

УДК 616.61-089.843-07:517.11

О.С. Никоненко, С.М. Гриценко

ДУ «Запорізька медична академія післядипломної освіти»

РЕНОПРОТЕКЦІЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НИРКИ

Встановлені різноспрямовані зміни елементів антиоксидантної системи на 5-й і 30-й хвилини реперфузії нирок алотрансплантата: збільшення активності CuZn-супероксиддисмутази, зниження активності вітамінів А, Е і С, незмінне інгібування активності каталази і церулоплазміну. Під час ниркової алотрансплантації реперфузія перекисного окиснення ліпідів була обмежена збільшенням активності CuZn-супероксиддисмутази на тлі інгібування елементів антиоксидантної системи. На найближчому і ранньому післяопераційному періодах обмежування активності продуктів перекисного окиснення ліпідів відбувалося в основному за рахунок збільшення активності каталази і меншою мірою через збільшення концентрації вітаміну А.

Ключові слова: трансплантація нирки, реперфузія, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, вазапростан.

Трансплантація нирки залишається найбільш ефективним методом лікування пацієнтів з термінальною стадією хронічної ниркової недостатності і забезпечує кращі віддалені результати лікування, ніж діаліз, що дозволяє досягти найбільш високих показників виживаємості хворих та якості їх життя при найбільш низьких затратах на лікування [1].

Реперфузія — критичний момент у нирковій трансплантації. Відновлення кровотоку викликає численні метаболічні зміни як результат початкового стану нирок та їх консервація. В результаті реперфузії порушується кислотно-лужна рівновага. Метаболічний ацидоз з початку реперфузії може бути зумовлений накопиченням лактатом в ішемізованій нирці. Зниження HCO_3^- може вказувати на постреперфузійне пошкодження нирок. Антиоксидантні системи обмежують виникнення оксидантного стресу. Клітинна CuZn-супероксиддисмутаза, каталаза та клітинна пероксидаза є скавенджерами активних кисневих радикалів [2–4].

У зв'язку з цим важливою проблемою є запобігання або нівелювання зазначених ефектів при трансплантації нирки. Однак дотепер не вирішені питання ренопротекції при цих операціях.

Мета — розроблення комплексу діагностично-лікувальних заходів на етапах операції та ранньому післяопераційному періоді, які вміщують застосування тотальної внутрішньовенної анестезії та вазапростану для фармакологічного протиішемічного та про-

тиреперфузійного захисту ниркового трансплантата з обґрунтуванням дозування, часу та кратності введення, що дозволить істотно збільшити кількість первинно функціонуючих трансплантатів та значно знизити кількість ускладнень, сеансів гемодіалізу, тривалість госпіталізації.

Матеріал і методи. Проведено дослідження гемодинаміки, кисневого режиму, деяких показників метаболізму, а також крові, яка відтікає від ниркового трансплантата, на 5-й та 30-й хвилини реперфузії, 1-шу, 3-тю, 5-ту, 7-му добу післяопераційного періоду у 194 хворих, котрим виконана алотрансплантація трупної донорської нирки. Хворі були розподілені на групи в залежності від методики ренопротекції.

У групу 1 (контрольна) включені 117 хворих, які оперовані під тотальною внутрішньовенною анестезією з ШВЛ, керованою гідратацією кристалоїдами в об'ємі, підтримуючим ЦВТ на рівні 10–12 мм рт. ст., введенням блокаторів кальцієвих каналів (верапаміл у дозі 0,15 мг/кг) і манітолом.

В групу 2 включено 77 хворих, які оперовані під тотальною внутрішньовенною анестезією з ШВЛ, керованою гідратацією кристалоїдами в об'ємі, підтримуючим ЦВТ на рівні 10–12 мм рт. ст., введенням в ниркову артерію трансплантата альпростадилу (вазапростан) у дозі 20 мкг і системно у дозі 20 мкг протягом 5 діб.

Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали визначенням первинних і вторин-

© О.С. Никоненко, С.М. Гриценко, 2011

них продуктів ПОЛ (дієнові кон'югати і малоновий діальдегід). Про стан антиокисних механізмів судили за рівнем ретинолу, токоферолу, аскорбінової кислоти, каталази і білка церулоплазмину, який містить мідь. Кількісне визначення супероксиддисмутази проводили імуноферментним методом стандартними наборами фірми Bender Med-Systems (Австрія).

У всіх випадках застосовували тотальну внутрішньовенну анестезію. Хворим виконували первинну алотрансплантацію трупної донорської нирки. Переважали хворі у віці від 20 до 52 років. Маса тіла коливалася від 22 до 90 кг і в середньому маса тіла складала $(65,0 \pm 0,7)$ кг.

Тривалість лікування гемодіалізом — $(10,8 \pm 0,6)$ місяця. Рівень креатиніну сироватки крові напередодні трансплантації нирки в середньому складав (341 ± 26) мкмоль/л. Передіснуючі антитіла були відсутні у 39 реципієнтів. Число збігу антигенів донора й реципієнта за системою HLA у середньому дорівнювало $(1,85 \pm 0,14)$.

Результати та їх обговорення. Вихідні показники ПОЛ у хворих наведені у табл. 1.

Первинні продукти ПОЛ (ГПЛ — гідроперекис ліпідів) були підвищені в серед-

характеризувався підвищеною активністю в порівнянні з нормальними показниками.

Показники ПОЛ на етапах реперфузії в крові, що відтікає безпосередньо від трансплантата, наведені в табл. 2. На 5-й хвилині реперфузії у венозній крові (що відтікає від ниркового трансплантата) концентрація гідроперекисів ліпідів і малонового діальдегіду вірогідно не відрізнялася від відповідних вихідних показників.

Концентрації дієнових кон'югат і дієнових кетонів знижувалися в середньому на 37,2 і 38,4 % у порівнянні з відповідними вихідними показниками. Концентрація основ Шиффа в середньому збільшувалася на 23,1 % ($p < 0,05$).

На 30-й хвилині реперфузії концентрації гідроперекисів ліпідів, дієнових кон'югат, дієнових кетонів, малонового діальдегіду вірогідно зменшувалися відносно вихідних показників у середньому на 23,2; 35,1; 42,1 і 35,7 % ($p < 0,001$). Концентрація основ Шиффа в середньому збільшувалася на 28,4 % ($p < 0,05$).

Таким чином, на 5-й хвилині реперфузії ниркового трансплантата намітилася тенденція до обмеження активності системи ПОЛ ниркового алотрансплантата, на 30-й

Таблиця 1. Вихідні показники ПОЛ і АОС у хворих

| Показник | Норма | Вихідні дані |
|------------------------------------------|------------------|------------------|
| ГПЛ, ΔD_{220} , мл | $3,09 \pm 0,16$ | $8,52 \pm 0,40$ |
| Дієнові кон'югати, ΔD_{233} , мл | $2,17 \pm 0,14$ | $7,32 \pm 0,23$ |
| Дієнові кетони, ΔD_{273} , мл | $0,43 \pm 0,03$ | $2,16 \pm 0,17$ |
| ШО, у. о. | $27,25 \pm 2,70$ | $43,3 \pm 2,5$ |
| МДА, мкмоль/л | $3,80 \pm 0,23$ | $5,99 \pm 0,36$ |
| CuZn-супероксиддисмутаза, пг/мл | 104 ± 21 | 643 ± 57 |
| Каталаза, мкат/л | $50,1 \pm 1,5$ | $12,65 \pm 1,95$ |
| Церулоплазмін, мг% | $27,00 \pm 1,44$ | $12,54 \pm 0,86$ |
| Вітамін А, мкмоль/л | $2,52 \pm 0,03$ | $1,88 \pm 0,05$ |
| Вітамін Е, мкмоль/л | $20,00 \pm 0,28$ | $16,20 \pm 0,39$ |
| Вітамін С, мкмоль/л | $57,9 \pm 3,3$ | $20,2 \pm 1,2$ |

Примітка. $p < 0,001$.

ньому на 275,7 % ($p < 0,001$). Показники вторинних продуктів ПОЛ (дієнові кон'югати, дієнові кетони, малоновий діальдегід) перевищували в середньому відповідні показники норми на 337,3; 502,3 та 157,6 %. Концентрація основ Шиффа (ШО), що характеризують сумарно кінцеві продукти ПОЛ, була збільшена в середньому на 158,9 %. Таким чином, вихідний стан ПОЛ у реципієнтів

хвилині реперфузії активність системи ПОЛ ниркового трансплантата в порівнянні з вихідним станом вірогідно знижувалася.

Антиоксидантна система у хворих на етапах трансплантації нирки, зазнала таких змін.

Вихідні показники АОС у хворих наведені в табл. 1. До операції показник CuZn-супероксиддисмутази в 6 разів перевищував

Таблиця 2. Показники ПОЛ і АОС на етапах реперфузії у венозній крові ниркового трансплантата у хворих 2-ї групи

| Показник | Вихідні дані | 5-та хвилина реперфузії | 30-та хвилина реперфузії |
|------------------------------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|
| ГПЛ, ΔD_{220} , мл | 8,52 \pm 0,40 | 8,09 \pm 0,36 | 6,54 \pm 0,37 [@] |
| Дієнові кон'югати, ΔD_{233} , мл | 7,32 \pm 0,23 | 4,60 \pm 0,27 [@] | 4,75 \pm 0,26 [@] |
| Дієнові кетони, ΔD_{273} , мл | 2,16 \pm 0,17 | 1,33 \pm 0,09 [@] | 1,25 \pm 0,07 [@] |
| ШО, у. о. | 43,3 \pm 2,5 | 53,3 \pm 2,5* | 55,6 \pm 2,5* |
| МДА, мкмоль/л | 5,99 \pm 0,36 | 5,14 \pm 0,20 | 3,85 \pm 0,29 [@] |
| CuZn-супероксиддисмутаза, пг/мл | 643 \pm 57 | 947 \pm 51 [@] | 909 \pm 48 [@] |
| Каталаза, мкат/л | 12,65 \pm 1,95 | 12,99 \pm 3,72 | 10,10 \pm 2,50 |
| Церулоплазмін, мг% | 12,54 \pm 0,86 | 10,13 \pm 0,89 | 9,99 \pm 0,84 [#] |
| Вітамін А, мкмоль/л | 1,88 \pm 0,05 | 1,70 \pm 0,05 [#] | 1,75 \pm 0,04* |
| Вітамін Е, мкмоль/л | 16,20 \pm 0,39 | 15,20 \pm 0,42 | 14,50 \pm 0,34* |
| Вітамін С, мкмоль/л | 20,2 \pm 1,2 | 18,3 \pm 1,1 | 15,2 \pm 1,0 [@] |

Примітка. Розходження в порівнянні з вихідними даними достовірні: * $p < 0,05$; # $p < 0,01$; @ $p < 0,001$.

норму. Вихідні показники концентрації каталази, церулоплазміну, вітамінів А, Е і С у пацієнтів були вірогідно знижені відносно показників норми в середньому на 74,7; 53,5; 25,4; 19,0 і 62,1 % відповідно.

Таким чином, до операції у реципієнтів ниркових алотрансплантатів мало місце гноблення активності АОС.

Показники АОС на етапах реперфузії в крові, що відтікає безпосередньо від трансплантата, наведені в табл. 2.

На 5-й хвилині реперфузії у венозній крові (що відтікає від ниркового трансплантата) концентрація CuZn-супероксиддисмутази вірогідно зросла в середньому на 47,3 % у порівнянні з вихідним показником. Концентрації каталази, церулоплазміну, вітаміну Е вірогідно не відрізнялися від відповідних вихідних значень. Концентрація вітаміну А була знижена в середньому на 9,6 %. Концентрація аскорбінової кислоти вірогідно не відрізнялася від вихідної.

На 30-й хвилині реперфузії концентрація CuZn-супероксиддисмутази вірогідно перевищувала відповідний вихідний показник у середньому на 41,4 %. Показник каталазної активності вірогідно не відрізнявся від вихідного.

Встановлено, що до трансплантації нирки у реципієнтів груп 1 і 2 спостерігається нормодинамічний тип кровообігу, артеріальна гіпертензія 1-ї ст., знижена доставка кисню. Вихідний стан ПОЛ у реципієнтів характеризувався підвищеною активністю і гнобленням активності АОС.

На 5-й хвилині реперфузії у реципієнтів групи 2 у венозній крові, що відтікає від ниркового трансплантата, має місце субкомпенсований метаболічний ацидоз. Концентрація CuZn-супероксиддисмутази вірогідно зросла в середньому на 47,3 % у порівнянні з вихідним показником. Концентрація вітаміну А була знижена в середньому на 9,6 %.

На 30-й хвилині після відновлення кровотоку трансплантата у реципієнтів групи 2 у венозній крові продовжував зберігатися субкомпенсований метаболічний ацидоз. У реципієнтів групи 1 посилення процесів ПОЛ спостерігалось тільки в першу добу. На етапі реперфузії ниркового трансплантата у реципієнтів групи 2 активність системи ПОЛ обмежувалася підвищенням активності CuZn-супероксиддисмутази на тлі зниження вивчених ланок АОС. У найближчому і ранньому післяопераційному періодах обмеження активності процесів ПОЛ в основному відбувалося за рахунок зростання каталазної активності. Концентрація аскорбінової кислоти була нижче норми більш, ніж у 3 рази. Негайна функція ниркового трансплантата відмічена: в контрольній групі — у 86,3 % реципієнтів, у групі 2 — у 94,87 %. Комплексна програма анестезії та протишемічного захисту трансплантатів дозволяє збільшити кількість ниркових трансплантатів із негайною функцією на 8,48 % ($p < 0,05$), зменшити тижневу летальність з 1,7 до 0 %. Фармакологічний протишемічний захист ниркових транс-

плантатів на етапі реперфузії більш ефективний при використанні альпростадилу (вазапростану) у реципієнтів групи 2 з керованою гідратацією кристалолоїдами до досягнення у реципієнтів цільового ЦВТ 10–12 мм рт. ст.

Висновок

Завдяки застосуванню вазапростану на етапі реперфузії ниркового трансплантата

активність системи ПОЛ обмежувалася підвищенням активності CuZn-супероксиддисмутаз. На 5-й і 30-й хвилинах реперфузії мали місце різнонаправленні зміни ланок АОС: підвищення антиоксидантної активності CuZn-супероксиддисмутаз і зниження активності вітамінів А, Е і С при незмінній пригнотеній активності каталази і церулоплазміну.

Список літератури

1. Трансплантация почки от живого родственного донора / Я. Г. Мойсюк, А. В. Шаршаткин, С. М. Арутюнян [и др.] // Нефрология и диализ. — 2003. — № 3. — С. 17–22.
2. Activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in erythrocyte in kidney allografts during reperfusion in patients with and without delayed graft function / L. Domanski, B. Dolegowska, K. Safranow [et al.] // Clin. Transplant. — 2006. — V. 1. — P. 67–71.
3. Early acid-base balance disorders during kidney transplantation / K. Tejchman, L. Domanski, J. Sienko [et al.] // Transplant. Proc. — 2006. — V. 1. — P. 123–126.
4. Superoxide anion as a marker of ischaemia-reperfusion injury of the transplanted kidney / M. Masztalerz, Z. Wlodarczyk, J. Czuczejko [et al.] // Transplant. Proc. — 2006. — V. 1. — P. 46–48.

А.С. Никоненко, С.Н. Гриценко

РЕНОПРОТЕКЦИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Установлены разнонаправленные изменения элементов антиоксидантной системы на 5-й и 30-й минутах реперфузии почек аллотрансплантата: повышение активности CuZn-супероксиддисмутазы, снижение активности витаминов А, Е и С и неизменное ингибирование активности каталазы и церулоплазмينا. Во время почечной аллотрансплантации реперфузия перекисного окисления липидов было ограничено увеличением активности CuZn-супероксиддисмутазы на фоне ингибирования изучаемых элементов антиоксидантной системы. На ближайшем и раннем послеоперационном сроке ограничение активности продуктов перекисного окисления липидов происходило в основном за счет увеличения активности каталазы и в меньшей степени из-за роста концентрации витамина А.

Ключевые слова: трансплантация почки, реперфузия, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, вазапростан.

A.S. Nikonenko, S.N. Gritsenko

KIDNEY PROTECTION ON STAGES OF KIDNEY ALLOGRAFTING

It has been found differently directed changes of AOS elements on 5 and 30 minutes of kidney allograft reperfusion: increase of activity of CuZn-superoxide dismutase, decrease of activity of vitamins А, Е and С and unchanged inhibited activity of catalase and ceruloplasmin. During kidney allograft reperfusion LP activity was limited by increase of CuZn-superoxide dismutase activity on the background of inhibition of the studied AOS elements. On the nearest and early postoperative period limitation of LP activity took place mainly in expense of increase of catalase activity and, in lesser degree, because of rise of concentration of vitamin А.

Key words: kidney allografting, reperfusion, lipid peroxidation, antioxidant system, vasaprostan.

УДК 616.36-089.844:617-089.5]-08

*А.С. Никоненко, С.Н. Гриценко, В.А. Собокарь,
В.В. Саленюк, А.А. Вороной*

ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»

АНЕСТЕЗИЯ И ИНТРАОПЕРАЦИОННАЯ ИНТЕНСИВНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

Представлен опыт анестезиологического обеспечения ортотопической трансплантации печени 12 больным. Описана технология общей анестезии без веновенозного обхода. Приведен анализ гемодинамики, транспорта кислорода, изменений некоторых показателей метаболизма на этапах анестезии и операции. Анестезия и интраоперационная интенсивная терапия при пересадке печени являются очень сложной проблемой, требующей достаточного оснащения, трансфузионного обеспечения, инвазивного мониторинга, а также слаженной работы хирургов, анестезиологов, перфузиологов, трансфузиологов, врачей-лаборантов.

Ключевые слова: трансплантация, печень, анестезия, интенсивная терапия.

Ironically... liver replacement, which was once considered the most formidable of the whole organ transplantation procedures and the least likely to be practical, has become the flagship of new principles that are applicable to recipients of all whole organs...

Thomas Starzl, 1996

Трансплантация печени — жизнеспасаящая операция больным с конечными стадиями хронических паренхиматозных или холестатических процессов печени, осложненных портальной гипертензией, кровотечениями из варикозно расширенных вен пищевода, асцитом, энцефалопатией, гепаторенальным синдромом [1–5]. Представляем наш опыт анестезиологического обеспечения 12 ортотопических пересадок печени (ОТП), выполненных в 1994–2011 годах профессором А.С. Никоненко с сотрудниками.

Материал и методы. Нами были проведены и проанализированы течение 12 анестезий при ОТП. Характеристика больных, продолжительность операции и наркоза, объемы кровопотери и инфузионно-трансфузионной терапии приведены в таблице. Оперированы 6 мужчин и 6 женщин в возрасте 24–58 лет, средний возраст — $(37,4 \pm 3,8)$ года. В 9 случаях ОТП были выполнены по поводу цирроза печени, в 2 — по поводу первичной холангиокарциномы, в 1 — доброкачественной гигантской гемангиомы. Диагнозы подтверждены дооперационной

биопсией печени. Все ОТП выполняли без веновенозного обхода. Предоперационная подготовка включала в себя лапароцентез (в 1 случае — наложение постоянного перитонеовенозного шунта) у больных с асцитом, переливание эр. массы, альбумина для коррекции анемии и гиповолемии, кристаллоидов, а также свежзамороженной плазмы (СЗП) для коррекции гипокоагуляции, симптоматическую терапию. У 5 больных отмечались гепаторенальный синдром (скорость клубочковой фильтрации — 36–52 мл/мин), портальная гипертензия с расширением вен пищевода, энцефалопатия. Предоперационную подготовку дополняли назначением верошпирона, фуросемида, лактулозы в общепринятых дозах.

Согласно критериям, разработанным W. Shoemaker, эти больные отнесены к группе высокого риска (обширность операции — гепатэктомия, острая массивная кровопотеря — более 3 л, снижение гематокрита — менее 25 %).

Перед операцией у больных циррозом печени показатели общего и прямого билирубина в плазме составляли 21–128/11–

© А.С. Никоненко, С.Н. Гриценко, В.А. Собокарь и др., 2011

Характеристика больных, продолжительность операции и наркоза, объемы кровопотери и восполнение

| Показатель | Больной | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------------|---------|------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Возраст, лет | 39 | 48 | 43 | 32 | 35 | 24 | 50 | 28 | 32 | 33 | 58 | 40 |
| Пол | м | ж | м | ж | ж | м | м | ж | м | ж | ж | м |
| Масса, кг | 68 | 72 | 80 | 55 | 53 | 62 | 71 | 47 | 55 | 50 | 65 | 60 |
| Длительность анестезии, ч | 11,8 | 10,5 | 11,7 | 12,0 | 8,3 | 10,5 | 10,8 | 11,8 | 15,0 | 9,5 | 14,0 | 14,0 |
| Длительность операции, ч | 10,2 | 8,2 | 9,0 | 9,0 | 5,6 | 9,5 | 8,7 | 9,3 | 13,0 | 8,0 | 12,0 | 12,0 |
| <i>Применяемые препараты</i> | | | | | | | | | | | | |
| ГОМК, г | 28 | 8 | 20 | 14 | 14 | 18 | 24 | 18 | 16 | 16 | 18 | 16 |
| ГОМК, мг/(кг·мин) | 0,58 | 0,18 | 0,36 | 0,35 | 0,53 | 0,46 | 0,52 | 0,54 | 0,32 | 0,56 | 0,33 | 0,38 |
| Фентанил, мг | 7 | 3,5 | 2,4 | 3,9 | 4,1 | 3,9 | 4,2 | 4,4 | 6,3 | 4,0 | 7,0 | 3,4 |
| Фентанил, мкг/(кг·час) | 10,09 | 5,93 | 3,33 | 7,88 | 13,81 | 6,62 | 6,80 | 10,07 | 7,64 | 8,42 | 7,69 | 4,04 |
| Кетамин, мг | 800 | — | 850 | — | — | — | — | — | 200 | | | |
| Севоран, об% | | | | | | | | | | | | 2,0 |
| Кальция глюконат, г | 20 | 3 | 5 | 5 | 7 | 5 | 6 | 5 | 5 | 5 | 10 | 5 |
| Сода, ммоль | 600 | 250 | 400 | 300 | 100 | 200 | 180 | — | 400 | 200 | 200 | 400 |
| <i>Объем кровопотери и восполнение</i> | | | | | | | | | | | | |
| Объем кровопотери, мл | 10400 | 3000 | 9000 | 6000 | 3000 | 4500 | 6500 | 6000 | 6000 | 2000 | 10000 | 8000 |
| Эр. масса, мл | 10395 | 1920 | 3130 | 3300 | 2100 | 2960 | 4530 | 2905 | 4200 | 1000 | 3650 | 4332 |
| СЗП, мл | 3135 | 3440 | 3105 | 2300 | 2400 | 2760 | 4180 | 5080 | 7220 | 1200 | 5410 | 5000 |
| Альбумин 10 %, мл | 900 | 1200 | 4000 | 600 | 400 | 900 | 1800 | 2600 | | | 1400 | |
| Аутоэритроциты, мл | — | 600 | 1800 | 2200 | 800 | 1300 | 2000 | 1847 | 1600 | 600 | 1400 | 1000 |
| Кристаллоиды, мл | 3600 | 1000 | 1800 | 1600 | 800 | 2000 | 4400 | 2800 | 1300 | 2000 | 5600 | 6200 |
| Коллоиды, мл | 2400 | | | | | | | | 500 | 500 | 500 | |
| Криопреципитат, доз | 12 | — | 30 | 30 | 20 | 14 | 20 | 18 | 18 | 22 | 20 | 20 |
| Диурез, мл | 170 | 2300 | 450 | 1800 | 400 | 900 | 5350 | 2150 | 2300 | 475 | 2500 | 5300 |
| Перспирация, мл | 4800 | 4100 | 5000 | 4300 | 2100 | 4100 | 4300 | 3100 | 5000 | 4000 | 4350 | 4200 |
| Асцитическая жидкость, л | 6,0 | — | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 3,0 | — | 4,8 | 2,0 | | | |
| Гемогидробаланс, л | -0,9 | -1,2 | -3,0 | -4,1 | -2,6 | -2,3 | +1,1 | -0,4 | +0,5 | -1,0 | +0,25 | +0,4 |

56 мкмоль/л. У больных злокачественными новообразованиями печени содержание билирубина в плазме было 304–610/204–382 мкмоль/л. У всех больных имелась анемия, уровень гемоглобина — (82,2±4,6) г/л, протромбиновый индекс колебался от 60 до 81 %, электролиты (K⁺, Na⁺, Ca²⁺) в плазме крови — соответственно (3,26±0,13), (136,0±1,1) и (0,91±0,04) ммоль/л. У 1 больного число тромбоцитов было 48·10⁹/л.

Донорами являлись 8 мужчин (24–50 лет) и 4 женщины (20–48 лет) в состоянии смерти головного мозга, причиной которой в 10 случаях была черепно-мозговая травма и в 2 — острое нарушение мозгового кровообращения. У всех доноров регистрировали нормальные показатели билирубина, креатинина, протромбинового индекса и аминотрансфераз. Изъятие трансплантата выполняли в рамках мультиорганного забора, дли-

тельность которого не превышала 90 мин. Анестезиологическое обеспечение проводили натрия оксibuтиратом. В качестве консерванта использовали кустадиол.

После визуальной оценки трансплантата сообщали в центр трансплантации о возможности выполнения ОТП. Реципиента направляли в операционную.

Анестезиологическое обеспечение реципиентов. Премедикация — рантак, метоклопрамид и атропин. Чрезкожно катетеризовали периферическую вену, вводили антибиотик, начинали преоксигенацию. Мониторинг неинвазивного артериального давления, ЭКГ, насыщения гемоглобина кислородом и температуру тела проводили аппаратом Cardiosap II CH-S фирмы «Датекс» (Финляндия). В качестве базового анестетика избран оксibuтират натрия, лишенный выраженных негативных метаболических эффектов. Изменение концентрации оксibuтирата натрия в организме носит экспоненциальный характер, а константа его метаболизма одинакова для мозга, крови, легких, печени, почек и скелетных мышц. При кровопотере скорость утилизации оксibuтирата натрия возрастает, а время поддержания наркотической концентрации в крови сокращается [6]. Начальная и поддерживающая дозы его определены с учетом вероятности поддержания минимальной наркотической концентрации в крови в зависимости от объема операционной кровопотери [6].

Введение в наркоз: натрия тиопентал — 3 мг/кг или кетамин 2 мг/кг, лидокаин — 1 мг/кг, оксibuтират натрия — 56 мг/кг/30 мин (начальная доза), ардуан — 0,06 мг/кг, ИВЛ кислородно-воздушной смесью с ПДКВ до 5–10 см вод. ст. (в беспеченочном периоде и реперфузионной фазе). Анестезию поддерживали оксibuтиратом натрия в зависимости от объема кровопотери, анальгезию — фентанилом — 20 мкг/кг в 1-й час, 5–10 мкг/кг — в последующие часы. Поддержание релаксации — ардуан. Для улучшения кровотока почек и других внутренних органов на протяжении всей операции и в первые 48 часов использовали допамин — 1–2 мкг/кг/мин. Перед пуском кровотока через трансплантат вводили 30–50 мл кальция глюконата и 1000 мг метилпреднизолона. Для профилактики реперфузионного синдрома использовали изоптин — 5 мг, маннитол — 30 г. Восполнение кровопотери и компенсацию венозного возврата проводили системой быстрой инфузии, используя

для этого роликовый насос АИКа фирмы «Stockert» (Германия) и оксигенатор. Сбор крови из операционной раны с последующей реинфузией осуществляли селл-сейвером.

Контроль за состоянием больных. После введения больного в наркоз выполняли следующие сосудистые доступы: правая яремная вена (трехпросветный катетер, катетер Сван–Ганза в легочную артерию), правая подключичная вена (трехпросветный катетер), одна из лучевых артерий. Для непрерывного инвазивного измерения систолического, диастолического и среднего артериального давления (САД), среднего давления в легочной артерии (СДЛА), ЦВД, электрокардиографии и температуры тела использовали мониторы с инвазивными датчиками для регистрации параметров центральной гемодинамики. Систему быстрой инфузии соединяли с катетером (внутренний диаметр — 3 мм), находящимся в левой плечевой вене. Дозированное введение лекарственных средств осуществляли с помощью четырех полуавтоматических инъекторов (допамин, оксibuтират натрия, норадреналин, аprotинин) и трех гравитационных дозаторов (добутрекс, нитроглицерин, фентанил). С помощью общепринятых методов на этапах общей анестезии и операции оценивали показатели кислотно-основного состояния и газового состава артериальной и смешанной венозной крови, электролитов плазмы (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), осмолярность — AVL-505 и 800, концентрации белка и глюкозы крови, параметры гемостаза (время свертываемости, фибриноген, протромбиновый индекс), число тромбоцитов.

В операционной рассчитывали системный транспорт (STO_2) и потребление (PO_2) кислорода. Перспирацию рассчитывали ретроспективно по формуле $\Pi = \text{масса} \times \text{длительность анестезии} \times 7$ (мл). Гемогидробаланс рассчитывали с учетом асцитической жидкости.

Статистическую обработку показателей гемодинамики, кислородного режима и лабораторных данных проводили на следующих этапах операции: 1-й — исходные данные; 2-й — после введения в наркоз; 3-й — интубация трахеи; 4-й — ревизия органов брюшной полости; 5-й — выделение печеночно-двенадцатиперстной связки; 6-й — пережатие воротной вены; 7-й — мобилизация печени; 8-й — пережатие нижней полой вены; 9–10–11-й — 15–30–60 мин беспеченочного периода; 12-й — 5-я минута реперфузионной фазы; 13-й — формирование

артериального анастомоза; 14-й — формирование желчеотводящего анастомоза; 15-й — гемостаз и ушивание операционной раны; 16-й — конец операции. Лабораторные данные усредняли на следующих этапах: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16.

В зависимости от этапов хирургического вмешательства можно выделить три основных периода общей анестезии.

I. Добеспеченочный период — от момента кожного разреза до полного выключения печени из кровотока (1–8-й этапы). Интраоперационную интенсивную терапию при массивной кровопотере начинали у больных циррозом печени с началом кожного разреза, используя эр. массу, СЗП, альбумин, а также кровь из селл-сейвера. Профилактику активации плазмينا и фибринолиза начинали болюсным введением 200 000 ЕИК аprotинина и продолжали до конца операции в дозе 100 000 ЕИК/ч.

II. Беспеченочный период — от момента пережатия подпеченочного отдела нижней полой вены до включения печени в кровоток (9–11-й этапы). В аспекте влияния на гемодинамику более значимо пережатие нижней полой вены, чем воротной. Веновенозный обход не использовали ни в одном случае. Гипокоагуляцию начинали корректировать СЗП и криопреципитатом.

III. Послебеспеченочный период — от начала последовательного снятия зажимов с нижней полой и воротной вен до окончания операции (12–16-й этапы). Гемостаз проводили очень тщательно в течение 1,5–2 ч и только затем ушивали операционную рану. Введение криопреципитата продолжали.

Начальный этап третьего периода, непосредственно после включения трансплантата в кровоток, выделяют в особую реперфузионную фазу ОТП, характеризующуюся особенно выраженными гемодинамическими и метаболическими сдвигами гомеостаза, а также потенциальной угрозой воздушной эмболии.

Результаты и их обсуждение. Продолжительность анестезии при ОТП колебалась от 8,3 до 15,0 часа, оперативного вмешательства — от 5,6 до 13,0 часов. Продолжительность беспеченочного периода — 40–80 мин. Показатели центральной гемодинамики и транспорта кислорода приведены на рис. 1.

Добеспеченочный период. Выраженных расстройств кровообращения не наблюдалось. Достоверно снижалось САД на 19,6 %, умеренно возрастало ЦВД и постепенно на-

растала ЧСС. СДЛА к концу беспеченочного периода было снижено по сравнению с исходными показателями, но оставалось в пределах нормальных значений. К концу добеспеченочного периода $СТО_2$ и $ПО_2$ снижались на 26,8 и 33,2 % по сравнению с соответствующими исходными значениями. Причиной снижения $СТО_2$ явилось достоверное снижение сердечного индекса (СИ), обусловленное уменьшением венозного возврата из-за пережатия воротной вены и общей печеночной артерии. Температура тела колебалась в пределах 37,1–37,4 °С.

Беспеченочный период. После пережатия нижней полой вены САД снижалось до (68,0±2,7) мм рт. ст., что позволяло обойтись без веновенозного обхода. Гемодинамику поддерживали норадреналином, добутрексом и нитроглицерином, инфузионно-трансфузионной терапией (система быстрой инфузии) со скоростью кровопотери под контролем ЦВД и СДЛА. Дозировки норадреналина, добутрекса и нитроглицерина зависели от состояния гемодинамики и составляли 2–6 мкг/мин, 2,5–10 мкг/(кг·мин) и 10–30 мкг/мин соответственно. САД удерживали в пределах (64,0±3,2) — (74,0±3,9) мм рт. ст., что позволяло минимизировать развитие отека кишечной стенки и почек при пережатых воротной и нижней полой вен. ЧСС колебалась в пределах (119,0±7,6) — (138,0±7,1) уд/мин. Отмечалось постепенное возрастание СДЛА к концу беспеченочного периода. Тем не менее, повышение СДЛА не выходило за допустимые величины. Перед пуском кровотока через трансплантат инфузию нитроглицерина прекращали. ЦВД колебалось в пределах нормальных значений. Снижение $СТО_2$ до (251,0±11,9) мл/(мин·м²), т. е. более чем в 2 раза, можно объяснить снижением СИ в результате низкого венозного возврата, массивной кровопотери. $ПО_2$ снижалось критически, достигая минимальных значений (51,0±4,2) мл/(мин·м²) в конце беспеченочного периода. Донорскую печень отмывали 5 % раствором альбумина — 0,6–1,0 л через воротную вену для удаления консерванта и пузырьков воздуха из трансплантата. Перед пуском кровотока вводили внутривенно 30–50 мл кальция глюконата, заполняли резервуар системы быстрой инфузии эр. массой, СЗП и 5 % раствором альбумина в соотношении 2:3:1.

Послебеспеченочный период. Пуск кровотока через трансплантат сопровождался кратковременным (30–40 с) снижением АД,

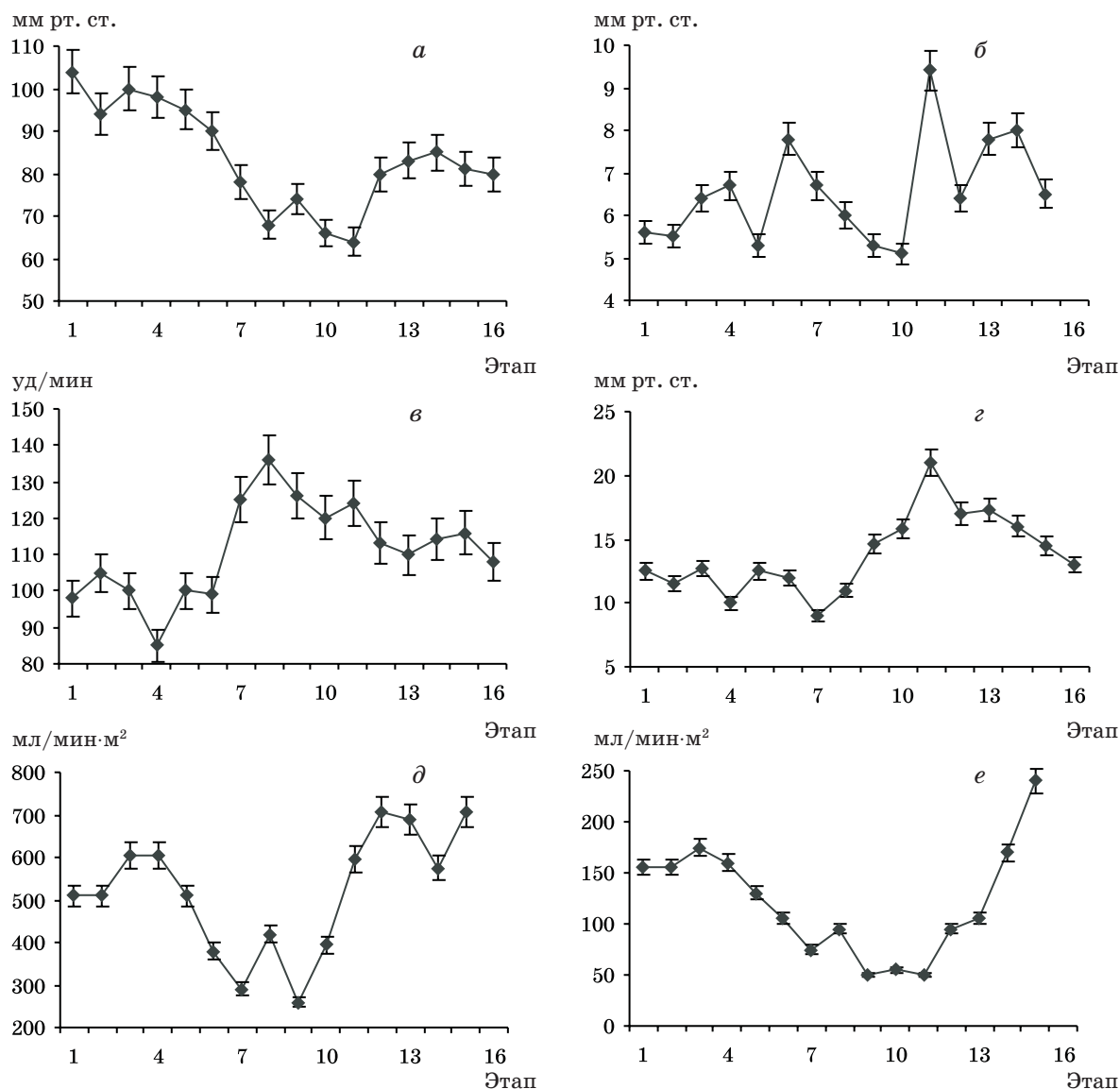


Рис. 1. Центральна гемодинаміка і транспорт кисню на етапах ОТП: а — САД; б — ЦВД; в — ЧСС; г — СДЛА; д — STO_2 ; е — PO_2 ; $p < 0,05$

уреженням ЧСС, ростом ЦВД і СДЛА до $(9,50 \pm 0,36)$ і $(20,60 \pm 0,79)$ мм рт. ст. відповідно. Розвивався так званий постреперфузійний синдром (ПРС) [7]. Патогенез ПРС пов'язаний не стільки з острым збільшенням переднагрузки в результаті мобілізації крові з нижніх кінцівок і кишечника, скільки з угнетенням скоротливої здатності міокарда. Депресія міокарда є головною, але не єдиною причиною ПРС. Факторами, сприяючими розвитку ПРС, є гіперкаліємія, метаболічний ацидоз, гіпотермія. Простациклін, тромбоксан і ендотоксин після реперфузії печеночного трансплантата в нинішнє час відводиться віводяча роль в розвитку ПРС [8–

15]. САД зростало до $(95,0 \pm 3,9)$ мм рт. ст., ЧСС к концу операції достовірно не відзначалась від доопераційних значень. СИ зростав і коливався в межах $(4,30 \pm 0,24)$ — $(5,50 \pm 0,31)$ л/(мін·м²). Інфузію добутрекса припиняли. Гіпердинамія кровообігу зберігалась в часі всього післяпеченочного періоду. STO_2 підвищався, досягаючи максимальних значень $(682,0 \pm 21,0)$ — $(711,0 \pm 22,1)$ мл/(мін·м²) на етапах формування артеріального і жовчотворячого анастомозів. PO_2 к концу ОТП достовірно перевищувало доопераційний рівень. СДЛА поступово знизалося і к концу операції не відзначалося від доопераційних нормальних значень. Діурез складав 0,6–6,5 мл/(кг·ч).

Метаболічніє і електролітніє змієня во время ОТП. Выраженнєи змієняєи рН на протяженієи добеспеченочного періода не отмечалось. Однако к концу беспеченочного періода отмечалось постепенное достоверное снижение рН и рост дефицита буферных оснований. Показатель HCO_3^- оставался в пределах физиологических значений, вероятно, за счет возрастания pCO_2 на 14,8 % по сравнению с исходом. Показатель p50 достоверно возрастал до $(30,8 \pm 1,2)$ мм рт. ст., что свидетельствует о смещении кривой диссоциации оксигемоглобина вправо (рис. 2).

На протяжении бес- и послебеспеченочного периодов развивался декомпенсированный метаболический ацидоз. Причина

ми ацидоза явились снижение системного транспорта кислорода, отсутствие печеночного метаболизма неэстерифицированных жирных кислот и других кислых промежуточных продуктов обмена веществ, инфузия цитратной крови. Тактика коррекции дефицита буферных оснований является дискуссионной. Основными отрицательными эффектами чрезмерно активного использования гидрокарбоната натрия являются гипернатриемия и гиперосмолярность. Мы начинали коррекцию метаболического ацидоза гидрокарбонатом натрия при снижении ВЕ ниже 5 ммоль/л.

В беспеченочном и послебеспеченочном периодах не отмечено достоверных изменений концентрации калия в плазме крови.

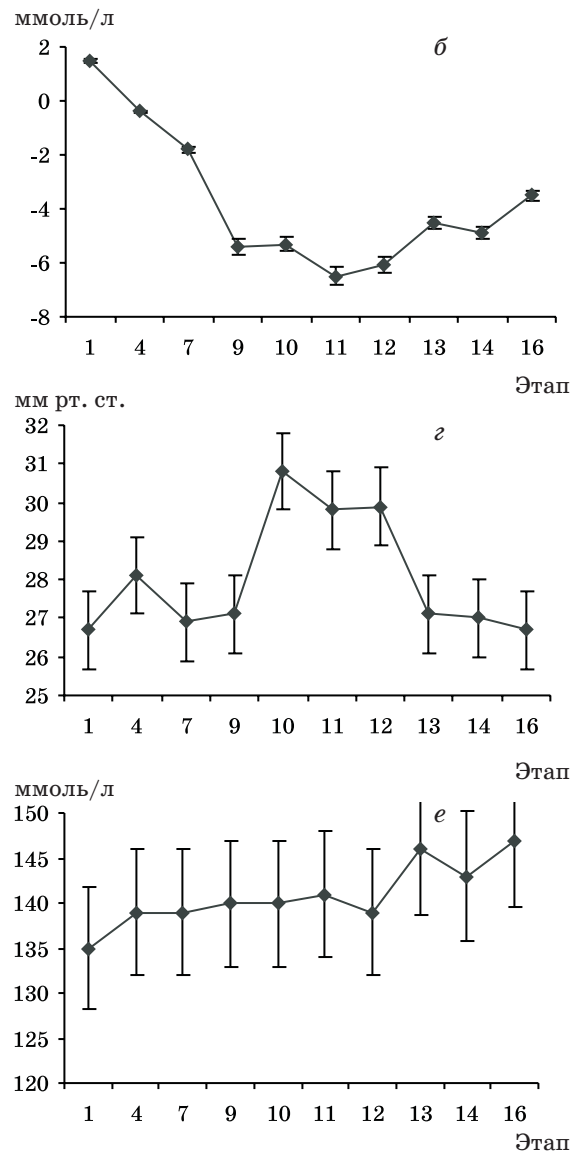
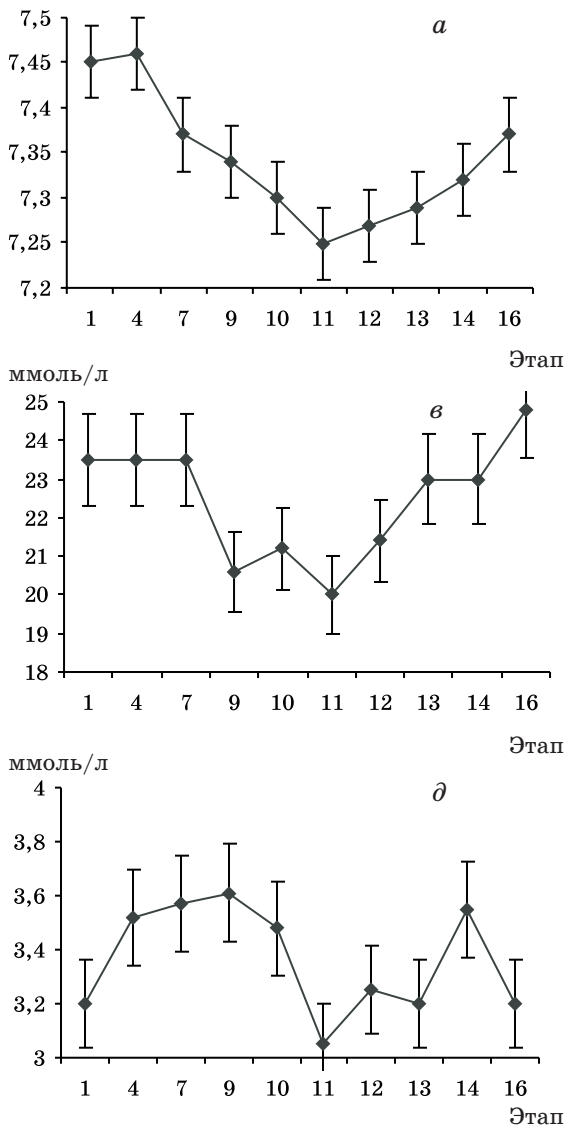


Рис. 2. Показатели КОС и электролитов на этапах ОТП:
 а — рН; б — ВЕ; в — HCO_3^- ; г — p50 ; д — K^+ ; е — Na^+

Отсутствие гиперкалиемии после реперфузии донорской печени для нас было неожиданным и, вероятно, объясняется достаточным отмыванием трансплантата 5 % раствором альбумина, гипокалиемическим эффектом натрия оксипутирата и низким содержанием калия в кустадиоле. Снижение концентрации ионизированного кальция в плазме крови в добеспеченочном $[(0,735 \pm 0,051)$ ммоль/л] и беспеченочном $[(0,602 \pm 0,060)$ ммоль/л] периодах — типичное электролитное нарушение при ОТП, требующее инфузии значительных количеств препаратов кальция, поскольку при снижении уровня ионизированного кальция в плазме крови менее 0,55 ммоль/л угнетается инотропная функция миокарда. Одной из причин снижения концентрации ионизированного кальция в плазме крови является массивное переливание крови, содержащей натрия цитрат, активно связывающий ионизированный кальций.

В послебеспеченочном периоде отмечали повышение содержания ионизированного кальция, достигающее дооперационного уровня. Содержание глюкозы в крови до операции было нормальным у всех больных. На протяжении беспеченочного и в на-

чале послебеспеченочного периодов регистрировали умеренную гипергликемию. Причиной этого явления могут быть использование массивных доз метилпреднизолона и выброс глюкозы из гепатоцитов трансплантата. К концу операции уровень гликемии снижался, что является важным начальным признаком восстановления метаболических функций трансплантата. Рост протромбинового индекса к концу операции свидетельствует о начале восстановления белкосинтетической функции трансплантата.

Инфузионно-трансфузионная терапия и гемостаз во время ОТП. Отсутствие значительных изменений концентраций гемоглобина и общего белка свидетельствует об адекватности инфузионно-трансфузионной терапии, хотя объем кровопотери колебался от 3 до 10,4 л (рис. 3) и в среднем составил 6200 мл.

Острая массивная кровопотеря была наибольшей у больных циррозом печени. Приблизительно 60–70 % объема кровопотери во время операции у этих больных наблюдали на этапе гепатэктомии и в беспеченочном периоде. Тактика восполнения строилась на стремлении поддерживать показатели гемоглобина и общего белка на

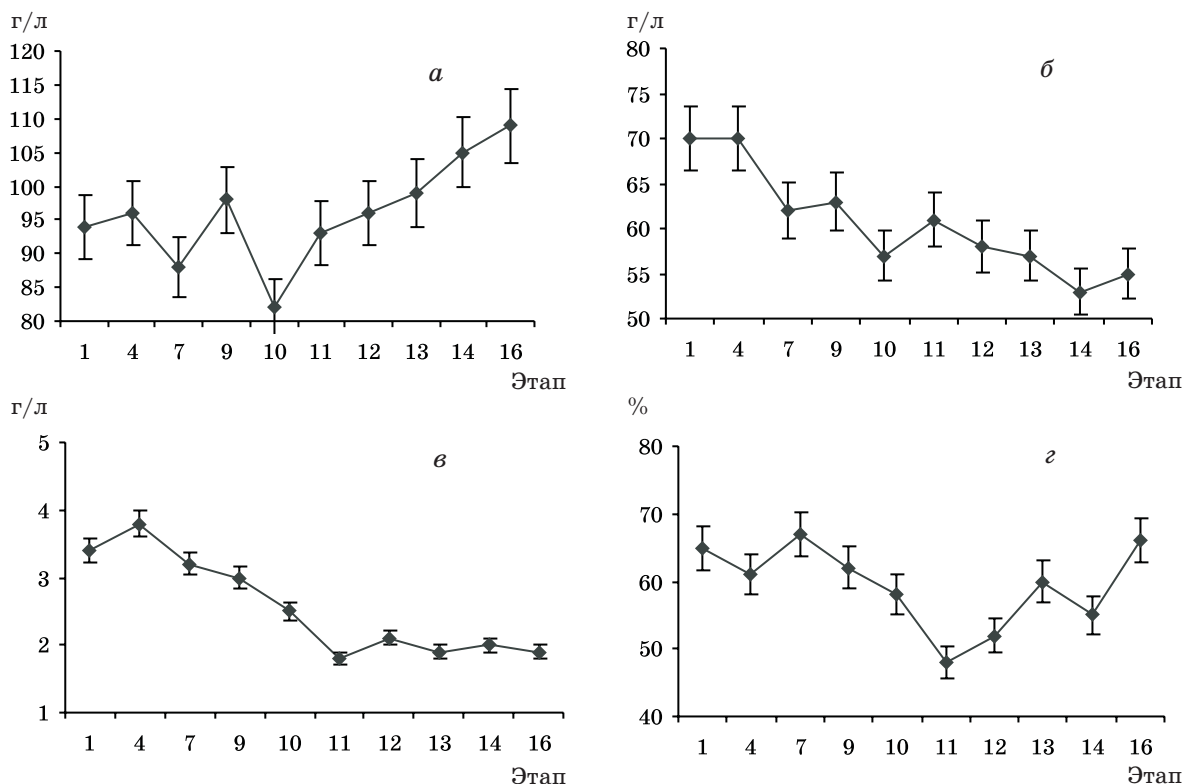


Рис. 3. Некоторые показатели метаболизма на этапах ОТП:
 а — Hb; б — общий белок плазмы; в — фибриноген; г — протромбиновый индекс;
 д — время свертываемости; е — глюкоза крови

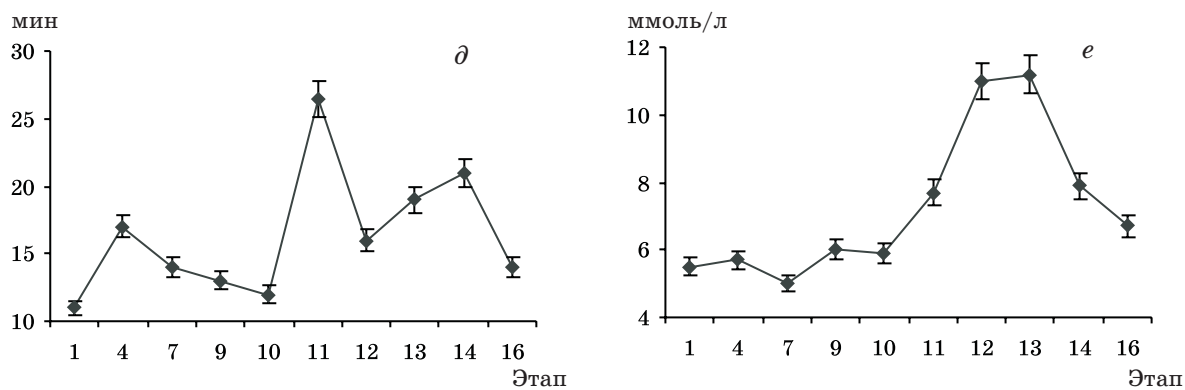


Рис. 3. Окончание

уровне 80 и 60 г/л соответственно. Для восполнения массивной кровопотери использовали эр. массу, СЗП, альбумин, кристаллоиды и препараты ГЭК. Кроме того, с помощью селл-сейвера было возвращено около трети объема перелитой эр. массы. Состав и объемы инфузионно-трансфузионной терапии приведены в таблице. Использование массивных объемов СЗП и постоянная внутривенная инфузия аprotинина и криопрципитата позволили добиться удовлетворительного гемостаза, хотя время свертываемости крови достоверно удлинялось к концу беспеченочного периода до $(26,0 \pm 1,2)$ мин на фоне достоверного снижения протромбинового индекса до $(52,5 \pm 2,8)$ % и концентрации фибриногена до $(1,80 \pm 0,31)$ г/л.

После операции сознание у больных восстановилось через 2–8 ч, экстубация трахеи выполнялась через 10–24 ч после ликвидации метаболического алкалоза, который всегда развивался после операции. Интенсивное желчеотделение у 11 больных началось через 6–7 ч. Интраоперационной летальности не было.

В послеоперационном периоде пациентам проводили иммуносупрессию (неорал + метилпреднизолон), в течение 10 дней —

антибиотикотерапию. Всем больным проводили противовирусную и противогрибковую терапию.

Выводы

1. Анестезия и интраоперационная интенсивная терапия при пересадке печени являются очень сложной проблемой, требующей достаточного оснащения, трансфузионного обеспечения, агрессивного мониторинга, а также слаженной работы хирургов, анестезиологов, перфузиологов, трансфузиологов, врачей-лаборантов.

2. В добеспеченочном периоде не отмечалось серьезных расстройств гемодинамики и метаболизма.

3. В беспеченочном периоде наблюдалось выраженное снижение системного транспорта и потребления кислорода, развивался ацидоз, возрастало время свертываемости крови, снижались протромбиновый индекс и концентрация фибриногена плазмы.

4. В послебеспеченочном периоде наблюдалась стабилизация гемодинамики и транспорта кислорода. Регистрировалась гипернатриемия. Показатели свертывающей системы крови улучшались.

Список литературы

1. Ерамешанцев А. К. Ортопическая трансплантация печени / А. К. Ерамешанцев, С. В. Готье, О. Н. Цирюльникова // Клиническая медицина. — 1991. — Т. 69, № 16. — С. 12–16.
2. Fabbioni D. Anaesthesia for hepatic transplantation. Continuing education in anaesthesia / D. Fabbioni, M. Bellamy // Critical Care and Pain. — 2006. — V. 6. — P. 171–175.
3. Анестезиологическое обеспечение ортопической трансплантации печени в клинике / В. И. Шумаков, И. А. Козлов, И. Е. Пиляева [и др.]. // Анестезиология и реаниматология. — 1991. — № 4. — С. 3–10.
4. Шумаков В. И. Трансплантация печени в России / В. И. Шумаков, Я. Г. Мойсюк // Трансплантология и искусственные органы. — 1994. — Презентац. выпуск. — С. 25–28.
5. Starzl Th. E. The Puzzle People. Memoirs of a transplant surgeon / Th. E. Starzl. — University of Pittsburgh Press, 1992. — 364 p.
6. Хижняк А. А. Концентрация оксипутирата натрия при наркозе в условиях хирургической кровопотери : автореф. дис. на соискание уч. степени канд. мед. наук / А. А. Хижняк. — Харьков, 1979. — 20 с.

7. *Hannaman M. J.* Anaesthesia care for liver transplantation / M. J. Hannaman, Z. G. Hevesi // *Transplant. Revs.* — 2011. — V. 25. — P. 36–43.
8. *Busuttil R. W.* The utility of marginal donors in liver transplantation / R. W. Busuttil, K. Tanaka // *Liver Transplant.* — 2003. — V. 9. — P. 651–663.
9. *Govender S.* Anaesthesia for liver transplant / S. Govender // *University of Kwazulu-Natal.* — 2009. — P. 1–39.
10. Controversies in anesthetic management of liver transplantation / J. L. Manley, J. S. Plotkin, J. Yosaitis [et al.] // *HPB (Oxford).* — 2005. — V. 7 (3). — P. 183–185.
11. A practical approach to anaesthesia for paediatric liver transplantation / J. Thomas, M. McCulloch, W. Spearman [et al.] // *Southern Africa J. of Anesthesia and Analgesia.* — 2006. — V. 3. — P. 11–15.
12. *Wang Ling.* Anesthesia management for liver transplantation / Wang Ling, Tang Shi-rong. // *J. of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* — 2008. — V. 3. — P. 43–51.
13. Endotoxemia and human liver transplantation / I. Yokoyama, S. Todo, T. Miyta [et al.] // *Transplant. Proc.* — 1989. — V. 21. — P. 3833–3841.
14. *Yu Xiang-hong.* Effect of retrograde perfusion on hemodynamics in orthotopic liver transplantation / Yu Xiang-hong, Wu Xiao-zhi, Chen Guo-zhong // *J. of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* — 2008. — V. 3. — P. 33–38.
15. Anesthesia for Combined Cardiac Surgery and Liver Transplant / C. D. Christopher, A. H. Barry, M. Mordecai [et al.] // *J. Cardiothoracic and Vascular. Anesthesia.* — 2010. — V. 24, issue 2. — P. 285–292.

О.С. Никоненко, С.М. Гриценко, В.О. Собокар, В.В. Саленюк, О.О. Вороний

АНЕСТЕЗІЯ ТА ІНТРАОПЕРАЦІЙНА ІНТЕНСИВНА ТЕРАПІЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ПЕЧІНКИ

Представлений досвід анестезіологічного забезпечення ортотопічної трансплантації печінки 12 хворим. Описана технологія загальної анестезії без веновенозного обходу. Наведено аналіз гемодинаміки, транспорту кисню, змін деяких показників метаболізму на етапах анестезії та операції. Анестезія та інтраопераційна інтенсивна терапія при пересаджуванні печінки є дуже складною проблемою, яка потребує достатнього оснащення, трансфузійного забезпечення, інвазивного моніторингу, а також злагодженої роботи хірургів, анестезіологів, перфузіологів, трансфузіологів, лікарів-лаборантів.

Ключові слова: трансплантація, печінка, анестезія, інтенсивна терапія.

A.S. Nikonenko, S.N. Gritsenko, V.A. Sobokar, V.V. Salenuk, A.A. Voronoy

ANESTHESIA AND INTRAOPERATIVE INTENSIVE CARE FOR LIVER TRANSPLANTATION

The first clinical experience with anesthesia and intensive care during 12 orthotopic transplantation of the liver 6 males and 6 females, whose ages were 24–58 years is presented. A procedure for general anesthesia without vein-venous bypass is described. Hemodynamic, oxygen balance, metabolic and coagulation parameters during anesthesia and surgery are analyzed. Drastic changes of parameters were noted in the anhepatic phase. Oxygen delivery and consumption decreased almost two times in the anhepatic phase. Metabolic acidosis developed in pre- and more severe in the anhepatic phase. Our experience has shown that liver transplantation, anesthesia and intensive care are a very difficult problem.

Key words: transplantation, liver, anesthesia, intensive care.

УДК 616.61-008.64036.12036.8089:616.61-78036.12:616.61-089.84

*А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, С.Н. Гриценко, Н.Н. Поляков,
Ю.В. Сушко, О.В. Пастухов, И.А. Лактионов,
Т.И. Остапенко, И.С. Кузьмина*

*ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»
Запорожский центр трансплантации*

ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЬНЫХ ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, КОРРИГИРУЕМОЙ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕМОДИАЛИЗОМ И ТРАНСПЛАНТАЦИЕЙ ПОЧКИ

Отражен опыт работы Запорожского центра трансплантации за период с 1992 по 2011 г. Освещены подходы к лечению пациентов в до- и посттрансплантационный период.
Ключевые слова: трансплантация почки, предтрансплантационный период, посттрансплантационный период.

Хронический гемодиализ и трансплантация почки стали доступными методами лечения терминальной стадии почечной недостаточности, многие сотни тысяч больных получают эти варианты лечения, естественно, что у них могут возникать показания к хирургическому лечению других заболеваний, риск хирургических вмешательств для них значительно выше, чем при стандартных ситуациях. Больные, находящиеся на лечении программным гемодиализом, имеют метаболические нарушения, артериальную гипертензию, анемию, повышающую риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний [1, 2]. После трансплантации почки больные получают иммуносупрессию, которая также влияет на гомеостаз, устойчивость к инфекциям. Хирургическая техника операции не отличается от общепринятой, но требует педантичности и тщательности исполнения, применения комплекса кровесберегающих методик, ренопротекции для предотвращения нарушения кровообращения в трансплантате [3, 4]. Особенности обеспечения операционного и послеоперационного периодов у этой категории больных недостаточно разработаны [5–7].

Материал и методы. Ежегодно на гемодиализе находится от 120 до 140 человек. За период с 1992 по 2011 г. в Запорожском центре трансплантации выполнено 546 аллотрансплантаций почек пациентам в возрасте от 6 до 64 лет, 12 ортотопических аллотрансплантаций печени, симультантная пересадка поджелудочной железы и почки,

3 пересадки сердца. Выработана концепция ведения больных на каждом из этапов: до-трансплантационном, трансплантационном и посттрансплантационном. Предпочтение отдаем активной хирургической тактике в лечении возникших заболеваний на этапе подготовки пациента к трансплантации и после трансплантации.

Всего прооперировано 142 пациента. В целях санации хронических очагов инфекции выполнено 66 нефрэктомий (22 односторонних, 44 билатеральных). Показанием к превентивной нефрэктомии считали поликистоз почек (42 операции) и хронический пиелонефрит с признаками уроинфекции (11 операций). При вазоренальной гипертензии выполняли одностороннюю или билатеральную нефрэктомию (7 больных; 10 операций), так как труднокорригируемая гипертензия может привести к ранней потере трансплантата.

Как известно, одной из сложных проблем у больных в посттрансплантационном периоде является адинамическая болезнь кости и мочекаменная болезнь, причиной которых в большинстве случаев является вторичный и третичный гиперпаратиреоз. Это требует необходимости раннего выявления данного заболевания и в случаях неэффективности консервативной терапии, проводимой в течение 3 месяцев, выполнения паратиреоидэктоми. При вторичном и третичном (аденоматозном) гиперпаратиреозе выполняли субтотальную паратиреоидэктомию (39 пациентов; 40 операций).

© А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, С.Н. Гриценко и др., 2011

Узловой эутиреоидный зоб был причиной для выполнения 8 струмэктомий как профилактики малигнизации в посттрансплантационном периоде, так как на фоне иммуносупрессии риск малигнизации очень высок. У 1 из больных по данным патоморфологического исследования верифицирована папиллярная карцинома щитовидной железы.

У 8 больных была диагностирована желчнокаменная болезнь, произведена лапароскопическая холецистэктомия. У 2 пациентов выполнена операция Гартмана, в последующем им произведено закрытие стомы; у 2 — выполнялась гемиколэктомия, в 1 из случаев в послеоперационном периоде функция трансплантата утеряна, в последующем произведена трансплантатнефрэктомия.

У пациентов с уремическим перикардитом показанием к активной хирургической тактике был риск развития тампонады сердца — выполнено 9 перикардэктомий (3 из которых видеоторакоскопическим методом) и 1 пункционное дренирование перикарда. При варикозной болезни выполнялась флебэктомия — у 5 больных. Прооперировано 10 больных с грыжами передней брюшной стенки различной локализации. В последующем всем оперированным больным была выполнена трансплантация почки с удовлетворительными отдаленными результатами.

Перенесенная трансплантация почки не является противопоказанием для различных оперативных вмешательств у реципиентов. 5 больных были прооперированы по поводу асептического некроза головки бедренной кости (7 протезирований тазобедренного сустава), 1 — стентирование коронарных артерий, 2 — мастэктомии, 2 пациентки после аллотрансплантации почки успешно родоразрешились путем кесарева сечения.

Операции в условиях общей анестезии с ИВЛ у больных, находящихся на хроническом гемодиализе, проводили в междиализном периоде спустя 24 часа после процедуры. Следующий гемодиализ выполняли через 24–48 часов после операции. В качестве антикоагулянта применяли клексан.

У больных с функционирующим почечным трансплантатом оперативные вмешательства выполняли в условиях тотальной внутривенной анестезии с ИВЛ и ренопротекцией. В периоперационном периоде применяли методику ренопротекции функционирующего почечного трансплантата, которая позволяла предупредить ишемические повреждения трансплантата, обусловленные негативным влиянием на почечный

кровоток операционного стресса и кровопотери. В рамках методики ренопротекции выполняли катетеризацию центральной вены для мониторинга центрального венозного давления. Во время операции и анестезии, а также в раннем послеоперационном периоде волемиической нагрузкой кристаллоидами (30–40 мл/кг) удерживали целевые значения центрального венозного давления в пределах 10–12 мм рт. ст., значения среднего артериального давления в пределах 105–125 мм рт. ст. Кроме того, для профилактики интраоперационного снижения кровотока в почечном трансплантате и увеличения диуреза во время операции применяли маннитол в дозе 1 г/кг, фуросемид — 1 мг/кг и блокатор кальциевых каналов верапамил — 0,15 мг/кг. Функцию почечного трансплантата в послеоперационном периоде оценивали по концентрации креатинина, мочевины и калия в плазме крови, а также посуточной экскреции креатинина. В 1-е сутки послеоперационного периода отмечали транзитное увеличение концентрации креатинина и мочевины в плазме крови и снижение суточной экскреции креатинина. Указанные изменения носили временный характер. К 5–7-м суткам послеоперационного периода показатели функции почечного трансплантата были сопоставимы с дооперационными значениями. Потерь почечных трансплантатов в раннем и позднем послеоперационном периоде не было.

Обсуждение. Хирургические вмешательства у больных хронической почечной недостаточностью, получающих диализ либо после трансплантации почки, имеют повышенный риск, потребность в операции у них на этапе диализа — у 5–8 %, после трансплантации — у 7 % больных.

Пациенты на гемодиализе имеют метаболические нарушения, анемию, высокий риск сердечно-сосудистых заболеваний, нарушения обмена калия и свертывающей системы крови. Хирургическое вмешательство может быть выполнено в междиализный период, при этом надо учитывать возможность возникновения кровотечения как после операции, так и в период следующего диализа, в связи с этим операционные раны должны быть дренированы на большие сроки для контроля кровотечения. Перед операцией должны быть откорректированы метаболические нарушения.

Реципиенты почечных трансплантатов даже при благоприятном течении имеют в результате приема циклоспорина нарушение

ния углеводного, липидного обменов, циклоспорин вызывает вазоконстрикцию, что в условиях операционного стресса, кровопотери может привести к ухудшению кровотока в почечном трансплантате и развитию тубулярной ишемии, дисфункции трансплантата. В связи с этим основное внимание должно быть уделено ренопротекции во время операции и раннем послеоперационном периоде.

Для интра- и послеоперационной ренопротекции функционирующего почечного трансплантата представляется патогенетически обоснованным и целесообразным применение препаратов, способствующих увеличению почечного кровотока и предупреждающих ишемию почки.

В исследованиях реципиентов почечного трансплантата, получающих циклоспорин, выявлены активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, подавление синтеза предсердно-натрийуретического фактора, обуславливающего диуретический ответ. В связи с этим кроме ренопротекции использовали волевическую нагрузку для

стимуляции синтеза предсердного натрийуретического пептида. Применение комплексной терапии дало возможность во всех случаях получить хорошие результаты.

Активное выявление и устранение сопутствующих заболеваний у пациентов на хроническом гемодиализе повышает успешность трансплантации впоследствии.

Активная хирургическая тактика в пре- и посттрансплантационном периоде оправдана и приводит к увеличению выживаемости почечного трансплантата и пациентов.

Комплексная программа периоперативной интенсивной терапии, включающая волевическую нагрузку кристаллоидами и фармакологическую ренопротекцию позволила сохранить функцию пересаженных почек в раннем послеоперационном периоде.

Комплексное применение активной хирургической тактики при сопутствующей патологии с интраоперационной ренопротекцией увеличило годовичную выживаемость до 92 % и 5-летнюю выживаемость до 70 % трансплантатов.

Список литературы

1. Отдаленные результаты трансплантации почки и факторы риска хронической нефропатии отторжения / И. Г. Ким, И. И. Стенина, И. М. Ильинский [и др.] // Нефрология и диализ. — 1999. — № 1. — С. 27–38.
2. Перлин Д. В. Дифференциальная диагностика, лечение и профилактика осложнений при трансплантации почки : автореф. дис. на соискание уч. степени д-ра мед. наук / Д. В. Перлин. — Н., 1998. — 40 с.
3. Томилина Н. А. Отдаленные результаты трансплантации почки / Н. А. Томилина, Э. М. Балакирев // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2001. — № 3–4. — С. 65–75.
4. Трансплантация почки / В. И. Шумаков, Я. Г. Мойсюк, Н. А. Томилина [и др.] // Трансплантология : руководство / под ред. акад. В. И. Шумакова. — М. : Медицина, 1995. — С. 194–196.
5. Goodman W. G. Options for patients with end-stage renal disease / W. G. Goodman, G. M. Danovitch // Handbook of Kidney Transplantation. — Tokio, 2001. — P. 1–16.
6. Діагностика і профілактика дисфункції ниркового алотрансплантату : навчальний посібник / під ред. О. С. Никоненко. — Запоріжжя : Орбіта-ЮГ, 2009. — 128 с.
7. Комплексное лечение хирургических заболеваний у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности / [Ватазин А. В., Шумский В. И., Астахов П. В., Круглов Е. Е.]. — М. : МОНИКИ, 2002.

О.С. Никоненко, С.М. Завгородній, С.М. Гриценко, М.М. Поляков, Ю.В. Сушко, О.В. Пастухов, І.А. Лактіонов, Т.І. Остапенко, І.С. Кузьминова

ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ З ТЕРМІНАЛЬНОЮ СТАДІЄЮ ХРОНІЧНОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ, ЯКУ КОРИГУВАЛИ ГЕМОДІАЛІЗОМ ТА ТРАНСПЛАНТАЦІЄЮ НИРКИ

Відображено досвід праці Запорізького центру трансплантації з 1992 по 2011 р. Висвітлені підходи до лікування пацієнтів у до- і післятрансплантаційному періоді.

Ключові слова: трансплантація нирки, передтрансплантаційний період, посттрансплантаційний період.

A.S. Nikonenko, S.N. Zavgorodniy, S.N. Gritsenko, N.N. Polyakov, Yu.V. Sushko, O.V. Pastukhov, I.A. Laktionov, T.I. Ostapenko, I.S. Kuzminova

SURGICAL TREATMENT PATIENTS WITH TERMINAL STAGE OF CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY, RECEIVED THE TREATMENT WITH HEMODIALYSIS AND AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

The experience of The Center of Transplantation in Zaporozhye from 1992 till 2011 year was observed. It was turn on the problem of guidance patients before and after transplantation.

Key words: kidney transplantation, pretransplant period, posttransplant period.

УДК 616.61-089.843.000.616.13-089

*А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, Н.Н. Поляков, А.В. Губка,
О. В. Пастухов, И. А. Лактионов, Ю.В. Сушко*

*ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»
Запорожский центр трансплантации*

АНГИОХИРУРГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

На основании анамнеза 546 трансплантаций почки разработаны технические аспекты выполнения операций. Трансплантация почки — это прежде всего сосудистая операция, состоящая из трех этапов: забор трансплантата с учетом особенностей кровоснабжения почек, подготовка сосудов почки к трансплантации и формирование сосудистых анастомозов. У 3,48 % больных возникают различные сосудистые осложнения, требующие своевременного диагноза и выбора варианта операции.

Ключевые слова: трансплантация почки, реваскуляризация почечного трансплантата, сосудистый анастомоз, кровоснабжение почечного трансплантата, стеноз почечной артерии, аррозивное кровотечение.

Наиболее перспективным методом лечения больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (тХПН) является аллотрансплантация трупной почки (АТТП). Несмотря на то что ежегодно в мире выполняется около 30 тысяч подобных операций, количество выполняемых трансплантаций не соответствует неуклонно возрастающему количеству больных тХПН (около 6–8 % в год). В этой связи одной из основных задач лечения больных с тХПН остается дальнейшее улучшение результатов АТТП. Жизнеспособность и дальнейшая функция пересаженной почки зависят от адекватного кровоснабжения. Неадекватность кровотока в почечной артерии является важнейшим пусковым механизмом в развитии недостаточной функции трансплантата. Несмотря на то что хирургическая техника трансплантации почек разработана еще в 40–50-х годах и не претерпела существенных изменений, вопрос выбора варианта реваскуляризации трансплантата остается дискуссионным и требует дифференцированного подхода в целях устранения возможных осложнений [1, 2].

Целью настоящего исследования явилось изучение зависимости частоты сосудистых осложнений и результатов операции от различных подходов к сосудистому этапу трансплантации почки с разработкой дифференцированных ангиохирургических приемов при пересадке почки.

В Запорожском центре трансплантации в период с 1992 по 2011 г. было произведено 546 трансплантаций почек: из них в 56 случаях — пересадка почки от живых доноров (от близких родственников больных), в 490 — пересадка трупной почки. При пересадке правой почки (210 трансплантатов) выполнялась пластика почечной вены в целях ее удлинения за счет нижней полой вены. У 81,5 % (445) больных формировали артериальные анастомозы между почечной и наружной подвздошной артериями по типу конец в бок и у 13,9 % (76) больных — анастомозы между почечной и внутренней подвздошной артериями конец в конец. На остальные 4,6 % (25) приходится 2 случая анастомозов почечной артерии с аортой или общей подвздошной артерией (трансплантация детям), а также трансплантации при множественных артериях трансплантата.

Ангиохирургические аспекты трансплантации почки можно разделить на три этапа:

- забор донорских органов;
- обработка сосудов почек «Back-table»;
- формирование сосудистых анастомозов.

