть успешным [18, 19]. Побудительным мотивом к применению фагов явилось все возрастающее число устойчивых к антибиотикам микроорганизмов, особенно стафилококков, клебсиелл и синегнойной палочки. На новом научном уровне проводятся экспериментальные и клинические исследования по бактериофагам. Так, в недавно опубликованной работе французских исследователей на мышах воспроизводили кистозный фиброз (муковисцидоз), вызванный МРШ *Pseudomonas aeruginosa*. 1 доза синегнойного бактериофага вводилась интраназально через 2 часа после начала инфекции и дала 95% выживаемость животных. Также только 1 доза превентивного лечения обеспечивала 100% выживаемость. Проведенные микробиологические и гистологические исследования, определение уровня интерлейкинов, маркеров воспаления показали их корреляцию с эффективностью лечения. Авторы заключают, что полученные данные являются обоснованием для развития клинических исследований по применению терапии бактериофагами для лечения легочных инфекций, вызванных МРШ [20]. Высказывается мнение, что лет через десять производство бактериофагов в США станет одной из лидирующих отраслей в фармацевтической промышленности [18].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ антибиотикочувствительности 84 штаммов нозокомиальных бактерий и фагочувствительности 140 штаммов. Клебсиеллы, обладающие БЛРС, были чувствительны к 2 классам препаратов из 22 антибиотиков – карбапенемам и аминогликозидам. Синегнойные палочки подавляли со средней степенью активности 4 антибиотика из 22 – азтреонам, цефепим, амикацин, нетилмицин и со 100% активностью – полимиксин, колистин. У всех штаммов с известной антибиотикограммой определена фагочувствительность к специфическим бактериофагам. Стафилококки, в том числе с множественной резистентностью, лизировались секста-фагом и комплексным бактериофагом. Частота лизиса МРШ синегнойных палочек и клебсиелл составила 43 и 48% соответственно.

Учитывая множественную резистентность основных условнопатогенных микробов к антибиотикам и активный лизис фагами МРШ, следует поддержать тенденцию интенсивного внедрения

специфических бактериофагов в практику работы трансплантологической клиники для профилактики и лечения гнойно-септических осложнений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Асланов Б.И., Яфаев Р.Х., Зуева Л.П.* Пути рационального использования синегнойных бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике // Журн. микробиол. 2003. Т. 5 (6). С. 72–76.
2. *Алавидзе З.И., Чанишвили Т.Г., Булавкова В.А., Дзидзишвили Л.К., Малунашвили Т.И.* Бактериофаги для лечения и профилактики гнойно-септических инфекций // Госпитальная эпидемиология: Сб. науч. трудов. Л., 1989. С. 92–94.
3. *Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М.* Иммунобиологические свойства и терапевтическая эффективность препаратов бактериофагов клебсиелл // ЖМЭИ. 1992. № 3. С. 30–33.
4. *Григорьев В.Е.* Внутрибольничные стафилококковые инфекции и меры их профилактики // Казан. мед. журнал. 1995. Т. 76. № 2. С. 176–179.
5. *Дарбеева О.С.* Эпидемиологическая эффективность фагопрофилактики гнойно-септических заболеваний в акушерских стационарах: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1982. 21 с.
6. *Дарбеева О.С., Майская Л.М., Перепанова Т.С.* Опыт использования адаптированных препаратов бактериофагов // Биопрепараты. 2002. № 1. С. 13–17.
7. *Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Попова В.М., Дарбеева О.С., Майская Л.М.* Совершенствование методов конструирования бактериофагов для лечения лорпатологии. Биопрепараты. М., 2002. Т. 2 (6). С. 2–6.
8. *Кочеткова В.А., Мамонтова А.С., Московцева Р.Л. и др.* Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных // Сов. медицина. 1989. № 6. С. 23–26.
9. *Лазарева Е.Б., Смирнов С.В., Хватов В.Б., Спиридонова Г.Г. и др.* Эффективность применения бактериофагов в комплексном лечении больных с ожоговой травмой // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46 (1). С. 10–14.
10. *Кюттер Э.* Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики. СПб., 2001.
11. *Лахно В.М., Бордуновский В.Н.* Применение фаготерапии в хирургической практике // Вестник хирургии. 2001. № 4. С. 122–124.
12. *Перепанова Т.С.* Комплексное лечение и профилактика госпитальной инфекции: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1996. 53 с.
13. *Парфенюк Р.Л.* Микробиологические основы пероральной фаготерапии гнойно-воспалительных заболеваний: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004.
14. *Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Козлов Р.С.* Современные аспекты эпидемиологии, диагностики и лечения нозокомиальной пневмонии // 2008. Т. 10 (2). С. 143–153.
15. *Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Стецюк О.У. и др.* Сравнительная активность антисинегнойных антибиотиков в отношении нозокомиальных штаммов *Ps. aeruginosa*, выделенных в отделениях реанимации и интенсивной терапии в России // КМАХ. 2003. Т. 5. № 1. С. 35–46.
16. *Шаликашвили С.Р.* Комплексное применение специфических фагов, антибактериальных и иммунных препаратов при различной локализации гнойно-воспалительных процессов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Тбилиси, 1992.
17. *Эйдельштейн М.В., Страчунский Л.С.* Динамика распространенности и чувствительности БЛРС-продуцирующих штаммов энтеробактерий к различным антимикробным препаратам в ОРИТ России // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2005. Т. 7 (4). С. 323–336.
18. *Kutateladze M., Adamia R.* Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics // Trends Biotechnol. 2010. Vol. 28 (12). P. 591–595.
19. *Monk A.B., Rees C.D., Barrow P. et al.* Bacteriophage applications: where are we now? // Lett Appl. Microbiol. 2010. Vol. 51 (4). P. 363–369.
20. *Morello E., Saussereau E., Maura D. et al.* Pulmonary bacteriophages therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis steps towards treatment and prevention // PLoS One. 2011. Vol. 6 (2). P. 169–163.

## ОПТИМИЗАЦИЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С АОРТАЛЬНЫМИ ПОРОКАМИ И ВЫРАЖЕННОЙ СИСТОЛИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИЕЙ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

*Мехтиев Э.К., Семеновский М.Л., Потцов В.Н., Вавилов П.А., Евлюхин Д.В.*

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ, Москва

Представлен анализ результатов хирургического лечения больных с аортальными пороками и выраженной систолической дисфункцией левого желудочка (фракция выброса левого желудочка менее 35%) за период с января 2005 года по апрель 2011 года. В исследование включены 39 пациентов, которым произведена коррекция аортального порока. С целью улучшения результатов хирургии был использован разработанный протокол, включавший превентивную подготовку в отделении реанимации с применением кардиотонического препарата левосимендана, применение в периоперационном периоде постоянных методов заместительной почечной терапии, применение гибридного подхода при сочетании порока с ИБС. Госпитальная летальность составила 5,1%. На основании полученных результатов был сделан вывод, что разработанный протокол позволяет значительно улучшить результаты хирургического лечения больных такой тяжелой категории.

*Ключевые слова: аортальный порок, систолическая дисфункция левого желудочка, гибридное лечение, протокол оптимизации.*

## OPTIMIZATION OF SURGICAL TREATMENT OF PATIENTS WITH AORTIC VALVE DISEASES AND SEVERE LEFT VENTRICULAR SYSTOLIC DYSFUNCTION

*Mekhtiev E.K., Semenovskiy M.L., Poptsov V.N., Vavilov P.A., Evlyukhin D.V.*

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,  
Moscow

An analysis of the results of surgical treatment of patients with aortic valve diseases and severe left ventricular systolic dysfunction (ejection fraction less than 35%) for the period from January 2005 to April 2011. The study included 39 patients who performed the aortic valve diseases correction. In order to improve the results of surgery was used developed a protocol that included preventive training in the intensive care unit with cardiotonic drug levosimendan, the use of permanent methods of perioperative renal replacement therapy, using a hybrid approach with a combination of diseases with coronary artery disease. Hospital mortality was 5,1%. Based on these results it was concluded that the developed protocol can significantly improve the results of surgical treatment of patients with such severe category.

*Key words: aortic valve diseases, left ventricular systolic dysfunction, hybrid approach, protocol optimization.*

Аортальный порок встречается примерно у трети больных с пороками клапанного аппарата сердца и является одним из основных пороков, приводящих к тяжелой инвалидизации и ранней смертности [10].

Протезирование аортального клапана остается в большинстве случаев единственно возможным радикальным методом коррекции гемодинамических нарушений, развивающихся при аортальном стено-

*Статья поступила в редакцию 15.06.11 г.*

**Контакты:** Мехтиев Э.К., аспирант, сердечно-сосудистый хирург кардиохирургического отделения № 1.

**Тел.:** моб. 8-916-044-66-30, раб. 8-499-190-36-82, **e-mail:** elnar1978@yandex.ru

зе[16]. Несмотря на достигнутые успехи в хирургии аортального стеноза, наиболее сложным аспектом протезирования аортального клапана является его выполнение у пациентов с сопутствующим нарушением сократительной способности миокарда и/или наличием стенозирующего атеросклероза коронарных артерий и другой сопутствующей патологией, что может влиять на результативность кардиохирургического вмешательства [11].

По данным ряда авторов, протезирование аортального клапана у пациентов с выраженным аортальным пороком и сниженной фракцией выброса левого желудочка имеет высокий риск летального исхода и низкую выживаемость как в ближайшем, так и в отдаленном периоде. В разных сообщениях можно отметить неоднозначность в оценке степени выраженности систолической дисфункции левого желудочка, большинство авторов относят к этой группе больных с ФВЛЖ менее 40%, менее 45% и даже менее 50%. При этом цифры летальности варьируют довольно широко, и в большинстве сообщений представляются высокими. Так, Connolly и соавт. у больных с ФВЛЖ менее 35% указывают на летальность 21% [12], а Powell и соавт. – 18% [13]. В ряде других сообщений у больных с ФВЛЖ менее 40% летальность варьирует в пределах от 9 до 10,9% [21, 22]. В одном из исследований Бокерия и Джангулян у пациентов с исходной ФВЛЖ менее 35% указана цифра летальности 8,3% [2], а группа авторов под руководством Giuseppe Tarantini [24] сообщает о летальности в 8%. Группа авторов НИИПК им. акад. Е.Н. Мешалкина [6], исследовав группу больных с критическим аортальным стенозом и ФВЛЖ менее 50%, сообщили об общей госпитальной летальности 4,9%, в то время как в подгруппе больных с ФВЛЖ менее 40% она составила более чем 10,5%.

Учитывая высокий риск неблагоприятного (летального) исхода при коррекции аортального порока, остается актуальным дальнейшее совершенствование хирургической техники выполнения протезирования аортального клапана, методов предоперационной подготовки, интра- и послеоперационного ведения больных [8, 15, 26].

**Целью** данного исследования является анализ непосредственных результатов и определение протокола, направленного на их улучшение при хирургическом лечении пациентов с аортальными пороками в сочетании с выраженной систолической дисфункцией левого желудочка (ФВЛЖ < 35%)

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включили 39 больных (мужчин – 32 (82,1%), женщин – 7 (17,9%) с выраженным аортальным пороком и значительной систолической

дисфункцией левого желудочка (ФВЛЖ < 35%), которым с января 2005 года по апрель 2011 года в отделении реконструктивной хирургии приобретенных заболеваний сердца ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» выполнено протезирование аортального клапана (табл. 1).

Возраст больных составил от 27 до 80 лет, в среднем  $53,2 \pm 13,6$  года. При предоперационном обследовании недостаточность кровообращения (НК) IIб стадии по классификации Василенко–Стражеско выявили у 34 (87,2%), IIа стадии – у 5 (12,8%). Выраженность НК до операции составила  $3,6 \pm 0,3$  ФК по классификации NYHA.

Этиологическим фактором поражения аортального клапана или аортального протеза являлись: ревматизм – у 13 больных (33,3%); двустворчатый аортальный клапан – 11 (22,2%); атеросклеротический порок – 7 (17,9%); инфекционный эндокардит – 2 (5,1%), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) с аортальной недостаточностью – 2 (5,1%); дисфункция ранее имплантированного механического протеза (паннус, парапротезная фистула) – 2 (5,1%); аневризма восходящего отдела аорты с аортальной недостаточностью – 2 (5,1%). Аортальный стеноз был выявлен у 24 (61,5%) пациентов, аортальная недостаточность – у 15 (38,5%). Сочетание аортального порока с ИБС диагностировали у 8 (20,5%) больных. Критериями исключения из исследования были требующие хирургической коррекции органические поражения митрального клапана.

Таблица 1

### Данные дооперационного обследования включенных в исследование больных

Показатель	Все пациенты (n = 39)
Возраст, годы	$53,2 \pm 13,6$ (от 27 до 80)
Мужчины/женщины (%)	32:7 (82,1:17,9)
Аортальный стеноз	24 (61,5%)
Аортальная недостаточность	15 (38,5%)
НКIIа	5 (12,8%)
НК IIб	34 (87,2%)
Сочетание с ИБС	8 (20,5%)
Артериальная гипертензия	13 (33,3%)
Сахарный диабет	3 (7,7%)
ХОБЛ	26 (66,7%)
Атеросклероз брахиоцефальных артерий	6 (15,4%)
Почечная недостаточность – креатинин >200 ммоль/л	2 (5,1%)
ОНМК в анамнезе	2 (5,1%)
Инфаркт миокарда в анамнезе	1 (2,6%)
Мерцательная аритмия	10 (25,6%)
Повторная операция на открытом сердце	2 (5,1%)

С целью оптимизации результатов хирургического лечения данной группы больных был использован следующий протокол периоперационного ведения больных.

- 1. Предоперационная подготовка с применением кардиотонического препарата левосимендан в условиях ОРИТ** и инвазивным контролем центральной гемодинамики: среднее АД (АД ср., мм рт. ст.), давление в правом предсердии (ДПП, мм рт. ст.), среднее давление в легочной артерии (ДЛА, мм рт. ст.), давление заклинивания легочных капилляров (ДЗЛК, мм рт. ст.), термодилуционное определение сердечного индекса (СИ, л/мин/м<sup>2</sup>), термодилуционная волюметрия правых отделов сердца с определением ФВ правого желудочка (ФВПЖ, %), индексированного конечно-диастолического объема (мл/м<sup>2</sup>), а также транспульмональная термодилуция (PiCCO-технология), трансторакальная или транспищеводная ЭХО-КГ. Гемодинамическими показаниями для проведения терапии левосименданом являлись: ДПП > 12 мм рт. ст., ЗДЛА > 15 мм рт. ст., СИ < 2,5 л/мин/м<sup>2</sup>, ФВЛЖ < 35%.
- 2. Применение в периоперационном периоде постоянных методов заместительной почечной терапии** (постоянная вено-венозная гемофильтрация (CVVH) или постоянная вено-венозная гемодиализация (CVVHDF) у пациентов с преобладающей почечной недостаточностью, резистентной к мочегонной терапии, направленной на коррекцию волевических, электролитных и метаболических расстройств.
- 3. Выполнение предварительной баллонной ангиопластики и стентирования коронарных артерий** у пациентов с сопутствующей ИБС и гемодинамически значимым стенозирующим поражением венечных артерий (гибридный метод коррекции аортального порока и ИБС).
- 4. Взвешенный подход к одномоментной коррекции относительной митральной и трикуспидальной недостаточности.**
- 5. Ранняя экстубация и активизация больных** после операции как мера профилактики дыхательных и инфекционных осложнений.

Хирургическую коррекцию аортального порока осуществляли в условиях искусственного кровообращения, умеренной гипотермии, фармакологической кардиopleгии. Предпочтение отдавалось проведению ретроградной коронарной перфузии. Протезирование аортального клапана производили с использованием механических протезов (MedInж, Carbomedics, On-X).

Проведен анализ медицинских карт всех пациентов, включая предоперационные клинические данные, результаты комплексной инструментальной оценки сердечно-сосудистой системы с помощью

ЭКГ, ЭХО-КГ, коронароангиографии, рентгенографии органов грудной клетки, перфузионной сцинтиграфии миокарда.

Госпитальная летальность расценивалась как смерть пациента до выписки из стационара. Также послеоперационный анализ включил в себя количество койко-дней, проведенных в клинике, в том числе в отделении реанимации и интенсивной терапии, контрольное эхокардиографическое исследование, послеоперационные осложнения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У 14 (35,9%) из 39 пациентов потребовалось применение предоперационной терапии левосименданом в дозировке 100 нг/кг/мин, которую начинали за 17 – 42 (22 ± 2) ч до начала операции. У 5 из 14 больных дополнительно применили следующие кардиотонические препараты: допамин (4,1 ± 0,3 мкг/кг/мин, n = 4), добутамин (4,0 мкг/кг/мин, n = 1), адреналин (35 нг/кг/мин). На фоне проведенного предоперационного лечения выявили улучшение показателей насосной функции левого (ЛЖ) и правого (ПЖ) желудочков: уменьшение (p < 0,05) КДР ЛЖ (с 6,9 ± 0,2 до 6,3 ± 0,1 см), КСР ЛЖ (с 5,6 ± 0,2 до 4,8 ± 0,3 см), КДО ЛЖ (с 276 ± 10 до 226 ± 15 мл), КСО ЛЖ (с 197 ± 20 до 140 ± 23 мл), индексированного КДО ПЖ (с 157 ± 10 до 108 ± 14 мл/м<sup>2</sup>) при одновременном увеличении (p < 0,05) СИ (с 1,68 ± 0,20 до 2,46 ± 0,14 л/мин/м<sup>2</sup>), ФВЛЖ (с 26 ± 4 до 34 ± 5%) и ФВПЖ (с 25 ± 4 до 42 ± 7%). Отметили уменьшение (p < 0,05) ДПП (с 14 ± 2 до 7 ± 2 мм рт. ст.), ДЛА ср. (с 48 ± 4 до 38 ± 2 мм рт. ст.), ДЗЛК (с 31 ± 2 до 18 ± 2 мм рт. ст.). При транспульмональной термодилуции определили уменьшение (p < 0,05) индекса содержания внесосудистой воды в легких (ELWI) с 16 ± 3 до 9 ± 2 мл/кг.

У 10 пациентов (25,6%) в периоперационном периоде применили непрерывные методы заместительной почечной терапии (ЗПТ): CVVH у 7 больных и CVVHDF – у 3 больных. Объемная скорость кровотока по экстракорпоральному контуру составила 180–240 (211 ± 15) мл/мин, бикарбонатный буфер, объемная скорость замещения раствором с бикарбонатным буфером – 30–35 (31,8 ± 3) мл/кг/ч. Продолжительность предоперационной ЗПТ составила от 18 до 48 (28 ± 4) ч, суммарный объем ультрафильтрации – от 1667 до 4050 (2491 ± 516) мл. Во всех наблюдениях ЗПТ продолжили в интра- и послеоперационном периоде.

Продолжительность послеоперационного применения ИВЛ у данной категории составила 3,8 ± 1,1 ч, послеоперационного применения ЗПТ – 34 ± 6 ч, послеоперационного лечения в условиях ОРИТ – 39 ± 3 ч.

Летальных исходов у пациентов с предоперационной подготовкой левосименданом и/или ЗПТ не зафиксировали.

Выполнение предварительной баллонной ангиопластики и стентирования коронарных артерий перед протезированием аортального клапана (гибридный метод коррекции аортального порока и ИБС) потребовалось 7 (17,9%) пациентам (в том числе одному по методике one-stop). Количество имплантированных коронарных стентов составило 11, в среднем  $1,6 \pm 0,3$  на одного пациента. Только 1 (2,6%) выполнили протезирование аортального клапана в сочетании с коронарным шунтированием (МКШ ПМЖВ, аутовенозное АКШ ДВ и ПКА). У двух пациентов с сочетанной патологией и нестабильной системной гемодинамикой при отсутствии аортальной регургитации дополнительно применили превентивную внутриаортальную баллонную контрпульсацию. Специфических кардиальных осложнений у больных с сочетанной патологией (аортальный порок + ИБС), перенесших как коронарное шунтирование, так и предварительное стентирование венечных артерий, выявлено не было. У больных с сочетанной патологией, которым проводился гибридный метод лечения, летальных исходов не было.

Результаты хирургического лечения обследованных больных представлены в табл. 2.

Продолжительность ИК составила  $99 \pm 31$  мин, ишемии миокарда –  $72 \pm 23$  мин. Средний размер имплантированного протеза составил  $22,9 \pm 1,8$  см. Дополнительно к протезированию аортального клапана выполнение пластики трикуспидального клапана потребовалась 8 (20,5%) пациентам, биопротезирование трикуспидального клапана – 2 (5,1%). Ни одному из пациентов не потребовалось выполнения протезирования или пластики митрального клапана.

Ранняя экстубация трахеи и активизация больных проведена большинству пациентов. В течение первых суток после операции экстубация трахеи выполнена 36 (92,3%) больным, при этом 28 (71,8%) пациентам – на операционном столе.

Проведенный анализ эхокардиографического исследования показал значительное улучшение объемных, линейных и весовых параметров левого желудочка, уменьшение степени митральной и трикуспидальной регургитации, давления в легочной артерии в послеоперационном периоде (табл. 3). Положительная динамика была более ярко выражена у больных с аортальным стенозом: ФВЛЖ увеличилась с  $29,3 \pm 4,8$  до  $48,6 \pm 9,1\%$ , тогда как при аортальной недостаточности – с  $30 \pm 5,2$  до  $36,7 \pm 10,9\%$ .

Преобладающей в структуре госпитальных осложнений явилась постперфузионная острая сер-

дечная недостаточность (40% больных), что потребовало внутривенной инфузии кардиотонических препаратов в раннем послеоперационном периоде. Острая почечная недостаточность развилась у 4 (10,3%) пациентов, что потребовало проведения сеансов гемодиализа с постепенным восстановлением выделительной функции почек. Следует отметить, что одному из этих больных была проведена

Таблица 2

**Характер выполненных оперативных вмешательств**

Оперативное вмешательство	Количество
Протезирование аортального клапана	35 (89,7%)
Репротезирование аортального клапана	1 (2,6%)
Ушивание парапротезной фистулы	1 (2,6%)
Операция Бенталла–де Боно	2 (5,1%)
Аортопластика и экзопротезирование восходящей аорты	6 (15,4%)
Сочетание протезирования аортального клапана с коронарным шунтированием	1 (2,6%)
Предварительная баллонная ангиопластика и стентирование коронарных артерий	7 (17,9%)
Пластика трикуспидального клапана	8 (20,5%)
Протезирование трикуспидального клапана	2 (5,1%)

Таблица 3

**Динамика изменений эхокардиографических показателей до и после операции**

Параметры	До операции	После операции	p
ФВЛЖ, %	$29,5 \pm 4,9$	$44,5 \pm 11,2$	$p < 0,05$
КДР ЛЖ, мм	$69,6 \pm 11$	$64,5 \pm 10,3$	$p < 0,05$
КСР ЛЖ, мм	$58,1 \pm 9,8$	$49,4 \pm 11,5$	$p < 0,05$
КДО ЛЖ, мл	$258,8 \pm 98,4$	$227,8 \pm 86,2$	$p < 0,05$
КСО ЛЖ, мл	$176,3 \pm 71,1$	$137 \pm 75$	$p < 0,05$
УО ЛЖ, см	$84,3 \pm 34,7$	$90,1 \pm 22,5$	$p < 0,05$
ТМЖП, мм	$14,3 \pm 3,8$	$13,5 \pm 3,7$	$p > 0,05$
ТЗСЛЖ, мм	$13,9 \pm 3,9$	$13,3 \pm 3,4$	$p > 0,05$
Масса миокарда ЛЖ, г	$606,4 \pm 193,7$	$465 \pm 137$	$p < 0,05$
Митральная регургитация, степень	$1 \pm 0,7$	$0,5 \pm 0,6$	$p < 0,05$
Трикуспидальная регургитация, степень	$1,2 \pm 1,2$	$0,3 \pm 0,4$	$p < 0,05$
Давление в ЛА, мм рт. ст.	$48,6 \pm 11,7$	$31 \pm 7,2$	$p < 0,05$
Пиковый градиент на аортальном протезе, мм рт. ст.	–	$25,6 \pm 10$	

сочетанная операция: протезирование аортального клапана и коронарное шунтирование 3 артерий, при этом время искусственного кровообращения составило более 180 мин, а время окклюзии аорты – более 120 минут.

В приведенном исследовании госпитальная летальность составила 5,1% (n = 2). Причиной летальных исходов в обоих случаях явилась острая сердечно-сосудистая недостаточность. Следует отметить, что у умерших пациентов была необходимость в коррекции сопутствующего трикуспидального порока (в одном случае биопротезирование, в другом – пластика), а также пластике восходящей аорты у одного из пациентов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

По многочисленным литературным данным, основным предиктором неблагоприятных непосредственных и отдаленных результатов после протезирования аортального клапана признана систолическая дисфункция левого желудочка [16]. Исходя из этого рядом авторов даже было рекомендовано отказаться от протезирования аортального клапана при выраженном снижении ФВЛЖ [9, 19, 25]. Однако многие исследователи при анализе хирургического лечения больных с аортальными пороками и сниженной ФВЛЖ считают, что протезирование аортального клапана является эффективным методом лечения данной категории больных.

В настоящем исследовании представлены результаты хирургического лечения наиболее тяжелой группы больных со значительным снижением ФВЛЖ: менее 35%. Разработанный нами протокол периоперационного ведения позволил оптимизировать результаты хирургического лечения данной группы больных. Из стационара в удовлетворительном состоянии выписано 37 пациентов (94,9%). Исследование, проведенное нами, подтвердило, что протезирование аортального клапана у пациентов с аортальным пороком и выраженной систолической дисфункцией левого желудочка может быть выполнено с низкой госпитальной летальностью, которая, по нашим данным, составила 5,1%.

Предоперационное (превентивное) применение несимпатомиметического кардиотонического препарата левосимендана («сензитайзера внутриклеточного кальция»), по данным ряда авторов [17, 23], оправдало себя при систолической дисфункции левого желудочка и является эффективной лечебной мерой коррекции значимого нарушения насосной функции сердца при декомпенсированных пороках аортального клапана. Через 6 часов после начала инфузии препарата в дозировке 100 нг/кг/мин наступает гемодинамическое улучшение (увеличение

сердечного выброса, сердечного индекса) транспорта кислорода, кислотно-основного состояния, уменьшение выраженности лактатемии при одновременном снижении напряженности кардиотонической терапии. Применение левосимендана сопровождается вазодилатацией большого (снижение периферического сосудистого сопротивления) и малого (снижение легочного сосудистого сопротивления) кругов кровообращения, что является выгодным при нарушениях гемодинамики, что и подтверждено при его применении у наших больных: прирост сердечного индекса (в среднем с  $1,68 \pm 0,20$  до  $2,46 \pm 0,14$  л/мин/м<sup>2</sup>), снижение давления заклинивания легочных капилляров (в среднем с  $31 \pm 2$  до  $18 \pm 2$  мм рт. ст.) и давления в легочной артерии (в среднем с  $48 \pm 4$  до  $38 \pm 2$  мм рт. ст.), увеличение фракции выброса левого желудочка с  $26 \pm 4$  до  $34 \pm 5\%$  уже до начала операции. Следует отметить, что в группе пациентов, получивших превентивную подготовку левосименданом, на госпитальном этапе не отмечено ни одного летального исхода.

Аортальный порок нарушает функцию левого желудочка, равно как и стенозы венечных артерий способствуют снижению сократимости миокарда и изменению геометрии сердечных полостей. Несмотря на то что в современных кардиохирургических клиниках растет число одновременных сочетанных оперативных вмешательств на аортальном клапане и коронарных артериях [14], ранняя госпитальная смертность даже у больных с сохранной функцией левого желудочка после протезирования аортального клапана и шунтирования коронарных артерий достигает 10% [4, 7]. Увеличение длительности операции и кардиоплегии является более рискованным, чем при изолированном протезировании аортального клапана, тем более у больных с резким снижением ФВЛЖ. По результатам проведенного Л.А. Бокерия и Газалом Белалом мультивариабельного анализа [1], независимыми предикторами внутрибольничной смертности являлись:

- низкая фракция выброса левого желудочка (менее 30%) – риск внутрибольничной смертности при комбинированных операциях протезирования аортального клапана и коронарного шунтирования у пациентов с низкой ФВЛЖ (менее 30%) в 17,16 раза больше по сравнению с пациентами с высокой (более 50%) ФВЛЖ.
- продолжительность ИК – свыше 60 мин; каждый час ИК повышает риск внутрибольничной смертности в 2,13 раза.

В связи с развитием методов интервенционной кардиологии в последнее время появилась возможность более безопасного хирургического лечения больных с высоким уровнем периоперационного риска, к которым можно, в частности, отнести па-

циентов с выраженным снижением ФВЛЖ. У тяжелых больных этой группы, особенно пожилого и старческого возраста, «гибридный» метод лечения позволяет снизить периоперационный риск [3]. По данным нашего исследования, в группе больных с сочетанной патологией (аортальный порок + ИБС), у которых применялся гибридный метод лечения, значимых кардиальных и некардиальных осложнений не отмечено; кроме того, в этой подгруппе больных не было ни одного летального исхода.

В исследуемой группе больных следует отметить наш взвешенный подход к коррекции относительной митральной и трикуспидальной недостаточности. На данный период нет окончательного ответа на вопрос о коррекции относительной митральной недостаточности при аортальном стенозе. В недавнем исследовании проф. И.И. Скопина и соавт. [5] нашло отражение то, что госпитальная летальность среди пациентов с аортальным пороком в сочетании с относительной митральной недостаточностью выше, чем у пациентов с изолированным аортальным пороком, что объясняется их исходно более тяжелым состоянием. Был сделан вывод, что в группе пациентов с преобладающим аортальным стенозом хирургической коррекции относительной митральной недостаточности II или III степени следует избегать, если нет дополнительных предикторов, осложняющих ее течение, тогда как при значительной степени митральной регургитации (III степень) в сочетании с выраженной дилатацией фиброзного кольца митрального клапана и полости левого желудочка со снижением сократительной способности миокарда левого желудочка коррекция митральной недостаточности оправдана. Необходимости в коррекции относительной недостаточности митрального клапана не было, при этом в раннем послеоперационном периоде отмечено, что степень относительной митральной недостаточности в среднем уменьшилась с  $1 \pm 0,7$  до  $0,5 \pm 0,6$ . Что касается пластики трикуспидального клапана, то доказано, что она сама по себе «защищает» правые отделы сердца от объемной перегрузки. В нашем исследовании 10 (25,6%) пациентам потребовалась коррекция трикуспидальной недостаточности, в том числе пластика ТК проведена 8 (20,5%), биопротезирование – 2 (5,1%) больным.

Ранняя экстубация и активизация больных (в течение первых суток после операции было экстубировано 36 больных, или 92,3%, при этом 28 пациентов, или 71,8%, – на операционном столе), активно применяемая в клинике нашего Центра, позволила избежать дыхательных и инфекционных осложнений у большинства пациентов.

Исследование, проведенное нами, подтверждает, что протезирование аортального клапана у пациен-

тов с аортальным пороком и выраженной систолической дисфункцией левого желудочка приводит к улучшению внутрисердечной гемодинамики: увеличению ФВЛЖ более чем в 1,5 раза (в среднем с  $29,5 \pm 4,9$  до  $44,5 \pm 11,2\%$ ), уменьшению линейных и объемных показателей левого желудочка, уменьшению массы миокарда левого желудочка, значительному уменьшению степени митральной регургитации, а также нормализации давления в легочной артерии. Отмечается более выраженный эффект непосредственно после операции у больных с аортальным стенозом, нежели у пациентов с аортальной недостаточностью. Объяснением этому могут служить работы Репенес и соавт. [18], которые, используя морфометрическое изучение интраоперационных биопсий, показали, что при уменьшении сократительного миокарда по сравнению с прогрессирующим интерстициальным фиброзом у больных с аортальной недостаточностью даже успешная операция уже неспособна полностью восстановить (обратное ремоделирование) структуру и функцию левого желудочка. Поэтому, по рекомендациям Венской конференции [27], у пациентов с аортальной недостаточностью при снижении ФВЛЖ даже менее 55% и увеличении его конечно-диастолического размера более 6 см операция должна быть абсолютно показанной и неотложной, несмотря на умеренную выраженность клинических симптомов. Но даже при крайней степени дисфункции миокарда у больных с аортальной недостаточностью перед тем как рекомендовать трансплантацию сердца, следует обсуждать все возможности реконструктивной хирургии или протезирования клапана [20].

В нашем исследовании независимыми факторами возникновения госпитальной летальности были мужской пол, сопутствующий трикуспидальный порок (потребовавший коррекции: в одном случае биопротезирование, в другом – пластика), расширение восходящей аорты (что потребовало проведения линейной аортопластики), и как следствие, **значительное увеличение времени искусственного кровообращения и пережатия аорты.**

Проведенное нами исследование демонстрирует, что протезирование аортального клапана у пациентов с выраженной систолической дисфункцией левого желудочка при соблюдении разработанного и примененного протокола может быть выполнено с низкими периоперационными осложнениями и летальностью.

## ВЫВОДЫ

1. Протезирование аортального клапана у больных с аортальными пороками и выраженной систолической дисфункцией левого желудочка (ФВЛЖ <



- 35%) может быть проведено с низкими периоперационными осложнениями и госпитальной летальностью. Этому способствует разработанный нами протокол, направленный на оптимизацию хирургического лечения пациентов этой тяжелой категории.
2. Использование гибридного метода (предварительная баллонная ангиопластика и стентирование коронарных артерий) у данной категории больных с сочетанной ИБС позволяет снизить интраоперационный риск и количество осложнений.
  3. Превентивная (предоперационная) подготовка левосименданом способствуют дооперационному улучшению систолической функции ЛЖ и центральной гемодинамики.
  4. Ранняя экстубация и активизация больных позволяет избежать дыхательных и инфекционных осложнений у большинства пациентов.
  5. Результатом хирургической коррекции аортальных пороков при выраженной систолической дисфункции левого желудочка является значимое увеличение ФВЛЖ (особенно у больных с аортальным стенозом) и улучшение объемных и линейных параметров левого желудочка уже в ранние сроки после операции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бокерия Л.А., Газал Белал. Результаты одномоментного протезирования аортального клапана и шунтирования коронарных артерий: предикторы летальных исходов // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2009. № 5. С. 21–26.
2. Джангулян Н.Г. Эффективность хирургической коррекции аортального стеноза в группе пациентов с низкой сократительной способностью миокарда // Врач-аспирант. 2005. № 12.
3. Семеновский М.Л., Вавилов П.А., Миронков Б.Л., Анискевич Г.В. и др. Гибридный метод лечения сочетанной патологии (пороки сердца и ишемическая болезнь сердца) у больных старше 70 лет // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2010. № 3. С. 8–12.
4. Скопин И.И., Камбаров С.Ю., Никитина Т.Г. и др. Особенности хирургического лечения больных аортальными пороками сердца в сочетании с ИБС // Сердечно-сосудистые заболевания: Бюллетень VI ежегодной сессии Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН с Всероссийской конференцией молодых ученых. Москва. 2002. Том 3. № 5. С. 84.
5. Скопин И.И., Цискаридзе И.М., Сливнева И.В. и др. Предикторы послеоперационных осложнений и госпитальной летальности у пациентов с аортальными пороками и сопутствующей митральной недостаточностью // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2010. № 2. С. 18–24.
6. Шматов Д.В., Железнев С.И., Астанов Д.А. и др. Непосредственные результаты протезирования аортального клапана у пациентов с аортальным стенозом и систолической дисфункцией левого желудочка // Патология кровообращения и кардиохирургия. 2010. № 4. С. 24–28.
7. Birol Yamak, A Tulga Ulus, S Fehmi Katircioglu et al. Surgery for Combined Rheumatic Valve and Coronary Artery Disease // Asian Cardiovasc. Thorac. Ann. 1999. № 7. P. 33–36.
8. Borowsky A., Ghosizad A., Vchivkov I., Gams E. Surgery for severe aortic stenosis with low transvalvular gradient and poor left ventricular function – single centre experience and review of the literature // J. of Cardiothoracic Surgery. 2007, 2:9 doi:10.1186/1749-8090-2-9.
9. Brogan W.C., Grayburn P.A., Lange R.A. et al. Prognosis after valve replacement in patients with severe aortic stenosis and a low transvalvular pressure gradient // J. Am. Coll. Cardiol. 1993. Vol. 21. P. 1657–1660.
10. Carabello B.A., Paulus W.J. Aortic stenosis // Lancet. 2009. Vol. 373 (9667). P. 956–966.
11. Collinson J., Henein M., Flather M. et al. Valve replacement for aortic stenosis in patients with poor left ventricular function: comparison of early changes with stented and stentless valve // Circulation. 1999. Vol. 100 (Suppl. II). P. II1–II5.
12. Connolly H.M., Jay K., Hartzell V. et al. Severe aortic stenosis with low transvalvular gradient and severe left ventricular dysfunction // Circulation. 2000. Vol. 101. P. 1940–1946.
13. Powell D.E., Tunick P.A., Rosenzweig B.P. et al. // Arch. Intern. Med. 2000. Vol. 160. P. 1337–1341.
14. DiSesa V. Valvular and ischemic heart disease // Cardiac Surgery in the Adult / Ed. H.L. Edmunds. N.Y.: McGraw Hill, 1997. Chap. 37.
15. Hoefler D., Jonetzko P., Hoermann C. et al. Successful administration of levosimendan in a patient with low-gradient low-output aortic stenosis. // Curr. Opinion. Cardiol. 2007. Vol. 22 (2). P. 84–91.
16. McCarthy P.M. Aortic valve surgery in patients with left ventricular dysfunction // Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2002. Vol. 14. P. 137–143.
17. Nieminen M., Akkila J., Hasenfuss G. et al. Hemodynamic and neurohumoral effects of continuous infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure // JACC 2000. Vol. 36. P. 1903–1912.
18. Perennec J., Hereman F., Cosma H. et al. Relationship of myocardial morphometry in aortic valve regurgitation to myocardial function and post-operative results // Basic Res. Cardiol. 1988. Vol. 83. P. 10.
19. Rediker D.E., Boucher C.A., Block P.C. et al. Degree of reversibility of left ventricular dysfunction aortic valve replacement for isolated aortic valve stenosis // Am. J. Cardiol. 1987. Vol. 60. P. 112–118.
20. Дземешкевич С.Л., Стивенсон Л.У. Болезни митрального клапана. М.: ГЭОТАР-Медицина, 2000.
21. Rothenburger M., Drebber K., Tjan T.D. et al. Aortic valve replacement for aortic regurgitation and stenosis,

- in patients with severe left ventricular dysfunction / M. Rothenburger // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2003. № 23. P. 703–709.
22. *Sharony R., Grossi E.A., Saunders P.C. et al.* Aortic valve replacement in patients with impaired ventricular function // *Ann. Thorac. Surg.* 2003. Vol. 75. P. 1808–1814.
23. *Slawsky M.T., Colucci W.S., Gottlieb S.S. et al.* Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure // *Circulation.* 2000. Vol. 102. P. 2222–2227.
24. *Tarantini G., Buja P., Scognamiglio R. et al.* Aortic valve replacement in severe aortic stenosis with left ventricular dysfunction: determinants of cardiac mortality and ventricular function recovery // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2003. Vol. 24. P. 879–885.
25. *Thompson R., Yacoub M., Ahmed M. et al.* Influence of preoperative left ventricular function on results of homograft replacement of the aortic valve for aortic stenosis // *J. Am. J. Cardiol.* 1979. Vol. 43. P. 929–938.
26. *Turk R., Varadajan P., Kamath A. et al.* Survival benefit of aortic valve replacement on older patients with asymptomatic chronic severe aortic regurgitation // *Ann. Thorac. Surg.* 2010. Vol. 89 (3). P. 731–737.
27. *Unger F., Rainer W., Horsthotte D. et al.* Standards and concepts in valve surgery // *Cor. Europaeum.* 2002. № 8. P. 174.

