

ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ: ИТОГИ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Том II
2010 год

Под редакцией С.В. Готье

Министерство здравоохранения и социального развития РФ

ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии
и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России

Общероссийская общественная организация трансплантологов
«Российское трансплантологическое общество»

**Трансплантология:
итоги и перспективы
Том II
2010 год**

Под редакцией С.В. Готье

Москва
2011

УДК 616-089.819.843

ББК 52.5

T65

T65 **Трансплантология: итоги и перспективы. Том II. 2010 год /**
Под ред. С.В. Готье. – М. – Тверь: ООО «Издательство «Триада»,
2011. – 464 с.: ил.

ISBN 978-5-94789-460-8

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

Приведен анализ состояния органной трансплантации в России за 2006–2010 гг. Результаты научных исследований в области трансплантологии и искусственных органов представлены в виде обзоров по материалам отчетов о научно-исследовательских работах, методических рекомендаций, авторефератов диссертаций, защищенных в 2010 г. по специальности 14.01.24 Трансплантология и искусственные органы. Приведен перечень диссертационных советов, принимающих к защите диссертации по этой специальности. Отдельные разделы содержат библиографию работ отечественных ученых, опубликованных в 2010 г. за рубежом, а также календарь основных всероссийских научно-практических мероприятий.

ББК 52.5

Авторы и составители: С.В. Готье, Н.В. Кунцевич, Я.Г. Мойсюк, С.М. Хомяков, О.М. Цирульников, О.П. Шевченко, Е.В. Яновская

ISBN 978-5-94789-460-8

© С.В. Готье, 2011

© Макет ООО «Издательство «Триада», 2011

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
I. РЕЗОЛЮЦИЯ V ВСЕРОССИЙСКОГО СЪЕЗДА ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ	7
II. РАЗВИТИЕ ОРГАННОГО ДОНОРСТВА И ТРАНСПЛАНТАЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006–2010 гг.	17
III. РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	33
Основные результаты научных исследований по комплексной проблеме «Трансплантология и искусственные органы»	34
Наиболее значимые результаты НИР за 2010 г. по проблеме «Трансплантология и искусственные органы» (научный совет по трансплантологии и искусственным органам № 21)	39
IV. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	47
Правовые, организационные и клинические аспекты органного донорства	49
Прогнозирование раннего развития васкулопатии сердечного трансплантата на этапе дооперационного обследования	125
Диагностика острого отторжения аллотрансплантированной печени по схеме Банфф-1995	143
V. ДИССЕРТАЦИИ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ «ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ», ЗАЩИЩЕННЫЕ В 2010 г.	155
Перечень советов по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности «трансплантология и искусственные органы»	156
Авторефераты диссертаций на соискание ученой степени доктора наук	157

Авторефераты диссертаций на соискание ученой степени
кандидата наук.....265

**VI. УКАЗАТЕЛЬ РАБОТ ОТЕЧЕСТВЕННЫХ АВТОРОВ
В ОБЛАСТИ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЗАРУБЕЖНЫХ
ИЗДАНИЯХ В 2010 г.455**

**VII. ВСЕРОССИЙСКИЕ КОНФЕРЕНЦИИ
ПО ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫМ
ОРГАНАМ, СОСТОЯВШИЕСЯ В 2010 г.459**

ГЛУБОКОУВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

Первый том периодического издания «Трансплантология: итоги и перспективы» вышел год назад и отражал состояние клинической трансплантологии и результаты научных исследований в области трансплантологии и искусственных органов по итогам 2009 года. Опыт оказался удачным и показал востребованность такой формы подачи информации. Представляем вашему вниманию следующий, второй выпуск «Трансплантология 2010: итоги и перспективы», составленный по итогам 2010 года.

Одним из заметных и значимых профессиональных событий года явился очередной V Всероссийский съезд трансплантологов, прошедший 8–10 октября 2010 г. в Москве под эгидой Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова», I Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Общероссийской общественной организации «Российское трансплантологическое общество». В рамках съезда состоялись Первые Шумаковские чтения, посвященные проблемам сердечно-сосудистой хирургии и трансплантации сердца, которые вызвали большую заинтересованность гостей и участников. Надеемся, что проведение Шумаковских чтений станет доброй традицией и заметным событием в насыщенной научной и общественной жизни нашей страны. Настоящее издание открывает резолюция V Всероссийского съезда трансплантологов, констатирующая современное состояние и определяющая приоритетные задачи и перспективы развития отечественной трансплантологии.

Как показывает анализ, представленный по результатам III сообщения национального трансплантологического регистра, положительные тенденции в развитии органного донорства и трансплантации в нашей стране устойчиво сохраняются и характеризуются увеличением числа трансплантаций органов, открытием новых трансплантационных центров. Несмотря на это, чтобы удовлетворить потребность населения нашей страны, объем трансплантологической помощи должен быть увеличен.

Второй том по структуре несколько отличается от предыдущего: мы продолжаем искать наиболее полную и удобную форму представления информации. В настоящую книгу не вошли тексты отчетов по завершённым научно-исследовательским работам, поскольку содержание последних в значительной степени отражено в авторефератах защищенных диссертаций, которые приводятся в полном объеме. Краткие обзоры наиболее значимых результатов научных исследований по комплексной проблеме «Трансплантология и искусственные органы» составлены по материалам

годовых отчетов, направленных в Российскую академию наук и Российскую академию медицинских наук. Новый раздел представлен разработанными в 2010 г. методическими рекомендациями, посвященными ключевой проблеме трансплантологии – донорству органов, а также базирующимися на перспективных исследованиях в области трансплантации сердца и печени.

Одной из приоритетных задач является формирование позитивного имиджа, укрепление авторитета российской науки и отечественных ученых в мировом научном сообществе. Приведенные в настоящем издании указатель зарубежных публикаций отечественных авторов, а также перечень наиболее значимых всероссийских научно-практических мероприятий позволят заинтересованному читателю составить представление об этом важном аспекте нашей деятельности в 2010 г.

Хочется выразить уверенность, что очередной выпуск издания «Трансплантология: итоги и перспективы» станет еще одним шагом на пути к достижению и реализации нашей общей цели – развитию современной отечественной трансплантологии и обеспечению высокотехнологичной трансплантологической помощью населения нашей страны.

*Главный специалист-трансплантолог Минздравоуразвития РФ,
директор ФГУ «Федеральный научный центр
трансплантологии и искусственных органов
им. академика В.И. Шумакова»
Минздравоуразвития России,
член-корреспондент РАМН, профессор*



С.В. Готье

**I. РЕЗОЛЮЦИЯ
V ВСЕРОССИЙСКОГО СЪЕЗДА
ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ**

РЕЗОЛЮЦИЯ V ВСЕРОССИЙСКОГО СЪЕЗДА ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ

г. Москва

10 октября 2010 года

В соответствии с п. 26 Плана научно-практических мероприятий Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации на 2010 год, утвержденного приказом Минздравсоцразвития России от 15 марта 2010 года № 147, 8–10 октября 2010 года в Москве прошел V Всероссийский съезд трансплантологов.

В мероприятии, прошедшем на традиционно высоком уровне, приняли участие ведущие российские и зарубежные ученые – специалисты в области клинической и экспериментальной трансплантологии, реаниматологи и неврологи, врачи больниц скорой помощи, руководители здравоохранения, главные внештатные специалисты – трансплантологи регионов, представители профессиональных медицинских обществ и ассоциаций, индустрии медицинской техники и лекарственных препаратов, всего более 600 человек.

В адрес участников съезда были зачитаны приветствия Президента РФ и Министра здравоохранения и социального развития РФ. На съезде выступили руководители профильных департаментов Минздравсоцразвития России.

По традиции состоялось торжественное награждение специалистов медалью «Академик В.И. Шумаков» за выдающийся вклад в развитие отечественной трансплантологии; почетным знаком донора «Дарящему часть себя» пациентов, ставших родственными донорами для спасения жизни своих близких.

На съезде выступил с лекцией «Основополагающие принципы клеточной, тканевой и органной трансплантации» координатор департамента высоких медицинских технологий Всемирной организации здравоохранения Luc J.P. Noel.

В рамках съезда прошла объединенная сессия Европейского общества трансплантации органов (ESOT) и Общероссийской общественной организации трансплантологов «Российское трансплантологическое общество», что свидетельствует о признании отечественной трансплантологии, делающей уверенные шаги на пути становления.

Состоялись заседание профильной комиссии по трансплантологии Экспертного совета по здравоохранению Минздравсоцразвития России, заседание Координационного совета Общероссийской общественной организации трансплантологов «Российское трансплантологическое общество».

Насыщенная программа съезда включала 93 научных доклада, сделанных ведущими российскими и зарубежными учеными. С большим интересом участниками съезда были встречены Первые Шумаковские чтения «Сердечно-сосудистая хирургия и трансплантация сердца», мастер-классы по трансплантации печени и легкого, видеотрансляция из операционной. Большинство докладов, представленных на съезде, продемонстрировали высокую научную подготовленность участников, появление новых научных школ и имен.

Съезд обеспечен обширной информационной базой: были изданы и предоставлены участникам и гостям обширные материалы съезда (около 500 тезисов), новые книги («Очерки клинической трансплантологии») первый выпуск национального информационного издания «Трансплантология 2009: итоги и перспективы», очередные выпуски журнала «Вестник трансплантологии и искусственных органов».

Должное внимание общественности к мероприятию обеспечили ведущие средства массовой информации.

Прошедшие со времени IV Съезда 2 года развития трансплантологии в нашей стране охарактеризовались увеличением числа трансплантаций органов, открытием трех новых центров. На сегодняшний день трансплантация органов выполняется в 19 городах Российской Федерации, в которых функционируют: 33 центра трансплантации почки, 7 центров трансплантации сердца, 10 центров трансплантации печени, 3 центра трансплантации поджелудочной железы. По итогам 1–3 кварталов 2010 г. выполнено 805 трансплантаций почки, 158 трансплантаций печени, 71 трансплантация сердца, 17 трансплантаций поджелудочной железы, что приближается к объемам всего 2009 г. (830 трансплантаций почки, 175 трансплантаций печени, 46 трансплантаций сердца, 8 трансплантаций поджелудочной железы). Таким образом, общее число трансплантаций органов, выполняемых в РФ, увеличивается с хорошей динамикой.

Несмотря на общий низкий уровень донорства в нашей стране (2,7 донора на 1 млн населения), в отдельных регионах уровень донорства сопоставим с таковым в развитых странах, например, Новосибирская область – 16,1 донора на 1 млн населения.

Положительная динамика объемов и качества трансплантологической помощи населению РФ в период 2008–2010 гг. в немалой степени была достигнута благодаря поддержке со стороны Минздравсоцразвития России, обеспечившего увеличение объемов финансирования по профилю «трансплантация», выделяемого в рамках ежегодного государственного задания на оказание высокотехнологичной медицинской помощи гражданам РФ;

адекватному лекарственному обеспечению стационарного лечения (выполнения трансплантаций) и последующему амбулаторному наблюдению пациентов (пожизненная иммуносупрессивная терапия);

разработке и принятию нормативно-правовых актов, регламентирующих организацию трансплантологической помощи:

приказу от 9 октября 2009 г. № 819н «Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи методом трансплантации органов»;

приказу от 2 ноября 2009 г. № 863н/78 «О внесении изменений в приказ Минздравсоцразвития России и РАМН от 25 мая 2007 г. № 357/40 «Об утверждении Перечня органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации, Перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, и Перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека»;

приказу от 5 ноября 2008 г. № 622 «Об Экспертном совете в сфере здравоохранения Минздравсоцразвития России» (создание профильной комиссии по трансплантологии);

организации и поддержке научно-практических мероприятий по вопросам донорства и трансплантации органов и (или) тканей человека;

финансированию ведущих федеральных центров трансплантации на приобретение дорогостоящего медицинского оборудования, обучение специалистов, обновление медико-санитарного автопарка, развитие медицинских информационных и телекоммуникационных технологий, ремонт помещений и др.

Съезд трансплантологов положительно оценивает деятельность в 2008–2010 гг. Общероссийской общественной организации трансплантологов «Российское трансплантологическое общество».