Забор донорских органов зависит от характера донора — живой или трупный донор. При живом донорстве донор предварительно обследуется методом ангиографии, в последнее время — спиральной компьютерной томографии, что позволяет оценить анатомические особенности донорского органа, спланировать тактику ангиохирургической

© А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, Н.Н. Поляков и др., 2011

реконструкции трансплантата. На донорском этапе предпочтение отдавалось моноартериальной почке. Тщательно выделяли сосудистую ножку, при правосторонней нефрэктомии для обеспечения максимальной длины почечной вены забор выполняли с боковым отжатием нижней полой вены с последующей ее пластикой. При заборе почек от донора — трупа органы забираются с фрагментами аорты и нижней полой вены, при разделении почек аорту рассекают продольно, левую почечную вену отсекают от нижней полой вены.

Второй этап — подготовка сосудов почки к трансплантации.

Во всех 210 случаях трупной трансплантации формирование правой почечной вены выполняли за счет участка нижней полой вены. Это обусловлено необходимостью увеличения длины почечной вены и профилактики возможных осложнений из-за исходно короткой правой почечной вены.

Во всех случаях во время нефрэктомии у трупного донора почечные артерии забирали вместе с аортальной площадкой по Carrel. При биартериальных почках и большой аортальной площадке последнюю уменьшали путем иссечения избытка аортальной площадки между устьями почечных артерий. В случае полиартериальной трансплантации почки с 4 почечными артериями 2 почечные артерии на одной площадке анастомозированы с наружной подвздошной артерией по типу конец в бок и 2 почечные артерии после формирования единого соустья — с внутренней подвздошной артерией конец в конец. При наличии биартериальных почек при родственной трансплантации формировалось единое соустье между почечными артериями. После выполнения реконструкции проводили контроль на герметичность, мелкие лимфатические сосуды в воротах почки тщательно лигировали для профилактики развития лимфоцеле.

Формирование сосудистых анастомозов. Для анастомоза выделяются наружные подвздошные артерия и вена.

Первым накладывается венозный анастомоз, который у большинства больных формировали конец в бок между почечной и наружной подвздошной венами, в 2 случаях (трансплантации детям) — с нижней полой веной.

Если планируется наложить анастомоз между почечной и наружной подвздошной артериями по типу конец в бок, то внутренняя подвздошная артерия со всеми ветвями

остаётся интактной (эта методика используется чаще всего в нашей клинике). После того как эластичный и лишенный бляшек участок наружной подвздошной артерии выбирается местом будущего анастомоза, на подвздошную артерию выше и ниже этого места накладывают зажимы De-Bakey. При отсутствии участка стенки донорской аорты, включающего устье почечной артерии (лоскут по Carrel), производят рассечение дистального края почечной артерии в проксимальном направлении на несколько миллиметров, далее с помощью небольшого разреза выполняют артериотомию подвздошной артерии. Анастомоз выполняют, используя непрерывный шов нитью с двумя иглами. В случаях биартериальных почек в подвздошную артерию вшивали вновь сформированное соустье почечных артерий, реже — при достаточном их диаметре — с обеими артериями накладывали самостоятельные анастомозы по типу конец в бок наружной подвздошной артерии. При пересадке почек от живых доноров добавочная почечная артерия встретилась в 7 случаях. В большей части (4 случая) артерии были анастомозированы между собой внутренней поверхностью и вшивались как один сосуд по типу конец в бок с наружной подвздошной артерией. У 1 больного основная почечная артерия была анастомозирована по типу конец в бок с наружной подвздошной артерией, добавочная почечная артерия к нижнему полюсу почки была анастомозирована с нижней надчревной артерией. У 1 больного основная почечная артерия была анастомозирована по типу конец в бок с наружной подвздошной артерией, добавочная почечная артерия к верхнему полюсу почки (гемодинамически незначимая) была лигирована. У 1 больного основная почечная артерия была анастомозирована по типу конец в бок с наружной подвздошной артерией, добавочная почечная артерия к верхнему полюсу почки анастомозирована по типу конец в конец с внутренней подвздошной артерией.

Сосудистые осложнения после трансплантации почки можно разделить на четыре группы: тромбоз почечной артерии, тромбоз почечной вены, стеноз почечной артерии, первичные или вторичные кровотечения в зоне анастомоза. Менее часто встречаются аневризмы почечной артерии и артериовенозные фистулы (в нашей клинике последние не встречались). Частота сосудистых осложнений после трансплантации почки составляет от 2,5 до 9 % (3,5), при

этом утрата трансплантата возникает в 50–70 % (3,5). Тромбоз артерий трансплантата в раннем послеоперационном периоде может быть обусловлен техническими погрешностями или острой реакцией отторжения. Стеноз артерии трансплантата возникает в более отдаленные сроки, его диагностируют у 2–8 % больных [1, 2, 4, 5]. Аррозивное кровотечение из артерии почечного аллотрансплантата чаще всего возникает вследствие инфицирования его ложа, что обуславливает утрату органа, а иногда смерть больного.

Различные сосудистые осложнения, потребовавшие хирургического вмешательства после трансплантации, возникли у 19 (3,48 %) реципиентов: аррозивное кровотечение — у 8 (1,46 %), стеноз почечной артерии — у 3 (0,55 %), грибковая аневризма наружной подвздошной артерии с разрывом — у 2 (0,37 %) больных. У 3 пациентов (0,55 %) во время трансплантации почки возникло кровотечение из почечной вены, выполнена ретрансплантация почки: артерия и вены трансплантата отсекали, почку консервировали раствором «Кустодиол». Почечную вену протезировали фрагментом большой подкожной вены, затем формировали анастомоз конец протеза почечной вены в бок наружной подвздошной вены и анастомоз между почечной артерией и наружной подвздошной артерией по типу конец в бок. В обоих случаях получена первичная функция трансплантата.

Аррозивное кровотечение возникло у 8 больных (1,46 %), что требовало выполнения неотложного оперативного вмешательства: у 6 больных (1,1 %) выполнили трансплантатнефрэктомия и лигирование наружной подвздошной артерии. Из них у 5 больных признаков острой ишемии конечности не развилось. У 1 больного появились признаки острой ишемии конечности, что потребовало выполнения перекрестного бедренно-бедренного шунтирования аллопротезом. У 2 больных (0,37 %) при наличии удовлетворительно функционирующих трансплантатов и отсутствии явных признаков нагноения их ложа выполнена ретрансплантация почки во внутреннюю подвздошную артерию с сохранением функции трансплантата. Для этого отсекали артериальный анастомоз, почку консервировали раствором «Кустодиол» (предварительно для оттока консервирующего раствора выполняли венотомию), формировали анастомоз почечной артерии с внутренней подвздошной артерией конец в конец, венотомию ушива-

ли, почку включали в кровоток, затем проводили мобилизацию наружной подвздошной артерии. Участок дефекта артерии иссекали, накладывали анастомоз конец в конец, восстанавливали кровоток по наружной подвздошной артерии. В обоих случаях удалось сохранить функционирующий трансплантат.

Стеноз артерии трансплантата проявлялся некорректируемой артериальной гипертензией, над трансплантатом выслушивается систолический шум. Диагноз верифицирован с помощью доплерографии и ангиографии. Выполнена коррекция стеноза: чрескожная баллонная дилатация (1), открытая эндартерэктомия из почечной артерии (1). У 1 пациента со стенозом почечной артерии возник тромбоз, выполнена трансплантатнефрэктомия.

У 1 больного через 13 месяцев после аллотрансплантации почки образовалась веретенообразная аневризма наружной подвздошной артерии с разрывом. Выполнены резекция аневризмы, трансплантатнефрэктомия, протезирование наружной подвздошной артерии.

У 1 (0,18 %) больного в отдаленном периоде (более 10 лет) после трансплантатнефрэктомии возникла аневризма наружной подвздошной артерии с разрывом, что потребовало оперативного лечения: резекция аневризмы, протезирование наружной подвздошной артерии аллопротезом.

Тромбоз почечной артерии и вены вследствие острой реакции отторжения возник у 3 (0,53 %) пациентов, у всех выполнена трансплантатнефрэктомия.

Таким образом, на основании оценки особенностей разных типов сосудистых анастомозов, течения послеоперационного периода в нашей клинике используется комплексный дифференцированный подход к выбору реваскуляризации почечного трансплантата: практически во всех случаях при трупном донорстве производится реконструкция с удлинением правой почечной вены за счет нижней полой вены, при формировании артериальных анастомозов предпочтение отдается анастомозу между почечной и наружной подвздошной артериями с предварительной реконструкцией почечных артерий на этапе back-table, что позволяет сократить время вторичной тепловой ишемии. Активная ранняя хирургическая тактика лечения сосудистых осложнений способствует увеличению продолжительности функционирования почечного трансплантата.

Список литературы

1. Руководство по трансплантации почки / [под ред. Г. М. Данович ; пер. с англ. под ред. Я. Г. Мойсюка]. — [3-е изд.]. — Тверь : Триада, 2004. — 472 с.
2. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation / M. Pascual, T. Theruvath, T. Kawai [et al.] // *New Eng. J. Med.* — 2002. — V. 346. — P. 580–590.
3. *Chapman J. R.* Chronic renal allograft dysfunction / J. R. Chapman, R. J. O'Connell, B. J. Nankivell // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2005. — V. 16. — P. 3015–3026.
4. *Merville P.* Combating chronic renal allograft dysfunction: optimal immunosuppressive regimens / P. Merville // *Drugs.* — 2005. — V. 65. — P. 615–631.
5. ANZDATA Registry Report 2004 / [ed. by Macdonald S. Excell L.]. — Australia and New Zealand Dialysis and Transplantation Registry, Adelaide, Australia.

О.С. Никоненко, С.М. Завгородній, М.М. Поляков, О.В. Губка, О.В. Пастухов, І.А. Лактіонов, Ю.В. Сушко

АНГІОХІРУРГІЧНІ АСПЕКТИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НИРКИ

На підставі анамнезу 546 трансплантацій нирки розроблені технічні аспекти виконання операцій. Трансплантація нирки — це насамперед судинна операція, що складається з трьох етапів: вилучення трансплантата з урахуванням особливостей кровопостачання нирок, підготовка судин нирки до трансплантації та формування судинних анастомозів. У 3,48 % хворих виникають різні судинні ускладнення, що вимагають своєчасного діагнозу і вибору варіанту операції.

Ключові слова: трансплантація нирки, реваскуляризація ниркового трансплантата, судинний анастомоз, кровопостачання ниркового трансплантата, стеноз ниркової артерії, аррозивна кровотеча.

A.S. Nikonenko, S.N. Zavgordny, N.N. Poliakov, A.V. Gubka, O.V. Pastukhov, I.A. Laktionov, Yu.V. Sushko

ASPECTS OF VASCULAR SURGERY IN KIDNEY TRANSPLANTATION

On basis of 546 kidney transplantation the technical aspects of the operation have been developed. First of all, kidney transplantation — is a vascular operation that includes three periods — sampling of kidney grafts in consideration of the specific of blood supplying, preparation vessels of kidney to transplantation and formation of vascular anastomosis. 3,48 % of patients have typical vascular complications that require making diagnosis and choosing variants of operation opportunely.

Key words: kidney transplantation, renal graft revascularization, vascular anastomosis, blood flow to the renal transplant, renal artery stenosis, arroziv bleeding.

УДК 616.36-089.843

А.С. Никоненко, Т.П. Котова, Н.Н. Поляков, И.В. Писаренко

ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»

Запорожский государственный медицинский университет

ВОЗМОЖНОСТИ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ДОППЛЕР-СОНОГРАФИИ В КОМПЛЕКСНОЙ ДИАГНОСТИКЕ СМЕРТИ МОЗГА

Оценивали возможности ультразвуковой транскраниальной доплерографии в диагностике смерти мозга у пациентов реанимационных отделений, особенно у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой или спонтанным кровоизлиянием в мозг с признакам запредельной комы. Методом ультразвуковой транскраниальной доплерографии обследовано 336 пациентов, отсутствие мозгового кровотока с помощью данного метода установлено у 182 больных, у 154 пациентов зарегистрирован магистральный кровоток по мозговым артериям. Ультразвуковая транскраниальная доплер-сонография — это быстро осуществимые, прикроватные, безопасные, высокоточные методики, которые позволяют отказаться от использования панангиографии в диагностике смерти мозга.

Ключевые слова: *смерть мозга, диагностика, транскраниальная доплер-сонография.*

В настоящее время под «смертью мозга» понимают патологическое состояние, связанное с тотальным некрозом головного мозга, а также первых шейных сегментов спинного мозга, при сохранении сердечной деятельности и газообмена, поддерживаемых с помощью искусственной вентиляции легких. Подобные ситуации нередко возникают у пациентов реанимационных отделений с повреждением мозга, развившимся вследствие тяжелой закрытой либо открытой черепно-мозговой травмы, спонтанных и иных внутричерепных кровоизлияний, закрытой острой гидроцефалии, инфаркта мозга [1, 2]. В трансплантологии необходимость ранней констатации смерти мозга (СМ) потенциального донора, сохраняющего при помощи технических систем жизнеобеспечения дыхание и кровообращение, во многом определяет эффективность последующей трансплантации [3].

Диагноз СМ может быть достоверно установлен на основании обязательных клинических критериев: полное и устойчивое отсутствие сознания (кома), атония всех мышц, отсутствие реакции на сильные болевые раздражения в области тригеминальных точек, отсутствие реакции зрачков на свет, отсутствие корнеальных, окулоцефа-

лических, окуловестибулярных, фарингеальных и трахеальных рефлексов, отсутствие самостоятельного дыхания.

Параклинические методы, подтверждающие СМ и прекращение биологической активности нейронов [4, 5], — определение потребности тканей мозга в кислороде, транскраниальная доплер-сонография (ТКД). Обычно используется портативный прибор, позволяющий осуществлять запись показателей мозгового кровотока и его мониторинг. Метод ТКД отвечает необходимым требованиям:

- возможность проведения исследования непосредственно у постели больного;
- непродолжительность исследования;
- безопасность исследования для обследуемого;
- большая чувствительность, специфичность и защищенность от влияния внешних факторов;
- экономичность и возможность проведения повторного исследования.

Цель — оценить возможности ультразвуковой транскраниальной доплерографии в диагностике смерти мозга у пациентов реанимационных отделений, особенно у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой или спонтанным кровоизлиянием в мозг с признакам запредельной комы.

© А.С. Никоненко, Т.П. Котова, Н.Н. Поляков, И.В. Писаренко, 2011

Матеріал і методи. В Запорізькому центрі трансплантації всім пацієнтам с клінічної картини СМ виконували ультразвукову доплер-сонографію. Исследование проводили на портативном доплеровском аппарате «EZ-Dop» (DWL, Германия) с использованием датчиков 2, 4, 8 МГц. Во всех случаях больным выполняли ультразвуковую доплерографию (УЗДГ) прецеребральных артерий, внутрисерпную циркуляцию исследовали методом ТКД через височные, трансорбитальные окна: средняя мозговая артерия, сифон внутренней сонной артерии, глазничная артерия, основную артерию лоцировали через трансокипитальное окно.

Всего с 2007 по 2011 г. УЗДГ и ТКД выполнены 336 пациентам отделений реанимации Запорізького центра скорой помощи, неврологической реанимации 6-й городской больницы, нейрореанимации и общей реанимации областной клинической больницы. Среднее АД во время исследования поддерживалось на уровне не менее 90 мм рт. ст. Для подтверждения прекращения мозгового кровотока УЗДГ и ТКД брахиоцефальных артерий проводились троекратно с двух сторон с интервалом минимум 30 мин.

Результаты и их обсуждение. Во всех случаях у больных имело место первичное повреждение мозга, развившееся вследствие тяжелой закрытой (45,6 %) либо открытой (22,6 %) черепно-мозговой травмы,

спонтанных и иных внутрисерпных кровоизлияний (16,4 %), закрытой острой гидроцефалии (5,7 %), инфаркта мозга (9,7 %). Предварительно у всех обследуемых пациентов были исключены: интоксикации, включая лекарственные, первичная гипотермия, гиповолемический шок, метаболические эндокринные комы, а также применение наркотизирующих средств и миорелаксантов. В 154 случаях по мозговым артериям пациентов был зарегистрирован магистральный кровоток. Диагноз смерти мозга был установлен в 182 случаях (54,2 %).

При этом кровоток в экстракраниальных артериях мозга носил ревербирующий характер, отмечалось резкое повышение периферического сосудистого сопротивления по общим и внутренним сонным артериям, доплерограмма сонных артерий приближалась к спектру периферического сосуда со значительной отрицательной диастолической составляющей (рис. 1). Иногда отмечался усиленный сброс крови в наружную сонную артерию. Кровоток по внутренней сонной артерии был резко редуцирован. Индексы периферического циркуляторного сопротивления были резко повышены ($R_i = 0,93 \pm 0,03$), индекс пульсаций (P_i — индекс Гослинга) возрастал до $5,37 \pm 0,96$.

По средним мозговым артериям регистрировались: с двух сторон низкоамплитудные систолические пики и ретроградная диастолическая составляющая (102 случаев), рис. 2; систолические пики лоцировались с

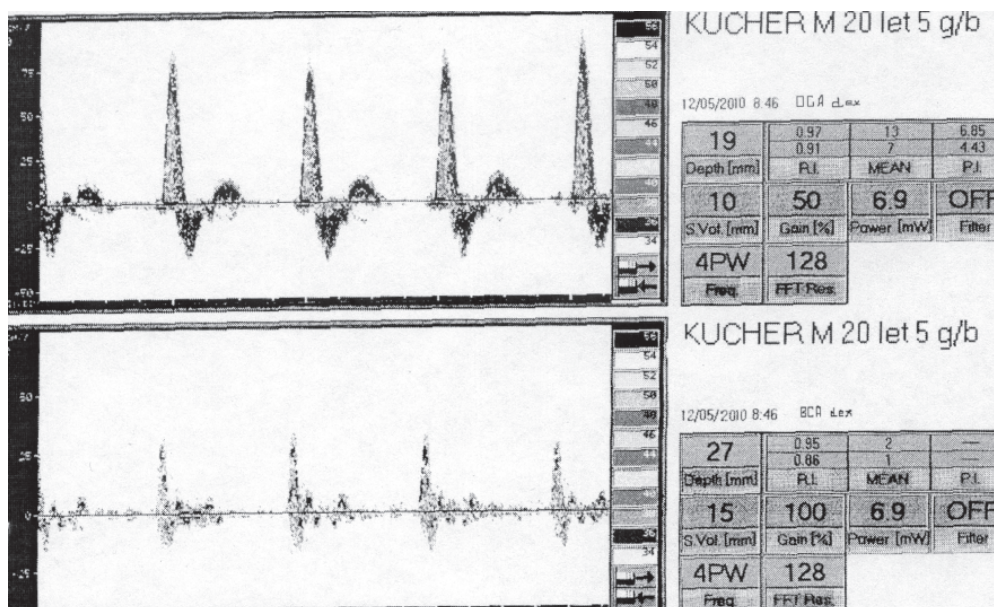


Рис. 1. Допплерограма б-го К. Ревербируючий редуциований характер кровотока по общим и внутренним сонным артериям

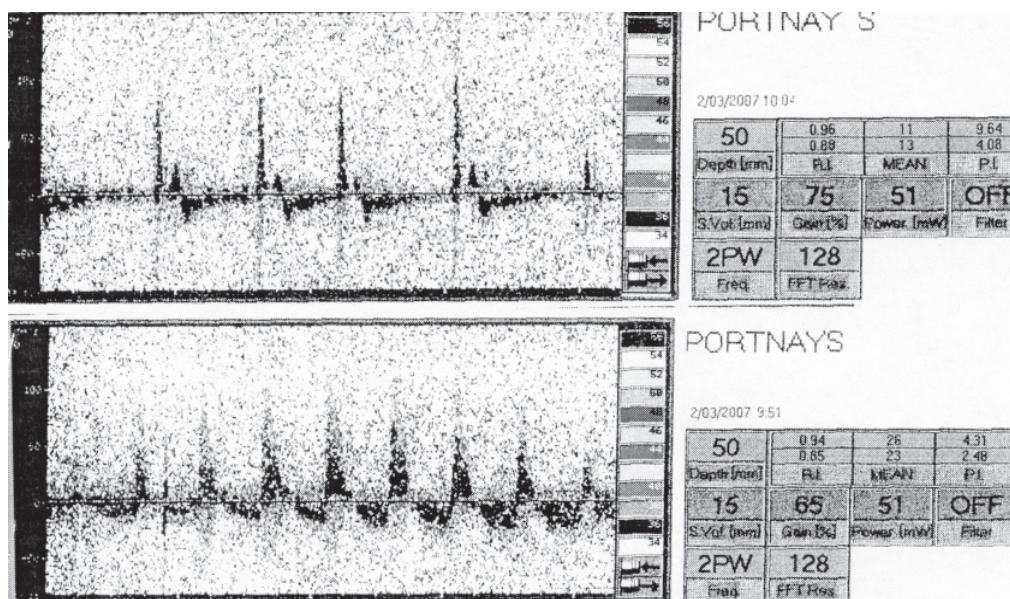


Рис. 2. ТКД б-ой П. В средней мозговой артерии с двух сторон регистрируются низкоамплитудные систолические пики и ретроградная диастолическая волна, магистральный кровоток отсутствует

одной стороны, контралатерально — регистрировалось полное исчезновение доплерографического сигнала (58 случаев), что указывало на развитие с этой стороны тотального отека; в отдельных случаях систолические пики регистрировались только на уровне сифона внутренней сонной артерии, по средней мозговой артерии наблюдалось полное отсутствие доплерографического сигнала (16 случаев).

По глазничным артериям чаще всего регистрировался ретроградный кровоток из глазничного анастомоза или же кровотока отсутствовал, что указывало на развитие тотального отека, повышение внутричерепного давления до уровня системного артериального давления и выше, вследствие чего происходит снижение церебрального перфузионного давления и прекращается циркуляция крови в полости черепа. В 88 случаях трансоксипитально удавалось локализовать базилярную артерию — низкоамплитудные систолические пики с ретроградной диастолической составляющей.

Динамический ТКД-мониторинг с интервалом 12–24 часа был выполнен в 6 случаях и показал прогрессирующее снижение скорости кровотока по артериям мозга вследствие нарастания явлений отека мозга.

Окончательный диагноз СМ устанавливался комиссией врачей лечебно-профилактического учреждения, где находится боль-

ной, согласно инструкции о констатации смерти человека на основании СМ.

Выводы

Публикации специалистов и наши собственные исследования подтверждают высокую информативность методов ультразвуковой доплерографии и транскраниальной доплер-сонографии в диагностике смерти мозга. Ее чувствительность составляет от 91 до 99 %, а специфичность — 100 %, что наряду с неинвазивностью, доступностью и безопасностью метода позволяет отказаться от использования панангиографии в диагностике смерти мозга.

Основным диагностическим критерием смерти мозга при выполнении ультразвуковой доплерографии и транскраниальной доплер-сонографии является наличие систолических пиков или реверберации хотя бы в одной из внутричерепных артерий (средним мозговым артериям, сифоне внутренней сонной артерии, основной артерии).

Диагноз, установленный при транскраниальной доплер-сонографии, должен быть подтвержден данными ультразвуковой доплерографии прецеребральных артерий.

Отсутствие сигнала от внутричерепных сосудов может считаться признаком смерти мозга только при наличии характерных паттернов в экстракраниальных отделах сонных артерий.

Список литературы

1. Актуальные вопросы органного донорства / А. С. Ермолов, А. В. Джао, И. В. Погребинченко [и др.] // Рос. мед. журнал. — 2005. — № 4. — С. 3–8.
2. Стулин И. Д. Современная клиничко-инструментальная диагностика смерти мозга / И. Д. Стулин, М. В. Синкин // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. — 2006. — № 1. — С. 58–64.
3. Time department validity in the diagnosis of brain death using transcranial Doppler sonography / J.-R. Kuo, C.-F. Chen, C.-C. Chio [et al.] // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. — 2006. — May. — V. 77 (5). — P. 646–649.
4. Ultrasonographic cerebral perfusion in assessment of brain death: a preliminary study / J. M. Abadal, J. A. Llompарт-Pou, J. Homar [et al.] // J. Ultrasound. Med. — 2008. — May. — V. 27 (5). — P. 791–794.
5. Transcranial Doppler for brain death in infants: the role of the fontanelles / E. Vicenzini, P. Pulitano, R. Cicchetti [et al.] // Eur. Neurol. — 2010. — V. 63. — P. 164–169.
6. De Freitas G. R. Sensitivity of transcranial Doppler for confirming brain death: a prospective study of 270 cases / G. R. de Freitas, C. Andre // Acta Neurologica Scandinavica. — 2006. — V. 113, issue 6. — P. 426–432.

О.С. Никоненко, Т.П. Котова, М.М. Поляков, І.В. Писаренко

МОЖЛИВОСТІ УЛЬТРАЗВУКОВОЇ ДОПЛЕР-СОНОГРАФІЇ В КОМПЛЕКСНІЙ ДІАГНОСТИЦІ СМЕРТІ МОЗКУ

Оцінювали можливості ультразвукової транскраніальної доплер-сонографії в діагностиці смерті мозку у пацієнтів реанімаційних відділень, особливо у хворих з тяжкою черепно-мозковою травмою або спонтанним крововиливом у мозок з ознаками позамежевої коми. Методом ультразвукової транскраніальної доплер-сонографії обстежено 336 пацієнтів, відсутність мозкового кровотоку за допомогою даного методу встановлена у 182 хворих, у 154 пацієнтів зареєстрований магістральний кровотік по внутрішньомозковим артеріям. Ультразвукова транскраніальна доплер-сонографія — це швидко здійснювана, неінвазивна, безпечна, високоточна методика, яка дозволяє відмовитися від використання панангіографії в діагностиці смерті мозку.

Ключові слова: смерть мозку, діагностика, транскраніальна доплер-сонографія.

A.S. Nikonenko, T.P. Kotova, N.N. Polyakov, I.V. Pisarenko

POSSIBILITIES ULTRASONIC DOPPLER-SONOGRAPHY IN COMPLEX DIAGNOSTICS OF MORS OF THE BRAIN

The possibilities ultrasonic transcranial Doppler in diagnostics of brain death at patients intensive care units, especially at patients with a serious craniocerebral trauma or a spontaneous hematecephalon with signs of an other-wordly coma were estimated. The method ultrasonic transcranial Doppler surveys 336 patients, absence of a cerebral blood flow by means of the given method is established at 182 patients, at 154 patients the main blood flow on cerebral arteries is registered. Ultrasonic transcranial doppler-sonografija are quickly realizable, bedside, safe, high-precision techniques which allows to refuse use angiography in diagnostics of brain death.

Key words: brain death, diagnosis, transcranial Doppler, ultrasonography.

УДК 616.12-008.331.1+616.61-089.843]-085

А.С. Никоненко, Т.И. Остапенко, Н.Н. Поляков, И.С. Кузьмина

ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»

Запорожский центр трансплантации

ВЛИЯНИЕ БЛОКАТОРОВ АТ1-РЕЦЕПТОРОВ АНГИОТЕНЗИНА II НА ТЕЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОЙ НЕФРОПАТИИ

Хроническая трансплантационная нефропатия — одна из основных причин утраты функции трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде. Изучено влияние блокатора АТ1-рецепторов кандесартана на течение хронической трансплантационной нефропатии. Выявлены ренопротективный и антигипертензивный эффекты кандесартана. Установлено, что использование кандесартана приводит к замедлению темпов развития хронической трансплантационной нефропатии.

Ключевые слова: трансплантация почки, хроническая трансплантационная нефропатия, блокаторы АТ1-рецепторов, артериальная гипертензия.

Артериальная гипертензия (АГ) является одним из факторов, влияющих на развитие и прогрессирование хронической трансплантационной нефропатии (ХТН), повышающих частоту сердечно-сосудистых осложнений и ухудшающих качество жизни пациентов с трансплантированной почкой [1]. В настоящее время убедительно доказан ренопротективный эффект препаратов, блокирующих ренин-ангиотензиновую систему — блокаторов АТ1-рецепторов ангиотензина II (БРА1) при хронических заболеваниях почек. В то же время целесообразность и эффективность их использования после трансплантации почки остается предметом изучения.

Целью исследования явилось изучение влияния БРА1 кандесартана на течение ХТН.

Материал и методы. Проведено обследование и динамическое наблюдение за 32 реципиентами почечного трансплантата (ПТ) в сроки от 8 до 59 месяцев [в среднем (30,3±2,2) месяца] после трансплантации почки. ХТН диагностировали при необратимом повышении креатинина выше 130 мкмоль/л при отсутствии других причин дисфункции ПТ и повышении экскреции белка свыше 0,1 г/сут. Всем пациентам исследовали концентрацию креатинина плазмы с расчетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ) по формуле Cockcroft–Gault, показатели среднего АД, протеинурии, плазменную концентрацию калия. У 84,2 % больных

ХТН сопровождалась АГ разной степени выраженности. У 8 пациентов регистрировалась АГ 1-й степени, у 17 — 2-й степени. У 7 пациентов отмечалась АГ 3-й степени. Протеинурию более 0,5 г/сут наблюдали у 21,7 % больных, менее 0,5 г/сут — у 78,3 % пациентов.

Целевыми уровнями АД у пациентов при протеинурии более 1 г/сут считали значения 125/75 мм рт. ст. Для оценки ренопротективных эффектов БРА1 использовали кандесартан в суточной дозе 12 мг. При неадекватном контроле АД у 8 больных суточную дозу препарата увеличивали до 16 мг и дополнительно назначали индапамид в дозе 1,5 мг/сут. У 7 пациентов с протеинурией более 0,5 г/сут для достижения должного антипротеинурического эффекта использовали кандесартан 16 мг/сут.

Продолжительность приема кандесартана составила (13,40±0,84) месяца. Для оценки влияния лечения на исследуемые параметры использовали парный двухвыборочный t-тест Стьюдента.

Результаты. Использование кандесартана позволило достичь целевого уровня АД у пациентов с АГ 1–2-й степени. Показатели среднего АД к концу исследования по сравнению с начальным уровнем снизились со (108,0±5,6) до (90,9±4,1) мм рт. ст. ($p<0,001$). У 5 пациентов с АГ 3-й степени применение кандесартана в сочетании с индапамидом позволило снизить уровень среднего АД с

© А.С. Никоненко, Т.И. Остапенко, Н.Н. Поляков, И.С. Кузьмина, 2011

(122,3±7,2) до (99,7±6,8) мм рт. ст. ($p < 0,001$). За время приема кандесартана концентрация креатинина плазмы у большинства пациентов оставалась стабильной. В среднем она составила (234,6±17,5) мкмоль/л к началу исследования и (197,6±13,2) мкмоль/л ($p < 0,05$) к его окончанию. СКФ значимо возросла с (44,7±3,5) до (53,8±4,7) мл/мин ($p < 0,05$).

Применение кандесартана сопровождалось достоверным снижением протеинурии с (0,57±0,20) г/сут до начала лечения до (0,22±0,30) г/сут ($p < 0,05$) к концу наблюдения. Принимая во внимание, что протеинурия рассматривается прежде всего как маркер гломерулосклероза, полученные нами данные позволяют предположить замедление процесса в условиях действия БРА1 кандесартана.

Повышение уровня креатинина выше 500 мкмоль/л за 12 месяцев наблюдения было констатировано у 2 (6,3 %) пациентов, получавших БРА1 кандесартан. У 30 реципиентов почечного трансплантата стабильная функция трансплантата сохранялась в течение (40,2±1,7) месяца.

Обсуждение. В патогенезе ХТН наряду с действием иммунологических антигензависимых механизмов важнейшее значение придается тем же факторам, которые определяют прогрессирование хронических нефропатий при поражениях собственных почек. Нормальный механизм ауторегуляции тонуса афферентных артериол нарушается в условиях уменьшения массы действующих нефронов, одним из вариантов ко-

торого является функционирование единственной трансплантированной почки. Это приводит к трансмиссии системной гипертензии на капиллярный кровоток, что усугубляет внутриклубочковую гипертензию и ускоряет развитие гломерулосклероза [2].

Еще одним фактором, влияющим на функцию трансплантата, является АГ [3]. Выживаемость трансплантата зависит не столько от факта АГ, сколько от степени ее выраженности. Период удовлетворительной функции максимален при нормальном уровне АД и минимален при высокой АГ [4]. Современные исследования не только продемонстрировали эффективность и безопасность использования БРА1, но и выявили ренопротективный эффект этой группы препаратов [5]. Наши наблюдения полностью совпадают с этими данными. Использование кандесартана позволило достичь целевых уровней АД у всех пациентов. Применение препарата способствовало снижению как минимальной, так и выраженной протеинурии, добиться стабилизации азотывделительной функции трансплантата.

Выводы

Кандесартан оказывает наряду с антигипертензивным эффектом ренопротективное действие на почечный трансплантат. Применение препарата позволило эффективно контролировать уровень артериального давления. Ренопротективные свойства проявились в снижении концентрации креатинина плазмы, повышении скорости клубочковой фильтрации, снижении уровня суточной протеинурии.

Список литературы

1. *Marnon R. B.* Predictors of cardiovascular events and associated mortality of kidney transplant recipients / R. B. Marnon // *Transplant. Proc.* — 2006. — V. 38, № 2. — P. 509–512.
2. *Nankivell B. J.* Chronic allograft nephropathy: current concepts and future directions / B. J. Nankivell, J. R. Chapman // *Transplant.* — 2006. — № 81. — P. 643–654.
3. *Hariharan S.* Recommendations for outpatient monitoring of kidney transplant recipients / S. Hariharan // *Am. J. Kidney Dis.* — 2006. — V. 47, № 4, suppl. 2. — P. 22–36.
4. Monitoring kidney graft function / O. Traindl, S. Falger, S. Reading [et al.] // *Am. J. of Kidney Dis.* — 2006. — V. 2, № 4. — P. 25–27.
5. Candecartan improves blood pressure control and reduced proteinuria in transplant recipients: results from SEKRET / T. Philipp, F. Martinez, H. Geiger [et al.] // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2010. — V. 25, № 3. — P. 967–976.

О.С. Ніконенко, Т.І. Остапенко, М.М. Поляков, І.С. Кузьміна

ВПЛИВ БЛОКАТОРІВ АТ1-РЕЦЕПТОРІВ АНГІОТЕНЗИНУ II НА ПЕРЕБІГ ХРОНІЧНОЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЙНОЇ НЕФРОПАТІЇ

Хронічна трансплантаційна нефропатія є однією з основних причин втрати функції трансплантата у пізньому післятрансплантаційному періоді. Вивчено вплив блокатора АТ1-рецепторів кандесартану на перебіг хронічної трансплантаційної нефропатії. Виявлено ренопротективний та антигіпертензивний ефекти кандесартану. Встановлено, що застосування кандесартану приводить до уповільнення темпів розвитку хронічної трансплантаційної нефропатії.

Ключові слова: трансплантація нирки, хронічна трансплантаційна нефропатія, блокатори АТ1-рецепторів, артеріальна гіпертензія.

A.S. Nikonenko, T.I. Ostapenko, N.N. Polyakov, I.S. Kuzminova

THE EFFECT OF ANGIOTENSIN II TYPE 1 RECEPTOR BLOCKER ON THE COURSE OF CHRONIC ALLOGRAFT NEPHROPATHY

Chronic transplant nephropathy (CTN) is the most frequent cause of the graft loss in the late post-transplant period. The influence of the angiotensin II type 1 receptor blocker candecartan on the course of CTN was investigated. Antihypertensive and renoprotective effects of candecartan have been revealed. It has been observed, that use of candecartan resulted in slowing down of CTN progression.

Key words: kidney transplantation, chronic transplant nephropathy, angiotensin II type 1 receptor blocker, arterial hypertension.

УДК 616.61-089.743843-073.43

А.С. Никоненко, Н.Н. Поляков, О.С. Гордиенко

Запорожский НИИ сердечно-сосудистой хирургии и трансплантологии

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ДОППЛЕРОГРАФИЯ В ОЦЕНКЕ ФУНКЦИИ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ

Проанализированы характерные ультразвуковые диагностические критерии дисфункции трансплантата почки. Показано, что ультразвуковая и доплерографическая картина коррелирует с клинико-лабораторными показателями и дает возможность оценить функцию трансплантата и выявить ранние признаки криза отторжения.

Ключевые слова: аллотрансплантат почки, спектральные доплеровские показатели, криз отторжения.

В настоящее время трансплантация почки является единственным радикальным методом лечения терминальной стадии хронической почечной недостаточности [1, 2]. В мировой практике ультразвуковое исследование, включающее в себя серошкальное сканирование (В-режим), цветовое и спектральное доплеровское картирование, рассматривается как один из ведущих методов инструментальной диагностики и мониторинга при трансплантации почки [3, 4].

Цель исследования — изучить характерные диагностические критерии дисфункции трансплантата почки при комплексном ультразвуковом мониторинге (спектральные доплеровские показатели).

Материал и методы. С 2010 года по май 2011-го обследовано 30 пациентов после аллотрансплантации почки. Всего 380 исследований, которые проводились планомерно на 1, 2, 3, 5, 7-е и 14-е сутки после трансплантации, 1 раз в месяц в течение первого года, а также по экстренным показаниям — 6 интраоперационных исследований. Возраст пациентов — от 11 до 57 лет. Из них 43 % составили женщины (13), 57 % — мужчины (17). 14 пациентам выполнена родственная пересадка почки (46 %), 16 — трупная трансплантация (54 %).

Все исследования выполнены на ультразвуковом сканере «Sono Scape 1000» линейным и фазированным датчиками с частотой сканирования 3–5 МГц.

Результаты. Клиническое течение и гемодинамические показатели в послеоперационном периоде у всех пациентов были

различными. Немедленная функция трансплантата была отмечена в 87 % (26 пациентов) наблюдений и отсроченная функция — в 13 % (4 пациента). У пациентов с немедленной функцией трансплантата при УЗИ-исследовании в первые сутки послеоперационного периода почка имела правильную форму, четкие контуры. Эхогенность паренхимы не изменена. Корковый слой четко дифференцировался. В режиме цветного доплеровского картирования в каждом сегменте визуализировались несколько междолевых и дуговых артерий с нормальным систолическим и диастолическим кровотоком на протяжении всего сердечного цикла. При проведении спектральной доплерографии величина и форма доплерограмм, снятых с различных сегментов трансплантата, были однотипными. На всех уровнях регистрировалась нормальная форма спектров (быстрый подъем, острая вершина в систолу и хорошо выраженный диастолический кровоток). Средняя скорость кровотока (ССК) по междолевым артериям составляла $(0,16 \pm 0,07)$ м/с, резистивный индекс (ИР) — $0,65 \pm 0,09$, по дуговым артериям ССК — $(0,12 \pm 0,06)$ м/с, ИР — $0,62 \pm 0,08$. Наряду с увеличением клубочковой фильтрации наблюдалось снижение уровня креатинина в крови. Стабилизация внутриорганной гемодинамики наступала к концу первой недели. У пациентов с немедленной функцией трансплантата характерно постепенное увеличение ССК по междолевым и дуговым артериям в течение первой недели послеоперационного периода, увеличение

© А.С. Никоненко, Н.Н. Поляков, О.С. Гордиенко, 2011

диастолического кровотока с нормализацией ИР по междолевым и дуговым артериям.

У реципиентов с отсроченной функцией аллотрансплантата отмечалось снижение эхогенности паренхимы, сглаженность кортикомедуллярной дифференциации. При цветном доплеровском картировании определялось неравномерное окрашивание междолевых и дуговых артерий, «обеднение сосудистого рисунка» коркового слоя, мозаичность в различных сегментах почки. Кровоток определялся преимущественно в систолическую фазу сердечного цикла. При спектральной доплерографии было выявлено существенное снижение ССК по междолевым и дуговым артериям — $(0,11 \pm 0,02)$ и $(0,06 \pm 0,02)$ м/с — из-за снижения диастолического кровотока или его отсутствия, что сопровождалось повышением показателей ИР до $0,93 \pm 0,09$ и $0,89 \pm 0,09$. Нарушения внутриорганной гемодинамики отражались на показателях, характеризующих выделительную функцию трансплантата. Для нормализации выделительной функции почек потребовалось проведение гемодиализа. Стабилизация внутриорганной гемодинамики и выделительной функции трансплантата наступала к концу четвертой недели.

В раннем послеоперационном периоде ни у одного пациента с немедленной функцией трансплантата по клиническим и инструментальным данным не было диагностировано острое отторжение.

Список литературы

1. *Thurston W.* The Urinary Tract / W. Thurston, S. R. Wilson // Diagnostic Ultrasound / [ed. by C. M. Rumack, S. R. Wilson, J. W. Charboneau]. — [3rd ed.]. — China, Elsevier Mosby, 2005. — P. 321–393.
2. *Alaleh Gheissari.* The Place of Ultrasound in Renal Medicine / Alaleh Gheissari // Saudi J. of Kidney Diseases and Transplantation. — 2006. — V. 17, issue 4. — P. 540–548.
3. *Догра В.* Секреты ультразвуковой диагностики / В. Догра, Д. Дж. Рубенс. — М., 2006.
4. *Клиническая доплеровская ультрасонография* / [Пол Л. Аллан, Пол А. Даббинс, Мирон А. и др.]. — Львов : Медицина мира, 2007. — 374 с.

О.С. Никоненко, М.М. Поляков, О.С. Гордієнко

УЛЬТРАЗВУКОВА ДОПЛЕРОГРАФІЯ В ОЦІНЦІ ФУНКЦІЇ АЛОТРАНСПЛАНТАТА НИРКИ

Проаналізовано характерні ультразвукові діагностичні критерії дисфункції трансплантата нирки. Показано, що ультразвукова і доплерографічна картина корелює з клініко-лабораторними показниками і дає можливість оцінити функцію трансплантата і виявити ранні ознаки кризи відторгнення.

Ключові слова: алотрансплантат нирки, спектральні доплерівські показники, криз відторгнення.

A.S. Nikonenko, N.N. Poliakov, O.S. Gordienko

DOPPLER ULTRASOUND IN THE EVALUATION OF ALLOGRAFT KIDNEY FUNCTION

The typical ultrasound diagnostic criteria of the transplant kidney dysfunction were analyzed. It was shown, that ultrasound and dopplerographic pattern correlates with clinical and laboratory parameters as provides an opportunity to assess graft function and detect early signs of rejection crisis.

Key words: kidney allograft, spectral Doppler indices, rejection crisis.

У реципиентов с острым отторжением при динамическом ультразвуковом и доплерографическом контроле была выявлена следующая УЗ-картина: отмечено достоверное увеличение толщины коркового слоя: прирост составлял 18,6 % ($p < 0,05$), умеренное увеличение толщины трансплантата, прирост составлял 18,5 % ($p < 0,05$). Клинико-лабораторные изменения следующие: снижение диуреза, клубочковой фильтрации, повышение уровня сывороточного креатинина.

Для острой реакции отторжения характерно снижение скорости диастолического кровотока с редукцией до нуля в конце диастолы и ростом показателей ИР.

Выводы

Ежедневный динамический контроль за состоянием внутрипочечной гемодинамики, осуществляемый с помощью цветовой и спектральной доплерографии, в комплексе с клинико-лабораторными показателями дает возможность оценить функцию трансплантата и выявить ранние признаки криза отторжения. Ультразвуковая и доплерографическая картина коррелирует с клинико-лабораторными показателями и с высокой степенью достоверности отражает данные изменения и степень их проявления. При острой реакции отторжения отмечается увеличение линейных размеров трансплантата: коркового слоя и размеров трансплантата, повышение индексов сопротивления.

УДК 616.61-089.843-076-037

*А.С. Никоненко, А.В. Траилин, Т.Н. Никоненко,
Т.И. Остапенко, Н.Н. Поляков*

ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»

ДИАГНОСТИКА, ПРОГНОЗИРОВАНИЕ И ПРОФИЛАКТИКА ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

На основании собственного опыта 530 трансплантаций почки и данных литературы аргументируются необходимость оценки состояния почечного аллотрансплантата на всех стадиях его жизни. При этом делается акцент на комплексном подходе к диагностике, что будет способствовать прогнозированию и профилактике дисфункции почечного аллотрансплантата и продлению срока его функционирования.

Ключевые слова: трансплантация почки, предсуществующая патология, морфологическая и неинвазивная диагностика, ранняя и поздняя дисфункция.

Несмотря на значительный прогресс в улучшении кратковременного выживания почечного аллотрансплантата (ПАТ), достигнутый благодаря внедрению более эффективных методов иммуносупрессии, серьезной проблемой остается хроническая дисфункция пересаженной почки [1]. Ее причиной является хроническое кумулятивное воздействие на ПАТ повреждающих факторов иммунной и неиммунной природы, что ведет к его склерозу [2] и снижению массы действующих нефронов. Вследствие многообразия повреждающих ПАТ факторов и их возможных комбинаций дифференциальная диагностика причины дисфункции трудна, особенно в поздние сроки после трансплантации. В связи с этим профилактика и ранняя диагностика поражений ПАТ приобретают первостепенное значение.

Одним из подходов к решению этих задач является мониторинг состояния ПАТ с применением инвазивных и неинвазивных методов исследования.

Претрансплантационный этап. Общепринятым методом определения пригодности почки для трансплантации являются анализ анамнестических и клинико-лабораторных данных донора и визуальная оценка трансплантата. Однако некоторые структурные изменения в донорской почке не имеют клинических и макроскопических проявлений и могут быть диагностированы только при микроскопии. В Запорожском трансплантационном центре в рамках про-

раммы морфологического мониторинга исследуются биоптаты ПАТ, полученные на донорском и интраоперационном этапах. Это позволяет оценить пригодность почки для трансплантации, степень ее повреждения, а в посттрансплантационный период помогает своевременно распознать предсуществующие, возвратные и *de novo* поражения [3–6]. Кроме того, полученные данные имеют и прогностическое значение.

При заборе почек у донора с небульцим-ся сердцем практически всегда в них наблюдаются выраженные ишемические повреждения. При сочетании ишемических повреждений с признаками предсуществующей патологии донорские почки не рекомендуются для пересадки [4]. Как показано нами по результатам срочного гистологического исследования пункционных биопсий почек от доноров с расширенными критериями, в 37 % случаев почки не пригодны для пересадки. В связи с этим дотрансплантационные биопсии следует сделать обязательным элементом морфологического мониторинга.

Предсуществующая патология донорской почки оказывает влияние на ранние [7] и отдаленные [8] результаты трансплантации. Начальная функция ПАТ в раннем послеоперационном периоде может значительно варьировать: от немедленной (НФ) до отсроченной (ОФ). В группу с замедленной функцией ПАТ (ЗФ) мы относим пациентов, у которых уровень креатинина крови

© А.С. Никоненко, А.В. Траилин, Т.Н. Никоненко и др., 2011

превышал 600 мкмоль/л на 3-й день после трансплантации и/или 300 мкмоль/л на 7-й день после трансплантации.

Установлено, что предсуществующие изменения в донорских почках практически одинаковы у пациентов с ОФ и ЗФ без потребности в диализе (ЗФ без Д) и выражены в большей степени, чем у пациентов с НФ (табл. 1). Это является одним из объяснений, почему даже не требующее проведения диализа нарушение начальной функции ПАТ повышает риск ранних и поздних посттрансплантационных осложнений [9, 10]. Поэтому считаем необходимым тщательный мониторинг состояния пациентов с ЗФ (аналогично наблюдению за пациентами с ОФ). В случае выявления ЗФ терапевтическая тактика нуждается в коррекции [9, 10].

ционный период и соответствующее нарушение начальной функции ПАТ. В связи с этим отдельные центры для предотвращения ОФ используют антилимфоцитарную терапию [9]. Эти данные подтверждают необходимость прогнозирования риска нарушения начальной функции ПАТ и отбора пациентов, которые нуждаются в моделировании терапевтической тактики. Степень артериосклероза была выявлена в качестве независимого предиктора ЗФ без Д (OR=2,80; 1,12–7,04; p=0,025). Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что начальная функция ПАТ зависит от исходного состояния донорской почки. В целях снижения частоты нарушения функции ПАТ целесообразно непосредственно после изъятия органов (особенно от пожи-

Таблица 1. Сравнительная оценка морфологических изменений в донорских почках у реципиентов с НФ, ОФ и ЗФ без Д

| Показатель | НФ (n=55) | ЗФ | |
|----------------------------------------|-----------|----------------|-----------|
| | | ЗФ без Д (n=7) | ОФ (n=13) |
| Степень ИФ | 1,1±0,5 | 1,8±0,5* | 1,3±0,7 |
| Степень утолщения БМ клубочков | 1,8±0,9 | 1,8±0,8 | 2,6±1,2* |
| Степень увеличения ММ | 1,7±0,9 | 1,8±1,0 | 2,2±1,1 |
| Клеточность клубочков | 0,4±0,5 | 0,7±0,5 | 0,8±0,4* |
| Глобально склерозированные клубочки, % | 3,2 | 11,9* | 6,3 |
| Степень артериосклероза | 0,9±1,0 | 2,8±1,3* | 1,0±0,9 |
| Степень артериологиаиноза | 0,7±1,0 | 2,1±1,9 | 1,8±1,7* |

* p<0,05.

Кроме того, мы выявили морфологические предикторы развития ОФ и ЗФ [7]. Независимым предиктором риска развития ЗФ является клеточность клубочков (OR=2,47; 1,23–4,97; p=0,010). Гиперклеточность может быть признаком воспалительного поражения донорских почек, о чем свидетельствует достоверная связь гиперклеточности с утолщением базальных мембран — БМ (R=0,56; p<0,001) и увеличением мезангиального матрикса — ММ (R=0,51; p<0,001), но также она может быть следствием лейкоцитарной инфильтрации поврежденной в процессе умирания донора почки. Ранее мы показали наличие в ПАТ на момент пересадки CD45R0⁺-Т-лимфоцитов и CD68⁺-моноцитов [11].

Можно предположить, что пациенты, у которых отмечается значительная инфильтрация клубочков ПАТ лейкоцитами, имеют более высокий риск развития острого отторжения (ОРО) в ранний послеопера-

льных доноров) выполнять биопсийное исследование для оценки состояния органа, определения риска нарушения функции ПАТ и его минимизации [12, 13]. Нами также установлено, что морфологические изменения во всех компартаментах донорской почки на момент пересадки влияют на функцию ПАТ в течение первого года его жизни в организме реципиента [1]. Гиперклеточность клубочков была связана со снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ) в 6 месяцев (табл. 2).

В случае, если гломерулосклероз (ГС) в интраоперационных биопсиях превышал 10 %, то СКФ в 1 год была достоверно снижена по сравнению с таковой при ГС менее 10 %. Выраженная степень интерстициального фиброза (ИФ) приводила к более низким показателям СКФ в 1 год. Выраженная степень артериосклероза и артериологиаиноза провоцировали достоверно более низкую СКФ на всех этапах наблюдения.

Таблица 2. СКФ в 3, 6 и 12 месяцев после трансплантации у пациентов с легкими (группа 1) и выраженными (группа 2) гистологическими изменениями в донорских почках

| Показатель | 3 месяца | | 6 месяцев | | 12 месяцев | |
|-------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
| | группа 1 | группа 2 | группа 1 | группа 2 | группа 1 | группа 2 |
| Степень ИФ | 63 (49–76) | 52 (43–70)* | 62 (50–75) | 46 (37–66)* | 65 (47–76) | 50 (38–67)* |
| Клеточность | 71 (48–79) | 60 (46–71) | 68 (56–80) | 55 (42–69)* | 61 (44–76) | 64 (45–73) |
| ГС, % | 63 (48–77) | 59 (42–72) | 62 (50–78) | 57 (37–66) | 64 (48–76) | 52 (33–68)* |
| Артериосклероз | 63 (48–76) | 47 (42–63)* | 62 (50–75) | 45 (31–51)* | 64 (46–75) | 32 (25–64)* |
| Артериологиалиноз | 63 (49–76) | 47 (43–63)* | 66 (52–77) | 43 (31–46)* | 64 (49–76) | 38 (31–54)* |

Примечания: 1. Результаты представлены как медиана (нижний и верхний квартили).
2. * $p < 0,05$.

Мероприятия, направленные на предотвращение развития ОФА, позволят обеспечить оптимальную функцию ПАТ и в течение первого года после трансплантации [9, 10].

Посттрансплантационный этап. В ранний период после операции необходим тщательный мониторинг состояния ПАТ путем оценки в динамике его азото- и водовыделительной функции, результатов общеклинических исследований. Среди причин нарушения ранней функции ПАТ различают: острый канальцевый некроз; антителоопосредованное отторжение (АОО); кортикальный некроз/инфаркт; эндотелиальное повреждение; острую токсичность ингибиторов кальциеврина; тромботическую микроангиопатию; медикаментозный интерстициальный нефрит; молниеносное возвратное заболевание; предсуществующую патологию [10]. Поэтому точный диагноз может быть выставлен только при проведении биопсийного исследования. Согласно М. Pascual и др. [14], результаты биопсии, выполненной в первые 30 дней после трансплантации, требуют изменения врачебной тактики в 39 % случаев, а в срок до 1 года — у 56 % пациентов.

Ранние неинвазивные показатели функции ПАТ имеют не только диагностическое, но и прогностическое значение. В частности, при сравнении групп пациентов с разной длительностью функционирования ПАТ выявлены достоверные различия в сроке восстановления азотовыделительной функции (АВФ) после трансплантации ($p=0,046$), СКФ в 6 месяцев ($p=0,022$), концентрации креатинина в сыворотке в 6 месяцев ($p=0,0004$), суточной протеинурии (СПУ) в 6 месяцев ($p=0,020$), проценте рефрактерных к терапии стероидами ОРО (табл. 3).

АВФ восстанавливалась быстрее у тех пациентов, ПАТ которых функционируют

более 3 лет. Креатинин и СПУ в 6 месяцев были наименьшими, а СКФ, наоборот, — наибольшей, у пациентов с более длительным функционированием ПАТ. Таким образом, наши результаты подтверждают литературные данные о том, что функция ПАТ в первый год после трансплантации и ее индикаторы — сывороточный креатинин и СКФ — являются важными параметрами, влияющими на долговременное выживание ПАТ [15]. Рефрактерные ОРО также реже отмечались у пациентов с более длительным функционированием ПАТ. Известно, что риск развития несостоятельности ПАТ достоверно выше у пациентов, которые перенесли ОРО [12], а стероидрезистентное ОРО достоверно повышает степень ИФ в ПАТ [16].

Морфологическим субстратом хронической дисфункции ПАТ является нефросклероз. Наши данные свидетельствуют о том, что с увеличением срока жизни ПАТ процент ГС также достоверно возрастает, а процент ИФ имеет тенденцию к увеличению (табл. 3).

В поиске патогенетических механизмов развития ГС была проанализирована взаимосвязь процента ГС и склероза стромы и установлено, что процент ГС не коррелирует со степенью ИФ/КА. Анализ взаимосвязи хронических изменений сосудов ПАТ и ГС позволил установить, что процент ГС позитивно коррелировал со степенью артериологиалиноза ($R=0,33$; $p=0,02$), но не с интимальным фиброзом [17]. Таким образом, артериологиалиноз был единственным морфологическим признаком, который позитивно коррелировал с % ГС. Эта находка позволяет полагать, что ведущую роль в склерозировании клубочков играют нефротоксичность циклоспорина А и артериальная

Таблица 3. Клинико-лабораторные данные и результаты гистологического исследования ПАТ

| Показатель | Срок функционирования ПАТ, лет | | | | |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | до 1 | до 2 | до 3 | до 4 | больше 4 |
| Степень ИФ | 1,5 (0–3) | 2 (1–2,5) | 1,75 (1–3) | 1,5 (1–3) | 2 (1–3) |
| ИФ, % | 21,9 (0–38,8) | 22,1 (16,6–45,8) | 32,5 (16,0–42,1) | 30,3 (15,8–34,3) | 19,1 (11,3–42,4) |
| ГС, % | 2,4 (0–10) | 4,5 (0–21,6) | 9,5 (2,9–36,7)* | 10,1 (5,1–23,8)* | 31,7 (1,0–57,5)* |
| Степень атеросклероза | 3,5 (0–4) | 3 (2–4) | 3,5 (0–4) | 3 (2–4) | 4 (1,75–4) |
| Степень артериологалиноза | 1,5 (0–4) | 1 (0–3) | 1 (0–4) | 2 (0,5–3) | 2,5 (0–3,25) |
| День восстановления АВФ | 20 (10–25) | 21 (16–32) | 25 (18–32) | 12 (11–23) | 10 (9–17) |
| Рефрактерные ОРО, % | 50 | 30,8 | 16,7 | 10 | 11,1 |
| Креатинин в 6 месяцев, мкмоль/л | 134 (109–140) | 167 (97–240) | 120 (57–172) | 84 (60–125)* | 102 (78–121)* |
| СПУ в 6 месяцев, мг | 89 (36–153) | 198 (96–298)* | 89 (52–150) | 52 (39–65) | 64 (38–65) |
| СКФ в 6 месяцев, мл/мин | 62 (46–86) | 64 (52–77) | 82 (67–89) | 87 (74–91)* | 87 (78–90)* |

* $p < 0,05$; достоверно по сравнению с показателем в сроке до 1 года.

гипертензия, ключевым морфологическим признаком которых является артериологалиноз [13]. СПУ в 6 месяцев позитивно коррелировала с процентом ИФ ($R=0,42$; $p < 0,05$), что подтверждает данные литературы о фиброгенной роли протеинурии, а также ее негативный эффект на выживание ПАТ [18]. С учетом этих данных становится понятным позитивный эффект на выживание ПАТ ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, снижающих протеинурию [6, 19].

Основной задачей мониторинга в первые недели и месяцы после трансплантации является ранняя диагностика ОРО, дифференциальная диагностика ее типов, прогнозирование исхода ОРО и отдаленных результатов трансплантации. В 49,1 % случаев ОРО у пациентов нашего центра было выявлено изолированное острое АОО, а в 33,3 % случаев оно сочеталось с острым Т-клеточно-опосредованным отторжением (ОТОО). Изолированное ОТОО имело место у 17,6 % реципиентов.

Столь высокий процент случаев острого АОО, по-видимому, объясняется более тяжелым его клиническим течением, что являлось основанием для биопсии/трансплантатэктомии, в то время как изолированное ОТОО у ряда пациентов могло протекать субклинически. Важность ранней диагностики острого АОО объясняется не

только более тяжелым его течением и худшим прогнозом, но и иными подходами к терапии [20].

Для повышения диагностической ценности биопсийного исследования полученный материал должен детально анализироваться. Для этого во многих центрах рутинным является анализ срезов биоптатов ПАТ с использованием стандартного гистологического окрашивания, иммуногистохимических методов с последующей световой, флюоресцентной и электронной микроскопией. Помимо микроскопии рутинно окрашенных срезов мы используем для диагностики ОРО и дифференциальной диагностики ее вариантов выявление в срезах Т-лимфоцитов, моноцитов, С4d-компонента комплемента. При ОТОО в инфильтратах можно выявить преобладание $CD4^+$ - и $CD8^+$ -Т-лимфоцитов, а также НК-клетки и $CD68^+$ -моноциты/макрофаги [11]. Такой подход, применяемый в комплексе с оценкой состояния ПАТ согласно Vanff-97-классификации [13], позволяет повысить качество диагностики ОРО.

Для подтверждения морфологического диагноза АОО необходимо исследование сыворотки реципиента на наличие донорспецифических антител. Наиболее достоверным иммуногистохимическим доказательством острого АОО является обнаружение депозитов С4d на базальных мембранах и

эндотелии перитубулярных или гломерулярных капилляров. Обнаружение депозитов C4d имеет и прогностическое значение. Их наличие в протокольных биопсиях даже у реципиентов с нормальной гистологией указывает на более высокий риск ОРО в течение года после трансплантации и является предиктором поздней дисфункции ПАТ [20–23].

Кардинальным морфологическим проявлением поздней дисфункции ПАТ являются тубулярная атрофия и ИФ. Такая картина выявляется у 30 % пациентов с поздней дисфункцией ПАТ [2]. Установлено, что степень ИФ коррелирует с функцией ПАТ и с отдаленным прогнозом [2]. Рутинно для выявления степени ИФ используется окраска гистологических образцов по Массону с последующей оценкой его степени в баллах [13]. Мы показали, что с использованием системы анализа изображения можно точно определить процент площади ткани, пораженной фиброзом, и повысить, таким образом, качество диагностики фиброза (табл. 2).

Дифференциальная диагностика причин хронической дисфункции ПАТ проводится между [2]: обструкцией мочеточника; стенозом почечной артерии; возвратным или *de novo* гломерулонефритом; инфекцией; нефротоксичностью; поздним/возвратным ОРО; нарушением режима иммуносупрессии; ятрогенией; хроническим активным антитело-опосредованным или Т-клеточно-опосредованным отторжением; хронической гипертензией. Поэтому точный диагноз устанавливается только по результатам гистологического исследования биоптатов. Но и в этом случае морфолог часто встречается с затруднениями, поскольку перечисленные патологические процессы могут сочетаться.

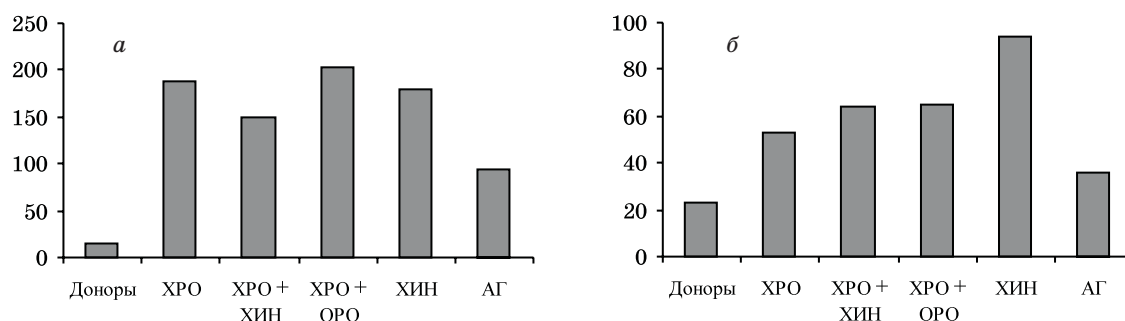
Мы внедрили в нашу практику метод окраски гистологических срезов резорцинином, что позволяет визуализировать

эластические волокна в стенке артерии. Наличие разрывов внутренней эластичной мембраны артерии свидетельствует о хроническом отторжении ПАТ, а наличие нескольких слоев внутренней эластичной мембраны артерии — о гипертензивной нефропатии аллотрансплантата [5]. Нами также показано, что повысить качество диагностики форм поздней дисфункции ПАТ можно путем сочетания окрашивания гистологических срезов биоптатов согласно рекомендациям Vanff-классификации [13] с иммуногистохимическим окрашиванием для выявления CD45R0⁺- Т-лимфоцитов и CD68⁺- моноцитов/макрофагов [11]. В большинстве случаев поздней дисфункции изучаемые показатели достоверно увеличивались относительно таковых на донорском этапе (рисунок).

Количество Т-лимфоцитов при артериальной гипертензии было наименьшим по сравнению с другими группами ($p < 0,001$), а в группе ХРО в сочетании с ОРО было достоверно большим, чем в группе ХРО в сочетании с хроническим интерстициальным нефритом — ХИН ($p < 0,05$). Количество моноцитов в группе ХИН достоверно превышало этот показатель в группах ХРО, ХРО + ХИН, ХРО + ОРО.

Применение этих подходов позволило нам установить, что в структуре хронической дисфункции ПАТ по-прежнему преобладают случаи, вызванные антигензависимыми факторами — позднее острое отторжение (17,4 %) и хроническое отторжение (43,5 %). Среди антигеннезависимых факторов преобладают хронические инфекции, гипертензивно-сосудистые заболевания, хронический гломерулонефрит, циклоспоринная нефротоксичность.

Таким образом, собственные данные и результаты проведенного анализа литературы свидетельствуют о важной диагности-



Количество CD45R0⁺ Т-лимфоцитов (а) и CD68⁺ моноцитов/макрофагов (б) в поле зрения микроскопа при вариантах хронической дисфункции ПАТ

ческой и прогностической роли мониторинга состояния ПАТ биопсийным и неинвазивным путем. Учитывая высокий уровень за-

трат для возврата на диализ и выполнения ретрансплантации, такой подход является экономически обоснованным.

Список литературы

1. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent years / H. U. Meier-Kriesche, J. D. Schold, T. R. Srinivas [et al.] // *Am. J. Transplant.* — 2004. — V. 4. — P. 378–383.
2. *Chapman J. R.* Chronic renal allograft dysfunction / J. R. Chapman, P. J. O'Connell, B. J. Nankivell // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2005. — V. 16. — P. 3015–3026.
3. *Никоненко Т. Н.* Клініко-морфологічний моніторинг трансплантованих нирок / Т. Н. Никоненко // *Мистецтво лікування.* — 2005. — № 8. — С. 34–35.
4. *Никоненко Т. Н.* Прогнозирование дисфункции почечного трансплантата на основании морфологического исследования донорской почки / Т. Н. Никоненко, А. В. Траилин, Т. И. Остапенко // *Актуальні питання медичної науки та практики : зб. наук. ст. — Запоріжжя.* — 2006. — № 69. — С. 284–288.
5. *Никоненко А. С.* Морфологический анализ причин поздней дисфункции почечного аллотрансплантата / А. С. Никоненко, Т. Н. Никоненко, А. В. Траилин // *Трансплантология.* — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 185–187.
6. *Остапенко Т. И.* Влияние ингибиторов АПФ на течение хронической трансплантационной нефропатии / Т. И. Остапенко, С. Н. Гриценко, Т. Н. Никоненко // *Актуальні питання медичної науки та практики : зб. наук. ст. — Запоріжжя.* — 2006. — Вип. 69. — С. 312–318.
7. Предсуществующая патология донорской почки как фактор риска нарушения начальной функции почечного аллотрансплантата / А. В. Траилин, Т. Н. Никоненко, Т. И. Остапенко [и др.] // *Український морфологічний альманах.* — 2008. — Т. 6, № 2. — С. 45–48.
8. Морфологические предикторы функции почечного аллотрансплантата (ПАТ) в первый год после операции / А. В. Траилин, Т. Н. Никоненко, А. С. Никоненко [и др.] // *Вестн. трансплант. и искус. органов.* — 2010. — Т. 12, № 1. — С. 21–26.
9. Delayed graft function in kidney transplantation / N. Perico, D. Cattaneo, M. H. Sayegh [et al.] // *Lancet.* — 2004. — V. 364. — P. 1814–1827.
10. *Halloran P. F.* Delayed graft function: state of the art / P. F. Halloran, L. G. Hunsicker // *Am. J. of Transplant.* — 2001. — № 1. — P. 115–120.
11. *Траилин А. В.* Иммунофенотипирование лейкоцитов в комплексной диагностике поздней дисфункции почечного аллотрансплантата / А. В. Траилин, Т. Н. Никоненко // *Український морфологічний альманах.* — 2006. — Т. 4, № 4. — С. 91–95.
12. *First M. R.* Renal function as a predictor of long-term graft survival in renal transplant patients / M. R. First // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2003. — V. 18, suppl. 1. — P. 13–16.
13. The Banff97 working classification of renal allograft pathology / L. C. Racusen, K. Solez, R. B. Colvin [et al.] // *Kidney Int.* — 1999. — V. 55, № 2. — P. 713–723.
14. The clinical usefulness of the renal allograft biopsy in the cyclosporine era: a prospective study / M. Pascual, H. Vallhonrat, A. B. Cosimi [et al.] // *Transplant.* — 1999. — V. 67, № 5. — P. 737–741.
15. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival / S. Hariharan, M. McBride, W. S. Cherikh [et al.] // *Kidney Int.* — 2002. — V. 62. — P. 311–318.
16. The natural history of chronic allograft nephropathy / B. J. Nankivell, R. J. Borrows, C. L. Fung [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2003. — V. 349. — P. 2326–2333.
17. *Траилин А. В.* Роль гломерулосклероза в развитии хронической дисфункции почечных аллотрансплантатов / А. В. Траилин // *Укр. морфологічний альманах.* — 2008. — Т. 6, № 4. — С. 95–98.
18. *Perico N.* More on renal disease progression: is interstitial inflammation truly protective? / N. Perico, M. Abbate, G. Remuzzi // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2007. — V. 18. — P. 1630–1632.
19. *Jevnikar A. M.* Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it / A. M. Jevnikar, R. B. Mannon // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* — 2008. — V. 3. — P. S56–S67.
20. *Colvin R. B.* Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis / R. B. Colvin // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2007. — V. 18, № 4. — P. 1046–1056.
21. *Траилин А. В.* Морфологический и молекулярно-генетический мониторинг трансплантированной почки — путь к увеличению срока ее выживания / А. В. Траилин, Т. Н. Никоненко // *Український медичний часопис.* — 2007. — Т. 57, № 1. — С. 81–87.
22. *Bohmig G. A.* Protocol biopsies after kidney transplantation / G. A. Bohmig, H. Regele, W. H. Horl // *Transpl. Int.* — 2005. — V. 18, № 2. — P. 131–139.
23. Prevalence and immunohistochemical findings of subclinical kidney allograft rejection and its association with graft outcome / F. V. Veronese, I. L. Noronha, R. C. Manfro [et al.] // *Clin. Transplant.* — 2004. — V. 18, № 4. — P. 357–364.

О.С. Никоненко, А.В. Траїлін, Т.М. Никоненко, Т.І. Остапенко, М.М. Поляков
ДІАГНОСТИКА, ПРОГНОЗУВАННЯ Й ПРОФІЛАКТИКА ДИСФУНКЦІЇ НИРКОВОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА

На підставі власного досвіду 530 трансплантацій нирки й даних літератури аргументуються необхідність оцінки стану ниркового алотрансплантата на всіх стадіях його життя. При цьому робиться акцент на комплексному підході до діагностики, що сприятиме прогнозуванню й профілактиці дисфункції ниркового алотрансплантата й продовженню строку його функціонування.

Ключові слова: трансплантація нирки, передіснуюча патологія, морфологічна і неінвазивна діагностика, рання й пізня дисфункція.

A.S. Nikonenko, A.V. Trailin, T.N. Nikonenko, T.I. Ostapenko, N.N. Polyakov
DIAGNOSTICS, PREDICTION AND PREVENTION OF KIDNEY ALLOGRAFT DYSFUNCTION

On the basis of own experience of 530 kidney transplantation and literature data authors argue the necessity of estimation of the kidney allograft state at all stages of its life. An accent is thus done on the necessity of the complex diagnostics, which will contribute to kidney allograft dysfunction prediction and prevention and the improving of long-time kidney allograft survival.

Key words: kidney transplantation, pre-existent pathology, morphological and noninvasive diagnostics, early and late allograft dysfunction.

УДК 616.61-089.843-076-037

Т.Н. Никоненко, А.В. Траилин

ГУ «Запорожская медицинская академия последипломного образования»

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К МОРФОЛОГИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ ПОЧЕЧНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

На основании собственного опыта и данных литературы авторы пропагандируют метод морфологического мониторинга состояния почечных трансплантатов. Диагностические и плановые биопсии почечных трансплантатов на всех стадиях его жизни, с последующим комплексным морфологическим исследованием незаменимы как при выборе качественного органа пересадки, так и для ранней диагностики его дисфункции.

Ключевые слова: трансплантация почки, биопсии, морфологический мониторинг, клиничко-морфологический анализ.

Трансплантация почки является методом выбора при лечении хронических заболеваний почек и значительно увеличивает продолжительность жизни больного с его полной медицинской и трудовой реабилитацией [1, 2].

Своевременная и объективная диагностика дисфункции почечных трансплантатов (ПАТ) возможна только при морфологическом исследовании пункционных биопсий [3, 4]. Морфологическое исследование удаленных трансплантатов позволяет более детально изучить структурные изменения, послужившие причиной дисфункции ПАТ.

Для морфологической диагностики используется в основном световая микроскопия с полуколичественной оценкой выявленных изменений, иммуногистохимическое исследование и лишь в некоторых случаях — электронная микроскопия. Из иммуногистохимических методов в настоящее время широко используется выявление белка системы комплемента C4d для дифференциальной диагностики антителоопосредованного отторжения [3–5].

Объектом морфологического исследования в трансплантации являются:

- донорские (контрлатеральные) почки;
- пункционные биопсии;
- удаленные трансплантаты.

На материал (донорские почки, пункционные биопсии, удаленные трансплантаты), отправленный в морфологическую лабораторию, оформляется «Направление на

патогистологическое исследование». На лицевой стороне бланка регистрируются паспортные данные реципиента, клинический диагноз, унифицированные по определенной схеме лабораторные данные, необходимые для клиничко-морфологического анализа. Также сообщаются сведения о доноре (возраст, пол, причина смерти, лабораторные данные).

На обратной стороне «Направления на патогистологическое исследование» регистрируются морфологические данные.

При макроскопическом исследовании донорских почек и удаленных трансплантатов указываются: масса, размеры, состояние капсулы (прозрачная, белесоватая, изменения очагового или диффузного характера), поверхность (гладкая, бугристая, зернистая), консистенция (дряблая, плотная).

На разрезе почки обращают внимание на: цвет, рисунок, соотношение коркового и мозгового вещества, состояние чашечно-лоханочного сегмента (расширен, сдавлен, содержит конкременты). Исследуются сосуды (артерии, вены): толщина стенки (равномерно или очагово утолщена), просвет (расширен, сужен, деформирован, наличие аневризмы), наличие тромбов, атеросклеротических бляшек. В обязательном порядке исследуется мочеточник.

При микроскопическом исследовании изучаются различные структуры трансплантата: клубочки, каналы, строма, сосуды.

© Т.Н. Никоненко, А.В. Траилин, 2011

Клубочки: размеры (увеличены, уменьшены), отметить наличие гиперклеточности, процент склерозированных клубочков, состояние капсулы Боумена (склерозирована, сращена с петлями капилляров), просвет капсулы (расширен, сдавлен), заполнен белковыми массами, коллагеновыми волокнами; капилляры — просвет сдавлен, расширен, заполнен тромбами, клетками (мононуклеары, нейтрофилы), отметить увеличение и транспозицию мезангиального матрикса, мезангиолизис, удвоение базальной мембраны.