## РЕТРОГРАДНАЯ ПЕРФУЗИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КАК МЕТОД ЕГО ЗАЩИТЫ ВО ВРЕМЯ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ОСТАНОВКИ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ОПЕРАЦИЯХ НА ВОСХОДЯЩЕМ ОТДЕЛЕ И ДУГЕ АОРТЫ

*Тарабарко Н.Н., Семеновский М.Л., Акопов Г.А., Потцов В.Н.*

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ, Москва

В настоящее время нет единой концепции в выборе метода защиты головного мозга при операциях на восходящем отделе и дуге аорты во время остановки кровообращения. Целью данного исследования стал анализ опыта проведения ретроградной перфузии головного мозга как метода его протекции при операциях с гипотермической остановкой кровообращения, накопленного в отделении реконструктивной хирургии приобретенных заболеваний сердца ФНЦТИО.

*Ключевые слова: ретроградная перфузия головного мозга, расслаивающая аневризма восходящего отдела аорты, расслаивающая аневризма дуги аорты, гипотермический циркуляторный арест.*

## RETROGRADE CEREBRAL PERFUSION AS METHOD OF BRAIN PROTECTION DURING OPERATIONS ON ASCENDING AND TRANSVERSE AORTA WITH HYPOTHERMIC CIRCULATORY ARREST

*Tarabarko N.N., Semenovskiy M.L., Akopov G.A., Poptsov V.N.*

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,  
Moscow

There is no optimal approach to cerebral protection during ascending and transverse aortic arch repairs in our days. This study was designed to analyze experience of using retrograde cerebral perfusion as method of brain protection during operations on ascending and transverse aorta with hypothermic circulatory arrest.

*Key words: retrograde cerebral perfusion, aortic dissection, hypothermic circulatory arrest.*

Операции на дуге аорты до сих пор остаются серьезным вызовом для кардиохирургов и невозможны без периода прерывания кровотока в ГМ. Глубокий гипотермический циркуляторный арест (ГЦА) является наиболее часто применяемой техникой для достижения экспозиции и одновременно защиты ГМ. Однако данный метод предоставляет ограниченное время для хирургических манипуляций на аорте, а также сопровождается высокой

частотой неврологических осложнений различного характера. Поэтому для расширения «безопасного периода» циркуляторного ареста и снижения частоты неврологических нарушений используются дополнительные методы защиты головного мозга (РПГМ, САПГМ). Несмотря на исследования, сравнивающие оба подхода, тяжело определить значимые преимущества какого-либо из них. В данном исследовании приведен опыт проведения ретро-

*Статья поступила в редакцию 17.06.11 г.*

**Контакты:** Семеновский М.Л., профессор, д. м. н., лауреат Государственной премии, заведующий 1-м кардиохирургическим отделением.

**Тел.:** раб. 8-499-190-28-46, дом. 8-495-415-32-71.

градной перфузии головного мозга как метода его протекции при операциях с гипотермической остановкой кровообращения.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С 1994-го по 2009 г. было выполнено 39 операций 38 пациентам по поводу расслаивающей аневризмы аорты с использованием ретроградной перфузии ГМ в условиях гипотермической остановки кровообращения (ГОК). Среди пациентов было 24 мужчины и 14 женщин. Средний возраст больных составил  $48,5 \pm 13$  лет (от 16 до 69). Большинство пациентов было с расслаивающей аневризмой аорты 1-го типа – 30 человек (76,9%). Расслоение 2А-типа было у 9 человек (23,1%). В острой стадии

расслоения находилось 16 больных, подострой – 6, хронической – 17.

В этиологии расслоения преобладал атеросклероз – 53% случаев. Дисгистогенез был причиной 44% случаев расслоения, и в одном случае расслоение произошло по поводу инфекционного эндокардита аортального клапана с развитием абсцесса корня аорты (3%) (рис. 1). Артериальная гипертензия была наиболее распространенным предоперационным расстройством, встречаясь более чем в 70% случаев.

Все манипуляции на дуге аорты проводились в условиях остановки кровообращения. Интраоперационная ревизия просвета дуги аорты определяла объем оперативного вмешательства, которое включало в себя: протезирование восходящей аорты с пластикой дистального анастомоза (17 операций); протезирование ВА с частичным замещением дуги аорты (13 операций, из них в одном случае было выполнено сопутствующее протезирование митрального клапана и пластика трикуспидального клапана по Бойду); протезирование ВА с полным замещением дуги аорты (5 операций). В тех ситуациях, когда представлялось возможным сохранить нативный аортальный клапан, выполнялось супракоронарное протезирование восходящей аорты, в остальных случаях выполнялась операция Бенталла – де Боно. Средняя продолжительность ИК составила  $182 \pm 64,4$  минуты, время пережатия аорты –  $117 \pm 16,7$  минуты.

Все операции выполнялись через срединную стернотомию. Искусственное кровообращение проводили через бедренную артерию и правое предсердие. Охлаждение проводилось до достижения общей гипотермии в  $14–16^\circ\text{C}$ . Для того чтобы увеличить толерантность нервной ткани к ишемии, голову пациента обкладывали пакетами льда, и до начала ГОК вводили 1000–1500 мг метилпреднизолона. Во всех случаях в качестве «индивидуального» метода защиты головного мозга использовалась РПГМ, которая осуществлялась через артерио-венозный шунт к канюле верхней полой вены (рис. 2). Объемная скорость перфузии колебалась от 250 до 350 мл/мин, давление в верхней полой вене поддерживалось на уровне 16–20 мм рт. ст. Средняя продолжительность РПГМ составила  $50,1 \pm 17,7$  минуты (4–107).

Адекватность восстановления функций головного мозга в послеоперационном периоде определяли время пробуждения, сроки экстубации, характер и степень выраженности неврологических дисфункций, которые оценивались неврологом.

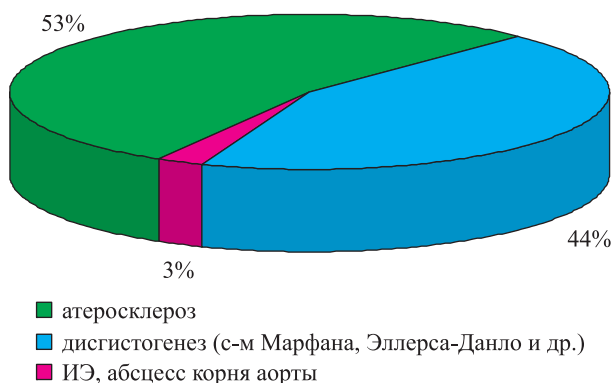


Рис. 1. Этиология расслоения

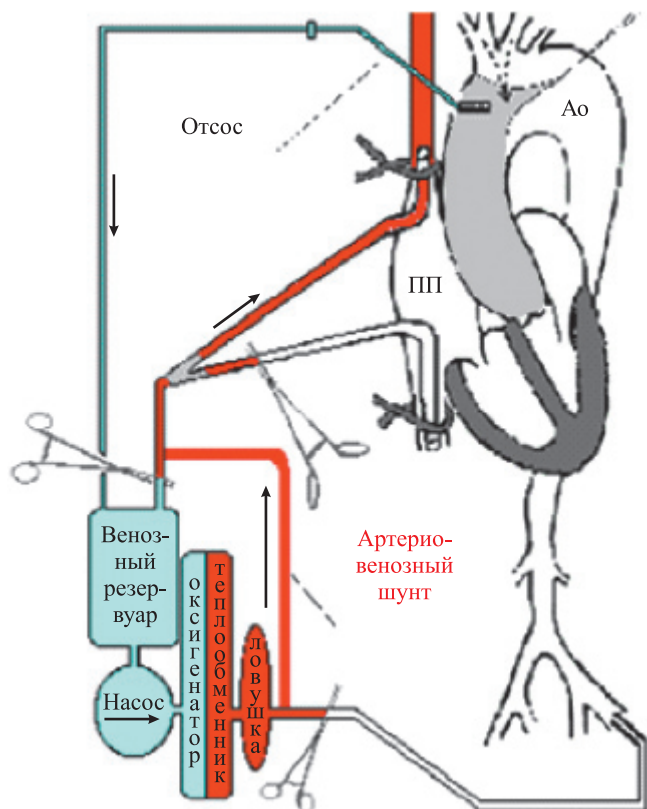


Рис. 2. РПГМ через артерио-венозный шунт к канюле верхней полой вены

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В госпитальном периоде умерло 8 больных (20,5%), из них 5 (12,8%) составляли категорию

крайне тяжелых и были оперированы в острой стадии расслоения по жизненным показаниям. Среди летальных исходов объем оперативного вмешательства включал в себя протезирование восходящего отдела аорты: с пластикой дистального анастомоза (2 случая), с полным замещением дуги (4 случая) и части дуги аорты (2 случая). Средняя продолжительность РПГМ в серии летальных случаев составила  $60,4 \pm 25,5$  минуты (26–107). Важно отметить, что ни один летальный исход не возник в результате неадекватной защиты головного мозга. В 2 случаях больные были экстубированы и не имели очаговой неврологической симптоматики. Причинами смерти стали острая сердечно-сосудистая недостаточность (3 случая), кровотечение (1), полиорганная недостаточность (4). На операционном столе и в течение первых суток экстубирован 21 пациент (54%), на 2-е сутки – 5 пациентов (13%). Более длительная ИВЛ требовалась в различных ситуациях в связи с возникновением дыхательной, печеночно-почечной недостаточности, а также синдромом низкого сердечного выброса и не была связана с неврологическими причинами.

У 5 пациентов были отмечены проходящие неврологические нарушения различной степени выраженности, которые проявлялись легкими интеллектуальными расстройствами, изменениями личностных характеристик, нарушениями памяти, потерей ориентации во времени и месте, бредом, психомоторным возбуждением, отказом от лечения. Важно отметить, что все транзиторные неврологические нарушения носили кратковременный характер и купировались в течение нескольких суток (2–5).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Операции на дуге аорты до сих пор остаются серьезной проблемой кардиохирургии и невозможны без периода прерывания кровотока в головном мозге. Поэтому необходимо обеспечить защиту мозга в течение этого уязвимого времени. Единственным эффективным способом отсрочить в этот период структурно-функциональные изменения в клетках головного мозга является системное охлаждение организма, и ГМ в частности. Метод остановки кровообращения в условиях глубокой гипотермии основан на том факте, что мозговой метаболизм уменьшается по мере снижения температуры и составляет 17% от исходного при гипотермии  $15^\circ\text{C}$  [5]. Это определяет «безопасное» время для остановки кровообращения, зависящее от глубины гипотермии. При  $13\text{--}14^\circ\text{C}$  данный лимит, по данным различных авторов, составляет 40–60 мин. Так, на примере 656 пациентов Swenson с коллегами продемонстрировали, что гипотермическая оста-

новка кровообращения более 40 минут без дополнительных методов защиты ГМ (РПГМ, САПГМ) связана с увеличенным риском неврологических осложнений, а время ишемии более 65 мин связано с увеличением смертности [11].

Однако хирургические вмешательства с использованием глубокого гипотермического циркуляторного ареста (ГЦА), не превышающие даже общепринятых «безопасных» лимитов, тем не менее, сопровождаются высоким риском неврологических осложнений в виде инсульта, проходящего неврологического дефицита или энцефалопатии (5–40%) [2, 4, 6, 9, 10]. Поэтому для расширения «безопасного периода» циркуляторного ареста и снижения частоты неврологических нарушений используются дополнительные методы защиты головного мозга (РПГМ, АПГМ). Несмотря на исследования, сравнивающие оба подхода, тяжело определить значимые преимущества какого-либо из них. Поэтому наряду с глубокой гипотермией выбор «индивидуального» метода защиты головного мозга (АПГМ, РПГМ) является актуальной проблемой, во многом определяющей степень и характер неврологических расстройств в послеоперационном периоде, а также сам исход оперативного вмешательства.

В конце 80-х годов Ueda и соавторы внедрили в клиническую практику хирургии восходящего отдела и дуги аорты метод ретроградной перфузии головного мозга, который был призван усовершенствовать защиту ГМ во время гипотермического циркуляторного ареста. С тех пор отношение к РПГМ является предметом многочисленных дискуссий. Одним из спорных моментов РПГМ является вопрос о количестве перфузируемой крови, которая достигает головного мозга. Оппоненты РПГМ принимают во внимание анатомические особенности в системе верхней полых вен (наличие клапанов в яремной вене, выраженная венозная сеть лица и шеи, подключичные вены с их притоками, непарная вена, являющаяся одним из важных кавакавальных анастомозов), которые служат препятствием для продвижения крови к головному мозгу. При наличии состоятельных клапанов во внутренней яремной вене именно непарная вена с ее притоками становится основной магистралью, обеспечивающей ретроградный поток крови к головному мозгу во время РПГМ. В то же время непарная вена может принимать активное участие в ретроградном кровоснабжении спинного мозга, тем самым шунтируя перфузат от ГМ. Еще одним шунтом, ограничивающим ретроградную перфузию непосредственно головного мозга, может быть базилярное сплетение, соединяющее посредством спинномозгового сплетения верхнюю с нижней полые вены. Однако в противоположность данным суждениям Anthony L. Estrera с соавторами сообщают об использовании

транскраниальной доплерографии при проведении РПГМ, по данным которой определялся обратный ток крови в средних артериях мозга на сопоставимом с антеградным уровне [1]. Данная работа может служить практическим подтверждением того, что РПГМ обеспечивает должный объем перфузата в головном мозге.

Достоинствами РПГМ является равномерное охлаждение ГМ, эффективная профилактика воздушной и материальной эмболии, а также простота и удобство в использовании. В противоположность этому приверженцы методики АПГМ основываются на положении о том, что данный метод представляет собой наиболее физиологичный способ защиты ГМ в условиях остановки кровообращения. Во время АПГМ перфузат достигает ГМ естественным (антеградным) путем через сосудистые бассейны плечеголового ствола и/или левой общей сонной артерии. Также экспериментальные данные свидетельствуют об адекватном кровоснабжении мозга при использовании АПГМ, а частота транзиторных неврологических нарушений в ряде сообщений достоверно ниже в сравнении с частотой аналогичных осложнений при использовании РПГМ. Таким образом, если ориентироваться только на нормальную физиологию кровообращения и результаты соответствующих работ, создается впечатление, что наличие такой методики, как АПГМ, является предпочтительным методом защиты ГМ.

Однако, по данным клинических исследований, применение РПГМ показало снижение госпитальной летальности и частоты стойких неврологических нарушений при операциях в условиях ГГЦА. По данным Marek P. Ehrlich и соавт., пациенты, оперированные с использованием РПГМ, имели значительно меньшую госпитальную летальность (15% против 31%) и стойкие неврологические осложнения (9% против 27%) [7].

В клиническом исследовании Okita с соавт. сравнили результаты полного протезирования дуги аорты, используя два разных метода защиты головного мозга: глубокий циркуляторный арест с РПГМ (30 пациентов) и САПГМ (30 пациентов). В группах выполнялись пред- и послеоперационные КТ головного мозга, неврологические исследования и тесты на когнитивные функции. Госпитальная летальность в обеих группах была одинаковой (6,6%). Однако в группе РПГМ причинами смерти были предшествующая тяжелая недостаточность функции ЛЖ и цирроз печени, а в группе САПГМ – послеоперационный инсульт с дыхательной недостаточностью и послеоперационная сердечная недостаточность. Частота инсультов была ниже в группе РПГМ – 3,3%, а в группе САПГМ составляла 6,6%. Присутствие транзиторных мозговых нарушений было больше в группе РПГМ (33,3% против

13,3%) [8]. Anthony L. Estrera и соавт., проанализировав опыт проведения 1107 операций в условиях ГГЦА, при которых в большинстве случаев в качестве дополнительного метода защиты головного мозга использовалась РПГМ, сообщают о хороших результатах: инсульт возник в 2,8% случаев, ТНН были у 15,5% пациентов [1].

Вариабельность преходящих неврологических нарушений в различных сообщениях может быть обусловлена тем, что в настоящее время нет единой концепции оптимальных условий техники проведения РПГМ. Поскольку качество защиты ГМ зависит от адекватности его перфузии, информация об уровне перфузионного давления имеет особое значение. При проведении РПГМ нами поддерживалось давление в верхней полой вене на уровне 16–20 мм рт. ст. Чрезмерно высокое или низкое давление может ухудшать протективные свойства РПГМ и тем самым увеличивать частоту возникновения транзиторных неврологических нарушений. Понятно, что низкое перфузионное давление соответствует недостаточному объему крови, доставляемому к ГМ. В то же время механизм неадекватности РПГМ при высоком перфузионном давлении может быть объяснен, с одной стороны, увеличением гидростатического давления в венозных сосудах, что повышает вероятность отека, с другой – возможной компрессией кортикального слоя ГМ многочисленными поверхностными мозговыми венами, объем которых при активном ретроградном заполнении значительно увеличивается. Учитывая то, что цифры перфузионного давления в зависимости от положения катетера у одного и того же пациента при неизменных условиях перфузии могут существенно различаться, для проведения адекватной РПГМ важен более четкий мониторинг. Anthony L. Estrera с соавт. сообщают об использовании церебральной оксиметрии и транскраниальной доплерографии при проведении РПГМ. Адекватность перфузии определялась по наличию обратного тока крови в средних артериях мозга, информация с доплерографии сопоставлялась с данными оксиметрии. В результате было установлено, что адекватность РПГМ зависит от изменения давления и потока, которые контролировались мониторингом головного мозга. Из-за того, что венозные сосуды ГМ могут требовать более высокого давления для обеспечения ретроградного потока крови, неконтролируемая мозговым мониторингом РПГМ может не обеспечивать адекватной защиты. Это служит объяснением худших результатов использования РПГМ, продемонстрированных в других исследованиях [1, 3].

Важно отметить, что транзиторные неврологические нарушения, частота которых больше при использовании РПГМ, чем АПГМ, носят кратковременный характер, не приводят к инвалидизации и

не являются фатальными. В то же время последние сообщения показывают, что большинство стойких неврологических нарушений связаны с инсультом в результате эмболического синдрома. В недавних сообщениях наблюдали, что 2/3 инсультов у пациентов после манипуляций на дуге аорты имели эмболическое происхождение, и только в 1/3 случаях причиной была гипоперфузия [5]. Это наводит на мысль, что проведение АПГМ – важная, но не основная методика защиты ГМ. Полагаясь на это, можно утверждать, что РПГМ с позиции профилактики интраоперационных инсультов выглядит более привлекательно, что связано с профилактикой эмболии различного генеза. Данное утверждение получило подтверждение и в настоящем исследовании. При этом стоит обратить внимание на то, что среди прооперированных пациентов в данном исследовании преобладали пациенты с атеросклеротическим генезом расслоения аорты (53%), что само по себе является фактором риска материальной эмболии, и как следствие, возникновения инсультов. Таким образом, применение РПГМ позволяет существенно снизить риск возникновения наиболее грозных осложнений со стороны головного мозга, которые часто приводят к инвалидизации, а зачастую и смерти пациентов.

Мы сознаем, что другие стратегии, особенно АПГМ, не используются в нашем центре рутинно, хотя важно отметить, что данная техника дает удовлетворительные результаты. Данное ретроспективное исследование показало, что использование РПГМ при операциях на восходящем отделе и дуге аорты в условиях ГОК дает приемлемые результаты со стороны ГМ. Частота возникновения ТНН сопоставима с другими сообщениями. РПГМ является эффективной в достижении гипотермии головного мозга, обеспечивая непрерывное охлаждение всей головы, предотвращая попадание воздуха и микроэмболов в циркуляторное русло ГМ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

РПГМ в сочетании с глубокой гипотермией представляет собой простой, удобный и, как показывает практика, эффективный метод протекции ГМ.

В большинстве клинических ситуаций РПГМ может служить методом выбора при вмешательствах на восходящем отделе и дуге аорты во время достаточно длительной остановки кровообращения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Estrera A.L., Miller Ch.C., Taek-Yeon Lee.* Circulation. 2008. Vol. 118. № 14, suppl. 1, September 30. P. 160–166.
2. *Bavaria J.E., Pochettino A., Brinster D.R.* New paradigms and improved results for the surgical treatment of acute type A dissection // Ann. Surg. 2001. Vol. 234. P. 336–342.
3. *Estrera A.L., Garami Z., Miller C.C.* Determination of cerebral blood flow dynamics during retrograde cerebral perfusion using power M-mode transcranial Doppler // Ann. Thorac. Surg. 2003. Vol. 76. P. 704–709.
4. *Ergin M.A., Uysal S., McCullough J.N., Griep R.B.* Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit // Ann. Thorac. Surg. 1999. Vol. 67. P. 1887–1890.
5. *Gega A., Rizzo J.A., Johnson M.H., Tranquilli M.* Straight deep hypothermic arrest: experience in 394 patients supports its effectiveness as a sole means of brain preservation // Ann. Thorac. Surg. 2007. Vol. 84. P. 759–766.
6. *Hagl C., Ergin M.A., Galla J.D.* Neurologic outcome after ascending aorta-aortic arch operations: effect of brain protection technique in high-risk patients // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2001. Vol. 121. P. 1107–1121.
7. *Ehrlich M.P., Fang W.Ch., Grabenwoger M.* // J. of Thorac. and Cardiovasc. Surg. 1999. Vol. 118, № 6. P. 1026–1031.
8. *Okita Y., Minatoya K., Tagusari O., Ando M.* The Annals of Thoracic Surgery 72 (1) July 2001. P. 72–79.
9. *Safi H.J., Letsou G.V., Iliopoulos D.C.* Impact of retrograde cerebral perfusion on ascending aortic and arch aneurism repair // Ann. Thorac. Surg. 1997. Vol. 63. P. 1601–1607.
10. *Sinatra R., Melina G., Pulitani I.* Emergency operation for acute type A aortic dissection: neurologic complications and early mortality // Ann. Thorac. Surg. 2001. Vol. 71. P. 33–38.
11. *Svensson L.G., Crawford E.S., Hess K.R. et al.* Deep hypothermia with circulatory arrest: determinants of stroke and early mortality in 656 patients // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1993. Vol. 106. P. 19–31.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ОПИСАНИЯ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ АЛЛЕЛЕЙ

Логина М.А.<sup>1, 2</sup>, Трофимова Н.П.<sup>1</sup>, Парамонов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр экспертизы качества препаратов крови и исследования фракционирования донорской плазмы Росздравнадзора», Киров

<sup>2</sup> Вятский государственный университет, Киров

В ходе проведения скринингового типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа, по локусам (HLA)-A, B, DRB1, DRB345 у образца № 1758 выявлен новый аллель по локусу A. Использование базовых наборов реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing в сочетании с HARP – A2F98A позволило установить генотип указанного образца – A\*30:01:01, новый аллель A\*25, B\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01.

*Ключевые слова:* HLA, SBT-типирование, новый аллель.

## THE USE OF NEW REAGENT KITS FOR DETECTION AND DESCRIPTION OF ADDITIONAL ALLELES

Loginova M.A.<sup>1, 2</sup>, Trophimova N.P.<sup>1</sup>, Paramonov I.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Volga Regional Medical Center of Expertise Quality of Preparation of Blood and Investigation of Donor Plasma, Киров

<sup>2</sup> Viatsky State University

During the screening typing of recruited volunteers with Volga Federal District for unrelated hematopoietic stem cell registry on the loci (HLA)-A, B, DRB1, DRB345 in sample № 1758 identified a new allele at locus A. The use of basic kit AlleleSEQR HLA-A Sequencing in combination with HARP – A2F98A allowed to determine the genotype of this sample – A\*30:01:01, a new allele A\*25, B\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01.

*Keywords:* HLA, SBT-typing, new allele.

### ВВЕДЕНИЕ

Главный комплекс гистосовместимости расположен у человека на 6-й хромосоме и занимает значительный участок ДНК, включающий около 50 генов [3]. Основной особенностью комплекса является значительная полигенность (наличие нескольких неаллельных близко сцепленных генов, белковые продукты которых сходны в структурном отношении и выполняют идентичные функции) и ярко выраженный полиморфизм – присутствие многих аллельных форм одного и того же гена [3, 11].

Необходимо отметить, что если со времени открытия системы антигенов лейкоцитов человека (HLA – human leukocyte antigen) до середины 80-х годов было открыто менее 150 HLA-специфичнос-

тей [14], то за последующий период их количество приблизилось к 6 500 [5]. Примечательно, что это увеличение произошло как за счет открытия новых генов HLA, так и за счет установления многочисленных аллельных вариантов уже известных генов. В последние годы внедрение в лабораторную практику метода прямого сиквенса генов значительно ускорило процесс открытия новых аллельных вариантов и повысило качество данных о новых аллелях. Так, по данным Комитета по номенклатуре факторов HLA-системы ВОЗ (The WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), на март 2010 года HLA-локусы I класса насчитывали в своем составе 3411 аллелей, II класса – 1222, а по данным на апрель 2011 года, эти цифры уже состав-

*Статья поступила в редакцию 18.04.11 г.*

**Контакты:** Логина Мария Александровна, к. б. н., биолог лаборатории HLA-типирования ФГУ «ПОМЦЭКПКИФДП Росздравнадзора».

**Тел.** (8332) 36-80-77, **e-mail:** loginova-ma@rosplasma.ru



ляют 4946 и 1457 соответственно [5]. Практически в каждом номере официального журнала Европейской ассоциации иммуногенетиков (EFI – European Federation of Immunogenetics) Tissue Antigens появляется два-три сообщения об открытии новых аллелей. Большинство этих сообщений описывают аллели, открытые в Китае [13, 15, 17], Южной Корее [4, 9] и других странах [8, 16], изучение популяций которых началось значительно позже американских и европейских популяций.

В связи с малой изученностью популяционных особенностей генов HLA в России вероятность выявления новых аллелей также велика. Технология SBT, основанная на определении полной нуклеотидной последовательности (секвенировании) ДНК-мишени, обладает максимальной разрешающей способностью и является «золотым стандартом» для выявления и описания новых аллелей [10]. В то же время технология SBT на сегодняшний день является самой дорогой из имеющихся и в связи с этим самой малораспространенной в практике российских HLA-лабораторий [1, 2]. Это значительно усложняет задачу выявления и описания новых аллелей.

В данной работе мы хотим показать возможность использования наборов реагентов AlleleSEQR HLA Sequencing для описания нового аллеля, согласно требованиям международного банка данных HLA-аллелей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК из замороженного образца цельной крови (антикоагулянт – ЭДТА<sub>Na</sub>) проводили методом колоночной фильтрации с помощью станции QIAcube с использованием набора реагентов QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN).

Концентрацию и показатель чистоты ( $A_{260}/A_{280}$ ) препаратов ДНК определяли с помощью спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Средняя концентрация препаратов ДНК (первичное и повторное выделения ДНК для проведения типирования по технологии SSO, первичное и повторное выделения ДНК для проведения типирования по технологии SBT) составляла 20,399 нг/мкл, среднее значение показателя чистоты –  $A_{260}/A_{280} = 1,8073$ .

HLA-типирование по локусам HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-DRB345 (до второго знака) по технологии SSO проводили с использованием наборов реагентов LABType SSO (One Lambda, США) с разрешением метода от среднего к высокому. Интенсивность флуоресценции идентифицировали с использованием системы диагностической Luminex 200 (в модификации LABScan 200 с XY платформой). Обработка данных, полученных на проточном флуориметре Luminex 200, производилась с помощью программного обеспечения HLA Fusion v. 1.2.

HLA-типирование по локусу HLA-A по технологии SBT проводили с использованием набора реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing (Abbott, США). Капиллярный электрофорез осуществляли на четырехкапиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США), полученные данные анализировали в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В июле 2010 года при проведении скринингового HLA-типирования потенциальных доноров гемопоэтических стволовых клеток, проживающих на территории Приволжского федерального округа, был выявлен образец № 1758, имеющий генотип B\*13, 44, DRB1\*03, 09, DRB3\*02, DRB4\*01 и необычный аллельный паттерн по локусу A. Результаты типирования указанного образца по локусу A в программном обеспечении HLA Fusion v. 1.2 представлены на рис. 1.

Из данных, представленных на рис. 1, следует, что программное обеспечение HLA Fusion v. 1.2 не может подобрать возможный аллельный код (Possible Allele Code – NMDP Not Assigned), однако подсказывает, что результат мог бы быть A\*25, 30 (вкладка Pairs), в случае если бы микросфера № 021 была положительной. Из диаграммы сигналов микросфер видно, что сигнал микросферы № 021 настолько низок, что в принципе не может быть ложноотрицательным, это свидетельствует о возможной мутации во втором экзоне локуса A.

Повторное типирование с момента выделения ДНК из образца цельной крови подтвердило полученный результат.

Для получения более подробной информации о локусе A указанного образца использовали базовые наборы реагентов AlleleSEQR. Результаты типирования по локусу A в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ представлены на рис. 2.

Из данных, представленных на рис. 2, следует, что при общем достаточно высоком качестве сиквенса (BCS = 86) в библиотеке HLA-аллелей (IMGT/A 3.3.0 2011-01-14) не найдено полного соответствия. Однако последовательность имеет только одно несовпадение с аллельным вариантом A\*25:01:01, 30:01:01 в основании 269 (экзон 2, позиция 196). Для аллелей A\*25:01:01 и 30:01:01 в этой позиции должен стоять A (аденин), в то время как в полученной консенсусной последовательности образец имеет смесь A и G (сигнал очень четкий в обоих сиквенсах – как в прямом, так и в обратном направлении).

В связи с тем, что при использовании наборов реагентов AlleleSEQR не секвенируется каждая аллель в отдельности, а создается консенсусная по-

следовательность, при определении новой аллели в гетерозиготе с уже известной не всегда получается выявить, какая из аллелей новая, а какая уже известная.

В нашем случае мы сравнили последовательности 2-го экзона аллелей A\*25:01:01 и 30:01:01 в программном обеспечении IMGT/HLA Sequence Alignments, доступном в on-line режиме в глобаль-

ной сети Интернет [6], результаты сравнения представлены на рис. 3. Аллели A\*25:01:01 и 30:01:01 во 2-м экзоне имеют 22 отличающиеся позиции. Наибольший интерес в нашем случае представляет основание в позиции 98, так как в указанной позиции последовательности аллелей различаются, и на выявление этого различия существует праймер для разрешения гетерозиготных неоднозначностей

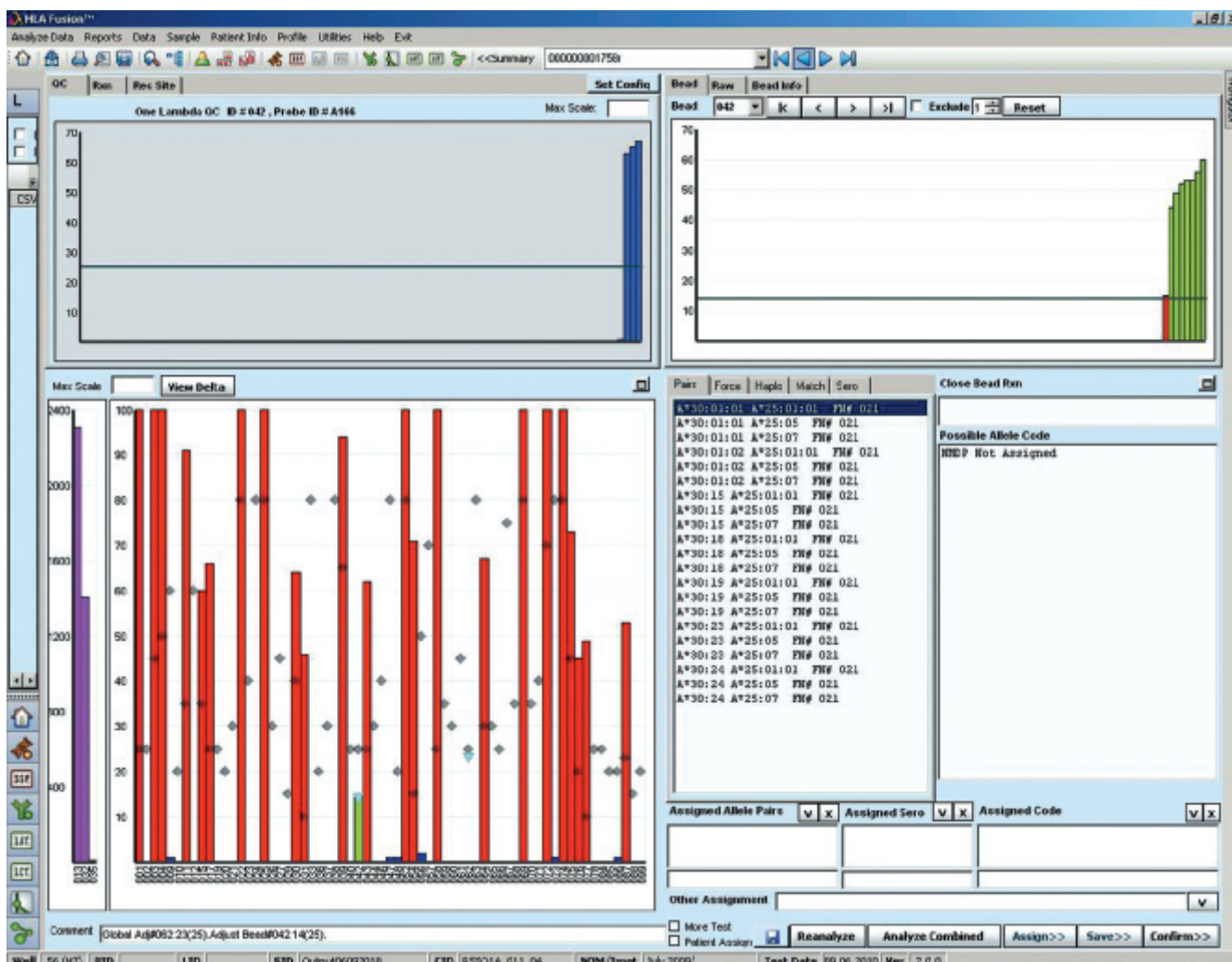


Рис. 1. Результаты типирования образца № 1758 по локусу А в программном обеспечении HLA Fusion v. 1.2

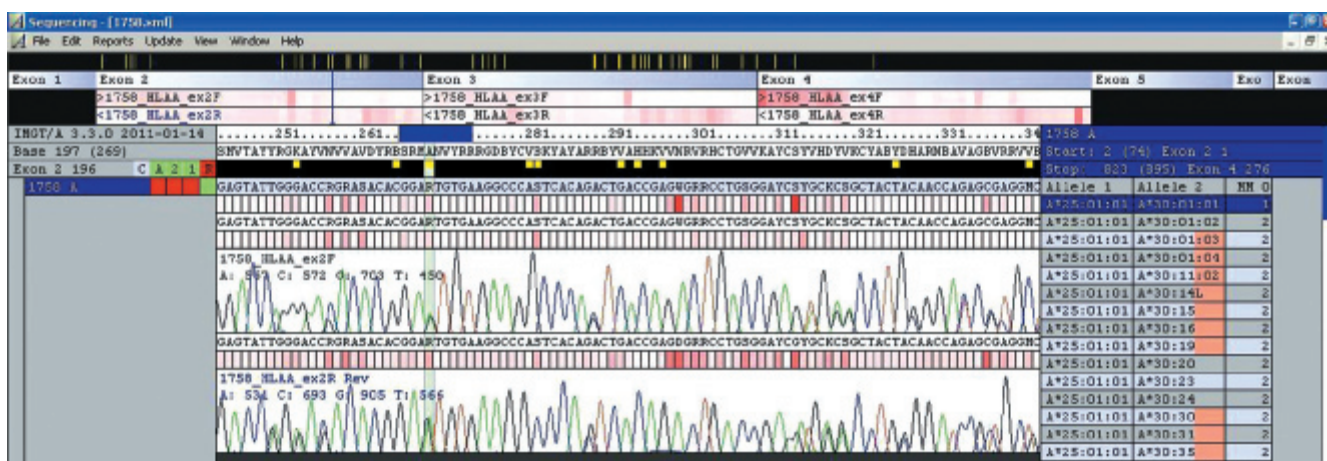


Рис. 2. Результаты типирования образца № 1758 по локусу А в программном обеспечении Assign v. 3.5+

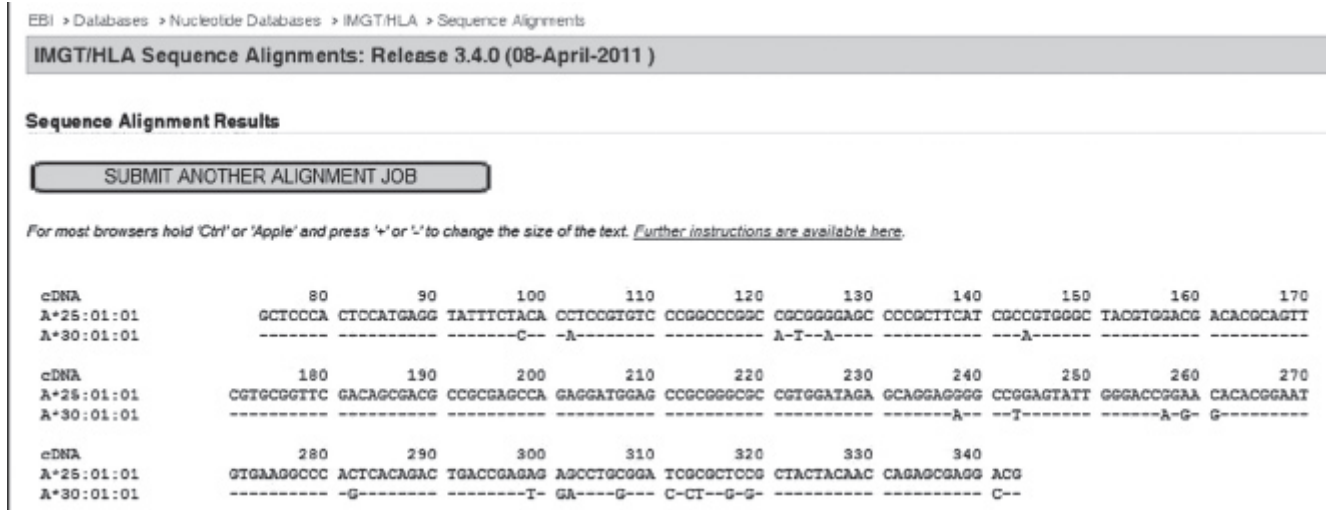


Рис. 3. Результаты сравнения последовательностей 2-го экзона аллелей A\*25:01:01 и A\*30:01:01 в программном обеспечении IMGT/HLA Sequence Alignments

(HARP – Heterozygous ambiguity resolution primer) – A2F98A. То есть при постановке секвенирующей ПЦР аллель A\*30:01:01, имеющий в позиции 98 – С (цитозин) не будет амплифицироваться с праймером A2F98A, а соответственно аллель A\*25:01:01, имеющий в позиции 98 – А (аденин) – будет.