Создание общества позволило консолидировать трансплантологическую общественность и сосредоточить усилия отдельных трансплантологических центров в решении приоритетных задач. В настоящее время в обществе состоит более 400 человек из 51 региона РФ; при организационном участии общества проведено 15 всероссийских и региональных научно-практических мероприятий (конференций).

Данные о работе российских трансплантологических центров, приведенные в сообщениях, показывают, что непосредственные и отдаленные результаты выполняемых клинических трансплантаций органов соответствуют международному уровню и свидетельствуют о высокой квалификации кадров и достаточном технологическом обеспечении.

Несмотря на это, Российская Федерация продолжает оставаться на одном из последних мест в мире по объему оказания трансплантологической помощи, которой охвачена лишь небольшая часть нуждающихся жителей страны. Недоступность трансплантаций большинству нуждающихся в них обусловлена прежде всего критическим дефицитом донорских органов.

Этот дефицит в условиях России определяется устаревшей формой организации посмертного органного донорства. Действия региональных донорских служб сводятся к попыткам установления контактов с администрацией регионов и руководством скоропомощных стационаров. Распоряжения местных органов исполнительной власти в области здравоохранения

ранения, призванные регулировать вопросы органного донорства, носят рекомендательный характер и не подкреплены федеральным законодательством и нормативно-правовыми актами Минздравсоцразвития России (положениями об ответственности руководителей субъектов РФ и главных врачей медицинских организаций за организацию органного донорства). Очевидна необходимость законодательно закрепить эти положения в области организации органного донорства.

Сегодня существует перечень учреждений, осуществляющих трансплантацию органов, и определен порядок их финансирования («федеральные квоты»). Донорство органов является организационно не менее трудной задачей, чем трансплантация органов, однако не имеет целевого федерального финансирования. Организация работ по донорству органов и трансплантация органов являются разными видами профессиональной деятельности, исполняются разными категориями врачей, в разных производственных помещениях и, соответственно, требуют разных источников финансирования.

Если необходимость оплаты государством трансплантаций органов не вызывает сомнения, то проблема адекватного финансирования донорских программ, по сути создания национальной системы донорства, которая имеется в каждой европейской стране, является насущной задачей.

Рост числа трансплантаций отмечается только в регионах и городах, в которых в организацию работ по органному донорству внедрены элементы трансплантационной координации. Это Москва, Московская область, Санкт-Петербург, Новосибирск. В указанных регионах по инициативе местных властей оплачиваются ключевые этапы госпитальной координации, а именно: идентификация (выявление донора), диагностика смерти мозга, оценка донора, ведение донора, аудит летальности, что обеспечивает интенсификацию и расширение спектра трансплантаций. Однако необходима консолидация программ на региональном и национальном уровнях, что отражено в концепции трансплантационной координации как оптимальной формы организации органного донорства, принятой еще IV Всероссийским съездом трансплантологов.

На съезде были рассмотрены вопросы новых подходов к иммуносупрессивной терапии, направленные на улучшение отдаленных результатов трансплантации солидных органов; вопросы профилактики инфекционных осложнений, прежде всего цитомегаловирусной инфекции.

Обозначены показания к назначению ингибиторов пролиферативного сигнала после трансплантации почки. Согласно результатам международных исследований ингибитор пролиферативного сигнала – лекарственный препарат эверолимус – имеет высокий уровень доказательной базы обеспечения эффективной иммуносупрессии в современных режимах минимизации циклоспорина с подтвержденным антипролиферативным и противовирусным эффектом, что создает предпосылки для реального улучшения отдаленных результатов трансплантации.

Развитие клинической трансплантологии немыслимо без дальнейшей разработки и углубленного решения научных проблем, среди которых проблемы преодоления тканевой несовместимости, острого и хронического отторжения трансплантата, разработка объективных критериев для прогнозирования развития отторжения, дифференцирования отторжения и инфекции, выявления факторов риска и предикторов развития хронического отторжения (васкулопатии) трансплантата.

Съезд считает необходимым выделение приоритетных направлений развития экспериментальной и клинической трансплантологии:

1. В сфере организации донорского обеспечения трансплантологической помощи гражданам РФ:

внедрение единой федеральной системы трансплантационной координации, имеющей бюджетное финансирование, главной задачей которой является организация работ по донорству в стационарах регионов, и предоставление донорских органов в трансплантационные центры на основе единого федерального листа ожидания;

расширение донорских критериев в соответствии с международными тенденциями в части использования трупных органов и тканей человека от доноров – носителей маркеров сифилиса.

2. В сфере совершенствования законодательства в области донорства и трансплантации органов и тканей человека:

разработка и принятие нового Федерального закона «О донорстве и трансплантации органов и (или) тканей человека»,

с сохранением в нем презумпции согласия;

закреплением механизма прижизненного волеизъявления лица о согласии (несогласии) на донорство органов и тканей после смерти;

закреплением федеральной системы трансплантационной координации;

урегулированием создания и ведения федеральных регистров доноров и реципиентов органов и тканей человека, федерального листа ожидания трансплантации трупных органов и тканей человека;

указанием отчетности и ответственности администрации скоропомощных стационаров за работы по донорству;

урегулированием порядка и процесса констатации смерти мозга у несовершеннолетних и посмертного донорства от несовершеннолетних (презумпция несогласия);

запретом торговли органами и тканями человека, трансплантационного туризма, рекламы коммерческих сделок с органами и тканями человека для трансплантации, ответственности за совершение указанных действий;

закреплением ограничений на выполнение трупных трансплантаций органов и тканей человека иностранным гражданам, пребывающим на территории РФ;

закреплением понятийного аппарата и принципов трансплантации органов и тканей человека и др.

Разработка и принятие порядка медицинского обследования донора-трупа, включая перечень абсолютных и относительных противопоказаний к посмертному донорству органов и тканей человека.

Разработка и принятие протокола ведения донора-трупа с констатированной смертью мозга (кондиционирование).

Разработка и принятие порядка заготовки трупных донорских органов и тканей человека.

3. В области финансирования трансплантологической помощи населению РФ:

выделение государственного финансирования на специализированную, включая высокотехнологичную, медицинскую помощь, амбулаторно-поликлиническую помощь по профилю «трансплантация» в объеме, достаточном для выполнения федеральных стандартов медицинской помощи, утверждаемых Минздравсоцразвития России;

дальнейшее увеличение объемов федерального финансирования, выделяемого в рамках государственного задания на оказание высокотехнологичной медицинской помощи (количества квот), в соответствии с реальной потребностью населения РФ в трансплантации органов;

выделение целевого федерального финансирования на донорское обеспечение и трансплантационную координацию;

выделение государственного финансирования на модернизацию материально-технической базы ведущих трансплантационных центров страны;

восстановление федерального финансирования программного гемодиализа в центрах гемодиализа федерального подчинения, что позволит увеличить «листы ожидания трансплантации» и оптимизировать селекцию пар «донор – реципиент», а также сделает реальным ожидание трансплантации в федеральных центрах для жителей регионов, в которых отсутствуют собственные центры трансплантации.

4. В сфере научных исследований съезд считает особенно актуальным развивать исследования по биологическим и клиническим аспектам клеточной трансплантации;

разработке вопросов иммунной толерантности на основе клеточных технологий и высокоспецифичных биомаркеров и биоагентов;

активизировать работы по созданию отечественного искусственного сердца, искусственных и биогибридных органов и систем.

На фоне дефицита донорских органов важно развивать исследования в области применения перфузионных систем в трансплантологии и их внедрение в практику органного донорства.

Съезд поддерживает инициативу организации первого многоцентрового национального научного проекта «Биомаркеры в прогнозировании отдаленных результатов трансплантации сердца» и призывает трансплантологические центры к консолидации и участию в этой работе.

5. Съезд считает приоритетной задачей формирование позитивного имиджа, укрепление авторитета российской науки и отечественных ученых в мировом научном сообществе;

считать целесообразным одобрить и развивать практику проведения совместных мероприятий Российского трансплантологического общества с международными профессиональными ассоциациями и обществами – Всемирным трансплантационным обществом (TTS), Европейским обществом трансплантации органов (ESOT) и др.;

поддерживать представление работ российских ученых на международных конгрессах и конференциях, стимулировать публикации работ российских ученых в авторитетных международных изданиях;

развивать традиции проведения Шумаковских чтений как всероссийского научно-практического мероприятия.

6. В сфере профессионального образования считать целесообразным:

поддерживать создание и функционирование кафедр трансплантологии в медицинских вузах и преподавание курса «Клиническая трансплантология и искусственные органы» на старших курсах медицинских институтов;

поддерживать создание и деятельность кафедр и курсов по преподаванию основ биотехнических систем, искусственных и биогибридных систем и органов студентам старших курсов технических университетов;

расширить практику последипломной подготовки специалистов из регионов на базе ведущих научно-практических учреждений и трансплантологических центров РФ.

7. В области подготовки научных кадров:

рекомендовать руководителям научно-практических учреждений, руководителям диссертационных советов по профилю «Трансплантология и искусственные органы» усилить контроль за качеством и сроками выполнения научно-квалификационных (диссертационных) работ и дальнейшим трудоустройством подготовленных специалистов и научных работников;

считать целесообразным полнее отражать деятельность диссертационных советов по профилю «Трансплантология и искусственные органы» в специализированном журнале «Вестник трансплантологии и искусственных органов».

8. В области подготовки молодых специалистов:

продолжить практику направления перспективных молодых специалистов на обучение и стажировку в ведущие зарубежные трансплантологические центры, используя возможности административных и общественных организаций РФ и образовательные программы международных трансплантологических обществ;

с целью адаптации молодых специалистов, повышения их статуса и закрепления в трудовых коллективах поддержать работу по формированию и развитию Советов молодых ученых и специалистов, активизировать вы-

движение кандидатов в районные, городские Советы молодых ученых и специалистов.

9. Развитие отечественной клинической трансплантологии, достигнутые успехи в длительном выживании и реабилитации пациентов с трансплантированными органами требует совершенствования подготовки медицинских специалистов не только в области донорства и трансплантации органов и тканей человека, но и в смежных областях. В целях скорейшего внедрения высокотехнологичной трансплантационной помощи в реальный сектор здравоохранения:

поддержать и ускорить разработку и реализацию совместно с ведущими медицинскими университетами РФ программ последипломного образования (повышения квалификации) врачей различных специальностей – терапевтов, кардиологов и др., – по выявлению и ведению больных, нуждающихся в высокотехнологичной трансплантологической помощи, и реципиентов трансплантированных органов. Считать особенно важным включение образовательной информации в курсы подготовки врачей-педиатров;

ввести в программу последипломного обучения на кафедрах анестезиологии и реаниматологии преподавания критерии диагностики смерти мозга и принципы ведения потенциальных доноров, находящихся в состоянии смерти мозга.

10. В сфере научно-информационной и образовательной деятельности съезд рекомендует продолжить работу по созданию и выпуску научной, научно-методической и научно-информационной литературы по проблеме трансплантологии и искусственных органов.

11. В сфере идеологической, просветительской и информационной политики съезд поддерживает:

организацию и проведение информационно-просветительских программ в средствах массовой информации;

взаимодействие с представителями основных религиозных конфессий;

повышение прозрачности, регламентацию работы различных служб в области донорства и трансплантации органов, тканей человека.

Участники съезда выступают:

за включение в список жизненно необходимых лекарственных средств ингибиторов пролиферативного сигнала, необходимых для удлинения срока функционирования трансплантированных органов путем предупреждения их хронического фиброза, обусловленного длительным действием ингибиторов кальциневрина, а также для применения у реципиентов с онкологическими осложнениями;

за внедрение в клиническую практику общей профилактики цитомегаловирусной инфекции у реципиентов донорских органов.

Делегаты съезда выражают уверенность, что при реализации вышеуказанных предложений клиническая трансплантология в РФ способна в течение короткого отрезка времени добиться новых высот, обеспечить

население РФ качественной и доступной трансплантологической помощью.

Принято на пленарном заседании V Всероссийского съезда трансплантологов.

10 октября 2010 года

Большой конференц-зал

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

**II. РАЗВИТИЕ ОРГАННОГО
ДОНОРСТВА И ТРАНСПЛАНТАЦИИ
В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
В 2006–2010 гг.**

РАЗВИТИЕ ОРГАННОГО ДОНОРСТВА И ТРАНСПЛАНТАЦИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006–2010 гг.