Канальцы: просвет (расширен, заполнен зернистыми или гиалиновыми цилиндрами, слущенными эпителиальными клетками); канальцевый эпителий — дистрофия (гидропическая, гиалиново-капельная), некроз (очаговый, тотальный), атрофия (очаговая, распространенная), тубулит.

Строма: отек, фиброз (очаговый, периваскулярный, перигломерулярный, диффузный), воспалительная инфильтрация (лимфоциты, моноциты, плазмоциты, нейтрофилы), очаги некроза, кровоизлияния.

Сосуды: артерии и артериолы — гиалиноз (диффузный, очаговый), фибриноидный некроз, фиброэластоз, атеросклероз, нодулярные гиалиновые депозиты в афферентных артериолах, дегенеративные изменения меди, артериит (интимальный, трансмуральный), фиброзирующий артериит, разрывы внутренней эластической мембраны; вены — просвет расширен, венозный застой, венулит [6–8].

Исследование пункционных биопсий имеют некоторые особенности. Желательно при взятии биопсии на неокрашенном биоптате под микроскопом определить наличие клубочков и их количество.

При макроскопическом исследовании указываются размеры, консистенция и цвет биоптата.

Микроскопическое исследование пункционных биопсий по современным требованиям проводится согласно рекомендациям Банфф-классификации. Вначале определяется адекватность биоптата для гистологического исследования. Адекватными считаются биоптаты, содержащие не менее 10 клубочков и 2 артерий. Срезы толщиной не более 4 мкм окрашиваются гематоксилин-эозином (3 стекла), ШИК или перийодной кислотой метенамином серебра (3 стекла), трихромом по Массону (1 стекло), резорцин-фуксином на эластик (1 стекло).

Кроме того, 2 стекла используют для иммуногистохимических исследований [4]. Стекла пункционных биопсий донорских почек и удаленных трансплантатов архивируют по каждому реципиенту, так что морфолог может проследить динамику морфологических изменений, приведших к дисфункции трансплантата, что дает возможность своевременной диагностики патологии в позднем послеоперационном периоде.

При микроскопическом исследовании пункционных биопсий так же, как трансплантированных почек, изучаются структурные изменения по общепринятой схеме (клубочки, канальцы, строма, сосуды).

Обнаруженные изменения вносятся в «Направление на патогистологическое исследование». Необходимо также обращать внимание на ранние и незначительные изменения, отмечая их в заключении. Эти изменения будут учтены в последующих исследованиях.

Начальное гистологическое исследование для объективности желательно проводить без учета клинических данных, однако окончательный диагноз формируется при сопоставлении результатов гистологического исследования и клинических данных (клинико-морфологический анализ).

Применение клинико-морфологического анализа способствует объективному суждению о структурных изменениях в трансплантате, обусловивших его дисфункцию.

Для улучшения качества диагностики причин дисфункции почечного трансплантата, особенно в позднем послеоперационном периоде, когда имеет место сочетание различных форм патологии, необходимо в обязательном порядке проводить морфологический мониторинг [7].

Обязательным элементом морфологического мониторинга являются предтрансплантационные «0» биопсии, которые позволяют диагностировать предсуществующую патологию донорских почек, пригодность их для трансплантации, а в последующих исследованиях являются «биопсией сравнения».

Пункционные биопсии интраоперационного периода дают представление об ишемических и реперфузионных повреждениях, оказывающих определенное влияние на начальную функцию почечного трансплантата и длительность его функционирования.

В послеоперационном периоде (до 3 месяцев) проводятся тонкоигольные биопсии,

а в 3, 6, 12 місяців і далі щорічно рекомендується проведення планових (протокольних) пункційних біопсій, позволяючих виявити ознаки того або іншого патологічного процесу на ранній стадії або при його субклінічному перебігу і внести коррекцію в проводиме лікування.

При дисфункції ниркового трансплантата пункційні біопсії необхідно проводити в обов'язковому порядку.

Висновки

Морфологічне дослідження трансплантованих нирок є основоположним методом в діагностиці причин дисфункції ниркових трансплантатів.

Список літератури

1. Денисов В. К. Трансплантологія / В. К. Денисов. — К. : Наукова думка, 1998. — 247 с.
2. Траїлін А. В. Діагностика і профілактика дисфункції ниркового алотрансплантату : навч.-метод. посібник, затверджений МОЗ України / А. В. Траїлін, Т. М. Никоненко, О. С. Никоненко. — Запоріжжя : Орбіта-Юг, 2009. — 128 с.
3. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology / K. Solez, R. A. Axelsen, H. Benediktsson [et al.] // *Kidney Int.* — 1993. — V. 44. — P. 411–422.
4. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology / L. C. Racusen, K. Solez, R. B. Colvin [et al.] // *Kidney Int.* — 1999. — V. 55, № 2. — P. 713–723.
5. Banff '09 Meeting Report: Antibody Mediated Graft Deterioration and Implementation of Banff Working Groups / B. Sis, M. Mengel, M. Haas [et al.] // *Am. J. of Transplant.* — 2010. — V. 10. — P. 464–471.
6. Никоненко О. С. Морфологічна характеристика основних форм патології ниркових трансплантатів : метод. рекомендації, затверджені МОЗ України / О. С. Никоненко, Т. М. Никоненко, А. В. Траїлін. — Запоріжжя, 2008. — 26 с.
7. Никоненко Т. М. Клініко-морфологічний моніторинг трансплантованих нирок / Т. М. Никоненко // *Мистецтво лікування.* — 2005. — № 8. — С. 34–35.
8. Траїлін А. В. Гістологічна класифікація та морфологічна характеристика форм патології ниркового алотрансплантату (за матеріалами Банфф-конференцій) : метод. рекомендації, затверджені МОЗ України / А. В. Траїлін, Т. М. Никоненко. — Запоріжжя, 2007.

Т.М. Никоненко, А.В. Траїлін

МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО МОРФОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ НИРКОВИХ ТРАНСПЛАНТАТІВ

На підставі власного досвіду та даних літератури автори пропагують метод морфологічного моніторингу стану ниркових трансплантатів. Діагностичні та планові біопсії ниркових трансплантатів на всіх стадіях його життя з подальшим комплексним морфологічним дослідженням незамінні як при виборі якісного органа пересаджування, так і для ранньої діагностики його дисфункції.

Ключові слова: трансплантація нирки, біопсії, морфологічний моніторинг, клініко-морфологічний аналіз.

T.N. Nikonenko, A.V. Trailin

METHODOLOGICAL APPROACH TO MORPHOLOGICAL EXAMINATION OF KIDNEY ALLOGRAFT

Based on own experience and literature data the authors popularize a method of morphological monitoring of the kidney allograft. Diagnostic and protocol biopsies of kidney allograft at all stages of its life, followed by a complex morphological study are essential in the choice of organ of high quality for transplantation and for early diagnosis of its dysfunction.

Key words: kidney transplantation, biopsy, morphological monitoring, clinical and morphological analysis.

УДК 616.61-089.843:616.23/.24

Є.В. Оніщенко, В.В. Захаров

Трансплантаційний центр

Донецького обласного клінічного територіального медичного об'єднання

АНАЛІЗ ПАТОЛОГІЇ НИЖНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ У ПОТЕНЦІЙНИХ РЕЦИПІЄНТІВ НИРКОВОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА

Проаналізовано патологію нижніх дихальних шляхів у потенційних реципієнтів ниркового алотрансплантата. Виявлено, що захворюваність в основній групі значно вище, ніж в загальній популяції. Більшість випадків патології бронхолегеневої системи розвиваються на тлі гіпергідратації та застою в малому колі кровообігу. Найбільш оптимальним для виконання трансплантації нирки з огляду на функціональний стан бронхолегеневої системи є період від другого місяця до першого півроку замісного гемодіалізного лікування.

Ключові слова: *потенційні реципієнти ниркового алотрансплантата, захворювання нижніх дихальних шляхів.*

Інфекції нижніх дихальних шляхів (ІНДШ) — широко розповсюджена патологія. Спектр ІНДШ ізноманітний — від мало-симптомної колонізації/інфекції слизової оболонки дихальних шляхів, гострого бронхіту, загострення хронічного бронхіту до тяжкої, загрожуючої життю пневмонії [1]. В даний час у світі відмічається ріст захворюваності пневмоніями. Велику тривогу викликає збільшення смертності: у пацієнтів молодого і середнього віку без супутніх захворювань летальність при позалікарняній пневмонії складає не більше 1–3 %, у старших вікових групах при наявності супутньої патології, а також у випадку тяжкого перебігу пневмонії летальність досягає 15–30 %, при нозокоміальній пневмонії — до 35–40 % [2, 3]. У пацієнтів з термінальною стадією хронічної ниркової недостатності (тХНН), що знаходяться на лікуванні гемодіалізом і очікують на трансплантацію нирки, дана проблема становить особливу небезпеку. Незважаючи на удосконалювання методів гемодіалізу й апаратів «штучна нирка», цілком компенсувати втрачені ниркові функції не вдається і дотепер. Стан субуремії збільшує ризик виникнення інфекцій шляхом зниження імунітету. В післятрансплантаційному періоді застосування імуносупресивних препаратів підсилює зниження захисних можливостей організму, що може спричинити загострення не-

діагностованих інфекцій з безсимптомним перебігом. З огляду на викладене аналіз захворюваності дихальної системи у потенційних реципієнтів ниркового трансплантата являє значний клінічний інтерес.

Матеріал і методи. Проведено ретроспективний аналіз 173 історій хвороби потенційних реципієнтів ниркового алотрансплантата, що знаходилися на лікуванні в трансплантаційному центрі Донецького обласного клінічного територіального медичного об'єднання в період з 2004 по 2009 р. В якості контролю була використана група із 149 потенційних донорів ниркового алотрансплантата. Досліджувані групи були порівнянні за віком та наявністю курців, беручи до уваги вплив куріння на бронхолегеневу систему.

Статистичний аналіз проведений за допомогою ПК з використанням пакета статистичних програм Excel 7 для Windows XP. Оцінювали середні значення (M), їхні похибки (m), критерій Ст'юдента (S). Розходження визнавали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В основній групі виявлена така патологія бронхолегеневої системи: пневмонії, гострий бронхіт та загострення хронічного бронхіту, екссудативний плеврит, набряк легень, вторинна венозна гіпертензія. В контрольній групі зареєстровані випадки лише пневмо-

© Є.В. Оніщенко, В.В. Захаров, 2011

нії та бронхіту (табл. 1). Всі діагнози пневмонії, ексудативного плевриту, набряку легень встановлювали на основі скарг, даних об'єктивного обстеження та рентгенологічного підтвердження; діагноз бронхіту — на основі скарг, даних об'єктивного обстеження при відсутності рентгенологічних ознак запалення легеневої тканини, діагноз вторинної венозної гіпертензії встановлювали за рентгенологічними ознаками.

ваються на тлі гіпергідратації та застою в малому колі кровообігу.

Між нирками та органами дихання існує антигенна спорідненість та функціональний зв'язок. При нирковій недостатності цей зв'язок підтверджується найбільш повно. При гломерулонефриті ураження легеневої тканини зумовлено імунологічними зсувами в організмі і зустрічається досить часто. У хворих з цукровим діабетом ура-

Таблиця 1. Патологія нижніх дихальних шляхів у потенційних реципієнтів ниркового алотрансплантата і у здорових донорів нирки

| Виявлена патологія | Група хворих на тХНН (n=173) | | Потенційні донори нирки – контроль (n=149) | |
|-----------------------------------------------------|------------------------------|--------------|--------------------------------------------|-------------------------|
| | абс. | % | абс. | % |
| Пневмонія | 18 | 10,4 | 4 [#] | 2,7 [#] |
| Гострий бронхіт або загострення хронічного бронхіту | 93 | 53,7 | 44* | 29,5* |
| Набряк легень | 11 | 6,4 | 0 | – |
| Ексудативний плеврит | 4 | 2,3 | 0 | – |
| Вторинна венозна гіпертензія | 97 | 56,1 | 0 | – |
| Всього | 223 | 128,9 | 48[#] | 32,2[#] |
| Без патології | 6 | 3,5 | 101 | |

* p<0,05; # p<0,001.

Відсутність у контрольній групі випадків ексудативного плевриту, набряку легень та венозної гіпертензії пов'язано із особливостями їх патогенезу: виникнення пов'язано з порушенням виведення рідини з організму у хворих з тХНН.

Вторинна венозна гіпертензія спостерігалась у 56,1 % хворих основної групи, причому на її тлі мали місце 100 % випадків набряку легень, 83,6 % випадків пневмонії і 76,3 % випадків загострень хронічного бронхіту. Таким чином, більшість випадків патології бронхолегеневої системи розви-

ження органів дихання спостерігаються рідше. Патогенез бронхолегеневої патології у пацієнтів з діабетом пов'язаний передусім з розвитком універсальної мікроангіопатії [4].

Аналіз захворювань дихальної системи у хворих, що отримували лікування у Донецькому трансплантаційному центрі ДОКТМО, дещо відрізняється від наведених даних (табл. 2).

Кількість випадків патології бронхолегеневої системи в групі хворих, де основним захворюванням, що призвело до розвитку тХНН, був цукровий діабет, є найбільша й

Таблиця 2. Розподіл патології дихальної системи у потенційних реципієнтів ниркового алотрансплантата f в залежності від основної патології

| Виявлена патологія | Гломерулонефрит (n=125) | | Цукровий діабет (n=38) | | Інші захворювання (n=10) | |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|--------------|------------------------|--------------|--------------------------|-----------|
| | абс. | % | абс. | % | абс. | % |
| Пневмонія | 15 | 12,0 | 3 | 7,8 | – | – |
| Гострий бронхіт або загострення хронічного бронхіту | 71 | 56,8 | 20 | 52,6 | 2 | 20 |
| Набряк легень | 8 | 6,4 | 3 | 7,8 | 0 | – |
| Ексудативний плеврит | 3 | 2,4 | 1 | 2,6 | 0 | – |
| Вторинна венозна гіпертензія | 65 | 52,0 | 29 | 76,3 | 3 | 30 |
| Всього | 162 | 129,6 | 56 | 147,3 | 5 | 50 |

Примітка. % — відсоток кожної патології бронхолегеневої системи в групах основного захворювання.

складає 147,3 %. Найменше випадків зареєстровано в групі пацієнтів з полікістозом нирок та пієлонефритом. Пневмонії зустрічаються частіше у хворих на гломеруло-нефрит, ніж на цукровий діабет, бронхіти реєструвалися приблизно однаково в групах хворих на діабет та гломеруло-нефрит і значно менше (приблизно у 2 рази) в групі з полікістозом та пієлонефритом, причому обидва випадки бронхіту в останній групі діагностовано у пацієнтів з пієлонефритом. Венозна гіпертензія, на тлі якої протікало більшість іншої патології дихальної системи, переважала в групі хворих на цукровий діабет, але й в інших групах виявлялася також часто.

Літературні дані [5, 6] свідчать про зростання кількості інфекційних захворювань нижніх дихальних шляхів у залежності від віку. Даний факт більшість пульмонологів пояснюють зниженням місцевого протиінфекційного захисту дихальних шляхів під впливом різних факторів навколишнього середовища (тютюновий дим, забруднення атмосфери відходами сучасного промислового виробництва, продуктів згоряння різних видів палива та ін.), які формують умови для інфікування бронхопупльмонального тракту.

Порівняльний аналіз захворюваності по віковим групам (табл. 3) показав, що має місце прямий сильний кореляційний зв'язок між зростанням віку та кількості виявлених випадків захворювань як в основній ($r=+0,721$), так і в контрольній ($r=+0,738$) групах. Отже, пацієнти з тХНН знаходяться під впливом як екзогенних, так і ендогенних патологічних чинників. Зазначені дані вказують на необхідність проведення заходів, спрямованих на ранню діагностику та профілактику, особливо у пацієнтів від 40 років і старше.

Таблиця 3. Випадки захворювань бронхолегеневої системи у пацієнтів різних вікових груп незалежно від діагнозу

| Вікова група | Основна група (n=173) | | Контрольна група (n=149) | |
|--------------|-----------------------|-------|--------------------------|------|
| | абс. | % | абс. | % |
| 21–30 років | 23 | 13,3 | 4 | 2,6 |
| 31–40 років | 48 | 27,7 | 10 | 6,7 |
| 41–50 років | 75 | 43,4 | 14 | 9,4 |
| 51–60 років | 77 | 44,5 | 20 | 13,5 |
| Всього | 223 | 128,9 | 48 | 32,2 |

Примітка. $p < 0,05$.

Програмний гемодіаліз зменшує накопичення потенційних уремічних токсинів у хворих із тХНН, нормалізує водно-електролітний баланс і кислотно-лужний стан. Однак зберігаються інші патологічні фактори: розвиток хронічної серцевої недостатності по лівошлуночковому типу на тлі ішемічної хвороби серця, артеріальної гіпертензії й уремічної кардіоміопатії, зниження функціональної активності клітинної і гуморальної ланок імунітету. Імунодепресія, асоційована з уремією, співіснує з фенотипічними і функціональними ознаками активації імунокомпетентних клітин, і ці зміни підсилюються в ході лікування програмним гемодіалізом. Перевантаження залізом підсилює ріст бактерій і вірулентність штамів, порушує клітинну імунну відповідь і в сполученні з поганим харчуванням можуть підсилити імунодефіцит пацієнтів, що одержують лікування програмним гемодіалізом. Біосумісність діалізних мембран, компоненти діалізатора і можливе забруднення ендотоксинами також можуть відігравати роль у розвитку імунних порушень у процесі діалізного лікування.

Нами було проаналізовано частоту випадків захворювань бронхолегеневої системи у хворих з різними термінами тривалості термінальної стадії ниркової недостатності (табл. 4).

Таблиця 4. Частота випадків захворювань бронхолегеневої системи у хворих з різними тХНН

| Тривалість тХНН | Кількість випадків патології бронхолегеневої системи | |
|-------------------------|------------------------------------------------------|------|
| | абс. | % |
| До 1 місяця | 67 | 30,0 |
| Від 1,1 міс до 0,5 року | 19 | 8,5 |
| Від 0,51 до 1 року | 26 | 11,7 |
| Від 1,1 до 5 років | 29 | 13,0 |
| Понад 5 років | 82 | 36,8 |
| Всього | 223 | 100 |

Більшість випадків захворювань бронхолегеневої системи припадає на групу пацієнтів, що знаходяться на лікуванні програмним гемодіалізом більше 5 років. Далі, з невеликим розривом, слідує група з тривалістю тХНН менше 1 місяця. Цей факт свідчить про різку декомпенсацію гомеостатичних показників у пацієнтів, які починають замісне гемодіалізне лікування або знаходяться на ньому тривалий час.

Найменша кількість випадків захворювань нижніх дихальних шляхів спостерігалась в групі з тривалістю тХНН від 1,1 місяця до 0,5 року з подальшим зростанням у залежності від терміну знаходження на лікуванні програмним гемодіалізом та листі очікування ниркового алотрансплантата. З наведених результатів маємо зробити висновок, що найбільш оптимальний період для виконання трансплантації нирки з огляду на функціональний стан бронхолегеневої системи є період від другого місяця до першого року замісного гемодіалізного лікування.

Висновки

1. Захворюваність нижніх дихальних шляхів у пацієнтів з тХНН є значно вищою, ніж у загальній популяції.
2. Серед захворювань бронхолегеневої системи, як і в загальній популяції, реєстру-

ються бронхіти, пневмонії; більш специфічною, з огляду на патогенез, патологією для хворих на тХНН є набряк легень, ексудативний плеврит, венозна гіпертензія в малому колі кровообігу.

3. Патологія дихальної системи частіше спостерігається в групі, де основним захворюванням, що призвело до тХНН, був цукровий діабет.

4. Більшість випадків патології бронхолегеневої системи розвиваються на тлі гіпергідратації та застою в малому колі кровообігу.

5. Як і в загальній популяції, у хворих на тХНН має місце зв'язок між зростанням кількості захворювань і зростанням віку.

6. Найбільш оптимальний період для виконання трансплантації нирки з огляду на функціональний стан бронхолегеневої системи є період від другого місяця до першого півроку замісного гемодіалізного лікування.

Список літератури

1. *Фещенко Ю. І.* Сучасні підходи до лікування хворих на пневмонію / Ю. І. Фещенко // Укр. хіміотерапевт. журн. — 1999. — № 1 (1). — С. 4–8.
2. *Юдина Л. В.* Анализ причин смертности от внебольничной пневмонии в г. Киеве / Л. В. Юдина, Н. И. Демин, Ю. В. Рачко // Здоровье Украины. — 2005. — № 110.
3. Неотложные состояния через призму клинко-анатомических разборов / А. Верткин, О. Зайратьянц, Е. Вовк [и др.] // Врач. — 2007. — № 11. — С. 18–22.
4. <http://www.medfarm.com.ua>.
5. *Трифонов Н. Ю.* Медико-социальные и психологические аспекты заболеваемости населения хроническим бронхитом в современных условиях / Н. Ю. Трифонова // Здравоохранение. — 2008. — № 11. — С. 17–19.
6. *Синопальников А. И.* Внебольничные инфекции нижних дыхательных путей: диагностика, дифференциальная диагностика, антибактериальная терапия / А. И. Синопальников // Российские медицинские вести. — 2004. — Т. 9, № 4. — С. 44.

Е.В. Онищенко, В.В. Захаров

АНАЛИЗ ПАТОЛОГИИ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

Проведен анализ патологии нижних дыхательных путей у потенциальных реципиентов почечного аллотрансплантата. Выявлено, что заболеваемость в основной группе значительно выше, чем в общей популяции. Большинство случаев патологии бронхолегочной системы развиваются на фоне гипергидратации и застоя в малом круге кровообращения. Наиболее оптимальным для выполнения трансплантации почки, исходя из функционального состояния бронхолегочной системы, является период от второго месяца до первого полугодия заместительного гемодиализного лечения.

Ключевые слова: потенциальные реципиенты почечного трансплантата, заболевания нижних дыхательных путей.

E.V. Onishchenko, V.V. Zakharov

THE ANALYSIS OF A PATHOLOGY OF LOWER RESPIRATORY TRACT FOR THE POTENTIAL RECIPIENTS OF A RENAL ALLOTRANSPLANT

The analysis of a pathology of lower respiratory paths for the potential recipients of a renal allotransplant is spent. Is detected, that the case rate in a basic group is much higher, than in a common population. Most cases of a pathology of the bronchopulmonary systems develop on a background of an overhydration and stagnation in a small circle of a circulation. Optimal the period for execution of a transplantation of a kidney, outgoing from a function state of the bronchopulmonary systems, is period from the second month up to the first half-favour of the chronic hemodialysis treatment.

Key words: potential recipients of a renal allotransplant, pathology of lower respiratory tract.

УДК 612.35.014-053.1.083.324.084

*М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко,
Ю.А. Гаевская, А.Ю. Димитров, П.А. Борисов, О.В. Челомбитько*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ИММУНОКОРРЕКЦИИ СОСТОЯНИЯ РЕЦИПИЕНТОВ С РТПХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Проведена сравнительная оценка иммунокорригирующей активности криоконсервированных и нативных клеток фетальной печени (КФП) разных сроков гестации в экспериментальной модели локальной РТПХ (лРТПХ). Индукцию лРТПХ проводили на мышах линии С57В1/6 путем подкожного введения в подушечку задней лапы клеток лимфоузлов (ЛУ) линии СВА/Н. Через 1 сутки после инициации лРТПХ мышам внутривенно вводили нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП 14 или 18 суток гестации мышей линии СВА/Н. На 5-е сутки после инициации патологии оценивали следующие показатели: индекс РТПХ, содержание Treg (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺-клеток) лимфоузлов (ЛУ) на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, США), экспрессию гена *tgf-β* — методом ПЦР; содержание ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α в сыворотке крови животных — иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (США). Установлено, что при индукции лРТПХ манифестируются признаки, характерные для патологий аутоиммунного генеза. В условиях развития лРТПХ КФП минимизируют клинические признаки патологии и интенсивность развития иммуновоспалительной реакции. Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с содержанием в ЛУ FOXP3⁺-клеток и экспрессией гена *tgf-β*, но не с содержанием CD4⁺CD25⁺-клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14 до 18 пкд иммунокорригирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорригирующую активность нКФП-14.

Ключевые слова: РТПХ, клетки фетальной печени, иммунокоррекция, Treg.

Одной из серьезных проблем, связанных с трансплантацией аллогенного костного мозга (КМ), является развитие иммунного конфликта в виде болезни «трансплантат против хозяина» (БТПХ) [1]. Данная патология имеет ряд признаков аутоиммунного заболевания (АИЗ) и ассоциируется с появлением в организме аутореактивного клона иммунокомпетентных клеток (ИКК) [2]. Экспериментальным аналогом данного системного АИЗ является локальная РТПХ (лРТПХ), которую индуцируют введением аллогенных лимфоидных клеток в регионарном к месту их введения лимфоузле [3].

Одной из основных причин развития АИЗ является разбалансировка состояния субпопуляций ИКК с регуляторной активностью [4]. Факт причастности к развитию АИЗ нарушения гомеостаза [2] определил необходимость применения при их лечении

препаратов, обладающих способностью комплексно корригировать состояние гемopoэтической и иммунной систем [2]. Коррекция иммунокомпетентной сферы при аутоиммунной агрессии предусматривает необходимость подавления эффекторного и/или активации регуляторного звена ИКК с супрессорной активностью. Неоднократно отмечалась уникальная способность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оказывать гемато- и иммунокорригирующий эффект [5]. Потенциально гемато- и иммунокорригирующей активностью и, соответственно, возможностью применения для лечения РТПХ обладает фетальная печень (ФП), в которой СКК и МСК являются основными структурно-функциональными единицами [2].

Неоднократно отмечалось, что в общем технологическом процессе аппликации фета-

© М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава и др., 2011

льных тканей в клинической практике обязательным компонентом является их криоконсервирование [6]. При этом известно, что эффективность криоконсервирования биообъекта определяется его исходным структурно-функциональным состоянием [7], т. е. КФП разных сроков гестации, априори имея разный исходный статус и различную криочувствительность, по-разному могут изменять свой терапевтический потенциал.

Целью исследования была оценка особенностей модуляции субпопуляций регуляторных Т-клеток и в целом иммунокомпетентной сферы животных с ЛРТПХ после применения нативных и криоконсервированных КФП разных сроков гестации.

Материал и методы. Эксперименты проводили на мышах линий С57В1/6, СВА/Н 3-месячного возраста массой 22–24 г в соответствии с Международными принципами «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

КФП 14 (КФП-14) и 18 (КФП-18) суток гестации выделяли на рабочей среде 199 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой и 2 % цитратом натрия и криоконсервировали по [6]. Клетки лимфоузлов выделяли путем их гомогенизации на той же среде.

Локальную РТПХ (ЛРТПХ) индуцировали у мышей линий С57В1/6 по общепринятой методике [3]. Контрольным мышам вводили физиологический раствор. Индекс РТПХ определяли на 5-е сутки после инициации патологии [3] по отношению количества клеток в опытном лимфоузле к контрольному.

Нативные (нКФП) или криоконсервированные (кКФП) КФП разных сроков гестации (КФП-14 или КФП-18) мышам линии СВА/Н

вводили внутривенно в дозе $5 \cdot 10^6$ кл./мышь через 1 сутки после инициации ЛРТПХ.

Фенотипические характеристики клеток лимфоузлов определяли на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) с использованием моноклональных антител (BD Bioscience, USA) к FOXP3, CD4, CD25 структурам согласно инструкции фирмы-производителя. Помимо процентного содержания FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺-клеток оценивали степень экспрессии этих молекул по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

Экспрессию гена *tgf-β* определяли методом ОТ-ПЦР. Амплификацию фрагментов ДНК проводили в термостате «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-технология» (Россия). Последующие этапы реакции выполняли согласно общепринятым рекомендациям [8]. Детекцию продуктов амплификации и количественный анализ проводили методом капиллярного электрофореза в чип-анализаторе «Agilent 2100» (США).

Содержание цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-10, ФНО-α — в сыворотке крови животных с ЛРТПХ определяли иммуноферментным методом на анализаторе Stat Fax 2100 (USA) с помощью наборов реагентов фирмы BD Pharmingen по прилагаемым протоколам.

Полученные данные статистически обрабатывали по методу Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Известно, что в экспериментальной модели ЛРТПХ манифестируемая ответная реакция лимфоузлов на введение аллогенных лимфоцитов является обоюдно направленной реакцией донорских и клеток реципиента. Установленное нами двукратное увеличение индекса РТПХ в сравнении с контролем является четким свидетельством развития этой реакции [1]. Как видно (таблица), в условиях развития ЛРТПХ более чем в 3 раза снижа-

Сравнительная оценка показателей, характеризующих развитие ЛРТПХ

| Группа животных | Индекс РТПХ | FOXP3 ⁺ -клетки | | CD4 ⁺ CD25 ⁺ |
|--------------------|-------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| | | % | СИФ | % |
| Контроль (интакт.) | 1,00±0,10 | 2,16±0,32 | 3774,12±247,70 | 2,61±0,23 |
| ЛРТПХ | 2,04±0,30* | 0,65±0,04* | 1790,32±148,50* | 1,47±0,17* |
| ЛРТПХ + нКФП-14 | 1,01±0,30 [#] | 2,11±0,05 [#] | 1809,31±199,40* | 1,12±0,15* |
| ЛРТПХ + нКФП-18 | 1,16±0,02* [#] | 1,12±0,02* [#] | 2505,02±239,40* [#] | 1,82±0,09* [#] |
| ЛРТПХ + кКФП-14 | 1,30±0,12* [#] | 1,53±0,15* [#] | 1410,53±109,40* [#] | 4,34±0,27* [#] |
| ЛРТПХ + кКФП-18 | 0,86±0,11 [#] | 1,94±0,04 [#] | 1180,00±134,90* [#] | 4,12±0,21* [#] |

Примечания: 1. СИФ — средняя интенсивность флуоресценции.

2. p<0,05; достоверно при сравнении с показателем: * контроля; [#] группы ЛРТПХ.

лась концентрация FOXP3⁺-клеток, которые характеризуются как Treg [4]. Оценка СИФ FOXP3⁺-клеток продемонстрировала снижение содержания в них FoxP3 белка, концентрация которого коррелирует с активностью FOXP3⁺-клеток [4].

На протяжении длительного времени дискутируется вопрос по поводу идентичности пула FOXP3⁺ и CD4⁺CD25⁺-клеток, проявления их иммуносупрессивной активности и соподчиненности понятию Т-регуляторные (Treg) клетки [4]. Как видно, в контроле показатели процентного содержания этих субпопуляций в лимфоузлах были достаточно близки. Вместе с тем оценка СИФ по маркеру CD25, имеющему приоритетную значимость для включения этих клеток в категорию Treg, показала, что она в 3 раза уступала СИФ FOXP3⁺-клеток. При этом при ЛРТПХ данные показатели снижались в 1,6 и 2,1 раза для CD4⁺CD25⁺ и FOXP3⁺-клеток соответственно.

Известно, что в реализации супрессорной функции Treg активное участие принимает трансформирующий ростовой фактор-β (TGF-β) [9]. Этот медиатор индуцирует экспрессию рецептора ИЛ-2 (CD25) и гена белка FoxP3 в CD4⁺CD25⁻-Т-хелперах, переводя их в категорию Treg. Полученные нами результаты показали снижение в условиях развития ЛРТПХ степени экспрессии гена *tgf-β* в клетках лимфоузлов в 2,5 раза в сравнении с контролем.

Как и для многих АИЗ, в том числе и системных [10], при ЛРТПХ было отмечено перераспределение цитокинового профиля организма (таблица). Так, повышался уровень воспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-2 и снижался противовоспалительного ИЛ-10.

КФП как препарат лечения ЛРТПХ оказывали выраженный корригирующий

эффект в отношении всех исследуемых показателей. Индекс РТПХ в наибольшей степени приближался к уровню контроля у животных после применения нКФП-14 и кКФП-18. Интересно, что до криоконсервирования КФП-18 проявляли более низкий корригирующий эффект, тогда как КФП-14 после криоконсервирования теряли его.

Максимальная коррекция процентного содержания FOXP3⁺-клеток наблюдалась также после введения нКФП-14 и кКФП-18. Обращает на себя внимание тот факт, что после применения кКФП-18 СИФ в FOXP3⁺-клетках была почти в 1,5 раза ниже, чем после введения нКФП-14. Бесспорно, что кКФП-18 активируют формирование Treg, которые идентифицируются цитофлуориметрически как FOXP3⁺-клетки, но с более низкой концентрацией скурфина [4]. Корригирующий эффект нКФП-18 был минимальным, судя по процентному содержанию FOXP3⁺-клеток, однако по СИФ он имел максимальную выраженность.

Иная картина наблюдалась при анализе содержания CD4⁺CD25⁺-Т-лимфоцитов. Известно, что эти клетки предупреждают развитие заболеваний аутоиммунного генеза, в системе *in vitro* ингибируют эффекторные клетки, проявляют ряд других иммуносупрессивных эффектов. Однако в условиях развития ЛРТПХ и применения КФП их поведение существенно отличалось от FOXP3⁺-клеток. Во-первых, не было обнаружено, как для FOXP3⁺-клеток, «синхронизированного» проявления корригирующего эффекта нКФП-14 и кКФП-18. Во-вторых, была очевидной превалирующая «индуцибельность» в отношении повышения концентрации CD4⁺CD25⁺-клеток после применения криоконсервированных КФП. Такого рода феноменология могла быть обусловлена имеющимися в некоторых случаях место измене-

до и после применения КФП разного вида и срока гестации

| -клетки СИФ | Уровень экспрессии гена <i>tgf-β</i> , % от контр | Уровень цитокинов, % от контроля | | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | ИЛ-2 | ФНО-α | ИЛ-10 |
| 1232,21±58,24 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 755,80±72,35* | 39,24±0,37* | 140,00±1,80* | 130,00±2,13* | 86,91±0,90* |
| 1643,95±84,52* [#] | 82,35±0,72* [#] | 112,20±4,77 | 101,85±3,41 [#] | 96,60±2,70 [#] |
| 410,00±36,13* [#] | 58,35±1,76* [#] | 120,00±2,16* | 114,35±1,74* [#] | 124,84±3,90* [#] |
| 977,07±84,62* | 55,05±0,98* [#] | 109,90±3,68 [#] | 137,00±2,08* | 94,35±2,45 [#] |
| 783,43±63,32* | 80,00±3,57* [#] | 120,00±2,72* [#] | 110,37±5,21 [#] | 95,00±3,34 [#] |

ниями после криоконсервирования иммуногенных характеристик аллогенного материала [2] и возможной активации субпопуляций клеток реципиента с низким профилем экспрессии рецептора ИЛ-2 ($CD4^+CD25^{low}$), которые функционально не являются Treg [4]. Однако СИФ этих клеток по CD25 маркеру в группах животных с введением криоконсервированных КФП не существенно отличался от его уровня у контрольных мышей. Как приведено в [4], формирование $CD4^+CD25^+$ -клеток в периферическом отделе ИС может реализоваться путем «перидифференцировки» $CD4^+CD25^-$ -клеток в Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. В таком случае потенциал индукции экспрессии маркера ИЛ-2 у КФП (вне зависимости от срока гестации) после криоконсервирования становится более выраженным.

Степень экспрессии гена $tgf-\beta$ после введения КФП в большей мере коррелировала с характером восстановления содержания $FOXP3^+$ Treg. Как известно, TGF- β играет важную роль в развитии и реализации супрессивной функции Treg в периферическом компартменте ИС [9] и представляет собой один из основных триггеров экспрессии ИЛ-2R. Особую значимость при этом играют элементы стволового компартмента стромы, прежде всего упоминавшиеся выше МСК [5]. Важным компонентом иммуномодулирующей активности МСК является вырабатываемый ими уникальный по своему потенциалу фермент индоламин 2,3-диоксигеназа (ИДО), которому принадлежит ключевая роль в активации супрессорного звена ИС [11]. Недавно нами была подтверждена активация гена ИДО в кКФП-18

[12]. Эти данные также говорят о том, что криоконсервирование в одном и том же режиме в зависимости от срока гестации КФП может индуцировать либо экспрессию новых, либо ингибировать действие уже имеющихся активных начал, точкой приложения которых могут быть сигнальные пути наработки FoxP3 белка и/или ИЛ-2R.

Не удивительно, что модификация состояния субпопуляций регуляторных клеток после применения КФП находит отражение и в изменении цитокинового профиля организма in general.

Максимально выраженный эффект коррекции оцененных показателей наблюдается после применения нКФП-14 и кКФП-18.

Выводы

При индукции ЛРТПХ манифестируются признаки, характерные для патологий аутоиммунного генеза. Очевидно, что лечебный эффект КФП, сопровождающийся минимизацией клинических признаков данной патологии и интенсивности развития иммуновоспалительной реакции, реализуется через коррекцию состояния субпопуляций ИКК с регуляторной активностью (Treg). Терапевтическая активность КФП в большей степени коррелировала с восстановлением количественного содержания в лимфоузлах $FOXP3^+$ -клеток и экспрессией гена $tgf-\beta$, но не с содержанием $CD4^+CD25^+$ -клеток и степенью их флуоресценции. По мере увеличения срока гестации с 14-х по 18-е сутки иммунокорректирующая активность КФП снижалась. Однако после криоконсервирования КФП-18 приобретали иммунокорректирующую активность нКФП-14.

Список литературы

1. Шевелев А. С. Реакция «трансплантат против хозяина» и трансплантационная болезнь / А. С. Шевелев. — М. : Медицина, 1976. — 237 с.
2. Грищенко В. И. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения / В. И. Грищенко, А. Н. Гольцев // Пробл. криобиологии. — 2002. — Т. 1. — С. 54–84.
3. Кудрина Г. П. Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств / Г. П. Кудрина, Р. Ф. Алтынбаева, Ю. В. Буров. — М. : Медицина, 1992. — 39 с.
4. Ярилин А. А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 / А. А. Ярилин // Иммунология. — 2006. — № 3. — С. 176–188.
5. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals / F. Djouad, P. Plence, C. Vony [et al.] // Blood. — 2003. — V. 102. — P. 3837–3844.
6. Особенности влияния криоконсервирования на функциональный потенциал стволовых кроветворных клеток фетальной печени разных сроков гестации / А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Л. В. Останкова [и др.] // Пробл. криобиологии. — 2009. — Т. 19 (2). — С. 186–199.
7. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products / A. N. Goltsev, V. I. Grischenko, M. A. Sirous [et al.] // Biopreservation and biobanking. — 2009. — V. 7 (1). — P. 29–38.

8. Молекулярная клиническая диагностика / под. ред. С. Херрингтон, Дж. Макги. — М. : Мир, 1999. — 558 с.

9. Transforming growth factor producing FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells by iris pigment epithelial cells display regulatory phenotype and acquire regulatory functions / S. Sugita, Y. Futagami, S. Hori, M. Mochizuki // *Exp. Eye Res.* — 2007. — V. 85 (5). — P. 626–636.

10. Sakaguchi S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases / S. Sakaguchi // *Curr. Opin. Immunol.* — 2000. — V. 12. — P. 684–690.

11. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy / A. L. Mellor, Ph. Chandler, G. K. Lee [et al.] // *J. Reproductive Immunol.* — 2002. — V. 57. — P. 143–150.

12. Кріоконсервирование как фактор модуляції гемо- и иммунокорректирующей активности клеток фетальной печени разных сроков гестации / А. Н. Гольцев, Т. Г. Дубрава, Е. Д. Луценко [и др.] // *Імунологія та алергологія.* — 2011. — Т. 1. — С. 64.

М.В. Останков, А.М. Гольцев, Т.Г. Дубрава, О.Д. Луценко, Ю.О. Гаєвська, О.Ю. Димитров, П.О. Борисов, О.В. Челомбітько

ЗАСТОСУВАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ДЛЯ ІМУНОКОРЕКЦІЇ СТАНУ РЕЦІПІЄНТІВ З РТПХ У ЕКСПЕРИМЕНТІ

Проведена порівняльна оцінка імунотропічної активності кріоконсервованих і нативних клітин фетальної печінки (КФП) різних термінів гестації в експериментальній моделі локальної РТПХ (лРТПХ). Індукцію лРТПХ проводили на мишах лінії С57В1/6 шляхом підшкірного введення в подушечку задньої лапи клітин лимфовузлів (ЛВ) лінії СВА/Н. Через 1 добу після ініціації лРТПХ мишам внутрішньовенно вводили нативні (нКФП) або кріоконсервовані (кКФП) КФП 14 або 18 днів гестації мишей лінії СВА/Н. На 5-ту добу після ініціації патології оцінювали такі показники: індекс РТПХ, вміст Treg (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺-клітин) лимфовузлів (ЛВ) на проточному цитофлуориметрі FACS Calibur (Becton Dickinson, США), експресію гена *tgf-β* — методом ПЛР; вміст ІЛ-2, ІЛ-10, ФНО-α у сироватці крові тварин — імуноферментним методом на аналізаторі Stat Fax 2100 (США). Встановлено, що при індукції лРТПХ маніфестуються ознаки, характерні для патологій аутоімунного генезу. В умовах розвитку лРТПХ, КФП мінімізують клінічні ознаки патології та інтенсивність розвитку імунотропічної реакції. Терапевтична активність КФП більшою мірою корелювала з вмістом у ЛВ FOXP3⁺-клітин і експресією гена *tgf-β*, але не з вмістом CD4⁺CD25⁺-клітин і ступенем їхньої флуоресценції. При збільшенні терміну гестації з 14 до 18 пкд імунотропічна активність КФП знижувалася. Однак після кріоконсервування КФП-18 здобували імунотропічну активність нКФП-14.

Ключові слова: РТПХ, клітини фетальної печінки, імунотропіція, Treg.

М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Лутсенко, Ю.А. Гаєвська, А.Ю. Димитров, П.А. Борисов, О.В. Челомбітько

APPLICATION OF FETAL LIVER CRYOPRESERVED CELLS TO IMMUNOLOGICALLY CORRECT STATE OF RECIPIENTS WITH GVHD IN EXPERIMENT

There has been estimated an immune correcting activity of cryopreserved and native fetal liver cells (FLCs) of different gestation terms in experimental model of local GVHR (IGVHR). IGVHR was induced in C57Bl/6 mice by means of subcutaneous introduction of CBA/H lymph nodes (LN) cells into the hindpaw pad. In 24 hrs after initiation of IGVHR the mice were intravenously injected with either native (nFLCs) or cryopreserved FLCs (cFLCs) of the 14th and 18th gestation days of CBA/H mice. To the 5th day after initiation of pathology the following indices were estimated: GVHR index, content of Treg (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺ cells) of LNs with flow cytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, USA), the expression of *tgf-β* gene by means of PCR; content of IL-2, IL-10, TNF-β in blood serum of animals by means of immune enzyme method with analyzer Stat Fax 2100 (USA). It has been established, that during induction of IGVHR there are manifested the signs characteristics for the pathologies of immune genesis. Under development of GCH, FLCs minimize clinical signs of pathologies and intensity of development of immune inflammatory reaction. Therapeutic activity of FLCs in greater extent correlated to the content in LNs of FOXP3⁺ cells and expression of *tgf-β* gene, but not to the content of CD4⁺CD25⁺ cells and rate of their fluorescence. With the increasing of gestation terms from 14 post-coital days to 18 ones immune correcting activity of FLCs reduced. However after cryopreservation the FLCs-18 gained immune correcting activity of nFLC-14.

Key words: GVHR, fetal liver cells, immune correction, Treg.

УДК 617.713-089.843-092.9

*Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Е. Думброва, Н.Ф. Леус,
Б.М. Коган, Н.И. Молчанюк, И.О. Насинник*

*ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова
НАМН Украины», г. Одесса*

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ И УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РОГОВИЦ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ИНТРАЛАМЕЛЛЯРНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ БЕСКЛЕТОЧНОГО МОДУЛЯ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ ЧЕЛОВЕКА

Исследована реакция роговиц кроликов на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по разработанной методике. Через 2,5 месяца воспалительная реакция отсутствовала, признаков отторжения трансплантата не было. Гистоархитектоника роговицы реципиента и ламеллярная структура трансплантата были сохранены.

Ключевые слова: бесклеточная строма роговицы, кератопластика.

Поражение роговицы вследствие заболеваний, травм и их последствий часто приводит к снижению зрения и слепоте. Более 10 млн людей в мире страдают слепотой из-за патологии роговицы, но только 120 000 ее пересадок выполняется ежегодно [1]. До сих пор наиболее распространенным методом лечения в клинике глазных болезней является пересадка нативной донорской роговой оболочки.

Существует растущая потребность в материале для трансплантации, что связано с острой нехваткой подходящей донорской ткани во многих странах из-за демографических проблем, увеличения случаев инфекционных заболеваний (ВИЧ, гепатиты, HTLV), более широкого использования рефракционной лазерной хирургии [2]. Наконец, этот дефицит усугубляется несовершенством законодательства и религиозными факторами.

Указанные проблемы пересадок нативной роговицы, а также технические трудности, возникающие при заборе роговичного материала, побуждают к поиску новых путей обеспечения материала для реконструктивных операций роговой оболочки.

Исследования в области тканевой инженерии роговичных эквивалентов привели к значительному прогрессу на протяжении последних нескольких лет. Так удалось получить такие эквиваленты с использованием природных или синтетических поли-

меров, сходных по своим свойствам и толщине с нативной роговицей [3, 4].

Альтернативным путем получения материала для кератопластики является удаление клеток и молекул антигенов из ткани роговицы в целях уменьшения иммунной реакции и получения остова роговицы. В последнее время получение остова на основе нативной ткани стало более привлекательным, поскольку бесклеточный матрикс имеет ту же структуру и состав, что и нативная ткань. Несколько групп исследователей получили бесклеточную строму роговицы с использованием неионных «моющих средств» и ферментов. Они сообщили, что отмытая строма роговицы сохраняет такую же структуру, как и нативная роговица [5, 6]. Однако «моющие средства», как правило, оказывают цитотоксический эффект и должны быть тщательно удалены из получаемого объекта. Возможен и другой путь, а именно: получение бесклеточной ткани при использовании высокого гидростатического давления, но без «моющих средств» [7].

Однако на сегодняшний день все полученные материалы еще не обладают необходимыми свойствами, предъявляемыми к роговичным имплантам [3], поэтому необходимы дальнейшие разработки.

Цель — изучение гистологических и ультраструктурных изменений роговицы кролика после интраламеллярной имплан-

© Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Е. Думброва и др., 2011

тации бесклеточного модуля стромы роговицы человека (БМСРЧ).

Материал и методы. Участки роговой оболочки, полученные из энуклеированных глаз человека, обрабатывали по предложенной нами методике (патент Украины № 44128). Согласно этой методике они помещались в среду для культивирования ткани, а затем последовательно обрабатывались ферментами (трипсин, фосфолипаза, гиалуронидаза) и детергентами (Тритон X-100), что приводило к удалению и вымыванию клеточных и неклеточных элементов роговицы, отщеплению концевых пептидных участков коллагеновых молекул, обуславливающих их антигенные свойства.

Экспериментальное исследование выполнено на 14 кроликах (28 глаз) породы шиншилла массой 2,5–3 кг. Под общей анестезией с использованием тиопентала натрия 1 г/кг массы в условиях операционной на обоих глазах животных производилась интраламеллярная имплантация БМСРЧ. В 1 мм от лимба скребцом производили насечку на роговице. Карман в строме роговицы выполняли тупым способом и расширяли до необходимых размеров при помощи шпателя. Затем в него имплантировали участок БМСРЧ диаметром 6 мм. После вмешательства проводили стандартную противовоспалительную и антимикробную терапию. Животных осматривали 4 раза в неделю с последующей фоторегистрацией. Офтальмоскопически оценивали состояние роговицы и имплантированного БМСРЧ. Срок наблюдения — 2,5 месяца.

Хирургическое вмешательство и выведение животных из эксперимента выполнено с соблюдением «Правил обращения с лабораторными животными», в частности: с выполнением болезненных процедур под наркозом.

Для световой микроскопии энуклеированные глаза кроликов подвергали гистологической обработке по общепринятой методике с окраской срезов гематоксилин-эозином.

Обработку образцов для ультраструктурного исследования проводили по стандартной методике, применяемой в электронной микроскопии.

Результаты и их обсуждение. После обработки роговиц энуклеированных глаз человека по нашей методике (для получения бесклеточного модуля стромы роговицы человека) наблюдался отек стромы роговичных имплантов и незначительное их помутнение (рис. 1).

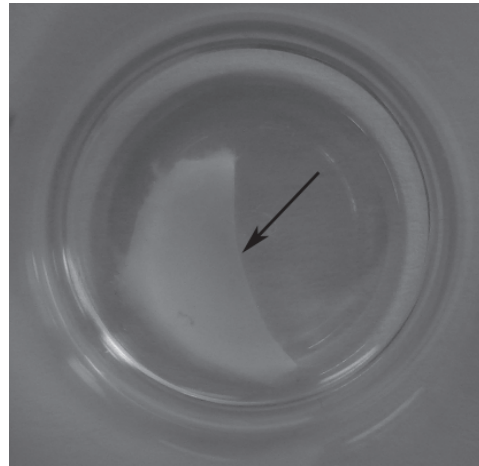


Рис. 1. Бесклеточный модуль стромы роговицы человека перед имплантацией

На следующий день после интраламеллярной имплантации на обоих глазах у всех животных наблюдалась смешанная гиперемия конъюнктивы, наличие скудного слизистого отделяемого, отек стромы роговицы, при этом отмечалось сохранение помутнения трансплантатов. Спустя 6 суток после операции при осмотре животных признаков воспалительной реакции не наблюдалось, отек роговицы отсутствовал, трансплантаты частично просветлели. У 1 кролика на обоих глазах отмечалась выраженная воспалительная реакция на протяжении 7 дней, что привело к развитию неоваскуляризации роговицы и образованию бельма.

На протяжении 2,5 месяца после имплантации у 13 кроликов (26 глаз) глаза были спокойны, признаков воспаления не наблюдалось. Отмечалось просветление трансплантатов (рис. 2).

При гистологическом исследовании микропрепаратов отмечается отсутствие

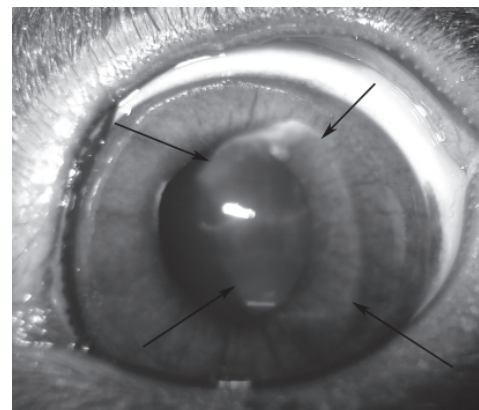


Рис. 2. Глаз кролика через 2,5 месяца после имплантации БМСРЧ. Границы трансплантата отмечены стрелками

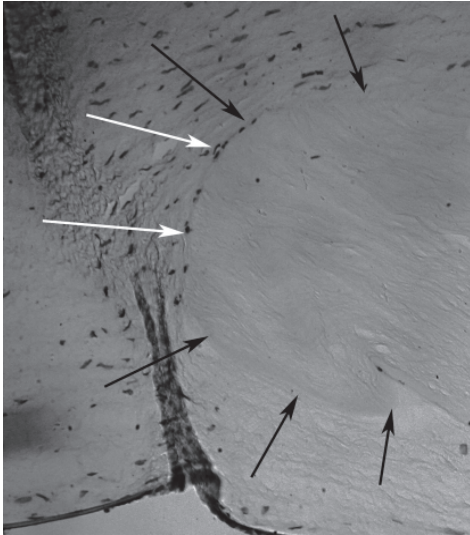


Рис. 3. Роговица кролика через 2,5 месяца после имплантации БМСРЧ. В БМСРЧ клеточные элементы отсутствуют, сохраняется структура коллагеновых пластин, нет признаков воспаления и отека (границы трансплантата отмечены черными стрелками). В месте контакта края трансплантата и роговицы реципиента скопление кератоцитов (отмечено белой стрелкой)

воспалительной реакции в трансплантате и роговой оболочке реципиента. В БМСРЧ сохранена структура коллагеновых пластин, нет признаков отека, клеточные элементы отсутствуют. Воспалительная реакция в трансплантате и роговой оболочке реципиента отсутствует. Определяется незначительная гомогенизация коллагеновых пластин и уменьшение количества кератоцитов в роговице реципиента, однако сохраняется ее структура. По краю трансплантата в месте контакта края БМСРЧ и роговицы реципиента определяется скопление кератоцитов с признаками проникновения их в строму трансплантата (рис. 3).

Список литературы

1. *Whitcher J. P.* Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Bull World Health Organ.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
2. Eye Bank Association of America. 1999 EBAA statistical report. — Washington, DC : Eye Bank Association of America, 1999.
3. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2006. — V. 47. — P. 1869–1875.
4. *Nishida K.* Tissue engineering of the cornea / K. Nishida // *Cornea.* — 2003. — V. 22. — P. 28–34.
5. Decellularization of bovine cornea for tissue engineering applications / S. P. Marquez, V. S. Martirnez, W. M. Ambrose [et al.] // *Acta Biomaterialia.* — 2009. — V. 5. — P. 1839–1847.
6. The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold / Z. Wu, Y. Zhou, N. Li [et al.] // *Biomaterials.* — 2009. — V. 30. — P. 3513–3522.
7. *Hashimoto Y.* Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering / Y. Hashimoto, S. Funamoto, S. Sasaki [et al.] // *Biomaterials.* — 2010. — V. 31. — P. 3941–3948.

При ультраструктурном исследовании в бесклеточном модуле стромы роговицы человека отмечается отсутствие клеточных элементов, незначительное рассоединение коллагеновых волокон с сохранением ламеллярной структуры стромы роговицы (рис. 4).

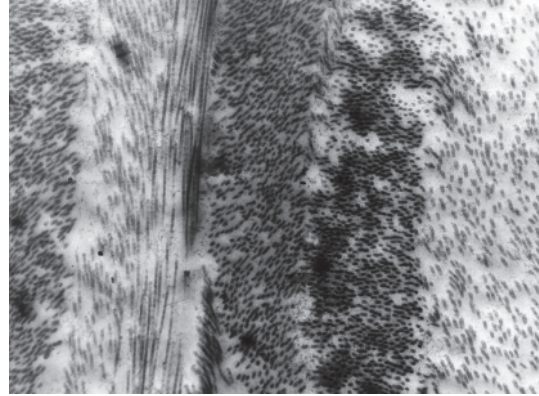


Рис. 4. Ультраструктура бесклеточного модуля стромы роговицы человека через 2,5 месяца после интраламеллярной имплантации в роговицу кролика. Электронная микроскопия, $\times 15\,000$

Таким образом, после интраламеллярной имплантации в роговицу кролика бесклеточного модуля стромы роговицы человека, полученного по нашей методике, у 13 кроликов (26 глаз) через 2,5 месяца отсутствовала воспалительная реакция, признаков отторжения трансплантата не наблюдалось. При этом сохранялась гистоархитектоника роговицы реципиента и ламеллярная структура трансплантата. На основании полученных результатов можно предположить возможность применения бесклеточного модуля стромы роговицы человека в качестве материала для послойной кератопластики.

Н.В. Пасечнікова, В.В. Віт, Н.Ф. Леус, Б.М. Коган, І.О. Насінник

ГІСТОЛОГІЧНЕ Й УЛЬТРАСТРУКТУРНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РОГІВОК КРОЛИКІВ ПІСЛЯ ІНТРАЛАМЕЛЯРНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ БЕЗКЛІТИННОГО МОДУЛЯ СТРОМИ РОГІВКИ ЛЮДИНИ

Досліджена реакція рогівок кроликів на інтраламелярну імплантацію безклітинного модуля строми рогівки людини, отриманого за розробленою методикою. Через 2,5 місяця була відсутня запальна реакція, ознак відторгнення трансплантата не було. При цьому гістоархітектоніка рогівки реципієнта та ламелярна структура імплантата були збережені.

Ключові слова: безклітинна строма рогівки, кератопластика.

N.V. Pasyechnikova, V.V. Vit, N.F. Leus, B.M. Kogan, I.O. Nasinnik

HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE RABBITS CORNEA AFTER INTRALAMELLAR TRANSPLANTATION OF ACELLULAR STROMA OF THE HUMAN CORNEA

The reaction of the rabbit cornea after interlamellar transplantation of acellular stroma of the human cornea was studied. At the end of the observation the inflammatory reaction was absent. There were no signs of transplant rejection. In addition the histoarchitectonics of recipient cornea and implant lamellar structure is preserved.

Key words: acellular stroma of the cornea, keratoplasty.

УДК 617.7

*Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус, С.А. Якименко,
А.И. Бузник, С.Г. Коломийчук, И.О. Насинник*

*ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова
НАМН Украины», г. Одесса*

ПРИМЕНЕНИЕ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА В КАЧЕСТВЕ РОГОВИЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Коллагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) был синтезирован путем «поперечной сшивки» свиного коллагена I типа 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом. Получен гидрогель, по оптическим и механическим свойствам схожий с человеческой роговицей. После интраламеллярной имплантации КАСР в роговицу кролика (8 кроликов — 8 глаз) имплант сохранял прозрачность в сроки наблюдений до 12 мес, незначительные помутнения поверхностных слоев роговицы наблюдались на 2 из 8 глаз. Гистологические исследования выявили структурную сохранность импланта и отсутствие воспалительной реакции. Полученные данные свидетельствуют о том, что КАСР в перспективе могут быть использованы в качестве материала для кератопластики.

Ключевые слова: роговица, имплантация, кератопластика.

Свыше 10 млн человек в мире страдают от слепоты, связанной с помутнением роговицы. Основным методом лечения роговичной слепоты остается пересадка донорской роговицы [1]. В большинстве стран потребность в донорской роговице в разы превышает ее наличие. В связи с этим все большую актуальность приобретает поиск альтернативных материалов для кератопластики.

В настоящее время в качестве аналогов донорской роговицы наиболее широко применяются амниотическая оболочка [2] и кератопротезы [3]. Однако амниотическая оболочка может использоваться только для лечебных покрытий язв роговицы различной этиологии, ее применение при более тяжелых деструктивных процессах роговицы ограничено. Кератопротезы используются для восстановления зрения при осложненных бельмах роговицы и несмотря на успехи, достигнутые в этой области в последние десятилетия, имеют определенные показания для применения.

В работах ряда авторов [4–6] была показана возможность получения гидрогелевого импланта на основе коллагена I или III типов, который по оптическим, химическим и физическим свойствам был схож с человеческой роговицей и при пересадке в рогови-

цу экспериментальных животных (мышей, кролей, свиней), а также в роговицу человека не вызывал аллергических реакций, в большинстве случаев сохранял прозрачность и прорастал нервами из роговицы реципиента.

Цель — синтезировать аналог стромы донорской роговицы, изучить его свойства *in vitro* и оценить переносимость *in vivo*.

Материал и методы. Работа была одобрена биоэтическим комитетом ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины». Коллагеновый аналог стромы роговицы (КАСР) был получен путем «поперечной сшивки» свиного коллагена I типа (ателоколлаген) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимидом и N-гидроксисукцинимидом.

Рефракционные свойства полученного КАСР *in vitro* оценивали на рефрактометре Abbe. Механические свойства КАСР оценивали по переносимости наложения на него 12 узловых швов, как при пересадке человеческой роговицы.

Переносимость КАСР *in vivo*. После интраламеллярной имплантации гидрогелевых дисков диаметром 6 мм в роговицу кролика (8 кроликов — 8 глаз) оценивали состояние роговицы и КАСР в месте имплан-

© Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус и др., 2011

тации (шкала В.В. Войно-Ясенецкого), васкуляризация роговицы (шкала В.М. Непомнящей). Срок наблюдения — 12 мес. Световая микроскопия роговиц кролей после окраски гематоксилин-эозином проведена через 12 мес после имплантации.

Результаты и их обсуждение. В результате «сшивки» коллагена образовался полупрозрачный имплант толщиной 0,5 мм с включениями единичных пузырьков воздуха (рис. 1). Рефракционный индекс полученного КАСР колебался в пределах 1,24–1,30, что незначительно ниже, чем у человеческой роговицы (1,37–1,38). Эластичность и прочность полученного КАСР позволяли фиксировать его 12 узловыми швами при моделированной частичной послойной пересадке роговицы на изолированном кроличьем глазу.

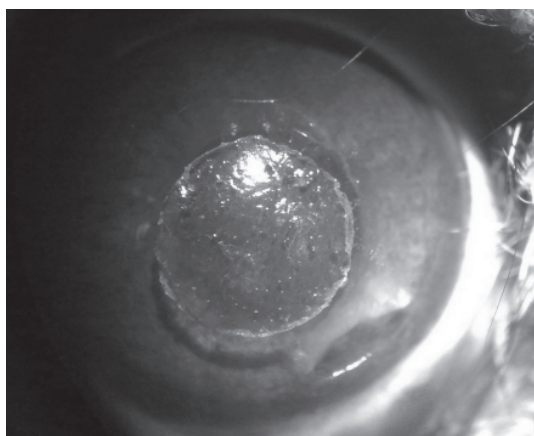


Рис. 1. Коллагеновый имплант перед имплантацией в роговицу кролика

При интраламеллярной имплантации КАСР сохранял прозрачность на всех глазах животных на протяжении 12 мес. Васкуляризации роговицы не наблюдалось ни на одном из оперированных глаз. Незначительные помутнения поверхностных слоев роговицы реципиента (плотность 1–2 балла) после имплантации наблюдались на 2 из 8 глаз, притом только на протяжении первой недели. В отдаленные сроки наблюде-

ний (до 12 мес) ограниченное облаковидное помутнение (плотность 2 балла) в поверхностных слоях роговицы сохранялось на 1 из 8 глаз. Гистологические исследования выявили структурную сохранность импланта и отсутствие воспалительной реакции (рис. 2).

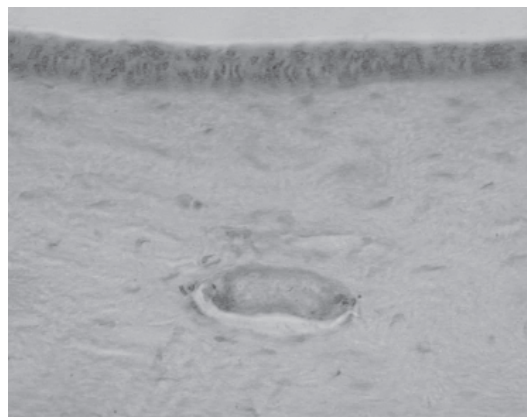


Рис. 2. Роговица кролика № 2, через 12 мес после имплантации. Имплант в строме роговицы, без сосудов и клеточных элементов. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 100$

Полученные нами данные подтверждают возможность получения импланта, схожего по оптическим и механическим свойствам с человеческой роговицей, путем образования поперечных сшивок между молекулами коллагена по методике Y. Liu et al. [5]. Основной трудностью при изготовлении импланта было удаление включений воздуха из него, от которых нам пока не удалось полностью избавиться, что может сказываться как на качестве зрения потенциального реципиента, так и на прочности импланта. Проведенные клинические наблюдения и гистологические исследования согласуются с данными других авторов о ареактивности и длительном сохранении этих имплантов в роговице экспериментальных животных [5, 6], что свидетельствует о перспективе их клинического использования в качестве материала для кератопластики.

Список литературы

1. *Whitcher J.P.* Corneal blindness: a global perspective / J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay // *Bull. World Health Organ.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
2. Amniotic membrane in ophthalmology / H. S. Dua, J. A. P. Gomes, A. J. King, V. S. Mahajan // *Surv. Ophthalmol.* — 2004. — V. 49. — P. 51–77.
3. Якименко С. А. 45-летние результаты кератопротезирования в Институте им. В. П. Филатова / С. А. Якименко // *Офтальмол. журн.* — 2008. — № 3. — С. 13–18.
4. Corneal regeneration following implantation of a biomimetic tissue-engineered substitute / P. Fagerholm, N. S. Lagali, D. J. Carlsson [et al.] // *Clin. Trans. Sci.* — 2009. — V. 2. — P. 162–164.

5. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu, L. Gan, D. J. Carlsson [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2006. — V. 47. — P. 1869–1875.

6. Tissue engineered recombinant human collagen-based substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen / K. Merrett, P. Fagerholm, C. R. McLaughlin [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2008. — V. 49. — P. 3887–3894.

Н.В. Пасєчнікова, В.В. Віт, М.Ф. Леус, С.А. Якименко, О.І. Бузник, С.Г. Коломийчук, І.О. Насінник
ЗАСТОСУВАННЯ ІМПЛАНТІВ НА ОСНОВІ КОЛАГЕНУ В ЯКОСТІ РОГІВКОВОГО ТРАНСПЛАНТАТА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Колагеновий аналог строми рогівки (КАСР) був синтезований шляхом «поперечного зшивання» свинячого колагену I типу 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмідом і N-гідроксисукцинімідом. Отримано гідрогель, який за оптичними і механічними властивостями схожий на людську рогівку. Після інтраламелярної імплантації КАСР у рогівку кроля (8 кролів — 8 очей) імплант зберігав прозорість у терміни спостережень 12 міс, незначні помутніння поверхневих шарів рогівки спостерігалися на 2 з 8 очей. Гістологічні дослідження виявили структурне збереження імпланту та відсутність запальної реакції. Отримані дані свідчать про перспективність подальшого використання отриманого КАСР у якості матеріалу для кератопластики.

Ключові слова: рогівка, імплантація, кератопластика.

N.V. Pasechnikova, V.V. Vit, M.F. Leus, S.A. Yakimenko, O.I. Buznik, S.G. Kolomiychuk, I.O. Nasinnik
APPLICATION OF COLLAGEN IMPLANTS AS A CORNEAL GRAFT IN EXPERIMENT

Collagen substitute of corneal stroma (CSCS) was synthesized by porcine type I collagen cross-linking with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide. Obtained implant had optical and mechanical properties similar to human cornea. It showed satisfactory biocompatibility when was implanted into rabbit corneas (8 rabbits — 8 eyes): CSCS has been preserved its clarity during 12 months follow-up. Fine opacities of superficial corneal layers have been observed in 2/8 eyes. Light microscopy confirmed good integrity of the implants and absence of inflammation in corneal stroma. Our data suggest that CSCS synthesized by collagen cross-linking might be a potential material for keratoplasty.

Key words: cornea, implantation, keratoplasty.

УДК 617.713-002-0.2:616.833.15-085-036.8-092.2

*Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова,
А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, Т.Б. Гайдамака*

*ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П. Филатова НАМНУ», г. Одесса
ГУ «ИНВХ им. В.К. Гусака НАМНУ», г. Донецк

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА МОДЕЛИ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО КЕРАТИТА (КЕРАТОПАТИИ)

Изучали влияние клеточной терапии идентифицированной культуры эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на процессы регенерации поверхности роговицы на разработанной модели нейротрофической кератопатии (кератита). На модели нейротрофической кератопатии (кератита) впервые в Украине установлено, что субконъюнктивальное введение суспензионной культуры лимбальных эпителиальных клеток роговицы в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора, включающей в состав стволовые клетки, позволяет значительно ускорить процессы регенерации роговичной ткани.

Ключевые слова: клеточная терапия, модель нейротрофического кератита, нейротрофическая кератопатия.

За последние десятилетия в патологии органа зрения резко возрос удельный вес дистрофических заболеваний роговицы, которые становятся одной из ведущих причин слабовидения и слепоты. Особое место среди них занимает нейротрофическая кератопатия, или нейротрофический кератит. Вопросам этиологии, патогенеза, лечения данной патологии посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных авторов. Несмотря на это проблема нейротрофической кератопатии еще достаточно далека от своего решения.

Установлено, что чувствительные нервы роговицы играют ключевую роль в поддержании анатомической целостности и функционирования роговой оболочки, особенно ее эпителия. Экспериментальными и клиническими исследованиями доказан, с одной стороны, двусторонний контроль пролиферации роговичного эпителия благодаря взаимодействию сенсорных нейромедиаторов, ускоряющих митоз эпителиальных клеток, а, с другой стороны, воздействие симпатических медиаторов, тормозящих митоз эпителиальных клеток [1–3]. В 2003 г. на Кембриджском офтальмологическом симпозиуме было сформулировано определение нейротрофической кератопатии как дегенератив-

ного заболевания роговицы, индуцируемого поражением тройничного нерва, которое приводит к снижению или потере чувствительности роговицы, уменьшению слезопродукции и, как следствие, — к нарушению регенерации роговицы. Литературные данные указывают на то, что поражение пятой пары черепно-мозговых нервов может происходить на разных уровнях (в ядре, гассеровом узле, на уровне глазной ветви тройничного нерва, назоцилиарного или длинных цилиарных нервов) и наблюдается при различных заболеваниях поверхности глаза, системных заболеваниях организма, а также после хирургических вмешательств.

Наиболее частыми причинами снижения чувствительности роговицы являются вирусные инфекции (герпес Simplex и герпес Zoster), хронические повреждения или воспалительные заболевания поверхности глаза с развитием синдрома лимбальной недостаточности, ношение контактных линз, наследственные дистрофии роговицы, последствия химических ожогов, травм, парезы пятой пары черепно-мозговых нервов, в том числе после удаления невриноном слухового нерва, менингиом и аневризм, хирургические операции на роговице (фото-рефракционная кератэктомия, LASIK, ке-

© Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова и др., 2011

ратопластика и др.) и на глазу (после хирургических и лазерных вмешательств, циркуляжа силиконовой лентой, витректомии (травма или сдавливание цилиарных нервов), а также в результате токсического влияния лекарственных препаратов.

Согласно классификации Y.A. Makie (1995 г.) в клиническом течении нейротрофической кератопатии выделены три стадии. Первая стадия характеризуется точечной кератопатией, гиперплазией эпителия и его иррегулярностью, поверхностной неоваскуляризацией и образованием помутнения в строме. Вторая стадия характеризуется наличием персистирующих дефектов эпителия, отеком стромы, складками десцеметовой мембраны, возможна воспалительная реакция во влаге передней камеры, иногда с наличием стерильного гипопиона. Для третьей стадии характерно вовлечение в патологический процесс стромы с формированием язвы роговицы, которая может осложняться расплавлением стромы, перфорацией и вести к потере зрения и глаза.

Несмотря на большой арсенал лекарственных препаратов и подходов к лечению нейротрофической кератопатии, до настоящего времени лечение данной патологии роговицы является одним из самых трудных в офтальмологии.

Для стимуляции регенерации роговичной ткани используют консервативные и хирургические методы. С тектонической целью в качестве временного покрытия поверхности роговицы используются различные материалы и способы их применения: лечебные мягкие контактные линзы, трансплантация донорской роговицы и конъюнктивы, амниотической мембраны, культивированных фетальных фибробластов и взрослых стволовых клеток как самостоятельно, так и на различных подложках, лимбальных ауто- и аллотрансплантатов.

Исследования последних лет направлены на совершенствование технологии культивирования фетальных фибробластов, лимбальных клеток, а также эпителиальных, стромальных, эндотелиальных клеток роговицы, разработку способов фиксации и доставки этих клеток в ткани роговицы, а также выяснение тонких механизмов регуляции процессов дифференцировки стволовых клеток, после трансплантации их на поверхность глаза, что является актуальной проблемой офтальмологии [4, 5].

В настоящее время применение культивированных клеток роговицы рассмат-

ривают как наиболее перспективный метод, позволяющий стимулировать репаративные процессы поврежденных тканей, при различных патологических процессах роговой оболочки, возникших вследствие синдрома лимбальной недостаточности. Синдром лимбальной недостаточности характеризуется наличием конъюнктивального паннуса, хронического воспаления и помутнения роговицы различной степени выраженности, неоваскуляризации, плохого взаимодействия эпителиальных клеток, которое проявляется неровностью поверхности, рецидивирующими эрозиями и язвами, деструкцией базальной мембраны.

В последние годы изучается возможность применения новой технологии, называемой культивированием (прижизненное донорство) *ex vivo* эпителиальных стволовых клеток, которая позволяет избежать потенциальных осложнений, значительно упрощает процедуру забора материала (биопсии) для выращивания, строгого тестирования как материала, так и собственно донора. Такой подход, кроме того, лишен морально-этических и социальных ограничений, появляющихся при использовании эмбрионального материала.

Экспериментальными исследованиями было доказано, что для длительного культивирования и размножения различных типов эпителиальных клеток необходимо наличие питательной среды либо субстрата, достаточное количество факторов роста и цитокинов [6]. Существуют различные модели культивирования клеток эпителия и стволовых клеток. В 1982 г. Friend et al. предложили способ культивирования роговичных эпителиальных клеток на базальной мембране, полученной из роговиц кроликов. В дальнейшем была изучена возможность применения других субстратов, таких как гидрогель, покрытый фибронектином, коллагеновые матрицы, контактные линзы, фибрин и т. д., для культивирования эпителия *ex vivo*.

Разными исследователями *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что амниотическая мембрана может быть успешно использована в качестве субстрата для культивирования эпителиальных стволовых клеток и их последующего применения в лечении тяжелой патологии поверхности глаза, протекающей с синдромом лимбальной недостаточности. Для идентификации культивированных клеток применяются иммуногистохимические методы с помо-

цью специфических маркеров: р63, кератинсульфатов, цитокератинов 3/12, позволяющих определить видовую принадлежность клеток.

Для изучения регенерации ткани роговицы предлагались различные экспериментальные модели формирования лимбальной недостаточности и нейротрофического кератита (кератопатии). В основе этих моделей лежит термическое, химическое или токсическое повреждение роговичной ткани либо оказывается деструктивное воздействие на глазную ветвь тройничного нерва. Учитывая перечисленные недостатки, мы разработали модель нейротрофического кератита, максимально приближенную к клиническим условиям (приоритетная справка № 201106827) [7].

Целью нашего исследования явилось изучение эффективности влияния клеточной терапии идентифицированной культуры эпителиальных лимбальных клеток роговицы человека на процессы регенерации поверхности роговицы на разработанной модели нейротрофической кератопатии (кератита).