Ретроспективный анализ сиквенса с праймером A2F98A в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ показал, что в позиции 269 стоит G (гуанин), что свидетельствует о том, что образец имеет аллель A\*30:01:01 и новый аллельный вариант A\*25, отличающийся от аллеля A\*25:01:01 в позиции 269, где вместо А (аденин) стоит G (гуанин). И 66 кодон будет выглядеть как AGT (=серин), вместо AAT (=аспарагин). Обе аминокислоты являются полярными с незаряженными боковыми цепями, поэтому возможно, что эта замена не вызовет глобальных структурных изменений молекулы белка.

Повторное типирование по технологии SBT с момента выделения ДНК из образца цельной крови подтвердило полученный результат.

Подводя итог всему вышесказанному, делаем вывод, что полученные данные удовлетворяют требованиям для официального заявления о новом аллеле [12]:

- 1) секвенирование выполнено в обоих направлениях (прямые и обратные праймеры на 2, 3, 4-й экзон в базовых наборе реагентов AlleleSEQR HLA-A Sequencing);
- 2) выполнено два повторных типирования ДНК, выделенной из биоматериала;
- 3) последовательность 2-го экзона нового аллеля секвенирована отдельно от второго уже известного аллеля (сиквенс, полученный с использованием HARP – A2F98A);
- 4) при формировании отчета в программном обеспечении Assign SBT v. 3.5+ последовательность

создается с исключением последовательности праймеров;

- 5) результаты типирования подтверждены набором реагентов, основанных на технологии SSO;
- 6) представлен полный HLA-A, -B, -DRB1 генотип изученного образца.

Дальнейшую работу целесообразно направить на составление официальной заявки на получение регистрационного номера нового аллеля в международный банк данных – GenBank [7].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Абрамов В.Ю., Гулидова О.В., Лебедева Л.Л. и др.* Итоги межлабораторной программы контроля качества тканевого типирования // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. XII, № 3. С. 89–93.
2. *Логонова М.А., Парамонов И.В., Трофимова Н.П.* Неоднозначности локусов при проведении HLA-типирования по технологии SSO и попытка их разрешения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. Т. 12, № 4. С. 33–38.
3. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. М.: Мир, 2000.
4. *Cha C.H., Ko S.Y., Oh H.B. et al.* HLA-C\*03:93, a novel allele identified by sequence-based typing // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 3. P. 266–267.
5. <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
6. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/align.html>.
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank.html>.
8. *Jakubauskas A., Vilkeviciene R., Juskevicius D., Griskevicius L.* Identification of a novel HLA-B allele, B\*56:31, by sequence-based typing in a Lithuanian individual // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 3. P. 262.
9. *Ko S.Y., Oh H.B., Heo Y.S. et al.* HLA-DRB1\*13:99, a novel HLA-DRB1\*13 allele identified by sequence-based typing // Tissue Antigens. 2011. Vol. 77, № 4. P. 343.

10. *Laboratory Manual American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. 4th edition.
11. *Mackay I., Rosen F.S.* The HLA system // *The New England Journal of Medicine*. 2000. Vol. 343, № 11. P. 782–787.
12. *Marsh S.G.E., Albert E.D., Bodmer W.F. et al.* Nomenclature for factors of the HLA system, 2010 // *Tissue Antigens*. 2010. Vol. 75, № 4.
13. *Qu J.H., Li J., Chen H. et al.* Identification of nine novel HLA-DRB1 alleles, HLA-DRB1\*04:91, DRB1\*07:18, DRB1\*11:01:12, DRB1\*12:02:05, DRB1\*12:22, DRB1\*12:23, DRB1\*13:100, DRB1\*15:45, and DRB1\*15:46 by polymerase chain reaction – sequence based typing // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 3. P. 264–265.
14. *Rodey G.E.* HLA Beyond Tears. – 2000.
15. *Tang Zh.H., Li G.Y., Wang M.L. et al.* Identification of a novel HLA-B\*35:42:02 allele in a Chinese bone marrow donor // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 4. P. 341.
16. *Veiga T.R., Rampim G.F., Gerbase-DeLima M.* Identification of a novel HLA-B\*52 allele in a Brazilian individual: B\*52:21 // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 4. P. 342.
17. *Zhu F.M., Zhang W., Wang W. et al.* Characterization of a novel HLA allele, HLA-B\*40:128, in a Chinese individual // *Tissue Antigens*. 2011. Vol. 77, № 3. P. 260.

*Авторы благодарят компанию ООО «Эбботт Лэбораториз» в лице сотрудников Екатерины Старцевой и Льва Оловянного за оказание технической поддержки при работе с программным обеспечением Assign SBT v. 3.5+.*

## ДВУХФАЗНАЯ ДИНАМИКА ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) КОСТНОГО МОЗГА НА ПЕЧЕНЬ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ФИБРОЗИРУЮЩЕГО ГЕПАТИТА

Онищенко Н.А.<sup>1</sup>, Люндуп А.В.<sup>1</sup>, Газизов И.М.<sup>2</sup>, Деев Р.В.<sup>3</sup>, Шагидулин М.Ю.<sup>1</sup>, Крашенинников М.Е.<sup>1</sup>, Аврамов П.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

<sup>2</sup> Казанский государственный медицинский университет, Казань

<sup>3</sup> Институт стволовых клеток человека, Москва

На модели хронического фиброзирующего гепатита у крыс (n = 75) изучена динамика развития фибролитического действия ММСК костного мозга (КМ) при однократном и двукратном применении этих клеток на раннем этапе фиброзирования печени.

При динамическом морфометрическом изучении в течение 90 суток площади фиброзной ткани в печени, экспрессии маркеров активированных звездчатых клеток (десмин,  $\alpha$ -ГМА) и маркеров клеточного апоптоза (каспаза-3, каспаза-9) установлены две фазы в развитии фибролитического действия ММСК КМ. Показано, что развитие фибролитического эффекта включает фазу первоначального усиления фиброза, которая сменяется фазой усиления фибролитических процессов в печени. Установлено, что двухфазная динамика наиболее выражена при двукратном применении ММСК КМ.

*Ключевые слова: хронический фиброзирующий гепатит, клетки костного мозга.*

## TWO-PHASE DYNAMICS OF BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MMSC) ACTION ON LIVER AT MODELING OF FIBROTIC HEPATITIS

Onishchenko N.A.<sup>1</sup>, Lyundup A.V.<sup>1</sup>, Gazizov I.M.<sup>2</sup>, Deev R.V.<sup>3</sup>, Shagidulin M.Y.<sup>1</sup>, Krashennnikov M.E.<sup>1</sup>, Avramov P.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

<sup>2</sup> Kazan State Medical University, Kazan

<sup>3</sup> Human Stem Cells Institute, Moscow

Under the modeling of chronic fibrousing hepatitis in rats (n = 75) the dynamics of fibrolytic effect of bone marrow MMSC was examined after one or two-time infusion of these cells at the early stage of liver fibrosis. By dynamic measuring of liver fibrotic area and the expression of activated stellate cell markers (desmin,  $\alpha$ -SMA) and markers of cell apoptosis (caspase-3 and caspase-9) within 90 days two phases of the development of bone marrow MMSC fibrolytic effect were found.

It is shown that the development of fibrolytic effect includes the primary phase of intensification of fibrosis, which is followed by the phase of enhanced fibrolytic process in the liver. It was determined that the two-phase dynamics of liver regeneration was more intensive after two-time infusion of bone marrow MMSC.

*Key words: chronic fibrotic hepatitis, bone marrow cells, cell therapy.*

Статья поступила в редакцию 23.05.11 г.

**Контакты:** Онищенко Нина Андреевна, д. м. н., профессор, зав. лабораторией биотехнологии стволовых клеток.

Тел. 8 (499) 190-45-31, e-mail: illak@mail.ru

Принято считать, что цирроз печени является необратимым патологическим состоянием. Однако экспериментальные и клинические наблюдения последних лет убеждают в возможности морфологического регресса склеротических изменений в печени путем принудительного перепрограммирования процессов фибротической регенерации за счет активного включения в него интегративных систем регуляции с помощью тканевых, клеточных и пептидных методов терапии [7, 13, 15].

Особенно важную роль в индукции восстановительной регенерации печени играют клетки КМ, которые, как полагают, вместе с синусоидальными клетками печени образуют единую функциональную систему регуляции морфогенеза здоровой и поврежденной печени [18, 20, 12].

Показано, что среди клеток КМ регуляторные функции наиболее выражены у мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) [6].

Эти клетки с помощью паракринных механизмов нейтрализуют действие провоспалительных цитокинов, ослабляют выраженность воспалительного ответа, тормозят дифференцировку звездчатых клеток печени в активированные миофибробласты, продуцирующие коллагены [2, 4], а также индуцируют их апоптоз за счет снижения экспрессии тканевых ингибиторов матриксных протеиназ и сопряженной активации матриксных металлопротеиназ [9].

Общим итогом применения ММСК КМ становится снижение процессов фиброобразования печени при ее повреждении. Однако не все исследователи признают фибролитический эффект клеток КМ и их способность индуцировать апоптоз звездчатых клеток печени при развивающемся фиброзе [17, 3].

Более того, появились работы о том, что клетки КМ сами вносят вклад в развитие фиброза печени, так как существенно увеличивают в ней популяцию звездчатых клеток [10, 5].

Противоречивость мнений о регулирующем воздействии клеток КМ, в частности ММСК, на процессы фиброгенеза в печени послужила основанием для проведения настоящего исследования.

Целью исследования явилось динамическое изучение особенностей развития фиброгенеза в печени при хроническом фиброзирующем гепатите без и на фоне применения ММСК КМ здоровых доноров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 75 крысах-самцах породы Вистар, содержащихся в виварии на смешанном рационе питания со свободным доступом к воде. У всех этих крыс моделировали хронический фиброзирующий гепатит (ХФГ) путем подкожных инъекций 60%  $CCl_4$  на персиковом масле по отработанной схеме в течение 6 недель. Суммарная кур-

совая доза чистого  $CCl_4$  составила 3,5 мл/100 г веса животного. После завершения затравки все крысы были разделены на 3 группы (по 25 в каждой группе) для дальнейшего изучения особенностей корригирования процессов фиброобразования печени путем внутривенного введения (в хвостовую вену) ММСК КМ. В I группе животным с ХФГ ММСК КМ вводили в дозе  $2,5 \times 10^6$  клеток однократно на 3-и сутки после моделирования ХФГ. Во II группе животным с ХФГ ММСК КМ вводили дважды на ранней стадии моделирования ХФГ (на 3-и и 10-е сутки) в общей дозе  $5 \times 10^6$  клеток. III группа служила контролем (спонтанная регенерация печени после моделирования ХФГ без клеточной терапии). Донорами ММСК КМ служили аллогенные здоровые доноры (крысы породы Вистар), так как у аутологичных клеток КМ после затравки  $CCl_4$  было выявлено резкое и пролонгированное снижение адгезивной и популяционной активности, причем первичная культура содержала большое количество дебриса (погибших клеток). В экспериментах использовали ММСК 1-го и 2-го пассажей; гомогенность культуры ММСК аллогенного КМ крыс была подтверждена иммуногистохимически с помощью кроличьих моноклональных антител к коллагену 1-го типа («Имтек», Россия). Во всех группах экспериментов в течение 3 месяцев после моделирования ХФГ проводили контроль динамики изменения биохимических показателей крови (АЛТ, АСТ, ЩФ) и гистологических срезов ткани печени. Проводили морфометрическую оценку динамики изменений площади образующейся соединительной ткани (окраска по Маллори), а также иммуногистохимическое выявление динамики изменения общего количества активированных звездчатых клеток, предопределяющих развитие процессов фиброобразования печени, и общего количества клеток печени, подвергшихся процессам обратимого и необратимого апоптоза.

Иммуногистохимические исследования проводили стрептавидин-биотинным методом с использованием антител к соответствующим антигенам. Для выявления активированных звездчатых клеток проводили окраску моноклональными антителами («Дако», Дания) к десмину – белку промежуточных филаментов, и к альфа-гладкомышечному актину ( $\alpha$ -ГМА) антителами («Абкам», США) – маркеру миофибробластоидной дифференцировки. Для оценки выраженности апоптоза клеток использовали антитела («Абкам», США) к каспазе-3 – маркеру необратимого расщепления компонентов клетки, и к каспазе-9 – маркеру обратимого апоптоза.

Результаты работы были подвергнуты статистической обработке на ПК с использованием статистического пакета Biostat; достоверность различий между сравниваемыми группами опытов оценивали по критерию t-Стьюдента с учетом поправки Бонферрони.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

По окончании моделирования ХФГ у выживших животных (гибель составила 20%) отмечались клинические признаки токсического повреждения печени: снижение двигательной активности и массы тела, частичное выпадение волосяного покрова. Продолжая динамическое наблюдение за клиническим состоянием этих животных, мы отметили более быструю и более выраженную нормализацию функции гепатоцитов у животных I и II групп, получивших терапию ММСК, особенно в группе с двукратным применением клеток (II группа) по сравнению с контролем (III группа). Результаты исследования динамики восстановления уровня цитолитических ферментов печени в сыворотке крови представлены в таблице. Из таблицы видно, что нормализация АлАТ во II группе наступала уже на 14-е сутки; АсАТ и ЩФ – на 21-е сутки.

При гистологическом исследовании уже на самых ранних сроках после завершения моделирования ХФГ (а именно на 3-и сутки) в ткани печени возникали отчетливые структурные изменения: наряду с жировой дистрофией гепатоцитов и увеличением количества двуядерных гепатоцитов возникали участки ложных долек и происходило формирование внутريدолькового фиброза за счет врастания коллагеновых волокон между гепатоцитами. Однако на 14-е сутки после моделирования ХФГ в печени животных разных экспериментальных групп возникли неожиданные для нас структурные изменения. В III, контрольной группе (без применения ММСК КМ) сохранялись признаки жировой дистрофии гепатоцитов, но структурные признаки фиброобразования печени практически полностью нивелировались (рис. 1, а).

В то же время в опытах I группы (с однократной трансплантацией ММСК КМ на 3-и сутки) и в

опытах II группы (с двукратной трансплантацией ММСК КМ на 3-и и 10-е сутки) на фоне крупнокапельной жировой дистрофии гепатоцитов происходило отчетливое разрастание соединительной ткани и образование ложных долек (рис. 1, б и в), особенно выраженное в печени крыс II группы при двукратном введении ММСК КМ. При дальнейшем динамическом изучении изменений площади фиброзной ткани в срезах печени разных групп (начиная с 14-х суток) нами были получены данные, показывающие, что в I и особенно во II группе после первоначального усиления процессов фиброобразования в печени, в отдаленные сроки (на 60-е и 90-е сутки после моделирования ХФГ) в печени развивались отчетливо выраженные фибролитические процессы (рис. 2).

Мы отметили также, что в III, контрольной группе с 14-х по 28-е сутки процессы фиброобразования в ткани печени не прогрессировали (стабилизация за счет нативных резервов тканевой адаптации), но затем с 28-х до 60-х и 90-х суток процессы фиброобразования резко активизировались, указывая на развитие дефицита внутритканевых резервов адаптации к токсическому повреждению. В то же время в группах с применением ММСК развитие процессов фиброобразования печени было не столь выраженным в I группе и практически отсутствовало во II группе при двукратном применении ММСК КМ (рис. 2). Двухфазная динамика развития фибролитического действия ММСК при ХФГ позволила нам признать, что клеточная терапия, по сути, представляет собой вариант адаптивной терапии, а ММСК КМ при этом выступают в роли достаточно эффективного адаптогена. Как всякий патогенетически значимый адаптоген, ММСК КМ, будучи примененными в достаточной дозе (при двукратном применении) и в условиях, когда еще сохранены (не израсходованы)

Таблица

**Динамика изменения содержания цитолитических ферментов в сыворотке крови при моделировании ХФГ без и на фоне применения ММСК КМ**

Сутки	АлАТ (норма до 40 ед./мл)			АсАТ (норма до 60 ед./мл)			ЩФ (норма до 300 ед./мл)		
	контроль ССІ <sub>4</sub> III гр.	ССІ <sub>4</sub> + 2,5 млн ММСК I гр.	ССІ <sub>4</sub> + 5 млн ММСК II гр.	контроль ССІ <sub>4</sub> III гр.	ССІ <sub>4</sub> + 2,5 млн ММСК I гр.	ССІ <sub>4</sub> + 5 млн ММСК II гр.	контроль ССІ <sub>4</sub> III гр.	ССІ <sub>4</sub> + 2,5 млн ММСК I гр.	ССІ <sub>4</sub> + 5 млн ММСК II гр.
7	183,1 ± 15,3*	#70,24 ± 8,9*	#70,24 ± 8,9*	198,3 ± 19,6*	148,14 ± 20,5*	148,14 ± 20,5*	1484,8 ± 65,0*	519 ± 20,2*	519 ± 34,4*
14	58,3 ± 5,3*	51,21 ± 5,1	31,66 ± 7,5	147,1 ± 13,3*	95,91 ± 14,4*	#89,26 ± 13,2*	399,3 ± 33,4	#509 ± 17,3*	400,4 ± 43,3
21	45,65 ± 4,2	41,73 ± 4,2	17,02 ± 7,2	147,5 ± 12,8*	#63,81 ± 7,6	#42 ± 3,0	481,5 ± 21,1*	#678,73 ± 19,9*	337,5 ± 33,3
28	42,2 ± 5,1	22,1 ± 3,7	40,45 ± 4,0	54,1 ± 6,0	66,4 ± 7,8	13 ± 7,7	420,1 ± 15,2*	#126 ± 34,8	#266 ± 27

\* – p < 0,05 по сравнению с нормой (интактные крысы).

# – p < 0,05 по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

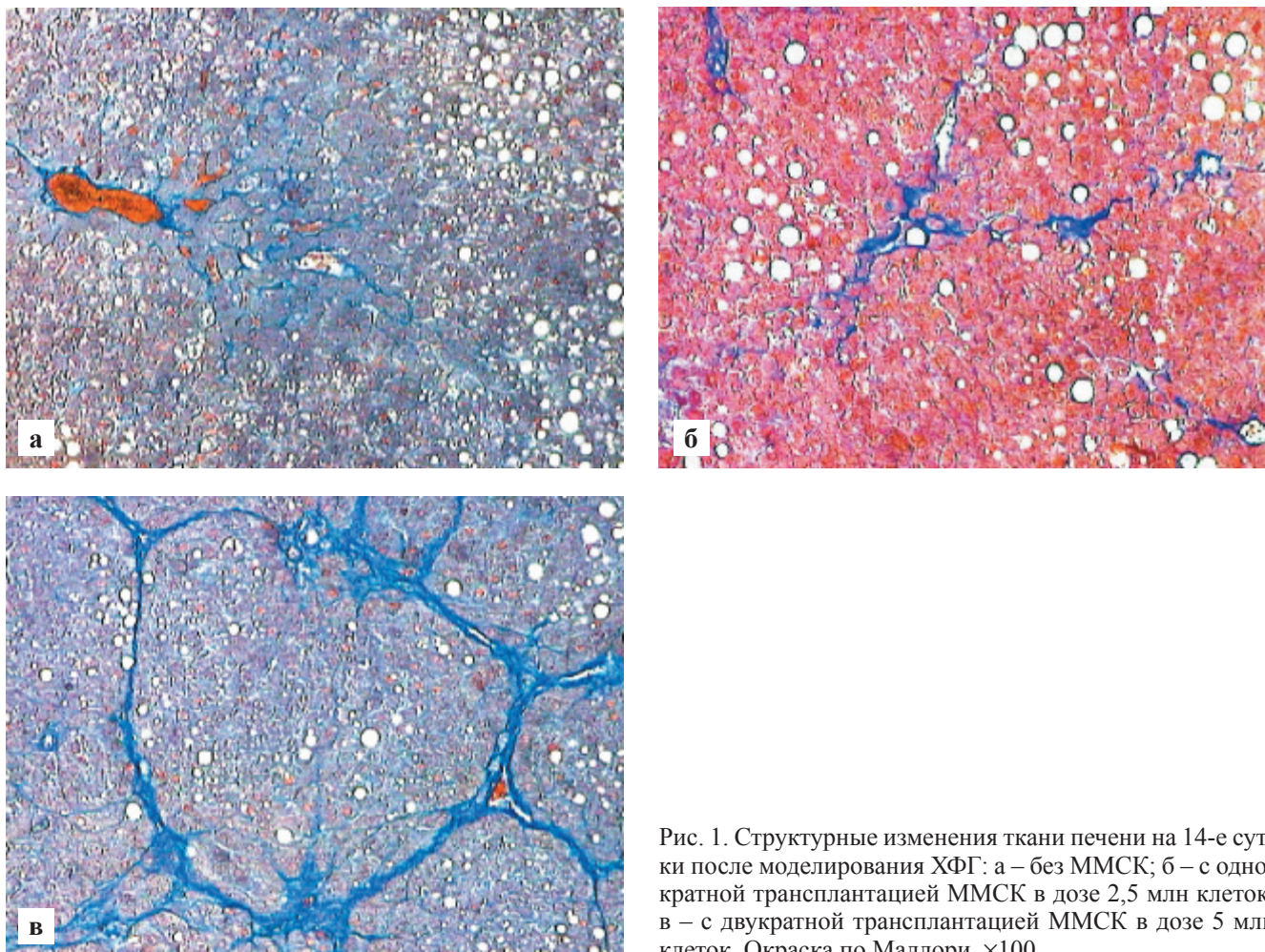
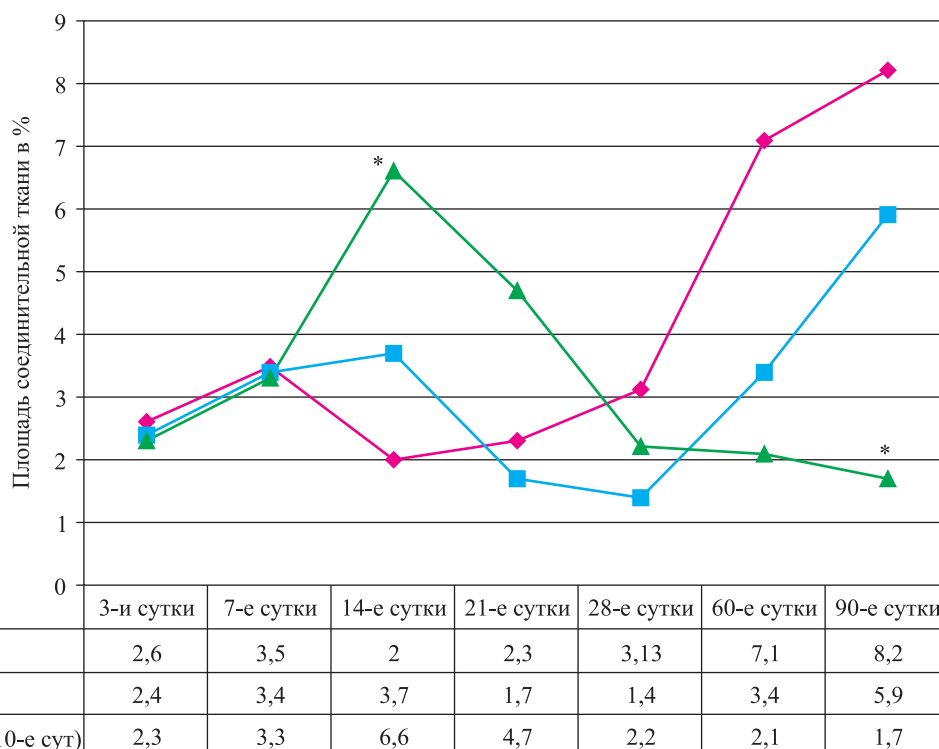


Рис. 1. Структурные изменения ткани печени на 14-е сутки после моделирования ХФГ: а – без ММСК; б – с однократной трансплантацией ММСК в дозе 2,5 млн клеток; в – с двукратной трансплантацией ММСК в дозе 5 млн клеток. Окраска по Маллори.  $\times 100$



\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 2. Динамика изменения площади фиброзной ткани в печени, при моделировании токсического ХФГ без и с последующей трансплантацией ММСК КМ на ранних сроках развития ХФГ (норма площади соединительной ткани 1,4%)



внутриклеточные резервы адаптации (на раннем этапе развития ХФГ), способны осуществить энергозависимую перестройку процессов фиброзирующей регенерации, перепрограммировав ее на индукцию восстановительной регенерации, при которой в ткани печени нивелируются процессы фиброгенеза.

Действительно, на 60-е и особенно на 90-е сутки после завершения моделирования ХФГ в группе с двукратной трансплантацией ММСК (рис. 3) соединительная ткань в печени практически не выявляется (в том числе в пространствах Диссе): в группе с однократной трансплантацией ММСК в печень (рис. 3, б) отмечалось развитие соединительной ткани, но в меньшей степени по сравнению с контролем. В контрольной группе (рис. 3, а) к 60-м и 90-м суткам архитектоника ткани печени оказывалась резко нарушенной: был выражен цирроз и фиброз, в том числе внутридольковый с «капилляризацией» синусоидов, которые косвенно свидетельствуют о глубоких нарушениях структуры и функции непаренхиматозных клеток печени, и прежде всего звездчатых клеток. Этим клеткам, по современным представлениям, отводят роль ство-

ловых клеток печени наряду с овальными клетками [1, 11], а в поврежденной печени – роль продуцентов коллагена и индукторов фиброгенеза за счет развивающейся в них миофибробластоподобной трансдифференцировки [8, 14, 16].

Выраженность утраты стволовых функций у звездчатых клеток в процессе развития ХФГ и после применения ММСК КМ оценивали по количеству выявленных в печени активированных звездчатых клеток, которые экспрессируют десмин и  $\alpha$ -ГМА – маркеры миофибробластоподобного фенотипа этих клеток. Оказалось, что экспрессия десмина (рис. 4, а) и  $\alpha$ -ГМА (рис. 4, б) была более выраженной в группе с двукратным введением ММСК на ранних сроках развития ХФГ, тогда как к концу наблюдения (на 60-е сутки) экспрессия этих маркеров становилась достоверно сниженной по сравнению с контролем. Такая динамика экспрессии маркеров активированных звездчатых клеток в опытах с введением ММСК указывает на достоверное снижение в печени количества клеток, продуцирующих соединительную (фиброзную) ткань и соответствует вышесприведенным результатам наших опытов о

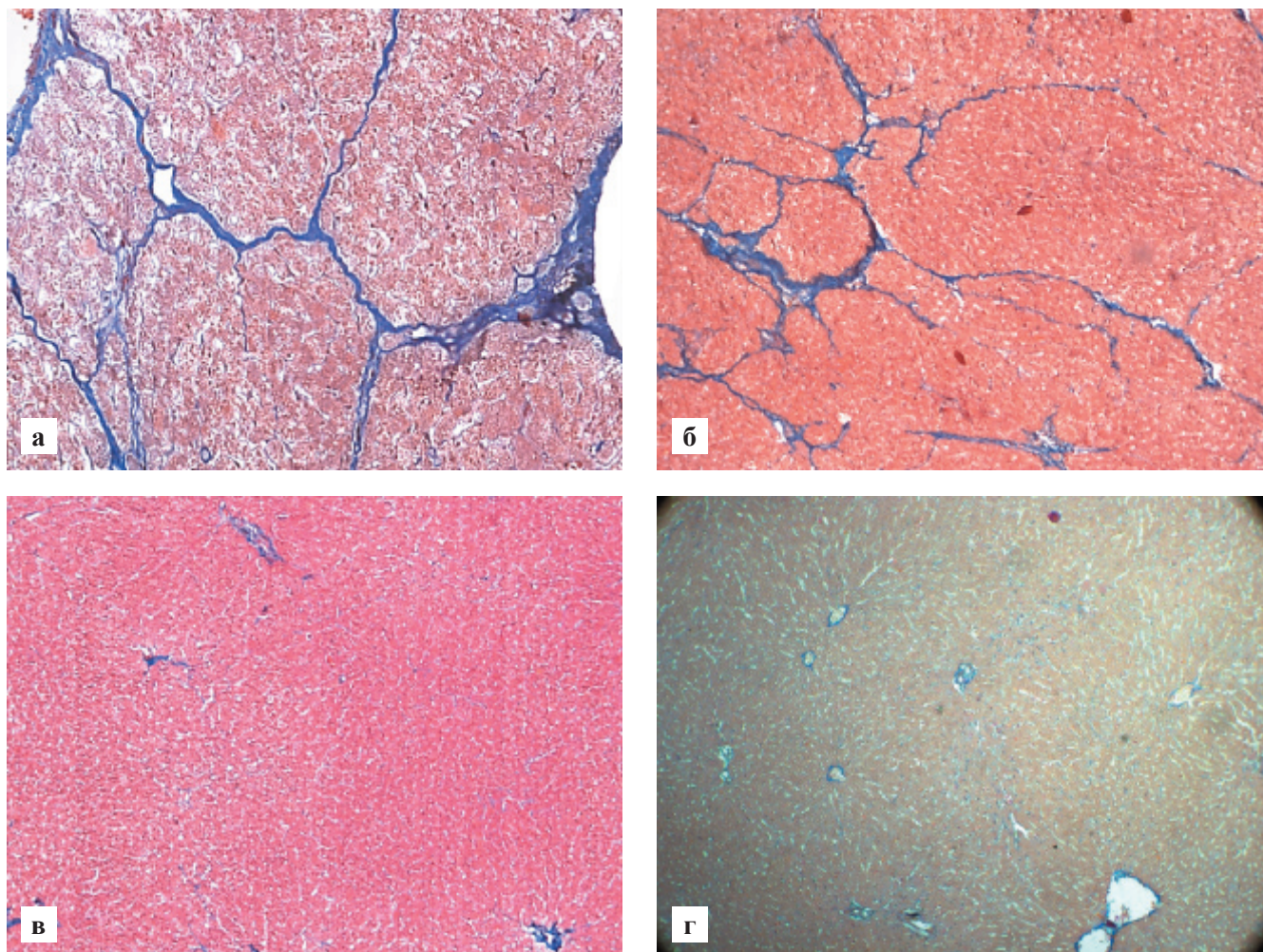


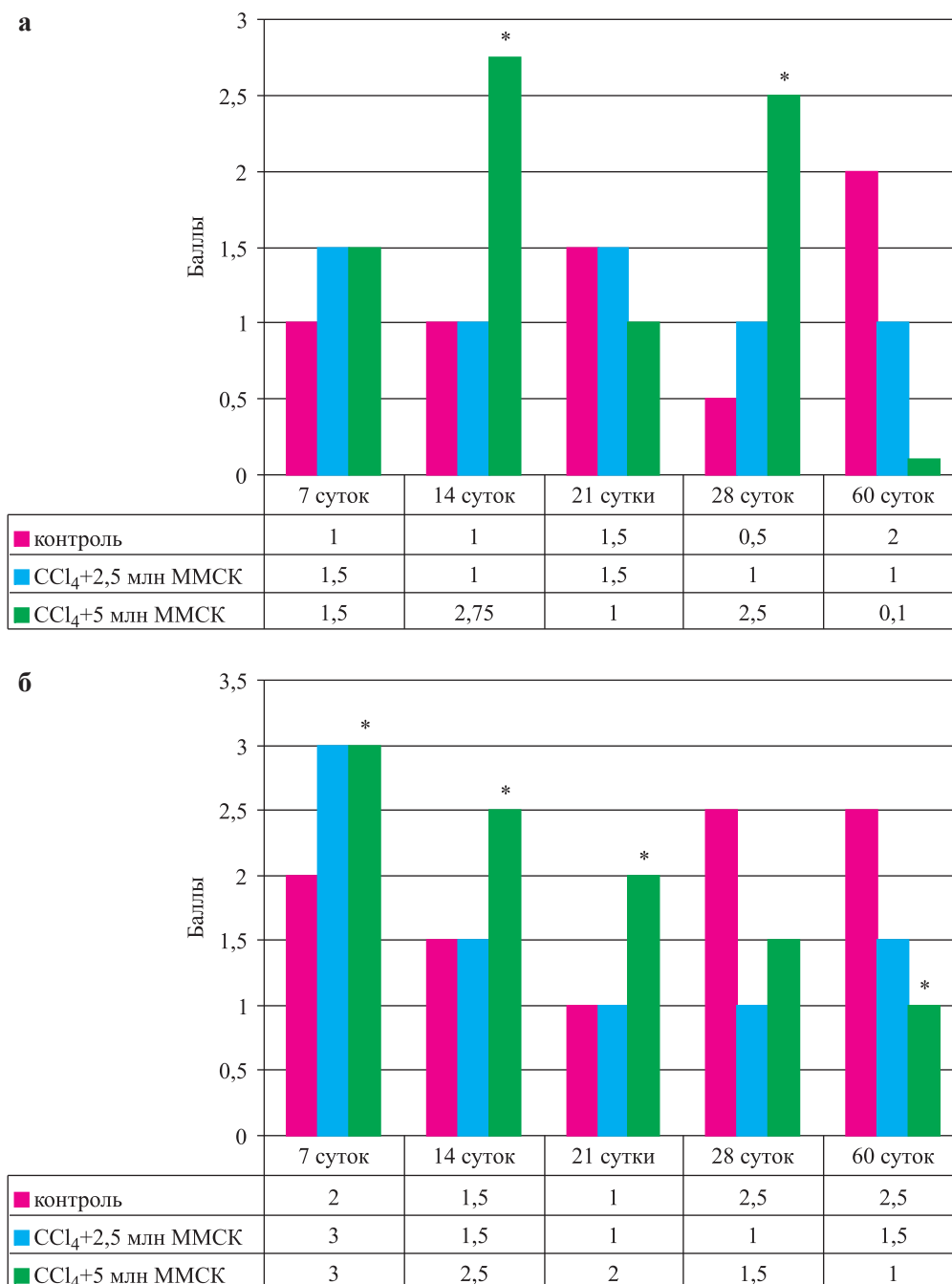
Рис. 3. Структурные изменения ткани печени на 90-е сутки после моделирования ХФГ: а – без ММСК; б – с однократной трансплантацией ММСК в дозе 2,5 млн клеток; в – с двукратной трансплантацией ММСК в дозе 5 млн клеток; г – нормальная ткань печени. Окраска по Маллори.  $\times 100$

достоверном снижении площади фиброзной ткани к 60-м и 90-м суткам наблюдения при двукратном введении ММСК (рис. 2).

Снижение количества активированных звездчатых клеток в отдаленные сроки наблюдения может быть обусловлено прежде всего усилением их апоптоза. Проведенное нами изучение в динамике процессов клеточного апоптоза показало, что при ХФГ и на фоне применения ММСК в печени первоначально усиливаются процессы как необратимого (каспаза-3), так и обратимого, т. е. адаптационно-зависимого (каспаза-9) апоптоза (рис. 5).

Важно, однако, отметить, что на 14, 28 и 60-е сутки содержание клеток, экспрессирующих каспазу-9 во II группе, где проводилось двукратное применение ММСК, было при всех сроках выше, чем в контрольной группе (рис. 5, а), и соотношение величин этого показателя (в баллах) – 1,25; 2,5 и 2,0 в сравниваемых группах (II и III) на указанные сроки свидетельствовало о продолжающемся развитии в печени адаптационных обратимых перестроек в группе с ММСК даже в отдаленные сроки.