Начиная с 2006 года отмечаются устойчивые положительные тенденции к увеличению абсолютного числа эффективных трупных доноров в большинстве регионов России и в стране в целом, к возрастанию частоты постановки диагноза смерти мозга у доноров. Эти тенденции наблюдались и в 2010 году.

2010 год характеризовался максимальным ростом абсолютных значений показателей донорской и трансплантационной активности (табл. 1).

Таблица 1

Донорство и трансплантация органов в России в 2010 году

Показатель	Количество	Количество на млн населения РФ
<i>Донорство</i>		
Трупные доноры	487	3,4
Живые родственные доноры	256	1,8
<i>Трансплантация органов</i>		
Почка, в т. ч. трупная от живого донора	1037 867 170	7,3
Печень, в т. ч. трупная от живого донора	209 121 88	1,5
Сердце	97	0,7
Поджелудочная железа	19	0,1
Легкие	1	
Всего пересажено органов	1363	9,6

На 31 декабря 2010 года в стране функционировали 35 центров трансплантации органов, из которых: трансплантация почки осуществлялась в 31, трансплантация сердца – в 7, трансплантация печени – в 11, трансплантация поджелудочной железы – в 3 (табл. 2).

Таблица 2

Трансплантационная активность центров РФ в 2010 году

№	Название трансплантационного центра	Число трансплантаций органов							Всего пересажено органов
		почка	печень	сердце	Полужелудочная железа	легкие			
1	2	3	4	5	6	7	8		
Центральный федеральный округ									
1	ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И.Шумакова» (ФНЦТИО), Москва	117 – трупная – 68 – родственная – 49	91 – трупная – 24 (в т. ч. 1 разделенный трансплантат для 2 реципиентов) – родственная – 67 (правая доля – 15; левый латеральный сектор – 52)	38	8		254 почка + подж. железа – 7 печень + почка – 2 печень + подж. железа – 1 сердце + почка – 1		
2	У РАМН «Российский научный центр хирургии» (РНЦХ), Москва	54	22 – трупная – 3 – родственная – 19 (правая доля – 7, левая доля – 1, левый латеральный сектор – 11)		5		81 почка + подж. железа – 5		
3	ФГУ «Российская детская клиническая больница» (РДКБ), Москва	37 (трупные)					37		

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
4	ФГУ «Научно-исследовательский институт урологии» (НИИ урологии), Москва	30 – трупная – 11 – родственная – 19					30
5	ФГУ «Гематологический научный центр РАМН» (ГНЦ), Москва	14 (трупные)					14
6	У РАМН «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» (НЦССХ), Москва			11			11
7	Клиническая больница № 119 ФМБА России (КБ № 119), Москва	16 (трупные)					16
8	ГУ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (МОНИКИ), Москва	65 (трупные)					65
9	ГУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» (НИИСП), Москва	91 – трупная – 90 – родственная – 1	37 (трупные)	7	6		141 почка + подж. железа – 5
10	ГУЗ «Городская клиническая больница № 7», Московский городской центр трансплантации почки (ГКБ № 7), Москва	82 (трупные)					82
11	ФГУЗ «Федеральный медико-биологический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России» (ФМБЦ им. А.И. Бурназяна), Москва		2 родственные – правая доля				2
12	Центр трансплантации печени и почки ГУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святого Иоасафа» (ОКБ), Белгород	10 (трупные)	4 (трупные)				14

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
Северо-западный федеральный округ							
13	ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» (РНЦРХТ), Санкт-Петербург		21 (группные)				21
14	ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» (ГМУ), Санкт-Петербург	13 – трупная – 10 – родственная – 3					13
16	ФГУ «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» (ФЦСКиЭ), Санкт-Петербург			4			4
15	ГУ «Санкт-Петербургский НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе» (НИИСП), Санкт-Петербург	64 (группные)	1 (группная)				65
17	Городской центр трансплантации органов и тканей на базе ГУЗ «Городская клиническая больница № 31» (ГКБ № 31), Санкт-Петербург	10 (группные)					10
18	ГУЗ «Ленинградская областная клиническая больница» (ЛОКБ), Санкт-Петербург	16					16
Приволжский федеральный округ							
19	ГУЗ «Республиканская клиническая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан» (РКБ Татарстан), Казань	31 – трупная – 24 – родственная – 7					31
20	ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России» (ПОМЦ), Н. Новгород	37 – трупная – 20 – родственная – 17	6 (группные)				43

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
21	Самарский центр трансплантации органов и тканей, клиника ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» (ГМУ), Самара	40 (трупные)					40
22	Клиническая больница № 3 ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет» (ГМУ), Саратов	8 (родственные)					8
23	ГУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова» Минздрава Республики Башкортостан (РКБ), Уфа	18 – трупная – 4 – родственная – 14					18
24	ГУЗ «Республиканская детская клиническая больница Республики Башкортостан» (РДКБ), Уфа	2 (родственные)					2
25	МУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1» (ГКБ № 1), Оренбург	1 (родственная)					1
Южный федеральный округ							
26	ГУЗ «Волгоградский областной уронефрологический центр» (УНЦ), Волжский	35 – трупная – 30 – родственная – 5					35
27	ГУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.В. Очаповского» департамента здравоохранения Краснодарского края (ККБ № 1), Краснодар	42 (трупные)	12 (трупные)	28		1	83
Уральский федеральный округ							
28	ГУЗ «Свердловская областная клиническая больница № 1» (ОКБ), Екатеринбург	28 – трупная – 27 – родственная – 1	12 (трупные)	4			44

Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
29	ГУЗ «Челябинская областная клиническая больница» (ОКБ), Челябинск	15 – трупная – 12 – родственная – 3					15
Сибирский федеральный округ							
30	ФГУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. академика Е.Н. Мешалкина» (НИИПК), Новосибирск	25 (трупные)		5			30
31	ОГУЗ «Государственная новосибирская областная клиническая больница» (ОКБ), Новосибирск	41 (трупные)	1 (трупная)				42
32	ГУЗ «Кемеровская областная клиническая больница» (ОКБ Кемерово)	35 – трупная – 34 – родственная – 1					35
33	Омский областной центр трансплантации органов МУЗ «Омская городская клиническая больница № 1 им. А.Н. Кабанова» (ГКБ № 1), Омск	36 (трупные)					36
34	ГУЗ «Иркутская областная клиническая больница» (ОКБ), Иркутск	17 – трупная – 16 – родственная – 1					17
Дальневосточный федеральный округ							
35	Республиканская больница № 1 – «Национальный центр медицины» Минздрава Республики Саха (НМЦ), Якутск	7 (родственные)					7
ИТОГО		1037	209	97	19	1	1363
Данные 2009 года		830	175	46	8	1	1063

ОРГАНОЕ ДОНОРСТВО

На сегодняшний день в России по-прежнему отсутствует единая национальная система организации посмертного органного донорства, не определен порядок функционирования учреждений здравоохранения, в которых осуществляются работы по заготовке донорских органов. Задача обеспечения деятельности центров трансплантации решается ими самостоятельно, и только в Москве, Санкт-Петербурге и Новосибирске – независимыми центрами координации органного донорства. В табл. 3 представлены данные о донорской активности в функционирующих регионах.

Таблица 3

Посмертное донорство органов (число эффективных доноров) в регионах РФ в 2006–2010 гг.

Регионы	2006	2007	2008	2009	2010	Динамика 2006–2010 гг.
Москва	87	126	135	136	151	73,6%
Московская область	24	45	59	52	71	195,8%
Санкт-Петербург	30	45	47	47	41	36,7%
Краснодар	0	0	0	3	3	9
Новосибирск	17	11	18	29	35	105,9%
Кемерово	16	13	18	18	22	37,5%
Самара	4	17	24	18	20	400%
Омск	10	15	13	19	19	90%
Волгоград	5	0	11	15	16	220%
Екатеринбург	14	13	12	13	14	0
Ленинградская область	12	8	11	11	13	8,3%
Республика Татарстан	0	3	1	3	1	2 300%
Нижний Новгород	0	0	0	7	11	5 7
Иркутск	0	0	4	6	1	0 150%
Челябинск	0	0	0	0	6	
Белгород	0	2	3	2	5	150%
Республика Башкортостан	0	0	0	0	2	
Воронеж	6	2	8	2	0	
Всего	225	300	364	381	487	116,4%

%

За анализируемый период организованы новые донорские программы в 8 регионах (Самарская область, Белгородская область, Республика Татарстан, Иркутская область, Нижегородская область, Краснодарский край, Челябинская область, Республика Башкортостан). Примечательно, что при организации этих программ изначально был взят курс на преимущественное использование доноров с констатированной смертью мозга и выполнение мультиорганного изъятия в соответствии с потребностями вновь созданных центров трансплантации.

После значительной интенсификации работы в области посмертного органного донорства в период 2006–2008 гг. 2009 год характеризовался стабилизацией как по большинству регионов, так и стране в целом. В 2010 г. показатель количества трупных доноров на 1 млн населения широко варьируется по регионам от 0,5 (Республика Башкортостан) до 13,7 (г. Москва, Московский координационный центр органного донорства), составляя в среднем по стране 3,4 (рис. 1).



Рис. 1. Количество доноров на 1 млн населения в регионах в 2010 году (ДСМ – доноры со смертью мозга, АСД – асистолические доноры). Донорские программы функционируют в 17 регионах РФ с населением 62,9 млн человек (44,3% населения России)

Прирост абсолютного числа эффективных доноров по отдельным регионам составил от 0 до 400%, а общее количество увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с 2006 г. В 2010 г. существенное увеличение количества эффективных доноров произошло преимущественно в результате деятельности новых региональных программ. Таким образом, к настоящему моменту функционирует 18 региональных программ посмертного донорства, активность которых широко варьируется при оценке по показателю количества доноров на 1 млн населения. Рубеж 10,0 эффективных доноров на 1 млн населения преодолен только в Москве, Новосибирске и Московской области. Этот показатель, очевидно, должен стать целевым для всех действующих программ.

Распределение донорской активности по федеральным округам РФ приведено на рис. 2.



Рис. 2. Число эффективных доноров на 1 млн населения федеральных округов РФ

Достижением последних 5 лет стало расширение практики констатации смерти мозга у потенциальных доноров и, соответственно, увеличение доли доноров со смертью мозга (ДСМ) с 42% в 2006 году до 58% в 2010 году (рис. 3). При этом доля мультиорганных доноров достигла в 2010 году 36%. По регионам в 2010 году этот показатель варьируется от 9,1 до 100%. Исходя из опыта работы крупных региональных донорских программ, обеспечивающих трансплантации как почки, так и других органов, он должен составлять не менее 50%, а в идеале – 60–80%. Не вызывает сомнения, что асистолические доноры должны рассматриваться с разумным ограничением, только как дополнительный источник донорских почек.

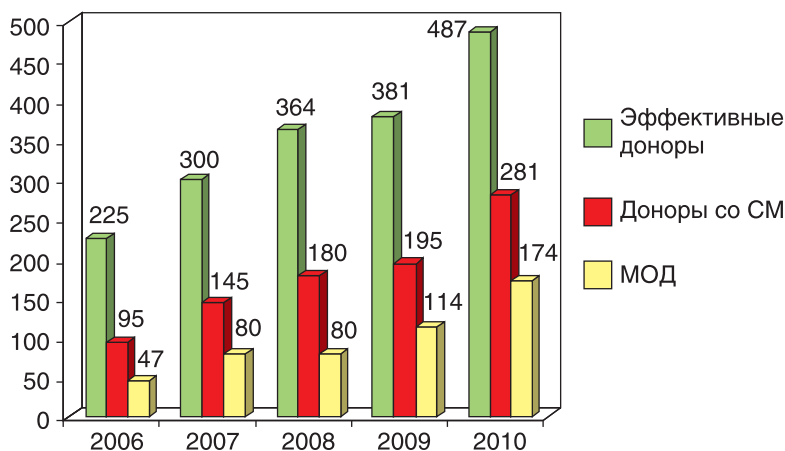


Рис. 3. Качественные изменения в структуре посмертного донорства (СМ – смерть мозга, МОД – мультиорганный донор)

Анализ эффективности работы донорских служб по выполнению мультиорганного изъятия для получения экстраренальных трансплантатов выявил возрастание доли мультиорганного изъятия с 21% в 2006 г. до 36% в 2010 г. Наиболее эффективно доноры со смертью мозга используются там, где функционируют программы трансплантации экстраренальных органов и показатель количества органов, пересаженных от одного донора, достигает 3,4 (донорская программа ФГУ ФНЦТиИО им. академика В.И. Шумакова на территории Московской области). Примером современного подхода к использованию ресурсов посмертного донорства может стать первый год работы донорской и трансплантационной программ на базе Краснодарской краевой клинической больницы № 1 им. С.В. Очаповского.