Материал и методы. Экспериментальное исследование было одобрено биоэтическим комитетом ГУ «Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины».

Выделение и культивирование лимбальных клеток роговицы проводили в лаборатории клеточного и тканевого культивирования «ИНВХ им. В. К. Гусака», отвечающей стандартам GMP с соблюдением асептических условий. С поверхности донорской роговицы выделяли зоны палисада Фогта, содержащие наибольшее количество лимбальных стволовых клеток с последующей инкубацией в коллагеназе при температуре 37 °С 10 мин, затем поверхность соскабливали для отделения эпителия от нижележащей стромы. Для выделения использовали питательную среду DMEM/F12 1:2, содержащую 10 % ЭТС, антибиотики и ростовые факторы. Суспензию клеток на 6-луночном плато культивировали в CO₂ инкубаторе, содержащем 95 % влаги при температуре 37 °С. После достижения конфлюэнтного слоя проводили пассирование с предварительным промыванием культуры буферным раствором. Наблюдение осуществлялось с помощью светового микроскопа фирмы Leika.

Иммуногистохимические методы идентификации клеток проводили с использованием специфических маркеров. На ран-

них пассажах для доказательства наличия стволовых клеток в культуре использовали Р63, который является маркером транскрипции. На более поздних пассажах для подтверждения дифференцировки культуру клеток окрашивали цитокератином 3/12 — маркером, который экспрессируется только в клетках роговицы. Пан-цитокератин положительным окрашиванием подтвердил эпителиальное происхождение клеток. Виментин своим цитоплазматическим положительным окрашиванием доказал принадлежность к клеткам мезенхимального происхождения. Происхождение базальных клеток лимба подтвердилось положительным окрашиванием цитокератином 19.

Моделирование нейротрофического кератита (кератопатии) проводили в виварии ГУ «Института глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова НАМН Украины». Наблюдение, уход, оперативное вмешательство на животных, а также выведение их из эксперимента выполняли в соответствии с международными правилами по работе с опытными животными (Хельсинская декларация об использовании животных в экспериментальных исследованиях, 1964–2000).

Для моделирования нейротрофического кератита в условиях *in vivo* использовали 10 кроликов (20 глаз) породы шиншилла массой 2–3,5 кг. Модель предполагала наложение циркуляжа на глазное яблоко силиконовой лентой, что приводило к нарушению иннервации и питания зоны лимба; формирование дефекта стромы в центре роговицы диаметром 6,0 мм и глубиной на 1/3 толщины; торможение регенерации роговицы инстилляциями кортикостероидов в конъюнктивальную полость 3 раза в сутки. За состоянием роговицы наблюдали в динамике с помощью бокового фокального освещения, биомикроскопии с флюоресцентным тестом, фоторегистрации. После выведения животных из эксперимента проводили морфологическое исследование.

Через 1 сутки от начала эксперимента биомикроскопическая картина выявила наличие светобоязни, скудного слизистого отделяемого, прокрашивания роговицы в области стромэктомии и за ее пределами до 7 мм в диаметре. Окружающая ткань собственной роговицы оставалась прозрачной. На 3-и сутки отмечали сохранение светобоязни, увеличение слизистого отделяемого, дефект роговицы в пределах стромэктомии ограничился, с окрашиванием флюо-

ресцеином до 5,5 мм в диаметре, поверхность окружающей роговицы пропитывалась по типу эпителиопатии, с нежным разряжением ткани в слоях. Через 5 суток у экспериментальных животных сохранялась светобоязнь, снизилась слезопродукция, отмечалось умеренное количество слизистого нитчатого отделяемого. В центре стромэктомии дефект поверхностных слоев роговой оболочки ограничился до 0,5–1,0 мм, на остальном протяжении пропитывался флюоресцеином по типу эпителиопатии. Окружающие ткани роговицы оставались почти прозрачными. На 8-е сутки от начала эксперимента проба Ширмера составляла 4,8–5,0 мм, вся поверхность роговицы кроликов заэпителизировалась. Однако поверхность эпителия была иррегулярной, в нижнем отделе роговица по ходу пограничного кольца стромэктомии пропитывалась флюоресцеином по типу эпителиопатии. К 14-м суткам после завершения эпителизации дефекта поверхностных слоев стромы начали формироваться нейротрофические изменения, которые биомикроскопически проявлялись снижением слезопродукции, наличием слизистого нитчатого отделяемого в конъюнктивальной полости, точечной кератопатией, гиперплазией и иррегулярностью эпителия, наличием поверхностной неоваскуляризации. Через 19 суток от начала эксперимента появлялись персистирующие дефекты эпителия роговицы, с отеком и помутнением стромы. К 29-м суткам — при биомикроскопии роговицы экспериментальных животных к ранее описанным трофическим изменениям присоединились нежные складки десцеметовой оболочки, эффект Тиндаля во влаге передней камеры. На 30-е сутки при наличии четких клинических признаков нейротрофического кератита (кератопатии) начинали исследование влияния культуры лимбальных эпителиальных клеток на процессы регенерации эпителия и передних слоев стромы роговицы.

Для этого на обоих глазах дополнительно удаляли передний эпителий в пределах ранее проведенной стромэктомии (6 мм). В глаза опытной группы (10 глаз) вводили субконъюнктивально в области лимба однократно с четырех точек на 3, 6, 9 и 12 часах

Список литературы

1. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии / М. А. Пальцев. — М. : Медицина — Шико, 2009. — Т. 2.

суспензию культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора. Парные глаза (10 глаз) животных являлись контролем.

Результаты. Установлено, что у животных опытной группы на 6 глазах спустя 1 сутки от начала эксперимента диаметр дефекта поверхностных слоев роговицы составил 1–1,5 мм, а на 4 глазах — 3,5–4 мм. В то же время у всех кроликов группы без введения культуры клеток (10 глаз) диаметр сформированного дефекта сохранялся первоначальным (в пределах 6 мм).

Спустя 2 суток у 8 животных опытной группы произошла полная эпителизация раневой поверхности и только на 2 глазах сохранился дефект диаметром 1 мм. В те же сроки наблюдения у кроликов контрольной группы на 8 глазах дефект эпителиального покрова и передних слоев стромы роговицы составил 4,5–5,0 мм, а на 2 глазах оставался в пределах 6 мм.

При дальнейшем наблюдении к 14-м суткам после введения культуры лимбальных эпителиальных стволовых клеток у всех животных опытной группы произошла эпителизация сформированного дефекта с полноценной дифференцировкой эпителиального покрова, а в поверхностных слоях роговицы сформировалось нежное облачковидное помутнение в пределах стромэктомии.

В контрольной группе у 7 кроликов несмотря на завершение эпителизации дефекта выявлялись признаки неполной дифференциации эпителия, а в верхних стромальных слоях формировалось помутнение средней интенсивности, на 3 глазах сохранялась эпителиопатия с формированием более грубого стромального помутнения.

Таким образом, на модели нейротрофической кератопатии (кератита) впервые в Украине установлено, что субконъюнктивальное введение суспензионной культуры лимбальных эпителиальных клеток роговицы в дозе 1 млн. в 0,2 мл физраствора, включающей в свой состав стволовые клетки, позволяет значительно ускорить процессы регенерации роговичной ткани. Применение клеточной терапии в клинике для лечения такого тяжелого дегенеративного заболевания, как нейротрофический кератит (кератопатия), представляется весьма перспективным.

2. Neurotrophic keratitis / S. Bonini, P. Rama, D. Olzi1, A. Lambiase // Eye. — 2003. — V. 17. — P. 989–995.
3. A novel mouse model for neurotrophic keratopathy: trigeminal nerve stereotactic electrolysis through the brain / G. Ferrari, S. K. Chauhan, H. Ueno [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2011. — Apr. 19. — V. 52 (5). — P. 2532–2539.
4. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-1 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy / M. Nakamura, M. Kawahara, K. Nakata, T. Nishida // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2003. — V. 44. — P. 2937–2940.
5. Lavker R. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle / R. Lavker, S. Tseng, T. Sun // Experimental Eye Research. — 2004. — V. 78. — P. 433–446.
6. Миллюдин Е. С. Экспериментальная модель недостаточности региональных стволовых клеток роговичного эпителия / Е. С. Миллюдин // Вестник СамГУ Сер. Естественные науки. — 2006. — № 9 (49). — С. 219–226.
7. Пат. України. Модель нейротрофического кератита / Дрожжина Г. И., Иванова О. Н., Гайдамака Т. Б. — Приорит. справка № 201106827. — Опубл. 2011.

Н.В.Пасечнікова, Г.І.Дрожжина, О.М.Іванова, А.Г.Попандопуло, А.С.Кавеліна, Т.Б.Гайдамака
ЕФЕКТИВНІСТЬ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ НА МОДЕЛІ НЕЙРОТРОФІЧНОГО КЕРАТОПАТІЇ (КЕРАТОПАТІЇ)

Вивчали вплив клітинної терапії ідентифікованої культури епітеліальних лімбальних клітин рогівки людини на процеси регенерації поверхні рогівки на розробленій моделі нейротрофічної кератопатії (кератиту). На моделі нейротрофічної кератопатії (кератиту) вперше в Україні встановлено, що субкон'юнктивальне введення суспензійної культури лімбальних епітеліальних клітин рогівки в дозі 1 млн. у 0,2 мл фізрозчину, що включає в склад стволові клітини, дозволяє значно прискорити процеси регенерації тканини рогівки.

Ключові слова: клітинна терапія, модель нейротрофічного кератиту, нейротрофічна кератопатія.

N.V. Pasechnikova, G.I. Drozhzhyna, O.N. Ivanova, A.G. Popandopulo, A.S. Kavelina, T.B. Gaydamaka

EFFICIENCY OF STEM CELL THERAPY ON THE MODEL OF NEUROTROPHIC KERATITIS (KERATOPATHY)

The influence of stem cell of limbal epithelial cells culture human cornea on the corneal surface regeneration processes at the experimental model of neurotrophic keratitis (keratopathy) was studied. On neurotrophic keratopathy model at first in the Ukraine have determined, that usage of stem cells therapy have positive influence on regenerative processes of damaged corneal tissue: 1 mln. cells subconjunctival injection have forced the epithelization of corneal stromal superficial defect.

Key words: stem cell therapy, model of neurotrophic keratitis, neurotrophic keratopathy.

УДК 617.713–089.843(477)

*Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина,
В.Л. Осташевский, Т.Б. Гайдамака*

*ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии
им. В.П. Филатова АМН Украины», г. Одесса*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ РОГОВОЙ ОБОЛОЧКИ В УКРАИНЕ

Представлены современные правовые и организационные проблемы, связанные с трансплантацией роговой оболочки. Несовершенство законодательной базы, отсутствие механизмов реализации, прописанных в Законе «О трансплантации» положений, отсутствие государственного финансирования кератопластики делают недоступным этот вид оперативного лечения для пациентов. В результате в Украине ежегодно увеличивается число инвалидов слепых и слабовзрячих вследствие патологии роговицы. Основными направлениями в преодолении сложившейся ситуации являются: изменение законодательной базы, пропаганда сознательного донорства, выделение средств из государственного бюджета на финансирование трансплантологии, создание на базе Института им. В.П. Филатова банка глазных тканей.

Ключевые слова: трансплантация, роговая оболочка, законодательная база.

Одним из самых замечательных достижений в медицине XX века является трансплантация органов и тканей. Офтальмология — одна из первых клинических дисциплин, в которой с успехом начали использовать метод трансплантации тканей. Такой тканью стала донорская роговица. Сегодня пересадка роговицы является самым распространенным видом трансплантации тканей у человека. По данным ВОЗ, ежегодно в мире выполняется более 100 000 трансплантаций роговицы. Из них в США производится более 25 000 трансплантаций роговицы, в Германии — 4200, во Франции — 3700, в Англии — 2800, в России — около 1500 [1]. В Украине, несмотря на то что в такой операции ежегодно нуждается не менее 4000–5000 человек, выполняется в 3 раза меньше кератопластик, чем в России. Таким образом, огромное количество пациентов, которым необходим этот вид специализированной хирургической помощи, не имеет возможности получить его и остаются инвалидами.

Украина на протяжении 75 лет была признанным в мире лидером в разработке и внедрении в офтальмологию теоретических и практических аспектов пересадки роговой оболочки. Этому способствовали труды ака-

демика В.П. Филатова, который является одним из основателей отечественной трансплантологии, как и созданная им в Одессе школа. Для развития пересадки роговицы и решения проблем со слепотой от бельма в 1936 г. в Одессе был создан Институт глазных болезней и тканевой терапии, а в нем — первая в стране лаборатория консервации тканей и первый тканевой банк. Пересадка роговицы с момента основания института являлась приоритетным направлением его работы.

В.П. Филатов впервые в мире доказал, что для пересадки можно использовать роговицу умершего человека, которую берут у трупа через несколько часов после смерти. Предложив сохранять роговицу донора на холоде при температуре +3–4 °С, В.П. Филатов вошел в историю мировой офтальмологии как создатель первого способа консервации донорской роговицы, который не утратил своей актуальности и в настоящее время [2, 3]. Исследования многих авторов показали, что роговица, консервированная во влажной камере по В.П. Филатову, не уступает по трансплантационным качествам роговой оболочке, подвергнутой другим способам холодовой консервации или консервации в «органной культуре». Метод холодовой консервации остается наиболее

© Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, В.Л. Осташевский, Т.Б. Гайдамака, 2011

экономически выгодным методом сохранения донорских роговиц сроком до 7 суток. В связи с тем что проверка донора на наличие вирусов ВИЧ-инфекции, гепатита В и С, возбудителя сифилиса, а также бактериологический контроль трансплантационного материала требуют определенного времени, возникла необходимость сохранения донорских трупных тканей до пересадки в течение не менее нескольких суток [4].

Благодаря этой операции десятки тысяч больных избежали слепоты, а институт им. В.П. Филатова стал всемирно известен. Пересадка роговицы выполнялась в институте на протяжении всех 75 лет его существования и является «визитной карточкой» учреждения. За это время в научных исследованиях, проведенных в институте, изучена жизнеспособность тканей роговицы при различных температурных режимах и установлены оптимальные режимы ее консервации (Баженова М.А., 1936–1940, Пучковская Н.А., 1940); изучена динамика биохимических процессов в роговице при ее консервации (Мучник С.Р., 1952); изучены механизмы приживления трансплантатов (Войно-Ясенецкий В.В., 1956–1963); установлено значение иммунологической реактивности организма для приживления трансплантата и определена роль аллергических реакций при пересадке роговой оболочки Войно-Ясенецкий В.В., 1953–1958); изучены трансплантационные свойства роговой оболочки при различных способах ее консервации (Савчук Л.Н., 1961), а также обезвоженной роговичной ткани (Попов Г.П., 1965); изучено влияние подбора пар донора и реципиента по эритроцитарным показателям (группе крови, резус-фактору), антигенам HLA-системы на динамику и характер приживления трансплантатов (Пучковская Н.А., Горгиладзе Т.У., Шульгина Н.С., Митов Т., 1982); изучена зависимость исхода сквозной кератопластики от трансплантационных свойств донорской роговицы (Кочкарева О.И., 1986); впервые создан банк типированных по антигенам HLA-системы криоконсервированных в жидком азоте роговиц; изучена эффективность лечения больных с васкуляризованными бельмами после сквозной кератопластики при использовании иммуносупрессантов с различным механизмом действия — дексаметазона и селлсепта (Г.И. Дрожжина, И.И. Жечева, 2002) и др. [5].

Операция по пересадке трупной роговицы входит в обязательный перечень хирур-

гических мероприятий по реабилитации слабовидящих и слепых. Цель этой операции — возвращение зрения слепым и сохранение глаза. Эту цель сегодня, когда роговица разрушена или повреждена в результате травмы, ожога, инфекционных или других заболеваний, никакими другими методами (и материалами) достичь невозможно.

Несмотря на проводимые в нашей стране и за рубежом исследования по созданию искусственной роговицы, а также попыток использования для этой цели других тканей организма (конъюнктивы, склера, твердая мозговая и амниотическая оболочки и др.), единственной тканью, способной прижить прозрачно и вернуть зрение больному, является донорская роговица, взятая у умершего человека.

Почему же сегодня в Украине — стране с богатейшим опытом научных и практических результатов в области пересадки роговицы — этот вид оперативного лечения находится под угрозой? Прежде всего это связано с несовершенством нашего законодательства.

Условия и порядок взятия анатомических материалов у умершего человека для трансплантации определяются статьей 16 Закона Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку»: «Кожна повнолітня дієздатна особа може дати письмову згоду або незгоду стати донором анатомічних матеріалів у разі своєї смерті. За відсутності такої заяви анатомічні матеріали у померлої повнолітньої дієздатної особи можуть бути взяті за згодою подружжя або родичів, які проживали з нею до смерті. У померлих неповнолітніх, обмежено дієздатних або недієздатних осіб анатомічні матеріали можуть бути взяті за згодою їх законних представників» [6]. Такая формулировка статьи 16 делает практически невозможной трансплантацию органов и других анатомических материалов, включая пересадку роговицы.

Проблема состоит в том, что в настоящее время граждане Украины не делают при жизни заявлений о своем согласии или несогласии быть донором своих органов или тканей после смерти. До сих пор в нашей стране не разработан механизм реализации права каждого гражданина выразить свое согласие или несогласие на посмертное донорство.

При правовом регулировании трансплантации органов и (или) других анатомических материалов умершего человека одну из ведущих ролей играет понятие презумп-

ции согласия либо несогласия на изъятие органов и (или) других анатомических материалов. Данное понятие регламентирует процедуру получения донорского материала. Существующий сейчас Закон полностью оставляет этот вопрос на усмотрение родственников умершего. А беседа с родственниками умершего человека является нелегким, зачастую безнадежным делом. В большинстве случаев встреча с родственниками происходит, когда они забирают тело умершего из морга и ткани, в частности роговица, даже при наличии разрешения уже непригодны для пересадки.

Презумпция несогласия запрещает изъятие донорского материала без прижизненного согласия самого донора либо согласия его родственников (законных представителей) после его смерти. В странах действия этого принципа (например, США) вопрос о возможности человека быть донором ставится перед каждым человеком и записывается, например, в медицинскую карту по постоянному месту наблюдения, в водительское удостоверение либо закрепляется другим образом. Государство при этом обеспечивает широкомасштабные разъяснительные мероприятия, пропагандирующие донорство как возможность продлить или улучшить жизнь другим людям.

Презумпция согласия позволяет изымать органы и (или) другие анатомические материалы человека без дополнительных заявлений. Права человека, не желающего быть донором, полностью защищаются возможностью в любой момент подать заявление об отказе от изъятия у него органов или других анатомических материалов. Презумпция согласия предусматривает, что потенциальный донор еще при жизни дал согласие на то, чтобы быть донором. Она действует в таких европейских странах, как Финляндия, Швеция, Италия, Франция, Бельгия. Такой принцип законодательно закреплен и действует в России, Белоруссии. «Изъятие органов и (или) тканей у трупа не допускается, если учреждение здравоохранения на момент изъятия поставлено в известность о том, что при жизни данное лицо либо его близкие родственники или законный представитель заявили о своем несогласии на изъятие органов и (или) тканей после смерти для трансплантации реципиенту» (статья 8 закона Российской Федерации о трансплантации органов и (или) тканей человека). Такая формулировка закона предусматривает, что «изъятие

органов или тканей может быть осуществлено, если на момент смерти донора в лечебном заведении не было информации относительно несогласия, оформленного при жизни на забор органов или тканей». Данная норма предусматривает возможность для каждого гражданина письменно отказаться от того, чтобы после смерти у него изъяли органы или ткани. Такой отказ заносится в базу данных. Если такой отказ не получен, считается, что человек при жизни не дал отказ на изъятие у него органов или тканей. В этом случае мнение родственников вообще не принимается во внимание.

подавляющее большинство украинцев никогда не задумывались над вопросом донорства своих органов или тканей после своей смерти в целях спасения других, а психологическое состояние родственников, потерявших близкого человека, не всегда адекватно позволяет оценить ситуацию и сделать правильный выбор.

Кроме того, не ясно, какой именно принцип закреплен в статье 16 Закона Украины. С одной стороны, часть 6 указанной статьи предусматривает запрет изымать донорский материал при наличии заявления о несогласии быть донором (презумпция согласия). Тут же предусмотрена невозможность получения донорского материала без прижизненного согласия донора либо его родственников (презумпция несогласия).

Таким образом, процедура получения донорского материала в Украине отягощена, предусматривает двоякую трактовку, дающую путь злоупотреблениям со стороны органов надзора. В это же время нуждающиеся украинцы практически лишены права получить должную медицинскую помощь, гарантированную Конституцией.

Более 36 % пациентов, нуждающихся сегодня в пересадке роговицы, составляют больные с ургентной патологией, у которых при отсутствии хирургического лечения будет потеряна орган зрения и они навсегда останутся инвалидами. В настоящее время во всех областях Украины образовались огромные очереди на плановую пересадку роговицы, а невозможность выполнения неотложной кератопластики приводит к слепоте и инвалидности в тех случаях, когда офтальмологи Украины могли бы оказать эффективную помощь. Отказываясь от этой операции сегодня, из-за несовершенства законодательства мы оставляем сотни молодых трудоспособных людей слепыми и слабовзрячими инвалидами. Ежегодно в

Украине растет инвалидность вследствие патологии роговицы, а инвалиды III группы переходят во II и I группы, содержание которых оплачивает государство.

На сегодняшний день Украина только становится на путь пропаганды осознанного донорства. В это же время тысячи украинцев ежегодно теряют жизнь либо жизненно важные функции (например, зрение), не дождавись трансплантата.

Учитывая изложенное, в целях защиты прав пациентов — граждан Украины, нуждающихся в пересадке роговицы, крайне остро назрел вопрос о внесении изменений в статью 16 Закона Украины «О трансплантации органов и иных анатомических материалов человека», предусмотрев презумпцию согласия на изъятие донорского материала у умершего донора, сформулировав его, как например, это сделано в Белоруссии или в России.

Постановлением Кабинета Министров Украины от 24.02.00 № 695 и последующими изменениями к этому Постановлению КМ от 18.02.06 № 164, от 28.05.08 № 498 и от 06.01.10 № 15 определен перечень учреждений здравоохранения, которые имеют право заниматься забором донорского материала у донора-трупа для трансплантации [7]. В г. Одессе в соответствии с этим постановлением таких учреждений пять. Однако, имея установленное законодательством право, заведующие этими учреждениями и работающие там патологоанатомы в связи с несовершенством законодательной базы и необходимостью выполнения не свойственной им функции — беседы с родственниками для получения разрешения на взятие материала у донора-трупа (врач-психолог в штат этих учреждений не входит) не хотят заниматься забором донорского материала. Кроме того, часть этих учреждений за время согласования и выхода в свет этого Постановления изменило свои названия, став, например, коммунальными учреждениями, и работа с ними на договорной основе стала невозможной. В связи с этим необходимо внести изменения в названия лечебных учреждений Одесской области (Одесская городская больница скорой помощи № 1, 2 и

11), которые согласно «Постановлениям Кабинета Министров Украины от 18.02.06 № 695» имеют право заниматься забором материала у донора-трупа для трансплантации [7]. Необходимо разработать систему взаимодействия и координации работы патологоанатомических учреждений Украины, которым разрешено производить забор материала у донора-трупа для получения и доставки донорского материала в соответствующие лечебные учреждения или банк глазных тканей.

Учитывая большое количество больных с патологией роговицы, нуждающихся в кератопластике, а также жесткие требования, предъявляемые к качеству донорского материала, назрела необходимость регистрации в Украине сред для консервации трупной донорской роговицы. Перспективным направлением также является разработка сред для консервации роговицы и других тканей для офтальмологии, изготовление которых возможно в условиях специализированных лабораторий [3, 5].

В государственных программах по развитию трансплантологии в Украине 2002–2005 и 2009–2012 гг. кератопластика отсутствует. Однако именно пересадка роговицы является радикальным и часто единственным средством борьбы со слепотой от бельма, что определяет важное социальное значение этой операции. Принимая во внимание многолетний опыт работы лаборатории консервации тканей ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В.П. Филатова АМН Украины», целесообразным является создание на ее базе банка глазных тканей для обеспечения потребностей в трансплантационном материале украинской офтальмологии. Создание банка глазных тканей позволит обеспечить офтальмологические отделения качественным трансплантационным материалом для кератопластики и других видов офтальмологических оперативных вмешательств, что позволит своевременно выполнять urgentную и плановую трансплантации роговицы при воспалительных, дистрофических и других заболеваниях, а также после травм и ожогов глаз и предотвратить слепоту и инвалидность от бельма.

Список литературы

1. Оптимизация применения трансплантационного материала / О. Г. Оганесян, Р. А. Гундорова, П. В. Макаров [и др.] // Федоровские чтения — 2009 : VIII Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием : материалы конф. — М., 2009. — С. 513.
2. Борзенко С. А. Два метода консервации донорских роговиц: холодовое и органное культивирование — «За» и «Против» / С. А. Борзенко // Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии : науч.-практ. конф. — М., 2005. — 24 с.

3. Сучасні методи забору, заготовлення і консервації донорської рогівки для кератопластики / Дрожжина Г. І., Пасечникова Н. В., Риков С. О. [та ін.]. — К., 2008. — 31 с.
4. Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 10.06.04 № 294. Про перелік заходів щодо попередження передачі інфекційних захворювань при трансплантації органів та інших анатомічних матеріалів людині.
5. Дрожжина Г. И. Вклад академика В. П. Филатова в развитие трансплантологии / Г. И. Дрожжина, Е. В. Ивановская, Ю. А. Марышев // Филатовские чтения. — Одесса, 2011.
6. Закон Украины. О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку // Голос Украины. — 1999. — 17 авг.
7. Постанова Кабінету Міністрів України від 18.02.06 № 695. Про внесення змін до переліку державних та комунальних установ охорони здоров'я і державних наукових установ, які мають право проводити діяльність, пов'язану з трансплантацією органів та інших анатомічних органів людини.

Н.В. Пасечникова, Г.І. Дрожжина, В.Л. Осташевський, Т.Б. Гайдамака
СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ РОГОВОЇ ОБОЛОНКИ В УКРАЇНІ

Представлено сучасні правові та організаційні проблеми, які пов'язані з трансплантацією рогової оболонки. Недосконалість законодавчої бази, відсутність механізмів реалізації, прописаних в Законі «Про трансплантацію» положень, відсутність державного фінансування кератопластики роблять недоступним цей вид оперативного лікування для пацієнтів. В результаті в Україні щорік збільшується кількість інвалідів сліпих і слабозрячих унаслідок патології рогівки. Основними напрямками в подоланні ситуації, що склалася, є: зміна законодавчої бази, пропаганда свідомого донорства, виділення засобів з державного бюджету на фінансування трансплантології, створення на базі Інституту ім. В.П. Філатова банку очних тканин.

Ключові слова: трансплантація, рогова оболонка, законодавча база.

N.V. Pasechnikova, G.I. Drozhzhina, V.I. Ostashevskiy, T.B. Gaydamaka
THE MODERN PROBLEMS OF CORNEAL TRANSPLANTATION IN UKRAINE

The modern jural and organizational problems, related to transplantation of the cornea are presented. Imperfection of legislative base, absence of realization mechanisms of positions, prescribed in Transpalantation Law, absence of the state financing of keratoplasty make inaccessible this type of operative treatment for patients. As a result the number of blind and visually impaired person, which become invalids due to corneal pathology is annually increased in the Ukraine. Basic directions in overcoming of the existing situation are: change of legislative base, popularization of conscious donorship, state financing of transplantology, creation of eye bank on the base of V.P. Filatov Iinstitute.

Key words: transplantation, cornea, legislative base.

УДК 617.713-089.843

Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк, М.В. Турчин

*Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В.П. Філатова АМН України, м. Одеса
Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського*

ОСОБЛИВОСТІ ТЕХНОЛОГІЇ ВИГОТОВЛЕННЯ І ЗАСТОСУВАННЯ КЕРАТОКСЕНОІМПЛАНТАТУ В ОФТАЛЬМОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

З огляду на актуальність проблеми лікування хворих із травмою органа зору і гнійним кератитом, запропонована технологія виготовлення ксенокератоімплантату із кріоконсервованої і ліофілізованої тканини рогівки свині, наведені особливості хірургічної кератоксенопластики та її переваги при використанні в офтальмологічній практиці.

Ключові слова: кератоксенопластика, кератоксеноімплантат, кріогенне консервування і ліофілізація, травма органа зору, гнійний кератит.

Консервативне лікування при травматичних пошкодженнях очей та виразок рогівки не завжди забезпечує позитивний ефект. Зазвичай до цього призводять порушення репаративно-регенеративних процесів, а вони, у свою чергу, — до перфорації та загибелі ока, через що патологія рогівки часто вимагає термінового хірургічного втручання, особливо при прогресивному лізисі і загрозі перфорації оболонки. Наведене з очевидністю доводить медичну, соціальну та економічну актуальність проблеми адекватного лікування хворих із травмою органа зору та гнійним кератитом [1, 2]. Труднощі в реалізації трансплантаційної технології складають сутність наукової і практичної проблеми сучасної офтальмології. Серед них такі, як забезпечення лікувальних закладів офтальмологічного профілю повноцінним високоякісним донорським матеріалом [3]. Одним із перспективних шляхів лікування хворих із травмою органа зору та гнійним кератитом є технологія кератопластики, методичні особливості якої потребують поглибленого вивчення [4, 5].

Мета роботи — оптимізувати технологію виготовлення і покращити ефективність хірургічного лікування запальних захворювань рогівки різної етіології за допомогою кератоксеноімплантату.

Матеріал і технологія виготовлення ксенокератоімплантату. При розробці кріоліофілізованого кератоксеноімплантату враховано позитивний багаторічний досвід

виготовлення і клінічного застосування біоімплантатів із ксеногенної шкіри (свині) для лікування головним чином опечених хворих [6]. Розроблена Тернопільським державним медичним університетом ім. І.Я. Горбачевського у творчій співдружності з Одеським інститутом очних хвороб ім. В.П. Філатова технологія виготовлення кератоксеноімплантату із рогівки свині (патент 52278 U, 2010) полягає у видаленні рогівки у щойно забитої свині, обробці за відповідних умов кріопротектором, консервуванні при наднизькій температурі (-196°C), вакуумному висушуванні, проходженні етапу технологічного контролю та пакуванні готового продукту. Останній зареєстровано в Україні як виріб медичного призначення (Свідоцтво про державну реєстрацію № 9967/2010).

Контроль якості продукту на технологічних етапах виготовлення кератоксеноімплантату здійснювали за показниками оптичних властивостей субстрату, а саме: за характером поляризованої флуоресценції із визначенням спектральної характеристики випромінювання у поляризованому світлі [7]. Це забезпечує необхідний рівень стандартизації виробу за біофізичними властивостями. Запровадження контролю за наведеним принципом зумовлено тим, що тканині рогівки притаманна висока оптична активність у вигляді анізотропії, що засвідчує наявність у певних сполуках її тканини властивостей рідких кристалів, зокрема, в

© Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк, М.В. Турчин, 2011

ліпідах мембран, нуклеїнових кислотах клітинних ядер, циклічних амінокислот тощо. Запатентований спосіб технологічного контролю забезпечує (наряду з іншими) гарантовану високу якість виготовленого продукту як виробу медичного призначення [4].

Методика хірургічної кератоксенопластики. За 1 год до хірургічного втручання сухий кератоксеноімплантат із дотриманням правил асептики і антисептики слід виймати із поліетиленої упаковки та інкубувати в стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду впродовж 1 год при 20–22 °С. Далі із зволоженого кератоксеноімплантату викраювати необхідний за розмірами тканинний клаптик переважно у вигляді круга з чотирма виступами (орієнтовно на 12, 3, 6 і 9 год) шириною 2–2,5 мм і довжиною 1–1,5 мм для фіксування клаптя до склери ока шовним матеріалом. При обмеженому (частковому) покритті ураженої рогівки використовують клапоть кератоксеноімплантату із фрагментами склери або лімба для фіксації. Після стандартної обробки операційного поля під місцевою анестезією (алькаїн, лідокаїн) накладали блефаростат і шов-тримач на верхній прямий м'яз, після чого відсепарували кон'юнктиву від лімба. Рогівку ураженого ока накривали підготовленим клаптем кератоксеноімплантату і пришивали в ділянці склери і лімба П-подібними швами 7,0–8,0. Ще двома швами фіксували кон'юнктиву на лімбі кератоксеноімплантату.

Список літератури

1. *Беляев В. С.* Операции на роговой оболочке / В. С. Беляев. — М.: Медицина, 1984. — 120 с.
2. *Бикбова Г. М.* Эпикератопластика с использованием незамороженной донорской роговицы в лечении кератоконуса: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Г. М. Бикбова. — Уфа, 2007. — 23 с.
3. *Выленгала Э. Н.* Роль «глазных банков» в развитии кератопластики / Э. Н. Выленгала, А. К. Донцов, А. К. Юревич // Русский мед. журнал. — 2001. — № 4. — С. 169–178.
4. *Гребеник І. М.* Морфологічна характеристика і біохімічні показники ксенорогівки при криоконсервації і ліофілізації / І. М. Гребеник, К. С. Волков, І. М. Кліщ // Вісн. наукових досліджень. — 2009. — № 3. — С. 67–69.
5. *Дронов М. М.* О роговичных трансплантатах / М. М. Дронов // Руководство по кератопластике. — СПб.: ВЛАЗИПРЕСС, 1997. — 130 с.
6. *Бігуняк В. В.* Консервування ауто- і ксенотрансплантата для відновлення втраченої шкіри у опечених хворих: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / В. В. Бігуняк. — Тернопіль, 1994. — 40 с.
7. *Гребеник І. М.* Морфологічний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І. М. Гребеник // Вісник морфології. — 2008. — № 14 (2). — С. 317–319.

Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк, Н.В. Турчин

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ КЕРАТОКСЕНОИМПЛАНТАТА В ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Исходя из актуальности проблемы лечения больных с травмой органа зрения и гнойным кератитом, предложена технология изготовления ксенокератоимплантата из криоконсервированной и лиофилизированной ткани роговицы свиньи, представлены особенности хирургической кератоксенопластики и ее преимущества при использовании в офтальмологической практике.

Після закрапування у кон'юнктивальну порожнину розчину антибіотика і вкладання антибактерійної мазі знімали блефаростат і шов-тримач, а око закривали монокулярною асептичною пов'язкою.

В післяопераційному періоді призначали антибіотики і сульфамідні препарати у вигляді очних крапель, які потенціювали закрапуванням нестероїдних протизапальних засобів. Лікування хворих зазвичай продовжували амбулаторно під наглядом офтальмолога до повного розсмоктування кератоімплантату.

Висновки

1. Технологія виготовлення кератоксеноімплантату на основі криогенної обробки з подальшою ліофілізацією нативної тканини рогівки свині забезпечує отримання високоефективного пластичного біоматеріалу як виробу медичного призначення для вирішення актуальних завдань офтальмологічної практики.

2. Хірургічна кератопластика з використанням виготовленого за технологією криоліофілізації рогівки свині кератоксеноімплантату забезпечує надійну пластику дефекту рогівки, зменшення інтенсивності та усунення запального процесу з подальшою його епітелізацією, відновленням анатомічної цілісності очного яблука.

3. Імплантований кератоксеноімплантат повністю розсмоктується впродовж 2–3 місяців.

Ключевые слова: кератоксенопластика, кератоксеноимплантат, криогенное консервирование и лиофилизация, травма органа зрения, гнойный кератит.

N.V. Pasechnikova, S.A. Yakimenko, V.V. Biguniak, M.V. Turchin

**FEATURES OF TECHNOLOGY OF MANUFACTURING AND USE KERATOXENOIMPLANT
IN OPHTHALMOLOGIC PRACTICE**

Due to actuality of the patients' treatment problem of the eye trauma and puss ceratitis the technology of the xenokeratograft on the base of cryolophilized tissue of the pig's ceratum is worked up. There are represented the peculiarities of the surgic xenokeratoplastics and its advantages when use in ophthalmologic practice.

Key words: keratoxenoplastics, keratoxenograft, cryogenic conservation and lyophilisation, the eyes' trauma, puss ceratitis.

УДК 617.7

*Н.В. Пасєчнікова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк,
М.В. Турчин, О.І. Бузник*, І.О. Насінник*

*ДУ «Інститут очних хвороб і тканинної терапії
ім. В.П. Філатова НАМН України», м. Одеса*

**Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського*

КЛІНІКО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РЕЗУЛЬТАТИ ЗАСТОСУВАННЯ АМНІОТИЧНОЇ ОБОЛОНКИ ТА КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОЇ РОГІВКИ СВИНІ В ЯКОСТІ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ КЕРАТОПЛАСТИКИ

Наведені результати застосування трансплантації амніотичної оболонки (ТАО) в лікуванні післяопікових виразок рогівки, а також експериментальне обґрунтування та перші результати трансплантації кріоліофілізованої рогівки свині (ТКРС) для лікування виразок рогівки різної етіології. Показано, що ефективність ТАО ідентична ефективності лікувальної кератопластики (76,3 против 76,9 %). В експерименті обґрунтовано, що кріоліофілізація свиних рогівок викликає найбільше зниження їх імуногенності. ТКРС у 14 хворих з виразками рогівки дозволила в усіх випадках досягти епітелізації рогівки. У 6 хворих трансплантат розсмоктався, у 8 — прижив. Реакція несумісності різного ступеня супроводжувала загоєння в 7 з 14 випадків.

Ключові слова: амніотична оболонка, кріоліофілізована рогівка, кератопластика.

Головним методом лікування рогівкової патології залишається пересаджування донорської рогівки. В більшості країн потреба в донорській рогівці в рази перевищує її наявність [1]. У зв'язку з цим все більшою актуальністю набуває пошук альтернативних матеріалів для кератопластики.

Мета — вивчити можливості застосування амніотичної оболонки та кріоліофілізованої рогівки свині в якості матеріалу для кератопластики.

Матеріал і методи. Трансплантація амніотичної оболонки (ТАО). В дослідження включено 78 хворих (78 очей) з опіками очей ІІБ, ІVА–Б ступенів за класифікацією С.А. Якименка [2], 53 з яких було проведено 55 ТАО (2 пацієнтам проведена повторна ТАО) та 25 — 26 лікувальних кератопластик (ЛКП) — 1 пацієнту проведена повторна ЛКП. Пацієнти обох груп статистично не розрізнялися між собою за ступенем тяжкості опіку, віком, розмірами виразок рогівки, гостротою зору. Середні терміни ТАО склали $(46,1 \pm 46,4)$ доби після опіку (8–181 доба), ЛКП — $(36,3 \pm 24,7)$ доби після опіку (12–95 діб). Терміни спостережень були від 1 до 46 місяців після операції, в середньому $(9,8 \pm 9,1)$ місяця. Показанням до операцій була неглибока виразка рогівки або ізольо-

вана, з краями, не зв'язаними з лімбом, або краї якої були зв'язані з лімбом і прилеглою ділянкою некрозу паралимбальної кон'юнктиви. Ефективність операції оцінювали за кількістю досягнень епітелізації рогівки, наявністю ускладнень (поглиблень виразки або перфорації рогівки), термінами епітелізації рогівки, щільністю помутніння рогівки і за динамікою гостроти зору у віддалені терміни після операції.

Трансплантація кріоліофілізованої рогівки свині (ТКРС). Експериментальні дослідження склалися з двох частин: розробка оптимального методу консервації рогівок свиней; оцінка переносимості свиних рогівок, консервованих різними методами, при їх імплантації в рогівки кролів. Застосовувалася методика інтраламелярної кератопластики. Були використані такі способи консервації донорських рогівок (волога камера, ліофілізація, глибоке замороження без і з кріопротекторами, в тому числі з подальшою ліофілізацією) — як з метою вивчення можливостей пригнічення їх антигенних властивостей, так і з метою їх зберігання. Терміни спостереження за тваринами — 6 місяців.

Клінічні випробування рогівок свиней у лікуванні хворих з виразками рогівки різ-

© Н.В. Пасєчнікова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк та ін., 2011

ної етіології проведені у 14 пацієнтів (дозвіл на проведення клінічних випробувань МОЗ від 04.06.10 № ВМ-522/н). Використовували донорську рогівку свиней, підготовлену та консервовану за спеціальною методикою (кріоконсервована з кріопротектором з подальшою ліофілізацією). Прооперовано 10 хворих з тотальним звирозкуванням рогівки опікової етіології і 4 хворих з виразкою рогівки іншої етіології (в 1 випадку виразка була з перфорацією — фістулою). В кожному випадку була одержана інформована згода пацієнта на запропоновану операцію. Застосовувалась поверхнева кератопластика повним або пошаровим трансплантатом з каймою склери. У 5 хворих з особливо тяжкими опіками очей кератопластика поєднувалась з покриттям трансплантата переміщеною кон'юнктивою і блефарорафією.

Результати. Трансплантація амніотичної оболонки. Призупинити подальше звирозкування рогівки після ТАО вдалося в 54 з 55 випадків (98,1 %) і у 25 з 26 випадків ЛКП (96,1 %), $p=0,542$ (тест Fisher). Епітелізація рогівки була досягнута в 42 з 55 проведених ТАО (76,3 %) і у 20 з 26 ЛКП (76,9 %), $p=0,596$. Терміни епітелізації рогівки склали в середньому ($24,2 \pm 26,7$) доби після ТАО (від 6 до 123 діб) та ($18,5 \pm 19,1$) доби після ЛКП (від 10 до 45 діб), $p=0,323$ (тест Mann-Whitney). У віддалені терміни спостережень формений зір (гострота зору від 0,01 до 0,7) був отриманий у 26 з 42 пацієнтів (61,9 %), в яких вдалося досягти епітелізації рогівки після ТАО, і у 5 з 20 пацієнтів (25 %), в яких вдалося досягти епітелізації рогівки після ЛКП, $p=0,013$ (двобічний тест Fisher). Це пояснюється тим, що після ЛКП утворювалися більш щільні та васкуляризовані помутніння рогівки.

Трансплантація кріоліофілізованої рогівки свині. Гістоморфологічне вивчення впливу різних способів консервації на тканини рогівки показало, що найменші гістоморфологічні зміни в тканинах донорської рогівки відбувалися при глибокому замороженні з кріопротектором, в тому числі й з подальшою ліофілізацією рогівки. Клінічне вивчення реакції ока і рогівки кроликів на трансплантацію донорської рогівки свині (ксенотрансплантат) показало, що реакція ока кроликів була незначною, проходила протягом 7–10 днів, і в подальшому очі були спокійними, в деяких рогівках виявлялися поодинокі судини, рогівки зберігали прозорість, а стан трансплантатів деякою мірою

залежав від способу консервації рогівки, але в більшості випадків вони зберігали прозорість. При гістоморфологічних дослідженнях рогівок і трансплантатів при ало-трансплантації не було виявлено суттєвих змін їх тканин, а клітинна реакція гістосумісності була незначною і залежала в основному від способу консервації рогівок, а при ксенотрансплантації зміни в цих тканинах були більш вираженими, і в більшості випадків спостерігалась тенденція до розсмоктування трансплантата.

Післяопераційний період у хворих з опіковим процесом у більшості випадків проходив з реакцією несумісності різного ступеня вираженості — від слабкої до сильної у 1 хворого; у 3 хворих трансплантат прижився, але помутнів і васкуляризувався; у 2 хворих поступово розсмоктався, але наступила повна епітелізація рогівки; помутніння рогівки у 1 хворого було інтенсивним і у 1 — неінтенсивним з помірно васкуляризацією. У хворих, яким проводилась блефарорафія, післяопераційний період протікав без особливостей. Таким чином, враховуючи тяжкість опіку, ці результати можна вважати задовільними. У хворих з виразками рогівки іншої етіології післяопераційний період протікав спокійно, трансплантат поступово розсмоктався, але було досягнуто повне заживлення виразки і закриття фістули рогівки.

Висновки

1. У випадку вчасного застосування у хворих з виразками рогівки, що утворюються після опіків очей тяжких ступенів, ефективність ТАО ідентична ефективності ЛКП: можна майже в усіх випадках призупинити подальше звирозкування рогівки (98,1 % при ТАО; 96,1 % при ЛКП) і в більшості випадків досягти епітелізації рогівки (76,3 % при ТАО; 76,9 % при ЛКП).

2. Амніотична оболонка є хорошою альтернативою донорській рогівці для лікувальної кератопластики при неглибоких виразках рогівки як опікової, так і іншої етіології.

3. Клінічні і гістоморфологічні дослідження з вивчення можливості ксенотрансплантації рогівок із застосуванням сучасних способів консервації донорської рогівки показали, що рогівку свині можна рекомендувати для лікувальної і тектонічної кератопластики й утворення банку таких рогівок, що дозволить значною мірою вирішити сучасну проблему дефіциту донорської рогівки.

Список літератури

1. *Whitcher J. P.* Corneal blindness: a global perspective // *J. P. Whitcher, M. Srinivasan, M. P. Upadhyay* // *Bull. World Health Organ.* — 2001. — V. 79. — P. 214–221.
2. *Якименко С. А.* Новая классификация ожогов глаз / *С. А. Якименко* // *Офтальмол. журн.* — 2001. — № 3. — С. 78–81.

Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бигуниак, Н.В. Турчин, А.И. Бузник, И.О. Насинник
КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ АМНИОТИЧЕСКОЙ ОБОЛОЧКИ И КРИОЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ РОГОВИЦЫ СВИНЬИ В КАЧЕСТВЕ МАТЕРИАЛА ДЛЯ КЕРАТОПЛАСТИКИ

Приведены результаты применения трансплантаций амниотической оболочки (ТАО) в лечении послеожоговых язв роговицы, а также экспериментальное обоснование и первые результаты трансплантации криолиофилизированной роговицы свиньи (ТКРС) для лечения язв роговицы различной этиологии. Показано, что эффективность ТАО идентична эффективности лечебной кератопластики (76,3 против 76,9 %). В эксперименте обосновано, что криолиофилизация свиных роговиц вызывает наибольшее снижение их иммуногенности. ТКРС у 14 больных с язвами роговицы позволила во всех случаях добиться эпителизации роговицы. У 6 больных трансплантат рассосался, у 8 — прижил. Реакция несовместимости разной степени выраженности сопровождала заживление в 7 из 14 случаев.

Ключевые слова: амниотическая оболочка, криолиофилизированная роговица, кератопластика.

N.V. Pasechnikova, S.A. Yakimenko, V.V. Biguniak, M.V. Turchin, O.I. Buznik, I.O. Nasinnik
CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESULTS OF APPLICATION OF AMNIOTIC MEMBRANE AND CRYOLYOPHILIZED PIG CORNEA AS MATERIAL FOR KERATOPLASTY

Results of amniotic membrane transplantation (AMT) in treatment of post-burn corneal ulcers, experimental background and first results of cryolyophilized pig cornea transplantation (CPCT) for treatment of corneal ulcers of different etiologies are analyzed. AMT efficacy is equal to therapeutic keratoplasty efficacy (76,3 versus 76,9 %). It is shown in experiment, that cryolyophilization of pig corneas causes the best decrease of their immunogenicity. CPCT in 14 patients with corneal ulcers led to corneal healing in all cases. The graft resolved in 6 patients and engrafted in 8 patients. Host reaction of different degrees accompanied corneal healing in 7 from 14 cases.

Key words: amniotic membrane, cryolyophilized cornea, keratoplasty.

УДК 616.43/.45-089.843:611.018.72:612.43/.45.018

**І.П. Пастер, І.А. Балла, А.Є. Коваленко, Я.Г. Бальон, В.В. Марков,
Н.В. Сологуб, О.Я. Родіонова, Л.А. Кузьминська, Н.І. Левчук,
О.А. Стаценко, С.В. Гулеватий, М.Д. Тронько**

*ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка
АМН України», м. Київ*

ПЕРСПЕКТИВИ ПРОВЕДЕННЯ АЛО- І КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ТКАНИН ЕНДОКРИННИХ ЗАЛОЗ БЕЗ НЕОБХІДНОСТІ ПРИЗНАЧЕННЯ ІМУНОСУПРЕСИВНОЇ ТЕРАПІЇ

Показано, що мікроінкапсульовані тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігають основні морфологічні властивості, що свідчить про перспективність їх застосування для компенсації гіпофункціонального стану відповідної системи.

Ключові слова: ендокринні залози, мікроінкапсульовані тканини, трансплантація.

Одним з альтернативних методів терапії стійких гіпофункціональних станів ендокринних залоз є трансплантація відповідних тканин або клітин. Виключити необхідність застосування імуносупресивної терапії можна за допомогою методу мікроінкапсуляції тканини або клітин у капсули з напівпроникними мембранами, які створюють імунологічний бар'єр між трансплантатом та організмом реципієнта при можливості необмеженої дифузії гормонів, поживних речовин, кисню, месенджерів і метаболітів [1].

Отримані позитивні результати експериментальних досліджень з використанням мікроінкапсульованих гормонпродуруючих клітин, а також розпочаті клінічні випробування ефективності трансплантації мікроінкапсульованих острівців підшлункової залози [2–4].

Метою нашої роботи було дослідити основні морфологічні характеристики мікроінкапсульованих тканин прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини за умов *in vitro* та *in vivo*.

Матеріал і методи. Для проведення експериментальних досліджень тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також тканину кори надниркової залози людини отримували в хірургічному

відділі клініки Інституту. Кожну ендокринну тканину промивали декілька разів стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію з антибіотиками (з розрахунку 100 од. бензилпеніциліну натрієвої солі та 100 мкг стрептоміцину сульфату на 1 мл розчину), очищали від жирової та сполучної тканин, після чого сікли на шматочки розміром до 1 мм³ та знову промивали декілька разів стерильним 0,9 % розчином хлориду натрію з антибіотиками.

Шматочки ендокринної тканини людини переносили в 1,0–1,5 % розчин альгінату («Fluka», Норвегія), після чого здійснювали мікроінкапсуляцію тканини за стандартним методом [5]. Для цього через перший канал генератора мікрокапсул пропускали розчин альгінату з рівномірно розподіленими шматочками ендокринної тканини; через другий канал — повітря зі швидкістю 6–10 л/хв. З вихідного отвору генератора мікрокапсули з тканиною потрапляли в гелеутворюючий розчин хлориду кальцію («Sigma», США) з концентрацією 100 ммоль/л для перехресного зв'язування карбоксильних груп мануронової та гулууронової кислот альгінату, в якому їх інкубували протягом 15–30 хв і промивали кілька разів 0,9 % розчином хлориду натрію.

Мікроінкапсульовану ендокринну тканину людини культивували по 3–5 мікро-

капсул у флакончиках з 1 мл середовища RPMI-1640 («Sigma», США), яке містило 10 % сироватки новонародженого теляти («Sigma», США) і антибіотики, при температурі 37 °С. Частина проб з тиреоїдною та адренокортикальною тканинами містила також відповідно тироген (тиротропін альфа для ін'єкцій, «Genzyme», США) в кінцевій концентрації 5 мкг/мл і синактен-депо («Novartis», Німеччина) в кінцевій концентрації 0,1 Од/мл. Середовище культивування змінювали через день.

На етапі мікроінкапсуляції, а також в різні строки культивування і після трансплантації для гістологічного дослідження відбирали альгінатні мікрокапсули з ендокринною тканиною людини, які фіксували в рідині Буена протягом 18 годин, двічі відмивали у 40° етиловому спирті, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації (40°, 50°, 60°, 70°, 80°, 90°, 96°), двічі просвітлювали у ксилолі по 5 хв та заливали у Paraplast X-tra («Sigma», USA) при температурі 55 °С. Мікротомні зрізи завтовшки 5 мкм забарвлювали гематоксилін-еозином, після чого проводили стандартні гістологічні дослідження за допомогою мікроскопа «Біолам» («ЛОМО», Росія).

В різні строки культивування і після трансплантації відбирали аліквоти середовища і сироватки крові, які заморожували при температурі -20 °С для подальшого кількісного визначення рівнів паратгормону, тироксину і кортизолу імунорадіометричним методом з використанням відповідних наборів реактивів «hPTH-120 min IRMA» («BioSource Europe S.A.», Бельгія), «TT4 RIA kit» («Immunotech», Чехія) і «Cortisol RIA kit» («Immunotech», Чехія) та вимірюванням поглинання на лічильнику «Beckmann 5500B» («Beckmann», США).

До початку дослідження було отримано позитивне рішення комісії з етики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України», а також інформована згода від кожного пацієнта.

Обробка отриманих даних здійснена стандартними методами варіаційної статистики.

Результати та їх обговорення. Результати макроскопічного дослідження показали, що альгінатні мікрокапсули зі шматочками ендокринних тканин людини мають розміри приблизно 1–2 мм у діаметрі, однорідну структуру переважно правильної округлої або іноді дещо продовгуватої форми. Мікрокапсули мають, як правило, рівну поверх-

ню, рівномірну товщину стінки з усіх боків від ендокринної тканини і щільно прилягають до неї. Шматочки тканини розміщуються в альгінатних мікрокапсулах як по центру, так і дещо ексцентрично, що не впливає на морфофункціональні властивості ендокринної тканини [6].

Деформація АМ, яка спостерігається на рисунках у різні строки культивування або після трансплантації, є наслідком нерівномірного видалення води в процесі гістологічної обробки препаратів [7].

Характеристика мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини.

In vitro. Гістологічні дослідження показали, що більшість фрагментів паратиреоїдної тканини людини мали у своєму складі залозисті клітини прищитоподібної залози, а також сполучну тканину. Паратиреоцити були округлої, інколи полігональної форми із світлою цитоплазмою, нормо- та гіперхромними кулястими ядрами та утворювали різні за розміром групи клітин. У фрагментах ендокринної тканини зустрічались також відокремлені прошарками сполучної тканини тиреоїдні фолікули, які містили колоїд з резорбційними вакуолями.

На 7-му добу культивування мікроінкапсульована тканина прищитоподібної залози людини була цілком життєздатною, проте в деяких секреторних клітинах цитоплазма ставала вакуолізованою і з'являлися поодинокі клітини з пікнотичними ядрами. На 15-ту добу культивування спостерігалось зростання кількості паратиреоцитів з вакуолізованою цитоплазмою, гіперхромними та ексцентрично розташованими ядрами, а також почали зустрічатися без'ядерні клітини. На 18-ту добу культивування дещо зменшувалася кількість секреторних клітин за рахунок пікнотизації ядер паратиреоцитів та їх десквамації.

Функціональні дослідження встановили достатню гормональну активність мікроінкапсульованої тканини прищитоподібної залози людини в динаміці культивування. Так, кількісне визначення паратгормону в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування становив (30,11±3,81) пг/мл (n=3), на 7-му добу — (25,34±13,66) пг/мл (n=3), на 11-ту добу — (31,94±24,65) пг/мл (n=3), на 13-ту добу — (20,93±11,09) пг/мл (n=3), на 15-ту добу — (16,34±7,25) пг/мл (n=3) і на 18-ту добу — (27,25±21,76) пг/мл (n=2).

In vivo. Результати макроскопічного дослідження показали, що альгінатні мікро-

капсули залишалися цілими протягом всього періоду спостереження після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпаратиреозом як у підшкірну жирову основу черевної стінки, так і внутрішньочеревно.

Гістологічні дослідження показали, що більшість фрагментів паратиреоїдної тканини людини мали у своєму складі залозисті клітини, а також сполучну тканину. Паратиреоцити були округлої, інколи полігональної форми із світлою цитоплазмою, нормо- і гіперхромними кулястими ядрами та утворювали різні за розміром групи клітин. У фрагментах ендокринної тканини зустрічалися також відокремлені прошарками сполучної тканини і тиреоїдні фолікули, які містили колоїд з резорбційними вакуолями. Альгінатні мікрокапсули щільно прилягали до ендокринної тканини, мали хвилясту поверхню і досить пористу неоднорідну будову.

На 7-му добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина прищитоподібної залози людини була представлена досить неоднорідною, однак життєздатною та функціонально активною секреторною паренхімою. Паратиреоцити полігональної та округлої форми із світлою цитоплазмою та з чіткими клітинними межами тісно прилягали один до одного. Округлі ядра були нормохромними або дещо гіперхромними. Альгінатні мікрокапсули мали чисту поверхню і склалися з досить «пухкого» полімерного шару, однак фрагменти тканини не сполучалися з навколишнім середовищем.

На 14-ту добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина складалася з життєздатних функціонально активних паратиреоцитів з великою світлою цитоплазмою і округлими ядрами. Альгінатні мікрокапсули мали вільну від сполучної тканини поверхню, тісно прилягали до фрагментів тканини, однак будова їх стінки була неоднорідною, «пухкою» і мала досить великі пори.

На 26-ту добу після ксенотрансплантації мікроінкапсульювана тканина містила досить велику кількість функціонально активних паратиреоцитів, межі між якими ставали більш чіткими та хвилястими. Подекуди починали зустрічатись явища каріолізу та, як наслідок, без'ядерні секреторні клітини. Альгінатні мікрокапсули мали нерівну поверхню з розташованими в ній великими порами.

На 43-тю добу після ксенотрансплантації в мікроінкапсульюваній тканині змен-

шувалася загальна кількість життєздатних паратиреоцитів, які були представлені як невеликими групами, так і окремими клітинами. Ядра більшості паратиреоцитів були гіперхромними, однак зростала кількість без'ядерних секреторних клітин. Альгінатні мікрокапсули мали нерівну розгалужену поверхню і розшаровану структуру.

На 69-ту добу після ксенотрансплантації в мікроінкапсульюваній тканині переважна частина паратиреоцитів, які були розташовані здебільшого невеликими групами, зберегла життєздатність. Інша частина секреторних клітин містила вакуолізовану цитоплазму з асиметрично розташованими ядрами. Спостерігалось подальше зростання каріопікнозу. Альгінатні мікрокапсули залишалися без видимих змін.

У функціональних дослідженнях встановили достатню гормональну активність мікроінкапсульюваної тканини прищитоподібної залози людини у віддалені строки після ксенотрансплантації щурам з експериментальним гіпаратиреозом. Так, кількісне визначення паратгормону в крові тварин-реципієнтів показало, що його рівень на 7-му добу становив $(49,08 \pm 8,38)$ пг/мл ($n=3$), на 14-ту добу — $(29,40 \pm 8,08)$ пг/мл ($n=2$), на 26-ту добу — $(20,49 \pm 3,61)$ пг/мл ($n=3$), на 36-ту добу — $(24,23 \pm 8,68)$ пг/мл ($n=3$), на 43-тю добу — $(32,93 \pm 10,15)$ пг/мл ($n=3$) і на 69-ту добу — $(32,01 \pm 4,98)$ пг/мл ($n=5$).

Характеристика мікроінкапсульюваної тканини щитоподібної залози людини.

Результати гістологічного дослідження показали, що мікроінкапсульювана тканина щитоподібної залози людини нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм і щільним колоїдом. Тиреоцити кубічної, іноді сплющеної форми з світлою цитоплазмою і округлими монотипними ядрами. Міжклітинні контакти не порушені, а клітинний детрит відсутній.

Після 2-ї доби культивування альгінатні мікрокапсули однорідної структури, дещо неправильної форми, нерівномірної товщини і з пологими інвагінаціями не досить щільно прилягають до мікроінкапсульюваної тканини щитоподібної залози людини. Тиреоїдна тканина переважно нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм, однак з'являються ділянки з мікрофолікулярною будовою. Тиреоцити кубічної форми з світлою цитоплазмою і округлими світлими ядрами. Міжклітинні контакти не порушені, однак спостерігається незначна кількість клітинного детриту.

У 5-добовій культурі альгінатні мікрокапсули не зазнають суттєвих змін порівняно з показником на 2-гу добу, однак спостерігається незначне відшарування біополімеру від тиреоїдної тканини. Сама тканина переважно нормофолікулярної будови з однорядним епітелієм і ознаками кістозної трансформації. Тиреоцити кубічної форми з світлою цитоплазмою і дрібними, щільними ядрами. Спостерігається часткове порушення міжклітинних контактів.

На 8-му добу культивування переважна більшість альгінатних мікрокапсул однорідної структури, дещо неправильної форми і з нерівною поверхнею. Тиреоїдна тканина переважно нормофолікулярної будови з деякими ознаками кістозної трансформації та частковим порушенням міжклітинних контактів. Зростає кількість клітинного детриту.

На 11-ту добу культивування альгінатні мікрокапсули не зазнають подальших видимих змін. Тканина щитовидної залози набуває ознак часткової будови за рахунок проростання в біополімерну капсулу і появи сполучної тканини в периферичній зоні. Тиреоїдна тканина нормо- або мікрофолікулярної будови з поодинокими ділянками фіброзу і деструкції. Тиреоцити переважно кубічної форми зі світлою цитоплазмою і дрібними, щільними ядрами.

Кількісне визначення загального тироксину в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 2-гу добу культивування мікроінкапсульованої тканини щитоподібної залози людини становив $(16,89 \pm 2,18)$ нмоль/л ($n=3$), на 5-ту добу — $(17,24 \pm 0,77)$ нмоль/л ($n=3$), на 8-му добу — $(18,78 \pm 1,07)$ нмоль/л ($n=3$) і на 11-ту добу — $(17,27 \pm 0,59)$ нмоль/л ($n=3$). В ці ж строки базальний рівень загального тироксину в культуральному середовищі культивування нативної тканини щитоподібної залози людини становив відповідно $(19,17 \pm 5,33)$ нмоль/л ($n=3$), $(18,54 \pm 0,76)$ нмоль/л ($n=3$), $(16,24 \pm 0,25)$ нмоль/л ($n=3$) і $(16,79 \pm 0,95)$ нмоль/л ($n=3$).

Культивування мікроінкапсульованої тканини щитоподібної залози людини з ти-

рогеном (5 мкг/мл) приводило до вірогідного зростання рівня загального тироксину в середовищі на 5-ту, 8-му і 11-ту добу відповідно на 49,2; 73,9 і 34,2 % порівняно з базальними показниками цього ж терміну.

Характеристика мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини.

У гормональних дослідженнях встановили наявність функціональної активності як нативної, так і мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини в динаміці культивування. Кількісне визначення кортизолу в культуральному середовищі показало, що його базальний рівень на 4-ту добу культивування мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини становив $(543,10 \pm 27,18)$ нмоль/л ($n=3$), на 8-му добу — $(506,27 \pm 40,93)$ нмоль/л ($n=3$), на 12-ту добу — $(276,67 \pm 42,56)$ нмоль/л ($n=3$), на 16-ту добу — $(199,43 \pm 91,53)$ нмоль/л ($n=3$), на 20-ту добу — $(92,36 \pm 30,72)$ нмоль/л ($n=3$), на 24-ту добу — $(86,00 \pm 29,79)$ нмоль/л ($n=3$) і на 28-му добу — $(81,19 \pm 28,57)$ нмоль/л ($n=3$).

Для порівняння, в ці ж строки базальний рівень кортизолу в культуральному середовищі культивування нативної тканини кори надниркової залози людини становив відповідно $(546,45 \pm 161,65)$ нмоль/л ($n=2$), $(320,45 \pm 71,95)$ нмоль/л ($n=2$), $(282,05 \pm 52,65)$ нмоль/л ($n=2$), $(97,29 \pm 14,41)$ нмоль/л ($n=2$), $(48,87 \pm 5,56)$ нмоль/л ($n=2$), $(26,06 \pm 1,27)$ нмоль/л ($n=2$) і $(34,62 \pm 13,94)$ нмоль/л ($n=2$).

Культивування нативної та мікроінкапсульованої тканини кори надниркової залози людини з синактен-депо (0,1 Од/мл) приводило до зростання рівня кортизолу в середовищі відповідно на 58,6 і 71,2 % порівняно з базальними показниками.

Таким чином, мікроінкапсульовані тканини прищитоподібної та щитоподібної залоз людини, а також мікроінкапсульована тканина кори надниркової залози людини зберігають основні морфофункціональні властивості, що свідчить про перспективність їх застосування для компенсації гіпофункціонального стану відповідної системи.

Список літератури

1. *Uludag H.* Technology of mammalian cell encapsulation / H. Uludag, P. De Vos, P. A. Tresco // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* — 2000. — V. 42, № 1–2. — P. 29–64.
2. *Islet transplantation in rodents. Do encapsulated islets really work?* / Y. E. Souza, E. Chaib, P. G. Lacerda [et al.] // *Arq. Gastroenterol.* — 2011. — V. 48, № 2. — P. 146–152.
3. *Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type I diabetes* / R. Calafiore, G. Basta, G. Luca [et al.] // *Diabetes Care.* — 2006. — V. 29, № 1. — P. 137–138.

4. Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation / R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. Tan [et al.] // *Xenotransplantation*. — 2007. — V. 14, № 2. — P. 157–161.
5. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets / M. Figliuzzi, T. Plati, R. Cornolti [et al.] // *Acta Biomaterialia*. — 2006. — V. 2, № 2. — P. 221–227.
6. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation / U. Zimmermann, F. Thirmer, A. Jork [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2001. — V. 944. — P. 199–215.
7. *De Vos P.* Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets / P. De Vos, A. F. Hamel, K. Tatarkiewicz // *Diabetologia*. — 2002. — V. 45, № 2. — P. 159–173.

И.П. Пастер, И.А. Балла, А.Е. Коваленко, Я.Г. Бальон, В.В. Марков, Н.В. Сологуб, А.Я. Родионова, Л.А. Кузьминская, Н.И. Левчук, А.А. Стаценко, С.В. Гулеватый, Н.Д. Тронько

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОВЕДЕНИЯ АЛЛО- И КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ ТКАНЕЙ ЭНДОКРИННЫХ ЖЕЛЕЗ БЕЗ НЕОБХОДИМОСТИ НАЗНАЧЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ

Показано, что микроинкапсулированные ткани паращитовидной и щитовидной желез человека, а также микроинкапсулированная ткань коры надпочечной железы человека сохраняют основные морфофункциональные свойства, что свидетельствует о перспективности их применения для компенсации гипофункционального состояния соответствующей системы.

Ключевые слова: эндокринные железы, микроинкапсулированные ткани, трансплантация.

I.P. Pasteur, I.A. Balla, A.Ye. Kovalenko, Ya.G. Balyon, V.V. Markov, N.V. Sologub, O.Ya. Rodionova, L.A. Kuzminska, N.I. Levchuk, O.A. Stazenko, S.V. Gulevaty, M.D. Tronko

PROSPECTS OF ALLO- AND XENOTRANSPLANTATION OF ENDOCRINE GLANDS WITHOUT THE NEED FOR PRESCRIBING IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY

It is shown, that the microencapsulated tissues of human parathyroid and thyroid glands, as well as of human adrenal cortex, maintain their main morphofunctional properties, which makes promising their use for the purpose of compensation of hypofunctional state of the respective system.

Key words: endocrine glands, microencapsulated tissues, transplantation.

УДК 618.393.018.82

А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК: ПЕРСПЕКТИВЫ И РЕАЛЬНОСТЬ

Обобщены результаты исследований авторов относительно перспективности использования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) из различных тканей человека в трансплантологии и регенеративной медицине. Представленные результаты свидетельствуют о том, что МСК могут найти широкое применение в трансплантологии для замены поврежденных клеток, продления жизни аллогенного трансплантата, коррекции патологии путем стимуляции собственных стволовых резервов организма и создания тканеинженерных конструкций.

Ключевые слова: трансплантация, мезенхимальные стволовые клетки, регенеративная медицина.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) характеризуются высокой скоростью пролиферации и способностью образовывать различные типы клеток. В трансплантологии МСК могут применяться с различными целями:

- для замены поврежденных клеток;
- для продления жизни аллогенного трансплантата путем угнетения активности лимфоцитов реципиента;
- для коррекции патологии путем стимуляции собственных стволовых резервов организма;
- для создания тканеинженерных конструкций.

Целью работы является обобщение полученных авторами данных относительно перспективности использования МСК из различных тканей человека в трансплантологии и регенеративной медицине.

Материал и методы. Объектом исследования служили МСК взрослого человека, полученные из костного мозга, жировой ткани, дермы, а также фетальных тканей 4–12-го пассажей. Эксперименты проводили с письменного согласия проинформированных доноров в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации по проведению биомедицинских исследований.

Клетки культивировали в 25 см² флаконах в среде α -MEM, дополненной 10 % сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота, 100 ед. пенициллина, 100 мкг

стрептомицина, при 37 °C / 95 % влажности в атмосфере с 5 % CO₂.

Иммунофенотипический анализ МСК проводили с использованием моноклональных антител CD29-PE, CD45-PE, CD105-FITC, CD34 Class II-FITC, CD 38-RPE, CD44-FITC, CD73-PE.

Остео-, хондро- и адипогенный потенциал МСК, а также их способность дифференцироваться в нейроны, клетки поджелудочной железы и кровеносных сосудов исследовали в процессе культивирования в течение 3 недель в средах, индуцирующих дифференцировку в указанных направлениях. Эффективность дифференцировки в соответствующих направлениях определяли с помощью иммуногистохимических, гистохимических и биохимических методов.

Экспансию и способность к индуцированной дифференцировке исследовали как в условиях монослоя, так и при объемном культивировании в различных носителях: широкопористых губках, альгинатных микрокапсулах, микро- и нановолокнах.

Пролиферацию лимфоцитов определяли по включению ³H-тимидина в смешанной одно- и двусторонней культуре. Цирроз печени моделировали путем длительного введения крысам тетрахлорметана. Состояние печени оценивали гистологическими и биохимическими методами.

Результаты и их обсуждение. Цитофлуориметрические исследования показали, что МСК, полученные из всех источни-

© А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, 2011

ков, имеют иммунофенотип, характерный для МСК: около 95 % клеток в исследуемых культурах экспрессировали маркеры CD29, CD44, CD73 и CD105. При этом содержание клеток, негативных по маркерам гемопоэтических клеток CD34, CD38, CD45, составляло более 95 % [1].

Продемонстрирована способность МСК в ответ на индуцирующие стимулы дифференцироваться в ортодоксальных направлениях (в клетки хряща, кости, жира) [1], а также в клетки поджелудочной железы [2], эндотелия кровеносных сосудов [3], нейроны. При сравнительном изучении способности МСК из костного мозга, жировой ткани и дермы взрослого человека дифференцироваться в бета-клетки поджелудочной железы было установлено, что в ответ на индуцирующие факторы, имеющиеся в экстракте поджелудочной железы новорожденных поросят, наибольшим потенциалом обладают МСК жировой ткани.

Уникальные свойства МСК сохраняются при их культивировании в составе различных носителей: микрокапсул [4], макропористых губок [5] и др. При этом интересно отметить, что если в альгинатных микрокапсулах МСК остаются округлыми и приостанавливают пролиферацию, но в течение длительного культивирования сохраняют способность к мультилинейной дифференцировке, то в составе широкопористых губок клетки распластываются и активно пролиферируют, заполняя объем пор. Приведенные данные свидетельствуют о том, что МСК могут найти широкое применение в эндокринологии, пластической хирургии, стоматологии, ортопедии и травматологии для замены поврежденных клеток как самостоятельно, так и в составе тканеинженерных конструкций.

Совместное культивирование клеточных суспензий, содержащих МСК, с митогенами

и лимфоцитами взрослого человека позволило выявить способность этих клеток ингибировать иммунный ответ. В частности, включение ^3H -тимидина в лимфоциты взрослых доноров многократно увеличивалось при добавке митогенов (ФГА, конкавалин А) или аллогенных лимфоцитов. При этом при введении в культуральную среду суспензий, содержащих МСК, предварительно обработанных митомицином С для остановки пролиферации, ингибировалось включение ^3H -тимидина, стимулированное как митогенами, так и аллогенными лимфоцитами [6]. Эти результаты и многочисленные экспериментальные данные других исследователей, проведенные в системах *in vitro* и *in vivo*, свидетельствуют о том, что МСК могут найти применение в клинической трансплантологии для продления сроков функционирования аллогенного трансплантата.

Была предпринята попытка идентифицировать МСК после их трансплантации животным с модельными патологиями печени. Для этого суспензии, содержащие МСК, были предварительно мечены 3-бромдиоксиуридином. После трансплантации крысам с хронической печеночной недостаточностью выявить меченые клетки не удалось. Вместе с тем трансплантация клеток приводила к существенному восстановлению структуры и функции печени, что может объясняться стимуляцией эндогенных стволовых клеток в поврежденном органе.

Таким образом, несмотря на то что трансплантация стволовых клеток и в частности МСК в настоящее время редко используется в клинике, эта терапия может найти широкое применение для замены поврежденных клеток, продления жизни аллогенного трансплантата, коррекции патологии путем стимуляции собственных стволовых резервов организма, а также для создания тканеинженерных конструкций.

Список литературы

1. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. Г. Скоробогатова [и др.] // Трансплантологія. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 84–86.
2. Выбор условий индукции дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека в инсулинпродуцирующие клетки *in vitro* / Ю. А. Петренко, С. П. Мазур, В. П. Грищук [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2011. — Т. 6, № 1. — С. 73–79.
3. Формування капілярноподібних структур стромальними клітинами жирової тканини і фетальної печінки людини в процесі культивування / Ю. О. Петренко, Д. Б. Домбровський, Р. В. Салютін, О. Ю. Петренко // Львівський медичний часопис / Acta Medica Leopoliensia. — 2010. — Т. 16, № 1. — С. 40–45.

4. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микросферы / А. И. Правдюк, Ю. А. Петренко, Н. А. Волкова, А. Ю. Петренко // Биотехнология. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 62–69.

5. Coupling of gelatin to inner surfaces of pore walls in spongy alginate-based scaffolds facilitates the adhesion, growth and differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells / Yu. A. Petrenko, R. V. Ivanov, A. Yu. Petrenko, V. I. Lozinsky // J. Mater. Sci. Mater. Med. — 2011. — V. 22. — P. 1529–1540.

6. Петренко Ю. А. Иммунорегуляторные свойства клеток фетальной печени человека / Ю. А. Петренко // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. — 2007. — Т. 2, № 3. — С. 57–61.