Между тем отношение содержания в печени клеток, экспрессирующих каспазу-3 – маркер необра-



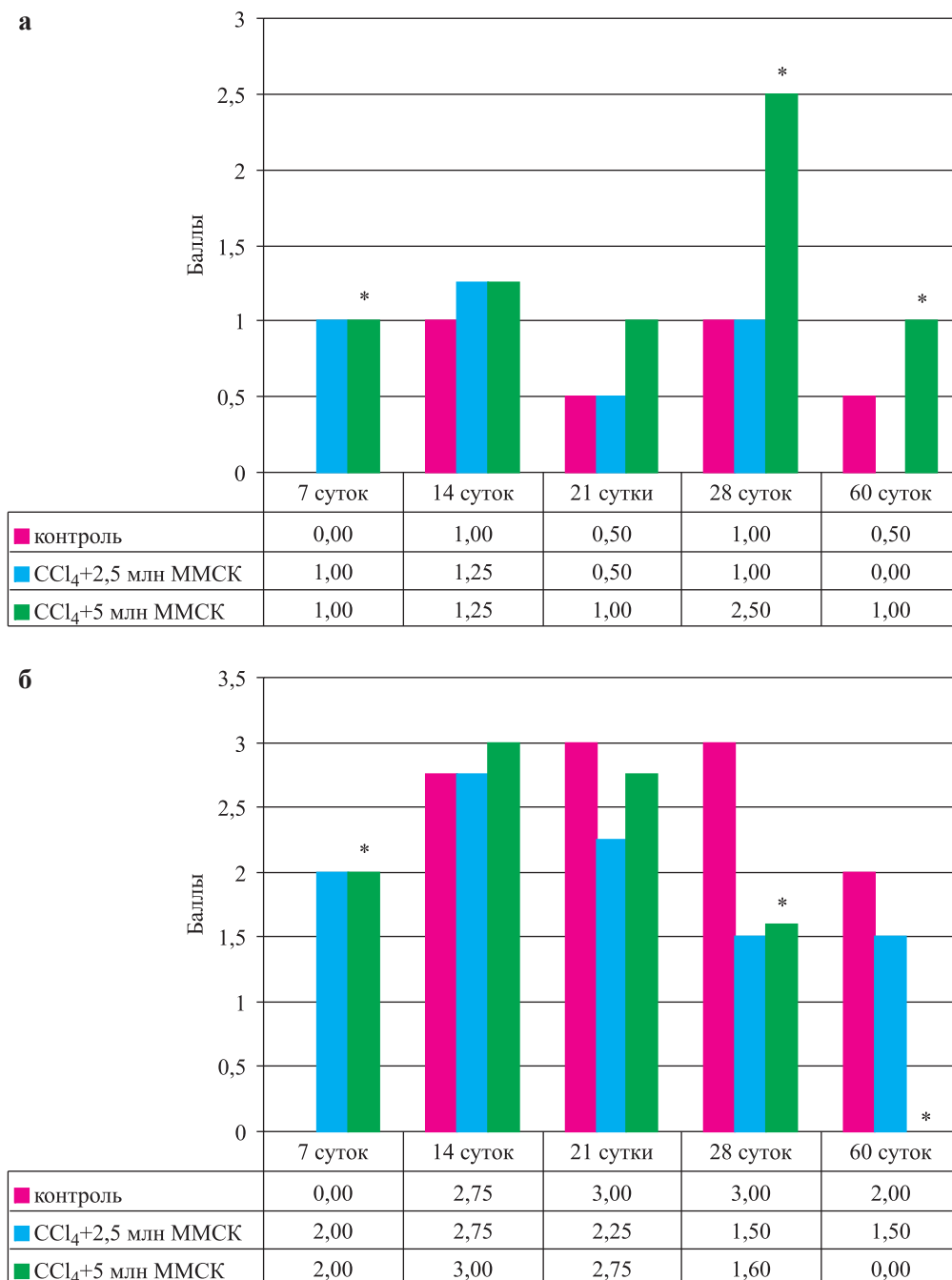
\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 4. Динамика изменения количества активированных звездчатых клеток в ткани печени, экспрессирующих десмин (а) и альфа-гладкомышечный актин (б) при моделировании ХФГ и введении ММСК КМ для коррекции ХГ

тимой гибели клеток, в те же временные интервалы (рис. 5, б) и в тех же группах составило: 1,1; 0,5 и 0, что указывало на снижение и даже полное нивелирование необратимого апоптоза клеток печени в отдаленные сроки после применения ММСК.

Таким образом, при моделировании ХФГ и применении ММСК КМ в достаточной дозе (двукратное применение) на раннем этапе фиброобразования печени выявлена двухфазная динамика развития фибролитического действия ММСК. Сначала в печени под влиянием ММСК индуцируются адаптивные

процессы для перепрограммирования регенерационных процессов с фиброзирующего типа регенерации на восстановительную регенерацию. Адаптивные процессы всегда сопровождаются усилением энергозатрат и развитием энергодефицита, что находит отражение в усилении деструктивных процессов на раннем этапе после применения ММСК: увеличение площади фиброобразования печени, увеличение экспрессии маркеров фибробластической дифференцировки звездчатых клеток – десмина и  $\alpha$ -ГМА, увеличение экспрессии маркеров обрати-



\* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем на тот же срок наблюдения.

Рис. 5. Динамика изменения количества клеток печени, экспрессирующих каспазу-9 (а) и каспазу-3 (б), при введении ММСК КМ для коррекции ХФГ. Отсутствие показателя в отдельные временные интервалы указывает на отсутствие иммуногистохимической реакции

мого (каспаза-9) и необратимого (каспаза-3) апоптоза. Перераспределение внутриорганных и системных резервов адаптации с помощью ММСК КМ на раннем этапе развития ХФГ способствует осуществлению перепрограммирования процессов регенерации в печени, и результатом этого становится отчетливо выраженный фибролитический эффект в отдаленном периоде, а также снижение количества активированных звездчатых клеток (снижение десмина и  $\alpha$ -ГМА) и клеток в состоянии необратимого апоптоза. Достаточно высокий уровень экспрессии каспазы-9 в течение всего срока наблюдения заставляет признать важную роль адаптационных процессов для обеспечения устойчивой восстановительной регенерации печени.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гумерова А.А., Киясов А.П. Могут ли перисинуоидальные клетки быть региональными стволовыми (прогениторными) клетками печени? // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5 (1). С. 33–40.
2. Aziz M.T.A., Atta H.M., Mahfouz S. et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis // Clin. Biochem. 2007. Vol. 40. P. 893–899.
3. Bonzo L.V., Ferrero I., Cravanzola C. et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential // Gut. 2008. Vol. 57. P. 223–231.
4. Dai L.J., Li H.Y. et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis // Stem. Cell Res. 2009. Vol. 2 (1). P. 16–25.
5. Dalakas E., Newsome P.N., Boyle S. et al. Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans // Stem. Cells Dev. 2010 Sep. Vol. 19 (9). P. 1417–1425.
6. Dugast A., Vanhove B. Immune regulation by non-lymphoid cells in transplantation // Clin. Exp. Immunol. 2009 April. Vol. 156 (1). P. 25–34.
7. Friedman S.L. Reversibility of hepatic fibrosis and cirrhosis – is it all hype? // Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol. 2007. Vol. 4. P. 236–237.
8. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88. P. 125–172.
9. Higashiyama R., Inagaki Y., Hong Y.Y. et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice // Hepatology. 2007. Vol. 45. P. 213–222.
10. Higashiyama R., Moro T., Nakao S. et al. Negligible contribution of bone marrow-derived cells to collagen production during hepatic fibrogenesis in mice // Gastroenterology. 2009 Oct. Vol. 137 (4). P. 1459–1466.
11. Kordes C., Sawitza I., Müller-Marbach A. et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007 Jan 12. Vol. 352 (2). 417 p.
12. Kuo T.K., Hung S. et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success for using bone marrow mesenchymal stem cells // Gastroenterology. 2008. Vol. 134. P. 2111–2121.
13. Parekkadan B., Poll D., Suganuma K. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure // PLoS One. 2007. Vol. 2 (9). P. e941.
14. Parola M., Marra F., Pinzani M. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: emerging concepts in a rapidly moving scenario // Mol. Aspects. Med. 2008. Vol. 29. P. 58–66.
15. Poll D., Parekkadan B., Cho C.H. et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo* // Hepatology. 2008. Vol. 47. P. 1634–1643.
16. Povero D., Busletta C., Novo E. et al. Liver fibrosis: a dynamic and potentially reversible process // Histol. Histopathol. 2010 Aug. Vol. 25 (8). P. 1075–1091.
17. Russo F.P., Alison M.R., Bigger B.W. et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis // Gastroenterology. 2006. Vol. 130. P. 1807–1821.
18. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N. et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice // Hepatology. 2004. Vol. 40. P. 1304–1311.
19. Yagi H., Soto-Gutierrez A., Navarro-Alvarez N. et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1 // Mol. Ther. 2010 Oct. Vol. 18 (10). P. 1857–1864.
20. Yu Y., Yao A.H., Chen N. et al. Mesenchymal stem cells over-expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration // Mol. Ther. 2007. Vol. 15. P. 1382–1389.

## ВЫЖИВАНИЕ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА 3D-МАТРИКСАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

*Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Ильинский И.М., Можейко Н.П., Шмерко Н.П., Андриянова А.А., Аврамов П.В., Немец Е.А., Севастьянов В.И., Готье С.В.*

ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова»  
Минздравсоцразвития РФ, Москва

В работе предложен и изучен новый способ коррекции печеночной недостаточности путем трансплантации в брыжейку тонкой кишки биомодуля (клетки печени, иммобилизованные на биосовместимом и биodeградируемом 3-мерном матриксе *ЭластоПОБ®*) – «вспомогательная печень». Установлено, что в опытах с моделированием острой печеночной недостаточности у собак (резекция 65–70% ткани печени) и трансплантацией биомодуля на 9–14-й день происходит восстановление нарушенных биохимических показателей (содержание общего белка, лактата, ферментов цитолиза, протромбинового индекса и других коагулологических показателей). Выявление живых клеток с фенотипом гепатоцитов и новообразованных полнокровных сосудов в деградируемом матриксе через 90 суток после трансплантации биомодулей позволяет предполагать эффективность предложенного метода для коррекции острой печеночной недостаточности.

*Ключевые слова:* печеночная недостаточность, иммобилизованные гепатоциты, устройство для поддержки печени.

## SURVIVAL OF LIVER CELLS, IMMOBILIZED ON 3D-MATRIXES, IN LIVER FAILURE MODEL

*Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A., Krasheninnikov M.E., Iljinsky I.M., Mogeiko N.P., Shmerko N.P., Andriyanova A.A., Avramov P.V., Nemets E.A., Sevastjanov V.I., Gautier S.V.*

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs,  
Moscow

It was examined a new method for correction of hepatic failure by transplantation of liver support biounit (liver cells, immobilized on biocompatible and biodegradable 3D-matrixes *ElastoPOB®*) into small intestine mesentery. It was determined that after modeling of acute hepatic failure on dogs by 65–70% liver resection) and transplantation liver support biounit the restoration of disturbed biochemical indecies (such as total protein, lactate, cytolytic enzymes-ALT, AST, ALP, LDH, fibrinogen, protrombine index and others) took place more rapidly on 9–14<sup>th</sup> day instead of 18<sup>th</sup> day in control.

It was made a preposition about efficiency of the suggested method for correction both acute hepatic failure because even 90 days after transplantation of liver support biounit alive hepatocytes and neogenic plethoric vessels, growing through matrix were revealed.

*Key words:* hepatic failure, immobilized hepatocytes, liver support unit.

*Статья поступила в редакцию 14.06.11 г.*

**Контакты:** Шагидулин Марат Юнусович, к. м. н., доцент, зав. отделом экспериментальной трансплантологии и искусственных органов.

**Тел.** 8-921-935-51-91, **e-mail:** dr.shagidulin@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Из-за повсеместной нехватки донорских органов около 30–50% потенциальных реципиентов с хроническими заболеваниями жизненно важных органов умирают, так и не дождавшись трансплантации [6]. Смертность в листе ожидания у реципиентов печени достигает 15–25% [20]. Прогрессирующее увеличение количества больных с печеночной недостаточностью (ПН), высокая инвалидизация, а также смертность среди людей молодого и трудоспособного возраста указывают на недостаточную эффективность существующих консервативных и хирургических методов лечения данной патологии и на необходимость поиска новых, более эффективных методов лечения [2, 12]. В этой связи большой интерес представляют современные биотехнологии, основанные на проведении клеточной терапии у больных с ПН.

Известно, что восстановительная регенерация печени обусловлена пролиферацией гепатоцитов и их внутриклеточной регенерацией [1], однако у больных с ПН она снижена и не восполняет развившийся устойчивый дефицит функционирующих гепатоцитов.

В связи с этим одним из направлений регенерационной клеточной терапии стало применение донорских гепатоцитов либо путем трансплантации их в подкожную клетчатку, селезенку, брюшную полость и паренхиму печени, либо путем временного подключения биореакторов (культиваторов) с микрофрагментами ткани печени или изолированными гепатоцитами в экстракорпоральных контурах перфузионных систем типа «биоискусственная печень» [11, 13, 18]. Между тем указанные способы клеточной терапии ПН имеют существенные недостатки, главными из которых являются короткие сроки выживания донорских изолированных гепатоцитов (до 4–5 часов) и соответственно короткие сроки их корригирующего воздействия на печень больного. Для увеличения сроков выживания изолированных гепатоцитов в биореакторах (до 1–2 суток) применяют метод их предварительной посадки на микроносители [18], который обеспечивает условия для контактного взаимодействия клеток и повышает выживаемость и резистентность гепатоцитов к действию повреждающих факторов. Однако использование гепатоцитов на микроносителях или в виде микрофрагментов ткани печени в перфузионных системах сталкивается не только с биологическим ограничением сроков их функционирования, но и с техническими проблемами обеспечения адекватных условий для их жизнедеятельности. Среди таких проблем:

- необходимость использования специальных измельчителей для получения фрагментов заданного размера, что повышает опасность инфицирования донорского материала;

- необходимость включения в контур перфузионных систем дополнительных технических узлов для оксигенации и детоксикации крови (плазмы) больного, а также управления ими, что существенно повышает себестоимость метода;
- необходимость использования в биореакторах микрофрагментов печени в смеси с частицами пористого биосовместимого носителя, которые предотвращают слипание микрофрагментов и обеспечивают эффективный массоперенос, но не предотвращают отсроченную гибель гепатоцитов в глубоких слоях и на поверхности микрофрагментов;
- необходимость использования больших количеств донорского материала, что повышает угрозу переноса опасных инфекций и служит фактором избыточной активации иммунной системы реципиента, сокращающей срок функционирования используемого материала;
- необходимость регулярного проведения сеансов подключения перфузионных систем «биоискусственная печень», что исключает непрерывность регуляторной поддержки печени у больных с ПН.

Недостатки и ограничения, возникающие при использовании экстракорпоральных перфузионных гибридных систем «биоискусственная печень» выдвигают на повестку дня необходимость разработки интракорпоральных биомодулей – устройств, создающих условия для долгосрочного выживания и функционирования в них клеток донорской печени, способных после трансплантации обеспечить непрерывную коррекцию ПН.

В экспериментах на животных описано применение интракорпоральных биомодулей «вспомогательная печень» [16, 17], которые представляют собой биodeградируемый полимерный матрикс с адгезированными на нем гепатоцитами. Однако выраженная местная воспалительная реакция после трансплантации предложенных биомодулей, гибель большого числа гепатоцитов и низкая плотность прикрепления клеток печени на них свидетельствовали об отсутствии у используемых матриксов оптимальной биосовместимости, и следовательно, о неспособности их обеспечивать адекватные условия для долгосрочного выживания клеток печени.

Если учесть, что используемые биомодули были изготовлены из импортных биополимеров, которые не лицензированы в нашей стране, то становится очевидным, что для изготовления биомодулей мы должны использовать отечественные лицензированные биополимеры, физико-химические, механические и технологические свойства которых позволяют прогнозировать их пригодность для изготовления биосовместимых каркасов и пролонгированного поддержания жизнедеятельности прикрепленных клеток.

Этим требованиям удовлетворяют 3D-матрицы из биополимеров [3, 4, 5], которые по своим свойствам способны не только обеспечить прикрепление клеток, но и формировать тканеподобные структуры за счет беспрепятственной диффузии к клеткам межтканевой жидкости с растворимыми субстратами, поддержания газообмена ( $O_2$  и  $CO_2$ ) и создания условий для прорастания через поры питающих сосудов.

Однако таких исследований по применению отечественных биополимеров для изготовления биомодулей типа «вспомогательная печень» и по использованию их для коррекции ПН мы в литературе не обнаружили.

Целью настоящего исследования явилось изучение пригодности биомодулей, созданных на основе биополимерных матриц «ЭластоПОБ®», для длительного выживания клеток печени и коррекции ПН.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводились с 9 до 19 часов при комнатной температуре (22–24 °C). Работа выполнялась в соответствии с требованиями, изложенными в Приказе МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и в приложении к Приказу МЗ СССР № 565 от 04.10.1977 г., а также Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных от 1973 г., Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) № 1045–73 от 1973 г. и постановлением правительства Москвы от 1 октября 2002 года № 819–ПП.

В качестве доноров клеток печени использовали беспородных собак-самцов ( $n = 5$ ) в возрасте 1–2 года весом 20–25 кг. Премедикацию этих животных (собаки) осуществляли путем внутримышечного введения: калипсола (5% – 10 мг/кг), дроперидола (1,5 мг/кг), атропина (0,1% – 0,02 мг/кг) и димедрола (1% – 0,5 мл). В операционной осуществляли вводный наркоз путем внутривенного введения пропофола (1% – 7 мг/кг). Операцию проводили под интубационным наркозом, анестезию поддерживали пропофолом (1% – 0,5 мг/кг/ч), калипсолом (5% – 2 мг/кг), дитилином (5% – 20 мг/кг/ч). Острую ПН моделировали путем резекции 65–70% ткани печени (правая центральная, квадратная, левая центральная, левая латеральная доли), которая создает сублетальный дефицит печеночной ткани и является признанной и адекватной моделью острой ПН [8, 9, 15]. Брюшную полость ушивали послойно наглухо. Для профилактики инфекционных осложнений интраоперационно животным внутривенно вводили офлоксацин – 40 мл и метронидазол – 30 мл.

Выделение аутологичных клеток печени осуществляли из резецированного участка печени (4 × 4 × 2 см) бесперфузионным методом [8] путем 3-кратной отмывки изъятых кусочков печени от крови и измельчения его на холоде ( $t = 4$  °C) в чашке Петри, с 3-кратной отмывкой образовавшейся взвеси клеток и мелких кусочков буферным раствором без кальция (1000 мл дистиллированной воды; 8,3 г NaCl; 0,5 г KCl; 2,38 г HEPES; pH 7,4; 37 °C) в течение 7–10 минут. После этого мелкие кусочки печени инкубировали трехкратно в растворе коллагеназы Тип IV-S (>125 CDU/mg); 1000 мл среды DMEM/F-12 + 1% FCS + 20 mM HEPES, pH 7,2–7,3; 37 °C в течение 6–8 минут каждый раз с последующей заменой ферментного раствора и центрифугированием 500 об./мин в течение 1 минуты при  $t = 37$  °C. Полученный материал переносили на сито с ячейками 200 мкм и фильтровали промыванием питательной средой DMEM/F-12 с 10% фетальной бычьей сывороткой; затем суспензию из отдельных клеток и небольших агрегатов переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали при 500 об./мин при 4 °C в течение 1 минуты. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в свежей среде того же состава и опять центрифугировали. Процедуру повторяли 3–5 раз. Жизнеспособность клеток оценивали методом окрашивания трипановым синим. Выход клеток из резецированного участка печени (12–15 г ткани печени) колебался в пределах (3–4 × 10<sup>8</sup>) клеток. Клеточная суспензия содержала: гепатоциты и непаренхиматозные клетки, которые определяли при световой микроскопии. Разделение паренхиматозных и непаренхиматозных клеток не выполняли. Полученную взвесь клеток печени концентрировали в 1–2 мл физиологического раствора и ресуспендировали в ростовой среде (William's E с заменой аргинина на орнитин и добавлением фетальной бычьей сыворотки, фактора роста гепатоцитов, эпидермального фактора роста, дексамезатона, этаноламина, селенита натрия, глюкогона, инсулина, инсулино-подобного фактора роста-I, аскорбиновой кислоты, линолевой и линоленовой жирных кислот) в концентрации 2,0–4,0 × 10<sup>6</sup> клеток печени/мл. Посадку (иммобилизацию) свежесделанных клеток печени в концентрации 2–3 × 10<sup>6</sup> клеток на 1 см<sup>3</sup> осуществляли на предварительно пропитанный этой средой трехмерный биосовместимый биодеградируемый пористый матрикс по традиционной методике [10].

В качестве матрикса использовали биополимер ЭластоПОБ® (ЗАО «Биомирсервис», Россия), созданный на основе сополимера полиоксибутирата-валерата, синтезируемого различными видами прокариотических клеток, поддерживающего жизнеспособность культивируемых клеток в неоптимальных условиях среды [5, 14, 19].

*ЭластоПОБ*<sup>®</sup> в настоящее время разрешен к медицинскому применению. Основным компонентом *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> является биodeградируемый бактериальный сополимер β-оксибутирата и β-оксивалерата (ПОБ-со-ПОВ), содержащий оксивалерата 15–30 мол% ( $M_w = 295–360$  КДа, кристалличность 50–60%). В состав *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> входит также высокомолекулярный гидрофильный пластификатор (ВГП), повышающий гидрофильность и эластичность материала.

Матрицы *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> представляли собой губки со следующими размерами и параметрами: диаметр пористой губки –  $10 \pm 2$  мм; толщина –  $1,2 \pm 0,5$  мм; масса – 6,0–12,0 мг. Пористость – не менее  $95 \pm 2\%$ . Размер макропор –  $300 \pm 100$  мкм.

Культивирование аутологичных клеток печени на матриксе осуществляли в течение 3 суток по общепринятой методике [16]. Для этого матрикс с посаженными клетками помещали в стерильную камеру и инкубировали *in vitro* в ростовой среде, состав которой указан выше. Созданный биомодуль, который содержал аутологичные клетки печени в концентрации  $2–3 \times 10^6$  клеток/см<sup>3</sup>, иммобилизованные на матриксе *ЭластоПОБ*<sup>®</sup>, трансплантировали в брыжейку тонкой кишки экспериментальному животному (собака) на 3-и сутки после резекции печени для коррекции развивающейся ПН.

Сразу после трансплантации назначали: гепарин 2500 МЕ каждые 12 часов в течение 7–10 дней под контролем свертывающей системы крови и трентал из расчета 45 мг/м<sup>2</sup> поверхности тела также через каждые 12 часов в течение 30 дней.

Динамику коррекции ПН контролировали по биохимическим показателям, измеряемым с помощью автоматического биохимического анализатора Hitachi-912 и биохимических наборов фирмы Roche. Показатели свертывающей системы исследовали на

коагулологическом анализаторе Sysmex 560 и агрегометре Chrono-log с использованием реактивов фирмы «Дейд Беринг». Исследование РКФМ (растворимых комплексов фибринмономеров) проводилось с использованием орто-фенантролина производства «Технология-стандарт». Для исследования показателей кислотно-щелочного и электролитного баланса использовали газово-электролитный анализатор ABL-700 (Radiometer). Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе Micros-60. Жизнеспособность клеток перед иммобилизацией на матриксе оценивали окрашиванием трипановым синим. Морфологию клеток, культивируемых на матриксе после трансплантации биомодулей в брыжейку тонкой кишки, исследовали методами световой микроскопии через 90 дней.

Для иммуногистохимического выявления активно функционирующих клеток печени, иммобилизованных на трансплантированном матриксе, был применен иммунопероксидазный метод с антителами на цитокератин 18 фирмы DAKO (Дания) и антимитохондриальными антителами фирмы BIOGENIEX (USA).

Результаты биохимических исследований были подвергнуты статистической обработке по Стьюденту.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методами световой микроскопии было установлено, что клеточная суспензия, приготовленная из резецированного участка печени, содержала ~95–98% гепатоцитов и ~5–2% непаренхиматозных клеток, причем жизнеспособность этих клеток составляла  $76 \pm 4\%$  (рис. 1).

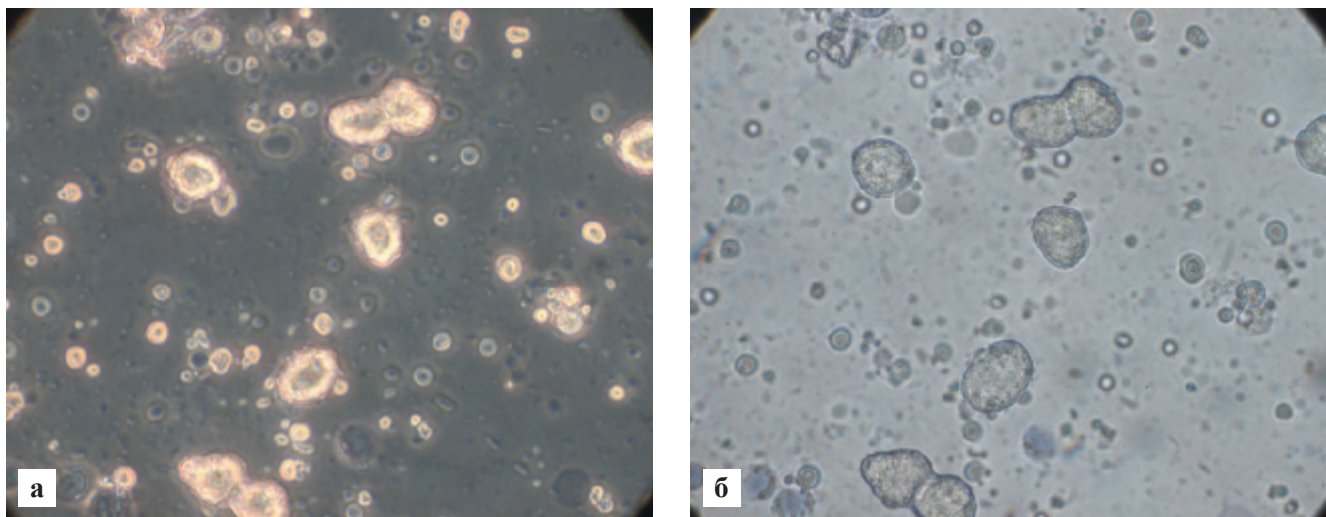


Рис. 1. Суспензия клеток печени сразу после выделения. Наряду с гепатоцитами и непаренхиматозными клетками в суспензии присутствует дебрис (осколки клеток). Фазово-контрастная (а) и прямая просвечивающая микроскопия (б).  $\times 630$



Культивирование выделенных клеток печени на культуральном пластике, покрытом коллагеном (имитация условий культивирования на 3D-матриксах), позволяет повысить процент жизнеспособных клеток до 92–95% и создает условия для формирования тканеподобных структур (рис. 2). Полученные нами результаты послужили основанием для использования предварительного культивирования *in vitro* выделенных клеток печени на 3D-матриксах *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> в течение 3 суток для иммобилизации жизнеспособных клеток и приготовления функционально активных биомодулей. Изучение динамики развития ПН позволило уста-

новить, что к концу 1-х суток после моделирования ПН общий белок сыворотки крови резко снизился (с 70,6 до 48,7 г/л) (рис. 3, а). Стал нарастать ацидоз (дефицит оснований увеличился в 2 раза); повысился лактат (рис. 3, б) и резко увеличился уровень цитолитических ферментов (рис. 4, а). Уровень АЛТ по сравнению с исходом увеличился в 6 раз, АСТ – в 15 раз, ALP (щелочная фосфатаза) – в 5 раз. При анализе показателей плазменного звена гемостаза было отмечено, что в исходе до моделирования ПН у собак имел место сдвиг в сторону гиперкоагуляции. Этот сдвиг характеризовался низкими цифрами АЧТВ (14<sup>''</sup>), повышенным уровнем про-

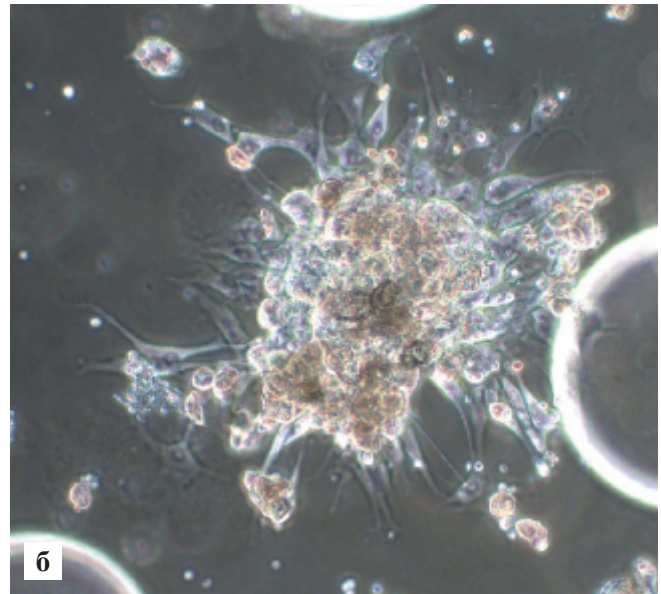
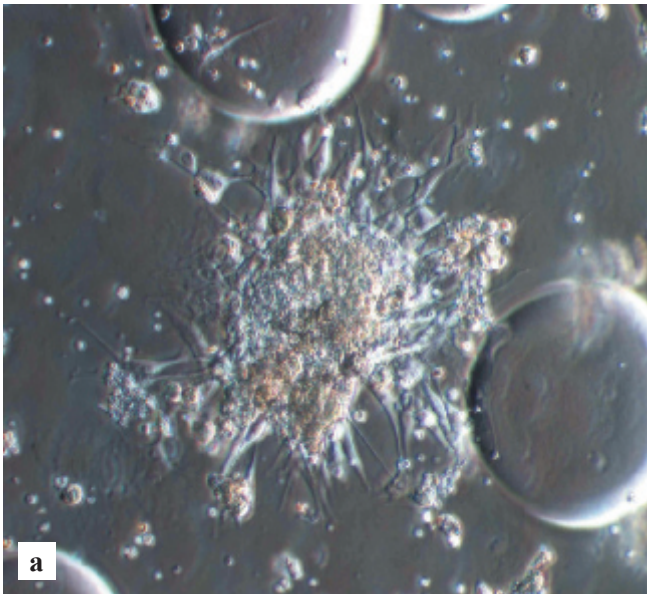
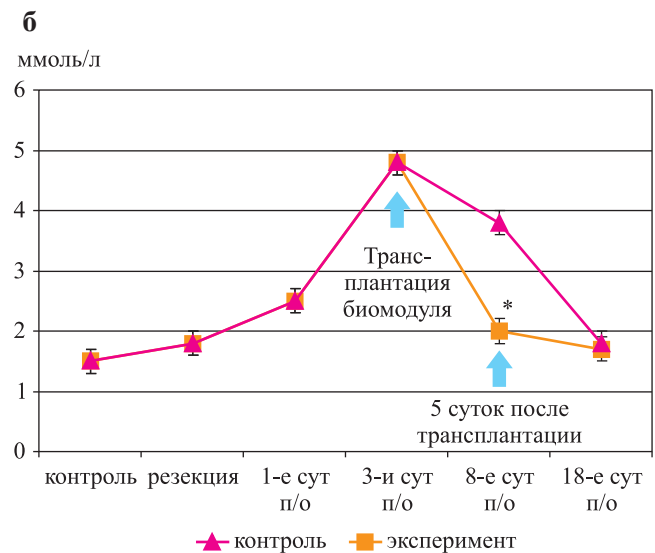
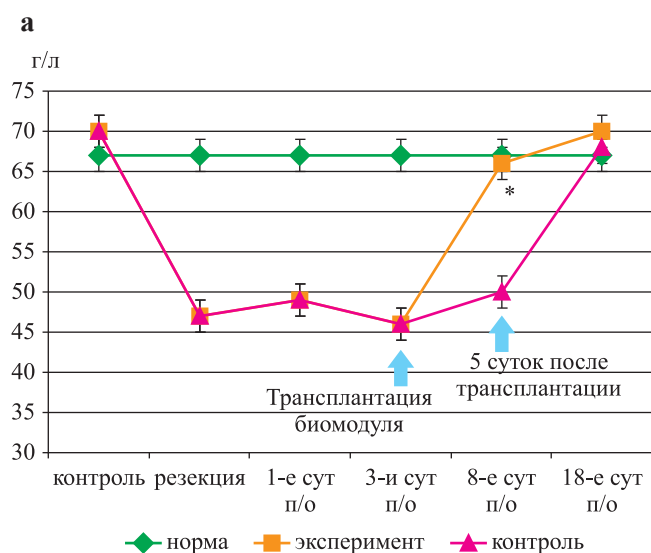


Рис. 2. Клетки печени. 3-и сутки культивирования на культуральном пластике, покрытом коллагеном. Образование ассоциата печеночных клеток, прикрепившихся к коллагеновому матриксу, из-под которого разрастаются клетки эпителиоподобного фенотипа. Микроскопия по Номарскому (а) и фазовый контраст (б).  $\times 200$



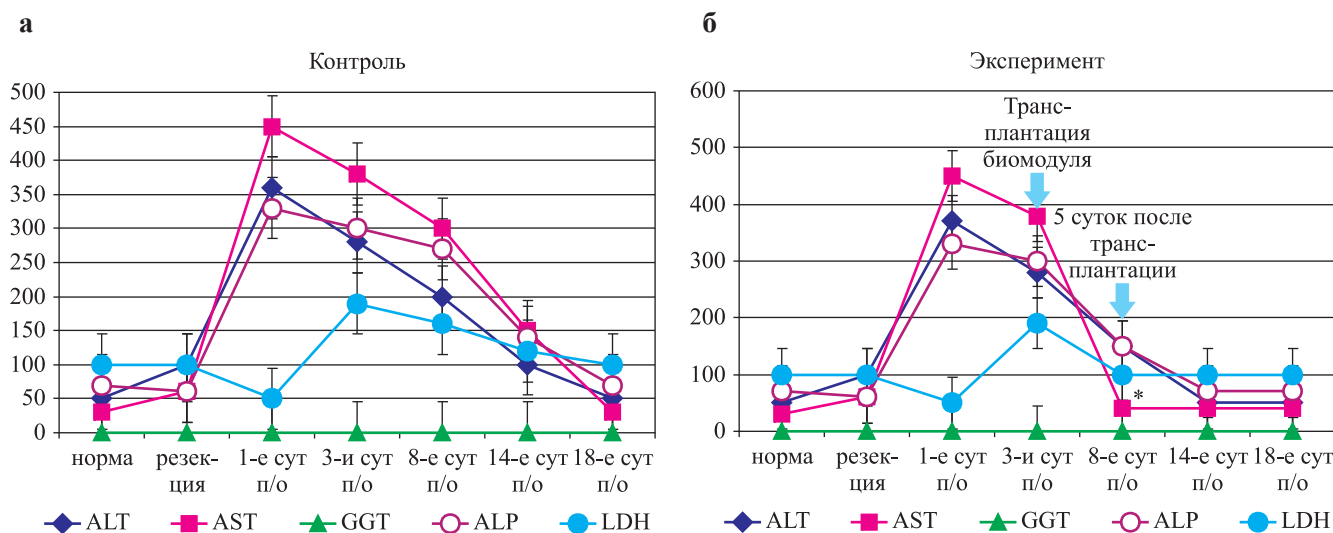
\* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 3. Динамика содержания общего белка (а) и молочной кислоты (лактат) (б) в сыворотке крови собак при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (контроль) и с трансплантацией биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)

тромбинового индекса (133%) (рис. 5, а), высоким содержанием фибриногена (6000 мг/л) (рис. 5, б), умеренно выраженной тромбинемией (РКФМ 15 мг%) без существенного снижения уровня АТ-III и снижением агрегационной активности тромбоцитов (9%). После резекции печени изменения АЧТВ не происходило, уровень протромбинового индекса к 1-м суткам составил 143% (рис. 5, а), значительно увеличился уровень тромбинемии (РКФМ 28 мг%). К 1-м суткам после резекции отмечалось снижение содержания фибриногена (1800 мг/л) (рис. 5, б) и АТ-III (64%), что указывало на снижение синтетической функции печени. Агрегационная активность тромбоцитов по сравнению с исходом также снизилась.

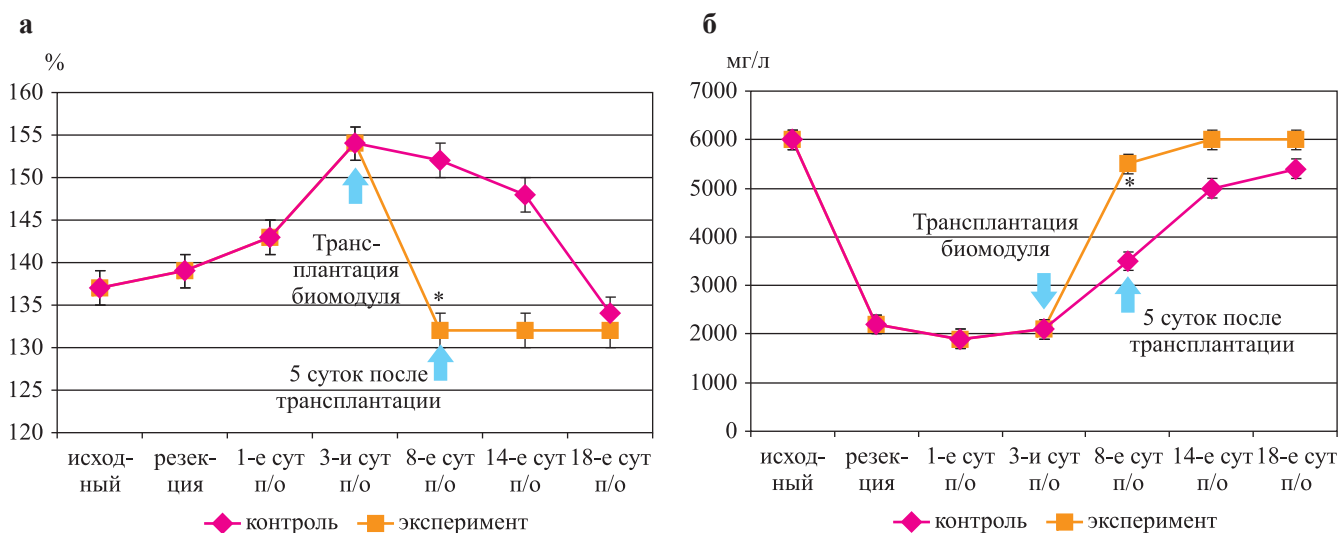
При динамическом исследовании перечисленных показателей у собак с ПН было отмечено постепенное их возвращение к норме. Содержание лактата в крови, показатели цитолиза и протромбинового индекса начинали снижаться с 3-х суток (рис. 3, б; 4, а; 5, а). Показатели общего белка и фибриногена начинали повышаться с 9-х суток после моделирования ПН (рис. 3, а; 5, б). Окончательное восстановление большинства исследуемых показателей в контроле наступало только на 18-е сутки после резекции печени.

В опытах с коррекцией ПН (трансплантация биомодулей на 3-и сутки после резекции печени) при динамическом исследовании биохимических показателей и показателей свертывающей системы кро-



\* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 4. Динамика ALT, AST, ALP, LDH (U/L) при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (а – контроль) и при трансплантации (б) биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)



\* – различие достоверно по сравнению с контролем.