2010 год характеризовался стабильным уровнем прижизненного донорства (рис. 4).

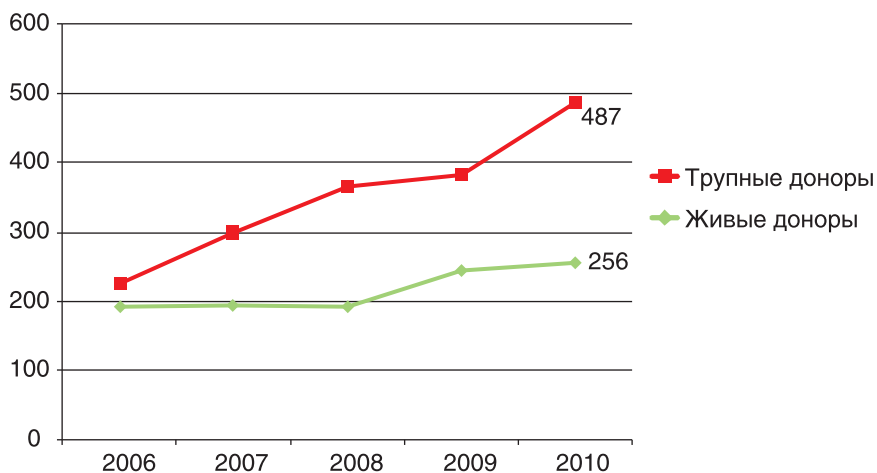


Рис. 4. Прижизненное и посмертное донорство органов в России в 2010 году (n = 743)

При этом необходимо отметить, что если операции по трансплантации фрагментов печени от живых родственных доноров на сегодняшний день фактически являются прерогативой двух центров, реализующих эту технологию, то возможности центров трансплантации почки в развитии прижизненного донорства реализуются в ряде регионов далеко не полностью.

Трансплантация почки

Актуализированные данные по трансплантации почки на 31 декабря 2010 года приведены на рис. 5.

При сохранении тенденции к постоянному росту начиная с 2006 года в 2010 году впервые количество трансплантаций почки превысило 1000, составив 7,3% на 1 млн населения. Приходится констатировать, что доля

трансплантаций от живых родственных доноров имеет тенденцию к относительному снижению и составляет 16,4%, тогда как в 2006 году она составляла 25%, что говорит о недостаточном использовании этого ресурса.

Для информации приводим статистические данные об обеспеченности трансплантацией почки населения по федеральным округам РФ (рис. 6). При этом нужно учитывать, что значение обеспеченности трансплантаци-

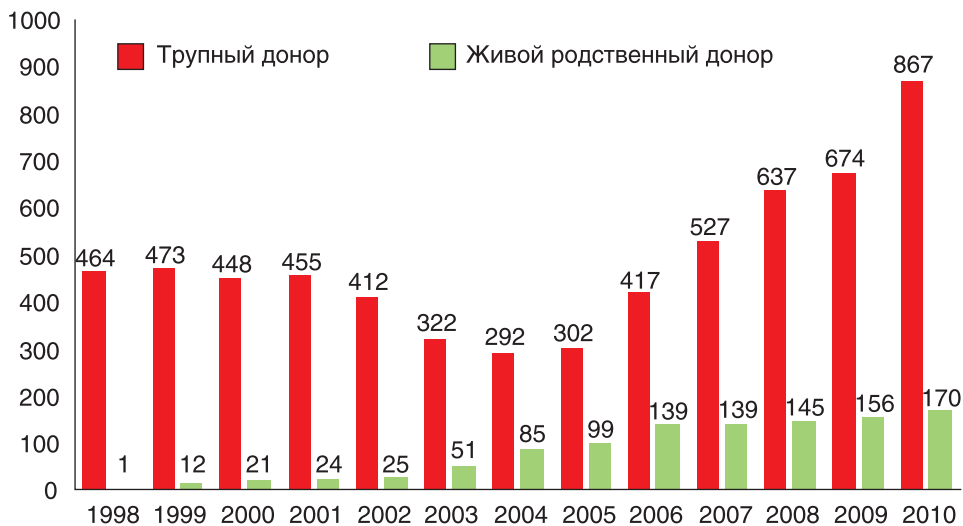


Рис. 5. Трансплантация почки в РФ в период 1998–2010 гг.



Рис. 6. Обеспеченность трансплантацией почки населения федеральных округов РФ (число трансплантаций почки на млн населения федерального округа)

ей почки жителей Центрального федерального округа не является объективным, так как включает в себя значительное число трансплантаций, выполненных больным из других федеральных округов.

Активность центров трансплантации широко варьируется: от 1 до 117 операций в год что в первую очередь определяется различным уровнем донорского обеспечения (рис. 7). Только 16 из 31 центра выполняют 30 и более операций в год. Годовой объем работы не менее 30 операций в год должен в ближайшей перспективе стать минимальным порогом, определяющим не только количество операций, но и их результативность. Достижение этого показателя во всех центрах вполне реально при сочетании практики посмертного и прижизненного донорства.

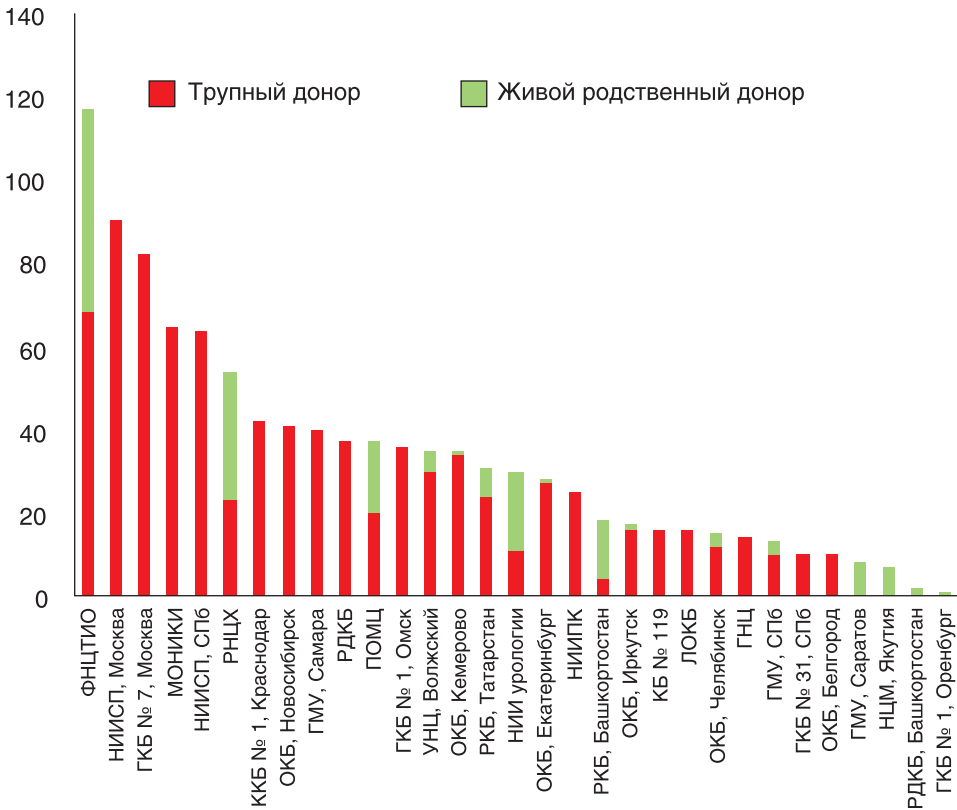


Рис. 7. Активность центров трансплантации почки в 2010 году (количество операций)

Трансплантация экстраренальных органов

В период с 2006 по 2010 гг. благодаря развитию донорских программ и организации новых центров трансплантации произошел значительный рывок в трансплантации сердца, печени, поджелудочной железы (рис. 8).

Данные по отдельным органам, годам и центрам представлены на рис. 9–11.

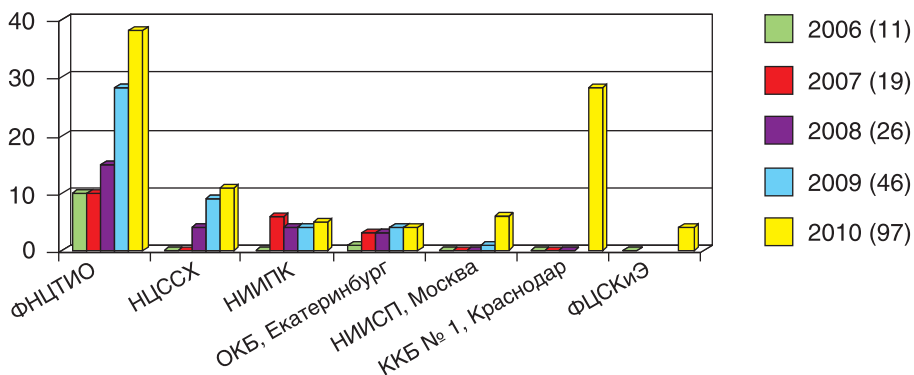


Рис. 8. Динамика числа экстрауренальных трансплантаций в период 2006–2010 гг.

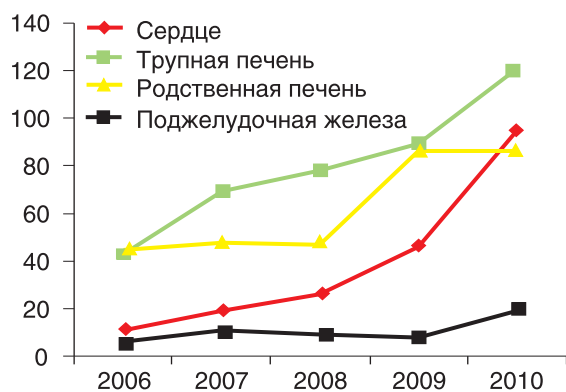


Рис. 9. Трансплантация органов в 2006–2010 гг.

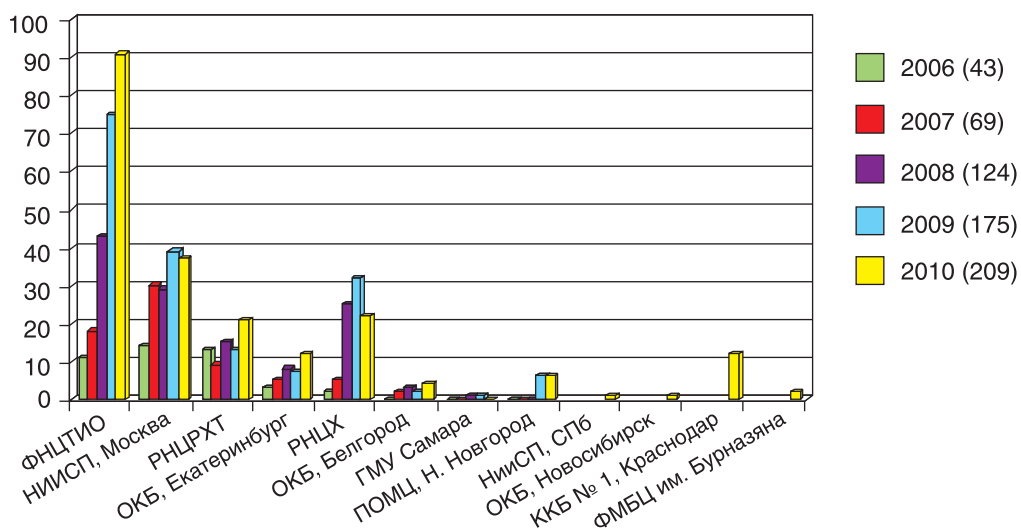


Рис. 10. Трансплантация печени в 2006–2010 гг.