О.Ю. Петренко, Ю.О. Петренко

ТРАНСПЛАНТАЦІЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН: ПЕРСПЕКТИВИ ТА РЕАЛЬНІСТЬ

Узагальнено результати досліджень авторів щодо перспективності використання мезенхімальних стромальних клітин (МСК) з різних тканин людини в трансплантології та регенеративної медицини. Представлені результати свідчать про те, що МСК можуть знайти широке застосування в трансплантології для заміни пошкоджених клітин, продовження терміну життя алогенного трансплантата, корекції патології шляхом стимуляції власних стоволових резервів організму і створення тканинно-інженерних конструкцій.

Ключові слова: трансплантація, мезенхімальні стромальні клітини, регенеративна медицина.

А.Ю. Petrenko, Yu.A. Petrenko

TRANSPLANTATION OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS: PROSPECTS AND REALITY

The data of authors on the prospects of using mesenchymal stromal cells (MSCs) from various human tissues in transplantation and regenerative medicine are summarized. The results presented in the paper suggest that MSCs can be widely used in transplantation to replace damaged cells, to prolong the lifespan of the allogeneic transplant, to correct a pathology by stimulating the own stem cell reserves of the organism, to develop tissue engineering constructs.

Key words: transplantation, mesenchymal stromal cells, regenerative medicine.

УДК 617.58+616.13/14-005-089.843+612.35

*Ю.В. Поляченко, Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, С.І. Мартиненко,
М.Ф. Соколов, В.А. Шаблій, М.П. Комаров*

Національний інститут хірургії та трансплантології

ім. О.О. Шалімова НАМН України, м. Київ

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, м. Київ

ТОВ «Інститут клітинної терапії», м. Київ

ЕФЕКТИВНІСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ФЕТАЛЬНОЇ ПЕЧІНКИ ЯК МЕТОДУ НЕПРЯМОЇ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК

Лікування хворих з нереконструктабельним ураженням периферичного артеріального русла є актуальною проблемою сучасної хірургії. Спираючись на позитивні результати доклінічних експериментальних досліджень, що засвідчили активацію регенераторно-відновних процесів та ангиогенезу в ішемізованих тканинах, проведено дослідження з метою визначити клінічну ефективність використання прогеніторних клітин фетальної печінки в лікуванні хворих з «нереконструктабельним» ураженням периферичного артеріального русла нижніх кінцівок. Аналіз результатів клінічного дослідження свідчить про доцільність та ефективність трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки людини як методу «непрямої» реvascularизації в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію нижніх кінцівок.

Ключові слова: *хронічна ішемія, непряма реvascularизація, прогеніторні клітини, фетальна печінка.*

Досягнуті суттєві успіхи сучасної судинної хірургії, однак проблема лікування хворих з ураженням периферичного (термінального) судинного русла є до кінця невирішеною та актуальною. Особливо це стосується тих клінічних випадків, коли виконати «пряму» реvascularизацію неможливо у зв'язку з відсутністю анатомо-функціональних можливостей [1, 2].

Одним з напрямків лікування даної категорії хворих є застосування методів «непрямої» реvascularизації, зокрема трансплантації стромальних аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку, які дозволяють шляхом стимуляції процесів ангиогенезу розвинути колатеральну капілярну мережу в ураженому сегменті [3, 4].

Однак широке клінічне використання клітин кісткового мозку обмежено певними технологічними проблемами та низьким потенціалом трансдиференціювання дорослих (adult) мезенхімальних клітин [5].

Результати проведених експериментів за умов *in vitro* та *in vivo* свідчили про високий потенціал трансдиференціювання про-

геніторних клітин фетальної печінки людини 6–8 тижнів гестації до ангиобластів та ендотеліоцитів — основної складової капіляра, що зумовило активацію регенераторно-відновних процесів та ангиогенезу в ішемізованих тканинах, більш ніж при трансплантації аутоклітин кісткового мозку.

Мета роботи — визначити клінічну ефективність використання прогеніторних клітин фетальної печінки в лікуванні хворих з «нереконструктабельним» ураженням периферичного артеріального русла нижніх кінцівок.

Матеріал і методи. Клінічну групу склали 22 пацієнти (всі чоловіки) з проявами хронічної ішемії нижніх кінцівок ІІБ–ІV ступенів, які знаходились на лікуванні у відділі мікросудинної та пластичної хірургії Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова та клініці ТОВ «Інститут клітинної терапії». Середній вік хворих складав 53,5 року. У 5 хворих діагностовано облітеруючий ендартеріїт, у решти — атеросклеротичне ураження судинного русла.

© Ю.В. Поляченко, Р.В. Салютін, С.С. Паляниця та ін., 2011

На момент госпіталізації хворі обстежувались за алгоритмом, що включав у себе: загальноклінічне обстеження, доплерографію, визначення показників регіонарного кровотоку (сегментарний тиск та ГПП), рентгеноконтрастну ангіографію, визначення стану мікроциркуляторного русла за допомогою лазерної флуометрії та анкетування («Quality of Life Index» і уніфікований опитувальник — Walking Impairment Questionnaire).

У всіх хворих було констатовано неможливість виконання реконструктивно-відновних оперативних втручань на артеріальному руслі нижньої кінцівки.

За локалізацією оклюзійного або облітеруючого ураження (по результатам клініко-інструментальних досліджень) хворі були розподілені таким чином: здухвинно-стегново-підколінно-гомільковий сегмент — 2; стегново-гомільково-стопний сегмент — 3; гомільково-стопний сегмент — 5; стегново-підколінно-гомільково-стопний — 12.

На основі даних науково-інформаційного пошуку і результатів клініко-лабораторного аналізу та інструментальних досліджень були встановлені показання та протипоказання до клітинної трансплантації.

Показаннями до клітинної трансплантації були: відсутність показань до прямої ревазуляризації, а саме: оклюзія дистального (термінального) артеріального сегмента та/або наявність мультифокального ураження артеріального судинного русла, яке поєднується з «нереконструктабельним» ураженням периферичного сегмента; хронічна ішемія кінцівок ІІБ–ІІІ ступенів; хронічна ішемія кінцівок ІV ступеня без гострих гнійно-запальних процесів та мікотичної інфекції стопи; відсутність онкопатології в анамнезі та негативний тест на онкомаркери.

Протипоказаннями до клітинної трансплантації були: наявність показань до «прямої» ревазуляризації; наявність міотичного ураження стоп; наявність гострого гнійно-запального процесу стопи; наявність цитомегаловірусної інфекції; перевищення вмісту онкомаркерів та позитивний онкоанамнез.

Розроблена технологія клітинної трансплантації включала в себе локальне введення прогеніторних клітин фетальної печінки (отримані з біотехнологічної лабораторії ТОВ «Інститут клітинної терапії») в фізіологічному розчині (20–30 мл) під місцевою анестезією (2 % розчин лідокаїну) за допо-

могою короткої закругленої канюлі під апоневроз в м'язи, розповсюджуючи клітини невеликими порціями в ішемізовані ділянки, вздовж облітерованих судин, де кровопостачання страждає найбільше. В деяких випадках (з метою системної дії) частину клітинного трансплантата вводили внутрішньовенно.

Через 1–3–6–12 міс після клітинної трансплантації хворі проходили контрольне обстеження, яке було ідентичним алгоритму первинного обстеження, за виключенням ангіографічного дослідження, яке виконували лише на 6–12-й місяць.

Результати та їх обговорення. Починаючи з 2–3-го тижнів після введення трансплантата у хворих спостерігали позитивну клінічну симптоматику, що проявлялось у вигляді покращання загального самопочуття, зменшення, а потім і повної відсутності больового синдрому (в тому числі болю спокою), загоєння трофічних розладів на пальцях та стопі.

Окрім того, починаючи з 3-го тижня після трансплантації поступово (у 2,5–3,2 разу) збільшувалась дистанція без больової ходи. У 88,2 % пацієнтів через 1–3 міс після клітинної трансплантації було відмічено зменшення ступеня ішемії за Покровським–Фонтейном. Аналіз результатів дослідження свідчив про те, що у 4 пацієнтів ІV ступінь ішемії зменшився до ІІІ ступеня, а у 11 пацієнтів (зі ступенем ішемії ІІІ–ІV) характер клінічних проявів через 3 міс після трансплантації відповідав ІА ступеню ішемії.

Водночас у 2 хворих з ІV ступенем ішемії з гнійно-запальним процесом на стопі (гангрена пальців з переходом на тильну поверхню стопи) позитивної клінічної динаміки не спостерігали. Навпаки, введення клітинного трансплантата призводило до стимуляції гнійно-запального процесу, поживлення некротичного процесу та активації латентної мікотичної інфекції, що в кінцевому підсумку змусило виконати ампутацію кінцівки (на рівні гомілки та стегна).

Окрім того, 1 хворому з відсутністю магистрального судинного русла сегмента «гомілка–стопа» ампутація кінцівки була виконана через 4 міс після клітинної трансплантації. На тлі повного благополуччя та переходу ступеня ішемії з ІІІ до ІА зафіксували гострий артеріальний тромбоз підколінної артерії з переходом до Гунтерова каналу.

Оперативне втручання визнано неефективним, а призначена консервативна терапія мала короткочасний ефект, у зв'язку з

погіршенням самопочуття, появою вираженого больового синдрому та некротичного процесу уражена кінцівка була ампутована.

Проаналізувавши літературу та суб'єктивний статус хворих у післятрансплантаційному періоді (вже на 7-му–10-ту добу), а саме: покращання загального самопочуття та психоемоційного статусу, прилив фізичної сили, ми дійшли висновку, що найбільш оптимальним шляхом введення клітинного трансплантата є локальна трансплантація в ішемізовану кінцівку (під місцевою анестезією шприцом з короткою канюлею), поєднана з системним (внутрішньовенним) введенням клітин фетальної печінки.

Окрім того, даний метод не потребує особливих умов та операційного блоку або рентген-операційної на відміну від внутрішньоартеріального шляху введення, який окрім залучення додаткового медичного персоналу (рентген-операційного блоку) може призвести до тромботичних ускладнень.

До того ж відомо, що при внутрішньоартеріальному шляху введення клітинного трансплантата близько 70–90 % клітин гине, не досягнувши патологічної зони, а в судині, яка використовується для трансплантації, відмічається гіпертрофія ендотеліального шару [6].

За період динамічного спостереження за пацієнтами, яким була виконана клітинна трансплантація, ускладнень у вигляді некротичних дефектів у зоні введення клітинного трансплантата, анафілактичної реакції або гнійно-запального чи іншого процесу (в тому числі й онкологічного) не було зафіксовано.

Крім того, протягом усього періоду спостереження пацієнти відмічали покращений психоемоційний статус (індекс якості життя), покращання сну та апетиту, збільшену працездатність та потенцію, збільшення дистанції (в середньому до 400–500 м) та швидкості безбольової ходи, а також зменшення частоти прийому та дозування гіпотензивних препаратів (у разі супутньої гіпертонічної хвороби).

Перші ознаки клінічного «завмирання» стану пацієнти відмічали вже починаючи з 12–15-го місяців після клітинної трансплантації, що проявлялось у тенденції до поступового «завмирання» дистанції та швидкості безбольової ходи (за даними опитувальника).

Результати загальноклінічного обстеження та тестування корелювали з даними інструментальних досліджень.

Однак необхідно зауважити, що показники регіонарної гемодинаміки (показники сегментарного тиску та ГПІ) в процесі лікування вірогідно не збільшувались. Даний факт пояснюється тим, що покращання кровопостачання ішемізованої кінцівки відбувається за рахунок новоутвореного капілярного (мікроциркуляторного) русла, а не за рахунок відновлення магістрального кровотоку.

Отже, використання методу визначення регіонарної гемодинаміки за показниками сегментарного тиску та ГПІ у хворих після клітинної трансплантації недоцільно, оскільки не відображає реальної картини стану кровопостачання ішемізованої кінцівки.

З метою об'єктивного моніторингу змін у мікроциркуляторному руслі після клітинної трансплантації застосовували метод лазерної доплерівської флуометрії. На момент госпіталізації у хворих з хронічною ішемією кінцівок спостерігали зниження рівня мікроциркуляторних процесів та ознаки компенсаторної відповіді — активація механізмів регуляції мікроциркуляції (ендотеліальних, нейрогенних, міогенних), посилення артеріовенозного шунтування, зниження ендотеліязалежного і ендотелійнезалежного резерву капілярного кровотоку.

В післятрансплантаційному періоді, вже наприкінці першого місяця після клітинної трансплантації, відмічається покращання мікроциркуляторних показників за рахунок функціонування новоутвореного капілярного русла, дилатації прекапілярних сфінктерів (за рахунок зниження нейротонусу), посилення артеріовенозного шунтування та збільшення резерву капілярного кровотоку (за рахунок поліпшення ендотелійнезалежної вазодилатації).

На подальших етапах спостереження (через 3–6 міс) відмічена стійка тенденція до подальшої нормалізації стану мікроциркуляторного русла за рахунок покращання веноулярного відтоку та поліпшення ендотеліязалежної вазодилатації (через активацію активних і пасивних механізмів регуляції процесів капілярного кровотоку).

Необхідно зауважити, що в подальшому (на 12-й місяць після клітинної трансплантації) показники процесів мікроциркуляції мають тенденцію до «завмирання» та формування стійкого позитивного рівня капілярного кровотоку.

Результати контрольної (6–12-й місяць після трансплантації) рентгеноконтрастної

артеріографії свідчили про значний розвиток колатерального кровотоку вздовж облітерованих магістральних судин, тобто в зоні клітинної трансплантації.

Таким чином, результати дослідження свідчать про безумовний позитивний ефект застосування прогеніторних клітин фетальної печінки в лікуванні хворих з хронічною ішемією нижніх кінцівок, яка зумовлена «нереконструктабельним» ураженням судинного русла.

Зменшення ступеня ішемічного ураження та позитивна клінічна динаміка, на наш погляд, відбуваються як за рахунок активації процесів ангиогенезу власне трансплантованими клітинами, так і опосередковано через стимуляцію власного тканинного ангиогенезу.

Доцільним є використання методу лазерної доплерівської флуометрії для визначення мікроциркуляторних процесів, що відбуваються в тканинах кінцівок після виконання методів «непрямої» реваскуляризації кінцівки. Впровадження даного методу в клінічну практику дозволить суттєво зменшити відсоток розвитку ішемії кінці-

вок тяжкого ступеня з подальшою втратою хворим цієї кінцівки, відповідно, зменшить відсоток пацієнтів, що отримають інвалідність і стануть тягарем для суспільства.

Висновки

1. Трансплантація прогеніторних клітин фетальної печінки людини в комплексному лікуванні хворих на хронічну ішемію кінцівок приводить до стійкого зростання індексу якості життя, відстані безболісної ходьби, покращання загального самопочуття, переведення хворого до групи пацієнтів з нижчим ступенем ішемії, сприяє більш швидкій соціальній реабілітації пацієнтів та зменшує прогноз щодо інвалідизуючих операцій.

2. Розроблена методика трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки людини є ефективним і доступним методом непрямої реваскуляризації у хворих із хронічною ішемією кінцівок. Цей метод показаний до використання у пацієнтів, яким не можна виконати реконструкцію судинного русла, хворих похилого віку та з вираженою супутньою патологією.

Список літератури

1. *Покровский А. В.* Клиническая ангиология : руководство для врачей : в 2 т. / [под ред. А. В. Покровского]. — М. : Медицина, 2004. — Т. 1. — 2004. — 808 с.
2. *Dormandy J.* Chronic critical ischemia of the legs / J. Dormandy, F. Becker // *Ann. Cardiol. Angiol.* — 2007. — V. 56, № 2. — P. 61–64.
3. *Воронов Д. А.* Стимуляция ангиогенеза в улучшении результатов хирургического лечения пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: экспериментальное обоснование и эффективность клинического применения / Д. А. Воронов, А. В. Гавриленко, Н. П. Бочков // *Болезни аорты и ее ветвей.* — 2009. — № 3. — С. 45–48.
4. Шляхи стимуляції непрямої реваскуляризації в лікуванні хронічної ішемії нижніх кінцівок / В. К. Гринь, А. Г. Попандопуло, О. А. Штутін [та ін.] // *Практ. медицина.* — 2008. — Т. XIV, № 5. — С. 35–38.
5. *Кухарчук А. Л.* Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки / А. Л. Кухарчук, В. В. Радченко, В. М. Сирман. — Черновцы : Золоті литаври, 2004. — 505 с.
6. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium / D. Ortic, J. Kajstura, D. Chimenti [et al.] // Nature.* — 2001. — V. 410. — P. 701–705.

Ю.В. Поляченко, Р.В. Салютин, С.С. Паляница, С.И. Мартыненко, Н.Ф. Соколов, В.А. Шаблій, М.П. Комаров

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ФЕТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНИ КАК МЕТОДА НЕПРЯМОЙ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Лечение больных с «нереконструктабельным» поражением периферического артериального русла является актуальной проблемой современной хирургии. Основываясь на положительных результатах доклинических экспериментальных исследований, свидетельствовавших о стимуляции регенеративно-восстановительных процессов и ангиогенеза в ишемизированных тканях, проведено исследование в целях определения клинической эффективности использования прогеніторных клеток фетальной печени человека в лечении пациентов с «нереконструктабельным» поражением периферического артериального русла. Анализ результатов клинического исследования свидетельствует о целесообразности и эффективности трансплантации прогеніторных клеток фетальной печени человека как метода «непрямої» реваскуляризації в комплексном лечении больных с хронической ишемией нижних конечностей.

Ключевые слова: хроническая ишемия, непрямая реваскуляризация, прогениторные клетки, фетальная печень.

Yu.V. Poljachenko, R.V. Salutin, S.S. Paljanitsa, S.I. Martynenko, N.F. Sokolov, V.A. Shablij, M.P. Komarov

EFFICIENCY OF TRANSPLANTATION OF PROGENITORY CELLS OF FETAL LIVER AS METHOD OF INDIRECT REVASCULARIZATION OF INFERIOR LIMBS

Treatment of patients with «non reconstructive» injury of artery vessel is an acute problem of modern surgery. Taking in to account the positive results of before clinical experimental researches which showed the stimulation of regenerative restoring processes and angiogenesis in ischemic tissues, the research has been carried out with the aim of defining of clinical efficiency of usage of progenitory cells of fetal liver of a human being at treatment of patients with «non reconstructive» injury of peripheral artery vessel. The analysis of the results of clinical research shows the expediency and efficiency of transplantation of progenitory cell of fetal liver of human beings as the method of «indirect» revascularization in complex treatment of patients with chronical ischemia of inferior limbs.

Key words: chronical ischemia, indirect revascularization, progenitory cells, fetal liver.

УДК 612.67:616.03.127:611.018:616-089.843

О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, В.Ю. Прокопюк

Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків

ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ХОРІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІОКАРДА СТАРИХ ЩУРІВ

Досліджено вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів. Аналізували електрофізіологічні показники та морфологічну структуру міокарда після навантаження. Продемонстровано, що імплантація кріоконсервованої хоріальної тканини підвищує функціональні та адаптаційні можливості міокарда після навантаження, що пояснюється відновленням структури міокардіоцитів та компонентів сполучної тканини міокарда.

Ключові слова: хоріальна тканина, імплантація, кріоконсервування, міокард, геронтологія.

З віком адаптаційні можливості міокарда обмежуються, що пов'язано зі структурно-функціональними змінами як у міокарді, судинах, так і в системах регуляції діяльності серцево-судинної системи [1–3]. Сьогодні, коли населення прогресує старіє, відновлення стану серцево-судинної системи в похилому віці є актуальною медичною і соціальною проблемою. Препарати, що застосовуються в геріатричній практиці, відносяться до різних фармакологічних груп, однак лише деякі з них мають доведені геропротекторні властивості [4–6]. Одними з таких препаратів є препарати тканин раннього онтогенезу [7]. Однак більшість геропротекторів тканинного походження, що застосовувалися, мали в складі лише поліпептидні складові в невеликій кількості. Підвищення кількості активних сполук та строку дії препаратів можливо завдяки імплантації фрагментів тканини, отриманої в найбільш активний період її функціонування із застосуванням кріотехнологій. Предметом даного дослідження стала хоріальна тканина (ХТ) ранніх строків гестації. Хоріон, що є попередником плаценти, активно синтезує і секретує біологічні сполуки, завдяки яким відбудовуються і розвиваються всі органи і клітини внутрішньоутробного плоду, в тому числі структури серцево-судинної системи. Імплантація фрагментів хоріона пацієнтам похилого віку, на нашу думку, повинна відновлювати адаптаційні можливості серцево-судинної системи.

Метою роботи було визначення впливу імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів.

Матеріал і методи. ХТ вилучали у ранньовагітних (10 днів вагітності) щурів лінії Wistar гострим шляхом. Фрагменти ХТ розмірів 0,3×0,3×0,3 см відмивали, заморожували під захистом 7 % ДМСО по двохетапній програмі: на першому етапі — із швидкістю 1 °С/хв до –20 °С, на наступному етапі — шляхом занурення у рідкий азот до –196 °С, розморожували при 40 °С на водяній бані.

Деконсервовану ХТ імплантували під місцевою інфільтраційною анестезією 0,5 % розчином новокаїну паравертебрально під шкіру самцям щурів лінії Wistar віком 21 місяць. Тварин розподілили на три групи (по 10 в кожній): 1-ша — інтактні; 2-га — хібнооперовані; 3-тя (основна) — з імплантацією ХТ. Функційні навантаження проводили шляхом нагріву експериментальних тварин у термостаті при 40 °С 30 хв 1 раз у тиждень. Усім тваринам проводили ЕКГ до імплантації, після неї, в динаміці функційних нагрузок протягом 6 тижнів. ЕКГ реєстрували на кардіографі ЕКНТМ «Малиш» із застосуванням голкових електродів. Через 6 тижнів тварин виводили з експерименту, проводили гістологічне дослідження міокарда після приготування парафінових зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином.

Експерименти на тваринах проводились згідно з «Загальними принципами експери-

© О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, В.Ю. Прокопюк, 2011

ментів на тваринах», що затверджені III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) та узгоджені з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Результати та їх обговорення. На початкових етапах дослідження (до проведення гіпертермічних навантажень) у щурів реєструвалася стабільна ЕКГ без істотних ознак патології. Виключення складали одиничні порушення серцевого ритму, що виявлялися у вигляді тахікардії, а так само в зміні амплітуди окремих зубців ЕКГ. Ці порушення були нерегулярні, виникали у тварин з початку проведення реєстрації та, ймовірно, були наслідком стресу тварини на часткову іммобілізацію, а також підшкірне введення електродів, що реєструють. Зміни в картині ЕКГ здобували чітку спрямованість після того, як тварини були піддані впливу гіпертермії. У більшості тварин усіх експериментальних груп спостерігалось загальне зниження вольтажу компонентів ЕКГ. Однак дані порушення були більш характерні для інтактних та хібнооперованих тварин, криві ЕКГ у деяких з них мали виражений сплюснений вид. У середньому амплітуда R зубця в ЕКГ цих тварин була на 20–30 % нижче, ніж у щурів, яким імплантувалася ХТ. Електрокардіограми щурів 1-ї і 2-ї груп відрізнялися так само амплітудою зубця Т. Подібні зміни свідчать про зниження швидкості і рівня реполяризації міокарда в старості. В деяких тварин 1-ї і 2-ї групи відмічалися ознаки перевантаження правих відділів серця. Реєструвалася розширення комплексу QRS.

Також серед порушень ЕКГ у щурів цих груп слід зазначити ефект електричної альтернації — чергування мінімуму і максимуму амплітуди зубця R, що може вказувати на нестабільність коронарного кровообігу. Динаміка (відновлення) показників ЕКГ у щурів 3-ї (основної) групи істотно відрізнялася від такої у щурів інших груп. Показники ЕКГ у тварин з імплантацією ХТ нормалізувалися протягом 10–40 хв, тоді як у хібнооперованих й інтактних тварин — зберігалися зміненими і через годину після функціонального навантаження (рис. 1).

Зазначена нормалізація електрофізіологічних процесів у міокарді старих тварин знаходить своє відображення в нормалізації морфологічної картини міокарда, досліджуваних тканин лабораторних тварин, котра мала ряд закономірностей.

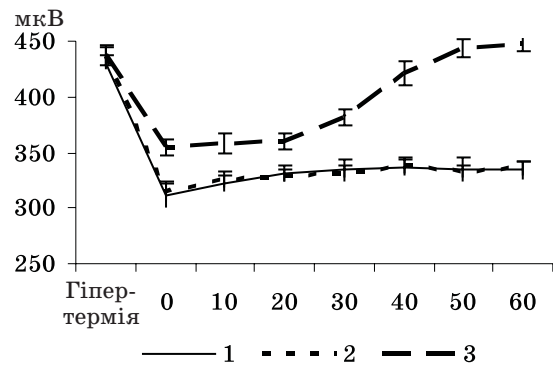


Рис. 1. Динаміка вольтажу зубця R ЕКГ підслідних тварин після гіпертермії: 1 — інтактні тварини; 2 — хібнооперовані тварини; 3 — щурі основної групи (після імплантації ХТ)

У старих тварин 1-ї і 2-ї груп міокард мав пухкий вигляд, м'язові волокна здебільшого були стоншені, хоча виявлялися і стовщені волокна. Відповідно, ядра більшості мікардіоцитів різко гіперхромні, витягнутої форми, унаслідок чого діаметр таких ядер був істотно зменшеним — $(2,10 \pm 0,01)$ мкм. Міокардіоцити з діаметром $(4,10 \pm 0,02)$ мкм зустрічалися рідко. Цитоплазма місцями здобувала відтінок базофілії, поперечна посмугованість здебільшого відсутня. Ендомізій також був представлений фіброцитами з гіперхромними ядрами. У різних відділах міокарда спостерігалися невеликі ділянки м'язових волокон з фрагментацією (некротичні і паранекротичні явища). Міграція макрофагів до ділянок некрозу була слабовиражена (рис. 2).

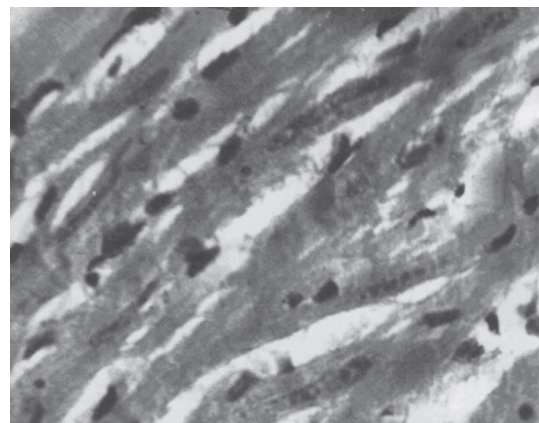


Рис. 2. Міокард щурів 1-ї групи. Забарвлення гематоксилином та еозином, × 400

Наслідками імплантації кріоконсервованої ХТ (у тварин 3-ї, основної, групи) визначено морфофункціональну активізацію частини ядер міокардіоцитів, раніш гіперхром-

них, міокардіоцитів з пікнотичними ядрами, з великими, овальної форми, еухромними ядрами: діаметр — $(4,40 \pm 0,02)$ мкм. Крім того, всі ділянки ушкодження міокардіоцитів були оточені макрофагами. Базофілія цитоплазми не спостерігалася (рис. 3).

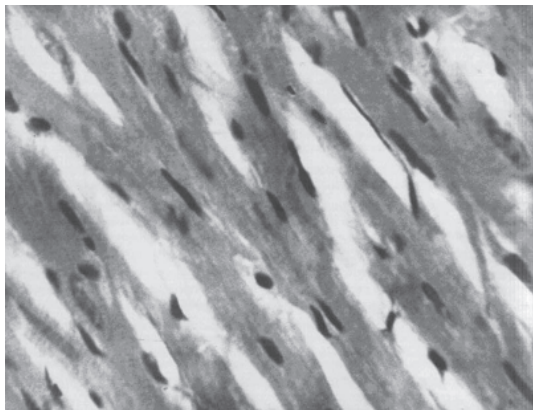


Рис. 3. Міокард щурів 3-ї (основної) групи. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$

В деяких зразках міокарда тварин після імплантації ХТ спостерігались волокна серцевого м'яза, утвореного окремими міокардіоцитами, що виглядали розгалуженими чи анастомозуючими з добре помітною поперечно-смугастою посмугованістю. Кожен

міокардіоцит мав, звичайно, одне ядро середнього ступеня гетерохромності, розташоване приблизно в центрі клітини. Щільнопоподібний простір між анастомозуючими волокнами містив ендомізій, у якому проходили капіляри і лімфатичні судини. Слід зазначити, що така структура міокарда характерна для тварин молодого і середнього віку.

У тварин 1-ї і 2-ї груп таких змін не виявлено.

Таким чином, підшкірна імплантація ХТ старій тварині зумовлює збільшення ступеня еухромності ядер міокардіоцитів, що можна вважати проявом посилення процесу синтезу в ядрі інформаційної РНК, наслідком чого є відновлення білків цитоплазми, у першу чергу, міофібрил. Отже, відбувається «омолодження» міокардіоцитів, здатних, як відомо, тільки до внутрішньоклітинної регенерації. Крім того, спостерігається посилення макрофагальної функції, що може бути результатом активізації неспецифічного імунітету.

Таким чином, імплантація кріоконсервованої ХТ підвищує функціональні та адаптаційні можливості міокарда в похилому віці після навантаження, що пояснюється відновленням структури міокардіоцитів та компонентів сполучної тканини міокарда.

Список літератури

1. Pfister O. Heart failure in the elderly O. Pfister, P. Buser, H. Brunner-La Rocca // *Ther. Umsch.* — 2011. — V. 68, № 2. — P. 107–112.
2. Ахаладзе Н. Г. Артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и биологический возраст / Н. Г. Ахаладзе // *Проблемы старения и долголетия.* — 2010. — Т. 19, № 3. — С. 262–263.
3. Fleg J. L. Cardiovascular drug therapy in the elderly: benefits and challenges / J. L. Fleg, W. S. Aronow, W. H. Frishman // *Nat. Rev. Cardiol.* — 2011. — V. 8, № 1. — P. 13–28.
4. Анисимов В. Н. Средства профилактики ускоренного старения (геропротекторы) / В. Н. Анисимов // *Успехи геронтологии.* — 2000. — Вып. 4. — С. 55–74.
5. Купраш Л. П. Взаимодействие лекарств и пищи в гериатрической практике / Л. П. Купраш // *Проблемы старения и долголетия.* — 2011. — Т. 20, № 2. — С. 197–202.
6. Uhrhan T. The effect of medications on the risk of falling in elderly patients / T. Uhrhan, M. Govercin, M. Schaefer // *Med. Monatsschr. Pharm.* — 2010. — V. 33, № 11. — P. 418–426.
7. Хавинсон В. Х. Избранные лекции по геронтологии / В. Х. Хавинсон, С. С. Коновалов. — М. : Прайм-Еврознак, 2009. — 976 с.

О.С. Прокопюк, В.В. Чижевский, В.Ю. Прокопюк

ВЛИЯНИЕ ИМПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ХОРИАЛЬНОЙ ТКАНИ НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИОКАРДА СТАРЫХ КРЫС

Исследовали влияние имплантации кріоконсервированной хоріальної ткани на морфофункціональне стан міокарда старих крыс. Аналізували електрофізіологічні показателі та морфологічну структуру міокарда після навантаження. Продемонстровано, що імплантація кріоконсервированной хоріальної ткани підвищує функціональні та адаптаційні можливості міокарда після навантаження, що об'яснюється відновленням структури міокардіоцитів та компонентів з'єднаної тканини міокарда.

Ключевые слова: хоріальна тканина, імплантація, кріоконсервирование, міокард, геронтологія.

O.S. Prokopjuk, V.V. Chizhevsky, V.Y. Prokopjuk

EFFECTS OF CRYOPRESERVED CHORIONIC TISSUE IMPLANTATION ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF MYOCARDIUM OF OLD RATS

The effects of cryopreserved chorionic tissue implantation on the morphofunctional state of the myocardium of old rats were studied. The electrophysiological parameters and morphological structure of infarction even after exercise were investigated. Demonstrated, that implantation cryopreserved chorionic tissue enhances the functionality and adaptive capabilities of myocardium after exercise, due to restoration of the structure of myocardiocytes and connective tissue components.

Key words: *chorionic tissue, implantation, cryopreservation, myocardium, gerontology.*

УДК 616-089.843

Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, Р.М. Борис, М.П. Комаров

*Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин
МОЗ України, м. Київ*

КЛІТИННА ТРАНСПЛАНТАЦІЯ: ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ ТА ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ

В останні роки прискореними темпами розвивається новий напрямок медичної галузі — клітинна трансплантація. На даний час науково-дослідні розробки виходять за межі лабораторій та втілюються в клінічну практику. Перші результати практичного застосування клітинних трансплантатів (у тому числі в Україні) вказують на перспективність застосування клітинної трансплантації в лікуванні низки тяжких захворювань.

Ключові слова: *стовбурові клітини, трансплантація.*

Жоден розділ науки не викликав такої прискіпливої уваги, наукової та суспільної полеміки, як дослідження стовбурових клітин як ауто-, так і алогенного походження.

Незважаючи на те що перше повідомлення про існування стовбурової клітини було оприлюднене А. Максимовим у 1908 р. на з'їзді гематологічного товариства в Берліні, статус великої науки ця галузь клітинної біології отримала лише в останні десятиріччя ХХ століття, а перші цілеспрямовані дослідження стовбурових клітин, а саме ембріональних, розпочалося лише у 1963 р.

В результаті досліджень була встановлена спроможність виділених стовбурових клітин під дією різних цитокінів або субстратів диференціюватися *in vitro*, що обумовило перспективу подальших досліджень та відкрило нові горизонти використання клітинного матеріалу в трансплантології.

Усвідомлення важливої ролі стовбурових клітин у медицині та біології відбувалося в упереджуваному режимі. Хоча за 1999 р. по даній проблемі було опубліковано лише 4–5 фундаментальних публікацій, провідні біотехнологічні компанії вже запатентували близько 2500 патентів на технології, пов'язані з маніпулюванням стовбуровими клітинами.

Цікавість та аргументи провідних біологів і медиків до проблеми стовбурових клітин зумовлені їх унікальними та повністю не дослідженими можливостями, наявністю факторів росту, цитокінів, соматомединів, гор-

монів, ферментів та здатністю до трансдиференціації власне трансплантованих клітин.

Останніми роками в медичній і біологічній науках відбулися значні події, що значною мірою пов'язані з техногенним прогресом у галузі фармакологічних та медичних технологій, які обумовили шляхи розвитку клітинної трансплантації, а саме: застосування клітин ембріофетального походження, диференційованих аутологічних (виділених з кісткового мозку, жирової тканини тощо), а також клітин позафетального походження (кордова кров, мезенхімальні клітини, виділені з плаценти, пуповини тощо).

Використовуючи клітинний матеріал, біотехнологічні компанії (наприклад, біофармацевтична компанія «Heron») виробляють препарати та біоматеріали, які вже використовуються для замісної клітинної терапії, а також у перспективі зможуть створювати штучні органи для коротко- та довгострокового використання.

Окрім того, у деяких ситуаціях використання клітинних трансплантатів може стати альтернативою органної трансплантації органів, оскільки клітинна та тканинна терапія значною мірою вирішують терапевтичні завдання, які досягаються трансплантацією органів.

На даний час клінічне застосування клітинних трансплантатів за кордоном (США, Європі тощо) переважно обмежується 2–3-ю стадією клінічних випробувань. Але отримані попередні результати дозволяють

© Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, Р.М. Борис, М.П. Комаров, 2011

із впевненістю стверджувати, що, використовуючи клітинні трансплантати, можна лікувати хворих на цукровий діабет, онкогематологічні захворювання, хворобу Альцгеймера, анемії різного генезу, захворювання печінки тощо.

В Україні також ряд науково-дослідних установ займаються проблемою практичного використання стовбурових клітин. На даний час Координаційним центром трансплантації органів, тканин і клітин відповідно до Постанови Кабінету Міністрів України від 05.09.07 № 1100 та наказу МОЗ України від 10.10.07 № 630 (зареєстрований в Міністерстві юстиції 25.10.07 за № 1206/14473) «Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань тканинних та клітинних трансплантатів та експертизи матеріалів клінічних випробувань» лише 4 медичним центрам (Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН, Інститут невідкладної та відновної хірургії ім. В.К. Гусака НАМН, Національна академія післядипломної освіти ім. П.М. Шупика МОЗ України, Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, НАМН та МОЗ) надано офіційний дозвіл на проведення клінічних випробувань клітинних та тканинних трансплантатів. За матеріалами доклінічних досліджень планується надання дозволу Інституту нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН та Київському міському центру трансплантації кісткового мозку, Національному інституту раку МОЗ.

Р.В. Салютин, С.С. Паляниця, Р.Н. Борис, М.П. Комаров

КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ: ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ И ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

В последние годы ускоренными темпами развивается новое направление медицинской отрасли — клеточная трансплантация. В настоящее время научно-исследовательские разработки выходят за границы лабораторий и внедряются в клиническую практику. Первые результаты практического применения клеточных трансплантатов (в том числе в Украине) свидетельствуют о перспективности использования клеточной трансплантации в лечении ряда тяжелых заболеваний.

Ключевые слова: стволовые клетки, трансплантация.

R.V. Salutin, S.S. Paljanitsa, R.N. Boris, M.P. Komarov

CELL TRANSPLANTATION: PERSPECTIVES OF DEVELOPMENT AND PRACTICAL USAGE

A new direction of medical science — cell transplantation is very quickly developing lately. At present scientific research works leave laboratories and are widely introduced in to clinical practice. First result of practical usage of cell transplants (in Ukraine as well) prove the perspective of usage of cell transplantation in treatment of a great number of serious diseases.

Key words: stem cells, transplantation.

За час проведення клінічних випробувань отримані обґрунтовані та переконливі докази перспективності й доцільності використання клітинних трансплантатів (ауто- та алогенного походження) в комплексному лікуванні хронічної ішемії кінцівок, цукрового діабету, вірусних захворювань печінки, опікової хвороби, панкреонекрозу, хронічної реакції «трансплантат проти господаря» тощо. Позитивні результати клінічних досліджень стимулюють подальші науково-дослідні розробки та відкривають нові сфери застосування клітинних і тканинних трансплантатів.

Враховуючи розвиток і перспективу широкого клінічного використання клітинних та тканинних трансплантацій, важливим аспектом є діяльність біотехнологічних лабораторій та банків кріоконсервування анатомічного матеріалу. Особливо це стосується дотримання стандартів та умов виробництва біопрепаратів, гарантування якості та високого рівня життєздатності трансплантата (навіть після довготривалого зберігання) і, що особливо важливо, їх біологічної безпечності.

Таким чином, клітинна трансплантація є перспективним сучасним напрямком розвитку медичної та біологічної науки. Аналіз результатів наукових досліджень і клінічних випробувань свідчить про те, що технології клітинної трансплантації можуть бути запропоновані як високотехнологічний метод надання медичної допомоги пацієнтам із різноманітною патологією.

УДК 615.361.451.014.41

О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ПОЛУЧЕНИЕ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКОВ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ

Разработан способ получения первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, которую возможно в последующем использовать для трансплантации. Исследованы морфологические особенности клеток первичной культуры на различных этапах культивирования. Показано, что в культуре клеток надпочечников новорожденных поросят формируются сферические клеточные колонии и, возможно, происходят процессы клеточной дифференцировки.

Ключевые слова: *первичная культура клеток, надпочечник, сферические клеточные колонии, дифференцировка.*

Трансплантация клеток и тканей все чаще применяется при лечении заболеваний эндокринных органов, сопровождающихся гормональной недостаточностью [1]. Такой подход может являться альтернативой заместительной гормональной терапии, поскольку в организме реципиента создается пул клеток, секретирующих гормоны в зависимости от физиологического состояния организма и в соответствии с его потребностями.

При лечении первичной и вторичной гормональной надпочечниковой недостаточности доказана эффективность трансплантации клеточных и органотипических культур надпочечников [2–4]. Однако органотипическая культура надпочечных желез при длительном культивировании не проявляет пролиферативной активности, что связано с нарушением ее трофической поддержки и накоплением вредных продуктов обмена веществ. Такая культура деградирует на 5–70-е сутки культивирования. В связи с этим актуальной является проблема получения первичной культуры клеток (ПКК) надпочечников и разработки метода ее длительного хранения. Культивирование клеток в виде монослоя позволяет хранить биологический материал до момента трансплантации длительное время. Кроме того, путем множественных пассажей можно в несколько раз увеличить количество клеток, а также произвести их дифференцировку в определенном направлении.

Наиболее перспективными донорами тканей и клеток для трансплантации человеку являются свиньи. При этом предпочтительнее получать биологический материал от новорожденных животных, поскольку он содержит большее количество прогениторных клеток, а также обладает меньшей иммуногенностью, чем клетки и ткани взрослых животных. Кроме того, клетки новорожденных животных более устойчивы к действию ишемии, что позволяет снизить потери ценного материала в процессе его получения. На сегодняшний день нет данных об особенностях получения и культивирования клеток надпочечников новорожденных поросят, поэтому, учитывая потенциальную возможность использования этих клеток в клинической практике, проблема их культивирования остается актуальной.

Первичные культуры клеток надпочечников применяются главным образом для изучения их гормонопродуцирующей активности *in vitro* при длительном культивировании, а также *in vivo* при трансплантации. Однако в последнее время все больше внимания уделяется изучению клеточного состава надпочечных желез, особенно активно исследуются свойства стволовых/прогениторных клеток коры и мозгового вещества и их способность к дифференцировке *in vitro* [5–7].

Целью работы была разработка способа получения первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, при-

© О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, 2011

годной для трансплантации, и анализ ее морфологических особенностей.

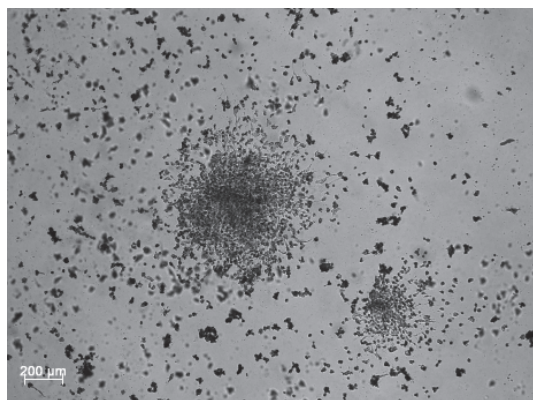
Материал и методы. Для получения клеток надпочечников использовались новорожденные поросята пород крупная белая и украинская мясная, доставленные с Агрокомплекса «Слобожанский» Харьковской области, Чугуевского района, с. Граково.

Надпочечные железы после выделения помещали в среду 199 либо DMEM/F12 (Sigma), измельчали на фрагменты размером приблизительно 1 мм³, которые затем подвергали ферментативной обработке коллагеназой IA (1 мг/мл) и деоксирибонуклеазой (0,10–0,15 мг/мл). Полученные клетки отмывали от ферментов и подсчитывали жизнеспособность клеток с помощью окрашивания трипановым синим. При получении клеток по данной методике жизнеспособность составляла 80–90 %.

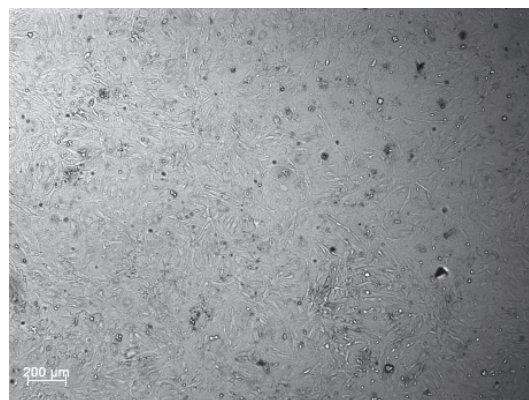
Клетки культивировали во флаконах и 24-луночных планшетах (Sarstedt) при температуре 37 °С и в атмосфере 5 % CO₂. Питательные среды были приготовлены на основе сред 199 либо DMEM/F12, в которые дополнительно добавляли 10 % эмбрио-

нальной телячьей сыворотки, гентамицин (40 мкг/мл) и амфотерицин (5 мкг/мл). Концентрация клеток составляла (1–3)·10⁶ клеток/мл при культивировании во флаконах и (1–3)·10⁵ клеток/мл при культивировании на планшете. Через сутки культивирования производили замену среды, удаляя при этом мертвые и неприкрепившиеся клетки. В дальнейшем замену питательной среды производили каждые 3–4 суток. Клетки, фиксированные в 4 % растворе параформальдегида, окрашивали гематоксилином и эозином. Микрофотосъемку осуществляли с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z.

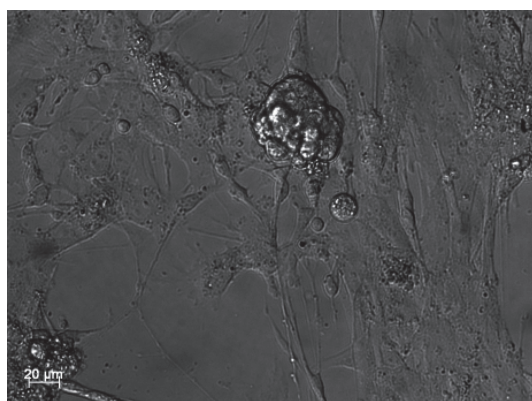
Результаты и их обсуждение. После 1-х суток культивирования клетки прикреплялись к поверхности, некоторые из них распластывались (рисунок, а). Судя по морфологическим признакам, в культуре имели место крупные фибробластоподобные клетки, а также небольшие округлые гормонопродуцирующие клетки, содержащие характерные гранулы. К 3–4-м суткам образовывался монослой, состоящий из фибробластоподобных и веретенообразных



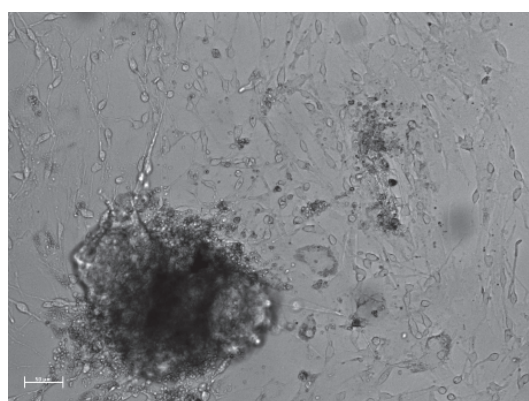
а



б



в



г

Первичная культура клеток надпочечников новорожденных поросят на различные сутки культивирования: а — 2-е сутки; б — 4-е сутки; в — 7-е сутки; г — 10-е сутки

клеток и достигающий 80 % конfluenceности (рисунок, б). В дальнейшем на клетках монослоя формировались многоклеточные агрегаты шарообразной формы (рисунок, в). Нами было замечено, что при дальнейшем культивировании из таких сферических колоний выселялись клетки необычной морфологии. В отличие от клеток первичного монослоя, они представляли собой относительно мелкие округлые нейроноподобные клетки с двумя длинными отростками (рисунок, з).

Поскольку для получения клеток использовался целый орган, изначально первичная культура была неоднородна по своему клеточному составу и могла содержать гормонопродуцирующие клетки коры и мозгового вещества надпочечников, а также нервные, эндотелиальные и соединительнотканые клетки. Однако к 3-м суткам культивирования монослой состоял в основном из фибробластоподобных клеток, а округлые гранулярные клетки (являющиеся скорее всего гормонопродуцирующими) из первичной культуры исчезли. Это может быть связано с тем, что дифференцированные гормонопродуцирующие клетки не способны к пролиферации и имеют ограниченное время существования. В то же время интенсивно пролиферирующие фибробласты приводят к быстрому истощению среды, конкурируя за питательные вещества с остальными типами клеток.

В последнее время особый интерес у исследователей вызывает изучение недифференцированных клеток надпочечников. Такие клетки поддерживают клеточный состав и отвечают за зональную дифференцировку коры надпочечников [6]. Недифференцированные клетки мозгового вещества надпочечников рассматриваются как источник материала для трансплантаций при лечении нейродегенеративных заболеваний [8–10], поскольку под влиянием определенных ростовых факторов из них могут быть получены полноценные нейроны [7, 11]. Возможности дифференцировки клеток мозгового вещества в нейрональном направлении связаны с ее эмбриональным происхождением, так как хромоаффинные клетки мозгового вещества и симпатические нейроны принадлежат к клеткам симпатoadrenalовой линии и имеют общего предшественника [12, 13]. Развитие клетки-предшественника по эндокринному или нейрональному пути определяется набором специфических факторов, выделяемых клетками микро-

окружения [14]. Предположив, что в мозговом веществе надпочечников могут в недифференцированном состоянии сохраняться клетки-предшественники симпатoadrenalовой линии, ученые занимались их выделением и изучали возможности их направленной дифференцировки [7, 9, 11].

Для выделения недифференцированных клеток из общей суспензии используется метод, основанный на способности таких клеток к пролиферации в суспензионной культуре. При этом они формируют так называемые сферы — клеточные скопления шарообразной формы. Таким методом были выделены недифференцированные клетки нервной системы [15, 16], щитовидной железы [17], роговицы [18], молочной железы [19].

Показано, что в культуре клеток надпочечников быка также формируются сферические структуры-хромосферы, клетки которых под влиянием определенных ростовых факторов и гормонов дифференцируются в хромоаффинные клетки, а также нейроны [7]. Так, под действием фактора роста нервов (NGF) клетки хромосфер формируют отростки, экспрессируют нейронспецифические маркеры, а также генерируют потенциал действия, т. е. приобретают характерные свойства зрелых нейронов. При культивировании в среде с высоким содержанием глюкокортикоидов развитие нейрональных признаков тормозится и формируются хромоаффинные клетки [11]. Интересно, что у млекопитающих были обнаружены клетки, одновременно экспрессирующие маркеры, характерные как для хромоаффинных клеток, так и для нейронов [7, 20].

В нашем эксперименте из сферических колоний при дальнейшем культивировании выселялись клетки, морфологически отличающиеся от клеток первичного монослоя. Поскольку клеток такого типа мы не наблюдали на начальных стадиях культивирования, можно предположить, что они появились в результате дифференцировки прогениторных клеток, находящихся в культуре. Возможно, источником таких недифференцированных клеток могут быть сферические многоклеточные структуры, появляющиеся в ПКК на более поздних сроках культивирования. В связи с этим сферы, формирующиеся на монослое в нашем эксперименте, могут являться интересным объектом для исследования направленной дифференцировки клеток под действием различных ростовых факторов и требуют тщательного изучения.

Выводы

1. Разработан способ получения клеток надпочечников новорожденных поросят, а также подобраны условия для их культивирования.

2. Показана неоднородность первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят, наличие морфологически отличающихся типов клеток и возможность их дифференцировки в разных направлениях.

Список литературы

1. Lee M. K. Cell transplantation for endocrine disorders / M. K. Lee, Y. H. Bae // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2000. — V. 42, № 1–2. — P. 103–120.
2. Легащ Е. И. Опыт клинического использования криоконсервированной адренкортикальной ткани / Е. И. Легащ // *Проблемы криобиологии.* — 2000. — № 3. — С. 85–90.
3. Adrenal cortical cell transplantation / J. C. Y. Dunn, Y. Chu, M. M. Lam [et al.] // *J. Pediatr. Surg.* — 2004. — V. 39, № 12. — P. 1856–1858.
4. Transplantation of H-2Kb-transgenic adrenocortical cells in the mouse having undergone an adrenalectomy: functional and morphological aspects / H. Seeliger, M. W. Hoffmann, M. Behrend [et al.] // *Transplantation.* — 2000. — V. 69, № 8. — P. 1561–1566.
5. In search of adrenocortical stem and progenitor cells / A. C. Kim, F. M. Barlaskar, J. H. Heaton [et al.] // *Endocrine Reviews.* — 2009. — V. 30, № 3. — P. 241–263.
6. Kim A. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances / A. Kim, G.D. Hammer // *Mol. Cell Endocrinol.* — 2007. — V. 265–266. — P. 10–16.
7. Chung K. F. Isolation of neural crest derived chromaffin progenitors from adult adrenal medulla / K. F. Chung, F. Sicard, V. Vukicevic // *Stem cells.* — 2009. — V. 27. — P. 2602–2613.
8. Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances / J. Sagen, H. Wang, P. A. Tresco [et al.] // *J. of Neuroscience.* — 1993. — V. 73, № 6. — P. 2415–2423.
9. Transplant of cultured neuron-like differentiated chromaffin cells in a Parkinson's disease patient. A preliminary report / R. Drucker-Colin, L. Verdugo-Diaz, C. Morgado-Valle [et al.] // *Arch. Med. Res.* — 1999. — V. 30, № 1. — P. 33–39.
10. Cells of the sympathoadrenal lineage: biological properties as donor tissue for cell-replacement therapies for Parkinson's disease / E. FernandezEspejo, J. A. Armengol, J. A. Flores [et al.] // *Brain Res. Rev.* — 2005. — V. 49, № 2. — P. 343–354.
11. Doupe A. J. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity / A. J. Doupe, S. C. Landis, P. H. Patterson // *J. of Neuroscience.* — 1985. — V. 5, № 8. — P. 2119–2142.
12. Huber K. The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives / K. Huber // *Developmental Biology.* — 2006. — V. 298. — P. 335–343.
13. Langley K. Molecular markers of sympathoadrenal cells / K. Langley, N. J. Grant // *Cell Tissue Res.* — 1999. — V. 298. — P. 185–206.
14. Hall B. K. Effects of growth factors on the differentiation of neural crest cells and neural crest cell-derivatives / B. K. Hall, S. Ekanayake // *Int. J. Dev. Biol.* — 1991. — V. 35. — P. 367–387.
15. Li H.-Y. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia / H.-Y. Li, H. M. S. Evonne, Z. Xin-Fu // *Stem cells.* — 2007. — P. 2053–2065.
16. Direct isolation of human central nervous system stem cells / N. Uchida, D. W. Buck, D. He [et al.] // *PNAS.* — 2000. — V. 97, № 26. — P. 14720–14725.
17. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes / L. Lan, D. Cui, K. Nowka [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2007. — V. 92, № 9. — P. 3681–3688.
18. Sphere formation and expression of neural proteins by human corneal stromal cells in vitro / S. Uchida, S. Yokoo, Y. Yanagi [et al.] // *IOVS.* — 2005. — V. 46, № 5. — P. 1620–1625.
19. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells / G. Dontu, W. M. Abdallah, J. M. Foley [et al.] // *Genes & Development.* — 2003. — V. 17. — P. 1253–1270.
20. Mammalian adrenal chromaffin cells coexpress the epinephrine-synthesizing enzyme and neuronal properties in vivo and in vitro / M. E. Ehrlich, M. Evinger, S. Regunathan [et al.] // *Dev. Biol.* — 1994. — V. 163, № 2. — P. 480–490.

О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Є.І. Легащ, Т.П. Бондаренко

ОТРИМАННЯ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

Розроблено спосіб отримання первинної культури клітин надниркових залоз новонароджених поросят, яка в подальшому може бути використана для трансплантації. Досліджено

морфологічні особливості клітин первинної культури на різних етапах культивування. Показано, що в культурі клітин надниркових залоз новонароджених поросят утворюються сферичні клітинні колонії та, можливо, відбуваються процеси клітинного диференціювання.

Ключові слова: первинна культура клітин, надниркова залоза, сферичні клітинні колонії, диференціювання.

O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko

OBTAINING OF NEWBORN PIG ADRENAL PRIMARY CELL CULTURE

The method for obtaining of newborn pig adrenal primary cell culture, which may subsequently be used for transplantation, was developed. The morphological features of primary cell culture were investigated during different stages of plating. It was shown, that spherical cell colonies were formed within newborn pig adrenal primary cell culture, and perhaps there are processes of cell differentiation.

Key words: primary cell culture, adrenal gland, spherical cell colonies, differentiation.

УДК 618.393.018.82:616.832-0011

А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ВЛИЯНИЕ ФЕТАЛЬНЫХ НЕРВНЫХ КЛЕТОК НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ КОНЕЧНОСТЕЙ КРЫС С ТРАВМАТИЧЕСКИМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ СПИННОГО МОЗГА

Изучали эффективность и безопасность трансплантации фетальных нервных клеток крысам с экспериментальным травматическим повреждением спинного мозга. Было показано, что трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов крыс животным с экспериментальным повреждением спинного мозга оказывает стимулирующее воздействие на процессы восстановления спинного мозга крыс и не приводит к формированию злокачественных и доброкачественных образований, что позволяет говорить о безопасности их трансплантации.

Ключевые слова: фетальные нервные клетки, повреждение спинного мозга, трансплантация, безопасность.

Причиной возникновения нейродегенеративных болезней является гибель нейронов и клеток глии вследствие либо острых (инсульт, травматические повреждения головного и спинного мозга), либо хронических (болезнь Паркинсона, амиотрофический боковой склероз, болезнь Альцгеймера) повреждений мозга. Для восстановления потерянных нервных клеток можно использовать трансплантацию нервных стволовых клеток или их производных, например, нейробластов [1].

Одним из наиболее перспективных источников клеток для такой клеточной терапии являются фетальные нервные ткани. Последние представляют собой гетерогенную смесь, которая главным образом состоит из дифференцированных, прогениторных и стволовых клеток. Однако в связи с потенциальной плюрипотентностью фетальных клеток и их высокой пролиферативной активностью существует опасность возникновения аберрантных клеток, что может привести к образованию опухолей. Поэтому вопрос безопасности требует тщательного изучения до использования фетальных нервных клеток в терапевтических целях.

Исходя из этого, целью работы явилось изучение эффективности и безопасности трансплантации фетальных нервных клеток крысам с экспериментальным травматическим повреждением спинного мозга.

Материал и методы. Нервные клетки получали из тканей мозга плодов крыс 15–16 дней гестации. Для этого ткань мозга помещали в 0,25 % раствор трипсина, инкубировали 5 минут при 37 °С, затем переносили в питательную среду DMEM/F12, содержащую 10 % сыворотки крови крыс, и механически дезагрегировали на единичные клетки. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновый фильтр. Жизнеспособность клеток оценивали по исключению 0,4 % красителя трипанового синего. Подсчет жизнеспособности и количества нервных клеток производили в камере Горяева.

Замораживание нервных клеток проводили в среде культивирования при наличии 10 % ДМСО со скоростью 1 °С/мин до –80 °С, после чего контейнеры с клетками помещали в жидкий азот.

Для определения жизнеспособности нервных клеток культивировали в 24-луночных планшетах (Corning, США) в среде DMEM/F12 (Sigma), обогащенной 0,6 % глюкозы, 2 мМ глутамина, 3 мМ бикарбоната натрия, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки.

Культуры нервных клеток иммуноцитохимически окрашивали на наличие специфического маркерного белка нейронов β -тубулин III [2].

Формирование модели травматического повреждения спинного мозга проводили на лабораторных крысах-самцах массой 250–

© А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко, 2011

400 г. Операцию проводили в стерильных условиях под анестезией тиопенталом натрия. Повреждение формировали путем удаления правой сегмента спинного мозга длиной около 2 мм на уровне 10-го позвонка грудного отдела. После этого непосредственно после операции в зону повреждения трансплантировали: 50 мкл среды DMEM/F12 (контроль 1; n=18); 100 мкл 13 % альгинатного геля, смешанного в соотношении 1:1 со средой DMEM/F12 (контроль 2; n=15); 50 мкл деконсервированной суспензии нервных клеток, содержащей 15–20 млн клеток (клеточная терапия 1; n=14) и 100 мкл 13 % альгинатного геля, смешанного в соотношении 1:1 с деконсервированной суспензией НК, содержащей 15–20 млн клеток (клеточная терапия 2; n=17).

У прооперированных животных регистрировали двигательные функции и болевую чувствительность задних конечностей через 1 неделю, 1, 6 и 12 месяцев.

Результаты и их обсуждение. Жизнеспособность свежeweделенных нервных клеток, определенная по окрашиванию трипановым синим, составляла $(55 \pm 7) \%$. После замораживания–оттаивания жизнеспособность НК уменьшалась и составляла $(36 \pm 9) \%$. Через 7 суток культивирования клетки, посеянные в концентрации 4 млн/мл, формировали монослой на 100 % площади лунки. Морфологически большинство этих клеток представляли собой клетки глии. Однако в монослое также отмечалось небольшое количество β -тубулин-III-положительных клеток, которые характеризовались нейрональной морфологией.

Прооперированные животные характеризовались устойчивым нарушением двигательной функции задних конечностей.

Через 1 неделю после операции животные как контрольной группы, так и группы, которой вводили в зону повреждения альгинатный гель, характеризовались ограниченной подвижностью левой задней конечности и полной неподвижностью и отсутствием

болевого чувствительности — правой. Через 1 месяц после операции наблюдалось существенное восстановление чувствительности левой задней конечности вплоть до полной нормализации. При этом у животных обеих групп было отмечено восстановление болевой чувствительности правой задней конечности, однако ее подвижность или вообще не восстанавливалась, что сопровождалось атрофией мышц, или восстанавливалась в очень незначительной степени и ограничивалась появлением мышечного тонуса. У животных обеих групп также наблюдался парез правой половины брюшной стенки. В ходе дальнейшего наблюдения на протяжении 12 месяцев подвижность задних конечностей медленно восстанавливалась, но полного восстановления не происходило.

Животные, которым вводили в зону повреждения только суспензию деконсервированных нервных клеток и такую же суспензию, смешанную с альгинатным гелем, через 1 неделю после операции характеризовались отсутствием подвижности и чувствительности в правой задней конечности и слабым мышечным тонусом или ограниченной подвижностью — левой. Через 1 месяц после операции наблюдалось значительное восстановление чувствительности левой задней конечности, а также ограниченное восстановление подвижности правой — животные на нее опирались, наблюдался хватательный рефлекс пальцев. Через 6 месяцев после операции степень подвижности обеих конечностей прогрессивно восстанавливалась, также наблюдалось восстановление атрофированных мышц. На протяжении последующих 6 месяцев наблюдалось медленное восстановление подвижности задних конечностей. Однако незначительные нарушения подвижности правой задней конечности сохранялись спустя 12 месяцев после трансплантации.

За время наблюдений никаких злокачественных или доброкачественных образований ни у 1 из 35 прооперированных под-



Фрагменты спинного мозга крыс через 4 месяца после трансплантации в зону повреждения (стрелка) альгинатного геля с фетальными нервными клетками (а) и без них (б)

опытных животных, которым были трансплантированы фетальные клетки, выявлено не было.

В то же время при введении геля с клетками (рисунок, а) в зону повреждения улучшался процесс восстановления нервной ткани относительно такового при введении только альгинатного геля (рисунок, б).

Таким образом, трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов

крыс животным с экспериментальным повреждением спинного мозга оказывает стимулирующее воздействие на процессы восстановления спинного мозга крыс.

Трансплантация криоконсервированных нервных клеток плодов крыс не приводит к формированию ни злокачественных, ни доброкачественных образований, что позволяет говорить о безопасности их трансплантации.

Работа выполнена при поддержке гранта УНТЦ (проект № 4419).

Список литературы

1. Сукач А. Н. Клеточная терапия нейродегенеративных болезней: источники клеток и стратегия их применения / А. Н. Сукач, В. И. Грищенко // Успехи современной биологии. — 2007. — Т. 127, № 1. — С. 25–33.
2. Сукач А. Н. Характеристика эмбриональных нервных клеток человека, полученных неферментативным способом / А. Н. Сукач // Цитология. — 2005. — Т. 47, № 3. — С. 207–213.

О.М. Сукач, О.С. Лебединський, О.В. Оченашко, О.Ю. Петренко

ВПЛИВ ФЕТАЛЬНИХ НЕРВОВИХ КЛІТИН НА ВІДНОВЛЕННЯ РУХЛИВОСТІ КІНЦІВОК ЩУРІВ З ТРАВМАТИЧНИМ УШКОДЖЕННЯМ СПИННОГО МОЗКУ

Вивчали ефективність і безпеку трансплантації фетальних нервних клітин щурам з експериментальним травматичним ушкодженням спинного мозку. Було показано, що трансплантація криоконсервованих нервних клітин плодів щурів тваринам з експериментальним ушкодженням спинного мозку чинить стимулюючу дію на процеси відновлення спинного мозку щурів і не призводить до формування злоякісних і доброякісних утворень, що дозволяє говорити про безпеку їх трансплантації.

Ключові слова: фетальні нервові клітини, ушкодження спинного мозку, трансплантація, безпека.

A.N. Sukach, A.S. Lebedinsky, O.V. Ochenashko, A.Yu. Petrenko

INFLUENCE OF FETAL NERVOUS CELLS ON RENEVAL OF MOBILITY OF EXTREMITIES OF RATS WITH THE TRAUMATIC DAMAGE OF SPINAL CORD

Efficacy and safety of transplantation of fetal neural cells to the rats with the experimental traumatic damage of spinal cord was studied. It was shown, that transplantation of cryopreserved neural cells from rat fetuses in rats with the experimental damage of spinal cord stimulates processes of renewal of spinal cord of animals and does not result either in malignant or innocent tumor growth, that allows to conclude safety of fetal cell transplantation.

Key words: fetal neural cells, damage of spinal cord, transplantation, safety.

УДК 616-089.843

**Б.М. Тодуров, Г.И. Ковтун, С.А. Шелудько, А.О. Шпачук,
А.В. Ревенко, А.В. Михайлова, А.В. Шмидт, А.Н. Поступальский**

*Киевская городская клиническая больница
Киевский городской центр сердца*

ХИРУРГИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Проанализированы результаты лечения 50 больных в терминальной стадии сердечной недостаточности, обусловленной кардиомиопатией, которым было проведено хирургическое лечение. 4 пациентам выполнена ортотопическая трансплантация сердца. Остальным 46 пациентам была выполнена операция по ремоделированию левого желудочка. У некоторых больных проведение частичной резекции левого желудочка сочетали с реконструкцией митрального клапана посредством пластики по Альфиери или имплантации опорного кольца. Ранняя послеоперационная летальность составила 4 %, поздняя послеоперационная летальность составила (2 %).

Ключевые слова: кардиомиопатия, терминальная стадия сердечной недостаточности, трансплантация сердца, хирургическое ремоделирование левого желудочка.

Среди заболеваний, вызывающих развитие терминальной стадии сердечной недостаточности (ТССН), ведущую роль играет дилатационная кардиомиопатия (ДКМП). Смертность больных в ТССН в течение года достигает 100 % [1–5].

Трансплантация сердца в настоящее время является наиболее эффективным методом лечения ТССН, рефрактерной к медикаментозной терапии [1, 2]. Однако проблема дефицита донорских органов обусловила поиск альтернативных методов хирургического лечения. В первую очередь это использование механического сердца [6], имплантация трехкамерных электрокардиостимуляторов с ресинхронизационным сокращением правого и левого желудочков сердца [7–9], а также хирургическое ремоделирование левого желудочка [10–14].

Цель — увеличить продолжительность и улучшить качество жизни больных с ТССН путем разработки оптимального хирургического метода лечения.

Материал и методы. Проанализированы результаты лечения 50 больных в ТССН, обусловленной кардиомиопатией, которым было проведено хирургическое лечение. В план обследования пациентов включалось: электрокардиография, эхокардиография, вычисление сердечного индекса, КВГ, биопсию миокарда, рентгенологическое

исследование легких, контроль биохимических показателей, бактериальные посевы со слизистых, показатели периферической крови.

Ведущие симптомы заболевания обследованных пациентов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинические проявления заболевания у обследованных больных ТССН

| Симптомы | Частота | |
|-----------------------|---------|----|
| | абс. | % |
| Одышка в покое | 43 | 86 |
| Тахикардия | 36 | 72 |
| Периферические отеки | 34 | 68 |
| Хроническая усталость | 36 | 72 |
| Кардиалгии | 22 | 44 |
| Аритмии | 18 | 36 |
| Гипотензия | 16 | 32 |

Систолическое артериальное давление у обследованных пациентов (АДс) регистрировалось в пределах от 90 до 125 мм рт. ст., в среднем — (100,2±5,2) мм рт. ст., диастолическое — от 65 до 70 мм рт. ст., в среднем — (72,5±4,2) мм рт. ст., ЧСС — от 88 до 120 уд/мин, в среднем — (110,2±6,1) уд/мин. Частота дыхания при этом составляла в среднем (24,0±2,1) в минуту (от 20 до

© Б.М. Тодуров, Г.И. Ковтун, С.А. Шелудько и др., 2011

27 в минуту). Инотропную поддержку (5–8 мкг/кг/мин допамина) получали 11 человек (22 %). Декомпенсация кровообращения сопровождалась отеком легких у 4 (8 %) пациентов, асцитом — у 10 (20 %) и гидротораксом — у 12 (24 %).

Все пациенты были внесены в лист ожидания на трансплантацию сердца. 4 пациентам выполнена ортотопическая трансплантация сердца. Все пациенты были мужчинами в возрасте 18–42 года (в среднем — 32,7 года). У 3 из них причиной сердечной недостаточности была идиопатическая дилатационная кардиомиопатия, у 1 — ишемическая кардиомиопатия. Длительность заболевания составляла 16–24 месяца (в среднем 17,2 месяца), функциональный класс (ФК) по NYHA — III.

Комплексная терапия пациентов включала в себя консервативную медикаментозную терапию, направленную на компенсацию состояния пациентов, а также на подготовку к оперативному вмешательству.

Проблема дефицита донорских органов обусловила поиск методов хирургического лечения, которые дали бы возможность увеличить продолжительность жизни больных и их пребывания на листе ожидания.

Остальным 46 пациентам была выполнена операция по ремоделированию левого желудочка. У некоторых больных проведение частичной резекции левого желудочка сочетали с реконструкцией митрального клапана посредством пластики по Альфиери или имплантации опорного кольца (табл. 2) [15, 16]. Возраст пациентов колебался от 25 до 72 лет, в среднем — (45,8±15,4) года. Лиц мужского пола было 92 % (42 пациента), больных женского пола — 8 % (4 пациента).

Разновидности хирургических вмешательств представлены в табл. 2.

Таблица 2. Разновидности хирургических вмешательств у больных с ТССН

| Вид операции | Частота | |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------|-----|
| | абс. | % |
| Сегментарная резекция ЛЖ и его линейная пластика | 15 | 30 |
| Пластика ЛЖ и внутреннее сведение папиллярных мышц | 9 | 18 |
| Пластика ЛЖ и внутреннее сведение папиллярных мышц + пластика МК по Альфиери | 2 | 4 |
| Пластика ЛЖ с рассечением межпапиллярного пространства | 6 | 12 |
| Сегментарная резекция ЛЖ и его пластика с заплатой | 10 | 20 |
| Сегментарная резекция ЛЖ и его пластика с заплатой + пластика МК опорным кольцом | 4 | 8 |
| Всего | 46 | 92* |

* Исключены пациенты, перенесшие трансплантацию сердца.

Результаты. Из пациентов, перенесших трансплантацию, выжило двое. Интраоперационной летальности не было. Послеоперационная летальность составила 4 % в общей группе (2 пациента). У 1 пациента послеоперационный период первые двое суток протекал без особенностей, на 3-и сутки на фоне приема циклоспорина при условии скомпрометированных почек и печени возникла острая печеночно-почечная недостаточность. Пациент умер на 11-е сутки. Второй больной отказался от приема иммуносупрессоров. Повторно госпитализирован через 9 месяцев после операции в связи с острым кризом отторжения. Интенсивная пульс-терапия острого криза отторжения оказалась неэффективной, пациент умер через 9,5 месяца после операции.

Двое выживших пациентов чувствуют себя удовлетворительно. Пациент С. в настоящее время имеет ПФК (в связи с умеренной артериальной гипертензией). Время наблюдения после операции — 8 лет. Пациент М. Послеоперационный период осложнился обострением язвенной болезни двенадцатиперстной кишки с желудочно-кишечным кровотечением, умеренной артериальной гипертензией и умеренно выраженным экссудативным перикардитом, поддавшимся медикаментозному лечению. Время наблюдения после операции — 5 лет. Состояние пациента удовлетворительное.

Среди пациентов, которым была выполнена операция по ремоделированию ЛЖ, удовлетворительные результаты были получены в 36 случаях, что составило 72 %.

В структуре ранних осложнений (табл. 3) ОСН являлась ведущей и была зарегистрирована у 12 пациентов (50 % от количества всех осложнений), что потребовало инфузии адrenomиметиков — допамин, добута-

Таблица 3. Частота осложнений у оперированных пациентов с ТССН

| Осложнения | Частота | |
|-----------------------|---------|----|
| | абс. | %* |
| ОСН | 12 | 24 |
| Аритмии | 5 | 10 |
| ОНМК | 2 | 4 |
| Полная А-В блокада | 2 | 4 |
| Экссудативный плеврит | 3 | 6 |

* Исключены пациенты, перенесшие трансплантацию сердца.

мин в дозах от 5 до 9 мкг/кг/мин, в среднем — $(7,2 \pm 1,8)$ мкг/кг/мин, и вазодилаторов — нитроглицерин от 1,5 до 2,2 мкг/кг/мин, в среднем — $(1,8 \pm 0,4)$ мкг/кг/мин.

Ранняя послеоперационная летальность составила 4 % (2 пациента). Поздняя послеоперационная летальность составила 2 % — 1 больной умер на протяжении первого года наблюдения. В течение 5 лет наблюдения умерло 7 пациентов, что составило 14 %. Причины летальности представлены в табл. 4.

Таблица 4. Сводная таблица летальности больных

| Причины летальных исходов | Частота | |
|-------------------------------------------|---------|----|
| | абс. | % |
| ОССН | 6 | 12 |
| ОНМК | 2 | 4 |
| Тромбоэмболия ЛА | 2 | 4 |
| Острый криз отторжения | 1 | 2 |
| Острая печеночно-почечная недостаточность | 1 | 2 |
| Всего | 12 | 24 |

В послеоперационном периоде пациентам обязательно проводили эхо- и электрокардиографию. При электрокардиографии основное внимание уделялось ритму, ЧСС, отсутствию фибрилляций или трепетания предсердий. При эхокардиографии измеряли толщину стенок ЛЖ, ФВ ЛЖ, сердечный индекс, КДО, КСО, давление в ЛА, наличие жидкости в перикарде. Полученные данные представлены в табл. 5.