Рис. 5. Динамика изменения протромбинового индекса (а) и содержания фибриногена (б) в плазме крови собак при моделировании печеночной недостаточности в опытах без (контроль) и с трансплантацией биомодуля (матрикс с иммобилизованными клетками печени)

ви был отмечен более высокий темп их нормализации по сравнению с контролем. На 5-е сутки после трансплантации биомодулей отмечалось выраженное снижение показателей ПН: снижение лактата (рис. 3, б), ферментов цитолиза (рис. 4, б), а также достоверное снижение протромбинового индекса (рис. 5, а), достоверное повышение фибриногена (рис. 5, б) и общего белка (рис. 3, а). К 5-м суткам после трансплантации происходило также значительное увеличение по сравнению с исходом содержания тромбоцитов, но без активации их функциональной активности (с  $531 \times 10^9$  до  $1646 \times 10^9$ ).

Все исследуемые биохимические показатели после трансплантации биомодулей нормализовались и достигали исходного уровня на 9–14-е сутки после резекции печени, тогда как в контроле их нормализация наступала не ранее чем на 18-е сутки. На 14-е сутки после трансплантации биомодулей исходных значений достигали не только биохимические, но и основные коагулологические показатели: АЧТВ, АТ-III, содержание фибриногена, протромбиновый индекс, значительно снизился уровень тромбинеми (РКФМ 8 мг%), которые, однако, в контрольной группе не нормализовались даже к 18-м суткам после резекции печени. Более высокий темп коррекции ПН, восстановления дезинтоксикационной и синтетической функций поврежденной печени при трансплантации биомодулей мы связали с реализацией гепатоспецифических и регуляторных функций тех жизнеспособных гепатоцитов, которые были трансплантированы на матриксах. Для подтверждения возможности длительного сохранения жизнеспособности и пролиферативной активности гепатоцитов на 3D-матриксах *ЭластоПОБ*<sup>®</sup>, а также для изучения возможности использования таких биомодулей для коррекции ПН нами было проведено изучение состояния гепатоцитов в биомодулях через 90 суток после их трансплантации. В приготовленных срезах зон (брыжейка тонкой кишки) трансплантации биомодулей (матрикс с гепатоцитами) через 90 дней были выявлены жизнеспособные пролиферирующие гепатоциты (рис. 6, а). В структуре биодегра-

дируемого матрикса располагаются клетки печени с четкими контурами, жизнеспособность и эндодермальное происхождение которых подтверждены иммуногистохимическим методом с антителами к митохондриальным антигенам (рис. 6, б). Важно подчеркнуть, что спустя 90 суток в структуре деградируемого матрикса наряду с жизнеспособными гепатоцитами нами были выявлены новообразованные сосуды (артерии мышечного типа) (рис. 6, в). Очевидно, пористость и полная биосовместимость используемых матриксов *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> способствовали прорастанию в них сосудов, а также длительному поддержанию жизнеспособности культивируемых гепатоцитов, и эти факты, по нашему мнению, могут служить гарантом пригодности трансплантируемых биомодулей для коррекции ПН.

Таким образом, проведенное нами исследование жизнеспособности клеток печени в структуре длительно имплантируемых биомодулей показало пригодность 3D-матрикса *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> для создания функционирующей ниши жизнеспособных ассоциатов клеток печени. Жизнеспособность клеточных ассоциатов в матриксе обеспечивается не только размещением и активной диффузионной доставкой кислорода и питательных веществ к иммобилизованным клеткам, но и прорастанием к ним сосудов, создающих благоприятные условия для формирования устойчивых тканеподобных ассоциатов иммобилизованных клеток печени и их длительного автономного функционирования. Мы полагаем, что изготовление интракорпоральных биомодулей «вспомогательная печень» на основе отечественного 3D-матрикса *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> может найти широкое применение для лечения ПН, так как предполагаемая конструкция биомодуля:

- исключает необходимость применения сложных перфузионных систем и проведения сложных полостных операций;
- создает с помощью трансплантируемого 3-мерного матрикса культуральные условия для выживания и пролиферации клеток печени, а также формирования «тканеподобной» структуры;

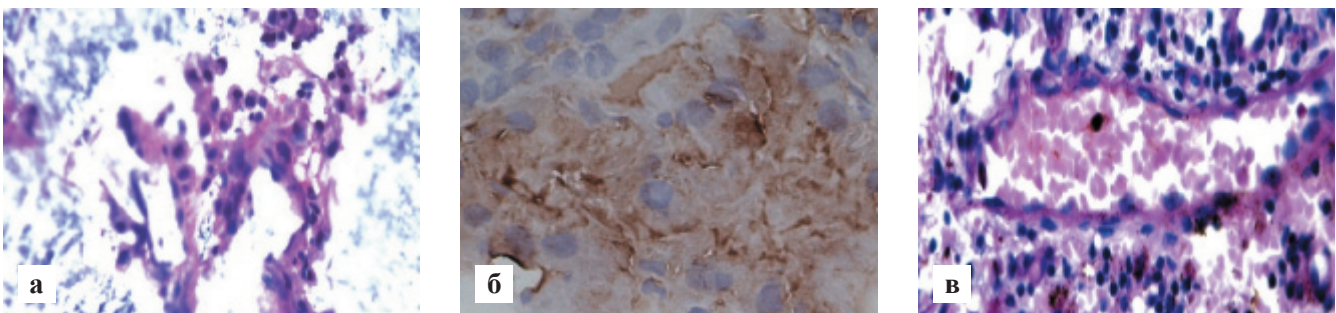


Рис. 6. Гистологические срезы в месте трансплантации биомодуля (матрикс *ЭластоПОБ*<sup>®</sup> с иммобилизованными клетками печени на 90-е сутки эксперимента): а – группы гепатоцитов, окраска гематоксилин-эозином; б – иммуногистохимическое окрашивание на специфические митохондриальные антигены эндотелиальных клеток (гепатоциты); в – вновь образованный сосуд (полнокровная артерия мышечного типа), PAS окраска.  $\times 400$

- создает с помощью 3D-каркаса адекватные условия для диффузии оксигенированной межклеточной жидкости и прорастания сосудов через матрикс, что пролонгирует и оптимизирует условия жизнеобеспечения иммобилизованных клеток печени;
- предполагает использование как аутологичных клеток, которые снижают степень активации иммунной системы, так и аллогенных клеток печени, что позволит трансплантируемому биомодулю при использовании иммуносупрессоров оказывать длительное биорегуляторное органоспецифическое воздействие на печень и организм.

Эффективность применения вживляемых биомодулей «вспомогательная печень» и сравнительно низкая себестоимость их использования также должны способствовать внедрению нового метода лечения ПН в клиническую практику.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало, что биомодули, представляющие собой изолированные клетки печени (гепатоциты и непаренхиматозные клетки), иммобилизованные на 3-мерном биосовместимом и биodeградируемом отечественном матриксе *ЭластоПОБ®* при аутотрансплантации в брыжейку тонкой кишки способны длительно выживать и сохранять фенотип печеночных клеток.

При трансплантации биомодулей «вспомогательная печень» животным с острой ПН коррекция нарушений функций печени происходит быстрее, чем у животных без трансплантации биомодулей.

Длительное сохранение жизнеспособности и фенотипа клеток печени в трансплантируемых биомодулях позволяет предполагать эффективность их применения для коррекции хронической ПН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н. Практическая гепатология // Рига: Звайгзне, 1984. 405 с.
2. Дифференциальная диагностика и лечение внутренних болезней: Руководство для врачей. Т. 2. Болезни органов пищеварения / Под ред. А.И. Хазанова. М., 2003. С. 281–306.
3. Севастьянов В.И., Егорова В.А., Немец Е.А., Перова Н.В., Онищенко Н.А. Биodeградируемый биополимерный материал *ЭластоПОБ®* для клеточной трансплантации // Перспективные материалы. 2004. № 3. С. 35–41.
4. Севастьянов В.И., Немец Е.А., Волкова Т.Г., Марковцова М.Г. Трехмерные пористые матриксы для трансплантации клеток на основе биodeградируемого бактериального сополимера «Биопластотан» // Перспективные материалы. 2007. № 6. С. 5–10.
5. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Довжик И.А. и др. Медико-биологические свойства полиоксиалканоатов – биodeградируемых бактериальных полимеров // Перспективные материалы. 2001. № 5. С. 46–55.
6. Шумаков В.И. Достижения и перспективы развития трансплантологии и искусственных органов в России // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2005. № 3. С. 6–9.
7. Fiegel H.C., Kaufmann P.M., Kneser U., Kluth D., Rogiers X. Priming of hepatocytes for cell culture by partial hepatectomy prior to cell isolation // Tissue Eng. 2000. Vol. 6 (6). P. 619–626.
8. Kahn D., Hickman R., Terblanche J., von Sommoggy S. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs – the response to different resection sizes // Nippon Geka Gakkai Zasshi. 1986. Vol. 87 (5). P. 536–546.
9. Kobayashi J., Takeyoshi I., Ohwada S., Morishita Y. et al. The effects of FR167653 in extended liver resection with ischemia in dogs // Hepatology. 1998. Vol. 28, № 2. P. 459–465.
10. Mooney D.J., Sano K., Kaufmann P.M., Vacanti J.P., Langer R. Long-term engraftment of hepatocytes transplanted on biodegradable polymer sponges // J. Biomed. Mater. Res. 1997. Vol. 5. P. 413–420.
11. Ohashi K., Park F., Kay M.A. Hepatocyte transplantation: clinical and experimental application // J. Mol. Med. 2001. Vol. 79. P. 617–630.
12. Pereira S.P., Williams R. et al. Limits to liver transplantation in the UK // Gut. 2008. Vol. 42. P. 883–885.
13. Pietrosi G., Vizzini G.B., Gruttadauria S., Gridelli B. Clinical applications of hepatocyte transplantation // World J. Gastroenterol. 2009. Vol. 7. P. 2074.
14. Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G. Production of purified polyhydroxyalkanoates (PHAs) for applications in contact with blood // J. Biomater. Sci. Polymer Edn. 2003. Vol. 14 (10). P. 1029–1042.
15. Siman J., Payer J., Stojkovic J., Cerný J. Hemodynamics of the liver. II. Hemodynamics of the dog liver after resection of 70% of the liver and ligation of the left branch of the portal vein // Z. Exp. Chir. 1979. Vol. 12 (2). P. 113–118.
16. Uyama S., Kaufmann P.M., Takeda T., Vacanti J.P. Delivery of whole liver equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation // Transplantation. 1993. Vol. 55. P. 932–935.
17. Uyama S., Kaufman P., Kneser U., Vacanti J., Rodrigues X. Hepatocyte transplantation using biodegradable matrices in ascorbic acid-deficient rats: comparison with heterotopically transplanted liver grafts // Transplantation. 2001. Vol. 7. P. 1–7.
18. Van de Kerkhove M.P., Hoekstra R., Chamuleau R.A., van Gulik T.M. Clinical application of bioartificial liver support systems // Ann. Surg. 2004. Vol. 240. P. 216–230.
19. Volova T., Shishatskaya E., Sevastianov V., Efremov S., Mogilnaya O. Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers // Biochem. Eng. J. 2003. № 3736. P. 1–9.
20. www.eurotransplant.nl/files/statistics.

# НОВЫЙ ТИП ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ КЕРАТОПРОТЕЗА НА ОСНОВЕ АЛЛОГЕННОЙ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ДОНОРСКОЙ РОГОВИЦЫ И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

*Борзенок С.А.<sup>1</sup>, Васильев А.В.<sup>2</sup>, Шипунова А.В.<sup>1</sup>, Дашинимаев Э.Б.<sup>2</sup>, Мороз З.И.<sup>1</sup>,  
Комах Ю.А.<sup>1</sup>, Ковшун Е.В.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий

<sup>2</sup> Учреждение Российской академии наук «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова»

При осложненных бельмах единственным эффективным способом восстановления зрения является кератопротезирование. Все чаще для замещения и восстановления поврежденных тканей организма используются биоинженерные конструкции, содержащие постнатальные фибробласты кожи человека. В связи с актуальностью данной проблемы была определена цель – разработать и обосновать преимущества технологии изготовления биоинженерной конструкции кератопротезного комплекса с использованием модифицированной донорской роговицы и культивированных фибробластов для лечения осложненных и истонченных бельм. На доклиническом этапе методами культуральных, морфологических, цитохимических исследований показана биоинженерная состоятельность предложенной конструкции биокератопротезного комплекса.

*Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, кератопротезирование, постнатальные фибробласты кожи, кросслинкинг роговичного коллагена.*

## NEW BIOKERATOPROSTHETIC COMPLEX BASED ON MODIFIED ALLOGENIC DONOR CORNEAS AND CULTURED POSTNATAL HUMAN SKIN FIBROBLASTS

*Borzenok S.A.<sup>1</sup>, Vasilyev A.V.<sup>2</sup>, Shipunova A.V.<sup>1</sup>, Dashinimaev E.B.<sup>2</sup>, Moroz Z.I.<sup>1</sup>,  
Komakh Y.A.<sup>1</sup>, Kovshun E.V.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> SN Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution

<sup>2</sup> NK Koltsov Institute of Developmental Biology

The aim of the study was to develop biokeratoprosthetic complex based on cross-linking modified allogenic donor corneas and cultured postnatal human skin fibroblasts. Cross-linking enhances corneal strength and tolerance to proteolytic enzymes. Fibroblasts' proliferation and migration in the intrastromal pocket stimulates fiber syncytium formation and collagen microcarriers integration into the corneal stroma, as well as intercellular matrix formation around the prosthetic metallic plate as early as the cocultivation stage. A new biokeratoprosthetic complex has been successfully developed for further in vivo studies.

*Key words: tissue engineering construct, keratoprosthetics, postnatal skin fibroblasts, corneal collagen crosslinking.*

*Статья поступила в редакцию 15.06.11 г.*

**Контакты:** Шипунова Анна Владимировна, аспирант лаборатории трансплантологии и клеточных технологий с Глазным тканевым банком ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий.

**Тел.** 8 (926) 524-28-80, **e-mail:** shipunova84@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Протезирование роговицы является единственным эффективным методом восстановления зрения пациентам с осложненными и истонченными бельмами [2–4, 7, 10, 14, 15, 18]. На сегодня существенной проблемой остается сохранение имплантированного кератопротеза в тканях бельма вследствие развития различного рода осложнений, наиболее значимым из которых является асептический некроз (рис. 1) [3, 4, 7, 10, 15, 18].

К некрозу могут приводить повышенное внутриглазное давление, длительно существующая ретропротезная мембрана, поверхностное расслоение бельма и несовпадение радиусов кривизны бельма и опорной пластины, постоянное давление опорной пластины протеза на патологически измененные ткани бельма, повышенное испарение с поверхности роговицы [2, 14, 15, 18]. Существует мнение, что причинами асептического некроза могут быть трофические нарушения, возникающие после введения опорной пластинки с избыточной механической жесткостью конструкции и малой площадью перфораций в толщу бельма [4, 7, 10].

Поиск способов повышения биомеханической прочности роговицы способствовал разработке новых методов «сшивания» коллагена. Наиболее эффективная и безопасная техника основана на эффекте фотополимеризации стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции – раствора рибофлавина, и низких доз ультрафиолетового излучения твердотельного UVA-источника [17, 20]. В результате происходит утолщение коллагеновых волокон, повышение ригидности роговицы и ее устойчивости к действию протеолитических ферментов.

Распространенным подходом в инжиниринге тканей является создание биоинженерных конструкций, содержащих прогениторные клетки че-

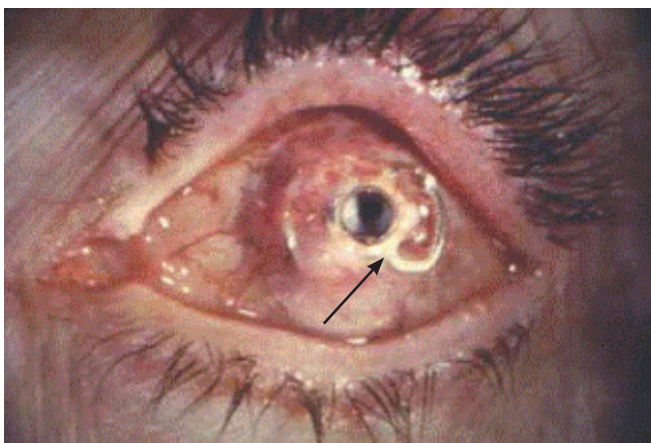


Рис. 1. Фото глаза больного С. при расплавлении передних слоев роговицы над опорной частью кератопротеза. Срок после протезирования – 4 года. Стрелкой указана опорная пластинка кератопротеза

ловека в комбинации с полимерными матрицами, интегрирующимися в организм реципиента [1, 6, 8, 9, 11–13, 16, 19]. По нашему мнению, проблема инжиниринга биокератопротезного комплекса и искусственной роговицы [4] может рассматриваться как перспективное направление в клеточной биологии, регенеративной медицине и трансплантологии. Целью данной работы явилась разработка и обоснование преимуществ технологии изготовления конструкции биокератопротезного комплекса на основе кросслинкинг-модифицированной аллогенной донорской роговицы и культивированных фибробластов кожи для повышения качества трансплантата при использовании его в лечении тяжелых осложненных бельм.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Метод кросслинкинга роговичного коллагена

В эксперименте *in vitro* использовались 24 кадаверные роговицы человека, не востребованные для трансплантации. Для имплантации титановой опорной пластинки кератопротеза (ОПК) модели Федорова–Зуева в строме данных роговиц был сформирован карман 6 × 8 мм, соответствующий размерам пластинки. Часть роговиц (n = 12) помещали на 14 суток в среду DMEM («Биолот», Россия), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США). Затем для сканирующего электронного исследования роговицы фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Остальные роговицы помещали на 1 час в раствор, содержащий 5% декстран и 0,1% рибофлавина [5], и по прошествии указанного времени роговицы подвергали процедуре рибофлавин-UVA-индуцированного кросслинкинга для повышения их структурной прочности. Для этого использовался прибор для кросслинкинга роговичного коллагена UV-X™ (IROC, Швейцария) мощностью 3 МВт/см<sup>2</sup> (5,4 Дж/см<sup>2</sup>), длиной волны 365 нм, сфокусированной на 10–12 мм от вершины роговицы. Каждые 5 мин для предотвращения высыхания роговицы на ее поверхность наносился раствор 0,1% рибофлавина. Общее время манипуляции составило 30 минут.

### Метод выделения и культивирования фибробластов

Фибробласты выделялись из биоптата кожи взрослого человека с помощью механической дезагрегации и ферментативной обработки 0,1% коллагеназой I типа (Worthington, США) с последующей отмывкой и центрифугированием. Клеточный осадок трижды отмывали в среде DMEM. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей

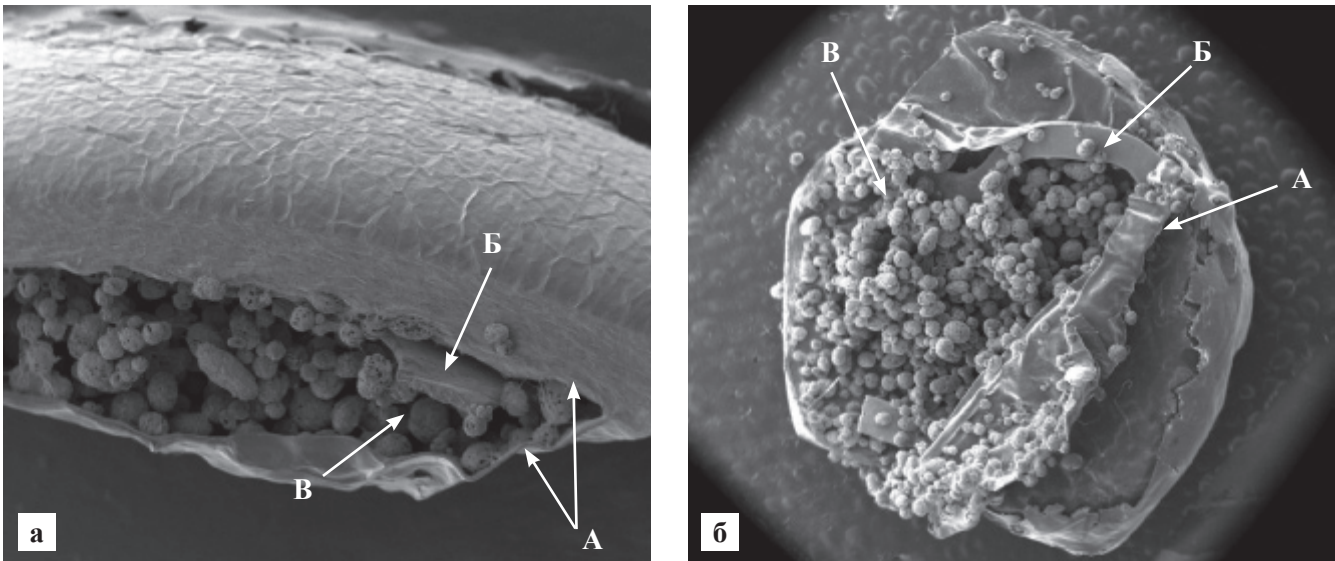


Рис. 2. Фрагмент биокератопротезного комплекса (7-е сутки инкубирования): а – вид сбоку (СЭМ  $\times 100$ ); б – вскрытая внутренняя стенка интрастромального кармана, вид сверху (СЭМ  $\times 50$ ). Стрелками указаны: А – строма роговицы; Б – опорная пластинка кератопротеза; В – коллагеновые микросферы

10% ЭТС. На 3-м пассаже культуры фибробластов трансфицировали геном зеленого флуоресцирующего белка GFP под CMV-промотором при помощи лентивирусной конструкции (ООО «Евроген», Россия) для возможности их прижизненной визуализации с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Япония). Часть трансфицированных клеток пассировали на титановый опорный элемент кератопротеза Федорова–Зуева и культивировали в течение 14 суток в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС. Другую часть клеток смешивали с коллагеновыми микроносителями CultiSpher-S (Percell, NuClone, США), представляющими собой биodeградируемые коллагеновые сферы диаметром 100–200 мкм с неровной поверхностью, в соотношении  $10^6$  клеток на 1 мл микроносителей. Культивирование проводилось в течение 7 суток в среде DMEM с 10% ЭТС.

### Моделирование конструкции биокератопротезного комплекса

Нами использовался кератопротез модели Федорова–Зуева, состоящий из перфорированной титановой ОПК и оптического элемента. Так как имплантация оптической части протеза проводится через несколько месяцев после пересадки биокератопротезного комплекса и его приживления в глаз, в конструкции применялась только ОПК. В интрастромальный карман кросслинкинг-модифицированной роговицы вводили титановую ОПК Федорова–Зуева. Далее при помощи автоматической пипетки в карман инъецировали 200 мкл суспензии культивированных фибробластов на микроносителях. Полученные конструкции инкубировали в стандартных культуральных условиях: 5%  $\text{CO}_2$ , 100% влажность,

37 °С. Наблюдение с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа проводили на 1, 3, 7 и 14-е сутки.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии полученные конструкции биокератопротезных комплексов (рис. 2) фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Исследования проводили на растровом ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI, Нидерланды).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты культивирования клеток на титановой опорной пластинке кератопротеза показали выраженную адгезию фибробластов на материале с полным заселением его поверхности к 5–7-му дню (рис. 3).

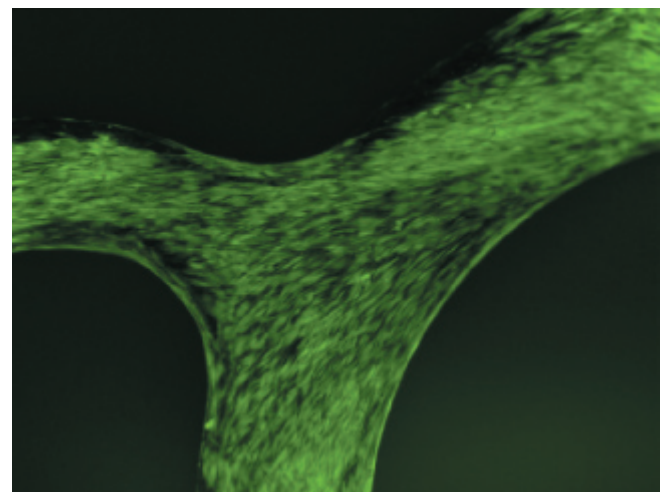


Рис. 3. Монослой трансфицированных фибробластов на опорной титановой пластинке кератопротеза на 5-е сутки. ФЭМ  $\times 400$

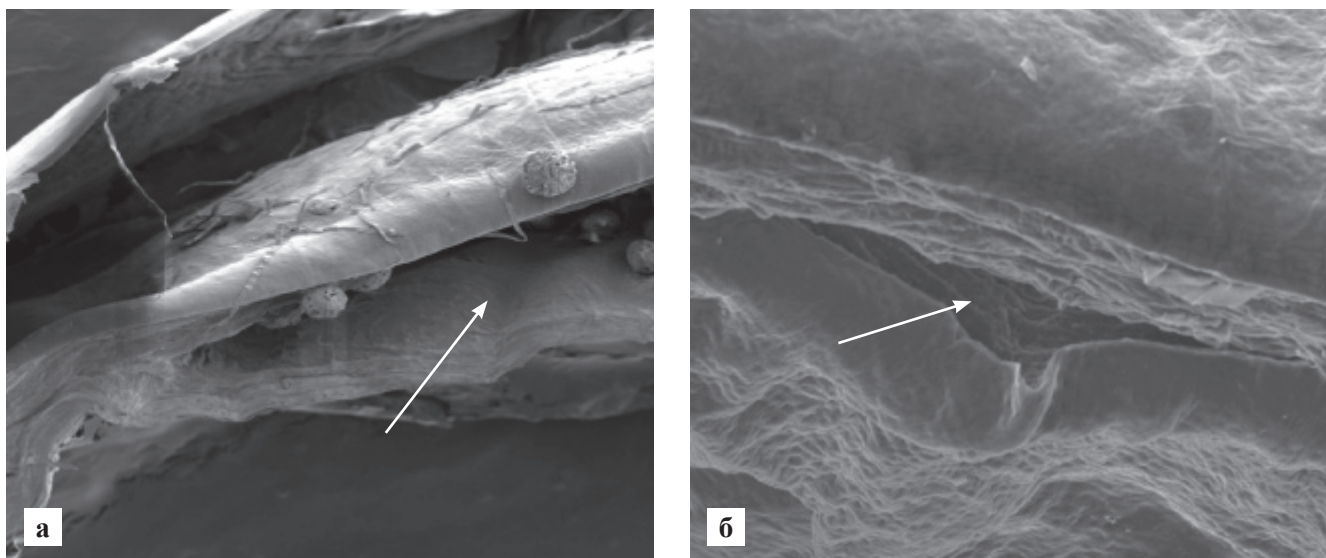


Рис. 4. Коллагеновые пластины стромы (7-е сутки инкубирования): а – кросслинк-модифицированная роговица, в интрастромальный карман которой введены фибробласты на коллагеновых микросферах (СЭМ ×60); б – интактная роговица с выкроенным интрастромальным карманом (СЭМ ×300). Стрелкой указан интрастромальный карман

С помощью инвертированной флуоресцентной микроскопии (ФЭМ) установлено, что фибробласты заселяют всю площадь поверхности коллагеновых микросфер к 5–7-му дню.

Данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали более плотную упаковку коллагеновых пластин стромы кросслинк-модифицированных роговиц по сравнению с таковой интактных роговиц (рис. 4).

По данным флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопий, после введения внутрь кармана фибробласты были жизнеспособными. Клетки активно мигрировали с коллагеновых микроносителей и адгезировались на тканях роговицы (рис. 5). К 5–7-м суткам инкубирования начинали образовываться фибриллы в виде перемычек между

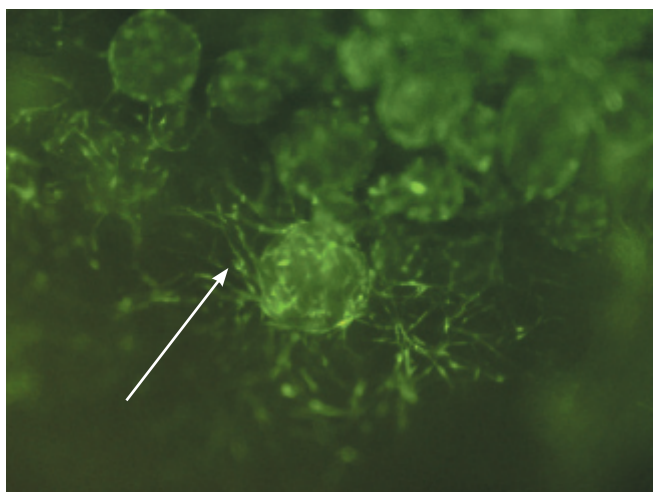


Рис. 5. Миграция фибробластов с поверхности коллагеновых микросфер и их адгезия на тканях роговицы на 7-е сутки инкубирования. ФЭМ ×800

поверхностями микроносителей и стромой роговицы (рис. 6). На этом же сроке наблюдалась биодеградация коллагеновых микросфер и их начальная интеграция в ткань роговицы (рис. 7).

Таким образом, уже через 7 суток инкубирования биоинженерной конструкции биокератопротез может быть имплантирован пациентам с осложненными и истонченными бельмами.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение процедуры кроссликинга на аллогенных донорских роговицах, по данным СЭМ, позволило увеличить прочностные свойства коллагеновых волокон стромы, что особенно важно при использовании различного рода протезных конструкций.

Биологическая инертность опорной пластинки из титанового материала подтверждена выраженной адгезией фибробластов, формированием клеточного монослоя и дальнейшей пролиферацией клеток вокруг опорного элемента внутри интрастромального кармана.

Коллагеновые микроносители в качестве 3D-матрикса способствовали малотравматичному введению клеток в интрастромальный карман роговицы и являлись дополнительным субстратом для синтеза межклеточного вещества.

Пролиферация и миграция фибробластов в интрастромальном кармане роговицы способствовала образованию фибриллярного синцития и интеграции коллагена микроносителей в строму роговицы, что, вероятно, свидетельствует о начальном формировании фиброзной ткани вокруг опорного элемента кератопротеза Федорова–Зуева.



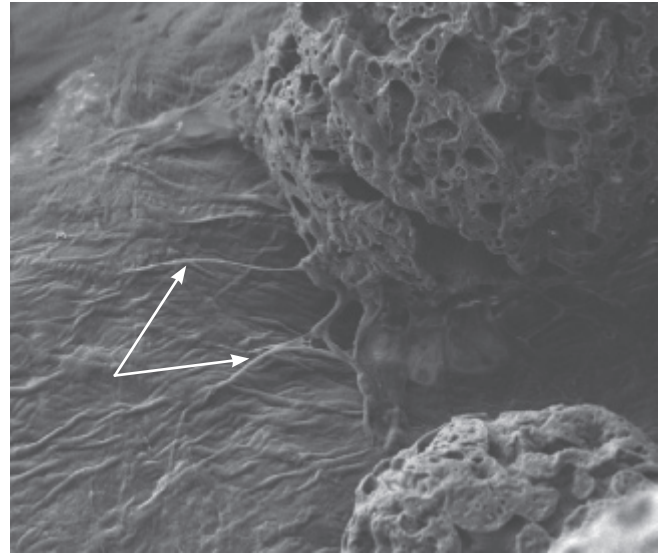
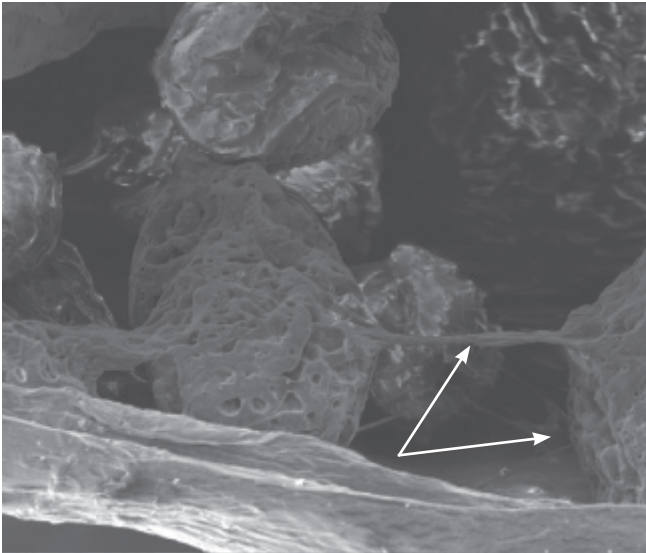


Рис. 6. Образование фибриллярного синцития на 7-е сутки инкубирования. Стрелками указаны «перемычки» между коллагеновыми микросферами и стромой роговицы. СЭМ  $\times 1200$

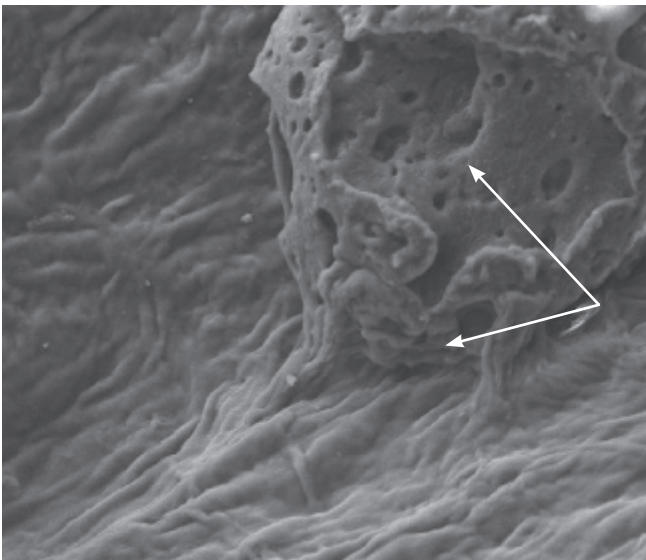


Рис. 7. Начальная интеграция коллагена микроносителей в ткани роговицы на 7-х сутках инкубирования. Стрелками указаны зоны деградации микросферы. СЭМ  $\times 2800$

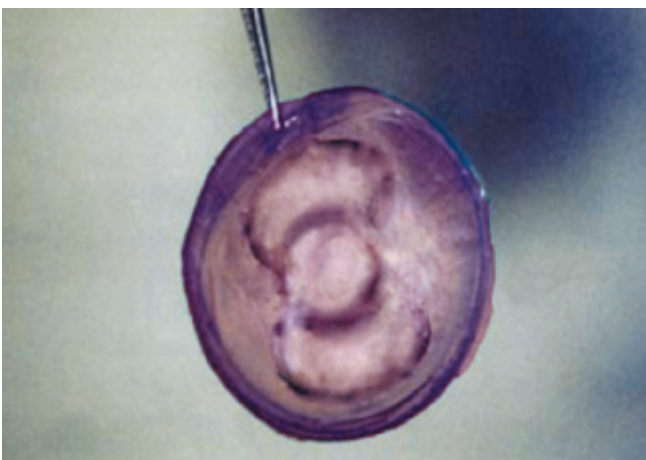


Рис. 8. Сформированный биокератопротезный комплекс

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная конструкция биокератопротезного комплекса (рис. 8) обладает рядом преимуществ за счет повышения прочностных свойств «сшитой» стромы роговицы и введения фибробластов на коллагеновых микроносителях, что способствует развитию пролиферативных процессов, направленных на поддержание трофики биокератопротезного комплекса, профилактики кератомалиции и протрузии опорной пластинки.

*В рамках проекта Роснауки по договору № 13.G25.31.0080 от 22.10.10 «Создание высокотехнологичного производства продуктов клеточных технологий для регенеративной медицины» (шифр 2010-218-02-172).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев А.В., Макаров П.В., Роговая О.С. и др. Восстановление дефектов роговицы с помощью тканевой инженерии // Известия РАН. Серия биол. 2005. Т. 32. С. 5–8.
2. Гундорова Р.А., Малаева Л.В., Удинцов Б.Е. Кератопротезирование // Методическое письмо. М., 1977.
3. Зуев В.К. Сквозное кератопротезирование роговой оболочки при ожоговых бельмах. Дис. ... канд. мед. наук. М., 1974. 122 с.
4. Калинин Ю.Ю. Оптическое биокератопротезирование ожоговых бельм. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 303 с.
5. Мороз З.И., Борзенко С.А., Калинин Ю.Ю. и др. Способ обработки трупной роговицы человека перед кератопластикой. Патент РФ № 2381649.
6. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 1. М.: Медицина. Шико, 2009. 272 с.

7. Пучковская Н.А., Якименко С.А. Оптическое кератопротезирование. Киев: Здоров'я, 1986. 120 с.
8. Роговая О.С., Васильев А.В., Киселев И.В. и др. Использование фибробластов человека, выращенных на микроносителях, для формирования эквивалента соединительной ткани // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 2. С. 105–109.
9. Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глуценко Е.В. и др. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожного покрова // Вестник РАМН. 1994. Т. 6. С. 6–11.
10. Федоров С.Н., Мороз З.И., Зуев В.К. Кератопротезирование, М.: Медицина, 1982. 144 с.
11. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей М.: Техносфера, 2007, 304 с.
12. Шехтер А.Б., Берченко Г.Н. Фибробласты и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фибриллогенеза и катаболизма коллагена // Архив патологии 1978. Вып. 8. С. 70.
13. Bell E., Rosenberg M. The commercial use of cultivated human cells // Transplantat. Proc., 1990. V. 22 P. 971–974.
14. Chirilia T.V., Constable I.I., Crawford G. et al. Keratoprosthesis // US Patent 5, 300, 116, 5 April 1994.
15. Dohlman C.H., Netland P.A., Fung W.C. Experience with a keratoprosthesis. // Anales del Instituto Barraquer. 1999. Vol. 31. № 2.
16. Horch R.E., Kopp J., Kneser U. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes // J. Cell. Mol. Med. 2005. Vol. 9, № 3. P. 592–608.
17. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D et al. Thermomechanical Behavior of Collagen-Cross-Linked Porcine Cornea // Ophthalmologica 2004; Vol. 218; 136–140.
18. Strampelli B. Keratoprosthesis with osteodental tissue // Amer. J. Ophthalmol. 1993. Vol. 89. P. 1029–1039.
19. Yonezawa M., Tanizaki H., Inoguchi N et al. Clinical study with allogenic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers // Int. J. Dermatol. 2007. Vol. 46. № 1. P. 36–42.
20. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Stress Strain Measurements of Human and Porcine Corneas after Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Crosslinking // J. Cataract Refract. Surg.; Sep. 2003; Vol. 29; 1780–1785.

## ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОТЕАСОМ ПЕЧЕНИ В РЕАЛИЗАЦИИ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

Божок Г.А.<sup>1</sup>, Карпова Я.Д.<sup>2</sup>, Люпина Ю.В.<sup>2</sup>, Легач Е.И.<sup>1</sup>, Богомяжкова Ю.В.<sup>2</sup>,  
Бондаренко Т.П.<sup>1</sup>, Шарова Н.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

<sup>2</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

В отличие от большинства органов в печени неспецифический иммунитет преобладает над адаптивным, а в ответ на презентацию антигена предпочтительнее развивается не защитная иммунная реакция, а иммунологическая толерантность. Считается, что толерантность обеспечивают ряд процессов, таких, как апоптоз реактивных Т-клеток, уклонение их от иммунного ответа и активная супрессия иммунных реакций. В то же время есть основания полагать, что важную роль в регуляции иммунного ответа печени играют протеасомы, внутриклеточные мультипротеазные белковые комплексы. Об этом свидетельствует факт применения протеасомного ингибитора бортезомиба в трансплантологии в качестве иммуносупрессанта. Иммунные 26S- и 20S-протеасомы участвуют в образовании антигенных олигопептидов и выполняют ключевую роль в Т-клеточном иммунном ответе. Было показано, что пул протеасом подвергается существенным изменениям в процессе онтогенеза иммуно-компетентных органов. Знание особенностей функционирования протеасом и закономерностей изменения соотношения их форм позволит выявить механизмы, отвечающие за направленность вектора иммунного ответа на отторжение или принятие трансплантата.

*Ключевые слова:* донор-специфическая толерантность, трансплантация, иммунология печени, конститутивные и иммунные протеасомы.

## POSSIBLE ROLE OF LIVER PROTEASOMES IN THE REALIZATION OF MECHANISMS OF TRANSPLANTATION TOLERANCE

Bozhok G.A.<sup>1</sup>, Karpova Ya.D.<sup>2</sup>, Lyupina Yu.V.<sup>2</sup>, Legach E.I.<sup>1</sup>, Bogomyagkova Yu.V.<sup>2</sup>,  
Bondarenko T.P.<sup>1</sup>, Sharova N.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Science of Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>N.K. Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow

In contrast to the majority of organs in liver non-specific immunity predominates over adaptive one, and in response to the antigen presentation develops preferably not immune reaction but immunological tolerance. Tolerance is considered to provide some processes, such as apoptosis of reactive T-cells, immune deviation and active suppression of immune reactions. At the same time there are the grounds for believing that an important role in regulation of liver immune response is played by proteasomes, intracellular multiprotease protein complexes. This is confirmed by the fact of application of proteasome inhibitor bortezomib as immune suppressor in transplantology. Immune 26S- and 20S-proteasomes participate in the formation of antigen oligopeptides and play a key role in T-cell immune response. It has been shown that the pool of proteasomes is subjected to significant changes during ontogenesis of immune competent organs. The changes in the pool of proteasomes occur likely during the development of specific tolerance in transplantation too. The knowledge of the peculiarities of proteasome functioning and regularities of alterations of their shapes will enable the revealing of the mechanisms responsible for either graft rejection or acceptance.

*Key words:* donor-specific tolerance, transplantation, liver immunology, constitutive and immune proteasomes.

Статья поступила в редакцию 17.02.11 г.

**Контакты:** Божок Галина Анатольевна, к. б. н., ст. науч. сотр. отдела криобиохимии и фармакологии нейро-гуморальных систем.  
**Тел.:** (057) 373-30-07, (067) 99-11-072, **e-mail:** bozhokgaru@mail.ru

Иммунологическая толерантность – это состояние ареактивности в отношении того или иного антигена, индуцированное предшествующим контактом с этим антигеном. Толерантность к собственным антигенам организма предотвращает иммунный ответ против собственных тканей. Способность организма предупреждать развитие иммунных реакций, направленных против собственных антигенов, не является генетически запрограммированной, а развивается в онтогенезе.

В начале XX столетия Эрлих предложил термин «страх самоотравления», предполагая необходимость существования регулирующего механизма, препятствующего продукции аутоантител. В 1938 г. Трауб индуцировал специфическую толерантность, введя эмбрионам мышей вирус лимфоцитарного хориоменингита, вызывающий пожизненную инфекцию. В отличие от нормальных мышей взрослые особи, зараженные *in utero*, не продуцировали нейтрализующих антител при повторном введении вируса. В 1945 г. Оуэн сообщил о неидентичных телятах-близнецах, в крови каждого из которых были обнаружены клетки, несущие и «свои», и «чужие» антигены. Эти телята в эмбриональный период имели общий плацентарный кровоток, в результате чего был возможен обмен гемопоэтическими клетками. У животных возникла пожизненная толерантность: во взрослом состоянии они не давали гуморального ответа на введение эритроцитов партнера по эмбриональному парабиозу. Основываясь на этом наблюдении, Вернет и Феннер постулировали, что решающим фактором в формировании иммунореактивности и приобретении способности распознавать чужеродные антигены служит возраст животных в момент первого контакта с антигеном. Такая гипотеза казалась логичной, поскольку с большинством собственных антигенов иммунная система сталкивается обычно до рождения и только позднее начинает взаимодействовать с чужеродными антигенами.

Иммунная толерантность к собственным антигенам поддерживается на протяжении жизни множественными механизмами, которые не позволяют образовываться антителам и аутореактивным лимфоцитам, способным повреждать собственные клетки и ткани организма. Классические представления о поддержании равновесия между толерантностью и реагированием на антиген отводят основную роль центральным и периферическим органам иммунной системы: тимусу, костному мозгу, селезенке, лимфатическим узлам. Однако клинические и экспериментальные данные, накопленные в последнее время, свидетельствуют о том, что печень также является важным органом, осуществляющим системную иммунную регуляцию в организме.

## 1. УЧАСТИЕ ПЕЧЕНИ В РЕАЛИЗАЦИИ МЕХАНИЗМОВ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ

В отличие от большинства других органов в печени неспецифический иммунитет преобладает над адаптивным, а в ответ на индукцию антигеном предпочтительнее развивается не защитная иммунная реакция, а иммунологическая толерантность. Это подтверждают результаты исследований о том, что: в печени приобретается толерантность к пищевым антигенам [32]; выживание аллогенных трансплантатов печени возможно без иммуносупрессии [8]; при введении в печень через портальную вену донорских клеток значительно увеличивает приживаемость тканевых аллографтов [35]; введение в печень через портальную вену растворимых антигенов ведет к развитию иммунологической толерантности [24]. Такое явление иммунологической гипореактивности печени при попадании антигена через портальную вену получило название «портальной толерантности».

Состояние портальной толерантности связывают с особенностями локальной регуляции иммунного ответа в печени, хотя детально ее механизм еще не изучен. Очевидно, что бимодальная функция печени, т. е. обезвреживание антигенов и патогенных микроорганизмов, с одной стороны, и избежание активного иммунного ответа на эти антигены, с другой стороны, требует искусного баланса между иммунитетом и толерантностью. Уникальность выполняемых печенью функций определяется особенностями ее строения и кровоснабжения, особым клеточным составом печени и функционированием самих клеток, а также спецификой межклеточных взаимоотношений, связанных с анатомическими особенностями микроциркуляции крови в печени.

Одной из важнейших функций печени в организме, наряду с участием в обмене веществ, является функция детоксикации. Печень имеет ряд уникальных особенностей, которые позволяют осуществлять ей эту функцию. Прежде всего, это система кровотока через воротную вену (*vena portae*), которая собирает кровь от органов брюшной полости: желудка, кишечника, селезенки, поджелудочной железы. Такая кровь насыщена антигенами пищи и продуктами жизнедеятельности кишечной микрофлоры, в частности липополисахаридами, которые создают особое микроокружение для функционирования клеток.

В печени наблюдается уникальный тип межклеточных взаимоотношений, связанный с анатомическими особенностями ее микроциркуляции. Подсчитано, что весь объем крови организма проходит через печень 360 раз в день [24]. Функциональной микроциркуляторной единицей печени является

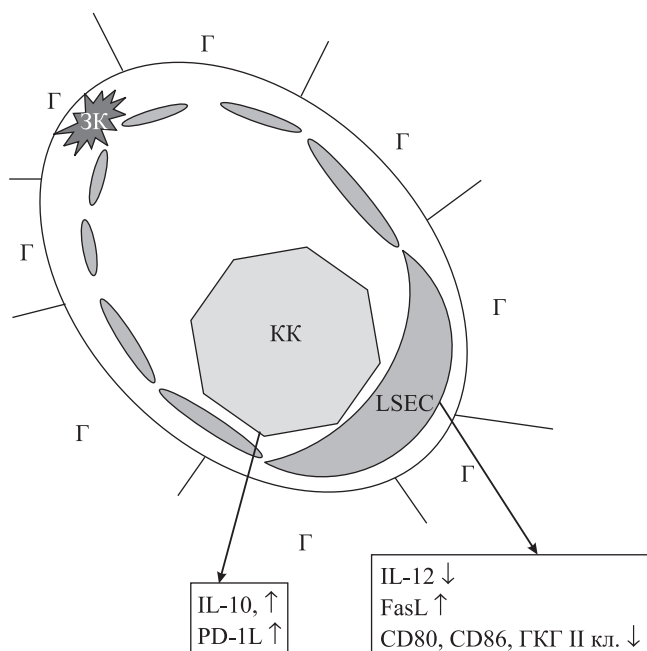


Рис. 1. Микроанатомия печеночного синусоида. LSEC – клетка эндотелия синусоида; KK – клетка Купфера; ЗК – звездчатая клетка; Г – гепатоцит

синусоид (рис. 1). Стенку синусоида выстилает один ряд эндотелиальных клеток (liver sinusoidal endothelial cells, LSEC), которые имеют отверстия (фенестрации) приблизительно 100 нм в диаметре. Таким образом, стенка печеночного синусоида является прерывистой, что облегчает обмен между кровью и гепатоцитами. В пространстве синусоида находятся резидентные макрофаги печени, называемые клетками Купфера (KK), а между гепатоцитами и эндотелием синусоидов существует перисинусоидное пространство (пространство Диссе), в котором находятся звездчатые клетки. Узкий диаметр синусоидов (5–7 мкм) и низкая скорость тока крови в них облегчают контакт между лейкоцитами крови и клетками печени. Проходя через печень с кровотоком, антигены и лейкоциты прежде всего взаимодействуют с KK и LSEC.

LSEC и KK имеют фенотип и свойства, присущие классическим антиген-представляющим клеткам [24, 14, 45]. Предполагается, что особенности процесса презентации антигена этими клетками и лежат в основе явления портальной толерантности.

LSEC являются той самой клеточной популяцией печени, которая первой входит в контакт с антигеном и может представлять его классическим образом через ГКГ II класса CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам [25], а также кросс-презентацией через ГКГ I класса CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам [39]. В эксперименте было показано, что патоген-ассоциированные молекулярные комплексы вызывают полное функциональное созревание LSEC с последующим превращением их в профессиональные АПК, несущие на своей поверхности не только молекулы ГКГ классов I и II,

но и все необходимые для активации Т-лимфоцитов корцепторы. Удобная локализация LSEC дает им возможность постоянно контактировать с циркулирующими лимфоцитами и влиять на их активность. Активация эффекторных Т-клеток является потенциально опасной для печени и должна быть строго контролируемой во избежание ее аутоиммунного поражения.

В связи с этим представление антигена LSEC наивным CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам направляет их дифференцировку не в провоспалительные эффекторные клетки, а в сторону развития иммуносупрессорного регуляторного фенотипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Treg cells), которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. В ответ на стимуляцию липополисахаридами в LSEC наблюдается уменьшение экспрессии молекул адгезии, а также молекул CD80, CD86, ГКГ II класса [25]; дефицит выработки IL-12, ответственного за стимуляцию провоспалительного ответа по Th1-пути [25]; Fas/FasL, опосредующий апоптоз Th1-клеток [28]. Презентация захваченных антигенов через ГКГ I класса CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, называемая кросс-презентацией, вызывает ингибирование развития наивных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в эффекторные цитотоксические лимфоциты, обеспечивая, таким образом, иммунологическую клеточную толерантность к пищевым антигенам [39].

KK составляют примерно 30% от всех клеток печеночного синусоида [32]. Одной из важнейших функций KK является очищение циркулирующей крови от различных эндотоксинов. Они отлично поглощают вирусы, бактерии, грибы, раковые клетки, липосомы и другие микрочастицы. Выделяют три субтипа KK по месту их локализации: околопортальные (periportal), промежуточные (midzonal) и околовенозные (perivenous) [32]. Между собой они имеют некоторые различия. Околопортальные KK крупнее, имеют более высокую лизосомальную и фагоцитарную активность, нежели KK двух других зон. Выделяемые KK цитокины также различаются, например, более крупные KK выделяют преимущественно IL-1 и α-TNF, в то время как высокий уровень секреции NO был отмечен в мелких макрофагах. Таким образом, различные регионы печени имеют различные профили эффекторных и сигнальных молекул, что особенно важно в случае локально действующих молекул, таких как NO.

KK играют важную роль в обеспечении толерантности организма как к тканевым аллографтам, так и к растворимым антигенам. Была показана сниженная способность KK активировать Т-лимфоциты *in vitro* в сравнении с макрофагами и дендритными клетками костного мозга и селезенки [45]. Кроме того, Т-лимфоциты, активированные KK, продуци-

руют значительно меньшее количество IL-2. В опытах на культуре КК показали, что это может зависеть от нескольких факторов. Для эффективной активации лимфоцитов необходимо два сигнала: от ГКГ 1, связанного с антигеном (первый сигнал), и от рецепторов CD40 и B7-1, B7-2 (второй сигнал). Причиной сниженной способности КК активировать лимфоциты является редуцированное проведение первого сигнала и неэффективное представление антигена. Кроме того, макрофаги выделяют PGE<sub>2</sub> и 15d-PGJ<sub>2</sub>, которые оказывают сильное ингибирующее влияние на активируемые лимфоциты. Эти клетки в норме экспрессируют лиганд иммуноингибиторного рецептора PD-1 [45]. Взаимодействие между PD-1L лигандом КК и PD-1 рецептором активированного Т-лимфоцита приводит к угнетению пролиферации последнего [16]. Также было показано, что КК играют основную роль в аккумуляции активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в печени, модифицируя таким образом общий иммунный ответ организма [14].

Под постоянным воздействием липополисахаридов КС и LSEC продуцируют иммуносупрессорные цитокины IL-10 и TGF-β, а в ответ на паракринное или аутокринное выделение TGF-β гепатоциты также продуцируют IL-10. HSC также способны выделять TGF-β при активации. Под действием иммуносупрессорных цитокинов происходит направление дифференцировки наивных CD4<sup>+</sup>Th0 не в Th1 или Th2, а в сторону развития регуляторного фенотипа CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов (Treg cells), которые поддерживают развитие иммунологической толерантности. Кроме того, эти цитокины не только влияют на дифференцировку Т-клеток, но и способны поддерживать толерантность в печени за счет ингибирования созревания АПК и снижения вследствие этого эффективности воздействия последних на Т-клетки. В дендритных клетках в присутствии высоких количеств липополисахаридов и других эндотоксинов был отмечен низкий уровень экспрессии TLR4 [25]. Это частично объясняет их невосприимчивость ко многим специфическим лигандам, что ведет к редуцированной или измененной активации адаптивного ответа и поддержанию иммунологической толерантности печени.

Нужно отметить, что спектр иммунных клеток печени не ограничивается двумя описанными типами и содержит также резидентные лимфоциты печени: натуральные киллеры (НК), натуральные киллеры-Т (НКТ), CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, В-лимфоциты, TCR-γδ клетки, а также миелоидные CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> и лимфоидные CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> дендритные клетки. Экспериментальные исследования, проведенные в работе [6], позволяют говорить о том, что гепато-

циты печени также действуют как специализированные АПК и вносят свой вклад в поддержание состояния толерантности печени. Звездчатые клетки печени обладают иммуномодулирующими свойствами и способны осуществлять локальный ингибиторный эффект. В работе [11] было показано, что аллогенные островки, трансплантированные совместно со звездчатыми клетками, были защищены от отторжения.

В последние годы установлено, что характерной чертой иммунологического профиля печени является большое количество НК и НКТ клеток, преобладание CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов над CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, дефицит В-лимфоцитов [14]. Так, в периферической крови соотношение CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов к CD8<sup>+</sup> составляет 2:1, в печени же оно смещено в сторону CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и составляет 1:2,5, а значительное количество Т-лимфоцитов экспрессирует не αβTCR, а γδTCR. Кроме того, лишь 6% от всех лимфоцитов печени составляют В-лимфоциты. Такой особый набор иммунокомпетентных клеток задает свои условия развития иммунного ответа.

Таким образом, особенности развития иммунного ответа на антиген в печени связаны с уникальностью ее клеточного «оркестра», где каждый тип иммунокомпетентных клеток играет свою роль на определенном этапе.

## 2. ПРОТЕАСОМЫ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ

В настоящее время молекулярные механизмы регуляции иммунного ответа в печени остаются невыясненными. Предполагается, что на молекулярном уровне такая регуляция может осуществляться с участием внутриклеточных компартментов, ответственных за процессинг антигена.

В 80-х годах прошлого века был обнаружен внутриклеточный высокомолекулярный белковый комплекс, который осуществляет избирательную деградацию белка [4, 46]. Он получил название протеасома. То, что протеасомы были найдены в клетках всех представителей эукариот, а также некоторых прокариот, свидетельствует об абсолютной их необходимости для нормальной жизнедеятельности организма. Оказалось, что у млекопитающих до 90% клеточных белков подвергается гидролизу с помощью протеасом.

26S-протеасома (где 26S – коэффициент седиментации) состоит из 20S-протеасомы, в которой происходит расщепление белка, и одной или двух регуляторных субчастиц 19S (PA700), расположенных от нее с двух сторон [44]. Протеолизу в 26S-протеасоме подвергаются белки, меченные молекулами белка убиквитина. 20S-протеасомы

служат резервом для образования 26S-протеасом и расщепляют некоторые белки не зависимо от убиквитина образом [20].

Протеасомы млекопитающих можно разделить на две основные группы – конститутивные и иммунные. Протеолитическим «сердцем» конститутивной протеасомы являются белковые субъединицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$ , обладающие соответственно каспаза-, трипсин- и хомотрипсинподобной активностями. Под воздействием  $\gamma$ -интерферона на клетки три  $\beta$ -субъединицы могут быть заменены на их изоформы, или иммунные субъединицы  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL1) и  $\beta 5i$  (LMP7) [17, 33]. Вместе с тем на базовом уровне эти изоформы синтезируются постоянно во всех органах, причем их количественное соотношение с конститутивными субъединицами зависит и от типа ткани, и от стадии дифференцировки органа [36].

Соотношение конститутивных и иммунных протеасом во многом определяет функции органов и тканей у млекопитающих. Так, конститутивные протеасомы регулируют клеточные процессы, включая репликацию и репарацию ДНК, дифференцировку, апоптоз, клеточный цикл и деление, главным образом, убиквитин- и АТФ-зависимым гидролизом белков, участвующих в этих процессах [13, 42]. Иммунные 26S- и 20S-протеасомы образуют антигенные эпитопы, способные присоединяться к молекулам ГКГ класса I, и выполняют ключевую роль в Т-клеточном иммунном ответе [33]. Общий пул протеасом (конститутивные и иммунные) наряду с протеазами лизосом участвуют в образовании

антигенных эпитопов, связывающихся с молекулами ГКГ класса II [38].

В результате гидролиза иммунными протеасомами аномальных или чужеродных белков (рис. 2) образуются олигопептиды длиной 8–11 аминокислотных остатков с «правильным» С-концом, содержащим остатки гидрофобных аминокислот или аргинина, необходимых для образования комплекса с ГКГ класса I. При гидролизе иммунными протеасомами либо сразу образуются антигенные эпитопы нужной длины, либо их удлиненные с N-конца олигопептиды [9]. Во втором случае эти олигопептиды в цитоплазме или эндоплазматическом ретикулуме укорачивают до нужной длины с помощью аминопептидаз [23]. Олигопептиды соединяются в цитоплазме с белками-транспортёрами TAP1 и TAP2 (рис. 2) и переносятся в эндоплазматический ретикулум, где при необходимости укорачиваются под действием аминопептидаз до необходимой длины и связываются с молекулами ГКГ класса I [33]. Комплекс молекул ГКГ класса I и антигенного олигопептида выносятся на поверхность клетки в составе трансмембранного пузырька и является своеобразным флажком, сигнализирующим о бедствии.

Следует отметить, что в различных типах клеток, в том числе в клетках печени, обнаружены добавочные формы протеасом, несущие смешанный ассортимент стандартных и индуцибельных каталитических субъединиц [18, 41]. Такие смешанные формы протеасом являются распространенными в опухолевых и дендритных клетках, а также составляют приблизительно половину протеасомно-

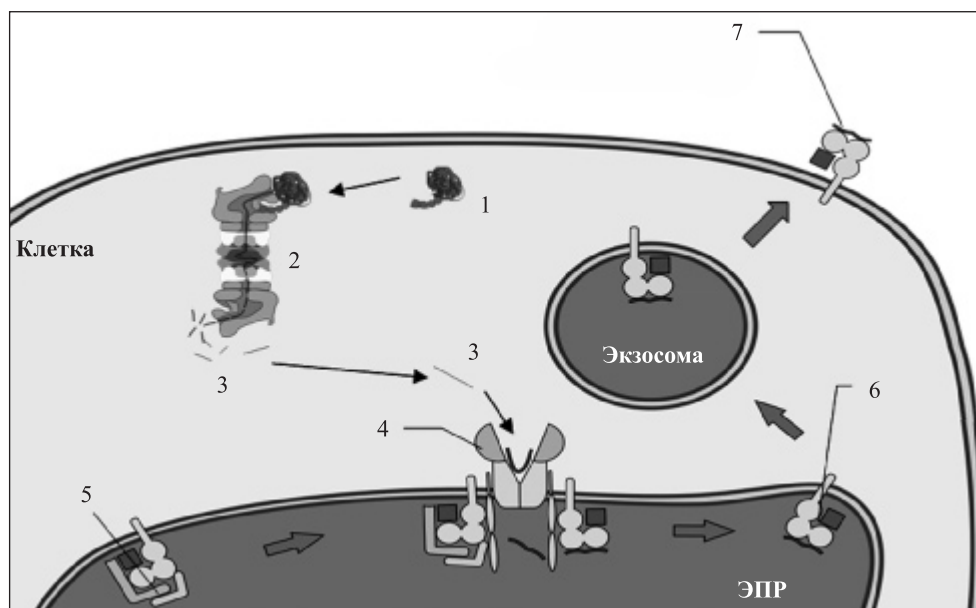


Рис. 2. Презентация антигенного эпитопа. Убиквитинированный мутантный, или чужеродный, белок (1) связывается с протеасомой (2), где происходит протеолиз белка с образованием антигенных эпитопов (3). Антигенный эпитоп переносится в эндоплазматический ретикулум (ЭПР) с помощью белков TAP1 и TAP2 (4) и образует стабильный комплекс с молекулами МНС класса I (6), до этого стабилизированный калнексином (5). Комплекс МНС класса I с помощью экзоцитоза транспортируется на поверхность клетки для связывания с Т-клеточным рецептором (7)

го пула клеток печени [18]. Для нормальной ткани печени был показан следующий состав протеасом: 31% конститутивных, 15% иммунных, 50% смешанной формы с каталитическими субъединицами  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5i$  и 4% смешанной формы с каталитическими субъединицами  $\beta 1i$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5i$ . Существование таких смешанных форм протеасом изменяет репертуар представляемых на поверхности клеток антигенных пептидов, что также может влиять на реализацию иммунного ответа в печени.

В равной степени на реализацию этого процесса может влиять уровень экспрессии ГКГ класса I, который коррелирует с эффективностью распознавания клеток-мишеней цитотоксическими Т-лимфоцитами. В соответствии с этим утверждением существовала гипотеза о том, что толерантность печени связана с отсутствием ГКГ класса I на поверхности гепатоцитов [5]. Позже было установлено, что гепатоциты экспрессируют молекулы ГКГ класса I в количестве, сравнимом с уровнем экспрессии этих молекул в спленоцитах. Однако уровень транскрипции LMP2, LMP7 и TAP2 в гепатоцитах оказался в 5 раз, а TAP1 – в 10 раз ниже, чем в спленоцитах [12]. Таким образом, образование антигенных олигопептидов, осуществляемое иммунными и/или смешанными протеасомами, в гепатоцитах уменьшено по сравнению со спленоцитами. Можно сказать, что и клеточный ГКГ-статус, и набор множественных форм протеасом являются важными критериями, определяющими существование иммунологической толерантности печени.

### **3. ИНДУКЦИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПОСЛЕ ИНТРАПОРТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДОНОРСКИХ КЛЕТОК**

В XX–XXI вв. трансплантология из экспериментальной науки вышла на лидирующие позиции в области клинической медицины. Основной проблемой при трансплантации органов и тканей является иммунологическое отторжение [2]. Для подавления отторжения трансплантата применяют два принципиально различных подхода: средства, неспецифически подавляющие иммунный ответ организма на чужеродные антигены (иммуносупрессивная терапия), и создание специфической толерантности реципиента к трансплантату. Второй подход является более физиологичным и имеет ряд преимуществ, основное из которых – возможность избежать пожизненного приема иммунодепрессантов и связанных с этим тяжелых системных осложнений [3]. Изучение механизмов индукции иммунной толерантности реципиента к донорским органам и тканям является одной из актуальнейших задач современной биологии и медицины.

Анализ клинических и экспериментальных трансплантаций свидетельствует о том, что физиологические механизмы регуляции иммунного ответа в печени, к которым относится портальная толерантность, могут быть с успехом задействованы в трансплантологии.

В трансплантологии существует двойкий феномен толерогенности печени: как объекта трансплантации и как сайта трансплантации. Аллогенный трансплантат печени может быть принят организмом реципиента без иммуносупрессии у многих видов млекопитающих [7, 8]. При клинической трансплантации такая ситуация наблюдается редко в связи с осложнениями, развивающимися при терминальной стадии печеночной недостаточности, когда, собственно, и применяют пересадку печени. Присутствие аллогraftа печени может угнетать отторжение другого органа, одновременно пересаженного от того же самого донора [21]. Протокол донорства печени при подборе пары «донор–реципиент» не требует совпадения по антигенам HLA, считая достаточным совпадение по группе крови [29]. Островки поджелудочной железы, трансплантированные через портальную вену в печень, выживают в организме реципиента несравненно дольше, чем в других органах. В последнее время в клиническую практику лечения инсулин-зависимого сахарного диабета стал внедряться Эдмонтонский протокол, включающий интрапортальную трансплантацию островков.

Один из основоположников трансплантологии П. Медавар еще в 60-х годах прошлого века установил, что при трансплантации кожи у животных, которым еще внутриутробно была сделана инъекция донорских спленоцитов, не наблюдается реакции отторжения.

В настоящее время в практике трансплантации, как клинической, так и экспериментальной, накоплено множество фактов, которые свидетельствуют о возможности увеличения срока выживаемости трансплантата или об индукции специфической иммунологической толерантности к трансплантату путем предварительного введения донорского антигена в организм реципиента [10, 19, 26, 30, 31, 37, 47]. Это явление называется донор-специфической толерантностью (ДСТ).

Способ индукции ДСТ реализуется следующим образом (рис. 3). На первом этапе осуществляют введение донорских клеток (моноклеаров периферической крови, клеток лимфоузлов, селезенки, костного мозга) в периферический кровоток или в портальную вену печени за 7–14 дней до трансплантации. На втором этапе производят трансплантацию органа или ткани от того же донора. Возможно использование иммуносупрессии в промежутке между этапами.



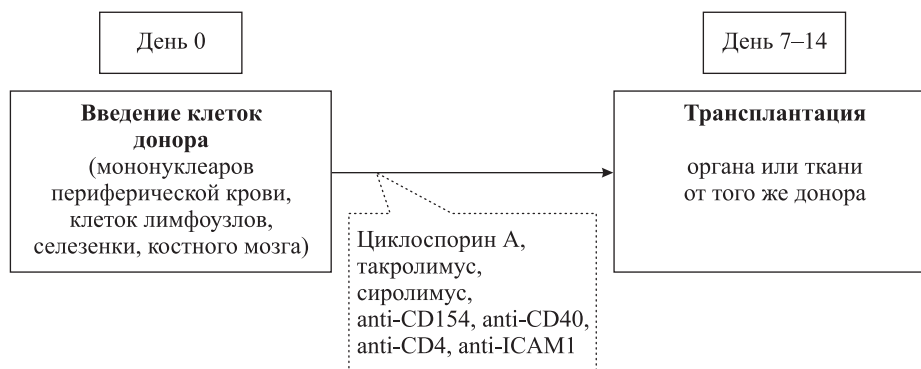


Рис. 3. Схема индукции донор-специфической толерантности

Эффект ДСТ был показан при аллотрансплантации целых органов (почки, сердце), тканей (кишечник, кожа, периферический нерв, овариальная ткань) и островков поджелудочной железы [1, 10, 15, 19, 22, 26, 30, 31, 37, 40]. Наступление состояния толерантности к трансплантату зависело от места введения (периферические сосуды или портальная вена печени) [27, 34], периода времени от введения лимфоцитов до трансплантации [34], повторности претрансплантационных обработок [35], дозы вводимого антигена [15]. Установлено, что наиболее эффективным способом индукции ДСТ является введение донорского антигена в портальную вену печени минимум за 7 дней до трансплантации [15, 34], повышение дозы вводимых клеток негативно влияет на индукцию ДСТ [15].

Нужно отметить, что ДСТ наступает не в 100% случаев. Конкретные механизмы данного явления изучены недостаточно. Установлено, что возможными механизмами реализации ДСТ на этапе, который следует за презентацией донорского антигена, являются клональная делеция цитотоксических Т-лимфоцитов, индукция анергии Т-лимфоцитов, уклонение их от иммунного ответа (девиация), активация регуляторных Т-лимфоцитов, микрохимеризм [14, 24, 45]. Определяющая роль в презентации донорского антигена и дальнейшем процессе развития ответа в сторону принятия или отторжения трансплантата принадлежит печени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание механизмов развития толерантности к трансплантату невозможно без знания особенностей функционирования пула протеасом и закономерностей изменения соотношения их форм в печени как в ДСТ-«формирующем» органе. О важной роли протеасом в регуляции иммунного ответа при трансплантации свидетельствует факт применения протеасомного ингибитора бортезомиба в качестве иммуносупрессанта [43]. Знание особенностей функционирования пула протеасом и закономер-

ностей изменения соотношения их форм в печени позволит выявить механизмы развития ДСТ и установить ключевые звенья процессов отторжения и приживаемости трансплантата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Божок Г.А., Киришча В.В., Тищенко Ю.О., Легач Е.И. Предтрансплантационное введение донорских лимфоцитов пролонгирует выживаемость аллогенной ткани яичников у овариэктомированных животных реципиентов // Проблемы эндокринной патологии. 2009. №4. С. 15–18.
2. Poim A., Brostoff D., Meil D. Иммунология. М.: Мир, 2000. 592 с.
3. Шумаков В.И. Трансплантология: Руководство для врачей. М.: Медицина, 1995. 575 с.
4. Arrigo A.P., Tanaka K., Goldberg A.L., Welch W.J. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multi-functional protease complex of mammalian cells (the proteasome) // Nature. 1988. Vol. 331. P. 192–194.
5. Barbatis C., Woods J., Morton J.A., Fleming K.A. et al. Immunohistochemical analysis of HLA (A, B, C) antigens in liver disease using a monoclonal antibody // Gut. 1981. Vol. 22 (12). P. 985–991.
6. Bertolino P., Bowen D.G., McCaughan G.W., Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver // J. Immunol. 2001. Vol. 166 (9). P. 5430–5438.
7. Calne R.Y. Mechanisms in the acceptance of organ grafts // Br. Med. Bull. 1976. Vol. 32. P. 107–112.
8. Calne R.Y., Sells R.A., Pena J.R., Davis D.R. et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts // Nature. 1969. Vol. 223. P. 472–476.
9. Cascio P., Hilton C., Kisselev A.F., Rock K.L. et al. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide // EMBO J. 2001. Vol. 20 (10). P. 2357–2366.
10. Chalermkulrat W., McKinnon K.P., Brickey W.J., Neuringer I.P. et al. Combined donor specific transfusion and anti-CD154 therapy achieves airway allograft tolerance // Thorax. 2006. Vol. 61 (1). P. 61–67.
11. Chen C.H., Kuo L.M., Chang Y., Wu W. et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice // Hepatology. 2006. Vol. 44. P. 1171–1181.

12. *Chen M., Tabaczewski P., Truscott S.M., Van Kaer L. et al.* Hepatocytes express abundant surface class I MHC and efficiently use transporter associated with antigen processing, tapasin, and low molecular weight polypeptide proteasome subunit components of antigen processing and presentation pathway // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175 (2). P. 1047–1055.
13. *Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L.* Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. Vol. 65. P. 801–847.
14. *Crispe I.N., Matthew G., Ingo K., Beena J. et al.* Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance // *Immunological Reviews.* 2006. Vol. 213. P. 101–118.
15. *Dhanireddy K.K., Bruno D.A., Weaver T.A., Xu H. et al.* Portal venous donor-specific transfusion in conjunction with sirolimus prolongs renal allograft survival in non-human primates // *Am. J. Transplant.* 2009. Vol. 9 (1). P. 124–131.
16. *Erhardt A., Biburger M., Papadopoulos T., Tiegs G.* IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice // *Hepatology.* 2007. Vol. 45. P. 475–485.
17. *Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J. et al.* Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits // *J. Exp. Med.* 1998. Vol. 187. P. 97–104.
18. *Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D. et al.* Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107 (43). P. 18599–18604.
19. *Iwata H., Umeda Y., Matsuno Y., Yoshikawa S. et al.* Prolongation of xenograft survival by combining donor-specific intravenous presensitization with FK 506 // *Transplant. Proc.* 2002. Vol. 34. P. 2745–2748.
20. *Jung T., Bader N., Grune T.* Oxidized proteins: intracellular distribution and recognition by the proteasome // *Arch. Biochem. Biophys.* 2007. Vol. 462 (2). P. 231–237.
21. *Kamada N., Davies H.F.S., Roser B.* Reversal of transplantation immunity by liver grafting // *Nature.* 1981. Vol. 292. P. 840–842.
22. *Kenick S., Lowry R.P., Forbes R.D.S., Lisbona R.* Prolonged cardiac allograft survival following portal venous inoculation of allogeneic cells: What is «hepatic tolerance?» // *Transplant. Proc.* 1987. Vol. 19. P. 478–479.
23. *Kloetzel P.M., Ossendorp F.* Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation // *Curr. Opin. Immunol.* 2004. Vol. 16 (1). P. 76–81.
24. *Knolle P.A., Gerken G.* Local control of the immune response in the liver // *Immunological Reviews.* 2000. Vol. 174. P. 21–34.
25. *Knolle P.A., Germann T., Treichel U., Uhrig A. et al.* Endotoxin downregulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162. P. 1401–1407.
26. *Markees T.G., Phillips N.E., Noelle R.J., Shultz L.D. et al.* Prolonged survival of mouse skin allografts in recipients treated with donor splenocytes and antibody to CD40 ligand // *Transplantation.* 1997. Vol. 64 (2). P. 329–335.
27. *Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczyk K., Wruk M. et al.* Prolongation of rat kidney graft survival after inoculation of allogeneic spleen cells: the effect of various routes of cell transfer // *Ann. Transplant.* 2002. Vol. 7 (2). P. 51–53.
28. *Onoe T., Ohdan H., Tokita D., Shishida M. et al.* Liver sinusoidal endothelial cells tolerate T cells across MHC barriers in mice // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175. P. 139–146.
29. *Opelz G., Wujciak T., Dohler B., Scherer S. et al.* HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study // *Rev. Immunogenet.* 1999. Vol. 1. P. 334–342.
30. *Patel R.D., Vanikar A.V., Aziz F.A., Shah P.R. et al.* Ahmedabad tolerance induction protocol and chronic renal allograft dysfunction: pathologic observations and clinical implications // *Diagn. Pathol.* 2009. Vol. 4. P. 4–9.
31. *Parker D.C., Greiner D.L., Phillips N.E., Appel M.C. et al.* Survival of mouse pancreatic islet allografts in recipients treated with allogeneic small lymphocytes and antibody to CD40 ligand // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92 (21). P. 9560–9564.
32. *Parker G.A., Picut C.A.* Liver immunobiology // *Toxicol. Pathol.* 2005. Vol. 33 (1). P. 52–62.
33. *Rock K.L., Goldberg A.L.* Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides // *Annu. Rev. Immunol.* 1999. Vol. 17. P. 739–779.
34. *Sato Y., Farges O., Buffello D., Hatakeyama K. et al.* Impact of 70% partial hepatectomy on administration of donor leukocytes in cardiac transplantation in rats // *Transplant. Proc.* 1998. Vol. 30. P. 3873–3875.
35. *Sato Y., Ichida T., Watanabe H., Yamamoto S. et al.* Repeating intraportal donor-specific transfusion may induce tolerance following adult living-related donor liver transplantation // *Hepatogastroenterology.* 2003. Vol. 50 (51). P. 601–606.
36. *Sharova N.P., Zakharova L.A., Astakhova T.M., Karpova Ya.D. et al.* New approach to study of T cellular immunity development: Parallel investigation of lymphoid organ formation and changes in immune proteasome amount in rat early ontogenesis // *Cell. Immunol.* 2009. Vol. 256. P. 47–55.
37. *Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M., Ogino T. et al.* Prolonged survival of donor-specific rat intestinal allograft by administration of bone-marrow-derived immature dendritic cells // *Transpl. Immunol.* 2005. Vol. 14 (1). P. 17–20.
38. *Tewari M.K., Sinnathamby G., Rajagopal D., Eisenlohr L.C.* A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent // *Nat. Immunol.* 2005. Vol. 6. P. 287–294.
39. *Tokita D., Shishida M., Ohdan H., Onoe T. et al.* Liver sinusoidal endothelial cells that endocytose allogeneic cells suppress T cells with indirect allospecificity // *J. Immunol.* 2006. Vol. 177. P. 3615–3624.
40. *Tung T.H., Doolabh V.B., Mackinnon S.B., Mohanakumar T. et al.* Survival of long nerve allografts following donor antigen pretreatment: a pilot study // *J. Reconstr. Microsurg.* 2006. Vol. 22 (6). P. 443–449.