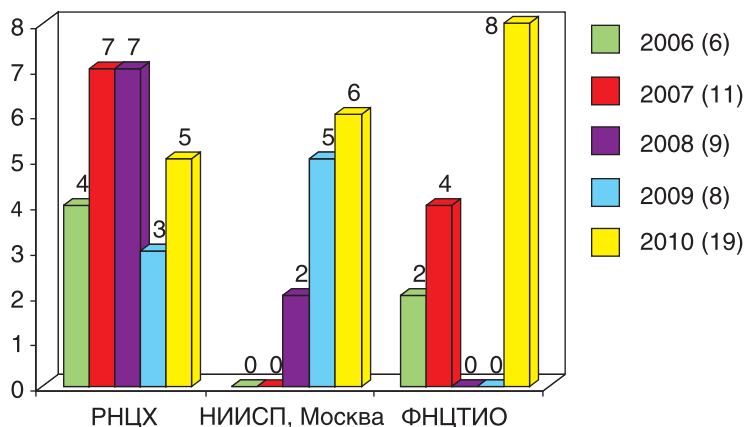


Рис. 11. Трансплантация поджелудочной железы в 2006–2010 гг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В табл. 4 представлены положительные тенденции развития отечественной трансплантологии по итогам последних 5 лет, прошедших после выхода из кризиса. Основным итогом следует назвать двукратное увеличение количества трансплантаций различных органов, которое, конечно же, не удовлетворяет существующие потребности.

Таблица 4

Трансплантация органов в России. Динамика за 2006–2010 гг.

Орган	2006	2007	2008	2009	2010
Почка, в т. ч. от живого родственного донора (%)	556 25,0	666 20,9	782 18,5	830 18,8	1037 (186,5%) 16,4
Печень, в т. ч. от живого родственного донора (%)	88 51,1	117 41,0	125 37,6	175 49,1	209 (237,5%) 41,5
Сердце	11	19	26	46	97 (881,8%)
Легкие	1	–	–	1	1
Поджелудочная железа	6	11	9	8	19 (316,7%)
Всего	669	820	942	1063	1363 (203,7%)

Что необходимо сделать для сохранения указанных тенденций?

Условия перспективного развития:

- совершенствование законодательства в области органного донорства;
- проведение последовательной государственной политики по развитию органного донорства в субъектах Российской Федерации, направленной

на обеспечение населения региона трансплантацией почки, а затем и других органов;

- участие учреждений здравоохранения, независимо от их административного подчинения, местных и региональных органов управления здравоохранением в программах посмертного донорства органов;
- целевое государственное финансирование учреждений здравоохранения, участвующих в обеспечении центров трансплантации донорскими органами;
- создание и модернизация инфраструктуры регионального донорства, деятельность которой должна быть направлена на максимальное расширение донорского пула (увеличение количества донорских баз) и интенсивное его использование (расширение практики констатации смерти мозга и выполнение мультиорганных эксплантаций);
- развитие существующих региональных трансплантационных центров, в том числе освоение пересадки различных органов;
- формирование положительного общественного мнения о донорстве и трансплантологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Ибрагимова О.С.* Тенденции развития органного донорства и трансплантации в Российской Федерации в 2006–2008 гг. Сообщение I (по данным регистра Российского трансплантологического общества) // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т. XI. – № 3. – С. 8–17.
2. *Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Ибрагимова О.С.* Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2009 году. II сообщение регистра Российского трансплантологического общества // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 3. – С. 6–15.
3. *Manyalich M., Nanni Costa A., Paez G.* IRODat 2008 International donation and transplantation activity // *Organs, tissues & cells (The Journal of European Transplant Coordinators Organization)*. – 2009. – Vol. 12. – № 2. – P. 85–89.
4. *Van Gelder F., Manyalich M., Nanni Costa A., Paez G.* 2009 International donation and transplantation activity. IRODAT // *Organs, tissues & cells (The Journal of European Transplant Coordinators Organization)*. – 2010. – Vol. 13. – № 2. – P. 77–80.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО КОМПЛЕКСНОЙ ПРОБЛЕМЕ «ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ»*

На основании ретроспективного анализа отдаленной выживаемости реципиентов после трансплантации сердца выявлено, что васкулопатия трансплантата является наиболее важным и достоверным предиктором риска, а наличие диффузного характера поражения коронарных сосудов – неблагоприятным фактором прогноза. Проведение чрескожного коронарного вмешательства у больных с типом поражения А достоверно улучшает актуальную выживаемость. На основании изучения у 74 реципиентов сердца биомаркеров, отражающих активность процессов неоартериогенеза и воспаления, установлено, что величина уровня плацентарного фактора роста (PIGF) определяет риск, степень тяжести и распространенность стенотического поражения коронарного русла трансплантированного сердца. Разработан метод прогнозирования риска васкулопатии сердечного трансплантата у больных сердечной недостаточностью на этапе дооперационного обследования (*д. м. н., профессор Казаков Э.Н.; д. м. н. Захаревич В.М.; к. м. н. Кормер А.Я.; д. м. н., профессор Шевченко О.П.; д. м. н. Орлова О.В.; д. м. н. Олефиренко Г.А.; д. м. н., профессор Честухин В.В.; д. м. н., профессор Миронков Б.Л.*).

На основании иммуногистохимических исследований материала 140 эндомикардиальных биопсий 37 реципиентов сердца установлено, что помимо известных признаков острого и хронического гуморального отторжения существует лимфогенный путь распространения аллоантител, что сопровождается фиксацией иммуноглобулинов и комплемента в стенках капилляров эндокарда и субэндокардиальной зоны миокарда. Разработка комплекса морфологических и иммуногистохимических признаков гуморального отторжения пересаженного сердца, уточнение их диагностических особенностей в разные периоды после операции и макромолекулярного состояния миокарда длительно функционирующего трансплантата сердца позволит оптимизировать подходы к профилактике и лечению его отторжения (*д. м. н., профессор Белецкая Л.В.; к. м. н. Куприянова А.Г.*).

На основании биохимических, иммунологических исследований и анализа результатов 62 операций трансплантации печени детям раннего возраста с врожденными и наследственным заболеваниями желчевыводящих путей выявлены прогностические лабораторные маркеры течения пост-

* По материалам отчета, направленного в РАН, по итогам 2010 г.

трансплантационного периода. У реципиентов с дисфункцией трансплантата уровни неоптерина и sCD30 повышаются за 3–5 суток до появления клинико-лабораторных признаков дисфункции трансплантата, а повышенный уровень sCD40L выявляется на этапе дооперационного обследования (*член-корр. РАМН, д. м. н., профессор Готье С.В.; д. м. н., профессор Циркульникова О.М.; к. м. н. Аммосов А.А.; д. м. н., профессор Шевченко О.П.*).

Отработана модель хронической печеночной недостаточности у животных в эксперименте, методика иммобилизации клеточного материала на биodeградируемый и биосовместимый трехмерный или гетерогенный матрицы. Показана возможность коррекции печеночной недостаточности методом клеточных технологий.

Показано, что изолированные гепатоциты, иммобилизованные на гетерогенном биodeградируемом матрице, *in vivo* остаются жизнеспособными длительное время. Выявлена возможность восстановления поврежденного органа за счет нормализации и восстановления архитектоники печени, снижения дистрофии клеток печени (*член-корр. РАМН, д. м. н., профессор Готье С.В.; к. м. н. Шагидулин М.Ю.; д. м. н., профессор Онищенко Н.А.*).

На основании изучения эффективности различных иммуносупрессантов у реципиентов почки установлено, что выбор ингибитора кальцинейрина в качестве базового препарата иммуносупрессии не оказывает влияния на ближайшие и отдаленные результаты трансплантации почек. Разработаны варианты коррекции иммуносупрессии (конверсии с циклоспорина на такролимус и ингибиторы пролиферативного сигнала) у пациентов с отторжением (острым и хроническим) и нефротоксичностью, вызванной ингибиторами кальцинейрина (*д. м. н., профессор Мойсюк Я.Г.; д. м. н., профессор Томилина Н.А.; д. м. н. Шаршаткин А.А.; д. м. н.. Столяревич Е.С.; к. м. н. Милосердов И.А.; к. м. н. Ким И.Г.*).

На основании разработки и изучения результатов выполненных 57 мануально-ассистированных лапароскопических (гибридных) нефрэктомий у родственных доноров почки доказана эффективность новой методики по сравнению с открытой методикой выполнения нефрэктомии: меньшая частота урологических осложнений, меньшая травматичность (*д. м. н., профессор Мойсюк Я.Г.; д. м. н., профессор Галлямов Э.А.; Ефимкин А.С.*).

В многофакторной модели показано, что гомозиготность донора аллотрансплантата по мутантному аллелю гена ингибитора активатора плазминогена PAI-1 оказывает достоверное негативное влияние на выживаемость аллотрансплантата трупной почки в раннем (в течение первого года) послеоперационном периоде (*к. м. н. Абрамов В.Ю.*).

На разработанной экспериментальной модели аутоиммунного сахарного диабета I типа выявлены условия корригирующего действия аутологических культивированных клеток костного мозга на клинические, биохимические и морфологические признаки сахарного диабета I типа. Установлено, что выраженная коррекция метаболических нарушений наступает при многократной трансплантации клеток костного мозга на начальной стадии за-

болевания и происходит на фоне восстановления иммунного баланса в организме за счет активации процессов центральной и периферической иммунной толерантности (д. м. н., профессор *Онищенко Н.А.*; *Великий Д.А.*).

С использованием методов биоинженерии получена панель биодegradуемых материалов: трехмерные матриксы, пленки, трубки, микроносители для клеток, микро- и наноконтейнеры для биологически активных веществ. При изучении биосовместимости материалов показано, что через месяц после подкожной имплантации трехмерных матриксов экспериментальным животным в структуре имплантата отсутствуют реакции отторжения, но наблюдаются признаки интенсивной неоваскуляризации и нейрогенеза (д. б. н., профессор *Агапов И.И.*; к. б. н. *Мойсенович М.М.*; к. б. н. *Богуш В.Г.*; д. б. н., профессор *Севастьянов В.И.*; член-корр. РАН *Дебабов В.Г.*; академик РАН, д. б. н., профессор *Кирпичников М.П.*).

Разработаны новые физические методы изготовления трехмерных биодegradуемых матриксов заданной геометрии для восстановительной и заместительной хирургии с использованием технологий биопечати, электроспиннинга и гель-сублимационной сушки. Получены высокопористые матриксы на основе коллагена и полиоксибутирата с различной удельной поверхностью и топографией (к. ф.-м. н. *Ефимов А.Е.*; д. х. н. *Василец В.Н.*; д. б. н., профессор *Севастьянов В.И.*).

На основе опыта разработки аппаратов вспомогательного кровообращения и искусственного сердца выполнены начальные этапы создания отечественного имплантируемого осевого насоса крови. По результатам испытаний насосных и энергетических характеристик показано адекватное обеспечение осевым насосом крови объемного расхода в широком диапазоне изменения постнагрузки при низких значениях потребляемой электрической мощности, позволяющей длительно функционировать в автономном режиме. Определены требования к конфигурации и рабочим параметрам катушек системы беспроводной передачи электроэнергии для имплантируемых аппаратов вспомогательного кровообращения. По результатам экспериментальных исследований макетных образцов системы чрезкожной передачи энергии показана эффективность и стабильность передачи электроэнергии при соотношении диаметров передающей и принимающей катушек 1,4 раза на рабочих частотах 130–150 кГц (д. б. н., профессор *Иткин Г.П.*; к. б. н. *Е.Н. Коньшева.*).