Все выжившие пациенты находятся под диспансерным кардиологическим наблюдением с постоянным контролем показателей сердечной гемодинамики и на постоянной медикаментозной поддержке, включая ингибиторы АПФ, антикоагулянты, мочегонные препараты в терапевтических дозах. В конце первого года после операции 60 %

Таблица 5. Динамика показателей эхокардиографии у оперированных пациентов с ТССН

| Показатель | До операции | После операции |
|---------------------------|----------------|----------------|
| Фракция выброса, % | 26 ± 5 | 45 ± 7 |
| КДО ЛЖ, мл | 307 ± 48 | 260 ± 32 |
| Сердечный индекс, л/мин/м | $2,2 \pm 0,2$ | $3,0 \pm 0,4$ |
| Давление в ЛА, мм рт. ст. | $54,0 \pm 3,4$ | $32,4 \pm 2,7$ |
| КСО ЛЖ, мл | 176 ± 35 | 135 ± 33 |

больных отмечали значительное улучшение общего состояния, качества жизни и им не требовалось проведение трансплантации сердца. Однако, несмотря на удовлетворительные и хорошие результаты после оперативного лечения, все они продолжают находиться на листе ожидания как потенциальные кандидаты на пересадку сердца. В ряде случаев хирургическое remodelирование левого желудочка и нормализация внутрисердечной гемодинамики не только явилось «мостом» к трансплантации сердца, но и позволило снять некоторых пациентов с «листа ожидания».

Выводы

1. Трансплантация сердца в настоящее время является наиболее эффективным методом лечения сердечной недостаточности, рефрактерной к медикаментозному или хирургическому лечению.

2. Учитывая возможность развития полиорганной недостаточности у больных в терминальной стадии сердечной недостаточности и возможность потенцирования ее на фоне приема циклоспорина необходимым остается тщательный отбор реципиентов.

3. Проведение частичной резекции левого желудочка дает возможность многим больным избежать трансплантации сердца и уменьшить время ожидания трансплантации сердца другим больным.

4. Кроме сохранения и продолжения жизни, трансплантация сердца несет в себе для пациентов улучшение качества жизни, социальную адаптацию и возвращение к приемлемому образу жизни, но лишь при условии полного и добросовестного соблюдения рекомендаций.

5. Частичная вентрикулектомия левого желудочка и трансплантация сердца являются основными методами лечения больных с терминальной стадией сердечной недостаточности.

Список литературы

1. Hoppe U. C. Current recommendations of the German Cardiac Society for the treatment of chronic heart failure / U. C. Hoppe, M. Bohm, R. Dietz // Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Z Kardiol. — 2005. — V. 94. — P. 488–509.
2. Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): the task force for the diagnosis and treatment of chronic heart failure of the European Society of Cardiology / K. Swedberg, J. Cleland, H. Dargie // Eur. Heart J. — 2005. — V. 26. — P. 1115–1140.
3. Cardiac replacement with a total artificial heart as a bridge to transplantation / J. G. Copeland, R. G. Smith, F. A. Arabia [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2004. — V. 351. — P. 859–867.
4. Long-term mechanical left-ventricular assistance for end-stage heart failure. Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group / E. A. Rose, A. C. Gelijns, A. J. Moskowitz [et al.] // N. Engl. J. Med. — 2001. — V. 345. — P. 1435–1443.
5. Selection and management of ventricular assist device patients: the Mucnster experience / M. C. Deng, M. Weyand, D. Hammel [et al.] // J. Heart Lung Transplant. — 2000. — V. 19 (suppl. 8). — P. 77–82.
6. Barnard C. N. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital. Cape Town / C. N. Barnard // S. Afr. Med. J. — 1967. — V. 41. — P. 1271–1274.
7. Systematic review of the management of atrial fibrillation in patients with heart failure / A. U. Khand, A. C. Rankin, G. C. Kaye [et al.] // Eur. Heart J. — 2000. — V. 21. — P. 614–632.
8. Atrial-fibrillation: current knowledge and recommendations for management. Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology / S. Levy, G. Breithardt, R. W. Campbell [et al.] // Eur. Heart J. — 1998. — V. 19. — P. 1294–1320.
9. Task Force on AHF. Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of AHF: The Task Force on AH F of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J. — 2005. — V. 26. — P. 384–416.
10. Partial left ventriculectomy to improve left ventricular function in end-stage heart disease / R. J. Batista, J. L. Santos, N. Takeshita [et al.] // Card. Surg. — 1999. — V. 11. — P. 96–97.
11. Partial left ventriculectomy to treat end stage heart disease / R. J. Batista, J. Verde, P. Nery [et al.] // Ann. Thorac. Surg. — 1997. — V. 64. — P. 634–638.
12. The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report-1999 / J. D. Hosenpud, L. E. Bennett, B. M. Keck [et al.] // J. Heart Lung Transplant. — 1999. — V. 18. — P. 611–626.
13. The European experience of Novacor left ventricular assist (LVAS) therapy as a bridge to transplant: a retrospective multi centre study / A. El Banayosy, M. Deng, D.Y. Loisanca [et al.] // Eur. J. Cardiothorac. Surg. — 1999. — V. 15. — P. 835–841.
14. Atliaiuisuleas C. L. Surgical ventricular restoration: the Restore Group experience / C. L. Atliaiuisuleas, C. D. Buckberg, A. W. Stanley // Heart Fail. Rev. — 2004. — V. 9. — P. 287–297.
15. Geha A. S. Mitral valve surgery in patients with ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy / A. S. Geha, C. El-Zein, M. G. Massad // Cardiology. — 2004. — V. 101. — P. 15–20.
16. Acker M. A. Clinical results with the Acorn cardiac restraint device with and without mitral valve surgery / M. A. Acker // Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg. — 2005. — V. 17. — P. 361.

Б.М. Тодуров, Г.І. Ковтун, С.О. Шелудько, А.О. Шпачук, О.В. Ревенко, А.В. Михайлова, А.О. Шмідт, О.М. Поступальський

ХІРУРГІЧНЕ ЛІКУВАННЯ ТЕРМІНАЛЬНОЇ СТАДІЇ СЕРЦЕВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Проаналізовано результати лікування 50 хворих в термінальній стадії серцевої недостатності, зумовленої кардіоміопатією, яким було проведено хірургічне лікування. 4 пацієнтам виконана трансплантація серця. Решті 46 пацієнтам була виконана операція з ремоделювання лівого шлуночка. У деяких хворих проведення часткової резекції лівого шлуночка поєднували з реконструкцією мітрального клапана за Альфієрі або імплантації опорного кільця. Рання післяопераційна летальність склала 4 %, пізня післяопераційна летальність склала 2 %.

Ключові слова: кардіоміопатія, термінальна стадія серцевої недостатності, трансплантація серця, хірургічне ремоделювання лівого шлуночка.

B.M. Todurov, G.I. Kovtun, S.O. Sheludko, A.O. Shpachuk, O.V. Revenko, A.V. Mikhailov, A.A. Schmidt, A.M. Postupal

SURGICAL TREATMENT OF END-STAGE HEART FAILURE

The results of treating 50 patients in end-stage heart failure caused by cardiomyopathy, which was carried out surgical treatment is analyzed. 4 patients made heart transplantation. The rest 46 patients surgery was performed on surgical ventricular restoration. In some patients a partial resection of the left ventricle combined with mitral valve reconstruction by Alfieri, or implantation of the reference ring. Early postoperative mortality was 4 %, late postoperative mortality was 2 %.

Key words: *cardiomyopathy, end-stage heart failure, heart transplantation, Surgical ventricular restoration.*

УДК 616.61-089.843

Н.А. Томилина, И.Г. Ким, Е.С. Столяревич, Н.Д. Федорова

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАЗИСНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ ЦИКЛОСПОРИНОМ И ТАКРОЛИМУСОМ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ (АНАЛИЗ 3-ЛЕТНЕГО ОПЫТА)

Такролимус и циклоспорин остаются базисными иммуносупрессантами большинства режимов после трансплантации органов. Данные о показаниях к их предпочтительному выбору после трансплантации почки неоднозначны.

Цель исследования — сравнить 3-летнюю выживаемость трансплантатов и реципиентов, а также частоту осложнений в течение 3-летнего посттрансплантационного периода у реципиентов почки, получавших иммуносупрессию на основе циклоспорина или такролимуса.

Материал и методы. Проанализированы материалы наблюдений 545 реципиентов почечного трансплантата, оперированных с 01.01.07 по 31.12.09. 354 из них: мужчин 59 %; возраст — $(40,5 \pm 12,5)$ года — получали циклоспорин, 191: мужчин 59,5 %, возраст — $(38,8 \pm 12,2)$ года — такролимус. В обеих группах дополнительными иммуносупрессантами были кортикостероиды (доза к 6 мес — 5 мг/сут) и микофенолаты. У 19 реципиентов (4,4 %) микофенолаты из-за плохой переносимости были заменены на азатиоприн. Пациенты, у которых в ходе исследования была выполнена конверсия с циклоспорина на такролимус или с такролимуса на циклоспорин из анализа были исключены.

3-летнюю выживаемость реципиентов и трансплантатов рассчитывали по Kaplan–Maier. «Почечную смерть» констатировали при уровне креатинина в плазме крови более 0,55 ммоль/л. При расчете выживаемости трансплантатов умершие с функционирующим трансплантатом рассматривались как выбывшие из наблюдения. Наряду с вы-

живаемостью к концу наблюдения оценивали функцию трансплантата (по уровню креатинина крови) и такие важнейшие характеристики посттрансплантационного течения, как частота кризов отторжения, тяжелых инфекций, посттрансплантационного сахарного диабета, гиперлипидемии, а также частота и выраженность артериальной гипертензии и протеинурии. Кризы отторжения во всех случаях подтверждены морфологически. Сроки наблюдения составили в среднем $(18,3 \pm 11,3)$ мес — от 1 до 42 мес. Артериальную гипертензию диагностировали по уровню офисного АД, а также по потребности в гипотензивной терапии для снижения АД ниже 140/90 мм рт. ст.

При статистической обработке данных использовали пакет программ SPSS (13-я версия).

Результаты и их обсуждение. 3-летняя выживаемость реципиентов составила 95,3 % в группе лиц, получавших циклоспорин, и 89,9 % у получавших такролимус (различия статистически незначимы, $p < 0,12$). Выживаемость трансплантатов к этому же сроку равна 94,3 и 91,7 % соответственно (различия статистически незначимы, $p < 0,6$). К концу наблюдения (медиана 19 мес) отсутствовали также и значимые различия между группами важнейших показателей состояния почечного трансплантата — уровня креатинина крови и экскреции белка (у подавляющего большинства не выше 0,15 ммоль/л и 0,3 г/сут соответственно).

Частота ранних кризов отторжения (в течение первых 3 мес) в сравниваемых группах не различалась и составила 15,5 % в группе пациентов, получавших цикло-

© Н.А. Томилина, И.Г. Ким, Е.С. Столяревич, Н.Д. Федорова, 2011

спорин, и 16,2 % у получавших такролимус ($p < 0,46$). Однако поздние кризы отторжения выявлялись чаще у пациентов, получавших циклоспорин: 5,4 % против 2,4 % ($p < 0,049$).

Частота артериальной гипертензии была значимо выше в группе лиц, получавших циклоспорин (27,6 % против 18,1 %, $p < 0,018$). Точно так же в группе пациентов, получавших такролимус, была ниже и потребность в гипотензивной терапии ($p < 0,05$).

Тяжелые инфекционные осложнения (наиболее часто микст-пневмонии) в сравниваемых группах наблюдались с примерно одинаковой частотой: у 29,1 % реципиентов, леченных циклоспорином, и у 31,8 % группы лиц, получавших такролимус ($p < 0,32$). В то же время риск инфекционной летальности оказался выше в группе больных, получавших в качестве базового иммуносупрессанта такролимус: 5,8 против 1,0 ($p < 0,039$).

Посттрансплантационный сахарный диабет в условиях терапии такролимусом развивался чаще, чем у пациентов, получавших циклоспорин: 31 и 20 % соответственно ($p < 0,016$). Однако во всех случаях, за исключением двух, гипергликемия компенсировалась коррекцией дозы такролимуса в сочетании со снижением дозы/отменой кор-

тикостероидов и/или назначением сахароснижающих препаратов.

Уровень холестерина крови был значимо выше в группе пациентов, получавших циклоспорин, чем у леченных такролимусом (6,02 и 5,4 ммоль/л соответственно $p < 0,0001$).

Выводы

Полученные данные свидетельствуют о сопоставимой в целом эффективности поддерживающей иммуносупрессии на основе циклоспорина и такролимуса, хотя и обращает на себя внимание более частое развитие поздних кризов отторжения в условиях циклоспорина, что может отражать более высокий иммунодепрессивный эффект такролимуса и согласуется с представлениями о показаниях к его назначению у пациентов с высоким уровнем пресенсибилизации. Наши данные подтверждают более частое развитие сахарного диабета в условиях такролимуса при меньшей частоте таких факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, как артериальная гипертензия и гиперхолестеринемия. Таким образом, выбор того или иного иммуносупрессанта должен основываться на индивидуальных особенностях иммунологического и соматического статуса реципиента.

УДК 616.61-089.843-076-037

*А.В. Траилин, А.С. Никоненко, Т.Н. Никоненко,
Н.Ф. Ефименко, М.В. Плеть*

Запорожская медицинская академия последипломного образования

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ IP-10

Показано, что уровень IP-10 на 4-е сутки после трансплантации достоверно снижается только у пациентов без острой реакции отторжения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение сывороточной концентрации IP-10 в динамике может быть использовано для оценки риска развития острого отторжения.

Ключевые слова: IP-10, почка, трансплантация, острое отторжение.

Трансплантация почки является эффективным методом лечения пациентов в терминальной стадии хронической почечной недостаточности. Одним из серьезных осложнений у реципиентов являются острые реакции отторжения (ОРО) почечного аллотрансплантата (ПАТ), которые достоверно снижают продолжительность его функционирования [1]. Поэтому успех трансплантации во многом зависит от прогнозирования риска развития ОРО и его ранней диагностики. Среди новых методов, позволяющих выявлять пациентов с высоким риском отторжения, наше внимание привлекло определение уровня хемокина CXCL10 (IP-10) в сыворотке [2].

Хемокины — это семейство низкомолекулярных цитокинов, которые контролируют миграцию лейкоцитов в ткань при воспалении. Т-хелперы 1-го типа и CD8⁺-лимфоциты высвобождают интерферон- γ , который усиливает экспрессию эндотелием сосудов и эпителиоцитами проксимальных канальцев ПАТ ряда хемокинов [2–4]. Один из таких хемокинов — ИФНГ-индуцибельный протеин-10 (IP-10) — хемоаттрактант для моноцитов и хелперов 1-го типа [5]. Высокий уровень IP-10 в крови у пациентов перед трансплантацией, по данным [2, 6], является достоверным маркером высокого риска потери ПАТ в раннем периоде вследствие тяжелой ОРО, а в позднем периоде — вследствие хронической трансплантационной нефропатии.

Целью исследования было изучение корреляции сывороточной концентрации

IP-10 в перитрансплантационном периоде и риска развития ОРО.

Материал и методы. В исследование включены 40 трупных и 6 родственных трансплантаций почки, выполненных в нашем центре в 2006–2007 гг.

Материалом для исследования послужили истории болезни и амбулаторные карты реципиентов, сыворотка крови реципиентов, полученная непосредственно перед индукцией иммуносупрессии и на 4-й день после операции и хранившаяся при -20°C до исследования.

Концентрацию IP-10 (пг/мл) определяли путем иммуноферментного анализа с использованием набора фирмы Hycult biotechnology (Нидерланды).

Все реципиенты к моменту пересадки были диализ-зависимыми. 39 пациентов в целях иммуносупрессии получали циклоспорин А + микофенолата мофетил + стероиды + даклизумаб для индукции. У 7 пациентов даклизумаб не применялся, однако концентрация IP-10 и другие оцениваемые параметры не отличались от таковых в группе пациентов, получавших этот препарат.

ОРО диагностировалась по клиническим признакам, росту азотистых шлаков в крови, данным УЗИ и биопсии. Из 46 реципиентов у 5 человек на 4–7-й день после операции была диагностирована ОРО. Все случаи ОРО были купированы пульс-терапией метилпреднизолоном в течение 3 дней.

Результаты выражали в виде медианы и межквартильного размаха. Для оценки до-

© А.В. Траилин, А.С. Никоненко, Т.Н. Никоненко и др., 2011

стоверності отличий между независимыми группами использовали Mann–Whitney U-тест, а зависимыми — критерий знаков. Все виды анализа выполняли с использованием программы Статистика 7,0 (StatSoft Inc., USA). Различия между группами и предсказательная ценность критерия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Концентрация IP-10 до трансплантации достоверно не различалась у пациентов с развившимся впоследствии ОРО и без него ($p=0,76$), таблица, хотя литературные данные указывают на то, что у пациентов с ОРО концентрация IP-10 до трансплантации выше [2, 7]. Возможно, это связано с меньшим количеством пациентов в нашем исследовании.

Концентрация IP-10 в сыворотке до и после трансплантации у пациентов разных групп, пг/мл

| Группа пациентов | До пересадки | После пересадки | p |
|------------------|------------------|------------------|------|
| Отсутствие ОРО | 2053 (1467–3623) | 1303 (71–2123) | 0,05 |
| Наличие ОРО | 1420 (1303–4792) | 1350 (1327–9676) | 0,35 |

Обращал на себя внимание тот факт, что уровень IP-10 на 4-е сутки после трансплантации снижался под влиянием иммуносупрессивной терапии, но достоверным это снижение было только у пациентов без ОРО. По нашим сведениям, полученные данные впервые указывают на значение динамики

Список литературы

1. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996 / S. Hariharan, C. P. Johnson, B. A. Bresnahan [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — V. 342. — P. 605–612.
2. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy / E. Lazzeri, M. Rotondi, B. Mazinghi [et al.] // *Transplantation.* — 2005. — V. 79, № 9. — P. 1215–1220.
3. Early expression of interferon-gamma inducible protein 10 and monokine induced by interferon-gamma in cardiac allografts is mediated by CD8⁺ T-cells / A. Kapoor, K. Morita, T. M. Engeman [et al.] // *Transplantation.* — 2000. — V. 69. — P. 1147–1155.
4. T-cell mediated induction of allogeneic endothelial cell chemokine expression / H. Kobayashi, S. Koga, A. C. Novick [et al.] // *Transplantation.* — 2003. — V. 75. — P. 529–536.
5. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection / W. W. Hancock, W. Gao, V. Csizmadia [et al.] // *J. Exp. Med.* — 2001. — V. 193. — P. 975–980.
6. High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure / M. Rotondi, A. Rosati, A. Buonamano [et al.] // *Am. J. Transplant.* — 2004. — V. 4, № 9. — P. 1466–1474.
7. *Romagnani P.* From basic science to clinical practice: use of cytokines and chemokines as therapeutic targets in renal diseases / P. Romagnani // *J. Nephrol.* — 2005. — V. 18, № 3. — P. 229–233.

А.В. Траїлін, О.С. Никоненко, Т.М. Никоненко, Н.Ф. Єфіменко, М.В. Плетень

ОЦІНКА РИЗИКУ РОЗВИТКУ ГОСТРОЇ РЕАКЦІЇ ВІДТОРГНЕННЯ НИРКОВОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА ШЛЯХОМ ВИЗНАЧЕННЯ СИРОВАТКОВОЇ КОНЦЕНТРАЦІЇ IP-10

Показано, що рівень IP-10 на 4-ту добу після трансплантації вірогідно знижується тільки в пацієнтів без гострої реакції відторгнення. Отримані результати свідчать про те, що визначення сироваткової концентрації IP-10 у динаміці може бути використано для оцінки ризику розвитку гострого відторгнення.

Ключові слова: IP-10, нирка, трансплантація, гостре відторгнення.

концентрації IP-10 для оценки риска развития ОРО.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение сывороточной концентрации IP-10 до трансплантации и в первую неделю после нее может быть использовано для оценки риска развития ОРО. Как следствие, оценка сывороточной концентрации IP-10 может стать индикатором необходимости выполнения биопсии в целях ранней диагностики ОРО и своевременного начала терапии отторжения.

Выводы

1. Концентрация IP-10 до трансплантации достоверно не различается у пациентов с развившимся впоследствии ОРО и без него.

2. Уровень IP-10 на 4-е сутки после трансплантации достоверно снижается только у пациентов без ОРО.

3. Определение сывороточной концентрации IP-10 до трансплантации и в первую неделю после нее может быть использовано для оценки риска развития ОРО.

A.V. Trailin, A.S. Nikonenko, T.N. Nikonenko, N.F. Efimenko, M.V. Pleten

SERUM IP-10 TESTING IN THE ESTIMATION OF THE RISK OF ACUTE KIDNEY ALLOGRAFT REJECTION

It is shown, that the IP-10 level on the 4th day after transplantation in non-rejecting patients, contrary to rejecting ones significant decreases. Received data argue that serum IP-10 testing in dynamics may help in the estimation of the risk of acute kidney allograft rejection.

Key words: IP-10, kidney, transplantation, acute rejection.

УДК 616.61-091.8-089.843+612.461.1+612.466.6

Е.П. Тумасова, И.В. Гомоляко, Т.А. Царенко, Л.С. Донцова

*Национальный институт хирургии и трансплантологии и м. А.А. Шалимова НАМН
Украины, г. Киев*

ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСАДКА МОЧИ У БОЛЬНЫХ С ПОЧЕЧНЫМ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОМ

Показано, что частота выявления «decoy»-клеток в осадке мочи у больных после трансплантации почки составила 22,6 %. Наличие в мазке «decoy»-клеток свидетельствует о полиомавирусной инфекции. Сочетание «decoy»-клеток, дегенеративного канальцевого эпителия и лейкоцитов позволяет судить о полиомавирусной инфекции как об одной из причин хронической нефропатии.

Ключевые слова: трансплантация почки, хроническая нефропатия, вирусная инфекция, полиомавирус.

Улучшение отдаленных результатов трансплантации почек является важнейшей задачей трансплантологии [1, 2]. Одна из основных причин отторжения трансплантата — инфекционные осложнения, развитию которых способствует применение иммуносупрессивных препаратов [3]. На фоне иммуносупрессии происходит активация и генерализация инфекций, в первую очередь вирусных. Последние составляют не менее 50 % всех инфекционных осложнений у реципиентов почечных аллотрансплантатов (ПАТ) и возникают как в раннем, так и в отдаленном посттрансплантационном периоде [4]. Одним из вирусов, который активируется при снижении Т-клеточного иммунитета (врожденные или приобретенные иммунодефицитные синдромы, в том числе и иммуносупрессивная терапия после трансплантации органов) является полиомавирус (ПВ) [5].

Полиомавирус, относящийся к семейству Paroviridae, был выделен S.D. Gardner из мочи реципиента ПАТ при иммуносупрессивной терапии. В дальнейшем он обнаруживался и другими исследователями в эпителиальных клетках почечных канальцев [6]. Высокая частота выявления ПВ у больных после трансплантации почки послужила основанием рассматривать ПВ как один из факторов развития посттрансплантационной нефропатии. Период развития нефропатии, обусловленной ПВ, составляет от 1 до 15 месяцев. Клинические проявле-

ния этого заболевания неспецифичны и достаточно разнообразны: гематурия, геморрагический цистит, тубулоинтерстициальный нефрит. Развитие последнего ведет к быстрой потере функции почки [3]. Следует отметить, что хотя наличие ПВ в эпителиальных клетках почечного трансплантата почки было выявлено в 65 % наблюдений, клинически значимая нефропатия развилась лишь у 2–6 % пациентов [7]. Ведущим методом диагностики ПВ-инфекции является морфологический. Морфологическая картина поражения почки при прогрессировании ПВ-инфекции достаточно характерна и близка к таковой при хронической нефропатии трансплантата (распространенный интерстициальный фиброз, васкулопатия, склерозирование клубочков). Может также выявляться фокальный интерстициальный фиброз с мононуклеарными инфильтрациями, фокусы некроза тубулярных клеток. Наиболее достоверным критерием ПВ-нефропатии является наличие характерных эпителиальных клеток с большими ядрами и темными базофильными включениями. Интрануклеарные включения в эпителиальных клетках — вирусные частицы размером 45–55 нм (вирусные капсиды), которые четко дифференцируются при ультраструктурных исследованиях [8].

При цитологической идентификации ПВ-нефропатии в мазках осадка мочи также определяются характерные эпителиальные клетки — так называемые «decoy»-cells

© Е.П. Тумасова, И.В. Гомоляко, Т.А. Царенко, Л.С. Донцова, 2011

(клетки-ловушки). Последние представляют собой большие (25–35 мкм) атипичные клетки округлой или овальной формы с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Ядро содержит типичные базофильные включения, занимающие практически всю площадь ядра, оставляя небольшой ободок гранулярного хроматина, цитоплазма базофильная, темная. Появление большого количества «desou»-клеток обычно сопровождается дисфункцией ПАТ [5, 9, 10].

Цель работы — изучить цитологические характеристики осадка мочи и уточнить частоту и значимость выявления «desou»-клеток у больных после трансплантации почки.

Материал и методы. Цитологическое изучение осадка мочи было проведено у 106 пациентов в разные сроки после трансплантации почки. Утреннюю мочу предварительно отстаивали в течение 2 часов, верхний слой сливали, остаток центрифугировали, приготовленные из осадка мазки окрашивали по методике Романовского–Гимзы. Исследования проводились на микроскопе ВХ-41 (OLYMPUS, Япония) при увеличении микроскопа ок. 10, об. 20 и об. 40. Наличие клеточных элементов (нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов, клеток переходного и почечного эпителия) в осадке мочи учитывалось полуколичественным методом с выделением трех градаций (1+, 2+, 3+); диагностически значимые количества соответствуют 2+ (умеренное количество), 3+ (значительное количество) при увеличении ок. 10, об. 20. Макрофаги наблюдались редко и в очень небольшом количестве, поэтому при проведении анализа не учитывались. «Desou»-cells определяли при увеличении ок. 10, об. 40.

Результаты и их обсуждение. Клеточный состав мазков осадка мочи у разных больных после трансплантации почки отли-

чался по составу, количеству и соотношению клеточных элементов. В половине мазков диагностически значимые количества клеточных элементов выявлены не были. Основные клеточные формы осадка мочи приведены в таблице.

Основную массу клеточных форм в осадке мочи составляли нейтрофильные гранулоциты, они были выявлены у 65 (61,3 %) больных. В умеренных и значительных количествах нейтрофильные гранулоциты были определены в 14 (13,2 %) и 18 (17,0 %) наблюдениях соответственно. Высокое содержание нейтрофильных гранулоцитов в мазке является свидетельством активного воспалительного процесса. Лимфоциты в осадке мочи наблюдались реже — у 41 (38,5 %) больного, а диагностически значимые их количества — в 19 (17,8 %) наблюдениях. Практически во всех наблюдениях имело место сочетание нейтрофилов и лимфоцитов. У 7 (6,6 %) больных в осадке мочи были определены эритроциты, наличие которых свидетельствует о гематурии, а также о возможности развития воспалительных процессов в почках. Однако диагностически значимая гематурия наблюдалась только у 3 (2,8 %) больных.

Эпителиальные клетки присутствовали в мазках в 100 % наблюдений, при этом преобладали клетки переходного эпителия — у 76 (72,0 %) больных. Сочетание в мазке переходного эпителия, лимфоцитов, нейтрофильных гранулоцитов и эритроцитов в диагностически значимых количествах является свидетельством наличия воспалительного процесса в мочевом пузыре, почечных лоханках и мочеточнике. Канальцевый эпителий был выявлен в 30 (28,2 %) наблюдениях. Однослойный канальцевый эпителий полиморфный, представлен мелкими кубическими клетками округлой или овальной формы, с довольно крупным круглым ядром. Цитоплазма содержит мелкую зер-

Клеточный состав осадка мочи после трансплантации почки

| Клеточные элементы | Количество клеточных элементов | | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|
| | + | ++ | +++ |
| Клетки крови | | | |
| нейтрофильные гранулоциты | 33 (31,1 %) | 14 (13,2 %) | 18 (17,0 %) |
| лимфоциты | 22 (20,7 %) | 11 (10,3 %) | 8 (7,5 %) |
| Клетки эпителия | | | |
| переходный эпителий | 36 (34,0 %) | 20 (19,0 %) | 20 (19,0 %) |
| канальцевый эпителий | 8 (7,5 %) | 10 (9,4 %) | 14 (13,2 %) |

нистость, наблюдаются признаки белковой или жировой дистрофии. Именно наличие канальцевого эпителия, особенно в комбинации с эритроцитами и воспалительными клетками является основанием для целенаправленного поиска «desou»-клеток.

«Desou»-клетки были обнаружены в мазках 24 из 30 больных, у которых был выявлен канальцевый эпителий. Количество «desou»-клеток колебалось от 1 до 7 в поле зрения. «Desou»-клетки имели характерный вид — крупные эпителиальные клетки с четкими контурами и темной базофильной цитоплазмой. Крупные ядра располагались центрально или эксцентрично; в ядре определялись множественные полиморфные базофильные включения.

Анализ цитологической картины осадка мочи показал, что наряду с типичными «desou»-клетками в 22,6 % наблюдений отмечались своеобразные клетки канальцевого эпителия с выраженными дегенеративными изменениями — усилением базофилии цитоплазмы, значительной вакуолизацией цитоплазмы, уплотнением ядерной и клеточной мембраны. Последнее создает характерный эффект «штампованности» клеток, который в целом является типичным для вирусов *Rapovaviridae*. Количество дегенеративных форм канальцевого эпителия может быть значительным и достигать 5–10 в поле зрения. Их наличие является также основанием для целенаправленного поиска

«desou»-клеток и проведения повторных цитологических исследований осадка мочи. Как правило, дегенеративные формы канальцевого эпителия обнаруживаются на фоне диагностически значимых количеств нейтрофилов и лимфоцитов, что свидетельствует об активной полиомавирусной инфекции.

Таким образом, диагностика ПВ-инфекции является важным звеном в определении причин развития посттрансплантационной нефропатии. Цитологическое исследование мазков осадка мочи реципиентов ПАТ является адекватным и информативным методом выявления ПВ-инфекции и ее морфологического эквивалента — «desou»-клеток.

Выводы

«Desou»-клетки были обнаружены у 22,6 % больных в разные сроки после трансплантации почки. Количество «desou»-клеток невелико и не превышает 1–7 в поле зрения мазка, однако благодаря характерной морфологии «desou»-клеток это является достаточным для диагностики полиомавирусной инфекции. Сочетание в мазке «desou»-клеток, дегенеративного канальцевого эпителия и лейкоцитов в диагностически значимых количествах свидетельствует об активных воспалительных и дистрофических процессах в паренхиме почки и позволяет рассматривать полиомавирусную инфекцию как существенный фактор развития хронической нефропатии трансплантата.

Список литературы

1. Никоненко А. С. Морфологический анализ причин дисфункции почечного аллотрансплантата / А. С. Никоненко, Т. Н. Никоненко, А. В. Траилин // Трансплантология. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 185–187.
2. Профілактика бактеріально-септичних ускладнень у реципієнтів ниркового алотрансплантату на дотрансплантаційному етапі / Р. О. Зограб'ян, Г. В. Лапшин, В. Ф. Закордонцев, С. Е. Харченко // Трансплантология. — 2007. — Т. 9, № 1. — С. 109–111.
3. Human polyomavirus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology / C. B. Dracbenberg, C. O. Bescou, C. B. Cangro [et al.] // Hum. Pathol. — 1999. — Aug. — № 50 (8). — P. 970–977.
4. Инфекционно-воспалительные осложнения после аллотрансплантации почки / Р. З. Исмаилов, Т. А. Бапиев, А. К. Зайналов [и др.] // Трансплантология. — 2005. — Т. 8, №3. — С. 58–61.
5. Суханов А. В. Полиомавирусная нефропатия трансплантата (Обзор литературы) / А. В. Суханов // Нефропатия и диализ. — 2001. — Т. 3, № 4. — С. 411–413.
6. New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation / S. D. Gardner, A. M. Field, D. V. Coleman, B. Hulme // Lancet. — 1971. — V. 1. — P. 1253.
7. Renal failure due to BK virus infection in an immunodeficient child / L. M. De Silva, P. Bale, D. Brown, W. Knowles // J. of Medical Virology. — 1995. — V. 45. — P. 192–196.
8. Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients / D. Howell, S. Smith, D. Butterly [et al.] // Transplantation. — 1999. — V. 68 (9). — P. 1279–1288.
9. «Desou»-cells в диагностике нефропатии трансплантата почки / И. В. Гомоляко, Е. П. Тумасова, Т. А. Царенко, Л. С. Донцова // Трансплантология. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 180–182.
10. International standartization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: The Banff working classification of kidney transplant pathology / K. Solez, R. A. Axelsen, H. Benediktsson [et al.] // Kidney International. — 1993. — V. 44. — P. 411–422.

К.П. Тумасова, І.В. Гомоляко, Т.А. Царенко, Л.С. Донцова

ЦИТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОСАДУ СЕЧІ У ХВОРИХ З НИРКОВИМ АЛОТРАНСПЛАНТАТОМ

Показано, що частота виявлення «decoy»-клітин в осаді сечі у хворих після трансплантації нирки складає 22,6 %. Наявність у мазку «decoy»-клітин свідчить про поліомавірусну інфекцію. Поєднання «decoy»-клітин, дегенеративного канальцевого епітелію і лейкоцитів дозволяє робити висновок про поліомавірусну інфекцію як про одну із причин хронічної нефропатії.

Ключові слова: трансплантація нирки, хронічна нефропатія, вірусна інфекція, поліомавірус.

Ye.P. Tumasova, I.V. Gomolyako, T.A. Tsarenko, L.S. Dontsova

CYTOLOGIC CHARACTER OF URINARY SEDIMENT IN PATIENTS WITH RENAL ALLOTRANSPLANTANT

It was shown, that the frequency of identification of «decoy»-cells in the urinary sediment of patients after renal transplantation is 22,6 %. The presence of «decoy»-cells in the specimen says about polyomavirus infection. Combination of «decoy»-cells, degenerative canalicular epithelium and leucocytes allow s account for polyomavirus infection as etiologic factor of chronic nephropathy.

Key words: renal transplantation, chronic nephropathy, virus infection, polyomavirus.

УДК 612.35:612.6.089.67:612.085.2

*Д.В. Черкашина, И.А. Сосимчик, О.А. Семенченко,
Е.Н. Ткачева, А.Ю. Петренко*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ВНЕСЕНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ СТВОЛОВЫХ И ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК В КОНСЕРВИРУЮЩИЙ РАСТВОР УЛУЧШАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЕЧЕНИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Наличие в консервирующем растворе биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток предотвращало разобщение окислительного фосфорилирования митохондрий и снижение содержания АТФ, а также улучшало прооксидантно-антиоксидантный баланс в печени после 24 ч гипотермического хранения. Функциональное состояние печени, оцененное по скорости потока желчи, под влиянием биорегуляторов оставалось на физиологическом уровне. Выраженный защитный эффект в отношении печени в условиях околонулевых температур определяет перспективность использования таких биорегуляторов в качестве компонента растворов для долгосрочного хранения изолированных органов.

Ключевые слова: гипотермическое хранение печени, биорегуляторы стволовых и прогениторных клеток, дыхательная активность митохондрий, уровень АТФ, прооксидантно-антиоксидантный баланс.

На сегодняшний день вопрос предупреждения ишемически-реперфузионных повреждений, возникающих при гипотермическом хранении (ГХ) печени для трансплантации, остается открытым. Одним из перспективных подходов к повышению сохранности органа является дополнение раствора хранения смесью трофических факторов, эффективность которых показана при трансплантации печени у свиней [1].

Ранее в нашей лаборатории были проведены исследования влияния биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток (БСПК) мезенхимально-мезодермального происхождения на течение ряда экспериментальных патологий [2, 3]. Нами показано, что введение крысам БСПК за 4 часа до изоляции органа позволяет значительно улучшить его состояние после длительного ГХ и последующей нормотермической реперфузии (НР) [4].

Эти данные и тот факт, что в клинической практике возможность подготовки донора существует только в случае частичной трансплантации печени, определили цель настоящей работы — исследование возможности применения БСПК в качестве компо-

нента раствора для долгосрочного хранения изолированной печени. Кроме того, преимуществом избранного подхода, на наш взгляд, является «физиологичность» состава БСПК, в отличие от искусственно созданной смеси отдельных трофических факторов.

Материал и методы. Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самках массой 200–250 г (n=25). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Этического комитета Института, согласованными с правилами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других исследовательских целях» (Страсбург, 1986). Для наркоза использовали диэтиловый эфир.

В качестве источника БСПК использовали цитозоль фетальных тканей, который получали путем высокоскоростного ультрацентрифугирования гомогената тканей мезенхимально-мезодермального происхождения плодов крыс 15–16 дней гестации, стандартизацию проводили по содержанию белка [4]. В качестве раствора хранения использовали сахарозосодержащий раствор (ССР), разработанный в нашем

© Д.В. Черкашина, И.А. Сосимчик, О.А. Семенченко и др., 2011

Институте (250 мМ сахарозы, 1мМ MgSO₄, 0,5 мМ CaCl₂, 15 мМ Na₂HPO₄, 30 мМ KH₂PO₄, 1 % ПЭГ-8000; рН 7,4) [5].

Печень хранили в течение 24 ч при 0–4 °С в ССР, в отсутствие или при наличии БСПК (100 мкл/100 мл раствора). Затем орган реперфузировали бикарбонатным раствором Кребс–Рингера (рН 7,4) в течение 60 мин при температуре 37 °С. В ходе реперфузии для оценки секреторной функции печени производили сбор желчи. Контролем служила свежеизолированная печень.

В гомогенатах печени до и после реперфузии общепринятыми методами исследовали: дыхательную активность митохондрий, уровень АТФ, базальный уровень и скорость накопления малонового диальдегида (МДА), каталазную и GSH-пероксидазную активности [5].

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программы «Statistica v. 5.5». Данные оценивали, используя непараметрический U-критерий Манна–Уитни, выражали в виде M±m. Достоверно отличными считали результаты при p<0,05.

Результаты и их обсуждение. Энергетическое состояние печени после долгосрочного хранения является важнейшей характеристикой ее сохранности. Хранение печени в ССР приводило к снижению дыхательного контроля митохондрий более чем в

2 раза (таблица). При наличии БСПК после ГХ наблюдалось повышение дыхательного контроля в 1,7 раза, а после НР — почти в 2 раза, что свидетельствует об улучшении функционального состояния митохондрий. Подтверждением этому служит значительное увеличение содержания АТФ в печени, которое при наличии БСПК было выше, чем в ССР-группе, после ГХ в 3,6 раза, а после реперфузии — в 9 раз (таблица).

Важнейшим фактором развития ишемически-реперфузионных повреждений печени в ходе хранения и последующей НР является нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса [4, 5]. Действительно, базальный уровень МДА после ГХ увеличился в 2 раза и оставался на этом уровне после НР. Дополнение раствора БСПК не влияло на данный показатель после хранения, однако после реперфузии наблюдалось его снижение в 1,4 раза по отношению к таковому при ГХ и в группе без БСПК. После ГХ скорость накопления МДА не изменялась, а последующая реперфузия приводила к ее двукратному увеличению. Наличие в среде БСПК вызывало снижение интенсивности индуцированного ПОЛ в 2 и 3 раза по отношению к показателю в ССР-группе после ГХ и НР соответственно. Кроме того, значения в БСПК-группе были достоверно ниже контрольных как после ГХ, так и после НР (таблица).

Влияние БСПК на биохимические и функциональные параметры изолированной печени после ГХ и НР (M±m)

| Показатель | Контроль | ССР | | ССР + БСПК | |
|--------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | ГХ | ГХ + НР | ГХ | ГХ + НР |
| Дыхательный контроль | 6,41±0,70 | 3,02±0,10 [#] | 2,36±0,10 ^{#^} | 5,12±0,40* | 4,68±0,40 ^{#*} |
| Уровень АТФ, мкмоль/г ткани | 3,85±0,40 | 0,72±0,10 [#] | 0,38±0,10 ^{#^} | 2,6±1,2* | 3,43±1,50* |
| Базальный уровень МДА, пмоль/мг белка | 142,3±31,7 | 307,9±16,4 [#] | 325,7±26,0 [#] | 300,1±16,7 [#] | 222,6±13,0 ^{#^*} |
| Скорость накопления МДА, пмоль/мг белка за 1 мин | 19,0±3,9 | 18,9±2,1 | 38,1±8,3 ^{#^} | 9,1±2,1 ^{#*} | 11,3±1,5 ^{#*} |
| Каталазная активность, мкмоль H ₂ O ₂ /мг белка за 1 мин | 122,0±14,9 | 77,4±8,8 [#] | 70,7±15,6 [#] | 117,5±9,3* | 91,6±17,7 ^{#*} |
| GSH-пероксидазная активность, мкмоль GSSG/мг белка за 1 мин | 0,309±0,04 | 0,161±0,02 [#] | 0,173±0,01 [#] | 0,241±0,02 ^{#*} | 0,238±0,05 ^{#*} |
| Скорость потока желчи, мкл/г ткани за 1 ч | 16,0±1,7 | 6,0±1,3 [#] | | 15,4±2,5* | |

Примечания: 1. n=7.

2. p<0,05; достоверно при сравнении с показателем: # контроля; * ССР-группы; ^ при ГХ.

В ССР-групі в ході ГХ і наступуючої НР спостерігалося значительне угнетення активності антиоксидантних ферментів. Так, каталазна активність знизилася в 1,6 разів, а GSH-пероксидазна — в 2 рази порівняно з контролем. Внесення БСПК в ССР повністю запобігало зменшенню активності каталази після ГХ, а також вело до підвищення активності GSH-пероксидази в 1,5 рази як після зберігання, так і після реперфузії (таблиця).

В доповнення до спостережуваних біохімічних змін, найбільш яскравим підтвердженням здатності БСПК в складі розчину зберігання покращувати стан ізольованої печінки після довготривалого ГХ стало практично повне відновлення швидкості потоку жовчі в ході реперфузії, що і спостерігалося нами в ССР-групі (таблиця).

В висновок хотілося б зазначити, що при попередньому введенні БСПК життєвими стільки вираженого ефекту в енергетичному стані печінки не спостерігалося. Ступінь сопряженности мітохондрій залишалася низкою навіть після короткотривалого ГХ, а рівень АТФ підвищувався тільки після 1 ч ГХ, а при продовженні термінів цей ефект нівелювався [4, 6]. Вероятно, механізми реалізації ефектів БСПК во мно́гом залежать від способу введення і температурного режиму.

шався тільки після 1 ч ГХ, а при продовженні термінів цей ефект нівелювався [4, 6]. Вероятно, механізми реалізації ефектів БСПК во мно́гом залежать від способу введення і температурного режиму.

Выводы

1. БСПК в складі цитозоля фетальних тканин викликають виражене захисне дію на енергетичне стан печінки, зберігаючи ступінь сопряженности окислювального фосфорилування і продукцію АТФ на нормальному рівні.

2. Доповнення розчину для ГХ печінки БСПК позитивно впливає на прооксидантно-антиоксидантний баланс, який порушується в процесі ГХ і НР.

3. Відновлення швидкості утворення жовчі дозволяє утвердити, що наявність БСПК в консервуючому розчині позитивно впливає на функціональний стан органу.

4. Всі спостережувані ефекти БСПК реалізуються при околонулевых температурах, що вказує на перспективність їх застосування як компонента розчину для зберігання ізольованих органів.

Список литературы

1. Improved survival of orthotopic liver allograft in swine by addition of trophic factors to University of Wisconsin solution / S. Ambiru, K. Uryuhara, S. Talpe [et al.] // *Transplantation*. — 2004. — V. 77, № 2. — P. 302–319.
2. Cherkashina D. V. Hepatoprotective effect of fetal tissue cytosol and its thermostable fraction in rats with carbon tetrachloride-induced hepatitis / D. V. Cherkashina, A. Yu. Petrenko // *Bull. Exp. Biol. Med.* — 2006. — V. 141, № 4. — P. 544–547.
3. Kovalev G. A. Modulating the state of the pro-oxidant-antioxidant brain system with xenopreparations under experimental chronic alcohol poisoning / G. A. Kovalev, D. V. Cherkashina // *Cell Preserv. Technol.* — 2008. — V. 6. — P. 108.
4. Supplementation with fetal-specific factors ameliorates oxidative liver damage during hypothermic storage and reperfusion in a rat model / D. V. Cherkashina, O. A. Semenchenko, V. P. Grischuk [et al.] // *Cell Preserv. Technol.* — 2005. — V. 3, № 3. — P. 201–209.
5. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model / A. Yu. Petrenko, D. V. Cherkashina, A. Yu. Somov [et al.] // *Cryobiology*. — 2010. — V. 60, № 3. — P. 293–300.
6. Перспективи застосування біорегуляторів стовбурових клітин при трансплантації печінки / Д. В. Черкашина, Е. Н. Ткачева, А. Ю. Сомов [і др.] // *Проблеми криобіології*. — 2005. — № 3. — С. 389–392.

Д.В. Черкашина, І.О. Сосімчик, О.А. Семенченко, О.М. Ткачова, О.Ю. Петренко

ВНЕСЕННЯ БІОРЕГУЛЯТОРІВ СТОВБУРОВИХ І ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН ДО КОНСЕРВУЮЧОГО РОЗЧИНУ ПОКРАЩУЄ ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ПЕЧІНКИ ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ

Наявність у консервуючому розчині біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин попереджувала роз'єднання окислювального фосфорилування мітохондрій та знизення вмісту АТФ, а також покращувала прооксидантно-антиоксидантний баланс у печінці після 24 год гіпотермічного зберігання. Функціональний стан печінки, що оцінювали за швидкістю потоку жовчі, під впливом біорегуляторів залишався на фізіологічному рівні. Виразний захисний ефект щодо печінки за температур, близьких до нуля, визначає перспективність застосування таких біорегуляторів у якості компонента розчинів для довготривалого зберігання ізольованих органів.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання печінки, біорегулятори стовбурових і прогеніторних клітин, дихальна активність мітохондрій, рівень АТФ, прооксидантно-антиоксидантний баланс.

D.V. Cherkashina, I.A. Sosimchyk, O.A. Semchenko, E.N. Tkacheva, A.Yu. Petrenko
**SUPPLEMENTATION OF PRESERVATION SOLUTION WITH BIOREGULATORS OF STEM
AND PROGENITOR CELLS IMPROVES FUNCTIONAL PARAMETERS OF LIVER
FOR TRANSPLANTATION**

Presence of bioregulators of stem and progenitor cells in storage solution prevented oxidative phosphorylation uncoupling and ATP content decrease and improved pro-oxidant-antioxidant balance in liver after 24 h of hypothermic storage. Due to bioregulators liver functional state estimated by bile flow rate remained at physiological level. Significant protective effect on liver at near-zero temperatures determines the prospects of such bioregulator application as a compound of solutions for long-term storage of isolated organ.

Key words: liver hypothermic storage, bioregulators of stem and progenitor cells, mitochondrial respiratory activity, ATP level, pro-oxidant-antioxidant balance.

УДК 612.621.38.014:57.043

В.А. Шаблій

*Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин
МОЗ України, м. Київ
ТОВ «Інститут клітинної терапії», м. Київ*

КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ОВАРІАЛЬНОЇ ТКАНИНИ ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ В РЕПРОДУКТИВНІЙ МЕДИЦИНІ

Огляд літератури присвячений аналізу різних методів кріоконсервування оваріальної тканини та шляхів її використання в репродуктивній медицині. Головну увагу приділено сайтам трансплантації тканини, динаміці росту фолікулів та секреторній функції тканини яєчника. Розглянуто також ефективність використання методів запліднення *in vitro* після трансплантації, перераховані основні чинники, які лежать в основі затухання оваріальної функції трансплантата.

Ключові слова: оваріальна тканина, трансплантація, фолікули, естрадіол, запліднення *in vitro*.

Кріоконсервована оваріальна тканина (КОТ) після ретельного тестування на наявність ракових клітин використовується як немедикаментозний метод корекції гормонального фону та для відновлення репродуктивної функції у жінок після хіміо- та радіотерапії при лікуванні різноманітних онкологічних захворювань (лімфома Ходжкіна, лімфогранульоматоз, рак матки), після оваріоектомії при ендометріозі, ендометріомі, фіброміомі та ін. [1–4].

Однак довготривале функціонування розмороженої тканини після трансплантації можливо в тому випадку, якщо після кріоконсервування зберігається її морфофункціональна активність. Ефективність кріоконсервування тканини яєчника значною мірою залежить від використаних кріозахисних середовищ (КС) та протоколів охолодження–відтаювання [5].

Методи кріоконсервування оваріальної тканини людини. В літературі описано різноманітні КС та режими кріоконсервування для тканини яєчників людини. Найчастіше використовують КС, які складаються з 1,5 М ДМСО з 0,1 М розчином цукрози та 10 % сироватки крові в середовищі Лейбовітц-*L-15* або ін. [5]. Автори препарували кортикальний шар яєчника на фрагменти (5×5×2 мм), інкубували 30 хв у КС при +4 °С та заморожували в 1,5-мілілітрових кріопробірках по двохетапній програмі з сидінгом при –7 °С.

Кріопробірки з фрагментами яєчника розморожували у день трансплантації при кімнатній температурі протягом 2 хв та на водяній бані при +25 °С — 2 хв. Оваріальну тканину промивали у розчинах із поступовим зниженням концентрації кріопротектора [6]. В роботі Ісаченка та ін. також використовували 1,5 М ДМСО з середовищем *L-15* з *L*-глутаміном + 10 % SSS (синтетичний замітник сироватки). Тканину з середовищем для кріоконсервування еквілібрували на льоду протягом 30 хв, переносили в охолоджену до +2 °С кріокамеру, заморожували від +2 до –6 °С зі швидкістю 2 °С/хв, при –6 °С — температурна зупинка протягом 10 хв, від –6 до –40 °С — швидкість охолодження була 0,3 °С/хв, від –40 до –140 °С — швидкість 10 °С/хв, потім кріопробірки переносили в рідкий азот [7].

Інші дослідники оваріальну тканину поміщали у 800 мкл у середовище МЕМ + *Glutamax™* при 0 °С, потім замінювали його на 10 % ДМСО з 2 % альбуміну сироватки людини в середовищі Лейбовітц. Заморожування проводили за протоколом: від 0 до –8 °С зі швидкістю охолодження 2 °С/хв, при –8 °С — ручний сидінг, від –8 до –40 °С — зі швидкістю 0,3 °С/хв, потім занурення в рідкий азот. Відтаювання проходило при кімнатній температурі протягом 2 хв та на водяній бані (+37 °С). Фрагменти оваріальної тканини після розморожування

© В.А. Шаблій, 2011

поміщали у чашку Петрі та триразово промивали по 5 хв у середовищі MEM + Gluta-max [6]. У [7] подрібнені фрагменти (2–3 мм³) заморожували після еквілібрації при 4 °С протягом 10 хв у розчині, що містить 0,7 М ДМСО, 20 % сироватки людини в середовищі RPMI 1640. Кріопробірки охолоджували по двохетапній програмі з сидінгом при –7 °С. Розморожування проводили таким чином: кріопробірки поміщали в водяну баню +37 °С до повного відтаювання; потім вміст пробірок переносили в чашку Петрі та додавали кожної хвилини (протягом 7 хв) подвійний об'єм середовища RPMI 1640 з 4 % сироватки крові людини при +4 °С до 0,14 М кінцевої концентрації ДМСО та еквілібрували протягом 3 хв до перенесення в Flushing Medium, де інкубували 25 хв при +37 °С з 5 % CO₂ [8].

У 80-х роках минулого століття в Україні був розроблений метод кріоконсервування оваріальної тканини по трьохетапній програмі охолодження під захистом 10 % поліетиленоксиду молекулярної маси 400 (ПЕО-400) [9].

Крім того, для кріоконсервування тканини яєчників людини використовували КС на основі комерційного середовища Freeze-Kit 1[®] (Vitrolife), що містить фосфатний буфер та 25 мг/мл НАS [10], розчин № 1 — 1,5 М пропандіол (PrOH), розчин № 2 — 1,5 М PrOH із 0,1 М розчином цукрози. Фрагменти тканини інкубували при кімнатній температурі послідовно у Freeze-Kit 1[®] — 5 хв, у розчині № 1 — 10 хв, у розчині № 2 — 5 хв, потім поміщали у кріопробірки (Nunc) з 1 мл розчину № 2 та заморожували по програмі: охолодження до –6,5 °С зі швидкістю 2 °С/хв, ручний сидінг при –6,5 °С, температурна зупинка при –6,5 °С 10 хв, охолодження до –35 °С зі швидкістю 0,3 °С/хв і перенесення у рідкий азот. Розморожували зразки яєчника поетапно (на повітрі при кімнатній температурі — 30 с, водяна баня (+40 °С) — до появи рідкої фази) із використанням розчину Thaw Kit 1[®] з 1,0 М PrOH та 0,2 М розчином цукрози — 5 хв, 0,5 М PrOH і 0,2 М цукрози — 5 хв, 0,2 М цукрози — 10 хв і останній розчин лише cryo-PBS — 10 хв при кімнатній температурі [5].

Для кріоконсервування тканини яєчника Шмідт та ін. використовували 1,5 М розчин етиленгліколю в фосфатному буфері з 30 мл 0,1 М розчином цукрози, в якому тканину еквілібрували 30 хв при 1 °С, потім переносили в 1,8 мл кріоампули і заморожували на «Planer» зі швидкістю охолодження

2 °С/хв до –9 °С, 5 хв витримки, потім сидінг, охолодження зі швидкістю 0,3 °С/хв до –40 °С, від –40 до –140 °С — зі швидкістю 10 °С/хв і переносили в рідкий азот. Відігрів проводили на водяній бані +37 °С [7, 11].

Таким чином, на сьогодні впроваджено багато різноманітних протоколів кріоконсервування тканини яєчника, які дають змогу зберегти її морфофункціональні характеристики, а також 30–80 % примордіальних фолікулів [5].

Аутотрансплантація кріоконсервованої оваріальної тканини людини. У роботі Санчез та ін. було продемонстровано функціонування свіжої оваріальної тканини людини після трансплантації її 12 пацієнткам. Хоча середній вік пацієнток був (40,8±0,7) року, у 91,6 % відбувалася овуляція, у 75 % спостерігався овуляторний цикл упродовж 2 років після трансплантації та у 5 пацієнток (41,7 %) рівень ФСГ був у межах норми [8]. Підвищення рівня ФСГ після трансплантації свіжої оваріальної тканини протягом 3–6 місяців описано іншими дослідниками [7, 13–15].

В експериментальних дослідженнях хірургічна процедура трансплантації оваріальної тканини проходить досить швидко, але ішемічне ушкодження тканини може тривати протягом 3–7 днів до реваскуляризації, що призводить до втрати більш ніж 50 % примордіальних та дозріваючих фолікулів [10]. Після атрофії великих фолікулів продукція естрогенів знижується до гранично низького рівня протягом, щонайменше, одного тижня. Як показали експерименти [8], відновлення гормонального тла після трансплантації оваріальної тканини відбувається швидше у кастрованих тварин. У літературних джерелах наведено багато досліджень про народження нормального потомства у мишей [16], щурів [17] та овець [10] після трансплантації КОТ або цілісного яєчника.

Однак перший випадок відновлення функціонування яєчника у людини після ортотопічної трансплантації кріоконсервованого кортикального шару тканини яєчників був описаний у 2000 році [18], а перша дитина народилася у 2004-му [9, 13].

Показано, що як після ортотопічної, так і після гетеротопічної трансплантації оваріальної тканини, а також при одночасній гетеро- і ортотрансплантації КОТ у жінок спостерігався фолікулогенез, який супроводжувався овуляцією.

При гетеротопічній імплантації КОТ містили під шкіру на животі, тоді як при

ортотопічний — використовували два сайти імплантації: перитонеальний карман, який формували при лапароскопії із тазової очередини оваріальної ямки, і атрофованій яєчник. Трансплантацію КОТ виконували через тиждень у неоваскуляризований сайт при проведенні другої лапароскопії [19]. Було встановлено, що сайт трансплантації може впливати на подальший розвиток фолікулів. При комбінованій трансплантації КОТ розвиток доміантних фолікулів відбувається більш часто в оваріальному сайті трансплантації у порівнянні з перитонеальним та підшкірним. Це вказує на те, що локальні умови залишеного яєчника покращують відновлення оваріальної функції при трансплантації КОТ. Але потрібно відмітити, що можливість трансплантації КОТ у яєчник після лікування онкологічних захворювань є обмеженою у зв'язку з малими розмірами (0,3–1,3 см³) атрофованого органа [11].

Аутоотрансплантація КОТ була описана [20] у пацієнтки з лімфомою Ходжкіна при лікуванні передчасної оваріальної дисфункції. Пацієнтці було проведено унілатеральну оофоректомію після першої хіміотерапії (ABVD — доксорубіцин, блеоміцин, вінкрисдин, декарбазин) і кріоконсервовано 40 фрагментів кортикального шару тканини яєчника. Після трансплантації кісткового мозку пацієнтка видужала, але діагностична біопсія атрофованого яєчника показала відсутність фолікулів. Пацієнтка виявила бажання щодо трансплантації КОТ, яка була проведена як ортотопічно (перитонеальний та оваріальний сайти), так і гетеротопічно (абдомінальний сайт). Перед трансплантацією було зроблено ретельне гістологічне дослідження тканини на наявність метастазів та щільності фолікулів (12 фолікулів/мм²). Трансплантація аутологічної КОТ привела до відновлення менструального циклу. Після 6-го циклу пацієнтка завагітніла, але вагітність перервалася у зв'язку із генетичним порушенням розвитку плоду (анеуплоїдія). Через 1 рік після трансплантації КОТ у пацієнтки спостерігалось зростання рівня ФСГ та зниження — інгібіну В, що вказувало на виснаження оваріального резерву та втрати функціональної активності трансплантата. Стимуляція яєчників не привела до відновлення функції. Тому пацієнтці була проведена повторна трансплантація КОТ шляхом двохступінчастої лапароскопії. Чотири фрагменти оваріальної тканини було трансплантовано

у яєчник та два — під шкіру на животі. Протягом перших 3 місяців базальний рівень ФСГ залишався підвищеним (>20 mIU/ml), хоча у пацієнтки відбулася овуляція. Ріст фолікулів спостерігався як у яєчнику, так і у місці гетеротопічної трансплантації. Після третього менструального циклу базальна концентрація ФСГ повернулася до пременопаузного рівня (<10 mIU/ml). Протягом 5-го спонтанного циклу у яєчнику спостерігався розвиток 2 фолікулів (по 15 мм у діаметрі перед овуляцією). Тест на лХГ був позитивним на 14-й день лютеїнової фази циклу та клінічна вагітність підтверджувалася ультразвуковим дослідженням (УЗД). На 41-му тижні вагітності пацієнтка народила здорову дитину [20].

В роботі Файн–Кахн та ін. [21] було показано використання методу трансплантації КОТ при лікуванні посткастраційного синдрому (ПС), після радикального хірургічного втручання при лікуванні пограничних пухлин яєчника (ППЯ), у випадках, коли обстеження показало непридатність використання органозберігаючого консервативного лікування рецидивів ППЯ. У цих випадках для збереження фертильності проводили сальпінг-оофоректомію із подальшим відбором нормальної оваріальної тканини для кріоконсервування, однак головним фактором, що обмежує використання КОТ, є мала кількість морфологічно нормальної тканини в яєчнику. Оваріальну тканину кріоконсервують лише у випадку, коли при макроскопічному дослідженні спостерігаються морфологічно не уражені фрагменти розміром >4–5 мм та проводять гістологічний аналіз фрагментів як морфофункціональне «дзеркало» замороженої тканини. Другим обмеженням є виявлення злоякісного рецидиву. Потенційний ризик контамінації атиповими клітинами зростає у пацієнток із мікропапілярним серозним ППЯ, а також при більш прогресивних стадіях захворювання, при яких неможливо використовувати аутологічну КОТ [21].

Вибір місця реімплантації при гетеротопічній трансплантації відіграє велику роль на функціонування оваріальної тканини. Так, у 2 пацієнток (46 та 49 років), яким проводили трансплантацію оваріальної тканини (кортикальний шар товщиною 1–2 мм) у передпліччя руки, відновлення оваріальної функції відбувалося після 3–4 місяців і відповідно рівень естрадіолу та ФСГ підтримувався протягом подальших 2–4 місяців. Але у обох пацієнток не спостерігався

ріст доміантного фолікула та утворення жовтого тіла. Крім того, за даними [8], після трансплантації КОТ (40–45 фрагментів 2–3 мм³) у прямий м'яз черева пацієнтки (47 років) спостерігався ріст фолікула до 16 мм у діаметрі при рівні естрадіолу 383 пМ/л та функціонування КОТ тривало протягом 5–6 місяців. Однак великою проблемою при гетеротопічній трансплантації яєчника є нездатність примордіальних фолікулів до прямого з'єднання із кровоносними судинами, що призводить до гіпоксії протягом періоду проростання новими кровоносними судинами. Коли яєчник фрагментований на малі сегменти, ішемія та дегенеративні зміни мінімізовані тому, що процес ревазуляризації залежить від розміру тканини. При цьому гарно васкуляризована абдомінальна мускулатура покращує виживання трансплантата та його ендокринну активність.

Розвиток примордіальних фолікулів до преантральних розмірів у людини триває протягом 85 днів, тоді як фінальне дозрівання великих преантральних фолікулів до преовуляторної фази відбувається протягом 14 днів (тривалість фолікулярної фази). Тривалість латентного періоду після трансплантації оваріальної тканини до відновлення гормонального тла становить приблизно 3 місяці, що співпадає з часом, що потрібен для розвитку примордіальних фолікулів до преовуляторних. У всіх пацієнток після КОТ зростає рівень ФСГ у 2–7 разів на тлі нормальної секреції естрадіолу [8], що співпадає з результатами, які отримані на вівцях [10]. Зростання рівня ФСГ асоційовано із повільним ростом фолікулів та зниженим рівнем секреції інгібінів [4].

Ауто трансплантація кортикального шару яєчника може бути використана для уникнення передчасної оваріальної дисфункції після лікування онкозахворювань опроміненням тазової зони та проходженням хіміотерапевтичної терапії [15].

Потрібно відмітити, що гормональне тло не завжди відповідає функціональному стану яєчників. Так, було описано [22], що після аутологічної імплантації КОТ в різні сайти (перший сайт був карманом в очеревині, другий — широка зв'язка нижче правої фалопієвої труби) через 2,5 року, в період ремісії пухлини прямої кишки, спостерігалася різниця в активності цих трансплантатів. Через 3 місяці після трансплан-

тації зростала концентрація естрадіолу в крові (4 місяці — 155 пг/мл, через 4 тижні — 436 пг/мл), зниження рівня гонадотропінів почалося через 2,5 місяця, а розвиток антрального фолікула (лише у першому сайті) — через 5 місяців. На 11-му місяці пацієнтці, після підвищення ФСГ та ЛГ до кастраційного рівня, було проведено додаткову трансплантацію КОТ у черевну стінку навпроти першого сайту. Під час лапароскопії було видалено тканину яєчника з сайтів попередньої трансплантації. Гістологічний аналіз цих фрагментів показав наявність білого тіла та відсутність примордіальних, первинних, преантральних та антральних фолікулів у першому сайті, тоді як у другому було знайдено фолікули на всіх стадіях розвитку. Із вказаного випливає, що, хоча параметри гормонального тла вказують на відсутність розвитку фолікулів, вони можуть існувати в фрагменті тканини. Тому стан трансплантата треба контролювати даними УЗ-дослідження. Різниця у тривалості латентного періоду після імплантації може бути пов'язана із використанням цілісного кортикального шару та наявністю нормально сформованої медулярної частини яєчника.

Після трансплантації оваріальної тканини вагітність досягається як природним шляхом, так і за допомогою методів ЗІВ та ін'єкції сперматозоїда в яйцеклітину (ICSI IMSI). Було виявлено [23], що після проведення циклів стимуляції суперовуляції у пацієнток з ортотопічною трансплантацією оваріальної тканини (20 жінок віком 28–43 роки) частота пустих фолікулів складала 29 % (6/20), тоді як у загальній популяції жінок, що проходять програму ЗІВ, вона складає до 7 %. У цих жінок було отримано більше аномальних ооцитів у циклах ЗІВ після трансплантації КОТ, показник заплідненості є меншим (50 %), ніж у загальній популяції (70 %), що свідчить про порушення дозрівання ооцитів.

Отже, можна з впевненістю стверджувати, що трансплантації ауто- чи алогенної КОТ є перспективним методом для відновлення репродуктивної та гормональної функції у пацієнток після проходження променевої чи хіміотерапії, а також після радикальних оперативних втручань, але метод потребує подальших досліджень для отримання повноцінних ооцитів та ембріонів у програмах ЗІВ, ICSI, IMSI.

Список літератури

1. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy / D. Meiorow, J. Levron, T. Eldar-Geva [et al.] // *N. Engl. J. Med.* — 2005. — V. 353. — P. 318–321.
2. Searching for evidence of disease and malignant cell contamination in ovarian tissue stored from hematologic cancer patients / Meiorow Dror, Hardan Izhar, Dor Jehoshua [et al.] // *Human Reproduction.* — 2008. — V. 23, № 5. — P. 1007–1013.
3. Do cycle disturbances explain the age-related decline of female fertility? Cycle characteristics of women aged over 40 years compared with a reference population of young women / P. Van Zonneveld, G. J. Scheffer, F. J. M. Broekmans [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2003. — V. 18. — P. 495–501.
4. The significance of elevated basal follicle stimulating hormone in regularly menstruating infertile women / N. A. Ahmed Ebbiary, E. A. Lenton, C. Salt [et al.] // *Hum. Reprod.* — 1994. — V. 9. — P. 245–252.
5. Cryopreservation of follicles in human ovarian cortical tissue. Comparison of serum and human serum albumin in the cryoprotectant solutions / J. Hreinsson, P. Zhang, M. L. Swahn [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2003. — V. 18. — P. 2420–2428.
6. Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and *in vitro* culture in a calcium alginate matrix / Christiani A. Amorim, Anne Van Langendonck [et al.] // *Human Reproduction.* — 2009. — V. 24, № 1. — P. 92–99.
7. Simplified technique of human ovarian tissue freezing: quick cooling from -36°C / V. Isachenko, E. Isachenko, J. Reinsberg [et al.] // *CryoLetters.* — 2008. — V. 29, № 3. — P. 261–268.
8. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue / J. Callejo, C. Salvador, A. Miralles [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 2001. — V. 86. — P. 4489–4494.
9. А. с. № 1017251. Способ консервирования ткани яичника человека / Грищенко В. И., Лобинцева Г. С. и др. — Опубл. 1983, Б. И. № 18.
10. *Gosden R. G.* Ovary and uterus transplantation / R. G. Gosden // *Reproduction.* — 2008. — V. 136. — P. 671–680.
11. Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation / K. L. Schmidt, C. Yding Andersen, A. Loft [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2005. — V. 20. — P. 3539–3546.
12. Fresh human orthotopic ovarian cortex transplantation: long-term results / M. Sanchez, P. Alama, B. Gadea [et al.] // *Human Reproduction.* — 2007. — V. 22, № 3. — P. 786–791.
13. Restoration of ovarian function after orthotopic (intraovarian and periovarian) transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a woman treated by bone marrow transplantation for sickle cell anaemia: case report / J. Donnez, M. M. Dolmans, D. Demylle [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2006. — V. 21. — P. 183–188.
14. Fresh autologous transplantation of ovarian cortical strips to the anterior abdominal wall at the pfannenstiel incision site / G. Kiran, H. Kiran, Y. K. Coban, [et al.] // *Fertil. Steril.* — 2004. — V. 82. — P. 954–956.
15. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm / K. Oktay, K. Economos, M. Kan [et al.] // *JAMA.* — 2001. — V. 286. — P. 1490–1493.
16. *Parrott D. M. V.* The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue / D. M. V. Parrott // *J. Reprod. Fertil.* — 1960. — V. 1. — P. 230–241.
17. Cryopreservation and orthotopic transplantation of rat ovaries as a means of gamete banking / Martina M. Dorsch, Dirk Wedekind, Kenji Kamino and Hans J. Hedrich // *Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals.* — 2007. — V. 41. — P. 247–254.
18. *Oktay K.* Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue / K. Oktay, G. Karlikaya // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — V. 342, № 25. — P. 1919.
19. Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: case report / I. Demeestere, P. Simon, F. Buxant [et al.] // *Hum. Reprod.* — 2006. — V. 21. — P. 2010–2014.
20. Fertility preservation: successful transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a young patient previously treated for Hodgkin's disease / I. Demeestere, P. Simon, S. Emiliani [et al.] // *Oncologist.* — 2007. — V. 12. — P. 1437–1442.
21. Feasibility of ovarian cryopreservation in borderline ovarian tumours / V. Fain-Kahn, C. Poirot, C. Uzan [et al.] // *Human Reproduction.* — 2009. — V. 1, № 1. — P. 1–6.
22. Hormonal and histologic finding in human cryopreserved ovarian autografts / R. Dittrich, A. Muller, T. Maltaris [et al.] // *Fertility and Sterility.* — 2009. — V. 91, № 4. — P. 1503–1505.
23. IVF outcome in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue / M. M. Dolmans, J. Donnez, A. Camboni [et al.] // *Human Reproduction.* — 2009. — V. 24, № 11. — P. 2778–2787.

В.А. Шаблій

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ОВАРИЛЬНОЙ ТКАНИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В РЕПРОДУКТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Обзор литературы посвящен анализу различных методов криоконсервирования овариальной ткани и путей ее использования в репродуктивной медицине. Главное внимание уделено сайтам трансплантации ткани, динамике роста фолликулов и секреторной функции ткани яичника. Рассмотрена также эффективность использования методов оплодотворения *in vitro* после трансплантации, перечислены основные факторы, которые лежат в основе затухания овариальной функции трансплантата.

Ключевые слова: овариальная ткань, трансплантация, фолликулы, эстрадиол, оплодотворение *in vitro*.

V.A. Shablii

CRYOPRESERVATION OF OVARIAN TISSUE AND ITS USE IN REPRODUCTIVE MEDICINE

A literary review is devoted to the analysis of different methods of cryopreservation of ovarian tissue and ways of its use in reproductive medicine. The main attention is given to sites of tissue transplantation, the dynamics of follicular growth and secretory function of ovarian tissue. We also consider the effectiveness of methods for *in vitro* fertilization after transplantation are listed the key factors underlying the attenuation function of ovarian transplant.

Key words: ovarian tissue transplantation, follicles, estradiol, *in vitro* fertilization.

УДК 612.621.38.014:57.043

**В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик*,
Г.М. Онищенко, Г.С. Лобинцева**

ТОВ «Інститут клітинної терапії», м. Київ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України

**ДУ «Інститут генетичної і регенеративної медицини АМН України»*

ХАРАКТЕР ЕКСПРЕСІЇ ОКРЕМИХ ПОВЕРХНЕВИХ МАРКЕРІВ У КУЛЬТУРИ КЛІТИН ПУПОВИННОЇ ВЕНИ ЛЮДИНИ

Показано наявність популяції стромальних та ендотеліальних клітин у деяких культурах пуповинної вени людини. Такі популяції характеризувались імунофенотипами CD31⁺CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} відповідно. З пасажуванням у культурах ендотеліальних клітин виявлено тенденцію до зниження експресії маркера CD73. Показано, що низький рівень експресії маркера CD90 при одночасному високому рівні експресії CD105 може свідчити про наявність популяції ендотеліальних клітин у культурі пуповинної вени людини.

Ключові слова: пуповинна вена людини, стромальні клітини, ендотеліальні клітини, змішані культури.

Існують багато методів отримання культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) з пуповинної вени людини, однак всі вони не виключають можливості отримання змішаної культури клітин з ендотеліоцитами [1, 2]. Відомо багато факторів, що впливають на ефективність отримання культури ММСК, а саме: метод ферментації [3], склад середовища культивування [4].

Велика кількість поверхневих маркерів ММСК експресуються на ендотеліальних клітинах, а саме: CD73, CD105, CD146, CD44 [3]. Однак ендотеліальні клітини можна визначити за експресією CD31, CD144 [3], фактора Віллебрандта [5] та відсутністю CD90 [6].

Потрібно відмітити, що пошук оптимальних методів імунофенотипування культури клітин пуповини з метою визначення наявності як ендотеліальних, так і мезенхімальних стромальних елементів є досить актуальним.

Метою дослідження було охарактеризувати експресію деяких поверхневих маркерів на ендотеліальних клітинах пуповини людини для оптимізації методу їх детекції в культурі клітин ММСК пуповини.

Матеріал і методи. Отримання культури клітин з пуповинної вени людини.

Пуповину отримували після народження дитини з інформованої згоди жінок. Пуповину поміщали в розчин Хенксу з додаванням 30 од/мл гепарину, 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну та відразу промивали від крові. Після відмивки пуповинної крові пуповину інкубували в розчині, що містив 5 мкг/мл амфотерицину протягом 20 хв. Пуповинну вену заливали нагрітим до 37 °C розчином 0,1 % колагенази (Serva) та інкубували 30–40 хв при температурі 37 °C, після чого вену промивали середовищем DMEM (Sigma) з 5 мМ HEPES. Для зниження активності ферментів додавали FBS (Sigma) до кінцевої концентрації 10 %. Фільтрували отриману суспензію через фільтр з діаметром пор 100 мкм. Отриманий фільтрат центрифугували 5 хв при 300 g. Відбирали супернатант і ресуспендували осад клітин у розчині DPBS (Gibco) кімнатної температури. Підрахунок кількості клітин в отриманій суспензії проводили в камері Горяєва. Клітини висівали в культуральні флакони для адгезивних клітин з розрахунку 120–160 тис. клітин на 1 см². Середовище для культивування DMEM містило 15 % FBS (Gibco), 5 мМ HEPES, 2 мМ L-глутаміну (Biomedicals), 20 нг/мл FGF (Biochrom), 50 мкг/мл стрептоміцину, 100 од/мл пеніциліну.