41. *Visekruna A., Joeris T., Schmidt N., Lawrenz M. et al.* Comparative expression analysis and characterization of 20S proteasomes in human intestinal tissues: The proteasome pattern as diagnostic tool for IBD patients // *Inflamm. Bowel Dis.* 2009. Vol. 15 (4). P. 526–533.
42. *Voges D., Zwickl P., Baumeister W.* The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis // *Annu. Rev. Biochem.* 1999. Vol. 68. P. 1015–1068.
43. *Walsh R.C., Everly J.J., Brailey P., Rike A.H. et al.* Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection // *Transplantation.* 2010. Vol. 89 (3). P. 277–284.
44. *Walz J., Erdmann A., Kania M., Typke D. et al.* 26S proteasome structure revealed by three-dimensional electron microscopy // *J. Struct. Biol.* 1998. Vol. 121. P. 19–29.
45. *Watanabe T., Kudo M., Chiba T., Wakatsuki Y.* Molecular mechanisms of portal vein tolerance // *Hepatology Research.* 2008. Vol. 38. P. 441–449.
46. *Wilk S., Orłowski M.* Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex // *J. Neurochem.* 1983. Vol. 40 (3). P. 842–849.
47. *Yang L., Du Temple B., Khan Q., Zhang L.* Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes // *Blood.* 1998. Vol. 91 (1). P. 324–330.

## ПРИМЕНЕНИЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ НАСОСОВ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФУНКЦИИ МИОКАРДА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

*Иткин Г.П., Трухманов С.Б., Шемакин С.Ю., Попцов В.Н., Шумаков Д.В., Готье С.В.*

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва

В обзоре представлены данные о результатах восстановления функции миокарда у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности (ХСН) при длительном применении систем вспомогательного кровообращения. Наиболее эффективные методы лечения хронической сердечной недостаточности получены при сочетанном применении левожелудочкового обхода и медикаментозной терапии, направленных на нормализацию клеточных, структурных и функциональных характеристик миокарда («обратное ремоделирование»). Важным этапом восстановления миокарда до эксплантации насосов является создание условий для «физиологической гипертрофии» сердца. Применение данных методик открывает путь к лечению больных с дилатационной кардиомиопатией, альтернативный трансплантации сердца.

*Ключевые слова:* вспомогательное кровообращение, дилатационная кардиомиопатия, сердечная недостаточность, обход левого желудочка, пульсирующий насос, неппульсирующий насос, ремоделирование.

## THE USE OF VENTRICLE ASSIST DEVICES TO RESTORE MYOCARDIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE

*Itkin G.P., Trukhmanov S.B., Shemakin S.Yu., Poptsov V.N., Shumakov D.V., Gautier S.V.*

Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The review presents the data on the results of recovery the myocardial function in patients with end-stage chronic heart failure and prolonged using of the systems assist device. The most effective treatment of the chronic heart failure was received by the combination of the left ventricular bypass and the medical therapy aimed at normalizing the cellular, structural and functional characteristics of the myocardium («reverse remodeling»). An important step in restoring the myocardium to explantation pump is to create the conditions for the «physiologic hypertrophy» of the heart. The application of this technology will open the way for the treatment of patients with dilated cardiomyopathy, alternative heart transplantation.

*Key words:* assist circulation, dilated cardiomyopathy, heart failure, left ventricle assist device, blood pump, pulsatile pump, nonpulsatile pump, remodeling.

### ВВЕДЕНИЕ

Количество пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) постоянно растет, а золотой стандарт лечения этих пациентов за счет пересадки донорского сердца ограничен количе-

ством донорских органов. Это требует разработки альтернативных, нетрансплантационных методов лечения ХСН.

До сегодняшнего дня вспомогательные насосы (ВН) рассматривались либо в качестве моста для

*Статья поступила в редакцию 3.06.11 г.*

*Контакты:* Иткин Георгий Пинкусович, заведующий лабораторией биотехнических систем.

*Тел. 8 (916) 129-78-33, e-mail: georgeitkin@mail.ru*

последующей трансплантации сердца, либо подключение насосов позволяло продлить жизнь пациентам, которым было отказано в трансплантации из-за сопутствующих болезней или из-за возраста, так называемая «destination» терапия. Отдельную категорию пациентов, которым ВН оказывает эффективную помощь, составляют пациенты с острой сердечной недостаточностью (ОСН) (посткардиотомная ОСН, острый инфекционный миокардит и в отдельных случаях инфаркт миокарда). Однако данная категория пациентов составляет лишь незначительную часть от общего количества пациентов с тяжелыми формами ОСН. Применение методов вспомогательного кровообращения доказало свою эффективность в лечении данной группы пациентов за счет восстановления общего кровотока и частичной или полной разгрузки миокарда.

Отдельные редкие случаи восстановления миокарда при обходе левого желудочка сердца (ОЛЖ) у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) (от 1 до 5%) скорее считались исключением, чем направлением лечения пациентов с ДКМП, альтернативным трансплантации сердца. При этом хроническую СН связывали с клеточными, структурными и функциональными изменениями в миокарде. А соответствующие патологические процессы «ремоделирования» миокарда рассматривались как необратимые.

Однако все более частые случаи восстановления миокарда при ХСН с использованием методов ОЛЖ в последние годы позволяют по-новому подойти к рассмотрению данной проблемы.

Проведенные эхокардиографические исследования у пациентов с имплантированными насосами [7] показали значительное увеличение фракции выброса (ФВ) и уменьшение конечно-диастолического размера (КДР) ЛЖ через 2–3 месяца при тестовом снижении производительности ВН. Одновременно гистологические исследования биопсий ЛЖ показали значительное уменьшение размеров миоцитов.

В другой работе Levin et al. [11] провели сравнительное исследование двух групп пациентов, находящихся в листе ожидания на трансплантацию: пациентов с ОЛЖ в качестве моста для трансплантации и пациентов, которых лечили только медикаментозной терапией. Было показано, что у пациентов первой группы имело место значительное уменьшение КДР по сравнению со второй группой.

Первым значимым успехом восстановления миокарда у пациентов с ДКМ [6] была экплантация ВН у 4 пациентов из 5, которые остались живы и чувствовали себя хорошо через 35, 33, 14 и 2 месяца после удаления насоса.

Однако ретроспективный обзор 111 пациентов [12], из которых 46% имели ДКМП, показал,

что только у 5 пациентов (4,5%) удалось успешно эксплантировать насос. Тем не менее только один пациент имел хорошую функцию ЛЖ и оставался живым в течение 15 месяцев. И именно с данной работой связывают некоторое разочарование в возможности длительного восстановления функции миокарда с помощью ОЛЖ.

Дальнейшее применение ОЛЖ в качестве моста для последующей трансплантации сердца, проведенное на больших группах пациентов, позволило продолжить исследования возможности отключения насоса. В частности, результаты регистра из 271 пациента с неишемической ДКМП и имплантированным левожелудочковым насосом (ЛЖН) Thoratec [15] показали, что у 22 пациентов (8,1%) была произведена экплантация ЛЖН. При этом в конце первого года после экплантации выживали 86%, а к концу 5-го года после экплантации – 77%.

Успешной можно назвать работу Берлинской группы [5]: в марте 2004 г. они эксплантировали ЛЖН у 32 из 124 наблюдаемых пациентов с ДКМП (24,4%). Выживаемость этих пациентов в 3- и 5-летние постоперационные периоды составила 69,4 и 58,2% соответственно. Интересно отметить, что у подавляющего большинства пациентов длительность заболевания ХСН была более 5 лет.

Эта же группа в 2008 г. [4] представила результаты экплантации у 35 из 188 пациентов с неишемической ДКМ (18,5%). Впоследствии выживаемость этих пациентов в течение 5 и 10 лет после экплантации ЛЖН была 76,2 и 70,7% соответственно.

Однако наиболее впечатляющими, можно назвать их даже сенсационными, являются результаты восстановления миокарда у пациентов с ХСН, полученные в клинических исследованиях Harefield Hospital (Великобритания) [1, 2]. В отличие от других аналогичных работ в данном центре была разработана стратегия восстановления миокарда у пациентов с ХСН, сочетающая механическую разгрузку ЛЖ с фармакотерапией, направленной на «обратное ремоделирование» миокарда. Кроме того, в этих исследованиях более строго подходили к отбору группы пациентов. В частности, исследовались пациенты с неишемической ДКМП. По общемировой статистике, популяция пациентов с неишемической ДКМ примерно совпадает с популяцией пациентов с ишемической ДКМП.

Наиболее важным этапом в протоколе исследований авторы считают регулярную (ежемесячную) эхокардиографическую оценку камер ЛЖ (конечно-диастолический, конечно-систолический диаметры ЛЖ, фракцию выброса) при 15-минутном отключении вспомогательного насоса (в случае пульсирующего ЛЖН) или снижении его производительности (в случае неппульсирующего ЛЖН).

В первую серию исследований, проведенных с конца 1999 г. до середины 2001 г., были включены 15 пациентов с неишемической ДКМП (по классификации NYHA пациенты относились к классу IV), которым был имплантирован пульсирующий ЛЖН Heartmate XVE (Thoratec Inc) с электромеханическим приводом [2].

Процесс восстановления миокарда проходил в две стадии. На первом этапе на фоне работающего ЛЖН проводили медикаментозную терапию с использованием ингибиторов и ангиотензин-конвертируемых энзимов,  $\beta$ -блокаторов, антагонистов ангиотензина II, антагониста альдостерона и дигоксина. Авторы утверждают, что использование *больших доз* данных препаратов (25 мг Carvedilol 3 раза в день и ежедневно 40 мг Lisinopril, 100 мг Losartan, 25 мг Spironolactone и 125 мкг Dioxin), способствующих снижению патологической гипертрофии миокарда, возможно только при нормализации с помощью ЛЖН общего кровотока и органных функций.

На втором этапе было достигнуто устойчивое восстановление функции миокарда, подтвержденное результатами эхокардиографического исследования камер ЛЖ и нормализацией давления заклинивания легочных капилляров и сердечного индекса, и авторы начинают использовать препарат Clenbuterol, вызывающий «физиологическую гипертрофию» миокарда за счет увеличения постнагрузки, поскольку при длительной механической разгрузке (в данном исследовании среднее время работы ЛЖН составляло 7,5 месяца) происходит атрофия миокарда, и данный этап очень важен для подготовки миокарда к эксплантации насоса. Результат данной работы показал, что у 11 из 15 пациентов (73%) отмечалось устойчивое восстановление функции миокарда; выживаемость через 1 и 4 года после эксплантации была соответственно 90,9 и 81,8%. Повторных признаков СН у выживших пациентов в конце первого года не было, а в конце четвертого года – у 81,8%.

Данная работа, видимо, стимулировала проведение проспективного исследования 67 пациентов (из них 37 с неишемической ДКМП и 30 с ишемической ДКМП) консорциумом семи медицинских центров США [13] с середины 2001-го по октябрь 2003 г. Результатом работы было полное восстановление функции миокарда у 5 пациентов с неишемической ДКМП (13,5%). Относительно невысокий процент восстановления миокарда можно объяснить тем, что оценка функции миокарда производилась без отключения насоса при снижении производительности насоса до 4 л/мин. Кроме того, критерии восстановления миокарда и эксплантации ЛЖН определялись в каждом центре индивидуально.

С середины 2007 г. девять ведущих центров США начали другое проспективное исследование восстановления миокарда у пациентов с ДКМП с использованием протокола Harefield Hospital [8]. Окончание исследования планируется на середину 2012 г.

Следующая серия исследований в Harefield Hospital [1] проводилась в группе из 20 пациентов с неишемической ДКМП (IV класс NYHA) с 2006-го по 2008 год. В качестве ЛЖН использовался имплантируемый осевой насос Heartmate II, который в последние годы получил широкое внедрение в клиниках США и Европы в качестве моста для трансплантации сердца [9, 16]. Эти насосы имеют ряд преимуществ перед пульсирующими насосами, и главное – малые габариты и вес, что делает их более удобными для имплантации и эксплантации. Они бесшумны и обладают большим ресурсом, так как имеют только одну движущуюся деталь – ротор. С точки зрения взаимодействия с сердцем полагают, что пульсирующие насосы по сравнению с неппульсирующими роторными насосами позволяют более полно разгружать ЛЖ. Но поскольку практически все пульсирующие насосы (имплантируемые и паракорпоральные) работают в несинхронном автоматическом режиме полного заполнения и опорожнения (full/empty), то преимущество разгрузки ЛЖ ограничено. Использование в качестве ЛЖН Heartmate II ставило перед группой Harefield Hospital новую задачу определения влияния неппульсирующего потока на эффективность восстановления миокарда. Авторы использовали ранее предложенную двухэтапную методику восстановления миокарда. Отличие от предыдущей методики состояло в том, что осевой насос нельзя полностью отключать при проведении теста на восстановление миокарда, так как при этом происходит обратный сброс крови из аорты в ЛЖ, т. е. аортальная недостаточность. Поэтому авторы при проведении пробы на восстановление миокарда снижали частоту вращения ротора насоса до 6000 об./мин. Это соответствовало минимальной производительности насоса.

В результате 12 пациентов из 20 (60%) показали удовлетворительное для эксплантации восстановление миокарда. У большинства пациентов миокард восстанавливался в течение 6–7 месяцев работы ЛЖН и только у 2 пациентов – в течение 12–14 месяцев. Все восстановленные пациенты оставались в классе I (NYHA). Выживаемость к третьему году после эксплантации была 83,3%. Следует отметить, что среди остальных 8 пациентов, не попавших в группу восстановления, трем пациентам было трансплантировано донорское сердце, 4 находятся в листе ожидания, и один умер.

Определенные успехи по восстановлению миокарда достигнуты Берлинской группой с помощью

имплантации осевого насоса Incor (Berlin Heart AG), которая успешно эксплантировала насос у 5 пациентов [16]. Общая выживаемость в среднем составляла 2,4 года, и по классификации NYHA один пациент относился к классу I, четверо – к классу II.

Полученные данные подтверждают, что использование неппульсирующих насосов, обладающих рядом преимуществ перед пульсирующими насосами (габариты, вес и др.), разгружает ЛЖ до степени, необходимой для восстановления сердца. Повидимому, с учетом перспективы их использования для восстановления миокарда и особенностей работы в режиме мониторинга фаз восстановления необходимо пересмотреть требования к конструкции и системам управления этими насосами [10].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный обзор показывает значительный прогресс в лечении пациентов с ХСН при механической разгрузке миокарда, которая способствует активизации механизмов «обратного ремоделирования». Предложенная в клинике Harefield методика сочетанной фармакотерапии и разгрузки ЛЖ с помощью вспомогательных насосов на сегодняшний день является наиболее результативной в восстановлении тяжелых форм СН, хотя и проверена на относительно небольшом контингенте пациентов. Безусловно, в этом направлении еще много неясных вопросов, связанных с клеточными, молекулярными и структурными изменениями в миокарде. Исследование биоптатов, полученных у пациентов во время имплантации и при эксплантации ЛЖН, показали уменьшение размеров и массы миоцитов, регрессию клеточной гипертрофии, улучшение внутриклеточного транспорта кальция в кардиомиоцитах [1, 2, 3, 14]. Причем изменения на молекулярном, клеточном и интерстициальном уровне зачастую не соответствуют улучшению функции миокарда. Это говорит о скрытых резервах реверсного ремоделирования.

Применение методов комбинированной разгрузки миокарда и медикаментозных средств, направленных на «обратное ремоделирование» на уровне клеток и тканей в миокарде, а также поиск путей интенсификации этих процессов с помощью генной инженерии, технологии стволовых клеток и др. могут открыть новое направление в лечении пациентов с тяжелыми формами сердечной недостаточности, альтернативное пересадке сердца, и значительно увеличить объем радикальной помощи, оказываемой большому количеству пациентов, с улучшением качества их жизни.

Таким образом, восстановление миокарда с использованием вспомогательных насосов является одним из важнейших путей развития современной кардиохирургии. В свою очередь, это ставит новые

задачи по разработке имплантируемых насосов и техники имплантации /эксплантации, отвечающих требованиям данной технологии лечения хронической сердечной недостаточности.

В связи с этим мы полагаем провести работы по модификации разрабатываемого нами при частичной финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (*государственный контракт № 02.522.12.2010 от 2009 г.*) имплантируемого осевого насоса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Birks E.J., George R.S., Hender M. et al. Assist Device and Pharmacological Therapy: A Prospective Study Reversal of Severe Heart Failure With a Continuous-Flow Left Ventricular // *Circulation*. 2011. Vol. 123. P. 381–390.
2. Birks E.J., Tansley P.D., Hardy J.R.S. et al. Left Ventricular Assist Device and Drug Therapy for the Reversal of Heart failure // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355. P. 1873–1884.
3. Burkhoff D., Holmes J., Madigan J. et al. Left Ventricular Assist Device-Induced Reverse Ventricular Remodeling // *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2000. Vol. 43 (1). P. 19–26.
4. Dandel M., Weng Y., Siniawski H. et al. Prediction of cardiac stability after weaning from left ventricular assist devices in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy // *Circulation*. 2008. Vol. 118 (1 Suppl). P. S94–S105.
5. Dandel M., Weng Y., Siniawski H. et al. Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices // *Circulation*. 2005. Vol. 112 (9 Suppl). P. I37–I45.
6. Frazier O.H., Myers T.J. Left ventricular assist system as a bridge to myocardial recovery // *Ann. Thorac. Surg.* 1999. Vol. 68 (2). P. 734–741.
7. Frazier O.H., Radovancevic B., Abou-Awdi N.L. et al. Ventricular remodeling after prolonged ventricular unloading «Heart Rest» experience with the heartmate left ventricular assist device // *J. Heart. Lung. Transplant.* 1994. Vol. 13 (1, pt 2). P. 77.
8. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/>
9. John R., Kamdar F., Liao K. et al. Improved Survival and Decreasing Incidence of Adverse Events With the HeartMate II Left Ventricular Assist Device as Bridge-to-Transplant Therapy // *Ann. Thorac. Surg.* 2008. Vol. 86. P. 1227–1235.
10. Komoda T., Komoda S., Dandel M. et al. Explantation of INCOR left ventricular assist device after myocardial recovery // *J. Card. Surg.* 2008. Vol. 23. P. 642–647.
11. Levin H.R., Oz M.C., Chen J.M. et al. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading // *Circulation*. 1995. Vol. 91 (11). P. 2717–2720.
12. Mancini D.M., Benjaminovitz A., Levin H. et al. Low incidence of myocardial recovery after left ventricular assist device implantation in patients with chronic heart failure // *Circulation*. 1998. Vol. 98. P. 2383–2389.

13. *Maybaum S., Mancini D., Xydas S. et al.* Cardiac Improvement During Mechanical Circulatory Support. A Prospective Multicenter Study of the LVAD Working Group // *Circulation*. 2007. Vol. 115. P. 2497–2505.
14. *Moscato F., Arabia M., Colacino F.M. et al.* Left Ventricle Afterload Impedance Control by an Axial Flow Ventricular Assist Device: A Potential Tool for Ventricular Recovery // *Artificial Organs*. 2010. Vol. 34 (9). P. 736–744.
15. *Simon M.A., Kormos R.L., Murali S. et al.* Myocardial recovery using ventricular assist devices: Prevalence, clinical characteristics, and outcomes // *Circulation*. 2005. Vol. 112 (9 Suppl). P. I32–I36.
16. *Slaughter M.S., Rogers J.G., Milano C.A. et al.* Advanced Heart Failure Treated with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 361. P. 2241–2251.

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**



Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;"><b>80248</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: small;">(индекс издания)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: x-small;">КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ</td> </tr> </table>	<b>80248</b>	(индекс издания)	КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																					
<b>80248</b>																										
(индекс издания)																										
КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																										
на 2011 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;">1</td><td style="width: 5%;">2</td><td style="width: 5%;">3</td><td style="width: 5%;">4</td><td style="width: 5%;">5</td><td style="width: 5%;">6</td><td style="width: 5%;">7</td><td style="width: 5%;">8</td><td style="width: 5%;">9</td><td style="width: 5%;">10</td><td style="width: 5%;">11</td><td style="width: 5%;">12</td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда _____ <small>(почтовый индекс) (адрес)</small>																										
Кому _____ <small>(фамилия, инициалы)</small>																										
Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	ДОСТАВочНАЯ КАРТОЧКА на журнал <b>80248</b> <small>(индекс издания)</small>																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%; font-size: x-small;">ПВ</td> <td style="width: 10%; font-size: x-small;">место</td> <td style="width: 10%; font-size: x-small;">ли-тер</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table>			ПВ	место	ли-тер																					
ПВ	место	ли-тер																								
на 2011 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 5%;">1</td><td style="width: 5%;">2</td><td style="width: 5%;">3</td><td style="width: 5%;">4</td><td style="width: 5%;">5</td><td style="width: 5%;">6</td><td style="width: 5%;">7</td><td style="width: 5%;">8</td><td style="width: 5%;">9</td><td style="width: 5%;">10</td><td style="width: 5%;">11</td><td style="width: 5%;">12</td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда _____ <small>(почтовый индекс) (адрес)</small>																										
Кому _____ <small>(фамилия, инициалы)</small>																										



## ОСНОВНЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ И УРОСЕПСИСА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

*Крстич М., Ватазин А.В., Прокопенко Е.И.*

ГУ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва

В настоящем обзоре представлены современные данные об инфекции мочевых путей и уросепсисе после аллогенной трансплантации почки. Уросепсис является чрезвычайно серьезным осложнением у данной категории больных. Дифференцированный подход к ранней этиологической, патогенетической диагностике до сих пор остается приоритетной проблемой современной трансплантологии, так как летальность при уросепсисе остается стабильно высокой и составляет не менее 60%.

*Ключевые слова:* инфекции мочевых путей, уросепсис, трансплантация почки, иммуносупрессивная терапия.

## MAIN PATHOGENETIC MECHANISMS IN URINARY TRACT INFECTIONS AND UROSEPSIS AFTER ALLOGENIC KIDNEY TRANSPLANTATION

*Krstić M., Vatazin A.V., Prokopenko E.I.*

M.F. Vladimirsky Moscow regional clinical research institute, Moscow

This review presents recent data on urinary tract infections and urosepsis after allogeneic kidney transplantation. Urosepsis is an extremely serious complication in these patients. Differentiated approach to early etiological, pathogenetic diagnosis still remains a priority problem of modern transplantation, as mortality in urosepsis remains high and is at least 60%.

*Key words:* urinary tract infections, urosepsis, kidney transplantation, immunosuppressive therapy.

Отличительной особенностью последней четверти XX века и первого десятилетия наступившего столетия является стремительное развитие медицинских технологий. Среди них существенное место занимает трансплантация органов, тканей и клеток. Всего полвека назад были выполнены первые операции трансплантации почки для лечения терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ТХПН). В настоящее время в мире эти высокотехнологичные операции уже исчисляются десятками тысяч [20–22]. Число реципиентов с функционирующими ренальными трансплантатами (РТ) в США составило 100 на миллион населения [41], а в Российской Федерации – 30,4 на миллион населения [3].

В последние десятилетия достигнуты серьезные успехи в борьбе с инфекционными осложнениями после трансплантации почки (ТП) [39, 40]. Однако проблема септических осложнений, связанных с инфекцией мочевых путей (ИМП) у реципиентов РТ, не утратила своей важности [56]. Уросепсис является чрезвычайно серьезным осложнением у данной категории больных, о чем свидетельствует летальность, которая остается стабильно высокой и составляет от 20 до 60% [9, 17]. Рецидивирующие ИМП после аллотрансплантации почки вносят существенный вклад в развитие хронической трансплантационной нефропатии, которая характеризуется прогрессирующим фиброзом почечной ткани с неизбежной потерей функции РТ [51].

*Статья поступила в редакцию 19.05.11 г.*

**Контакты:** Крстич Миролуб, младший научный сотрудник хирургического отделения органного донорства центра трансплантологии и диализа.

**Тел.** (926) 284-04-59, **e-mail:** dolce-vita07@mail.ru

Структурные или функциональные аномалии развития мочевой системы у реципиентов РТ, пожизненный прием иммуносупрессивных препаратов в посттрансплантационном периоде, урологические осложнения после трансплантации, отсроченная функция трансплантата, женский пол, беременность после трансплантации являются факторами риска развития септических осложнений, в частности, уросепсиса [26, 33].

По данным отчета United States Renal Data System (USRDS), реципиенты РТ имели повышенный риск госпитализации (в 41,53 раза) по поводу септицемии по сравнению с общей популяцией. Развитие септицемии у госпитализированных реципиентов чаще всего было связано с ИМП – в 30,6% случаев. У реципиентов РТ с септиемией средняя выживаемость составила 9,03 года по сравнению с 15,73 года у больных с ТП без данного осложнения [26, 27].

По данным М. Hohenfellner, возбудителями уросепсиса в основном являются грамотрицательные микроорганизмы [29, 45, 47, 49], как правило, это *Escherichia coli* (52%), *Enterobacteriaceae spp.* (22%) и *Pseudomonas aeruginosa* (4%). Доля грамположительной микрофлоры составляет 15%, в том числе *Staphylococcus aureus* – 10% и *Enterococcus spp.* – 5%. Примерно в 7% случаев обнаруживаются дрожжеподобные грибы, в том числе рода *Candida* [1, 4, 5, 19, 44, 49].

При уросепсисе возможны два пути попадания возбудителя в системный кровоток – это эндогенный и экзогенный путь. В случае реализации эндогенного пути имеется инфицированность мочевой системы потенциального реципиента до трансплантации и/или инфицированность донорского органа и/или наличие нозокомиальной (госпитальной) или внебольничной инфекции [32, 33, 54, 56]. Под экзогенным путем подразумевается инфицирование кровотока во время эндовезикальных манипуляций – катетеризации мочевого пузыря, установки мочеточникового стента, чрескожной пункционной нефростомии трансплантата, эпицистостомии, трансуретральной контактной литотрипсии, уретроцистоскопии и др. [13, 35, 55].

По мнению А.И. Неймарка с соавторами, тяжесть течения уросепсиса определяется взаимодействием трех основных факторов: во-первых, вирулентностью возбудителя инфекции; во-вторых, локализацией и состоянием первичного инфекционного очага; в-третьих, реактивностью организма [15]. Центральным звеном патогенеза уросепсиса является активация условно-патогенной флоры и реализация феномена бактериальной транслокации с увеличением в крови концентрации эндотоксина, вызывающего чрезмерную и неадекватную системную воспалительную реакцию. Кроме того, эндотоксин оказывает прямое и опосредованное

повреждающее действие на клетки, запускает множество каскадных реакций и стимулирует их дальнейшее течение [1, 19, 53]. Следует отметить усугубляющее воздействие операционного стресса, который приводит к декомпенсации функции жизненно важных органов, и прежде всего к срыву регуляторных и защитных механизмов иммунной системы, уже находящихся в состоянии дисфункции. Нарастание анергии, супрессия иммунного ответа, цитокиновый дисбаланс, который заключается в преобладании провоспалительных цитокинов над противовоспалительными, приводят к истощению антибактериальной защиты [7, 9, 19]. Все эти факторы создают необходимые условия для развития послеоперационных уросептических осложнений на фоне ИМП.

Кроме того, медикаментозная иммуносупрессия способствует повышению частоты ИМП и уросепсиса: установлена прямая зависимость между развитием септических осложнений, органной дисфункцией и степенью выраженности иммуносупрессии [4, 16, 30], о чем свидетельствует ретроспективное исследование, в которое были включены 1169 реципиентов РТ [23].

Каждому из современных иммуносупрессивных препаратов присущи специфические побочные эффекты [14, 16, 18]. К наиболее серьезным из них можно отнести уросептические осложнения, особенно вызванные условно-патогенными микроорганизмами. В определенных ситуациях риск развития этих осложнений увеличивается. На фоне проведения медикаментозной иммуносупрессии происходит угнетение пролиферации Т- и В-лимфоцитов, а также продукции антител, глубокое снижение противоинфекционного иммунитета. Взаимосвязь между локализацией очага инфекции и характером микрофлоры, запускающей инфекционно-воспалительный процесс, по мере прогрессирования септической реакции возрастает. К сожалению, пока не существуют иммуносупрессивных препаратов, абсолютно свободных от инфекционных осложнений [4, 6, 16, 31, 32, 48].

ИМП были подробно изучены у 134 больных после ТП. Частота ИМП составила 53,7%, частота уросепсиса значимо не различалась при использовании различных протоколов иммуносупрессии и составляла от 0% до 1,8%. У большинства пациентов (60,5%) ИМП развивались в первый месяц после операции. Доля больных с ИМП зависела от схемы иммуносупрессии: ИМП чаще наблюдались при использовании высоких доз кортикостероидов (КС) с азатиоприном, а также больших доз циклоспорина А с КС, и применении антилимфоцитарных антител (АТГ) в сравнении с трехкомпонентной иммуносупрессией [16, 23, 24, 42, 43, 46, 60]. В меньшей степени способствуют развитию ИМП и уросепсиса

са ингибиторы кальциневрина (циклоспорин и такролимус), являющиеся на данный момент основой иммуносупрессивной терапии у большинства пациентов после трансплантации [16, 28, 34, 37, 58].

Главным фактором, способствующим развитию ИМП и уросепсиса, является нарушение уродинамики в посттрансплантационном периоде. По данным разных авторов, обструктивные уропатии, встречающиеся в 10% случаев после ТП, возникают вследствие нарушений пассажа мочи функционального или органического генеза на уровне чашечно-лоханочного, лоханочно-мочеточникового, пузырно-уретерального сегментов [2, 8, 13]. В раннем послеоперационном периоде из РТ нередко поступает моча с большой примесью крови и слизи, которые могут вызвать обтурацию мочеточника при низкой скорости мочевыделения или отсроченной функции трансплантата, что, по мнению R.M. De Souza [36], вызывает в этой зоне накопление большого количества инфекционных агентов. На фоне наиболее агрессивной стартовой иммуносупрессии существует наибольшая опасность развития ИМП и уросептических осложнений. Известно, что в первые 6 месяцев после трансплантации инфекционные осложнения возникают у 52% пациентов, а в первый месяц после трансплантации в структуре осложнений преобладают ИМП [10]. Следует подчеркнуть, что частота инфекции мочевой системы составила 65,4% у больных с урологическими осложнениями после трансплантации против 40,7% у пациентов без урологических проблем. P.J. Dupont с соавторами справедливо указывают, что периодически возникающие ИМП могут повреждать ткань почечных трансплантатов и являться причиной уросепсиса даже в отсутствие рефлюкса [31, 38]. В качестве провоцирующих факторов рассматриваются длительная катетеризация мочевого пузыря, наличие мочеточникового стента. Причиной обструктивных осложнений служат перегиб или перекут мочеточника, сдавление мочеточника снаружи. Анатомическими элементами сдавления могут быть семенной канатик или круглая связка матки, скопления лимфы – лимфоцеле, а также другие компрессионные обструкции [11, 13, 50].

Все эти факторы благоприятствуют проникновению инфекции из мочевых путей в кровеносное русло за счет механизма лоханочно-венозных рефлюксов и приводят к развитию системной воспалительной реакции, а в дальнейшем – к развитию уросепсиса [7, 49].

Анатомическими причинами, способствующими уросепсису, могут быть не только урологические осложнения со стороны РТ, но и дисфункция мочевого пузыря реципиента. Зачастую выполняющиеся пациентам с урологической патологией еще до ТП реконструктивные операции на мочевыводящих

путях приводят к рубцовым изменениям в паравезикальной клетчатке и к развитию хронического воспаления в мочевом пузыре. Часть пациентов до трансплантации получает длительное лечение глюкокортикоидами и/или цитостатиками, что способствует массивному слушиванию уротелия и отеку стромы в стенке мочевого пузыря [13, 16, 25, 59].

Важно также отметить, что у пациентов с ТХПН даже при нормальной функции мочевого пузыря присутствуют изменения в виде липоматоза, резко выраженного склероза, атрофии пучков гладкомышечной ткани и наличия периваскулярных лимфогистиоцитарных инфильтратов. У пациентов в ренопривном состоянии или в состоянии олигоанурии особенно ярко выражены такие изменения морфологии мочевого пузыря [16, 25].

Выполняемый при оперативном вмешательстве анастомоз между мочеточником трансплантата и мочевым пузырем реципиента формируется с заранее патологически измененной тканью мочевого пузыря [25], склонной к явлениям хронического воспаления, и в последующем – к развитию бессимптомной бактериурии [22, 36, 48, 61]. В отдельных случаях причиной стойкой бактериурии может быть нефункционирующий трансплантат. Бессимптомная бактериурия выявляется у реципиентов не менее чем в 60% случаев [10, 23] и служит триггером развития пиелонефрита трансплантата с высоким риском возникновения уросепсиса [12].

Гидронефроз трансплантата является следствием ретенции мочи, которая характеризуется прогрессирующим расширением чашечно-лоханочной системы в связи с нарушением оттока мочи и повышением гидростатического давления в чашечно-лоханочной системе, а также атрофией паренхимы и прогрессирующим нарушением интрапаренхиматозного кровотока в РТ. В условиях нарушенного оттока мочи из трансплантата может усугубиться течение мочевых инфекций с частыми рецидивами пиелонефрита трансплантата [12, 16, 23], что, в свою очередь, запускает механизм системной воспалительной реакции вплоть до развития уросепсиса.

Риск возникновения уросепсиса существенно выше у беременных женщин после трансплантации, так как у 40% таких пациенток наблюдаются ИМП. При этом острый пиелонефрит сравнительно чаще наблюдается у женщин с хроническим пиелонефритом или рефлюкс-нефропатией в анамнезе, послуживших причиной развития ТХПН [12, 16].

Можно сделать заключение, что уросепсис после аллогенной трансплантации почки является достаточно сложной и многопрофильной проблемой. Это во многом обусловлено не только необходимостью проведения адекватной иммуносупрессивной терапии, но и трудностями дифференциальной диагностики с возникающими в послеоперационном

периоде инфекционными осложнениями другой этиологии (вирусными, грибковыми) и бактериальными инфекциями другой локализации. Пересадка почки, как любое другое оперативное вмешательство, сопряжена с риском возникновения септических осложнений, в том числе – уросепсиса. Эти осложнения влияют не только на результат аллогенной трансплантации почки и длительность функционирования РТ, но зачастую могут быть причиной досадных потерь функционирующих трансплантатов, а порой и смерти пациентов после трансплантации вследствие генерализации инфекционного процесса. Частота возникновения уросепсиса, по данным зарубежных и отечественных исследований, остается стабильно высокой на протяжении десятилетий. Развитие таких осложнений зависит от множества факторов. Хирургические проблемы наложения сосудистых и мочеточниково-пузырных анастомозов в целом могут быть решены, и развитие уросептических осложнений связано в основном с состоянием реципиента, его иммунологическим статусом и модификациями иммуносупрессивной терапии. Уже во время трансплантации в ответ на хирургическую травму тканей, а также ишемическое и реперфузионное повреждение трансплантата в организме реципиента одновременно возникает реакция развернутого неспецифического воспаления в результате активации иммунной системы с образованием провоспалительных цитокинов и мигрирующих воспалительных клеток [9, 19, 45, 52, 53]. В последующем использование высоких доз иммуносупрессивных препаратов в раннем посттрансплантационном периоде является предрасполагающим моментом для присоединения локализованного инфекционного компонента, который является прямым предиктором уросепсиса.

Анализ вышеприведенных данных позволяет сделать вывод о наиболее значимых факторах, являющихся предикторами уросепсиса.

1. ТП может осложниться гнойно-септическими процессами (в том числе уросепсисом), которые особенно тяжело протекают у реципиентов РТ.
2. Донорские органы (в частности почки) могут быть инфицированы еще в организме потенциального донора, а также на этапе эксплантации.
3. Во время хирургического вмешательства и в посттрансплантационном периоде осуществляется катетеризация центральных сосудов, мочевого пузыря, дренирование раны, что создает дополнительные условия для развития локализованных, а затем и генерализованных инфекционных осложнений.
4. Потенциальные реципиенты РТ находятся в состоянии уремии, страдают анемией, белково-энергетической недостаточностью, могут иметь метаболические нарушения, которые сами по

себе в значительной степени изменяют иммунный статус.

5. Проведение в посттрансплантационном периоде иммуносупрессивной терапии создает условия для вторичного иммунодефицита, т. е. угнетения пролиферации Т- и В-лимфоцитов, продукции антител, глубокого снижения противоинфекционного иммунитета.