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ

1. *Василец В.Н., Заитов Л.М., Милентьев А.Ю., Недосеев С.Л., Шварцкопф П.В., Егорова В.А., Севастьянов В.И.* Создание и биологические испытания новых матриксов из биорезорбируемых материалов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 2. – С. 67–73.
2. *Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Поздняков О.М.* Коррекция аутоиммунных механизмов развития сахарного

- диабета 1-го типа методами клеточной терапии // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 9. – С. 34–42.
3. *Готье С.В., Луцевич О.Э., Мойсюк Я.Г., Галямов Э.А., Панченков Д.Н., Ефимкин А.С., Баранов А.В.* Лапароскопическая мануально-ассистированная донорская нефрэктомия. Первый российский опыт // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 1. – С. 56–60.
 4. *Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Ибрагимова О.С.* Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2009 году. II сообщение регистра Российского трансплантологического общества // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 3. – С. 6–15.
 5. *Данилов А.А., Иткин Г.П., Селищев С.В.* Развитие методов чрескожного беспроводного энергообеспечения имплантируемых систем вспомогательного кровообращения // Медицинская техника. – 2010. – № 4. – С. 6–11.
 6. *Ким И.Г., Столяревич Е.С., Ведерникова Р.Н., Томилина Н.А.* Опыт применения микофенолата натрия при трансплантации почки // Нефрология и диализ. – 2010. – № 2. – С. 106–110.
 7. *Коньшева Е.Г., Иткин Г.П., Дозоров К.Н., Кудинов В.Л., Шумаков Д.В.* Исследование взаимодействия имплантируемого роторного насоса и левого желудочка сердца на имитаторе системы кровообращения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 3. – С. 94–100.
 8. *Орлова О.В.* Неоптерин у больных сердечной недостаточностью и реципиентов сердца // Вестник РГМУ. – 2010. – № 1. – С. 20–27.
 9. *Попцов В.Н., Мойсюк Я.Г., Ухренков С.Г., Морозюк Е.В., Воронина О.В., Кузьмина Н.А., Лотышев А.А., Мошков А.С., Софронов Я.К., Воронина И.В., Пчельников В.В.* Неотложные состояния при трансплантации печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 2. – С. 10–13.
 10. *Рядовой И.Г., Томилина Н.А., Честухин В.В., Ким И.Г., Миронков А.Б.* К вопросу о безопасности использования рентгеноконтрастных веществ при проведении коронарной ангиопластики у реципиентов почечного трансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 2. – С. 43–47.
 11. *Трансплантология 2009: итоги и перспективы; под ред. Готье С.В.* – Вып. I. – Тверь: Издательство «Триада», 2010. – 408 с.
 12. *Халилулин Т.А., Орлова О.В., Миронков Б.Л., Честухин В.В., Казаков Э.Н., Кормер А.Я., Шевченко О.П.* Метаболические и аутоиммунные факторы риска поражения коронарного русла у реципиентов сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 1. – С. 17–20.
 13. *Шагидулин М.Ю., Онищенко Н.А., Люндуп А.В., Крашенинников М.Е., Деев Р.В., Ливак Д.Н., Ильинский И.М., Можсейко Н.П., Севастьянов В.И., Немец Е.А., Шмерко Н.П., Андриянова А.А., Готье С.В.* Биоискусственная печень как вспомогательная поддержка поврежденной печени перед ее трансплантацией // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 2. – С. 30–32.
 14. *Шевченко О.П., Олещенко Г.А., Орлова О.В.* Пути участия вирусной инфекции в патогенезе васкулопатии трансплантированного сердца. Инфекции

- в трансплантологии / Под ред. Готье С.В. – Тверь: Издательство «Триада», 2010. – С. 247–280.
15. *Шемакин С.Ю., Кормер А.Я., Халилулин Т.А., Честухин В.В., Ильинский И.М., Куприянова А.Г.* Особенности клинических проявлений острой реакции отторжения пересаженного сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII. – № 1. – С. 7–16.
 16. *Шкалова Л.В., Минина М.Г., Можейко Н.П., Ильинский И.М., Мойсюк Я.Г., Цирульников О.М., Готье С.В.* Морфология ишемического повреждения аллотрансплантированной печени по данным исследования пункционных биоптатов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 3. – С. 16–23.
 17. *Antonenko Y.N., Perevoshchikova I.V., Davydova L.I., Agapov I.I., Bogush V.G.* Interaction of recombinant analogs of spider silk proteins 1F9 and 2E12 with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – 1798 (6). – P. 1172–1178.
 18. *Gautier S.V., Tsirulnikova O.M., Ammosov A.A., Gichkun O.E., Pitshulina M.E., Kuncевич N.V., Shevchenko O.P.* Pediatric living donors liver transplantation: soluble CD40 ligand as an early predictor of graft dysfunction // *Transplantation.* – 2010. – Vol. 90. – P. 853.
 19. *Moisenovich M., Pustovalova O., Arhipova A., Vasiljeva T., Sokolova O., Bogush V., Debabov V., Sevastianov V., Kirpichnikov M., Agapov I.* In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spidroin 1 scaffolds // *Journal of Biomedical Materials Research.* – Part 2. – Vol. 96A. – P. 125–131.
 20. *Pashkovskaya A., Kotova E., Zorlu Y., Dumoulin F., Ashen V., Agapov I., Antonenko Y.* Light-triggered liposomal release: membrane permeabilization by photodynamic action. *Langmuir.* – 2010. – Vol. 26 (8). – P. 5726–5733.
 21. *Shagidulin M., Onishchenko N., Krashennikov M., Iljinsky I., Mogeiko N., Lyundup A., Nemets E., Sevastjanov V., Gautier S.* Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure // *ESSR.* – 2010. – P. 149–150.
 22. *Shagidulin M., Onishchenko N., Krashennikov M., Iljinsky I., Mogeiko N., Lyundup A., Shmerko N., Andriyanova A., Nemets E., Sevastjanov V., Gautier S.* Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure // *Medimond. International Proceedings.* – 2010. – P. 83–86.
 23. *Shevchenko O.P., Orlova O.V., Kazakov E.N., Kormer A.Ja., Shevchenko A.O.* Placenta growth factor is associated with cardiac allograft vasculopathy. – *Transplantation.* – 2010. – Vol. 90. – P. 446.
 24. *Shevchenko O.P., Pitshulina M.E., Gichkun O.E., Kuncевич N.V., Ammosov A.A., Tsirulnikova O.M., Gautier S.V.* Plasma levels of soluble CD30 and neopterin in pediatric living donors liver transplantation. – *Transplantation.* – 2010. – Vol. 90. – P. 1071.

Опубликовано: 67 статей, 24 – в зарубежных изданиях, 2 монографии.

НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НИР ЗА 2010 г. ПО ПРОБЛЕМЕ «ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ»* (НАУЧНЫЙ СОВЕТ ПО ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫМ ОРГАНАМ № 21)**

Обзор составлен на основании данных, полученных из 8 научно-исследовательских учреждений различных ведомств: Минздравсоцразвития России, РАМН, Департамента здравоохранения г. Москвы, Департамента здравоохранения г. Санкт-Петербурга.

Согласно представленным данным, в 2010 г. велись исследования по 36 научным темам. К 1 января 2011 года закончена разработка 6 НИР, все прикладные. В результате завершенных в 2010 году исследований получены следующие данные по отдельным направлениям проблемы. В обзор включены также данные по переходящим НИР, имеющие важные для науки и практики результаты.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

На основании разработки биологических и клинических аспектов трансплантации сердца сформулирована концепция патогенеза болезни коронарных артерий трансплантированного сердца, учитывающая синергизм провоспалительных, проатерогенных факторов и вирусной инфекции при повреждении сосудов трансплантата. Разработан алгоритм обследования пациентов с трансплантированным сердцем с использованием компьютерной томографии, внутрисосудистого ультразвукового исследования, радиоизотопной томосцинтиграфии с целью наиболее ранней диагностики васкулопатии трансплантата.

Разработаны способ прогнозирования и способ неинвазивного определения распространенности стенотического поражения коронарного русла трансплантата, основанные на анализе биомаркеров неоангиогенеза и эндогенной деструкции тканей и подтвержденные результатами коронароангиографического исследования. Результаты могут быть использованы для улучшения обследования и лечения больных после трансплантации сердца (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

* По материалам отчета о выполнении научных исследований по комплексной проблеме медицины «Трансплантология и искусственные органы» за 2010 г.

** Утвержденный Постановлением Президиума РАМН № 64 от 14 апреля 2010 г. «О научных советах по комплексным проблемам медицины Российской Федерации».

Выявлены различия на молекулярном уровне в действии различных иммуносупрессивных препаратов при развитии сердечно-сосудистых осложнений у реципиентов сердца. Результаты могут быть использованы при оптимизации иммуносупрессивной терапии у реципиентов сердца (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Усовершенствованы подходы к морфологической и иммуногистохимической диагностике острого клеточного и гуморального отторжения трансплантата сердца и макромолекулярного состояния миокарда длительно функционирующего трансплантата. Сформулированы предположительные механизмы лимфогенного распространения аллоантител. Результаты могут быть использованы для улучшения диагностики и лечения острого отторжения трансплантата сердца (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Разработан протокол предоперационной диагностики анатомии внутрипеченочных желчных протоков у доноров части печени для уточнения границ резекции паренхимы и выбора оптимального способа билиарной реконструкции. Разработан алгоритм послеоперационного обследования реципиентов фрагмента печени с целью ранней диагностики билиарных осложнений (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

На основании изучения клинико-биохимических корреляций у 60 детей раннего возраста с врожденными и наследственными заболеваниями гепато-билиарной системы до и после родственной трансплантации фрагмента печени выявлены и охарактеризованы биохимические и иммунологические показатели, потенциально значимые при развитии осложнений и отражающие динамику течения послеоперационного периода у реципиентов печени: маркеры активации макрофагов (неоптерин), Т-лимфоцитов (sCD40L), острофазного ответа (С-реактивный белок и церулоплазмин). Результаты могут быть использованы для прогнозирования течения посттрансплантационного периода и позволят повысить эффективность обследования и лечения реципиентов печени (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

На основании морфологических и гистохимических исследований охарактеризованы морфологические признаки диагностики острого отторжения аллотрансплантированной печени (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Разработана и внедрена трансплантация почки от родственного донора как альтернативный метод заместительной почечной терапии. Проанализирован наибольший в России опыт, оценены непосредственные и отдаленные результаты 300 трансплантаций почки от живых доноров. Усовершенствована хирургическая техника операции нефрэктомии у донора с позиций минимально инвазивной хирургии. Доказано, что мануально-ассистированная лапароскопическая (гибридная) нефрэктомия является эффективным хирургическим вмешательством у донора, имеющим преиму-

щества по сравнению с открытой методикой выполнения операции. Все трансплантаты почки, полученные с использованием метода мануально-ассистированной нефрэктомии, имеющие множественное кровоснабжение, демонстрировали немедленную функцию. Качество трансплантатов как правой, так и левой почки, было удовлетворительным во всех случаях. Осложнений у доноров с избыточной массой тела не было. Установлено, что факторами, влияющими на выживаемость родственных аллотрансплантатов почки, явились длительность периода заместительной почечной терапии более 6 месяцев, а также детский и подростковый возраст реципиента. Результаты имеют большое значение для увеличения числа трансплантаций и расширения оказания трансплантологической помощи больным с терминальной стадией хронической почечной недостаточности в условиях дефицита донорских органов. Метод мануально-ассистированной нефрэктомии может быть использован с целью улучшения результатов операции у родственных доноров (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Разработан способ профилактики острого отторжения аллотрансплантата трупной почки блокаторами альфа-цепи молекулы рецептора интерлейкина-2, который улучшит результаты трансплантации трупной почки за счет введения анти-CD25 моноклональных антител реципиентам, генетически предрасположенным к развитию острого отторжения. Индивидуализация иммуносупрессии позволит существенно снизить затраты на медикаментозное обеспечение трансплантации без ухудшения ее результатов (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Получены данные о преимущественном влиянии на развитие и тяжесть инфекционных осложнений у трансплантологических и кардиохирургических больных следующих факторов: нахождение на искусственной вентиляции легких более 1–2 дней, кровопотеря более 500 мл, повторные операции, полиорганная недостаточность. Установлено прогностическое значение дооперационного определения уровня средних молекул в сыворотке крови в отношении тяжести течения послеоперационного периода (гнойно-септических осложнений, полиорганной недостаточности). Выявлен клональный характер распространения госпитального штамма синегнойной палочки в стационаре, определена генетическая связь между штаммами, выделенными из внешней среды и от пациентов. Разработаны меры по прерыванию путей распространения синегнойной инфекции, доказано антагонистическое действие пробиотика споробактерина на клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов, на функциональную активность макрофагов. Результаты могут быть использованы для профилактики инфекционных осложнений у трансплантологических и кардиохирургических больных (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