© В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик та ін., 2011

Культивування проводили при 37 °С в 5 % CO₂ зі зміною середовища кожні 3–4 доби. Пересів здійснювали при досягненні культурою 80–90 % конфлюентності у співвідношенні 1:3. Для пересіву використовували 0,05 % розчин трипсину з ЕДТА (Biochrom).

Кріоконсервування культури клітин.

Після зняття клітин з культурального пластику за допомогою 0,05 % розчину трипсину з ЕДТА (Biochrom) суспензію клітин центрифугували 5 хв при 300 g. Клітини ресуспендували в розчині Хенкса з подальшим додаванням 10 % розчину ДМСО у співвідношенні 1:1. Заморожування проводили за трьохетапною програмою. Кріоконсервовані зразки зберігали у рідкому азоті при температурі –196 °С.

Імуноцитохімічне дослідження.

Для проведення імуноцитохімічного аналізу кріоконсервовані клітини розморожували на водяній бані при температурі 38–40 °С до появи рідкої фази з подальшим відтаюванням при кімнатній температурі. Краплю (10 мкл) з клітинами наносили на предметне скельце та центрифугували при 400 g протягом 5–10 хв. Цитоспіни фіксували сумішшю ацетону та метанолу 1:1. Ендогенну пероксидазну активність інгібували 0,3 % розчином H₂O₂ протягом 5 хв. Інкубували з первинними антитілами проти фактора Віллебранда (Dako, Данія) та проводили візуалізацію з використанням Mouse/Rabbit PolyVue HPR/DAB Detection System (DBS, США).

Проточна цитофлуориметрія.

Культуру клітин знімали з культурального пластику 0,05 % розчином трипсину з ЕДТА. До суспензії клітин додавали FBS (Gibco) до кінцевої концентрації 10 % та центрифугували при 250 g протягом 10 хв. Імунофенотипування суспензії клітин проводили методом проточної цитометрії з використанням моноклональних антитіл, кон'югованих з флуорохромами (Becton Dickinson, США) в робочій концентрації 0,5 мкг на 10⁶ клітин: anti-CD34 APC, anti-CD90 FITC, anti-CD45 APC-Cy7, anti-CD105 PerCP-Cy 5.5, anti-CD73 PE, anti-CD31 PE. Фенотипування проводили на лазерному проточному цитофлуориметрі-сортері BD FACSAria (Becton Dickinson, США) за допомогою програми FACS Diva 6.1, аналізуючи одночасно 2 параметри світлорозсіювання та 5 параметрів флуоресценції. Для налаштування компенсації перекриття спектрів емісії флуорохромів при багатопараметрич-

ному аналізі використовували контрольні зразки клітин без внесення антитіл (unstained control), зразки з кожним з антитіл окремо (single stained control) та зразки з комбінацією кількох антитіл без одного з них (fluorescence minus one control).

Результати та їх обговорення. При культивуванні клітин пуповинної вени на першому пасажі спостерігався ріст як фібробластоподібних клітин строми, так і ендотеліальних клітин (рис. 1). Стромальні клітини були фібробластоподібними та мали більше виростів (рис. 2). Ендотеліальні клітини мали характерну морфологію, схожу на бруківку, та утворювали колонії прозорих клітин (рис. 3, а). На периферії клітини розміщувались по колу, що надавало колоніям чіткого контуру (рис. 3, б). Для таких клітин була характерна багат шаровість при тривалому культивуванні на відміну від ендотелію.

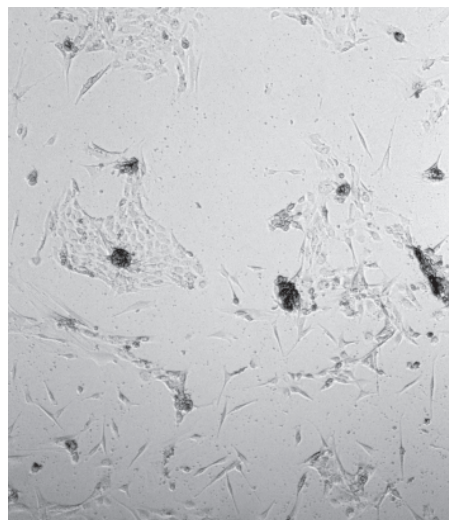


Рис. 1. Змішана культура пуповинної вени людини

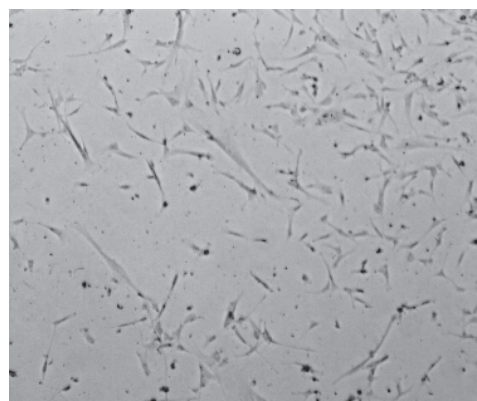


Рис. 2. Культура мезенхімальних клітин з пуповинної вени людини

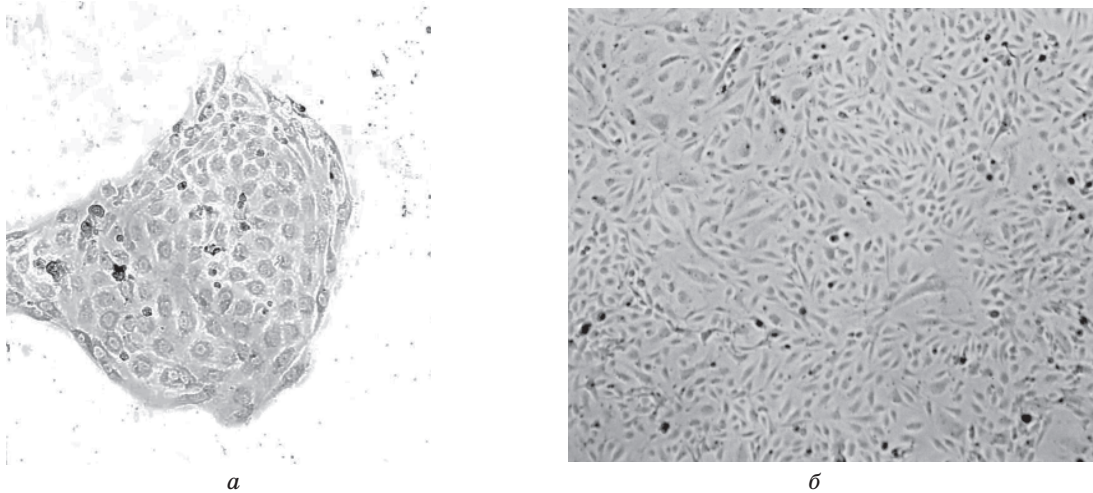


Рис. 3. Культура ендотеліальних клітин з пуповинної вени людини:
а — колонії прозорих клітин; б — колонії з чітким контуром

Використання мультипараметричного аналізу культури деяких ліній клітин пуповинної вени показало, що вони мають імунотип мезенхімальних стромальних клітин $CD90^+CD73^+CD105^+CD31^+CD34^-CD45^-$ (рис. 4).

На відміну від стромальних клітин, ендотеліальні клітини не експресували CD90 та були позитивні за CD31 (рис. 5).

Також проведення імуноцитохімічного аналізу виявило експресію фактора Віллебранда (рис. 6).

Експресія CD31 і фактора Віллебранда в культурі клітин пуповинної вени свідчить про те, що вони є ендотеліальними клітинами [6].

В роботі Rebecca C. Schugar et al. показано, що при культивуванні клітин, отриманих шляхом ферментування стінок пу-

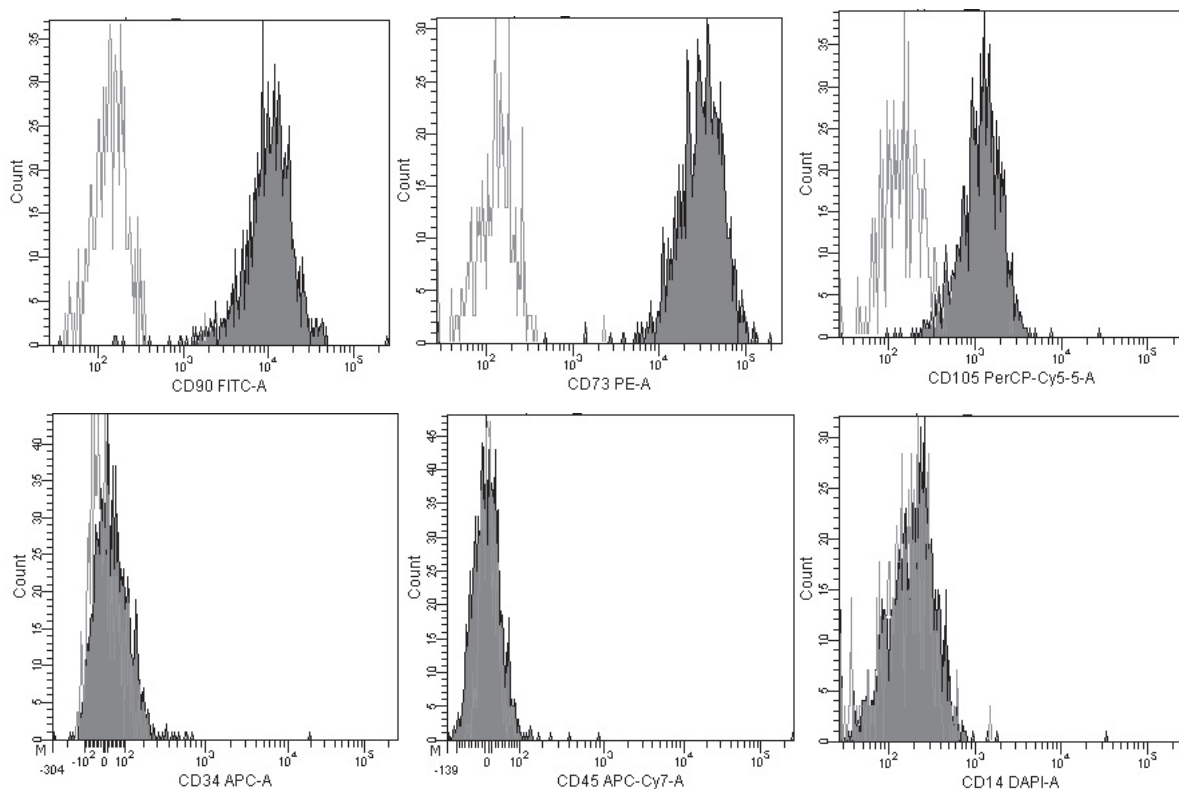


Рис. 4. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD34, CD45, CD14 в культурі стромальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 5-й пасаж: сірий контур — фоновий рівень флуоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флуоресценції після інкубації з антитілами

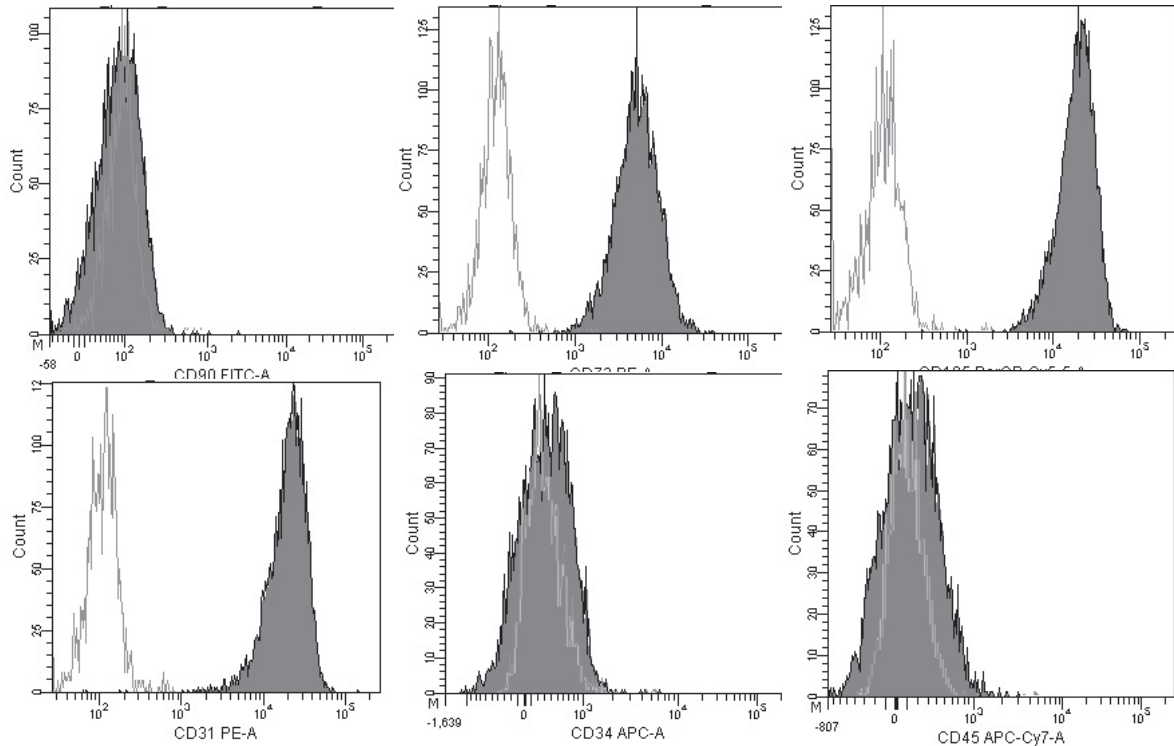


Рис. 5. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD73, CD105, CD31, CD34, CD45 в культурі ендотеліальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 5-й пасаж: сірий контур — фоновий рівень флюоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флюоресценції після інкубації з антитілами

виної вени колагеназою, спостерігається зростання кількості стромальних елементів з фенотипом CD90⁺CD144⁻CD146^{50%}, тоді як при використанні диспази переважають клітини CD90⁺CD144⁺CD146^{100%} [3].

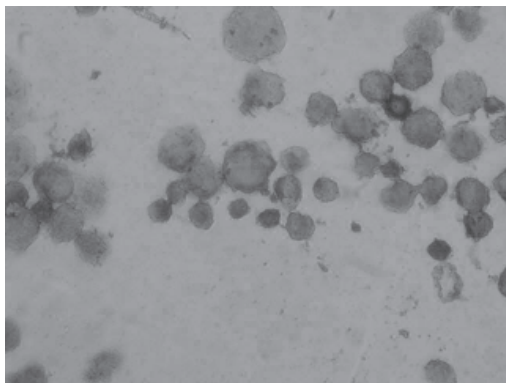


Рис. 6. Цитоспіновий препарат кріоконсервованої культури ендотеліальних клітин пуповинної вени людини. Імуноцитохімічне забарвлення на фактор Віллебрандта, × 100

Цікавим виявився характер експресії поверхневих маркерів CD73 та CD105. Ендотеліальні клітин порівняно слабо експресували CD73 та сильно — CD105 (рис. 3), тоді як стромальні клітини мали високий рівень експресії CD73 та низький — CD105 (рис. 2).

В роботі Andrew C. Voquest et al. було показано, що всі ендотеліальні клітини, виділені з жирової тканини, позитивні на CD31 і мали високий рівень експресії CD105 порівняно з фракцією CD31⁻ [7]. Відомо, що CD105 (ендоглін) бере участь у регуляції організації цитоскелета клітин та їх міграції, чим відіграє важливу роль у розвитку серцево-судинної системи та ремоделюванні судин [8].

Також потрібно відмітити, що з пасажуванням ендотеліальних клітин спостерігається зниження експресії CD73 (рис. 7).

В змішаних культурах клітин пуповини людина популяція ендотеліальних клітин мала імунофенотип CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi}, тоді як стромальні клітини були представлені популяцією CD31⁻CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low} (рис. 8).

Потрібно відмітити, що в деяких змішаних культурах при домінуванні популяції ендотеліальних клітин спостерігається подібний рівень експресії CD73 та CD105 на стромальних клітинах (рис. 9).

Отже, нами показано, що в культурі клітин пуповинної вени людини можуть бути стромальні та ендотеліальні популяції клітин, які розрізняються за характером експресії основних маркерів мезенхімаль-

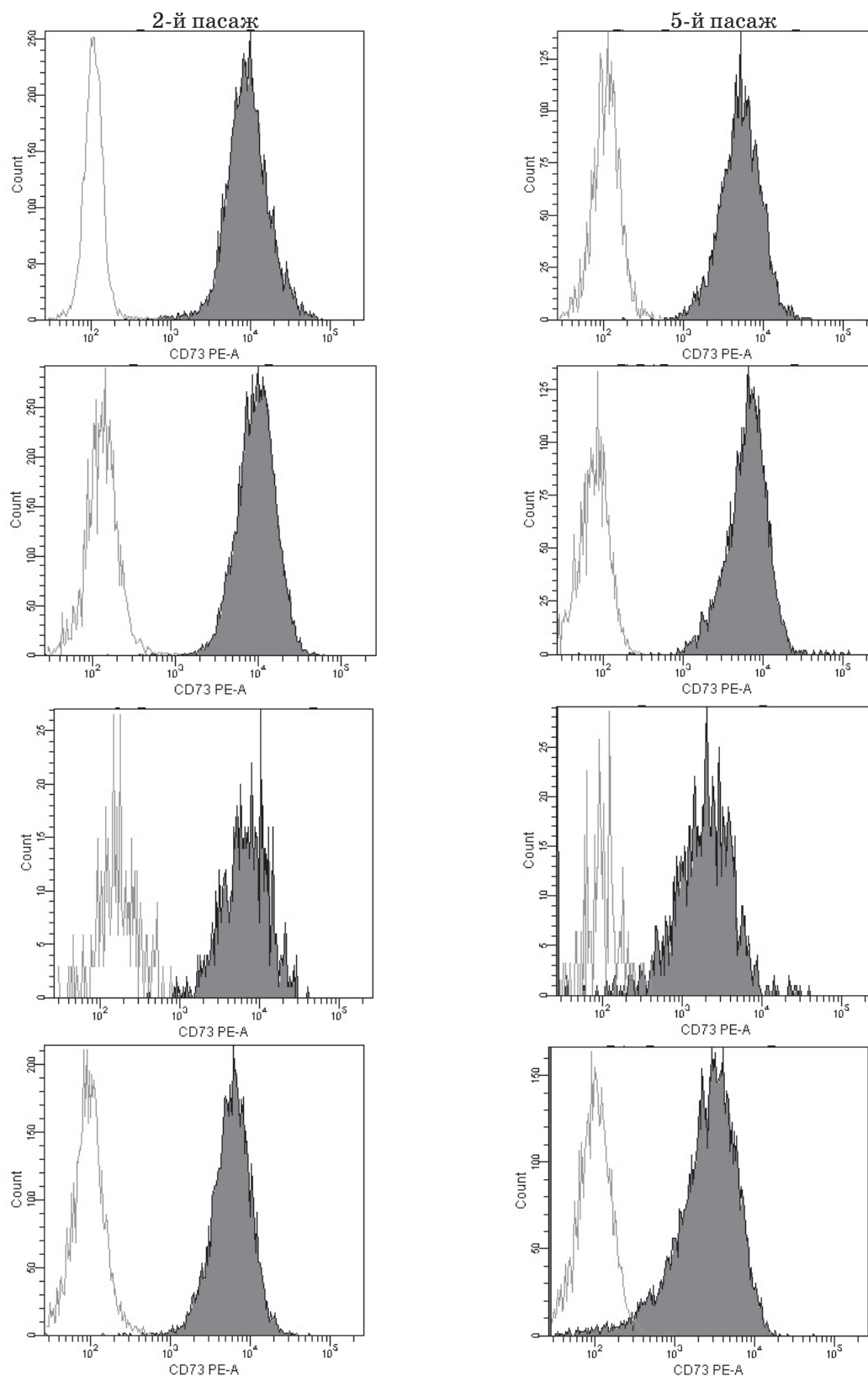


Рис. 7. Гістограми експресії поверхневого маркера CD73 в культурах ендотеліальних клітин, отриманих з пуповинної вени людини (1–4): сірий контур — фоновий рівень флюоресценції клітин; чорний колір — інтенсивність флюоресценції після інкубації з антитілами; mean — середнє арифметичне інтенсивності флюоресценції

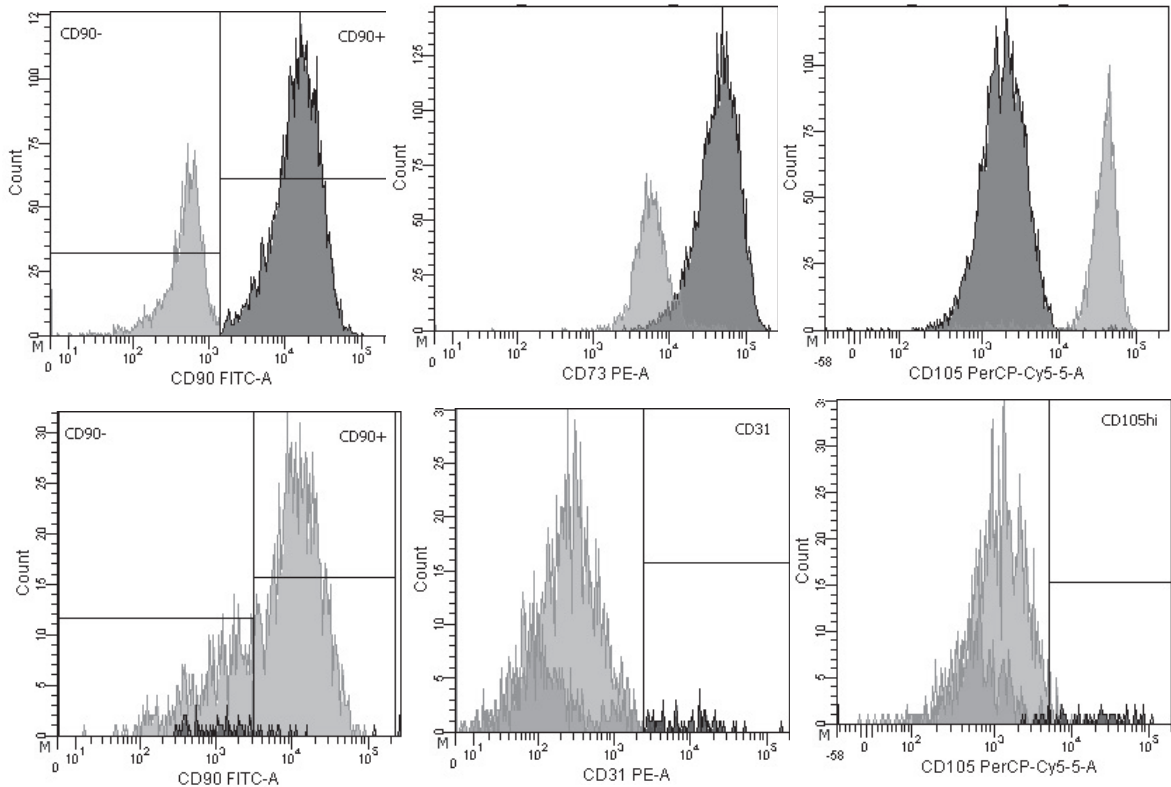


Рис. 8. Гістограми експресії поверхневих маркерів CD90, CD31, CD105 у культурі клітин з пуповинної вени людини, 3-й пасаж: чорний колір — популяція CD31⁺ клітин, сірий — CD31⁻

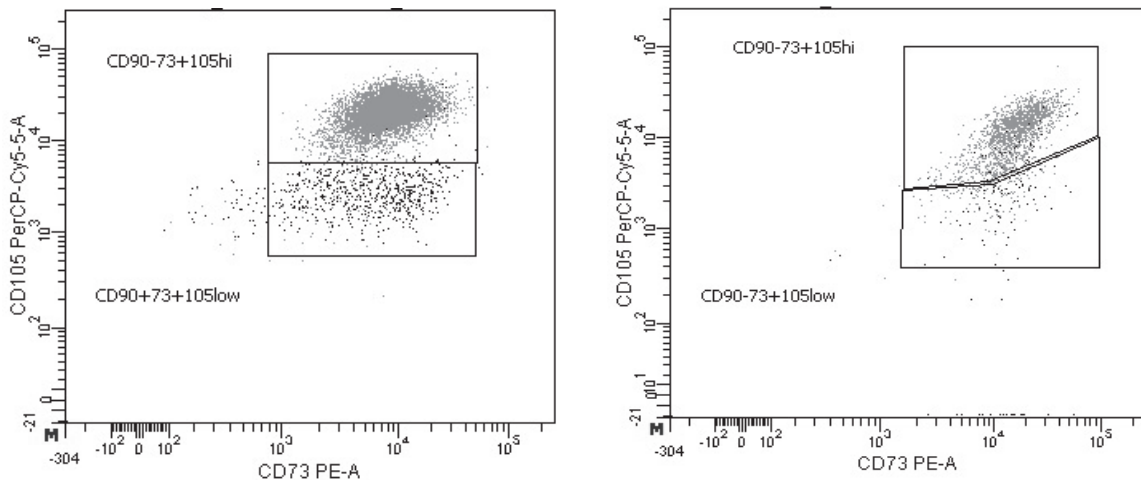


Рис. 9. Гістограми розподілу популяцій CD90⁻73⁺105^{hi} та CD90⁺73⁺105^{low} у 2 культурах клітин, отриманих з пуповинної вени людини, 1-й пасаж

них стромальних клітин CD90, CD73 та CD105. Встановлено, що в змішаних культурах пуповини людини стромальні клітини представлені популяцією CD31⁻CD90⁺CD73⁺CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻.

Висновки

1. Показано наявність у деяких культурах клітин пуповинної вени людини популяцій як стромальних, так і ендотеліальних клітин.

2. Виявлено різницю в інтенсивності експресії маркерів CD73 та CD105 у культурах стромальних та ендотеліальних клітин.

3. Низький рівень експресії маркера CD90 при одночасному високому рівні експресії CD105 може свідчити про наявність популяції ендотеліальних клітин у культурі.

4. З пасажуванням в культурах ендотеліальних клітин виявлено зниження експресії маркера CD73.

Список літератури

1. *Sachin S. Kadam*. Simultaneous isolation of vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells from the human umbilical cord / Sachin S. Kadam, Shubha Tiwari, Ramesh R. Bhonde // *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. — 2009. — V. 131, № 2. — P. 267–282.
2. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells / D. T. Covas, J. L. C. Jiufie, A. R. L. Silva, M. D. Orella // *Brazilian J. of Medical and Biological Research*. — 2003. — V. 36. — P. 1179–1183.
3. *Rebecca C. Schugar*. High Harvest Yield, High Expansion, and Phenotype Stability of CD146 Mesenchymal Stromal Cells from Whole Primitive Human Umbilical Cord Tissue / Rebecca C. Schugar, Steven M. Chirieleison, E. Kristin // *J. of Biomedicine and Biotechnology*. — 2009. — P. 1–11.
4. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors / R. Sarugaser, D. Lickorish, D. Baksh [et al.] // *Stem Cells*. — 2005. — V. 23. — P. 220–229.
5. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood / D. A. Ingram, L. E. Mead, H. Tanaka [et al.] // *Blood*. — 2004. — V. 104, № 9. — P. 2752–2760.
6. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures / L. Kisselbach, M. Merges, A. Bossie, A. Boyd // *Cytotechnology*. — 2009. — V. 59, № 1. — P. 31–44.
7. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture / Andrew C. Boquest, A. Shahdadfar, Katrine Fronsdal [et al.] // *Molecular Biology of the Cell*. — 2005. — V. 16. — P. 1131–1141.
8. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the lim family of proteins / Sanz-Rodriguez Francisco, Mercedes Guerrero-Esteo, Luisa-Maria Botella, Denis Banville // *J. Biol. Chem.* — 2004. — V. 279, № 31. — P. 32858–32868.

В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик, Г.М. Онищенко, Г.С. Лобынцева

ХАРАКТЕР ЕКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ МАРКЕРОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ПУПОВИНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

Показано наличие популяций стромальных и эндотелиальных клеток в некоторых культурах пуповинной вены человека. Такие популяции характеризовались иммунофенотипами CD31⁻CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} соответственно. При пассажировании в культурах эндотелиальных клеток обнаружено тенденцию к снижению экспрессии маркера CD73. Показано, что низкая экспрессия маркера CD90 при одновременном высоком уровне экспрессии CD105 может свидетельствовать о наличии популяции эндотелиальных клеток в культуре пуповинной вены человека.

Ключевые слова: пуповинная вена человека, стромальные клетки, эндотелиальные клетки, смешанная культура.

V.A. Shablii, M.D. Kuchma, V.M. Kyryk, G.M. Onishchenko, G.S. Lobintseva

CHARACTER OF THE SURFACE MARKERS EXPRESSION ON CULTURED CELLS DERIVED FROM HUMAN UMBILICAL VEIN

It was shown, that some cultures from the human umbilical vein contain the populations of stromal and endothelial cells. These populations were characterized by immunophenotype CD31⁻CD90⁺CD73^{hi}CD105^{low}CD34⁻CD45⁻CD14⁻ та CD31⁺CD90⁻CD73^{low}CD105^{hi} respectively. The expression of the marker CD73 of endothelial cells decreased during subcultivation. It was shown, that the low expression of the marker CD90 together with the high level of CD105 can serve as indicator of presence of endothelial cells in the cultures from the human umbilical vein.

Key words: umbilical cord vein, stromal cells, endothelial cells, mixed culture.

УДК 616.379-008

*В.И. Шепитько, Л.Е. Бобырева, И.Л. Дворник,
А.А. Капустянская, К.В. Шепитько, А.Л. Челишвили*

ВГУУУ «Украинская медицинская стоматологическая академия», г. Полтава

НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ В ДИАБЕТОЛОГИИ

Работа посвящена разработке новых биотехнологий лечения СД с использованием комплексной терапии СД гетеротопической трансплантации криоконсервированной фетоплацентарной ткани. Установлена ее способность нормализовать показатели углеводного обмена (снижается уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина), тормозить нарастание уровня липидов (снижается уровень общего холестерина, β - и пре- β -липопротеидов) и свободнорадикального перекисного окисления липидов (снижается уровень ТБК-реактантов, диеновых конъюгат).

Ключевые слова: сахарный диабет, криоконсервированная фетоплацентарная ткань, углеводный обмен, свободнорадикальное перекисное окисление липидов, качество жизни.

В настоящее время во всем мире сахарным диабетом (СД) страдает около 300 млн. человек. СД является одной из самых важных медико-социальных проблем здравоохранения практически всех стран мира. Распространенность СД в промышленно развитых странах составляет 5–6 % и имеет тенденцию к увеличению. Так, каждые 10–15 лет количество больных СД увеличивается примерно в 2 раза. Это происходит в основном за счет прироста больных СД 2-го типа, т. е. инсулиннезависимого (ИНСД). Расчеты показали, что в случае увеличения средней продолжительности жизни до 80 лет количество больных ИНСД будет превышать 17 % всего населения. ВОЗ оценила современное состояние роста заболеваемости СД как глобальную эпидемию, требующую решения не только медицинских, но и социальных проблем. Следует подчеркнуть, что важная социальная значимость СД состоит в том, что он приводит к ранней инвалидизации и летальности, которая связана с развитием поздних сосудистых осложнений, их частота составляет от 64 до 98 % случаев. По смертности СД вышел на третье место после сердечно-сосудистой патологии и злокачественных новообразований.

СД представляет собой заболевание, которое всегда обусловлено дефицитом инсулина, абсолютном при СД 1-го типа (ИЗСД) или относительном при СД 2-го типа (ИНСД)

вариантах. Нарушение утилизации глюкозы и, как следствие, появление гипергликемии и глюкозурии является первым витком в сложнейшем патогенезе сахарного диабета. За ним или одновременно следуют нарушения водно-электролитного, жирового, белкового обменов, нарушения циркадианного ритма регуляторных и контринсулярных гормонов. Со временем на вершину этой пирамиды гормонально-метаболических изменений выносятся органные и системные изменения, так называемые поздние диабетические осложнения, затрагивающие практически все функциональные системы организма человека.

Исходя из патогенеза СД, его терапия базируется на трех основных принципах: компенсации дефицита инсулина (диета, дозированные физические нагрузки, сахароснижающие средства, введение инсулина); коррекции гормонально-метаболических нарушений; лечения и профилактики диабетических осложнений.

И хотя в арсенал средств лечения больных с данной патологией в последние годы вошли человеческие инсулины, «искусственная поджелудочная железа», индивидуальные глюкометры, организованы система обучения принципам самоконтроля в «школах сахарного диабета» и подологическая служба, СД продолжает представлять собой серьезную медико-социальную проблему

© В.И. Шепитько, Л.Е. Бобырева, И.Л. Дворник и др., 2011

для большинства стран мира, так как сочетание неуклонного роста заболеваемости с отсутствием реальных профилактических мероприятий создает весьма пессимистический прогноз относительно будущего состояния здоровья населения планеты. Иллюстрацией к сказанному служат данные по распространенности СД и летальности за 1986–2000 гг. в Полтавской области и по Украине в целом. По данным анализа распространенности СД, его осложнений и летальности по Полтавской области и по Украине в целом 1986–2000 гг. (данные ежегодных обзоров МЗ Украины и Института эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко АМН Украины) установлено, что распространенность СД по Полтавской области увеличилась в 1,8 раза, по Украине в целом — в 1,7 раза, в то же время летальность в первом случае увеличилась в 1,8 раза, во втором — в 1,6 раза, что свидетельствует о необходимости разработок принципиально новых методов терапии СД.

В 1998 году американским ученым Джеймсу Томпсону и Джону Беккеру удалось выделить человеческие эмбриональные стволовые клетки (ЭСК). Опубликованные в 1999 году в журнале «Science» результаты экспериментов были признаны третьим по важности событием в биологической науке XX века после открытия двойной спирали ДНК и расшифровки генома человека. Уникальное свойство ЭСК — плюрипотентность, т. е. способность дать начало по меньшей мере 350 различным типам клеток, послужила толчком к бурной исследовательской деятельности по изучению ЭСК и открыла широкие перспективы их практического использования в биологии и медицине, в первую очередь в трансплантологии.

Миллиарды клеток растущего организма (человека или животного) происходят всего-навсего из одной клетки (зиготы), которая образуется в результате слияния мужской и женской гамет. Эта единственная клетка содержит не только информацию об организме, но и схему ее последовательного развертывания. Так развивается человеческий организм, состоящий из 1014 клеток. В ходе эмбриогенеза оплодотворенная яйцеклетка делится и дает начало клеткам, не имеющим других функций, кроме передачи генетического материала в следующие клеточные поколения. Это и есть ЭСК, геном которых находится в «нулевой точке» — механизмы, определяющие специализацию, еще не включены, из них потенциаль-

но могут развиваться любые клетки. Считывание генетического кода идет поэтапно. С момента дифференцировки на эмбриональные листки: экто-, энто- и мезодерму, появляются регионарные стволовые клетки (РСК) первого, второго и т. д. порядка до тканевых производных, т. е. потентность этих клеток определена эмбриональным листком. Делятся они таким же образом, как и ЭСК: одна РСК запускает программу развития, другая — отправляется в депо. Потомки этих стволовых клеток, размножаясь, следуют по уже определенному пути специализации — процесс получил название коммитирование. Во взрослом организме имеются стволовые клетки тканей, благодаря делению этих клеток обновляются структуры тканей.

С момента появления тканевых зачатков в процесс развития включается плацента, которая не только ведает жизнеобеспечением плода, но и регулирует его нормальное созревание и развитие. В плаценте выявлены пептиды, гомологичные гонадотропинам и лактогенам, которые выполняют роль соматотропного гормона (СТГ) во время внутриутробного развития плода. Также в ней синтезируются инсулиноподобные факторы роста 1 и 2, относящиеся к соматомединам и опосредующие действие СТГ. Из плаценты выделены и охарактеризованы факторы роста нервов и фибробластов, а также фактор, стимулирующий рост эндотелия сосудов; в ней выявляются все компоненты ренин-ангиотензиновой системы.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение терапевтического эффекта гетеротопической трансплантации криоконсервированной фетоплацентарной ткани в комплексной терапии больных СД.

Материал и методы. Обследовано 27 практически здоровых лиц, для чистоты исследования и достоверности сравнения, они были разделены на две возрастные группы: до и после 40 лет; 81 больной СД 1-го типа (39 — контрольная, 42 — исследуемая группа), 48 больных СД 2-го типа (27 — контрольная, 21 — исследуемая группа) и 49 больных СД 2-го типа, требующих для своего лечения инсулин, вторично инсулин-зависимые (24 — контрольная, 25 — исследуемая группа). Длительность заболевания составила 8,3 года, (период наблюдения — от 3 мес до 1 года. Больные контрольной группы получали традиционную терапию (диета, инсулин, сахароснижающие пероральные препараты, ангиопротекторы, витами-

ны), больным исследуемой группы на фоне традиционной терапии была произведена гетеротопическая трансплантация криоконсервированной плацентарной ткани. Забор тканей, их криоконсервация, проверка на стерильность, стандартизация, сертификация и подготовка их к клиническому использованию осуществлялась сотрудниками Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков). Обследование проводилось до лечения, через 3 месяца и 1 год после трансплантации. Для оценки качества жизни мы использовали методику диагностики оперативной диагностики самочувствия, активности и настроения с помощью анкетирования по Д.Я. Райгородскому (1999), табл. 1.

уровень общего холестерина («Биотест», Lachema), β - и пре- β -липопротеидов; углеводного обмена — уровень глюкозы ортотолуидиновым методом, содержание гликозилированного гемоглобина (HbA_{1c}); состояние свободнорадикального перекисного окисления липидов — уровень ТБК-реактантов, диеновых конъюгат и активность антиоксидантного фермента — церулоплазмина. Состояние периферической гемодинамики оценивали по показателям доплерометрии, реовазографии и капилляроскопии. Работа проведена на базе Полтавского регионального центра клеточной и тканевой трансплантации и лаборатории криоморфологии Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Таблица 1. Показатели качества жизни у больных СД 1-го, 2-го типа и вторично инсулинзависимым по Д.Я. Райгородскому

| Группа больных | Срок наблюдения | Самочувствие | Активность | Настроение |
|-------------------------------------|-----------------|--------------|------------|------------|
| СД 1-го типа | | | | |
| контрольная | До лечения | 1,7 | 1,6 | 1,6 |
| | Через 3 месяца | 2,2 | 2,4 | 2,5 |
| | Через 1 год | 1,9 | 2,2 | 2,3 |
| исследуемая | До лечения | 1,4 | 1,5 | 1,6 |
| | Через 3 месяца | 4,4 | 4,2 | 4,5 |
| | Через 1 год | 4,1 | 4,0 | 3,7 |
| СД 2-го типа | | | | |
| контрольная | До лечения | 2,0 | 2,2 | 2,1 |
| | Через 3 месяца | 2,4 | 2,5 | 2,6 |
| | Через 1 год | 2,2 | 2,3 | 2,2 |
| исследуемая | До лечения | 1,9 | 2,3 | 2,2 |
| | Через 3 месяца | 4,0 | 4,0 | 4,2 |
| | Через 1 год | 3,8 | 3,9 | 4,0 |
| Вторично инсулинзависимым СД | | | | |
| контрольная | До лечения | 1,8 | 2,0 | 2,3 |
| | Через 3 месяца | 2,2 | 2,5 | 2,7 |
| | Через 1 год | 2,1 | 2,3 | 2,4 |
| исследуемая | До лечения | 1,7 | 2,1 | 2,4 |
| | Через 3 месяца | 4,3 | 4,1 | 4,3 |
| | Через 1 год | 4,0 | 3,8 | 4,1 |

Обследование больных включало: общеклинические и функциональные методы обследования (общий анализ крови, мочи, глюкоза крови, ЭКГ, рентгеноскопия органов грудной клетки и др.), а также определение показателей липидного обмена —

(г. Харьков). Полученные результаты обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты. Нами установлено, что использование в комплексной терапии СД криоконсервированной фетоплацентарной

ткани позволило достичь продолжительной стойкой гликемической компенсации (табл. 2, 3).

мой — снизилась на 52,9 %. У больных СД 2-го типа (вторично инсулинзависимых) доза инсулина была увеличена на 6,1 % в

Таблица 2. Биохимические показатели и индекс массы тела у больных СД 1-го типа до и после трансплантации криоконсервированной фетоплацентарной ткани

| Показатель | До лечения (n=58) | Через 3 мес после лечения (n=54) | Через 1 год после лечения (n=51) |
|------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Глюкоза, ммоль/л | 11,80±0,36 | 6,95±0,11 p<0,001 | 6,20±0,21 p<0,001 |
| HbA _{1c} , % | 9,86±0,22 | 8,92±0,17 p<0,001 | 8,64±0,14 p<0,001 |
| Общий холестерин, ммоль/л | 4,85±0,07 | 4,61±0,05 p<0,01 | 4,54±0,04 p<0,001 |
| β- и пре-β-липопротеиды, г/л | 5,20±0,09 | 4,71±0,21 p<0,05 | 4,59±0,24 p<0,05 |
| Диеновые конъюгаты, мкмоль/л | 47,88±0,85 | 39,86±1,35 p<0,001 | 38,22±1,62 p<0,001 |
| ТБК-реактанты, мкмоль/л | 6,77±0,34 | 3,49±0,32 p<0,001 | 3,17±0,37 p<0,001 |
| Церулоплазмин, ЕД/мл | 274,21±6,46 | 233,50±7,87 p<0,001 | 229,41±9,42 p<0,001 |
| ИМТ, кг/м ² | 23,15±0,08 | 23,28±0,05 p>0,1 | 23,47±0,12 p<0,005 |

Примечание. Здесь и в табл. 3: p — достоверность по сравнению с показателем до лечения.

Таблица 3. Биохимические показатели и индекс массы тела у больных СД 2-го типа, получавших пероральные гипогликемизаты, до и после трансплантации криоконсервированной фетоплацентарной ткани

| Показатель | До лечения (n=11) | Через 3 мес после лечения (n=9) | Через 1 год после лечения (n=8) |
|------------------------------|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Глюкоза, ммоль/л | 9,60±0,10 | 6,10±0,22 p<0,001 | 5,90±0,20 p<0,001 |
| HbA _{1c} , % | 9,13±0,24 | 8,06±0,24 p<0,01 | 8,08±0,25 p<0,01 |
| Общий холестерин, ммоль/л | 5,83±0,09 | 5,56±0,10 p<0,1 | 5,34±0,08 p<0,01 |
| β- и пре-β-липопротеиды, г/л | 8,68±0,33 | 5,85±1,23 p<0,05 | 5,61±0,32 p<0,001 |
| Диеновые конъюгаты, мкмоль/л | 40,64±2,41 | 37,48±2,69 p>0,1 | 38,61±2,84 p>0,1 |
| ТБК-реактанты, мкмоль/л | 7,55±0,31 | 6,18±1,59 p>0,1 | 4,70±0,65 p<0,001 |
| Церулоплазмин, ЕД/мл | 174,04±5,96 | 221,33±17,40 p<0,05 | 220,32±18,28 p<0,05 |
| ИМТ, кг/м ² | 31,94±0,18 | 31,25±0,19 p<0,05 | 31,33±0,22 p<0,05 |

Так, благодаря комплексной терапии СД с использованием гетеротопической трансплантации криоконсервированной фетоплацентарной ткани снизился уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, уровень общего холестерина, β- и пре-β-липопротеидов. В значительной степени снизилась потребность в инсулине и сахароснижающих пероральных препаратах. У у больных СД 1-го типа в контрольной группе доза инсулина благодаря лечению была снижена на 2,1 %, в исследуемой — на 26,9 %. У больных СД 2-го типа доза сахароснижающих препаратов в контрольной группе увеличилась на 2,1 %, а в исследуе-

контрольной группе и снижена на 45,2 % — в исследуемой. Кроме того, нормализовалось перекисное окисление липидов и липидный обмен: снизился уровень ТБК-реактантов, диеновых конъюгатов. Существенно повысилось качество жизни у данной группы больных, причем данные изменения сохраняются практически неизменными в течение года.

Таким образом, использование в комплексной терапии СД криоконсервированной фетоплацентарной ткани способствовало нормализации показателей углеводного обмена, торможению нарастания уровня липидов и свободнорадикального перекисного окисления липидов.

В.І. Шепітько, Л.Є. Бобирьова, І.Л. Дворник, А.А. Капустянська, К.В. Шепітько, А.Л. Челішвілі
НОВІ БІОТЕХНОЛОГІЇ В ДІАБЕТОЛОГІЇ

Робота присвячена розробці нових біотехнологій лікування ЦД з використанням в комплексній терапії ЦД гетеротопічної трансплантації кріоконсервованої фетоплацентарної тканини. Встановлена її здатність нормалізувати показники вуглеводного обміну (знижується рівень глюкози і глікозильованого гемоглобіну), тормозити підвищення рівня ліпідів (знижується рівень загального холестерину, β - і пре- β -ліпопротеїдів) і вільнорадикального перекисного окиснення ліпідів (знижується рівень ТБК-реактантів, дієнових кон'югат).

Ключові слова: цукровий діабет, кріоконсервована фетоплацентарна тканина, вуглеводний обмін, вільнорадикальне перекисне окиснення ліпідів, якість життя.

V.I. Shepitko, L.Ye. Bobyreva, I.L. Dvornyk, A.A. Kapustyanskaya, K.V. Shepitko, A.L. Chelishvili
NEW BIOTECHNOLOGIES IN DIABETOLOGY

Work is devoted to development of new biotechnologies of treatment of the diabetes mellitus (DM) with use of a heterotopic transplantation of cryopreserved fetoplacental tissue in complex therapy of DM. Its abilities to normalize parameters of a carbohydrate metabolism (the levels of a glucose and glycated haemoglobin are reduced), to brake increase of a lipids level (the levels of the common cholesterol and β - and pre- β -lipoproteins are reduced) and free radical lipid peroxidation (levels of TBA-reactants and diene conjugates are reduced) was established.

Key words: diabetes, cryopreserved fetoplacental tissue, carbohydrate metabolism, free radical lipid peroxidation, quality of life.

UDC 616-089.843]-003.93-576.54

*O.L. Kukharchuk, V.V. Radchenko, B.M. Gandhi,
A.B. Padma Priya, A.O. Kukharchuk, Amol P. Gitte*

EmProCell Clinical Research Pvt. Ltd., Mumbai, India

THE AGING: THEORY OF THE BODY STEM-SPACES DEPLETION

The review contains an analysis of basic information about the principles and methods of a new direction in the treatment of human diseases named as regenerative medicine, basic information on stem-spaces of organism, provides information on the depletion of stem cells resources in the aging, and presented authors own theory of the aging mechanisms.

Key words: *stem cell, stem-spaces, immune system replacement, aging, regenerative medicine.*

Evolution developed two main options for the completion of living cells — necrosis and apoptosis, which at the tissue level corresponds to the processes of proliferation and regeneration. Proliferation can be regarded as a kind of sacrifice while filling the defect of damaged tissue that occurs due to its substitution of connective tissue elements: maintaining the structural integrity, the body loses partly the function of the diseased organ, which determines the subsequent development of compensatory responses to hypertrophy or hyperplasia of structural-functional elements that remains undamaged. The duration of the compensation depends on the amount of structural lesions caused by alteration of factors or disease, then in most cases decompensation occurs, a sharp deterioration in the quality and reducing the length of human life. Physiological regeneration provides remodeling process, i. e. replacement of aging and dying by the mechanism of natural death (apoptosis) of cells with new ones derived from stem cell reserves of the human body. In the process of reparative regeneration also involved cells resource of stem-spaces, which however, has already mobilized in pathological conditions associated with disease or tissue damage that initiates cells death by necrosis mechanisms.

Methods of regenerative medicine aimed at stimulation of the recovery of lost functions — either by mobilizing the patient's own stem resources of the body, either through the introduction of allogenic cells material. One

of these therapeutic methods is cells transplantation, known in history of medicine as a way to rejuvenate the aging organism. The term «cells therapy» is owned by a medicine and theology doctor Paul Niehans, who defined it as «a form of electoral influence whose goal is to develop the underdeveloped organ or organs which are incapable to self-regeneration». Beginning of stem cell therapy is calculated since 1931, when Niehans to rescue women from accidental removal of parathyroid glands, have successfully applied the introduction of parathyroid gland cells suspension of the ox. Further Niehans improved method of treatment by using for regenerative therapy cells of internal organs of sheep embryo — that is applied cells xenotransplantation. Among the most famous Niehans patients were Thomas Mann, who has lived for 80 years, Papa Piy XII — 82 years, Somerset Moaum — 91 years, Bernard Barukh — 95 years. Niehans himself died at the age of 89 years (Kurtzman J., Gordon Ph., 1976).

The current stage of regenerative medicine development is characterized by rapid progress in biotechnology, which is, above all, due to advances in the study of human embryonic stem cells (ESCs) biological properties (Snyder E.Y. et al., 1995; Gage F.H., 1998). It is now well known, such most important characteristics of cells of the early embryo as toti-, pluri- and multipotent. Totipotency, that is ability to recreate genetically programmed whole organism, possess cells of zygotes, blastomeres, and possibly embryonic

© O.L. Kukharchuk, V.V. Radchenko, B.M. Gandhi et al., 2011

stem cells (cells of the inner mass of the blastocyst). Another group of potentially totipotent cells, which are formed at later stages of embryo development, represented the primary germ cells of embryonic germinative area (germinative tubercles). Pluripotency — the ability to differentiate into cells of tissues of any organ is inherent in embryonic cells of three germ layers — ecto-, meso- and endoderm. It is believed that multipotency, i.e., the ability to form any cell within the limit of single specialized tissue, properties of two cell types: the so-called mesenchymal stem cells, which are formed in the neural crest and are the precursors of all cells of the connective tissue framework of the body including cells of the neuroglia, as well as hematopoietic stem cells, giving rise to all blood cell lines. Besides, stem cells divided into bipotent and unipotent cells, in particular, the progenitor cells of myeloid, lymphoid, monocyte, and megakaryocyte hematogenous germs. The existence of unipotent stem cells clearly proved by the example of hepatocytes — the loss of much of the liver tissue is compensated by an intensive division of differentiated hepatocytes, but without the formation of new liver lobules (Civin C.I., 2000; Lukash L.L., Vasilovskaya S.V., 2001; Repin V.S., 2001a, b; Sukhikh G.T., Shtill A.A., 2002; Uryvaeva I.V., 2001; Malaytcev V.V. et al. 2002; McKay R., 2002).

In the literature of recent years an increasing number of reports on the plasticity of stem cells, considered not only as the ability of the latter to differentiate into various cell types at different stages of development, but also undergo dedifferentiation, transdifferentiation, and retrodifferentiation. That is allowed in principle the possibility of returning differentiated somatic cells at the stage of embryonic development, recapitulation (return) of pluripotency and its implementation in the re-differentiation to form cells of another type. In particular, reported that hematopoietic stem cells can undergo transdifferentiation with the formation of hepatocytes, endothelial cells and cardiomyoblasts (Morrison S.J. et al., 1997; Repin V.S., Sukhikh G.T., 1998; Vescovi A.L., 1999; Gryshchenko V.I., 2000; Schuldiner M. et al., 2000; Demin J.A., 2001; Korochkin L.I., 2001; Terekhov S.M. et al., 2001; Hawley R.G., Sobieski D.A., 2002).

Scientific debate on the division of stem cells in their plasticity continues, i.e. glossary and terminology for cell transplantation are in the process of development, that has directly practical significance, since on par-

ticular use of plastic properties and the ability of stem cells to differentiate into different cell lines based mostly of the regenerative medicine methods. To avoid misunderstanding it should be noted that in this article we use the classification in which stem cells are divided into two groups according to the periods of their functions in ontogenesis, as well as the ability to differentiate. To the stem cells of the first category relates the cells of preimplantation embryo and derivatives of presumptive germ cells. The second group divided to regional stem cells, which are a source of differentiated cells throughout the organism's life, including period of embryogenesis. On differentiation potential, stem cells divide into totipotential — capable of fully re-create organs and tissues of the body, pluripotential — giving rise to cells of the ecto-, endo- and mesodermal origin, and multipotential — derivatives which may have various types of cells in a single lineage of differentiation, as well as cells with more limited possible, that is bi- and mono (uni) potential (Civin C.I., 2000; Malaytcev V.V. et al. 2002; Hawley R.G., Sobieski D.A., 2002).

Above all, it is necessary to review question about the presence of stem-spaces in mammals and humans. One of them is well known — this is stem space of blood cells, localized in the adult bone marrow. And besides in the bone marrow are deposited not only hematopoietic stem and precursor cells of myelocytogenesis, lymphocytogenesis, erythrocytogenesis and trombocytogenesis, but also mesenchymal stem cells, multipotency of which is realized in the generation of connective tissue elements, hepatocytes, endothelial cells, myoblasts, osteocytes, chondrocytes, adipocytes and tendocytes (Sukhikh G.T. et al., 2002).

Hypothesis about the presence of blood cells single precursor was suggested by A.A. Maximov in 1909 year. Today established that the foundation of hematopoiesis constitutes of a single self-renewal multipotent hematopoietic stem cell. When its division formed primitive, and then committed progenitor cell from which formed morphologically recognizable progenitor cells of different hematopoietic germs that ends with the release into the blood of mature erythrocytes, leukocytes, monocytes, lymphocytes, and platelets (Gluzman D.F. et al., 1998; Chertkov I.L., Drize N.I., 1998).

According to classical ideas, the embryogenesis of mammals is a natural change in the localization of hemopoiesis, which was originally performed in the yolk sac and then trav-

els to the liver, spleen, and finally to the bone marrow (Prindul G., 1998). However, new data obtained that in mammals, like in birds, together with the yolk sac, before the total closure of the vascular bed, in the body of the embryo (the so-called para-aortic splanchnopleura) appear hematopoietic cells, characterized as multipotent progenitor of T- and B-lymphocytes, granulocytes, megakaryocytes and macrophages (Godin I. et al., 1995; Schuldiner M. et al., 2000). Moreover, these multipotent progenitor cells phenotype proved to be very close to hematopoietic stem cells of adult animals bone marrow (CD34⁺c-kit⁺) (Sanchez M.J. et al., 1996).

Founded a new hemopoietic organ in the germ of mammals, in which hematopoiesis is detected simultaneously and independently from the extraembryonic yolk sac, raised the question which of these structures is a source of hematopoietic stem cells, providing definitive hematopoiesis. Analysis of contradictory information over some kind of consensus: hematopoietic cells of yolk sac *in situ* can differentiate only into primary red blood cells, but in the microenvironment of the newborn liver acquires the ability to repopulate hematopoietic organs and give rise initially to all hemopoiesis lineages of adult animal. On the other hand, the para-aortic splanchnopleura, denoted as an area of the aorta, gonads and mesonephros — AGM, initially contains hematopoietic stem cells, which are not in the yolk sac (Dieterlen-Lievre F., 1997).

The question of the biological sense of existence in the early mammalian embryogenesis hematopoietic organs with similar functions remains unknown (Domaratskaya E.I. et al., 2001). However, we would like to draw attention to the fact that the primarily cells determinate to embryonic hematopoiesis, detected in mammals immediately after implantation (6 days) when the morphological features of hematopoietic differentiation and presumptive hematopoietic organs still absent. At this stage disaggregated cells of mouse embryos are capable to repopulate hematopoietic organs of irradiated recipients and form red blood cells and lymphocytes, which differ from the host cells not only chromosomal markers T6, but the type of hemoglobin (Hollands P., 1987).

Stem space of the nervous system. The greatest number of publications devoted to the study of neural stem cells, which is not surprising, since the mere fact of multipotent cells detection in the central nervous system,

apparently, violates the basic paradigm of neurology (Viktorov I.V., 2001). In the embryonic brain proliferating neuroepithelial stem cells comprise of germinal ventricular zone and subventricular region is the site of the primary migration of neuro- and glioblastes (Davis A.A., Temple S., 1994). In the mature brain walls of the lateral ventricles are formed by the layer of ependymal cells that form a barrier separating brain tissue from cerebrospinal fluid fills the ventricles, and subependymal zone containing a reduced embryonic germinal tissue (Luskin M.B., 1993). Initially, data were obtained that in the wall of the lateral ventricles of the mature rat brain there is a population of proliferating cells and is a constant generation of progenitor cells that are able to follow migration and terminal differentiation into definitive neural and glial cells. In particular, it was found that the cells of rodents lateral ventricle subependymal zone give rise to a population of progenitor cells that migrate along the rostral migratory tract formed by the longitudinally oriented cells of astroglia. Reaching the olfactory bulb, migrating cells are embedded in the cell-grains layer, and become differentiated neurons of this structure (Lois C., Alvarez-Buylla A., 1993; Kuhn H.G., Svendsen C.N., 1999). Later migrating progenitor cells were detected in the rostral migratory tract of adult primates (Gould E. et al., 1999) and neural stem cells were isolated from adult human olfactory bulb — lines derived from these cells differentiate into neurons, astro- and oligodendroglial cells (Pagano S.F. et al., 2000).

Neural stem cells are found in the hippocampus of the mature rat brain (Brewer G.L., 1999; Gage F.H., 2000), mice (Kempermann G. et al., 1997 a, b), monkeys (Gould E. et al., 1999) and human (Kukekov V.G. et al., 1999; Svendsen C.N. et al., 1999). Shown that stem cells of hippocampus dentate fascia subgranular area give rise to progenitor cells migrating into the medial and lateral limbs of this structure, where they differentiate into mature grain-cells and glial elements. The axons of newly formed neurons in dentate gyrus can be traced to the field CA3, suggesting the involvement of these cells in a function of the hippocampus (Hastings N.B., Gould E., 1999). In the new cortex of adult monkeys formation of neurons migrating from the subventricular zone, found only in associative areas (Gould E. et al., 1999). In neocortical layer VI of mice, the *de novo* formation of pyramidal neurons was detected by 2–28 weeks after in-

jury and loss of native neurons of this layer (Magavi S.S. et al., 2000). In addition, about the postnatal neurogenesis in the human brain evidences the data proving that during the period from 15 months to 6 years two-fold increase in the number of cortical neurons occurs (Shanke W.R. et al., 1998).

There are certain contradictions in the matter of primary localization of neural stem cells in the periventricular zone of the lateral ventricles. Confirmation of the fact that mature brain stem cells are localized in ependyma, serves the results of studies showing the possibility of isolating immature neural precursors from the central nervous system areas, which does not contain subependymal zones — the third and fourth ventricles of the forebrain, spinal canal of the thoracic and lumbar spinal cord (Laywell E.D. et al., 1999). With spinal cord injury increases the proliferation of central canal ependyma stem cells, which generate cells migrating and differentiating into astrocytes of glia-mesodermal scar (Johansson C.B. et al., 1999). Precursors of astro- and oligodendrocytes were found in the intact spinal cord of adult rats (Horner P.J. et al., 2000).

Established cross-plasticity of stem cells — after intravenous injection of hematopoietic cells expressing GFP to adult mice, micro- and astroglial cells were found in the neocortex, hippocampus, thalamus, brain stem and cerebellum (Eglitis M.A., Mezey E., 1997; Ono K. et al., 1999). At the same time, cloned stem cells of the brain introduced into the venous system of irradiated mice, formed in the spleen and bone marrow populations of myeloid, lymphoid and immature hematopoietic cells (Bjornson C.R.R. et al., 1999).

Regenerative medicine and diseases of the nervous system. In the field of neurology cell transplantation was the most effective in the treatment of Parkinson's and Huntington's diseases, Down syndrome, epilepsy, cerebral ischemia, stroke, cerebral palsy, injury of the brain and spinal cord. Methodical approach of substitution cells transplantation in neurosurgery provides a local introduction to the damage area of CNS undifferentiated neuronal stem cells or embryonic neural tissue as well as pre-differentiated into neurons embryonic or adult stem cells. According to one such tool, an injury of the CNS, as well as in hemorrhagic stroke from the damage zone is suctioned blood, and in its place with the help of the stereotaxic apparatus entered cells isolated from fetal brain (neural stem cells).

Efficiency of cell transplantation in the treatment of CNS lesions is determined by brain location behind of the barrier, which to some extent isolates the cell graft from the immune system of the recipient and obstructs the reaction of its rejection. Under such conditions, the low level of cell differentiation and the absence of major histocompatibility complex molecules on their surface significantly delayed the beginning of the immune response to transplanted cells. However, the glial inflammatory reaction to the genetically foreign material is saved, which often leads to disruption of the hemato-encephalic barrier, infiltration of brain tissue by immunocompetent cells and the destruction of formed *de novo* neurons by immune mechanisms. Nevertheless, the duration of the recovery of the CNS functional defect is sufficient high and reaches after allogeneic neurons precursors transplantation from one year to three years (Snyder E.Y. et al., 1995; Rudenko V.A., 1998; Cameron H.A., McKay R.D.G., 1998; Otellin V.A., 1999; Bamber N.I. et al., 1999; Fukunaga A. et al., 1999; Tsybalyuk V.I., 2000; Marciniak A. et al., 2000; Aleksandrova M.A. et al., 2001; Viktorov I.V., 2001; Sosunov A.A., Chelyshev Y.A., 2002; Sukhikh G.T., Malaytsev V.V., 2001).

Cell transplant rejection due to the fact that the differentiation of transplanted cells into neurons *in loco morbi* accompanied by expression on its cell surface markers of genetically foreign that triggers glial reaction and immune attack by the recipient organism. That is why nowadays intensively been conducted clinical trials on the use of autologous transplantation of hematopoietic and mesenchymal stem cells. Autologous hematopoietic and mesenchymal stem cells are usually obtained from the patient's ilium. Isolated cells differentiate in culture to the fibroblast-like and neuron-like cells, which are administered to patients: with traumatic brain injury — in the cavity formed after the extraction of hematoma, at stroke — endolumbal, at myelopathy — intravenously. Results of Parkinson's disease treatment by the method of stereotactic transplantation are characterized by an initial increase in symptoms, but three months after the surgery comes a significant clinical improvement. In recent years, for transplantation uses regional stem cells from the area of the olfactory epithelium.

Method of cell neurotransplantation is constantly being improved. Today developed criteria for evaluating its effectiveness with

glial fibrillary astrocytic protein (GFAP): if a patient's blood after transplantation increases the content of GFAP, neurotransplantation performed poorly, because this fact shows that in the central nervous system formed not neurons but glial elements. The experiment proved the feasibility of using human neural stem cells to treat spinal cord injury. When dosed rats spinal cord compressional contusion after 6–7 days on the local of bleeding are formed cysts. With the help of dye bisbenzimidazole shown, that neural stem cells migrate along glial and neural tracts and removes atrophy of the injured spinal cord. Investigation of traffic neuronal stem cells in the brain confirms their highest migration capacity, which opens up prospects not only for replacement therapy, but also for treating deep localized tumors of the CNS by the directed transport of IL-12 with neuronal stem cells as a vector (Chumasov E.I., 1990; Lendahl U. et al., 1990; Park K.I. et al., 1995; Davies S.J. et al., 1997; Otellin V.A., Petrova E.S., 1998; Petrova E.S. et al., 1999; Chekhonin V.P. et al., 1999; Temple S., Alvarez-Buylla A., 1999; Babiychuk G.O. et al., 2000).

Great contribution to the development of Ukrainian neurotransplantation has a team of specialists led by Professor V. Tsymbalyuk, whose works cover a wide range of problems of cell transplantation — from experimental research to clinical implementation of new original methods of treatment of severe lesions of the nervous system (Tsymbalyuk V.I., Pichkur L.D., 1996; Tsymbalyuk V.V. et al., 1998; 1999; 2000; 2001; 2002).

Stem space of the eye. The discovery of stem cells in the eye of mammals (Ahmad J. et al., 2000; Perron M., Harris W.A., 2000; Tropepe V. et al., 2000) led to a kind of research shock, which often happens in breaking long-entrenched views. In this case broke down the fundamental position about the inability of the eye, especially the retina, to regeneration. Until 2000, it was thought that mammal's ciliary folds contain only differentiated cells, which provide accommodation and secrete proteins into the vitreous (Link B.A., Nichi R., 1998). In the embryogenesis multipotent cells of retina germ are capable to differentiating into all types of retinocytes. Cells of the neuroepithelium initially divided symmetrically, which leads to the accumulation of cell mass necessary for the retina development. Then the division becomes asymmetric, resulting in one of the daughter cells retains multipotent, and the other differentiated. In

the early stages of development are formed ganglion cells, cones, amacrine and horizontal cells; late — rods, bipolar cells and Muller glia (Chepko C.L., 1993; Harris W.A., 1997). In constantly growing amphibians and fish, as well as in chickens in the ciliary and the rim terminal areas of retina multipotent cells are preserved (Mitashov V.I., 1996; 2001; Wetts R., Fraser S.E., 1988), but in mammals only in the earliest stages of postnatal period in the terminal area of the retina are found proliferating cells, which are then not detected (Ahmad J. et al., 2000).

However, in experiment V. Tropepe et al. (2000) cells isolated from the ciliary folds of adult mice, proliferated *in vitro*, which was confirmed by proliferation marker BrdU. After 2 days the single cultured cells formed clones of pigmented cells, and after 5–7 days were formed spheroidal colonies containing both pigmented and depigmented cells, which could be subcultured up to 6 times. Moreover, the cells of iris, ciliary muscle and non-pigmented cells of ciliary folds spheroidal colonies did not form. In formed spheroids in the center of the colony were found large cells, which were attached to the substrate, whereas the peripheral cells expressed homeobox-containing genes *Chx10* and neurofilaments. This transient population of small-differentiated cells contained precursors of shortly differentiating rods, bipolars and Muller glia, which was proved by appropriate monoclonal antibodies. Similar results were obtained in experiments on rats (Ahmad J. et al., 2000): found that the conditions of culturing in the presence of FGF2 cells from the pigmented area of ciliary folds actively proliferating and, passing through a stage of nestin-producing transient population differentiated as rods, bipolar, ganglions and glial cells.

It is generally accepted that regional stem cells are undifferentiated multipotent cells producing several types of differentiated cells (Morrison S.J. et al., 1997; Temple S., Alvarez-Buylla A., 1999; Wei G. et al., 2000). However, mammals pigmented stem cells of the ciliary folds functions as the differentiated cells secreting proteins into the vitreous (Link B.A., Nichi R., 1998). They do not express nestin, but after depigmentation and dedifferentiation these cells were actively proliferating, express markers of neural-type differentiation and transform into neurons and glial cells. Such transformations of initially differentiated stem cells show their transdifferentiation, like the process that occurs with

the cells of the pigment epithelium in the adult newt retinal regeneration (Klein L.R. et al., 1990; Zhao S. et al., 1995; Sakaguchi D.S. et al., 1997).

The discovery of stem cells in the eye of adult mammals (mouse, rat, ox, human) is a sufficient basis for the revision of some established ideas about the differentiation and regenerative potencies of mammals eye tissues. Number of stem cells in pigmented ciliary folds is small (0,2 %), but quite enough for the manifestation of regenerative potentials. Currently mammalian pigmented cells of ciliary folds and peripheral region of lower vertebrates pigment epithelium, proposed to consider as homologous structures (Mitashov V.I., 2001). Preservation in these areas of proliferating elements with signs of stem cells that exhibit potency in transdifferentiation and subsequent formation of retinal cells, shows not only much broader regeneration potencies eyes of mammals, but also proves the reality of the existence of another mechanism for the formation of stem-spaces — transdifferentiation.

Regenerative medicine and eyes desiases.

At the junction of neurosurgery and ophthalmology with use of allogenic cell transplantation achieved success in treating of few eyes diseases (pigmental degeneration of the retina, glaucomatous optic nerve dystrophia and other degenerative processes). Shown, that the introduction of neural stem cells in rabbit's subtenonic space in case of laser retinal lesions restores the retinal histological structure. Transplantation of embryonic neural tissue under the membrane of the n. opticus in rabbit methanol intoxication normalizes the ultrastructure of the optic nerve and significantly improves the functional state of the visual analyzer, which was proved by means of vision evoked potentials (Sergienko N.M. et al., 1998; Zhaboedov G.D. et al., 2000; Lutsenko H.S., 2000, Radchenko M.V., 2003).

Stem space of the pancreas. The uniqueness of pancreas is the coexistence of two different morpho-functional components — the cells of the exo- and the endocrine apparatus (Slack J.M.W., 1995). Nevertheless, recent embryogenetic studies have clearly shown that all types of pancreatic cells originate from single multipotent stem cells with the phenotype epithelial ducts (Kasper M. et al., 1991). A set of embryonic cytokeratins -4, -7, -8, -18 and -19, which is characteristic for all cells of a two-week human embryo, is revealed in the pancreas until 28 weeks of intrauterine development, and in the future remains un-

changed throughout life only in the cells of ductal epithelium. Differentiation of pancreatic stem cells in the direction of acinar and endocrine lines is accompanied by loss of cytokeratins -4, -7 and -19. Mature acinar cells of the adult organism stably express cytokeratins -8 and -18, whereas their level is low in the differentiated endocrine cells (Schussler M.H. et al., 1992).

Stages of differentiation of endocrine cells from pluripotent progenitor cells have been well studied. The mechanism of morphogenesis of the islets of Langerhans involves a propagation of endocrine cells by gemmation (nesidioblastosis) from the epithelial lining of ducts, their accumulation between ducts and exocrine acini, followed by isolation. Such stem cells, or nesidioblasts, even in the pancreas of an adult organism can be induced to proliferation and differentiation into endocrine cells capable of producing a variety of peptide hormones (Bouwens L., De Blay E., 1996; Bouwens L., Kloppel G., 1996; Bouwens L. et al., 1997; Bouwens L., 1998 a, b). Unlike mature endocrine cells of adult animals capable of synthesizing only insulin, endocrine progenitor cells are multipotent and all hormone-specific genes are activated in them (Teitelman G., 1991; 1993). Similar islet cells simultaneously producing several hormones were also found in the human fetal pancreas (Bocian-Sobkovska J. et al., 1999). It has been established that polyharomonality is inherent to human and pig fetal pancreatic cells. They can synthesize and store different hormones, in particular insulin and glucagons (Lukinius A. et al., 1992), insulin and neuropeptide Y (Oberg K., 1996), and also gastrin (Chaundry A. et al., 1994; Gurevich L.E. et al., 2001), in the one and the same or different granules.

It has been proved that the highly differentiated endocrine cells (β -cells of Langerhans islets) does not represent the final, terminal stage of differentiation. On the contrary, the phenotype of islet cells remains ductile and under certain conditions genes responsible for expression of markers, which are characteristic of stem cells can be activated in them (Teitelman G., 1993). Among the markers of regional stem cells in the pancreas of adult animals, one should mention glucose transporter GLUT2, acidic β -galactosidase (Steiner D.F., James D.E., 1992; Wang T. et al., 1995), protonkogen bcl-2 (Bouwens L., De Blay E., 1996) and cytokeratin-19 (Bouwens L. et al., 1997). There are nestin-positive and hormone-negative cells at the periphery of

pancreatic islets of the adult organism, where usually the small positive group with respect to cytokeratin-19 cells are revealed, which do not form a duct structure (Hunziker E., Stein M., 2000). Moreover, pronounced ductility of exocrine acinar cells also suggests that they have properties of multipotent stem cells (Gurevich L.E. et al., 2001).

Regenerative medicine and pathology of endocrine system organs. The treatment of diabetes is the main trend of the regenerative medicine in endocrinology. Transplantation of stem cells after their *in vitro* differentiation in β -cells in the pancreas leads to reduction in blood sugar due to enhanced synthesis and incretion of the insulin. However, allogeneic islets of Langerhans lose their normal rhythm of insulin secretion, which poses a serious threat of hypoglycemic complications. There are reports that insulin producing cells can be obtained from mesenchymal stem cells of bone marrow, for this purpose conditioned medium from cells of embryonic pancreas is used (Repin V.S., Sukikh G.T., 1998; Verhulsky I.E. et al., 2000; Kovalsk I.O., 2000, Repin V.S., 2001 a, b; Kot O.G. et al., 2002).

Ukraine has made considerable progress in the treatment of diseases of the thyroid, parathyroid, semens and other endocrinopathies by means of xenotransplantation of cells, organ cultures, or endocrine tissues (Bondarenko T.P. et al., 2000; Zubkova G.A. et al., 2000; Lutsenko N.S. et al., 2000; Sichinava P.M., 2000; Genik S.M. et al., 2002). Professor I.S. Turchin has made great contribution in the development of xenotransplantation trend in the regenerative medicine (Turchin I.S. et al., 2000–2003).

Stem space of the liver. Stem Space of the Liver has a unique replicative potential as it consists of three components at once: hepatocytes, which exhibit properties of unipotent polyploid cells, oval cells of the bile duct and bone marrow stem cells. Hepatocytes in mammals are differentiated polyploid cells, which under normal conditions are stably located in the phase G₀/G₁ of cell cycle. The duration of such mitotically inert hepatocytes corresponds to human lifespan (Uryvaeva I.V., 2001). However, in case of partial loss of liver parenchyma hepatocytes exhibit almost limitless ability to multiply at an extremely high rate of regeneration — in course of multiple surgical resection from 70 to 80 % of cell mass of the liver parenchyma, its restoration occurs within 5–6 days. Experiments with intoxication by carbon tetrachloride have shown

that complete renewal of diseased liver tissue occurred even by eightfold introduction of CCl₄ with an interval of 1 month (Factor V.M., Uryvaeva I.V., 1980). It has been proved in the transgenic mice (ALuPA, Fah^{-/-}) that mature hepatocytes, as compared to other somatic cells, have a higher Hayflick limit, which shows the capability towards more than 100 replicative cycles and fully repopulate liver in animals of 6–8th transplant generations (Sandgren E.P. et al., 1991). Consequently, hepatocytes are characterized by their capability of self-maintenance throughout the life of an organism, which is one of the main characteristics of the cells in stem-spaces, and hence one may consider differentiated parenchymal liver cells as unipotent stem cells (Thorgeirsson S. S., 1996; Fausto N., 1997; Laconi E., 2000). Unipotency of hepatocytes is associated with polyploid set of chromosomes. Propagation of hepatocytes is characterized by alternation of acetokinetic and completed mitosis in the postnatal ontogenesis, which correspondingly leads to a uni- and binuclear state. Binuclear diploid cells are not capable of self-reproduction, as a result of which single diploid liver cells of adult animal are stored as precursors of a number of polyploid hepatocytes. After liver damage mitosis without cytokinesis is excluded and cell division occurs according to conventional, completed type, as a result of which a proliferating population of hepatocytes become uninuclear. Thus, binuclear cells are laid in course of the normal slow growth of the liver as potential sources of future clone of mononuclear polyploid hepatocytes with unlimited number of offspring under the conditions of regeneration (Uryvaeva I.V., 2001).