Таким образом, детальное изучение различных аспектов этиологии и патогенеза ИМП и уросепсиса в посттрансплантационном периоде, а также особенностей морфологических, иммунологических и неспецифических факторов возникновения и прогрессирования этой патологии имеет не только большое научное значение, но и существенную практическую значимость, поскольку будет способствовать улучшению ближайших и отдаленных результатов аллогенной трансплантации почки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Актуальные вопросы диагностики и лечения сепсиса / В.Б. Белобородов // Инфекции и антимикробная терапия. 2001. Т. 3. № 6. С. 3–6.*
2. *Аляев Ю.Г., Волынчик Е.П., Еникеев М.Э. и др. Состояние нижних мочевых путей у больных при трансплантации почки // ИТОГИ. Результаты научных исследований по программной тематике. Выпуск 8, Москва, РНЦХ РАМН. 2002. С. 3–10.*
3. *Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Состояние заместительной терапии больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации в 1998–2007 гг.: Аналитический отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии // Нефрология и диализ. 2009. Т. 11. № 3. С. 144–233.*
4. *Волынчик Е.П., Большаков Л.В., Богомолова Н.С. Разработка рациональных схем профилактики и лечения инфекционных осложнений при трансплантации почки // Хирургия. 2007. № 11. С. 29–35.*
5. *Волынчик Е.П., Белорусов О.С., Сорокина В.И. и др. Проблема внутрибольничной инфекции у больных с пересаженной почкой // Тез. докл. II российск. научно-практ. конф. с межд. участием. Москва. 1999. С. 58–59.*
6. *Волынчик Е.П., Большаков Л.В., Богомолова Н.С. и др. Развитие гнойно-септических осложнений на фоне иммуносупрессивной терапии у больных с аллотрансплантированной почкой // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2002. Т. 3. С. 67.*
7. *Воробьев А.И. Патогенез заражения крови. Сепсис – нозологическая форма или собрание различных нозологических форм // Клин. геронтология. 1997. № 1. С. 26–29.*
8. *Еникеев М.Э., Белорусов О.С., Гаджиева З.К. Исследование уродинамики нижних мочевых путей при трансплантации почки // Материалы III конгресса урологов Казахстана. Алматы, 2000. С. 97–99.*

9. Журавлев В.В., Руднов В.В. Уросепсис: этиология, патогенез. Лечение // Врач. 2000. № 10. С. 20–23.
10. Кабулбаев К.А. Инфекции после трансплантации почки // Нефрология и диализ. 2010. Т. 11, № 4. С. 293–298.
11. Кот А.Г., Чудин А.Ш. Лимфогенные осложнения при трансплантации почки // Клінічна хірургія. 2000. № 7. С. 52–55.
12. Лопаткин Н.А., Даренков А.Ф., Козлов В.А. Острый пиелонефрит трансплантированной почки // Урология и нефрология. 1981. № 2. С. 38.
13. Лопаткин Н.А., Трапезникова М.Ф., Перлин Д.В., Уренков С.Б. Урологические осложнения при трансплантации почки. М.: ГЭОТАР-МЕД. 2004. С. 5–15.
14. Мойсюк Я.Г., Горбунов В.В., Милосердов И.А. Использование комбинации Зенапакса и Селлсепта после трансплантации почки: Пособие для врачей. Москва: НИИТиИО, 2003. С. 25.
15. Неймарк А.И., Неймарк Б.А. Эфферентная и квантовая терапия в урологии. М.: Медицинское информационное агентство. 2003. С. 45–80.
16. Прокопенко Е.И., Ватазин А.В., Щербакова Е.О. Инфекционные осложнения после трансплантации почки: М.: ИПО «У Никитских ворот», 2010. 296 с.
17. Рациональная фармакотерапия в урологии: Руководство для практических врачей / Под общей редакцией Н.А. Лопаткина, Т.С. Перепановой. М.: Литтерра, 2006. С. 312–317.
18. Секреты нефрологии / Д.Е. Храйчик, Д.Р. Седор, М.Б. Гранц; под ред. Ю.В. Наточина; пер. с англ. М.: БИНОМ; СПб.: Невский Диалект, 2007. 303 с.
19. Сепсис: классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение: Практическое руководство / под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда. 2-е изд., доп. и перер. М.: Медицинское информативное агентство, 2011. 352 с.
20. Томилина Н. А., Балакирев Э. М. Отдаленные результаты трансплантации почки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2001. № 3–4. С. 65–75.
21. Трансплантология: Руководство для врачей / Под ред. В.И. Шумакова. 2-е изд., испр. и доп. М.: Медицинское информационное агентство. 2006. 544 с.
22. Шумаков В.И., Томилина Н.А., Мойсюк Я.Г. и др. Отдаленные результаты трансплантации трупной почки на современном этапе (опыт последнего десятилетия) // Клиническая трансплантация органов: Материалы конференции. М., 2005. С. 116.
23. Щербакова Е.О., Савицкая К.И., Русанова Е.В. и др. Инфекции мочевой системы у больных с почечным трансплантатом // Нефрология и диализ. 2004. № 4. С. 318–325.
24. Щербакова Е.О., Русанова Е.В., Ватазин А.В. и др. Инфекционные осложнения при использовании мофетила микофенолата у больных с почечным аллотрансплантатом // Терапевтический архив. 2005. № 1. С. 67–72.
25. Янковой А.Г. Трансплантация почки у больных с урологическими заболеваниями: Дис. ... докт. мед. наук. М., 2005.
26. Abbott K.C., Ogelsby R.J., Ko C.W. et al. Hospitalizations for Fractures after Renal Transplantation in the United States // Annals of Epidemiology. 2001. Vol. 11. P. 450–457.
27. Abbott K.C., Oliver J.D., Hypolite I. et al. Hospitalizations for Bacterial Septicemia after Renal Transplantation in the United States // Am. J. Nephrology. 2001. Vol. 21 (2). P. 120–127.
28. Augustine J.J., Chang P.C., Knauss T.C. et al. Improved renal function after conversion from tacrolimus/sirolimus to tacrolimus/mycophenolate mofetil in kidney transplant recipients // Transplantation. 2006. Vol. 81. P. 1004–1009.
29. Bantar C., Fernandez Canigia L., Diaz C. et al. Clinical, epidemiologic, and microbiologic study of urinary infection in patients with renal transplant at a specialized center in Argentina // 11 Arch. Esp. Urol. 1993. № 6. P. 473–477.
30. Bernabeu-Wittel M., Naranjo M., Cisneros J.M. et al. Infections in renal transplant recipients receiving mycophenolate versus azathioprine-based immunosuppression // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2002. № 3. P. 173–180.
31. Bouza E., San Juan R., Mupoz P. et al. Co-operative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections. A European perspective on nosocomial urinary tract infections II: Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-004 study) // Clin. Microbiol. Infect. 2001. Vol. 7. P. 532–542.
32. Brun-Buisson C., Meshaka P., Pinton P. et al. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units // Intensive Care Medicine. 2004. Vol. 30. № 4. P. 580–588.
33. Cardoso T., Ribeiro O., Costa-Pereira A. et al. Community-acquired and healthcare-related urosepsis: A multicenter prospective study // Crit. Care. 2008. Vol. 12. P. 8.
34. Ciancio G., Burke G.W., Gaynor J.J. et al. A randomized long-term trial of tacrolimus/sirolimus versus tacrolimus/mycophenolate versus cyclosporine/sirolimus in renal transplantation: Three-year analysis // Transplantation. 2006. Vol. 81. P. 845–852.
35. De Oliveira L.C., Lucon A. M., Nahas W. C. et al. Catheter-associated urinary infection in kidney post-transplant patients // Sao Paulo Med. J. 2001. № 5. P. 165–168.
36. De Souza R.M., Olsburgh J. Urinary tract infection in the renal transplant patient // Nat. Clin. Pract. Nephrol. 2008. № 4 (5). P. 252–264.
37. Di Landro D., Sarzo G., Marchini F. New immunosuppressive treatment in kidney transplantation // Clin. Nephrol. 2000. № 4. P. 23–32.
38. Dupont P.J., Psimenou E., Lord R. et al. Late recurrent urinary tract infections may produce renal allograft scarring even in the absence of symptoms or vesicoureteric reflux // Transplantation. 2007. Vol. 84 (3). P. 351–355.
39. Fishman J.A., Rubin R.H. Medical progress: Infection in organ-transplant recipients // N. Engl. J. Med. 1998. № 338. P. 1741–1751.
40. Gastmeier P., Kampf G., Wischniewski N. et al. Prevalence of nosocomial imfections in representative German hospitals // J. Hosp. Infect. 1998. Vol. 38. P. 37–49.
41. Guidebook: End-stage renal disease // March 19. 2008. USA.

42. *Hardinger K.L., Schnitzler M.A, Koch M.J. et al.* Cyclosporine minimization and cost reduction in renal transplant recipients receiving a C2-monitored, cyclosporine-based quadruple immunosuppressive regimen // *Transplantation*. 2004. Vol. 78. P. 1198–1203.
43. *Hibberd A.D., Trevillian P.R., Roger S.D. et al.* Assessment of the bioequivalence of a generic cyclosporine A by a randomized controlled trial in stable renal recipients // *Transplantation*. 2006. Vol. 81. P. 711–717.
44. *Hohenfellner M., Richard A.S.* Emergencies in Urology // *Stringer-verlag, Berlin-Heidelberg*. 2007. 659 p.
45. *Hotchkiss R.S., Karl I.E.* The Pathophysiology and Treatment of Sepsis // *The New England Journal of Medicine*. 2003. Vol. 348 (2). P. 138–150.
46. *Kode R., Fa K., Chowdhury S. et al.* Basiliximab plus low-dose cyclosporin vs. OKT3 for induction immunosuppression following renal transplantation // *Clin. Transplant*. 2003. № 4. P. 369–376.
47. *Kreger B.E., Craven D.E., McCabe W.R.* Gram-negative bacteremia, IV: Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients // *Am. J. Med*. 1980. Vol. 68. P. 344–355.
48. *Lin M.F., Lau Y.J., Hu B.S. et al.* Bacteremia in renal transplant recipients: retrospective analysis of 60 episodes in a teaching hospital // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2001. № 2. P. 108–114.
49. *Malek G.H., Uehling D.T., Daouk A.A. et al.* Urological complications of renal transplantation // *Urology*. 1973. Vol. 109. P. 173–176.
50. *Meyec A.M., Levine E., Myburg J.A. et al.* Diagnosis and management of lymphoceles after renal transplantation // *Urology*. 1977. Vol. 10 (5). P. 497–502.
51. *Nankivell B.J., Chapman J.R.* Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions // *Transplantation*. 2006. Vol. 81 (5). P. 643–654.
52. *Otero R.M., Nguyen H.B., Huang D.T. et al.* Early goal directed therapy in severe sepsis and septic shock revisited: Concepts, controversies, and contemporary findings // *Chest*. 2006. Vol. 130. P. 1579–1595.
53. *Reinhart K., Brunkhorst F., Bone H. et al.* Diagnosis and therapy of sepsis. Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine // *Internist (Berl)*. 2006. Vol. 47. P. 358–360, 362–368 [in German].
54. *Richards M.J., Edwards J.R., Culver D.H. et al.* Nosocomial infections in combined medical surgical intensive care units in the United States // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol*. 2000. Vol. 21. P. 510–515.
55. *Rosser C.J., Bare R.L., Meredith J.W.* Urinary tract infections in the critically ill patient with a urinary catheter // *Am. J. Surg*. 1999. Vol. 177. P. 287–290.
56. *Rubin R.H., Tolkoff-Rubin N.E.* Infection. The new problems // *Transplant. Proc*. 1989. № 21. P. 1440–1447.
57. *Schmaldienst S., Hoerl W.H.* Bacterial infections after renal transplantation // *Nephron*. 1997. Vol. 75. P. 140–153.
58. *Schiff J., Cole E., Cantarovich M.* Therapeutic Monitoring of Calcineurin Inhibitors for the Nephrologist C.J.A.S.N. 2007. Vol. 2. № 2. P. 374–384.
59. *Selli C., Risaliti A., De-Antoni P. et al.* Ureteral obstruction after kidney transplantation secondary to bone metaplasia // *Urology*. 2000. Vol. 56. № 1. P. 153.
60. *Sommerer C., Konstandin M., Dengler T. et al.* Pharmacodynamic monitoring of cyclosporine a in renal allograft recipients shows a quantitative relationship between immunosuppression and the occurrence of recurrent infections and malignancies // *Transplantation*. 2006. Vol. 82. P. 1280–1285.
61. *Stein G., Funfstuck R.* Asymptomatic bacteriuria // *Med. Klin. (Munich)*. 2000. № 95 (4). P. 195–200.

## ПОЗДРАВЛЯЕМ АЛЕКСЕЯ СЕРГЕЕВИЧА ИВАНОВА



2 июня 2011 года исполнилось 60 лет известному кардиохирургу, заслуженному деятелю науки и техники Российской Федерации, доктору медицинских наук профессору Алексею Сергеевичу Иванову. Алексей Сергеевич Иванов родился в Москве в семье служащих. В 1968 году поступил в Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. После окончания института в 1974 г. продолжил обучение в очной аспирантуре кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова под руководством профессора В.В. Кованова.

Алексей Сергеевич Иванов – один из ведущих ученых и специалистов нашей страны в области кардиохирургии и хирургического лечения пациентов с врожденными пороками сердца. Он является учеником одной из лучших хирургических школ выдающегося советского хирурга, академика Бориса Васильевича Петровского. Учителями Алексея Сергеевича были В.В. Кованов, Б.А. Константинов, Л.П. Черепенин.

Свою хирургическую практику Алексей Сергеевич начал в 1979 году в отделении хирургии врожденных пороков сердца ГУ «РНИЦ им. академика Б.В. Петровского РАМН» и прошел путь от младшего научного сотрудника до руководителя отделения, оперируя весь спектр врожденной патологии сердечно-сосудистой системы, и в частности сложные формы врожденных цианотических пороков сердца. В 1992 г. Алексей Сергеевич защитил докторскую диссертацию на тему «Реконструкция выходного отдела правого желудочка у больных тетрадой Фалло. Морфометрия, хирургическая тактика, клинические результаты» по специальности «сердечно-сосудистая хирургия». Он занимался активным изучением вариантной анатомии врожденных пороков сердца и разработал основные принципы морфометрии для планирования объема и результатов их радикальной хирургической коррекции.

Направлениями научной деятельности А.С. Иванова являются проблема хирургического лечения врожденных пороков сердца у взрослых, хирургия посттравматических пороков и инородных тел сердца, повторные оперативные вмешательства у пациентов, оперированных по поводу врожденных пороков сердца.

А.С. Иванов является автором новых типов биологических пластических материалов, которые с успехом используются в повседневной практике при реконструктивных вмешательствах у пациентов с пороками сердца. Ему принадлежат более 300 научных работ, 56 из которых опубликованы за последние 5 лет. Он является автором 2 монографий, имеет 12 авторских свидетельств и патентов России и зарубежных стран (США, Германии, Швеции, Болгарии), диплом на открытие в области медицины и биологии, под его руководством защищены более десяти кандидатских и 2 докторские диссертации.

Заслуги А.С. Иванова высоко оценены научной общественностью нашей страны. Он удостоен Государственной премии СССР «За разработку и внедрение биологических протезов клапанов сердца», а также премии Правительства РФ в области науки и техники «За разработку и клиническое применение новых биотехнологий в сердечно-сосудистой хирургии» в 2001 году.

Профессор А.С. Иванов является членом бюро научного совета по сердечно-сосудистой хирургии РАМН и МЗиСР РФ, членом проблемной комиссии «Хирургия врожденных пороков сердца» и членом Ассоциации сердечно-сосудистых хирургов России.

А.С. Иванов – блестящий хирург: им выполнено более 3000 операций на сердце в условиях искусственного кровообращения при врожденной и приобретенной патологии сердца, он является активным сторонником малоинвазивной хирургии в лечении врожденных пороков сердца у детей и взрослых.

Алексей Сергеевич – открытый и простой человек, интересный и эрудированный собеседник, добрый и мудрый руководитель, способный объединять вокруг себя людей и в любой момент прийти им на помощь. Любящий муж и отец. Человек веселый, с тонким чувством юмора в повседневной жизни и серьезный профессионал в операционной, у которого тысячи благодарных пациентов. Алексей Сергеевич – один из признанных авторитетов в области хирургии врожденных пороков сердца не только в нашей стране, но и в зарубежных кругах.

Редколлегия журнала «Вестник трансплантологии и искусственных органов» во главе с главным редактором членом-корреспондентом РАМН, доктором медицинских наук, профессором Сергеем Владимировичем Готье и коллектив ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова сердечно поздравляют А.С. Иванова с юбилеем и желают ему крепкого здоровья и профессиональных успехов.



## ПОЗДРАВЛЯЕМ ЭДУАРДА ИЗРАИЛЕВИЧА ГАЛЬПЕРИНА

10 августа исполнилось 80 лет выдающемуся ученому с мировым именем, основоположнику российской хирургической гепатологии, одному из самых ярких представителей отечественной хирургии профессору Эдуарду Израилевичу Гальперину.

Свою практическую деятельность Э.И. Гальперин начал в Институте скорой медицинской помощи им. Н.В. Склифосовского в качестве врача выездной бригады «Скорой помощи». Под руководством проф. Б.А. Петрова молодой хирург успешно стал развиваться в практическом и в научном плане. Он быстро защитил кандидатскую и докторскую диссертации и в 33 года стал заведовать хирургическим отделением. С этим периодом жизни Э.И. Гальперина связаны фундаментальные научные исследования в области гидродинамики оттока желчи, портальной гипертензии, органной гемодинамики печени. Он изучает вопросы печеночной недостаточности, разрабатывает и впервые применяет в клинике подсадку свиной печени. В эти годы вышли в свет первые его знаменитые монографии.

С 1970 г. Э.И. Гальперин заведует отделом трансплантации печени в Институте трансплантологии и искусственных органов, где после многолетних экспериментальных исследований разрабатывает и вместе с В.И. Шумаковым проводит первую в мире пересадку левого латерального сектора печени. В завершение этой тематики выпущены монографии, посвященные недостаточности печени и трансплантации печени. Параллельно ведется большая научная и практическая работа, посвященная свежим повреждениям и рубцовым стриктурам желчных протоков – это та область, в которую Э.И. Гальперин внес огромный вклад. Разработаны новые виды реконструктивных операций, создана самая популярная классификация, выпущена еще одна знаменитая монография «Рубцовые стриктуры желчных протоков», которая в дальнейшем была переведена на английский язык и издана в США.

С 1980 года по настоящее время профессор Э.И. Гальперин работает в Первом московском медицинском университете им. И.М. Сеченова, где сначала заведовал отделом хирургии печени, а позднее – курсом хирургической гепатологии факультета повышения квалификации врачей. За эти годы им разработана оригинальная концепция и метод лечения сахарного диабета, острого и хронического панкреатита, создан оригинальный способ выделения долевого и секторального сосудисто-секреторных ножек печени при ее резекции, метод регионарной химиотерапии опухолей печени.

Научные достижения принесли ученому-хирургу, никогда не занимающему руководящей должности выше заведующего отделом, огромный авторитет ученого во всем мире.

Глубина мысли, широкая эрудиция и неугасаемый интерес ко всему, что происходит не только в области хирургии, но и в смежных областях науки, в искусстве и вообще в жизни, тонкий вкус, наряду с целеустремленностью, умением вдохновить коллег новаторскими идеями, позволили Эдуарду Израилевичу с помощью небольшой группы сотрудников осуществить тот объем работы, который был бы под силу лишь целому научно-исследовательскому институту.

Э.И. Гальперин является инициатором и создателем международной Ассоциации хирургов-гепатологов, которая в течение 15 лет ежегодно проводит свои научные конференции, что способствовало открытию самостоятельных гепатологических центров по всей стране. Профессор Э.И. Гальперин является основателем и главным редактором журнала «Анналы хирургической гепатологии», одного из самых популярных хирургических изданий стран СНГ.

Заслуги Эдуарда Израилевича достойно оценены: он является лауреатом Государственных премий СССР и РФ, Премии Правительства РФ. Но главным признанием профессора Э.И. Гальперина являются высочайший авторитет ученого-хирурга, интеллигентного и замечательного человека.

Хирургическая общественность, ученики, сотрудники, редколлегия журнала «Вестник трансплантологии и искусственных органов» вместе с главным редактором членом-корреспондентом РАМН, профессором С.В. Готье и почитатели его таланта поздравляют Эдуарда Израилевича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, бодрости духа, творческих успехов и долгих-долгих лет жизни.



## НОВЫЕ КНИГИ



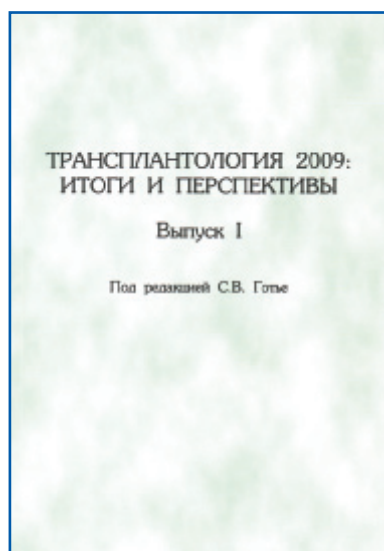
### ОЧЕРКИ КЛИНИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ

Под редакцией С.В. Готье, Москва, 2009 г., 357 с.

Книга представляет собой сборник очерков, посвященных анализу широкого круга актуальных проблем клинической трансплантологии. Рассматриваются фундаментальные основы, клинические аспекты и новейшие технологии в этой относительно молодой и быстро развивающейся области медицины. Основу фактического материала книги составляет уникальный собственный опыт, накопленный сотрудниками Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова за 40-летнюю историю этого учреждения.

Описаны задачи и возможности современной клинической трансплантологии, проанализированы хирургические, терапевтические, иммунологические, патофизиологические аспекты трансплантации жизненно важных органов – сердца, печени, почки. Отдельно проанализированы особенности раннего периода после трансплантации сердца; всесторонне обсуждается опыт трансплантации почки от живого родственного донора.

Предназначена для трансплантологов, врачей различных специальностей – нефрологов, гепатологов, кардиохирургов, специалистов лабораторной медицины, а также научных сотрудников, студентов медицинских и биологических факультетов.



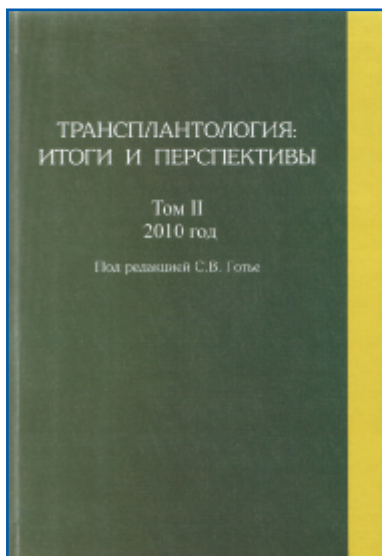
### ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ 2009: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Под редакцией С.В. Готье, Москва, 2010 г., том I, 406 с.

Книга представляет собой сборник материалов и документов, отражающих состояние клинической трансплантологии, а также результаты научных исследований в области трансплантологии и искусственных органов по итогам 2009 года.

Анализ состояния органной трансплантации в России представлен по данным первого национального трансплантологического регистра. Результаты научных исследований в области трансплантологии и искусственных органов представлены в виде материалов официальных отчетов по завершенным научно-исследовательским работам. Приведены данные о диссертационных советах, а также авторефераты диссертаций, защищенных в 2009 г. по специальности 14.01.24 «трансплантология и искусственные органы».

Отдельные разделы содержат библиографию работ отечественных ученых, опубликованных в 2009 г. за рубежом, а также календарь Всероссийских научно-практических мероприятий.



## **ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ. ТОМ II. 2010 год**

*Под редакцией С.В. Готье, Москва, 2011 г., том II, 461 с.*

В сборнике представлены материалы и документы, отражающие состояние клинической трансплантологии, а также результаты научных исследований по проблеме трансплантологии и искусственных органов по итогам 2010 года.

Приведен анализ состояния органной трансплантации в России за 2006–2010 гг. Результаты научных исследований в области трансплантологии и искусственных органов представлены в виде обзоров по материалам отчетов о научно-исследовательских работах, методических рекомендаций, авторефератов диссертаций, защищенных в 2010 г. по специальности 14.01.24 «трансплантология и искусственные органы».

Приведен перечень диссертационных советов, принимающих к защите диссертации по этой специальности. Отдельные разделы содержат библиографию работ отечественных ученых, опубликованных в 2010 г. за рубежом, а также календарь основных всероссийских научно-практических мероприятий.



## **ИНФЕКЦИИ В ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ**

*Под редакцией С.В. Готье, Москва, 2011 г., 381 с.*

Монография посвящена одной из актуальных проблем клинической трансплантологии – инфекциям, развивающимся у реципиентов солидных органов. Книга состоит из 9 глав, в которых дан подробный анализ данных современной литературы и собственного опыта, накопленного сотрудниками ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова».

Отдельные главы посвящены инфекционным осложнениям у реципиентов сердца, почки, печени, инфекционной безопасности донорства органов. Подробно описана роль цитомегаловирусной инфекции в развитии осложнений у трансплантологических больных. Представлены новейшие данные об участии вирусной инфекции в патогенезе повреждения коронарных сосудов трансплантированного сердца, в развитии гуморального отторжения трансплантата, приведены результаты морфологических исследований.

Книга предназначена для трансплантологов, широкого круга врачей различных специальностей, гепатологов, нефрологов, кардиологов, кардиохирургов, специалистов лабораторной медицины, а также научных сотрудников, студентов медицинских и биологических факультетов.

**ETHICON**  
a Johnson & Johnson company

Coated  
**VICRYL\***  
**Plus**  
Antibacterial  
(Polyglactin 910)  
Suture



**MONOCRYL\***  
**Plus**  
Antibacterial  
(Poliglecaprone 25)  
Suture



**PDS\***  
**Plus**  
Antibacterial  
(Polydioxanone)  
Suture



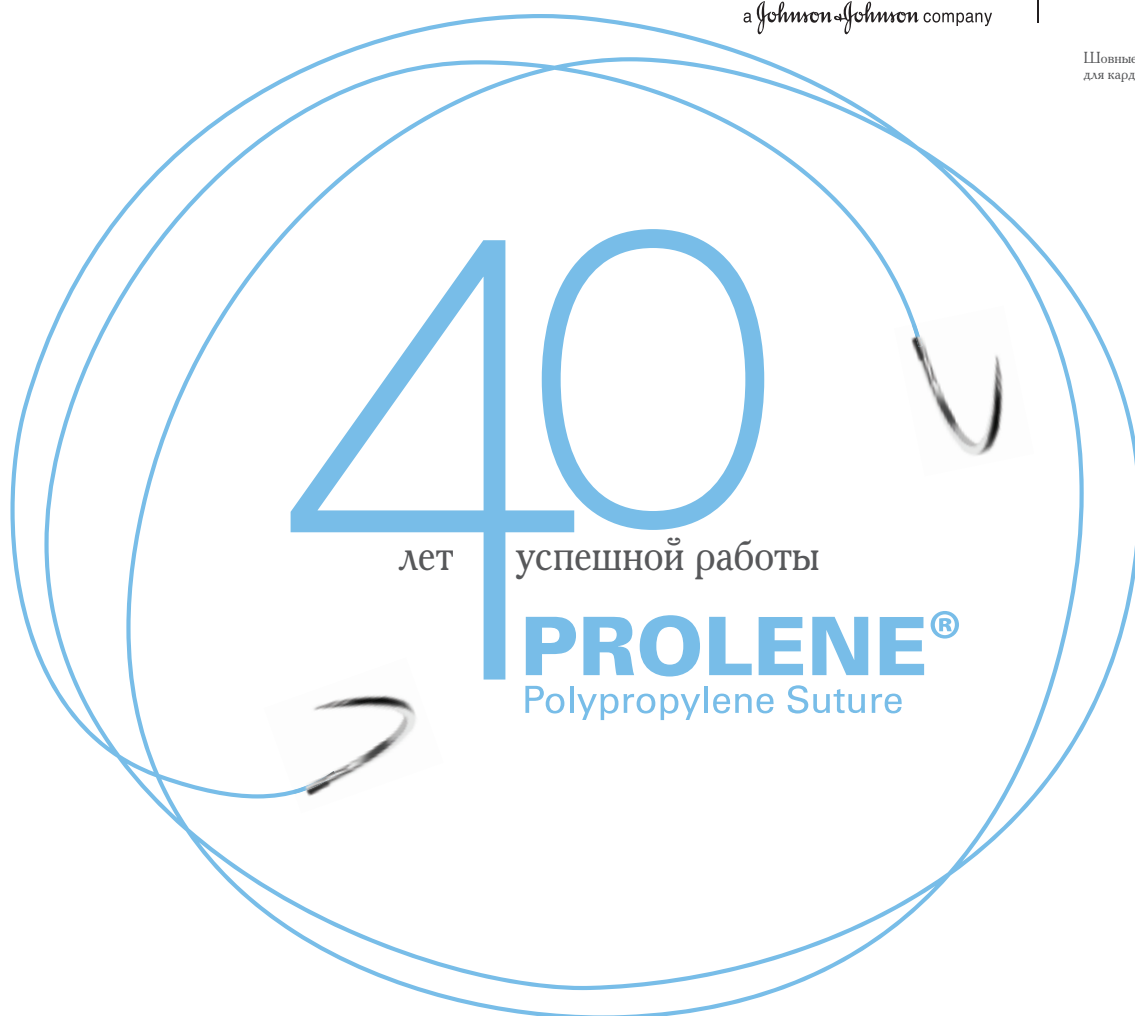
**ДАЖЕ ОДИН СЛУЧАЙ ИНФЕКЦИИ – УЖЕ СЛИШКОМ МНОГО  
ПЛЮС НИТИ – НАДЕЖНОЕ ЗАКРЫТИЕ РАНЫ**



\*Trademark

Рег. уд. ФСЗ 2007/00529 от 05.05.2010, ФСЗ 2010/06042 от 10.09.2010, ФСЗ 2010/07135 от 04.06.2010. Товар сертифицирован.

ООО "Джонсон & Джонсон"  
121614 Москва, ул. Крылатская, д. 17, корп. 3  
тел.: +7 (495) 580-7777, факс: +7 (495) 580-7878



2009

Prolene\* отмечает 40 летний юбилей

**MULTIPASS** (Мультипасс) - специальное покрытие иглы для мягкого проведения в тканях стежок за стежком

1999

Тело иглы прямоугольного сечения с скругленными углами — возможность манипулировать иглой под различным углом, даже в ограниченном пространстве

1989

Иглы из сплава Ethalloy (Эталлой), с увеличенной устойчивостью на изгиб

1979

**BV-175** - особо тонкие иглы для предупреждения кровоточивости в месте прокола

Иглы **Visi-Black** (Визи-блэк) черного цвета, первые иглы для хорошей визуализации в сердечно-сосудистой хирургии

1969

**Control release** (Контрол релиз) - иглы с контролируемым отделением нити

Prolene\* выведен на рынок

\* товарный знак

ООО "Джонсон & Джонсон"  
121614, Москва, ул. Крылатская, д. 17, корп. 3  
Тел. +7 (495) 580-7777  
Факс +7 (495) 580-7878

РУ ФС № 2005/1705 от 17.11.2005 г. Товар сертифицирован.

**ETHICON**  
a Johnson & Johnson company

**PROLENE®**  
Blue Monofilament  
Polypropylene Suture



Нить полипропиленовая  
монофиламентная окрашенная

# НАЗНАЧЬТЕ СЕРТИКАН® СЕГОДНЯ

## ОБЕСПЕЧЬТЕ УЛУЧШЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЗАВТРА



Раннее назначение Сертикана позволяет значительно уменьшить дозу ингибиторов кальциневрина (ИКН) без снижения эффективности терапии и улучшить отдаленные результаты трансплантации<sup>1</sup>

- Низкая частота тяжелых острых реакций отторжения трансплантата, подтвержденных при биопсии, в течение 12 месяцев терапии на фоне снижения дозы ИКН на 60%<sup>1</sup>
- Улучшение функции почек уже на 3-й день и в течение 12 месяцев терапии<sup>1</sup>
- Дополнительные преимущества: антипролиферативный и противовирусный эффект<sup>1,2</sup>

## СЕРТИКАН®/CERTICAN®

### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

**Лекарственная форма.** Эверолимус. Таблетки 0,25 мг, 0,5 мг, 0,75 мг, 1 мг, таблетки диспергируемые 0,1 мг, 0,25 мг.

**Показания.** Профилактика отторжения трансплантата у взрослых реципиентов почки и сердца с низким и средним иммунологическим риском, получающих базовую иммуносупрессивную терапию циклоспорином в форме микроэмульсии и глюкокортикостероидами.

**Способ применения и дозы.** Рекомендуемая доза составляет 1,5 мг/сут в два приема (0,75 мг 2 раза в сутки). Следует тщательно наблюдать за состоянием пациентов с легкими или умеренными нарушениями функции печени; у этих пациентов может потребоваться снижение дозы препарата.

Рекомендуется терапевтический мониторинг концентрации Сертикана в цельной крови. Опыт применения эверолимуса у детей ограничен.

**Противопоказания.** Повышенная чувствительность к эверолимусу, сиролимусу или другим компонентам препарата.

**Меры предосторожности.** У пациентов, получающих терапию препаратом Сертикан®, повышается риск развития лимфом и других злокачественных новообразований, особенно кожи. Чрезмерная иммуносупрессия предрасполагает к развитию инфекций (бактериальной, микотической, вирусной, протозойной), в том числе ВК вирус-ассоциированной нефропатии, приводящей к отторжению трансплантата почки, и потенциально фатальной JC вирус-ассоциированной прогрессирующей лейкоэнцефалопатии (ПМЛ). Пациентов, получающих Сертикан®, следует мониторировать с целью выявления гиперлипидемии. Применение препарата совместно с ингибиторами АПФ может сопровождаться развитием ангионевротического отека. У пациентов с *de-novo* трансплантированной почкой возможно развитие протеинурии. Увеличение степени выраженности протеинурии может наблюдаться при полной отмене ингибитора кальциневрина (ИКН) на фоне терапии Сертиканом у пациентов, получающих поддерживающую терапию и уже имеющих умеренную протеинурию. Требуется снижение дозы циклоспорина при совместном использовании с эверолимусом для того, чтобы избежать развития дисфункции почек. Рекомендуется регулярный мониторинг концентрации препаратов (эверолимуса и циклоспорина) в сыворотке крови, функции почек и протеинурии. Не рекомендуется совместное применение препарата Сертикан® с сильными ингибиторами и индукторами CYP3A4, за исключением тех случаев, когда ожидаемая польза такой терапии превышает потенциальный риск. В течение первых 30 дней после трансплантации отмечено увеличение риска развития тромбоза почечной артерии или вены, приводящего к отторжению трансплантата. Сертикан®, как и другие ингибиторы m-TOR, может ухудшать процесс заживления ран, приводить к возникновению посттрансплантационных осложнений, особенно при наличии у пациента избыточной массы тела. Совместное назначение препарата Сертикан® и ингибиторов кальциневрина (ИКН) может повышать риск возникновения ИКН-индуцированного гемолитического уремического синдрома, тромбоцитопенической пурпуры, тромбоцитарической микроангиопатии. При развитии интерстициальной болезни легких на фоне применения препарата следует уменьшить дозу (вплоть до отмены терапии). На фоне применения препарата Сертикан® повышается риск возникновения впервые диагностированного сахарного диабета, поэтому необходим тщательный мониторинг уровня глюкозы в сыворотке крови. Имеются данные о возникновении обратимой азооспермии и олигоспермии у пациентов, получающих лечение ингибиторами m-TOR. Длительная терапия препаратом Сертикан® связана с риском развития мужского бесплодия.

Сертикан® не следует применять у пациентов с редкими наследственными нарушениями, связанными с непереносимостью галактозы, тяжелой лактазной недостаточностью или глюкозо-галактозной мальабсорбцией. Женщинам детородного возраста следует рекомендовать использовать эффективные методы контрацепции.

Не следует применять Сертикан® у беременных женщин, за исключением тех случаев, когда ожидаемая польза от терапии превышает потенциальный риск для плода. При применении препарата Сертикан® следует отказаться от кормления грудью.

**Взаимодействие.** Следует соблюдать осторожность при совместном применении эверолимуса с рифалпицином, рифабутином или кетконазолом, интраконазолом, вориконазолом, кларитромицином, телитромицином или ритонавиром и при необходимости снижать дозу препарата.

Также следует соблюдать осторожность при одновременном применении препарата со зверобоем продырявленным, эритромицином, флюконазолом, фенитоином, карбамазепином, фенбарбиталом, блокаторами кальциевых каналов, ингибиторами протеаз и препаратами для лечения ВИЧ. Следует избегать использования живых вакцин, грейпфрутового сока и грейпфрута.

**Побочное действие.** Наиболее частыми нежелательными явлениями при применении препарата Сертикан® в комбинации с циклоспорином в форме микроэмульсии и глюкокортикостероидами были лейкопения, гиперлипидемия и гиперхолестеринемия, перикардиальный или плевральный выпот.

Часто отмечались: вирусные, бактериальные и грибковые инфекции, пневмония, сепсис, тромбоцитопения, анемия, коагулопатия, тромбоцитопеническая пурпура/ гемолитикоуремический синдром, гипертриглицеридемия, впервые выявленный сахарный диабет, лимфоцелла, венозная тромбоземболия, тромбоз трансплантата, диарея, тошнота, рвота, боль в животе, боль, отеки, медленное заживление ран, гипертензия, ангионевротический отек, акне, осложнения со стороны хирургической раны, панкреатит, протеинурия, эректильная дисфункция.

Иногда наблюдались: раневые инфекции, гемолиз, панцитопения, гипогонадизм у мужчин, интерстициальная болезнь легких, гепатит, печеночные нарушения, желтуха, нарушения показателей печеночной функции, сыпь, миалгия, некроз почечных канальцев, пиелонефрит.

Очень редко: альвеолярный протеиноз, лейкоцитокластический васкулит.

**Примечание для врача.** Прежде чем назначить препарат, пожалуйста, прочитайте также инструкцию по применению.

Новartis Фарма АГ, произведено Новartis Фарма Штейн АГ, Швейцария

**Литература.** 1. Tedesco Silva H, Cibrik D, Johnston T et al. Everolimus plus reduced-exposure CsA vs mycophenolic acid plus standard-exposure CsA in renal-transplant recipients. As of 12-03-09, this manuscript has been prepared for submission. Based on final acceptance for publication, the information contained within this Visual Aid will be updated to reflect final data. 2. Kauffman MH, Cherikh WS, Cheng Y, Hanto DV, Kahan BD. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies. *Transplantation*. 2005;80:883-889.



# ВАЛЬЦИТ 200 ДНЕЙ

## РАСКРОЙ ВЕСЬ ПОТЕНЦИАЛ<sup>1</sup>



**Сокращает риск<sup>2</sup> смертности от ЦМВ на 74%**  
**общей смертности на 37%**

Регистрационный номер: П N015446/01 Торговое название препарата: Вальцит<sup>®</sup> Международное непатентованное название: Валганцикловир Показания: лечение ЦМВ ретиinitа у больных СПИДом. Профилактика ЦМВ инфекции после трансплантации органов у пациентов из группы риска. Противопоказания: повышенная чувствительность к валганцикловиру, ганцикловиру или любому компоненту препарата. Дети до 12 лет. С осторожностью: пожилой возраст (безопасность и эффективность препарата не установлены). Стандартный режим дозирования: больным, перенесшим трансплантацию почки, необходимо начать терапию препаратом Вальцит<sup>®</sup> в течение первых 10 дней после операции в дозе 900 мг (2 таблетки по 450 мг) 1 раз в сутки и продолжать терапию по 200-е сутки посттрансплантационного периода. Нежелательные явления: наиболее частыми нежелательными реакциями вне зависимости от серьезности, но по мнению исследователей связанными с приемом препарата у пациентов после трансплантации солидных органов были: лейкопения, диарея, тошнота, нейтропения. Перед назначением следует ознакомиться с полной инструкцией по применению препарата.

1. Инструкция по медицинскому применению препарата Вальцит<sup>®</sup> 2. Cochrane Database Syst Rev. 2008 Apr 16;(2)

**Вальцит<sup>®</sup>**  
валганцикловир

ЗАО «Рош-Москва»  
Официальный дистрибьютор  
«Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд.» (Швейцария)  
Россия, 107031 Москва  
Трубная площадь, дом 2  
Бизнес-центр «Неглинная Плаза»  
Тел.: +7 (495) 229-29-99  
Факс: +7 (495) 229-79-99  
www.roche.ru