На основании электронномикроскопических и морфометрических исследований трупных донорских роговиц человека определены оптимальные концентрации использования гомологичного регуляторного пептида роговицы (фармакопейный препарат NayDil Nr. 37, «ВитОрган», Германия) и предельные сроки гипотермической и нормотермической консервации трансплантата донорской роговицы, при которых механизмы апоптоза в клетках эндотелия роговицы не активированы. Изучены механизмы активации апоптоза в клетках эндотелия трансплантатов донорских роговиц на этапе их консервации. Полученные данные могут быть использованы для улучшения результатов трансплантации трупных роговиц (ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России)

РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ И ГИБРИДНЫХ ОРГАНОВ И СИСТЕМ ЗАМЕЩЕНИЯ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА

В процессе разработки, исследования и испытания отечественного имплантируемого осевого насоса для вспомогательного кровообращения («искусственного сердца») сформулированы принципы построения системы управления имплантируемым роторным насосом, основанные на стабилизации скорости оборота ротора, проведена модификация конструкции направляющих и запирающих элементов пресс-формы для изготовления мембранного паракорпорального насоса с целью обеспечения более совершенной геометрии посадочного места под искусственный клапан сердца. Модифицирована геометрия соединительных патрубков с целью обеспечения полного открытия впускного клапана искусственного желудочка сердца (ИЖС). Освоена технология нанесения наноструктурных покрытий с целью повышения жесткости, био- и гемосовместимости элементов ИЖС. Выявлены наиболее перспективные составы покрытий и методы их нанесения, выбраны и рекомендованы для изготовления материалы и покрытия с минимальным коэффициентом трения и износом. Положительные результаты испытаний макетного образца аппарата вспомогательного кровообращения позволили перейти к следующему этапу – разработке опытного образца отечественного аппарата вспомогательного кровообращения, предназначенного для лечения больных с тяжелыми формами сердечной недостаточности (ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России).

На основании исследований по использованию ассоциатов клеток печени, иммобилизованных на биodeградируемых носителях, для коррекции хронической печеночной недостаточности («искусственная печень») созданы биополимерные матрицы из коллагена с использованием технологии биопринтирования. Ультрафиолетовое облучение трехмерных структур из

коллагена в условиях подобранных режимов позволяет сшивать их без нарушения морфологии для формирования трехмерных структур и использовать как имплантируемые системы. Методами электронной сканирующей микроскопии, атомной силовой микроскопии проведен послойный анализ структур для исследования морфологии срезов в трехмерном изображении и доказано, что отработанные методики выделения ассоциатов клеток печени и стволовых и прогениторных мезенхимальных клеток костного мозга у экспериментальных животных позволяют получать жизнеспособные клетки. Разработанная методика отдельного и совместного культивирования ассоциатов клеток печени и стволовых прогениторных мезенхимальных клеток костного мозга позволяет увеличить количество клеток и способствует пролонгированному функционированию клеток в тканевой культуре. Проведенные эксперименты по имплантации экспериментальным животным клеточного материала на биodeградируемых носителях из биорезорбируемых полимеров свидетельствуют о длительном выживании клеточных ассоциатов печени и мезенхимальных стволовых клеток. Результаты могут быть использованы для создания новой клеточной технологии лечения печеночной недостаточности (**ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Проанализированы непосредственные и отдаленные результаты имплантации биологических протезов клапанов сердца «КемКор» и «ПериКор», продемонстрированы хорошие гемодинамические и клинические результаты в отдаленном периоде у пациентов пожилого и старческого возраста. При изучении данных мультиспиральной компьютерной томографии и ультразвукового исследования сердца установлено, что элементы протеза сохраняют свою подвижность в различные фазы сердечного цикла, имитируя биомеханику нормального аортального корня. Имплантация бескаркасных протезов «Кемерово-АБ-Композит Neo» в аортальную позицию больным пожилого и старческого возраста способствует клиническому улучшению, регрессу процессов гипертрофии и дилатации левых отделов уже в раннем послеоперационном периоде, в том числе у пациентов с систолической дисфункцией левого желудочка. Доказано, что биопротезы серии «БиоЛаб КА/ПТ» при имплантации в аортальную позицию восстанавливают адекватную гемодинамику, что создает благоприятные условия для нормализации функции левых отделов сердца, повышает толерантность к физическим нагрузкам, и в целом улучшает качество жизни пациентов. Инъекционная наркомания является доминирующим фактором риска развития дисфункции трикуспидального ксеноклапана на отдаленном этапе после операции. Имплантация биопротезов моделей «КемКор» и «ПериКор» в трикуспидальную позицию позволяет получить превосходные результаты как раннем послеоперационном периоде, так и при динамическом наблюдении у пациентов, относящихся к социально благополучной группе больных (**ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России**).

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ АСПЕКТОВ КЛЕТОЧНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Установлено выраженное корригирующее действие аутологичных клеток костного мозга при аутоиммунном сахарном диабете 1-го типа на клинические и морфологические показатели состояния островков Лангерганса в поджелудочной железе и органов иммуногенеза (тимус, селезенка) при многократном введении клеток костного мозга (клетки мононуклеарной и стромальной фракций) на ранней стадии развития заболевания; эффективность коррекции патогенетических нарушений у животных с аутоиммунным сахарным диабетом 1-го типа при трансплантации аутологичных клеток костного мозга зависит от суммарной дозы (кратности введения) клеток и стадии развития заболевания, при этом наиболее выраженный эффект был отмечен при многократной трансплантации клеток на начальной стадии заболевания. Установлено, что улучшение клинических показателей у животных с аутоиммунным сахарным диабетом 1-го типа после введения аутологичных клеток костного мозга происходит на фоне устранения иммунной дисрегуляции и индукции иммунной толерантности в организме. Результаты могут быть использованы для разработки клеточной терапии и пролонгирования ремиссии сахарного диабета **(ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России).**

При моделировании хронической печеночной недостаточности и коррекции ее путем внутривенного введения взвеси клеток костного мозга и путем имплантации в печень сочетанно иммобилизованных на 3D матриксах клеток костного мозга и клеток печени показано возрастание скорости регенераторных процессов в печени у крыс; клетки костного мозга, введенные внутривенно, действуют как адаптогены, первоначально усиливая провоспалительные и склеротические процессы. При использовании клеток, иммобилизованных на матриксах, фаза усиления склеротических процессов отсутствовала. Результаты могут быть использованы при разработке методов клеточной терапии заболеваний печени **(ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России).**

На основе проведенных 130 вмешательств ретроспективно были оценены безопасность, эффективность, а также механизмы действия аутологичных стволовых клеток костного мозга при их трансплантации больным хронической сердечной недостаточностью. Предложен новый способ профилактики иммунозависимых осложнений у кардиохирургических больных в послеоперационном периоде с помощью аутологичных культивированных клеток костного мозга (мононуклеарная фракция). Результаты могут быть использованы для снижения частоты и тяжести развития иммунозависимых осложнений **(ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России).**

Проанализированы результаты лечения с помощью медикаментозной терапии и комбинации медикаментозной терапии с интрамиокардиальным введением моноклеарной фракции клеток костного мозга (МФККМ) пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью, которым было невозможно выполнить прямую реваскуляризацию с целью улучшения функции сердца. В группе пациентов, которым имплантировалась МФККМ, смертность оказалась значительно ниже, чем в группе пациентов, получавших только медикаментозную терапию. В группе больных, которым выполнялась имплантация МФККМ, достоверно снизился функциональный класс стенокардии и частота дневных ангинозных эпизодов, увеличилась фракция выброса левого желудочка, улучшился суммарный индекс перфузии. Введение клеток в ишемизированные сегменты улучшает перфузию без индукции дополнительных рубцовых зон. Интрамиокардиальная имплантация МФККМ пациентам с хронической ишемической болезнью сердца и выраженной дисфункцией левого желудочка может быть использована для улучшения клинических результатов и прогноза (**ФГУ «Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздравсоцразвития России**).

Впервые разработан протокол выделения и культивирования тканевого трансплантата лимбальной зоны роговицы человека, содержащей мезенхимальные стволовые/прогениторные клетки, способные при сотрансплантации роговицы индуцировать иммунологическую толерантность и выделять иммуносупрессивные факторы. Разработана технология криоконсервации прекультивированных лимбальных трансплантатов и протокол их банкирования. Установлены оптимальные сроки культивирования лимбальных трансплантатов и показания к их клиническому применению у пациентов высокого риска отторжения трансплантата роговицы. Результаты могут быть использованы для улучшения клинических результатов трансплантации роговицы (**ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, ФГУ «ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России**).

Разработана технология изготовления биокератопротезного комплекса на основе фотохимически модифицированной аллогенной донорской роговицы как матрицы для создания аутобиокератопротезного комплекса, содержащего культивированные кожные аутофибробласты реципиента. Разработан протокол банкирования роговично-протезных матриц. Получена модель тяжелого сосудистого истонченного бельма у кроликов и выращены аутофибробласты кожи для проведения экспериментально-клинических исследований по имплантации биокератопротезного комплекса. Результаты могут быть использованы для разработки и оптимизации способов трансплантации тканей глаза (**ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, ГУ «Институт биологии развития им. Кольцова» РАН**).

Разработан алгоритм выделения и культивирования клеток ретинального пигментного эпителия трупных глаз человека. Разработаны протоколы исследования флуоресценции флуорофоров и оценки жизнеспособности клеток пигментного эпителия сетчатки для трансплантации. Результаты могут быть использованы для разработки и оптимизации способов трансплантации тканей глаза (ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, ГУ «Институт патофизиологии и общей патологии» РАМН, ГУ «Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля» РАН, ГУ «Институт биологии развития им. Кольцова» РАН).

В 2010 г. в результате проведенных исследований выпущено 2 монографии, 5 пособий для врачей и научных работников, опубликовано 149 статей в центральных рецензируемых журналах (из них 39 в зарубежных изданиях). Зарегистрировано 2 патента на изобретения и 2 программы для ЭВМ, получено положительное решение по заявке на изобретение. Разработаны две новые медицинские технологии, утверждено Минздравсоцразвития России новое изделие медицинского назначения. Защищены 3 докторских и 7 кандидатских диссертаций по специальности «Трансплантология и искусственные органы» и смежным с нею дисциплинам.

*Председатель Научного совета
по трансплантологии и искусственным органам,
директор ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России,
член-корреспондент РАМН, профессор*



С.В. Готье

IV. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Министерство здравоохранения и социального развития РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ ИМ. АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

«УТВЕРЖДАЮ»
директор ФГУ «Федеральный
научный центр трансплантологии
и искусственных органов
им. академика В.И. Шумакова»,
член-корреспондент РАМН, профессор
С.В. Готье

«___» _____ 2010 года

**ПРАВОВЫЕ, ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ
И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
ОРГАННОГО ДОНОРСТВА**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Москва 2010

Организация-разработчик:

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

Авторы:

Готье Сергей Владимирович – член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Погребниченко Игорь Викторович – руководитель отдела координации органного донорства ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Мойсюк Ян Геннадьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением пересадки почки и печени ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

АННОТАЦИЯ

В соответствии с основными принципами Стамбульской декларации, принятой участниками Стамбульского саммита (30 апреля – 2 мая 2008 года), Трансплантационным обществом (TTS) и Международным обществом нефрологии (ISN):

1. Национальные правительства, работающие в соответствии с международными нормами и сотрудничающие с международными и неправительственными организациями, должны развивать и выполнять программы скрининга, предупреждения и лечения заболеваний, приводящих к терминальной недостаточности органов, что должно включать развитие:

а) клинических и научных исследований;

б) эффективных программ лечения пациентов с терминальными стадиями заболевания органов, таких как диализ и трансплантация, для сокращения заболеваемости и летальности, в соответствии с международными нормативами;

в) трансплантации органов как предпочтительного метода лечения для пациентов, не имеющих медицинских противопоказаний.

2. Законодательство каждой страны должно быть разработано в соответствии с международными стандартами и применяться для урегулирования прижизненного и посмертного донорства и трансплантации органов.

а) Должна быть организована и принята такая система донорства и трансплантации, которая обеспечивала бы максимально полное обеспечение органами пациентов, нуждающихся в трансплантации.