Oval cells localized in the terminal bile duct — Goering tubules is one more stem space of liver. It is believed that the oval cell is a partially committed phenotypically recognizable cells originating from the brainstem of the latent stock of the liver (Alison M.R., 1998; Factor V.M. et al., 1994). The cells of this stock constitute so-called optional liver stem stock since oval-cell proliferation starts only when the division of polyploid hepatocytes is blocked, which is convincingly demonstrated in experiments with dipin and retrorsin (Uryvaeva I.V. et al., 1996; Gordon G.L. et al., 2000).

Stem-spaces are not necessarily localized in the organ, in which loss of cell mass is replenished by them. Extrahepatic sources of stem cells are also established for liver, which are capable of transformation into oval cells

and differentiated hepatocyte line. After lethal irradiation of animal, bone marrow transplants from male to female rats led to chimerization of liver with formation of hepatocytes, oval cells and bile duct epithelium containing Y-chromosome (Petersen B.E. et al., 1999). Similar results were obtained in course of heterosexual bone marrow transplantation using intravital biopsy or after removal of the liver due to a pathological process (Alison M.R. et al., 2000). Acinar pancreatic tissue is one more extrahepatic stem space for the liver, which develops from the embryonic germ common with the liver (Rao S. et al., 1989).

Regenerative medicine and liver diseases. Despite extremely high regenerative capacity of hepatocytes, there are quite a number of diseases, in which the hepatic failure is developed. Moreover, these diseases can be either acute (toxic or viral hepatitis), and chronic (autoimmune active hepatitis) and the number of cases requiring liver transplantation in terminal stages of liver disease increases progressively. The current method of liver transplantation is very effective, but extremely difficult in technical terms and requires considerable resources. In addition, problem of donor liver tissue remains unsolved. An alternative to a liver transplant operation is transplantation of hepatocytes, which has three possible versions: autotransplantation of hepatocytes generated in vitro from autologous stem (hematopoietic or mesenchymal) cells of the patient, allotransplantation of donor's hepatocytes and allotransplantation of hepatocytes of donor's stem cells. In the latter two cases, the need for immunosuppressive therapy programs remains, but much more simple, which use smuch smaller doses and the number of immunosuppressive agents than in liver transplantation. Another direction of the regenerative medicine in hepatology involves the use of unipotent stem properties of hepatocytes by using no cells and fetal liver extract, which stimulates the division of patient's own hepatocytes. The effectiveness of this method are morphologically and biochemically proven in experimental liver cirrhosis (Repin V.S., Sukhikh G.T., 1998; Petrenko O.Yu. et al., 2000; Subota N.P. et al., 2000; Tutchenko M.I. et al., 2000; Batanov A.N. et al., 2002; Kotenko O.G., 2002; Sukhikh G.T., Shtil A.A., 2002).

Mesenchymal stem space. Mesenchymal stem cells first appear in the neural in the embryogenesis crest, from where they migrate creating a primary framework for future pro-

visory bodies, being as if their skeleton of a three-dimensional spatial orientation. In addition, progenitor stromal elements control the development of embryonic parenchymal organs due to synthesis of a strictly defined combinatorial growth factors (TGF α , KGF, HGF, EGF) and are source of cells of connective, bone, cartilage, fat and muscle tissue in postnatal development, they generate background signals to maintain the viability and proliferation of progenitor cells (LIF, SCF, M-CSF, Flt-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15), form the tendons and the stroma that supports hematopoiesis (Repin V.S., 2001; Bianco P. et al., 2001).

On prolonged administration into the bloodstream mesenchymal stem cells are implanted into different organs of animals-recipients and differentiated into the blood cells, myocytes, cardiomyocytes, adipocytes, tendons, cartilage and bone cells as well as into the fibroblasts. Their introduction into the ventricles of the brain is accompanied by migration of mesenchymal stem cells into the parenchyma tissue of the CNS with the formation of glial cells and neurons. In addition, mesenchymal stem cells are capable of conversion into hematopoietic stem cells (Robertson E., 1986). The main mesenchymal stem space in the adult body is bone marrow tissue, where a network of immature stromal cells is located in the recess between the sinusoids and bone. Mesenchymal stem cells are dormant, do not express receptors for the adhesion molecules (CD34, VCAM, ICAM, CD44, CD29, receptors for collagen I and III type) and does not attach to the feeder layer. Even progenitor stromal cells exhibit adhesiveness, which are multiplied in the culture while maintaining low cell differentiation markers (SH2, SH3, CD106, CD54, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124) when there are no antigens of hematopoietic stem lines (CD34, CD14, CD45). When added into the culture medium for inducer of the synthesis of cAMP, inhibitors of phospholipases and thromboxansynthase virtually all immature stromal cells form adipocytes. From the same pool of progenitor under the influence of TGF α chondrocytes are formed in serum-free medium, while bone cells can be obtained in culture with fetal serum adding to the background of blockade of phospholipase donator of inorganic phosphate and ascorbic acid (Shamblott M.J., Gaerhart J., 1998).

According to our opinion, the most important is the detection of the circulating pool of mesenchymal progenitor cells: immature

CD34-negative cells were found in blood of adult mammals. These cells are attached to the substrate in culture and form colonies of fibroblast-like cells, demonstrating the ability to differentiate into adipocytes, myofibroblasts, bone marrow stroma tissue, chondrocytes and osteocytes. A small portion of CD34 — cells from the bloodstream returns back into the bone marrow, where it is transformed into a line of CD34-positive hematopoietic cells. Thus, the recycling of progenitor mesenchymal cells in the blood stream ensures the stem balance of tissue regions of the body through a common cell pool of bone marrow (Hanss R. et al., 2000). In other words, the bone marrow is a self-renewing multipotent stem space of non-specific mesenchymal stem cells providing the derivatives of mesenchymal cells to the body throughout life.

Specific stromal regenerative capacity is reserved directly in the tissues. Stellate cells are found in the primary culture of cells isolated from human skeletal muscle, which grow in culture without signs of differentiation, but by adding dexamethasone they start to differentiate to form cells of skeletal and smooth muscle, bone, cartilage and adipose tissue. Population of stellate cell precursors is derived from non-specified mesenchymal progenitor cells of bone marrow and is characterized by myogenic satellite cells (Bianco P., Robey P., 2000). Cells expressing STRO-1 — a marker of stromal cell precursors, but not having a marker of osteoblast — alkaline phosphatase have been revealed in primary cultures of human bone tissue revealed. These cells have the phenotype of proosteoblast with low capability of the forming the mineralized bone matrix without expression of osteopontin and the receptor of parathyroid hormone. Transient cells from intermediate to fully differentiated osteoblasts have also been detected, which originate from STRO-1-positive cells not expressing alkaline phosphatase (Deans R.J., Moseley A.B., 2000).

The least differentiated precursors of adipocytes in adipose tissue are stromal-vascular cells. These cells, along with mesenchymal progenitor cells of bone marrow origin, can differentiate into adipocytes under the influence of glucocorticoids, insulin-like growth factor-1 and insulin. In addition, the stromal-vascular cells form chondrocytes, while there are cells in the adipose tissues of bone marrow capable of differentiating into adipocytes as well as into osteoblasts (Pittenger M.F. et al., 1999).

Most of the vessels formed from the endothelial tubes, which envelops vascular smooth muscle pericytes originating from undifferentiated perivascular mesenchymal progenitor cells. This group of immature stromal muscle expresses α -actin of soft muscles and the receptor for platelet-derived growth factor (Sukhikh G.T. et al., 2002). Hence, along with distant migration of vascular bed, carried short distance or local movement of mesenchymal progenitor cells within the tissue during repair of cartilage, muscle regeneration and other regenerative processes are also accomplished. Impression is created that CD34-negative cells circulating in the blood perform the tasks of the linear brigade of emergency aid, while regional immature stromal elements localized in tissues ensure «urgent repair» of body «at the sites». Replenishment of tissue progenitor stromal mesenchymal reserve is ensured by mesenchymal space of the bone marrow.

Regenerative medicine, and pathology of bones and joints. Mesenchymal stem cells are primarily used in the traumatology. Reconstruction of the bones, ligaments and cartilage usually (90 %) does not require immunosuppression since the recovery of skeletal elements of the ligamentous apparatus or synovial-cartilage complex is performed using the patient's own cells. For a long time it was considered that restoration of hyaline cartilage is impossible even when cellular technology is used, however in 2003 conditions were found for the differentiation of mesenchymal stem cells in bone marrow in the hyaline cartilage and the first successful reconstructive surgery has been performed on the joints, positive results have been clearly confirmed by arthroscopy. There was striking success of cell transplantation surgery for the restoration of bone defects by using a matrix of cellular reconstruction, which also has a number of methodical techniques. In case of bone defects of craniofacial area porous plastic matrixes are used, which have exactly the same shape and size of the lost bone area. «Seeding» of the patient's own mesenchymal stem cells is performed on such matrix p, which under the influence of a certain range of growth factors and cytokines form bone tissue. Defect of jaw is replaced with a porous carrier of mesenchymal stem cells in bone marrow of the patient in the Clinic of Plastic Reconstructive Medicine, which is completed by osteofication of peculiar «graft». In case of complex fractures of long bones cadaveric bone is used to replace

the defects, from which organic material is burned in a muffle furnace or, conversely, removal of the mineral matrix by treatment with acids is accomplished. Mesenchymal stem cells are implanted on the remainder of the skeleton (mineral or organic), said cells are directionally differentiated into cellular elements of bone tissue and its connective tissue matrix. In both cases, the rejection of such implants-transplants did not occur. Osteogenic potential of mesenchymal stem cells is originally determined to the sufficient extent. From a single mesenchymal bone marrow cells colonies of cells are grown and subjected to incubation in vivo in the diffusion chamber, i. e. without direct cell contact. It is established that 3 kg of bone tissue is formed from 500 mg of these cells and overall life of the osteogenic potential of mesenchymal stem cell pool reserved in the bone marrow is thousand times greater than the real needs of the human body, even if there is hypothetical daily fractures (Alan F., 1994; Astakhov V.S. et al., 2000; Gaiko G.V. et al., 2001; Manuilova E.S. et al., 2001; Chailakhyan R.K. et al., 2001; Bianco P. et al., 2001).

Stem space of the skin. It is well known that the renewal of the epidermis is occurred at the expense of stem cell space capable of self-renewal and differentiation (Morrison S.J. et al., 1997). Epidermal stem cells were identified by the peculiarities of accumulation of ^3H -thymidine as a cell without exciting the radioactive label after a single dose (Potten C.S., 1983), or, conversely, as the cells with long-lasting activity after prolonged administration of labeled thymidine (Bickenbach J.R., 1981). The growth of human keratinocytes in culture is characterized by the formation of holoclones, meroclones and paraclones. Holoclones consist of small rounded basal stem cells and exhibit a maximum proliferative capacity producing from 1500 to 4000 daughter cells per day. Holoclone cells in culture can withstand up to 100 passages. Meroclones contain transient keratinocytes with different proliferation capacities. Paraclone cells are characterized by low proliferation potential (up to 15 divisions) and exposed to the terminal differentiation (Barrandon Y., Green H., 1987). Three in vivo (not histologically, but in terms of the kinetics of cell populations) zones are also singled out. Cells of the basal layer proliferate at very low speeds they are almost in a state of rest. Actively dividing along short-cycle transient cells was located above them, which, in turn, are the source of

the third, differentiated layers of mature keratinocytes. By this organization of cell growth formation of a large number of differentiated cells occur due to a small number of cell divisions of stem space (Watt F.M., 1998), which ensure the growth layers of keratinocytes in culture in course of autotransplantation of skin (Terskikh V.V., Vasiliev A.V., 1999).

Absolute marker of epidermal stem cells has not yet been found, however it has been shown that keratinocytes are capable of forming colonies characterized by the high level of expression of integrins $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ (Jones P.H., Watt F.M., 1993), while cell cultures expressing integrin β_1 after transplantation completely restores the epidermis (Jones P.H. et al., 1995). Moreover, it has been shown by means of double-marker $\alpha 6^{\text{bri}} 10\text{G}^{\text{dim}}$ that epidermal stem cells possessing the highest ability of regeneration constitute about 10 % of immature cells in the epidermis of skin (Li A. et al., 1998), whereas one may use up-regulation of expression of PA-FABP — protein, which binds fatty acid of epidermis, as a marker of transient cells (O'Shaughnessy R.F. et al., 2000).

Functionally, the epidermis consists of epidermal proliferative units, which have a central cluster that contains stem cells and Langerhans cells, as well as proliferating cells located above the cluster in the form of monetary column (Potten C.S., 1974; 1983). Stem cells of the basal layer of the epidermis or hair follicles at a low density of seeding on feeder layer of irradiated cells also form clusters in the culture and the number of cell «grains» on them corresponds to the number of divisions being passed (Morris R.J., Potten C.S., 1994).

Epidermal stem cells localized at the basal membrane, as well as undifferentiated cells of the outer sheath of human hair follicles are the main stem space of skin (Cotsarelis G. et al., 1990; Yang J.S. et al., 1993; Rochat A. et al., 1994). Another contender for the area of stem cell space is the sweat glands (Miller S.J. et al., 1998), however on recuticularization of wound surface cells of sweat glands, unlike migrating stem cells of hair follicles (Limat A. et al., 1991; Taylor G. et al., 2000), never form the epithelium of the skin identical to natural one (Terskikh V.V., Vasilieva A.V., 2001).

Regenerative medicine and skin blemishes. As in trauma, in the transplantation of skin preference is given to the patient's own stem cells, which eliminates the problem of transplant rejection. In recent years, quite

effective cultivation technology and skin grafts based on the implementation of the pluripotent potential of mesenchymal stem cells in bone marrow patient has been developed. Resulting in vitro fibroblasts are fixed on the absorbable biopolymer matrices, and then, under the influence of the natural microenvironment in the affected area or skin defect are subject to differentiation into keratinocytes. Method for separating stem cells from the basal layer of human skin is also effective. Separated cells are grown to the stage of transformation in fibroblasts. Microcarrier of fibroblasts is collagen, which forms a layer of dermal keratinocytes. The principle of the method is based on destratification (induction of death of all cells except the stem cells — the basal ones and localized in the hair follicle and in sebaceous glands) by means of the cultivation of the skin in a medium without calcium and mitogens for three weeks. After transplantation of cells on complete incubation medium, cells multiply within three days and subsequent transfer to fresh medium with growth factors after one week leads to the formation of keratinocytes, which can be transplanted to patients with burns. The resulting dermal equivalent obtained in this manner (a layer of fibroblasts in fibrin gel) and the live skin equivalent consisting of a layer of keratinocytes, biodegradable mesh and a layer of fibroblasts are successfully used in the treatment of superficial and deep skin burns (Viktorov I.V., 2001; Lucas L.L., Vasilevskaya S.V., 2001; Manuilova E.S. et al., 2001; Terskikh V.V., Vasilieva A.V., 2001; Malaytcev V.V. et al. 2002; Sukhikh T. et al., 2002).

Regenerative medicine and heart — blood vessels diseases. Cell transplantation in cardiology began his journey, as in other fields of medicine, with experimental studies. It has been proved in one of the first reports on the possibility of differentiation of ESCs into cardiomyocytes in the experimental myocardial infarction that ESCs of donor labeled with green fluorescent protein is embedded into the zone of ischemic damage of the heart muscle, where they are subjected to the differentiation into cardiomyocytes and replace non-croized heart tissue. This effect has been repeatedly replicated in other laboratories around the world and has already found clinical application in different versions: the administration of ESCs, autologous or allogeneic stem cells, previously differentiated in vitro into cardiac myoblasts directly into the zone of

necrosis of the heart intravenously or through a catheter into the coronary arteries. It is clear that the first and third options require the implementation of the protocols of immunosuppression. The first clinical trials of treatment of coronary atherosclerosis in humans with allogeneic hematopoietic stem cells have been initiated: later are administered directly into the coronary arteries, which contributes to activation of vasculogenesis with the formation of new blood vessels that ensures a «shunt» blood flow to ischemic myocardium. The methods for generating a self-developing capillary network are being developed: endothelial cells are grown in cell cultures of ESCs and then the resulting in vitro endothelial cells are transferred to the porous surface of microtubules, which are perfused by feed medium. Autologous capillary network generated in this manner can be used in ischemic lesions of internal organs without the use of immunosuppressive drugs. Patient's own mesenchymal stem cells are differentiated in vitro into cardiomyocytes for the treatment of myocardial infarction in human being, which are then administered into the coronary arteries or the border zone of necrosis in cardiac muscle. The effect of the positive dynamics of heart perfusion and regional cinematics in such a therapy has been proved by the projection of radiographs of heart obtained with ²⁰¹Tl-labeled cells in the radiographs obtained by tetrafosmin Tc-90m, which «highlights» the entire myocardium. Method is approved, according to which monocyte fraction of bone marrow cells of the patient is administered through a catheter directly into the heart with pinching sections of coronary artery by aerosol blown with air. In order to prevent retransplantational arrhythmias, cell suspension was administered fractionally, 4–5 times, but when there is single catheterization. It is reported that the administration of G-KSF (Neupogen) mobilizes own stem cells in the bone pulp of patient that facilitates the neovascularization of the heart and restore the damaged cardiomyocytes. Embryonic myoblasts are used in the pathology of vascular and heart diseases. Effective and positive remodeling of the heart has been proved in severe defects in children — branching of left coronary artery from the left pulmonary artery. It is assumed that the effect of cell transplantation is based on angiostimulating effect since the results obtained in treatment of patients with vascular pathology are consistent using such angiostimuline. It is shown, that the selection of

valves from pig heart, their devitalization followed by seeding endothelial or smooth muscle cells derived from autologous hematopoietic stem cells in bone marrow prevents calcification of transplanted valves and greatly reduces the intensity of the reaction of graft rejection. In the experiment, a single intravenous injection of moderate doses of embryonic pluripotent progenitor cells normalizes systemic arterial pressure in spontaneously hypertensive rats for 1 month (Henon P.R., 1993; Gage F.H., 1998; Gearhart J., 1998; Lukash L.L., Vasilovskaya S.V., 2001; Manuilova E.S. et al., 2001; Repin V.S., 2001 a, b; Malaytcev V.V. et al. 2002; Kukharchuk O.L. et al., 2003).

Stem space of the muscle tissue. Human skeletal muscle consisting of a multinuclear syncytium contains mononuclear cells capable of proliferation when cultured in vitro (Holdfeid R., Engl A.G., 1994) and known as satellite cells (Allbrook D., 1981; Law P.K., 1994). Among the features, according to which satellite cells can be included in stem space of muscle tissue, one should note their presence in all skeletal muscles, as well as fetal clonality satellite cells, which buds from the somites and mature independently of them showing a distinct heterogeneity virtually without fuzogenic activity in mature muscle tissue. Formation of satellite cells in embryogenesis and in postnatal ontogenesis is associated with thin non-innervated myofibrils. It is in the process of atrophy of fibers, which did not receive innervation, satellite cells are formed (Repin V.S., Sukhikh G.T., 1998).

Normally, satellite cells are dormant, but when muscle tissue is damaged they are activated and enter into the cell division cycle. Dividing descendants of satellite cells form new muscle fibers, while in culture they are multiplied to form myoblasts (Walsh F.S., Ritter M.A., 1984; Anderson J.E., 2000). In the process of culturing myoblasts of the spectrum there is a change in gene expression and proteins specific to muscle tissue appear, which is completed by myoblast fusion in multinucleated myotubes (Walsh F.S., Ritter M.A., 1984; Holdfeid R., Engl A.G., 1994). In this case, regeneration of skeletal muscle resembles embryonic myogenesis: satellite cells are divided into two pools — one of them is immortal immature population, while the other enters into an irreversible path of differentiation by c-transcriptase MyoD and other gene products ensuring myogenesis (myogenin, myf-5, myf-6) (Rantanen J. et al., 1995).

Many satellite cells actively express the gene MyoD in the human regenerating muscle. However, the number of MyoD-positive satellite cells declines sharply with age, which is correlated with the disappearance of the regenerative capacity of muscle in elderly people (Repin V.S., Sukhikh G.T., 1998).

The ability of myoblasts to form syncytia is coupled with their unique ability to integrate pre-existing myofibrils, which allows rectification of genome damage of skeletal muscle. It is shown that myoblasts are capable of delivering healthy donor gene that restores the synthesis of dystrophin into the muscle tissue of patients with Duchenne myodystrophy (Mendell J.R. et al., 1995; Svensson E.C. et al., 1996; Shishkin S.S. et al. 1999), while in case large-scale transplants positive therapeutic effect is accompanied by expression of the dystrophin gene for several years (Terekhov S.M. et al., 2001; Law P.K. et al., 1997).

Immunology of cells transplantation. Considered in the first two parts of the review a large group of regenerative medicine methods refers to the replacement cell transplantation and is based on the principle of embryonic stem cells preliminary multiplication in culture and their subsequent differentiation into specialized cells of the affected organ. The main problem that arose in the development of this regenerative medicine area, involves in the separation of pure ESCs-lines. Partially it is allowed by defined set of ESCs markers, which consists of Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, DAPI, TRA1-60 and embryonic alkaline phosphatase. To identify the cells of early hematopoiesis monoclonal antibodies against CD133 (AC133) are being used. Besides, was developed magnetic column which allows isolating clean fraction of bone marrow early hematopoietic cells (CD34⁺) without performing additional analysis (Gage F.H., 1998; Gryshchenko V.I. et al., 2000; Domarat-skaya E.I. et al., 2001; Lukash L.L., Vasilovskaya S.V., 2001, Novik A.A., Bogdanov A.N., 2001, Repin V.S., 2001 b).

Principally different direction of the regenerative medicine based on the use of large doses of embryonic/fetal progenitor cells (E/FPC) and realizes by the effect of the adult organism's system control antigenic homeostasis reinstallation (the effect of Kukharchuk-Radchenko-Sirman) (Kukharchuk O.L. et al., 2002) that solves one of the most important issues of cell transplantation — the problem of allogenic cell material rejection

(Bakay R.A. et al., 1998; Ivory O.G., Selevstov O.V., 2000; Slyusarev O.A. et al., 2002; Askenasy N., Farkas D.L., 2002). Prolonged chimerism of blood cells after hemotransfusion, as well as great therapeutic efficacy of high doses of stem cells (Zotikov E.A., 2001; Shevchenko Y.L., Zhiburt E.B., 2002; Askenasy N. et al., 2002; Fandrich F. et al., 2002; Down J.D., White-Scharf M.E., 2003) evidences an active interaction of transplantable cells with hematopoietic and immune systems of the recipient, whose essence concludes in induction of immunological tolerance.

The mechanism of immune system replacement involves creating a new database of immunocompetent cells and the simultaneous reprogramming of the major histocompatibility complex (MHC) control system. After introducing high doses of E/FPC the latter settles in the thymus and bone marrow tissues. In the thymus E/FPC are differentiate into dendritic, interdigital and other epithelial-stromal cells elements. In the process of E/FPC differentiation in the thymus, along with its own MHC-molecules are expressed MHC-molecules which are genetically determined into donor cells, i. e., establishing a double standard of MHC-molecules, by which realises the positive and negative selection of T-lymphocytes. In the bone marrow differentiation of E/FPC occurs (respectively to microenvironment) in the direction of hematopoietic progenitor cells and stromal cells elements. Replacement of the recipient immune cells in the process of system control antigenic homeostasis reinstallation carried out not discretely, but through a phase of immune chimerism with the gradual destruction of mature lymphocytes, stem and progenitor cells of the host organism by apoptosis mechanisms. Thus, the update of the recipient control antigenic homeostasis effector link occurs by the well-known mechanisms of positive and negative selection formed de novo T-lymphocytes via a double standard MHC-molecules of the recipient and donor E/FPC (Kukharchuk O.L. et al., 2002).

Is it principally possible of existance in nature the double standard of main histocompatibility complex molecules, by which effectively carried out positive and negative selection of T-lymphocytes? Answer to this question is immune system of truly hermaphrodites — in thier embryogenesis no crossin-gover and no division of parents genome. As a result, tetraploid truly hermaphrodites do not rejects transplanted organs of parents,

both mother's and father's organs. This fact convincingly proved in experiments on tetraploid mice (Royt A. et al., 2000; Kukharchuk O.L., Radchenko V.V., Sirman V.M., 2002).

Reprogramming of the immune system by using high doses of E/FPC not only allows to perform the cells transplantation without subsequent prolonged use of immunosuppressive drugs, but also opens up entirely new perspectives in the treatment of autoimmune diseases.

According to modern concepts, the specificity of T- and B-lymphocytes receptors formed coincidently, which naturally leads to the appearance of cells with a receptor field capable to react with antigens of own body, that is, constanly creating pool of autoreactive lymphocytes, for which counteracts the autologous tolerance mechanisms. Natural immunological tolerance both central and peripheral is not created in embryogenesis and is not encoded genetically, as previously assumed, but is constantly formed in ontogenesis. That is why the number of autoimmune diseases in which antibodies produced to the body's own modified by pathological process antigens seems to be entirely very low, whereas on forefront plan in the pathogenesis of autoimmune aggression moved antibodies, appearing due to the breach in the system of tolerance induction to own antigens of the organism, which in this case «skips» autoreactive T-lymphocytes through a thymic negative selection checkpoint. Subsequent launch of autoimmune aggression mechanisms is often triggered by microbial antigenic mimicry or adjuvant impact. In other words, an autoimmune disease in their predominant majority are not the result of acquired changes in the antigenic composition of an organism, but are the result of disturbances in the immune system, which should control and protect this antigenic composition (Royt A. et al., 2000).

Thus, replacement of damaged immune system to the new (reprogramming of the body antigenic homeostasis control system) in autoimmune pathology is pathogenetically approved, however does not removes the consequences, but the cause of disease i.e. cell transplantation aiming to substitute the damaged immune system in autoimmune diseases have an effect of pathogenetical treatment alternatives that do not currently exist.

Aging and stem-spaces. It is well known that autoimmune pathology, along with arterial hypertension and atherosclerosis (senile triad), is the prerogative of the aging organ-

ism. According to one of theories considered, that the basis for the development of senile triad is the age, so-called accidental involution of the thymus which leads to a weakening of the positive and negative selection of T-lymphocytes mechanisms with subsequent activation of autoaggressive clones of immunocompetent cells. In this regard, particular attention draws message evidencing about the effect of rejuvenation (by the external symptoms) and acceleration of the reproductive function after experimental or clinical use of stem cells (Kurtzman J., Gordon Ph., 1976).

Analysis of existing theories of aging shows that one of the key gerontology issues is the question about the identity of the cell and multicellular organisms aging mechanisms (Frolkis V.V., 1991; 1998; Frolkis V.V., Muradian H.K., 1992; Repin V.S., 2001 a).

By studying the biology of stem cells we found a grip for the development of new ideas about the aging process, considering itself from the viewpoint to body stem-spaces depletion theory.

Beneath the stem-spaces, we understand the pool of regional (adult) stem cells (mesenchymal, neural, hematopoietic stem cells, the basal stem cells of the skin, intestine, endocrine epithelium, ciliary folds pigment cells, etc.), called to compensate cells loss in specific tissues in the process of remodeling organism.

Remodeling of the body — this is a uninterrupted renewal of cells composition of all tissues and organs due to cells of stem-spaces throughout the whole life of mammals multicellular organism, in which all differentiated cells have limited term of life.

It is known, that in different organs and tissues the death and renewal of cells occur at different speed. Therefore physiological regeneration is realized in two ways. In the first option duplication of differentiated cells with the formation of identical genotypes and phenotypes descendants occurs. The second way involves in the replacement of dying cells by differentiated descendants of early undifferentiated precursors. In this case neocytogenesis occurs due to multipotent stem cells capable of self-renewal and the formation of committed progenitor cells that undergo final differentiation under the influence of the tissue microenvironment (growth factors and cytokines).

In our opinion, particular regional multipotent stem cells create the stem-spaces of an adult organism, which is the morphological equivalent of the body stabilizing vitality and prolong life expectancy process.

Thus, to understand the mechanisms of aging, we offer a theory of the body stem-spaces depletion, the main positions of which are as follows:

1. Aging is a permanent reduction in the size of the body stem-spaces.

2. The number of cells in stem-spaces is determined that defines the level of proliferative capacity of each stem-spaces.

3. The dimensions of stem-spaces determine the rate of aging of the separate organs, tissues and body systems.

4. After depletion of cells reserves in the stem-spaces, the intensity and rate of multicellular organism aging is determined by the mechanisms of aging somatic differentiated cells within the Hayflick limit.

5. At the stage of postnatal ontogenesis expansion of the body's stem-spaces for increase the longevity and quality of the individual life is possible through introduction of allogenic embryonic progenitor cells, which is achieved only in case of simultaneous reprogramming the immune system of the recipient.

According to the main position of this theory, aging is a permanent reduction in the size of the body stem-spaces. Under the stem-spaces, we understand the regional (adult) stem cells pool (mesenchymal, neural, hematopoietic stem cells, progenitor cells of the skin, gastrointestinal tract, endocrine epithelium, pigment cells of ciliary folds, etc.), which is replenished by cell loss of corresponding tissue during the remodeling of the organism. Remodeling of the body — this is renewal of cells composition of all tissues and organs by cells of the stem-spaces, which has uninterrupted characteristics and continues throughout the all life of a multicellular organism. The number of cells in stem-spaces are determined that defines the limited size (the proliferative potential) of each stem area. The dimensions of stem-spaces determine the rate of aging of individual organs, tissues and body systems: lesser the dimension of the stem-spaces the faster aging of the organ takes place. After depletion of cells stem-spaces reserves the intensity and the rate of a multicellular organism aging are determined by the mechanisms of somatic differentiated cells aging within the limit Hayflick: mature cells are capable to divide only 40–60 times.

Thus, during postnatal ontogeny the expansion of stem-spaces can increase the duration and quality of life, as such therefore stem cells reserves are renewing and remodeling of aging organism realizes due to allogenic stem

cells. The expansion of stem-spaces can be achieved by introduction of high doses of allogenic embryonic progenitor cells under the condition of simultaneous reprogramming the recipient immune system as such without these introduced cells will be rejected.

It should be noted that the main positions of our proposed stem-spaces theory can significantly change the existing notions not only about the mechanisms of aging, but also about the disease, as well as the consequences of its modern treatment. We give merely some examples.

- According to the theory of stem-spaces depletion, the diseases can develop (appear) as a result of pathology into the cells of stem-spaces (tumors, hypo- and aplastic anemia, immunodeficiencies, etc.).

- Depletion of mesenchymal cells stem space disrupts the remodeling of the connective tissues that leads to the appearance of external signs of aging.

- Depletion of endothelial stem cells reserve causes the development of hypertension and atherosclerosis.

- Small sizes of the thymus stem space determine its progressive age involution.

- Premature aging is a consequence of small sizes of the all body stem-spaces.

- Drug and non-pharmacological stimulation of stem cells reserve improves quality of life by reducing its duration, as it decreases the sizes of the stem-spaces.

- Low efficiency of modern geroprotectors is due to their protective effects on aging differentiated somatic cells rather, than body stem-spaces.

- Stem-spaces of long-lived people exceeds above the average population size.

- A protective action on aging cells, incorporating into the Hayflick limit, leads to a prolongation of senility, but does not improve quality of life.

- Positive effects of acupuncture, homeopathy, monochromatic laser light, ultraviolet blood irradiation, electromagnetic radiation, hypoxic training, and low doses of ionizing radiation (hormesis effect) are associated with cells of stem-spaces mobilization, which also reduces life duration.

It is known that during the period of the body maturity and its aging normological relay and the natural death of cells is realized via apoptosis. At the same time, the size of cells populations' capable to uninterrupted renewal is mainly determined by factors that prevent apoptosis. In other words, apoptosis

plays an important stabilizing role in maintaining the optimal number of cells in a multicellular organism. Apoptosis, unlike necrosis, does not cause formation of leukocyte infiltrates and does not elicit the growth of connective tissue with result of sclerosis or fibrogenesis. Outcome of apoptosis, as regulated cell death is cells regeneration (Lushnikov E.F., Abrosimov A.Y., 2001). It is logical to assume that the same factors that trigger apoptosis simultaneously are inducers of proliferation and differentiation of stem-spaces cells.

It should be noted that practically all stem cell research of adult mammals confirm the concept of Schofield (Schofield R., 1978) about the importance of the cell microenvironment or «niche» — a combination of growth factors and molecules of the extracellular matrix which provide the conditions necessary to maintain the phenotype of stem cells, and in the absence of these descendants of stem cells turn into differentiation or undergo apoptosis (Rodeck U. et al., 1997; Terskikh V.V., Vasilev A.V., 2001).

Maintaining the size of stem-spaces depends on the cells autonomous regulators modulated by external signals. In the role of such regulators are the factors of asymmetric cell division and genes expression control that determine the stage of committing and the number of mitoses. External signals that influence on the further fate of stem cells provides their microenvironment.

Thus, within the «stem-niche» carried out information exchange between non-committed and committed precursors, as well as between them and the surrounding cells. Proposed, that inducers of differentiation along with mesenchymal and non-mesenchymal cells and their products (growth factors and extracellular matrix molecules) are involved in the formation of spatial and temporal associations in the microenvironment of stem and progenitor cells.

Local tissue damage leads to the formation of new niches for stem and progenitor cells, qualitatively different from those in intact tissue, where there is a natural physiological updated pool of these cells. This distinction is extremely important in the strategy of cell phenotype specialization in normal and damage-induced microenvironment. Not so long ago was open common to all types of adult stem cells the ligand-receptor system (SCF / c-kit), mediating the process of early stages of stem-spaces cells reactivation (Thorgeirsson S.S., 1996).

Dimensions of stem-spaces and age. After completion of the embryonic period the role of stem cells is limited to physiological requirements of the organism in renewal of the cells composition and implementation of compensatory function in violation of the tissue completeness. With the onset of postnatal ontogeny quantity of stem cells is gradually reduced. In particular, its shown reduction of mesenchymal stem cells osteogenic potential with the achievement of a minimum level already to the age of 40 and cartilaginous tissue initially characterized by a limited reparative potential, apparently due to local shortages of mesenchymal progenitor cells and growth factors. Assumed, that the progenitor mesenchymal cells precommitive to chondrogenesis enter into the cartilaginous tissue from other stem sources (Sukhikh G.T. et al., 2002).

In the adult organism at equilibrium state of hemo- and lymphopoiesis stromal cells of bone marrow and lymphoid organs are updated very rarely and significant restructuring of stromal structures in these organs does not occur. In an experimental model for studying of bone marrow regeneration using a mechanical devastation of tubular bones medullary cavity — curettage. Therefore in the regeneration process involves not only populating the damaged organ of hematopoietic or lymphoid elements, but also its stromal structure. By existence, creates new stromal areas which repopulates by hemopoietic stem cells.

Application of the method of selective cloning allowed performing quantity estimation of hematopoietic and stromal-precursors populations, and studying changes in their numbers while elimination of hematopoietic tissue from a state of dynamic equilibrium. About the intensity of hemopoiesis, authors arbitrated by the number of hematopoietic cells, and by the concentration and quantity of stromal cell precursors — about the ability of bone marrow to form stromal structures. Established, that the recovery rates between hematopoietic and stromal cells have no direct correlation. Increase in the population of stromal precursors occurs at an earlier date after curettage, and stromal fibroblasts themselves become phosphatase-positive, which is characteristic of osteogenic tissue. Curettage of 3–5 tubular bones leads to an increase of this cells population in the bone marrow of non-operated bones and even in the spleen. At 20 days the number of hematopoietic elements is only 68 % of the control level, while the number of colony-forming fibroblast cells signifi-

cantly increases (Gerasimov Y.V. et al., 2001). In femoral fractures for the 60th day of the prolonged osteosynthesis the concentration of clonogenic stromal mechanocytes in the area of bone regeneration is increased compared with control by 11 times, and their numbers increased by 6 times. However, the number of myelocytes in the operated and contralateral bones decreased by 26 and 40% (Ilizarov G.A., Burke V., 1980; Ilizarov G.A. et al., 1980).

These data stands under doubt of the bone marrow hematopoietic stem cells to unlimited self-renewal ability. N.I. Drize and colleagues have shown that in irradiated mice reduced by hematopoietic cells transplantation hematopoiesis maintained throughout all life by many tens of simultaneously functioned small and short-lived clones. Short period existence of clones suggests that hematopoietic stem cells are not capable to have prolonged self-renewal and have limited proliferative potential. To confirm the validity of this conclusion, the authors analyzed the clonal composition of the mice bone marrow after transplantation of various doses of hematopoietic cells containing unique genetic markers as a result of human gene adenosine deaminase integration. It is shown, that reducing the dose of donor hematopoietic cells accelerates hematopoietic reversion to the recipient type and decreases the number of functioning clones. Since the results of this study confirms the failure of hematopoietic stem cells to prolonged self-renewal and proved its limited proliferative potential, authors have recommended to transplant maximum greatest number of hemopoietic stem cells (Drize N.I. et al., 1997).

It was established that the content of stromal clonogenic cells in the hematopoietic and lymphoid organs of mice and guinea pigs reduces with age. The most significant reduction in their number is observed in the thymus of mice and guinea pigs, as well as in the spleen of mice — by more than 12, 75 and 8 times respectively. In the bone marrow of old mice and guinea pigs were observed twice, and in the spleens of older guinea pigs — by 40 % drop of the stromal clonogenic cells content in compared with young animals. The obtained data is ensuring proved reduction in the quantity of determined and inducible osteogenic precursor cells during aging (Friedenstein A.J. et al., 1999). In vitro stromal precursor cells giving large colonies in primary cultures, maintains no more than 34 doublings, and with an increase in the level of doubling the

percentage of large colonies is reduced (Chailakhyan R.K. et al., 2001).

Unlike human, rodent cells retain throughout life a high telomerase activity in many tissues, including liver (Tsujiuchi T. et al., 1998). Nevertheless, in old animals a significant part of unipotent hepatocytes population loses the ability to enter into the cells cycle in response to a mitotic stimulus (Uryvaeva I.V., 2001).

De novo formation of neurons in the neocortex, hippocampus, striatum and septum of the mature brain (Kirschenbaum B.M. et al., 1994; Palmer T.D. et al., 1995; Pincus D.W. et al., 1998; Gould E. et al., 1999; Kukekov V.G. et al., 1999; Scharff C., 2000) actually evidences about the existence of dormant (reserve) stem and progenitor cells capable to proliferation with the generation of nerve and glial cells during changes in functional status and pathology of the CNS. Numerous studies results indicate that the enriched environment, learning, intense locomotor activity, as well as some pathological changes in the brain stimulate the formation of new neurons in dentate gyrus of the hippocampus, contribute to the formation of long-term potentiation in the hippocampus and improves cognitive functions (Kempermann G. et al., 1997; Gould E. et al., 1999; Kempermann G., Gage F., 1999; Nilsson M. et al., 1999; Van Praag H. et al., 1999; Gould E. et al., 2000), including while aging (Cameron H.A., McKay R.D., 1999; Kempermann G. et al., 1998). However, with ageing the intensity of neurogenesis decreases, although retained in the mature and aging brain of rodents and primates including humans (Altman J., Das G.D., 1965; Eriksson P.S. et al., 1998; Gould E. et al., 1999; Kempermann G. et al., 1998; Roy N.S. et al., 2000).

We share the view L.I. Korochkin who believes that the discovery of neural stem cells did not abolish the basic positions of the existing paradigm in neurobiology as well as the fact that the nervous system has limited ability to regenerate has been known before, and postulate failure to mature nerve cells to divide the results of stem cell research does not refute. In addition, the nervous system is not «stuffed» with stem cells, and has a very limited number of centers that contain them (Korochkin L.I., 2001).

In principle, the model of induced reduction of stem-spaces sizes already exists. This is the model of accelerated aging in experimental animals suggested to study geroprotective effects of new drugs (Frolkis V.V. et

al., 2002). Its essence concludes in the 2 Gy radiation exposure doses of mature animals. It is believed that while there are persistent changes in chromatin structure and protein synthesis in cells, DNA breaks, mutations and chromosomal aberrations, which leads to premature aging of cells, and with it a multicellular organism. But it is well known that the radiation factor is substantial inducer of apoptosis, and not only individual cells, but entire regions of the cell, which should cause the recruitment cells of stem-spaces and consequently, reduce their size. The result of such reduce stem-spaces — premature aging of the animals.

Thus, literature data suggest an important fact — the size of the stem-spaces and proliferative potential of adult regional stem cells are limited. Therefore, to achieve the amplification effect of regeneration of aging cells or rather to replace the old cells pool by young cells, the stem space required to be expanded by stem cells introduction from outside sources. In this respect are very interesting data about that genetically modified clones and cell lines of neural stem cells embedded in multiple areas of the CNS of adults and even of the aging recipients, demonstrating the capacity for adequate integration and differentiation. But most significantly includes that some neural stem cells remain pluripotent after intracerebral transplantation (Sukhikh G.T., Malaytcev V.V., 2001). This means that exogenous stem cells can be included in the stem-spaces of the recipient and to expand its. In particular, the population of the liver parenchyma by exogenous unipotent hepatocytes, introduced into the bloodstream in the form of suspensions, is just as integration — growing of new cells in the free zone of lobules girder structure ensures the preservation of the normal liver cytoarchitectonics (Braun K.M., Sandgren E.P., 1998; Overturf K. et al., 1997).

Established that behind-barriers located brain of adult animals, the transplanted cells migrate, differentiate and engraftment without any apparent immune response from the recipient organism (Aleksandrova M.A. et al., 2001). However, the expansion of other stem-spaces of the body is only possible when the control antigen homeostasis system was reinstalled, otherwise expression of major histocompatibility complex molecules in differentiating cells leads to a rejection of cells transplants (Royt A. et al., 2000; Down J.D., White-Scharf M.E., 2003). Reprogramming

of the immune system by using high doses of EPC not only allows to perform cell transplantation without subsequent long-term use of immunosuppressive drugs, but also opens up entirely new prospects for increasing longevity and exceeding human life quality.

According to one of the main positions of the adaptive-regulatory theory, aging is genetically determined features of the living systems organization (Frolkis V.V., 1998). We consider that these features are determined by the size of stem-spaces, diversity of which can be easily explained heterochrony, heterotopic, heterocatectenic and heterokineticity of aging process. The remaining positions of aging adaptive-regulatory theory are fully consistent with the fourth postulate of the depletion of stem-spaces theory (after depletion of stem-spaces cells reserves intensity and the speed of a multicellular organism aging is determined by the mechanisms of somatic differentiated cells aging within the Hayflick limit).

We propose three basic principles of using cells technology to rejuvenate the body and prevention of aging:

1. Expansion must be applied to all stem-spaces of the aging organism.

2. For the effective housing of exogenous stem cells, the required conditions are preparation of stem-spaces of the recipient to create niches that arise on the site of apoptosis, which is achieved by using generalized pressing on energy systems of senescent cells by hypoxic and hyperoxic stress.

3. For expansion of the body stem-spaces by cells transplantation requires the use of high doses of embryonic progenitor cells capable to substitute the recipient's immune system.

As follows attention to be paid on unpredictability result of the cell transplantation in oncological diseases, when the introduction of stem cell seems to be very dangerous because their differentiation can occur under the influence of the microenvironment factors which generates by tumor that poses a real threat not only to accelerate the growth of neoplasms, but also intensive metastasis even

those tumors, which are characterized by predominantly invasive growth.

There is another version of the regenerative medicine — Tissue Therapy, which is based on the effects of protein and non-protein molecules of allo- or xenogenic origin parabiologic tissues (Filatov V.P., 1952). In our opinion, the basic principle mechanism of tissue therapy is based on the effect of retrospective action of oligopeptides on the cell's genome. It is known that peptide bioregulating molecules are formed by limited proteolysis and have a broad spectrum of biological activities, coordinating the processes of biosynthesis in cells by influencing on the expression of specific gene sequences (Khavinson V.H., 2001). Attention paid that the practically entire process of embryogenesis is built on the subsequent action of peptide regulators (growth factors, cytokines) in the genome of embryonic cells (Khavinson V.H., Malinin V.V., 2002). Proved, that particularly microenvironmental factors determine the direction of migration and further differentiation of embryonic stem and progenitor cells (Repin V.S., Sukhikh G.T., 1998).

We consider that this is why the use of tissue-specific proteins, some of which have already been allocated to the «pure» form, or synthesized, is effective in the treatment of chronic diseases like asthma, arthritis, congestive heart failure, endarteritis obliterans, trophic ulcers and others. It is established geroprotective effect of such tissue-specific protein preparations, as epithalamin, epithalon, timalin, vilon, cortexin, retinolamin, prostatilen, prostamaks and livagen (Khavinson V.H., 2001; Khavinson V.H., Malinin V.V., 2002).

Thus, experimental and theoretical stages in the development of regenerative medicine has already given the scientific reasons for exit into practice, however realize the tremendous potential of cells transplantation and tissue therapy is necessary and is very important to consider all theoretical achievements and inclined world clinical experience to minimize the probability of side effects and achieve positive results of treatment.

О.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, Б.М. Ганджи, А.Б. Падма Прия, А.О. Кухарчук, Амол П. Гитте
СТАРЕНИЕ: ТЕОРИЯ ИСТОЩЕНИЯ СТЕЛОВЫХ ПРОСТРАНСТВ ТЕЛА

В обзоре проанализирована основная информация о принципах и методах нового направления в лечении больных, именуемого регенеративной медициной, основная информация о стволовых пространствах организма, содержатся данные об истощении ресурсов стволовых клеток при старении и представлена собственная теория механизмов старения.

Ключевые слова: *стволовые клетки, стволовые пространства, иммунная система замены, старение, регенеративная медицина.*

О.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, Б.М. Ганджи, А.Б. Падма Прия, А.О. Кухарчук, Амол П. Гитте
СТАРІННЯ: ТЕОРІЯ ВИСНАЖЕННЯ СТОВБУРОВИХ ПРОСТОРІВ ТІЛА

В огляді проаналізована основна інформація щодо принципів і методів нового напрямку в лікуванні хворих, який має назву регенеративної медицини, основна інформація щодо стовбурових просторів організму, містяться дані про виснаження ресурсів стовбурових клітин при старінні і представлена власна теорія механізмів старіння.

Ключові слова: *стовбурові клітини, стовбурові простори, імунна система заміни, старіння, регенеративна медицина.*

ЗМІСТ / CONTENT

- Д.І. Білько, Н.М. Білько.** Потенційні можливості ранніх ембріональних клітин формувати гемопоетичні клітини в культурі тканин *in vitro* 5
- С.Б. Билявская, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко.** Гормональная активность и морфологические особенности первичной культуры клеток щитовидной железы новорожденных поросят 10
- Г.А. Божок, В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко, Ю.В. Люпина, Я.Д. Карпова, Н.П. Шарова, Е.И. Легач.** Влияние интрапортального введения донорских спленоцитов и хлорида гадолиния на выживаемость тканевых аллогraftов эндокринных желез 13
- В.В. Боровик, Д.А. Гранов, Ф.К. Жеребцов, Д.Н. Майстренко, И.О. Руткин, М.И. Генералов.** Сосудистые осложнения при трансплантации печени 17
- А.В. Габрієлян, В.Й. Смержевський, Т.М. Доманський, В.Ф. Оніщенко.** Ствобурові клітини в комплексі лікування хворих з порушеною функцією скорочення міокарда 19
- К.А. Гольцев, И.А. Криворучко, К.А. Ачгибесов, О.В. Сафранчук, О.Ю. Кожина, М.В. Останков, А.Н. Гольцев.** Применение криоконсервированной кордовой крови в комплексной терапии острого гнойного перитонита у крыс 24
- І.В. Гомоляко, І.В. Григорова, Н.Є. Клочкова, Л.С. Донцова, І.О. Швадчин.** Морфологічна характеристика печінки донорів 31
- І.В. Гомоляко, Р.О. Зограб'ян, В.М. Торак, Л.С. Донцова, Г.В. Самсонова.** Цитометрична характеристика системи нейтрофілних гранулоцитів крові у реципієнтів ниркового трансплантата з наявністю герпетичної інфекції 35
- І.В. Гомоляко, Р.О. Зограб'ян, В.М. Торак, Г.В. Самсонова, Т.М. Полушина.** Характеристика системи нейтрофілних гранулоцитів крові у реципієнтів ниркового алотрансплантата дитячого віку 40
- В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, Б.Б. Івнев, Р.М. Радьк.** Восстановление двигательных и когнитивных функций у крыс после фокальной экспериментальной ишемии при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток 45
- В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, М.В. Петрова, И.Ю. Мокрук, Д.Л. Юдицкий.** Тканевой инжинеринг аортального и легочного клапанов сердца ксеногенного происхождения 49
- D.I. Bilko, N.M. Bilko.** Potential possibility of embryonic stem cells to form hemopoietic cells *in vitro* 5
- S.B. Bilyavskaya, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko.** Hormonal activity and morphological peculiarity of primary cell culture of thyroid glands of newborn sucking pigs 10
- G.A. Bozhok, V.V. Kiroshka, Yu.O. Tishchenko, Y.V. Lyupina, Ya.D. Karpova, N.P. Sharova, E.I. Legach.** Influence of donor splenocytes intraportal infusion and gadolinium chloride on the survival of the endocrine glands allograft tissue 13
- V.V. Borovik, D.A. Granov, F.K. Gerebtsov, D.N. Maystrenko, I.O. Rutkin, M.I. Generalov.** Vascular complication on the liver transplantation 17
- A.V. Gabriyelyan, V.I. Smorjevskiy, T.M. Doman'skiy, V.F. Onischenko.** Stem cells in complex treatment of patients with impaired myocardial contractive function 19
- K.A. Goltsev, I.A. Krivoruchko, K.A. Achgibesov, O.V. Safranchuk, O.Yu. Kozhina, M.V. Ostankov, A.N. Goltsev.** Application of cryopreserved cord blood in combined therapy of acute purulent peritonitis in rats 24
- I.V. Gomolyako, I.V. Grigорова, N.Ye. Klochkova, L.S. Dontsova, I.O. Shvadchin.** Morphologic characteristics of the donor's liver 31
- I.V. Homoliako, R.O. Zograban, V.M. Torak, L.S. Dontsova, G.V. Samsonova.** Cytometric character of neutrophil granulocytes of blood in renal transplant recipients with herpes infection 35
- I.V. Homoliako, R.O. Zograban, V.M. Torak, G.V. Samsonova, T.M. Polushina.** The neutrophil granulocytes system in pediatric renal allotransplant recipients 40
- V.K. Grin, A.G. Popandopulo, B.B. Ivnev, R.M. Radyk.** Neurological functions recovery at rats after focal experimental ischemia by mesenchymal stem cells transplantation 45
- V.K. Gryn, A.G. Popandopulo, M.V. Petrova, I.Yu. Mokryk, D.L. Yuditskiy.** Tissue engineering of aortic and pulmonary heart valves of xenogenic nature 49

- В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, С.И. Эстрин, Е.М. Денисова, Н.В. Сергиенко, А.А. Рябко.** Влияние клеточной трансплантации на течение хронической сердечной недостаточности у больных с ишемической болезнью сердца 52
V.K. Grin, A.G. Popandopulo, S.I. Estrin, E.M. Denisova, N.V. Sergiienko, A.A. Ryabko. The impact of cell transplantation on the course of chronic heart failure in patients with coronary heart disease
- С.Н. Гриценко, С.П. Корнеева, Т.А. Семенова, С.Н. Корогод, А.В. Литвинов, В.А. Собокаръ.** Интенсивная заместительная терапия острой недостаточности почечного трансплантата 58
S.N. Gritsenko, S.P. Korneyeva, T.A. Semenova, S.N. Korogod, A.V. Litvinov, V.A. Sobokar. Intensive replacement therapy of acute renal transplant failure
- В.К. Денисов.** Пути повышения эффективности междисциплинарного взаимодействия в трансплантологии 62
V.K. Denisov. The ways of increasing efficiency of interdisciplinary cooperation in transplantology
- В.К. Денисов.** Трансплантология в XXI веке. Итоги первого десятилетия 66
V.K. Denisov. Transplantation in XXI century. The results of the first decade
- В.К. Денисов, В.В. Захаров, Н.Д. Олещенко, Е.В. Онищенко, А.И. Сидоркин, И.И. Деменкова, Т.С. Голубова, А.С. Ксенофонтова, О.В. Захарова.** Пределы допустимого риска при трансплантации почек 70
V.K. Denisov, V.V. Zakharov, N.D. Oleschenko, E.V. Onischenko, A.I. Sidorkin, I.I. Demenkova, T.S. Golubova, A.S. Ksenofontova, O.V. Zakharova. Kidney transplantation to the high-risk patients
- В.К. Денисов, А.С. Ксенофонтова, И.И. Деменкова.** Прогнозирование исходов трансплантации почки в позднем послеоперационном периоде 74
V.K. Denisov, A.S. Ksenofontova, I.I. Demenkova. Forecasting of renal transplantation results in late postoperative period
- Н.Г. Завгородняя, О.А. Исакова, Н.С. Луценко, О.А. Рудычева.** Основные проблемы офтальмотрансплантологии и возможные пути их решения 78
N.G. Zavgorodnyaya, O.A. Isakova, N.S. Lutsenko, O.A. Rudycheva. Main problems of ophthalmotransplantation and the ways of decision
- В.В. Захаров, С.О. Варібрус, О.В. Захарова.** Ефективність нових протоколів індукційної імуносупресивної терапії після алотрансплантації трунної нирки 82
V.V. Zakharov, S.A. Varibrus, O.V. Zakharova. Efficiency of the new protocols for induction immunosuppressive therapy after cadaveric kidney transplantation
- Р.О. Зограб'ян, О.В. Закрут'ко, В.Ф. Закордонець, С.С. Харченко, В.М. Торак, С.М. Бочарніков, В.В. Шелест.** Додіалізна трансплантація нирки від живого родинного донора: приваблива альтернатива 86
R.O. Zograbyan, O.V. Zakrutko, V.F. Zakordonecs, S.Ye. Harchenko, V.M. Torak, S.M. Bocharnikov, V.V. Shelest. Predialysis kidney transplantation from a living related donor: an attractive alternative
- Р.О. Зограб'ян.** Попередження ішемічно-реперфузійного пошкодження ниркового алотрансплантата 91
R.O. Zograbyan. Prevention of renal allograft ischemia/reperfusion injury
- А.Б. Кебкало, Р.В. Салютин, Г.С. Лобинцева.** Біохімічні зміни в плазмі крові хворих на некротичний панкреатит при трансплантації стовбурових клітин кордової крові 97
A.B. Kebkalo, R.V. Salyutin, G.S. Lobintseva. Biochemical changes in the blood plasma of patients with pancreatitis necrotizing transplantation of stem cells cord blood
- І.І. Кобза, Р.А. Жук, Ю.Г. Орел, О.І. Русин, Д.Є. Федорів, Л.З. Любінецька, І.Г. Яковлев, Я.І. Ярема.** Альтернативні шляхи реконструкції «короткої» ниркової вени в трансплантаційній хірургії 106
I.I. Kobza, R.A. Zhuk, Yu.G. Orel, O.I. Rusyn, D.Ye. Fedoriv, L.Z. Ljubinetska, I.G. Yakovlev, Ya.I. Yarema. Alternative ways of «short» renal vein reconstruction in transplant surgery
- І.І. Кобза, Р.А. Жук, О.І. Русин, П.П. Поваляшко, Р.Б. Савронь, О.А. Зубенко, І.Д. Бойків.** Успішна ендovasкулярна корекція критичного стенозу ниркової артерії з гострим пошкодженням трансплантата нирки 110
I.I. Kobza, R.A. Zhuk, O.I. Rusyn, P.P. Povaljashko, R.B. Savron, O.A. Zubenko, I.D. Boykiv. Successful endovascular correction of critical transplant renal artery stenosis with acute kidney graft failure
- А.Э. Королёв, А.А. Костенко, А.П. Мазур, Н.Ю. Дыховичная, С.М. Спасский, А.В. Шарпов.** Поддержание стабильных интраоперационных показателей гемодинамики у пациентов с обширными резекциями печени 114
A.E. Korolov, A.A. Kostenko, A.P. Mazur, N.I. Dykhovichnaya, S.M. Spasskiy, A.V. Sharapov. Maintenance of stable intraoperation indexes of hemodynamics for patients with the extensive liver resections

- О.Г. Котенко, Д.А. Федоров, А.О. Попов, А.А. Коршак, А.В. Гриненко, А.В. Гусев.** 10-летний опыт трансплантации печени от живого родственного донора в Украине 121
- O.G. Kotenko, D.A. Fedorov, A.O. Popov, A.A. Korshak, A.V. Grinenko, A.V. Gusev.** 10-year experience of liver transplantation from living related donor in Ukraine
- Е.И. Легач, Ю.И. Боднар, Г.А. Божок.** Сравнительный анализ структурного состояния фрагментов ткани эндокринных желез при органо-типическом культивировании или гипотермическом хранении в кустодиоле и турусоле 128
- E.I. Legach, Yu.I. Bodnar, G.A. Bozhok.** Comparative analysis of the structure of the endocrine glands tissue fragments at organotypic culture or hypothermic storage in the Custodiole and Turusole
- В.Н. Лесовой, Н.М. Андоньева, И.М. Антонян, Ю.Б. Ларьяновская, С.А. Кешишян.** Применение стромальных стволовых клеток при экспериментальном гипогонадизме 132
- V.N. Lesovoy, N.M. Andonyeva, I.M. Antonyan, Yu.B. Laryanovskaja, S.A. Keshyshyan.** Application of stromal stem cells in experimental hypogonadism
- В.Н. Лесовой, Н.М. Андоньева, В.В. Бублик, О.В. Нечипоренко, В.Л. Лисаченко, И.Н. Лященко, С.А. Кешишян, А.В. Бублик, А.В. Лесовая, Е.А. Гуц, М.Я. Дубовик.** Случай ЦМВ-инфекции у реципиентки почечного трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде 141
- V.N. Lesovoy, N.M. Andonyeva, V.V. Bublik, O.V. Nechiporenko, V.L. Lisachenko, I.N. Ljashchenko, S.A. Keshishyan, A.V. Bublik, A.V. Lesovaya, E.A. Guts, M.Y. Dubovik.** Case of CMV-infection at recipient of kidney transplant in late post-transplantation period
- В.М. Лисовий, Н.М. Андон'єва, В.В. Бублик, О.А. Гуц, М.Я. Дубовик, М.А. Грушка, Г.В. Лисова, О.В. Нечипоренко.** Досвід трансплантації нирки від живого родинного донора 144
- V.N. Lesovoy, N.M. Andonyeva, V.V. Bublik, E.A. Guts, M.Y. Dubovik, M.A. Grushka, A.V. Lesovaya, O.V. Nechiporenko.** Experience of kidney transplantation from living related donor
- В.М. Лисовий, Н.М. Андон'єва, В.В. Бублик, О.А. Гуц, М.Я. Дубовик, М.А. Грушка, Г.В. Лисова, О.В. Нечипоренко.** Родинна трансплантація нирки у пацієнта з синдромом Альпорта 150
- V.N. Lesovoy, N.M. Andonyeva, V.V. Bublik, E.A. Guts, M.Y. Dubovik, M.A. Grushka, A.V. Lesovaya, O.V. Nechiporenko.** Related kidney transplantation at the patient with Alport syndrome
- Е.А. Мединец, В.В. Кирошка, Ю.О. Тищенко, Т.П. Бондаренко.** Анализ морфологии трансплантатов овариальной ткани после гипотермического хранения 153
- K.O. Medynets, V.V. Kiroshka, J.O. Tischenko, T.P. Bondarenko.** Morphology of transplant ovarian tissue after hypothermic storage
- О.С. Никоненко, С.М. Гриценко.** Ренопротекция при трансплантації нирки 158
- A.S. Nikonenko, S.N. Gritsenko.** Kidney protection on stages of kidney allografting
- А.С. Никоненко, С.Н. Гриценко, В.А. Собокар, В.В. Саленюк, А.А. Вороной.** Анестезия и интраоперационная интенсивная терапия при трансплантации печени 162
- A.S. Nikonenko, S.N. Gritsenko, V.A. Sobokar, V.V. Salenuk, A.A. Voronoy.** Anesthesia and intraoperative intensive care for liver transplantation
- А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, С.Н. Гриценко, Н.Н. Поляков, Ю.В. Сушко, О.В. Пастухов, И.А. Лактионов, Т.И. Остапенко, И.С. Кузьмина.** Хирургическое лечение больных терминальной стадией хронической почечной недостаточности, корригируемой хроническим гемодиализом и трансплантацией почки 171
- A.S. Nikonenko, S.N. Zavgorodny, S.N. Gritsenko, N.N. Polyakov, Yu.V. Sushko, O.V. Pastukhov, I.A. Laktionov, T.I. Ostapenko, I.S. Kuzminova.** Surgical treatment patients with terminal stage of chronic renal insufficiency, received the treatment with hemodialysis and after kidney transplantation
- А.С. Никоненко, С.Н. Завгородний, Н.Н. Поляков, А.В. Губка, О.В. Пастухов, И.А. Лактионов, Ю.В. Сушко.** Ангиохирургические аспекты трансплантации почки 174
- A.S. Nikonenko, S.N. Zavgorodny, N.N. Poliakov, A.V. Gubka, O.V. Pastukhov, I.A. Laktionov, Yu.V. Sushko.** Aspects of vascular surgery in kidney transplantation
- А.С. Никоненко, Т.П. Котова, Н.Н. Поляков, И.В. Писаренко.** Возможности ультразвуковой доплер-сонографии в комплексной диагностике смерти мозга 178
- A.S. Nikonenko, T.P. Kotova, N.N. Polyakov, I.V. Pisarenko.** Possibilities ultrasonic doppler-sonography in complex diagnostics of mors of the brain
- А.С. Никоненко, Т.И. Остапенко, Н.Н. Поляков, И.С. Кузьмина.** Влияние блокаторов АТ1-рецепторов ангиотензина II на течение хронической трансплантационной нефропатии 182
- A.S. Nikonenko, T.I. Ostapenko, N.N. Polyakov, I.S. Kuzminova.** The effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on the course of chronic allograft nephropathy

- А.С. Никоненко, Н.Н. Поляков, О.С. Гордиенко.** Ультразвуковая доплерография в оценке функции аллотрансплантата почки 185
A.S. Nikonenko, N.N. Poliakov, O.S. Gordienko. Doppler ultrasound in the evaluation of allograft kidney function
- А.С. Никоненко, А.В. Трайлин, Т.Н. Никоненко, Т.И. Остапенко, Н.Н. Поляков.** Диагностика, прогнозирование и профилактика дисфункции почечного аллотрансплантата 187
A.S. Nikonenko, A.V. Trailin, T.N. Nikonenko, T.I. Ostapenko, N.N. Polyakov. Diagnostics, prediction and prevention of kidney allograft dysfunction
- Т.Н. Никоненко, А.В. Трайлин.** Методологический подход к морфологическому исследованию почечных трансплантатов 194
T.N. Nikonenko, A.V. Trailin. Methodological approach to morphological examination of kidney allograft
- Є.В. Оніщенко, В.В. Захаров.** Аналіз патології нижніх дихальних шляхів у потенційних реципієнтів ниркового алотрансплантата 197
E.V. Onishchenko, V.V. Zakharov. The analysis of a pathology of lower respiratory tract for the potential recipients of a renal allotransplant
- М.В. Останков, А.Н. Гольцев, Т.Г. Дубрава, Е.Д. Луценко, Ю.А. Гаевская, А.Ю. Димитров, П.А. Борисов, О.В. Челомбитко.** Применение криоконсервированных клеток фетальной печени для иммунокоррекции состояния реципиентов с РТПХ в эксперименте 201
M.V. Ostankov, A.N. Goltsev, T.G. Dubrava, E.D. Lutsenko, Yu.A. Gaevskaaya, A.Yu. Dimitrov, P.A. Borisov, O.V. Chelombitko. Application of fetal liver cryopreserved cells to immunologically correct state of recipients with GVHD in experiment
- Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Е. Думброва, Н.Ф. Леус, Б.М. Коган, Н.И. Молчанюк, И.О. Насинник.** Гистологическое и ультраструктурное исследование роговицы кроликов после интраламеллярной имплантации бесклеточного модуля стромы роговицы человека 206
N.V. Pasechnikova, V.V. Vit, N.F. Leus, B.M. Kogan, I.O. Nasinnik. Histological and ultrastructural study of the rabbits cornea after intralamellar transplantation of acellular stroma of the human cornea
- Н.В. Пасечникова, В.В. Вит, Н.Ф. Леус, С.А. Якименко, А.И. Бузник, С.Г. Коломийчук, И.О. Насинник.** Применение имплантов на основе коллагена в качестве роговичного трансплантата в эксперименте 210
N.V. Pasechnikova, V.V. Vit, M.F. Leus, S.A. Yakimenko, O.I. Buznik, S.G. Kolomiychuk, I.O. Nasinnik. Application of collagen implants as a corneal graft in experiment
- Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, О.Н. Иванова, А.Г. Попандопуло, А.С. Кавелина, Т.Б. Гайдамака.** Эффективность клеточной терапии на модели нейротрофического кератита (кератопатии) 213
N.V. Pasechnikova, G.I. Drozhzhyna, O.N. Ivanova, A.G. Popandopulo, A.S. Kavelina, T.B. Gaydamaka. Efficiency of stem cell therapy on the model of neurotrophic keratitis (keratopathy)
- Н.В. Пасечникова, Г.И. Дрожжина, В.Л. Осташевский, Т.Б. Гайдамака.** Современные проблемы трансплантации роговой оболочки в Украине 218
N.V. Pasechnikova, G.I. Drozhzhina, V.L. Ostashevskiy, T.B. Gaydamaka. The modern problems of corneal transplantation in Ukraine
- Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк, М.В. Турчин.** Особливості технології виготовлення і застосування кератоксеноімплантату в офтальмологічній практиці 223
N.V. Pasechnikova, S.A. Yakimenko, V.V. Biguniak, M.V. Turchin. Features of technology of manufacturing and use keratoxenoinplant in ophthalmologic practice
- Н.В. Пасечникова, С.А. Якименко, В.В. Бігуняк, М.В. Турчин, О.І. Бузник, І.О. Насінник.** Клініко-експериментальні результати застосування амніотичної оболонки та криоліофілізованої рогівки свині в якості матеріалу для кератопластики 226
N.V. Pasechnikova, S.A. Yakimenko, V.V. Biguniak, M.V. Turchin, O.I. Buznik, I.O. Nasinnik. Clinical and experimental results of application of amniotic membrane and cryolyophilized pig cornea as material for keratoplasty
- І.П. Пастер, І.А. Балла, А.Є. Коваленко, Я.Г. Бальон, В.В. Марков, Н.В. Сологуб, О.Я. Родіонова, Л.А. Кузьминська, Н.І. Левчук, О.А. Стаценко, С.В. Гулеватий, М.Д. Тронько.** Перспективи проведення ало- і ксенотрансплантації тканин ендокринних залоз без необхідності призначення імуносупресивної терапії 229
I.P. Pasteur, I.A. Balla, A.Ye. Kovalenko, Ya.G. Balyon, V.V. Markov, N.V. Sologub, O.Ya. Rodionova, L.A. Kuzminska, N.I. Levchuk, O.A. Stazenko, S.V. Gulevaty, M.D. Tronko. Prospects of allo- and xenotransplantation of endocrine glands without the need for prescribing immunosuppressive therapy
- А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко.** Трансплантация мезенхимальных стромальных клеток: перспективы и реальность 234
A.Yu. Petrenko, Yu.A. Petrenko. Transplantation of mesenchymal stromal cells: prospects and reality

- Ю.В. Поляченко, Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, С.І. Мартиненко, М.Ф. Соколов, В.А. Шаблій, М.П. Комаров.** Ефективність трансплантації прогеніторних клітин фетальної печінки як методу непрямой ревазуляризації нижніх кінцівок 237
- Yu.V. Poljachenko, R.V. Salutin, S.S. Paljanitsa, S.I. Martynenko, N.F. Sokolov, V.A. Shablii, M.P. Komarov.** Efficiency of transplantation of progenitor cells of fetal liver as method of indirect revascularization of inferior limbs 237
- О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, В.Ю. Прокопюк.** Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів 242
- O.S. Prokopjuk, V.V. Chizhevsky, V.Y. Prokopjuk.** Effects of cryopreserved chorionic tissue implantation on the morphofunctional state 242 of myocardium of old rats
- Р.В. Салютін, С.С. Паляниця, Р.М. Борис, М.П. Комаров.** Клітинна трансплантація: перспективи розвитку та практичного використання 246
- R.V. Salutin, S.S. Paljanitsa, R.N. Boris, M.P. Komarov.** Cell transplantation: perspectives of development and practical usage 246
- О.С. Сидоренко, Г.А. Божок, Е.І. Легач, Т.П. Бондаренко.** Получение первичной культуры клеток надпочечников новорожденных поросят 248
- O.S. Sidorenko, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko.** Obtaining of newborn pig adrenal primary cell culture 248
- А.Н. Сукач, А.С. Лебединский, О.В. Оченашко, А.Ю. Петренко.** Влияние фетальных нервных клеток на восстановление подвижности конечностей крыс с травматическим повреждением спинного мозга 253
- A.N. Sukach, A.S. Lebedinsky, O.V. Ochenashko, A.Yu. Petrenko.** Influence of fetal nervous cells on renewal of mobility of extremities of rats with the traumatic damage of spinal cord 253
- В.М. Тодуров, Г.И. Ковтун, С.А. Шелудько, А.О. Шпачук, А.В. Ревенко, А.В. Михайлова, А.В. Шмидт, А.Н. Поступальский.** Хирургическое лечение терминальной стадии сердечной недостаточности 256
- V.M. Todurov, G.I. Kovtun, S.O. Sheludko, A.O. Shpachuk, O.V. Revenko, A.V. Mikhailov, A.A. Schmidt, A.M. Postupal.** Surgical treatment of end-stage heart failure 256
- Н.А. Томилина, И.Г. Ким, Е.С. Столяревич, Н.Д. Федорова.** Сравнительная эффективность базисной иммуносупрессии циклоsporином и такролимусом после трансплантации почки (анализ 3-летнего опыта) 261
- N.A. Tomilina, I.G. Kim, Ye.S. Stolyarevich, N.D. Fedorova.** Comparative efficiency of basic immunosuppression by cyclosporine and takrolimus after kidney transplantation (analysis of 3-year experience) 261
- А.В. Траилин, А.С. Никоненко, Т.Н. Никоненко, Н.Ф. Ефименко, М.В. Плетень.** Оценка риска развития острой реакции отторжения почечного аллотрансплантата путем определения сывороточной концентрации IP-10 263
- A.V. Trailin, A.S. Nikonenko, T.N. Nikonenko, N.F. Efimenko, M.V. Pleten.** Serum IP-10 testing in the estimation of the risk of acute kidney allograft rejection 263
- Е.П. Тумасова, И.В. Гомоляко, Т.А. Царенко, Л.С. Донцова.** Цитологическая характеристика осадка мочи у больных с почечным аллотрансплантатом 266
- Ye.P. Tumasova, I.V. Gomolyako, T.A. Tsarenko, L.S. Dontsova.** Cytologic character of urinary sediment in patients with renal allotransplantant 266
- Д.В. Черкашина, И.А. Сосимчик, О.А. Семенченко, Е.Н. Ткачева, А.Ю. Петренко.** Внесение биорегуляторов стволовых и прогениторных клеток в консервирующий раствор улучшает функциональные показатели печени для трансплантации 270
- D.V. Cherkashina, I.A. Sosimchik, O.A. Semenchenko, E.N. Tkacheva, A.Yu. Petrenko.** Supplementation of preservation solution with bioregulators of stem and progenitor cells improves functional parameters of liver for transplantation 270
- В.А. Шаблій.** Кріоконсервування оваріальної тканини та її використання в репродуктивній медицині 274
- V.A. Shablii.** Cryopreservation of ovarian tissue and its use in reproductive medicine 274
- В.А. Шаблій, М.Д. Кучма, В.М. Кирик, Г.М. Онищенко, Г.С. Лобинцева.** Характер експресії окремих поверхневих маркерів у культурі клітин пуповинної вени людини 280
- V.A. Shablii, M.D. Kuchma, V.M. Kyryk, G.M. Onishchenko, G.S. Lobintseva.** Character of the surface markers expression on cultured cells derived from human umbilical vein 280
- В.И. Шепитько, Л.Е. Бобырева, И.Л. Дворник, А.А. Капустянская, К.В. Шепитько, А.Л. Челишвили.** Новые биотехнологии в диабетологии 287
- V.I. Shepitko, L.Ye. Bobyрева, I.L. Dvornyk, A.A. Kapustyanskaya, K.V. Shepitko, A.L. Chelishvili.** New biotechnologies in diabetology 287

*О.Л. Кухарчук, В.В. Радченко, Б.М. Ганджи,
А.Б. Падма Прия, А.О. Кухарчук, Амол
П. Гитте. Старение: теория истощения
стволовых пространств тела*

*O.L. Kukharchuk, V.V. Radchenko, B.M. Gandhi,
A.B. Padma Priya, A.O. Kukharchuk, Amol
P. Gitte. The aging: theory of the body stem-
spaces depletion* 292