б) Практика донорства и трансплантации требует развитых институтов контроля со стороны правительственных медицинских организаций для обеспечения их ответственности и открытости данных.

в) Система контроля предполагает наличие национального регистра для учета прижизненного и посмертного донорства.

г) Ключевыми моментами эффективной программы трансплантации органов и тканей являются просвещение общественности, образование и тренинг медицинского персонала, определение ответственности, обязанностей и отчетности всех участников национальной системы донорства и трансплантации.

3. Органы для трансплантации должны справедливо и беспристрастно распределяться внутри стран и регионов вне зависимости от пола, этнической и религиозной принадлежности, финансового и социального статуса.

Финансовые факторы или любая другая материальная выгода не должны влиять на применение правил распределения органов.

Вышеизложенное послужило поводом для издания методических рекомендаций, предназначенных для врачей, с изложением сведений о юридических, организационных и клинических аспектах органного донорства. В приложениях к методическим рекомендациям представлены все необходимые для практической работы правовые акты, касающиеся органного донорства.

ВВЕДЕНИЕ

Появление трансплантологии является одним из важнейших достижений современной медицинской науки за прошедший век. Этому способствовали фундаментальные исследования в области иммунологии, физиологии, успешные экспериментальные исследования как у нас в стране, так и за рубежом, а также успехи современной анестезиологии и реаниматологии. В настоящее время трансплантология заняла достойное место в современной медицине и позволяет эффективно лечить чрезвычайно тяжелую категорию больных, которые ранее считались бесперспективными. Трансплантация органов стала обоснованным рутинным методом выбора лечения широкого круга заболеваний с необратимой или полной утратой функции того или иного органа.

Однако с ростом показаний к трансплантации и умножением числа больных, которым данная операция показана, отмечается постоянное увеличение разрыва между наличием пригодных донорских органов и количеством нуждающихся в спасительных операциях.

Проблемой трансплантологии в нашей стране на сегодняшний день является крайне низкий уровень органного донорства. Спецификой органного донорства является то, что оно находится на границе жизни и смерти, затрагивая интересы умерших и живых, и требует решения ряда сложных проблем морально-этического и юридического характера. Ре-

шение нравственных проблем, касающихся прав донора и реципиента, является одной из наиболее сложных задач, стоящих перед сегодняшним обществом.

Одной из основных причин, сдерживающих развитие трансплантации в России, является дефицит донорских органов, который часто обусловлен непониманием и незнанием проблем трансплантации и органного донорства медиками и руководителями медицинских учреждений, а зачастую и простым нежеланием их решать.

Многие организаторы и руководители здравоохранения игнорируют трансплантацию, прикрываясь высокой стоимостью этих операций, забывая, что лечение пациентов в условиях реанимационных отделений с терминальными фазами печеночной, почечной, сердечной недостаточности и т. д. и «лечение» потенциальных доноров со смертью мозга, до наступления необратимой остановки сердечной деятельности, обходится гораздо дороже. При этом пациенты с терминальными стадиями органной недостаточности теряют единственный шанс на выживание и выздоровление.

Приведенные факты позволяют рассматривать отношение к донорству с необычной точки зрения – отказ от участия в донорских программах можно расценивать как факт неоказания помощи больным.

К сожалению, крайне отрицательную роль в этом тонком вопросе играют и средства массовой информации, которые освещают вопросы донорства однобоко, формируя отрицательное общественное мнение об этой области медицины.

Причиной негативного отношения к проблеме является незнание правовых и организационных аспектов трансплантации и органного донорства работниками здравоохранения, а незнание пугает и приводит к нежеланию участвовать в реализации этих программ. Отношение медицинского персонала к проблемам органного донорства играет важную роль в развитии трансплантологии.

В методических рекомендациях представлены основные понятия органного донорства, вопросы диагностики смерти мозга, а также нормативно-правовая база, действующая в настоящее время и регламентирующая работу врачей всех специальностей, участвующих в обеспечении единого многоэтапного процесса донорства органов для трансплантации.

1. ПРАВОВАЯ БАЗА ОРГАННОГО ДОНОРСТВА

Существующая нормативно-правовая база, регламентирующая органное донорство и трансплантацию в стране, основана и соответствует всем международным правовым актам, действующим в этой сфере:

- **ДЕКЛАРАЦИЯ О ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ОРГАНОВ**
Принята 39-й Всемирной медицинской ассамблеей, Мадрид, Испания, октябрь 1987.

- основополагающие принципы трансплантации органов человека Всемирной организации здравоохранения по обсуждению правовых вопросов трансплантологии, 1991 г., Женева.
- Дополнительный протокол к Конвенции по правам человека и биомедицине относительно трансплантации органов и тканей человека, 24 января 2002 г., Страсбург.

Деятельность медицинских учреждений, связанная с изъятием и трансплантацией органов и тканей человека, осуществляется в строгом соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» № 5487-1 от 22 июля 1993 года, с изменениями от 2 марта 1998 года и Законом Российской Федерации от 22 декабря 1992 года № 4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (в ред. федеральных законов: от 20.06.2000 г. № 91-ФЗ, от 16.10.2006 г. № 160-ФЗ, от 09.02.2007 г. № 15-ФЗ) (приложение 1).

Перечень приказов, регламентирующих работу по органному донорству:

- Приказ МЗ РФ и РАМН № 460 от 20.12.2001 г., вводящий в действие «Инструкцию по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга». Приказ зарегистрирован Министерством юстиции РФ № 3170 от 17.01.2002 г. (приложение 2 настоящих рекомендаций);
- Приказ МЗ РФ № 73 от 04.03.2003 г., зарегистрированный Минюстом РФ 04.04.2003 г., № 4379, вводящий в действие «Инструкцию по определению критериев и порядка определения момента смерти человека, прекращения реанимационных мероприятий» (приложение 3 настоящих рекомендаций);
- Приказ Минздравсоцразвития Российской Федерации и РАМН от 25.05.2007 г. № 357/ 40 «Об утверждении Перечня органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации, Перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, и Перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека» (приложение 4);
- Минздравсоцразвития Российской Федерации от 9 октября 2009 г. № 819н «Порядок оказания медицинской помощи методом трансплантации органов» (приложение 5);
- Приказы региональных органов управления здравоохранения, регламентирующие порядок оказания трансплантологической помощи и организации органного донорства.

1.2. Презумпция согласия предусматривает изъятие органов и тканей у трупа без согласия родственников и доверенных лиц, если не выражено несогласие.

Основным документом, регламентирующим возможность изъятия органа у трупа, является ст. 8 Закона о трансплантации органов и (или) тканей человека, в которой говорится:

«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 его органов и (или) тканей после смерти для трансплантации реципиенту».

Некоторые считают, что данная статья находится в противоречии со ст. 5 Закона о погребении и похоронном деле (приложение 4), в которой говорится, что изъятие органов и тканей у умершего возможно на основании прижизненного волеизъявления, сделанного в устной или письменной форме, а при отсутствии такового – по разрешению родственников или лиц, взявших на себя обязанность осуществить погребение (приложение 6).

Данная статья не содержит однозначной трактовки: является ли согласие родственников или иных уполномоченных лиц на изъятие органов обязательным?

В письме Министерства юстиции РФ от 14.02.2002 г. № 11/1356-ЕС дается следующее разъяснение по данному вопросу:

«Министерство юстиции РФ рассмотрело проект Федерального закона «О внесении изменений и дополнений в Федеральный закон «О погребении и похоронном деле» и сообщает.

Представляется излишним дополнение статьи 5 закона пунктом 4, так как вопрос о волеизъявлении лица на изъятие его органов и (или) тканей после смерти уже урегулирован в рамках ст. 8 Закона РФ от 22.12.1992 года № 4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей».

Таким образом, если на момент изъятия органов администрация лечебного учреждения не поставлена в известность о прижизненном несогласии умершего или его родственников быть донором органов, изъятие органов производится без получения прямого испрошенного согласия родственников умершего».

В письме Конституционного суда РФ от 04.12.2003 г. № 459-О определена правомочность презумпции согласия:

*«Презумпция согласия базируется, с одной стороны, на признании **негуманным** задавать родственникам практически одновременно с сообщением о смерти близкого человека либо непосредственно перед операцией или иными мероприятиями лечебного характера вопрос об изъятии его органов (тканей), а с другой стороны – на предположении, обоснованном фактическим состоянием медицины в стране, что на современном этапе развития трансплантологии невозможно обеспечить выяснение воли указанных лиц после кончины человека в сроки, обеспечивающие сохранность трансплантата» (приложение 7).*

2. ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ ОРГАННОГО ДОНОРСТВА

Ключевыми понятиями, необходимыми для понимания связи правовых и практических аспектов органного трупного донорства, являются:

- потенциальный донор;
- смерть человека;
- смерть мозга.

2.1. Потенциальный донор – пациент с доказанным инкурабельным поражением головного мозга, находящийся в состоянии атонической комы или неблагоприятным прогнозом на выживание и прогрессивного ухудшения гемодинамических показателей на фоне применения полного комплекса поддерживающих жизнь мероприятий.

Определяющим фактором при пересадке органов является порядок констатации смерти:

- изъятие органов после констатации смерти мозга при работающем сердце донора дает возможность пересаживать реципиентам сердце, печень, поджелудочную железу, кишечник и другие органы, обладающие низкой толерантностью к ишемии;
- при смерти человека, обусловленной необратимой остановкой сердечной и дыхательной деятельности, изъятие органов производится при неработающем сердце донора. При этом возможно, как правило, изъятие только почек как наиболее устойчивых к ишемии. Вероятность положительного исхода операции в этом случае значительно ниже.

2.2. Смерть человека – состояние необратимой гибели организма как целого – может быть констатирована как на основании диагноза смерти мозга, так и на основании традиционных критериев – необратимого прекращения дыхания и сердечной деятельности.

В диагностике смерти у потенциального донора и в его лечении участвует участие трансплантологов и бригад, осуществляющих изъятие органов.

Констатация смерти человека вследствие необратимой остановки сердечной деятельности осуществляется в соответствии с «Инструкцией по определению критериев и порядка определения смерти человека, прекращения реанимационных мероприятий», введенной Приказом Министерства здравоохранения РФ № 73 от 04.03.2003 г. (приложение 3).

Доноры, у которых наступила смерть вследствие необратимой остановки сердечной деятельности, относятся к категории асистолических доноров (доноров с небеющим сердцем).

2.3. Смерть мозга

Головной мозг расположен в замкнутом пространстве, ограниченном костными структурами черепа. Многочисленные отверстия, соединяющие мозг с перикраниальным пространством, заполнены нервами и сосудами. Лишь большое затылочное отверстие, в просвете которого находится продолговатый мозг, IX, X, XI нервы и позвоночные артерии, не полностью выстлано тканями; относительно широкая щель соединяет полость черепа

с полостью спинального канала. Объем мозга постоянно меняется, в зависимости от его функциональной активности и кровенаполнения. Компенсирует данные колебания буферное пространство, которое занимает не более 10% полости черепа. Повреждение мозговых структур приводит к возникновению отека и увеличению объема мозга. Если градиент объема превышает компенсаторные возможности буферного пространства, формируется внутричерепная гипертензия. При выраженном отеке, который сопровождается механическими повреждениями церебральных тканей (травма, инсульт), внутричерепное давление может превысить системное артериальное. В этом случае может возникнуть тампонада мозга: артериальная кровь перестает поступать в мозг, сбрасываясь в коллекторы наружных сонных артерий. Ситуация усугубляется тем, что под действием запредельного давления полушария мозжечка дислоцируются в большое затылочное отверстие, сдавливая позвоночные артерии и жизненно-важные стволовые центры. Доказано, что подобная тампонада мозга спустя 30 мин приводит к несовместимым с жизнью изменениям – смерти мозга; при этом сердечная деятельность, минимальная активность гомеостаза может поддерживаться месяцы и даже годы. Смерть мозга подразумевает полное отсутствие вероятности восстановления функций высшей нервной деятельности.

Традиционные критерии смерти не пригодны для успешного проведения трансплантаций большинства органов. Поиск условий для их изъятия привел большинство ученых мира к выводу, что слово «смерть» в его индивидуальном и общественном значении применимо к необратимой смерти мозга, не зависимо от состояния других тканей и органов.

Понятие смерти мозга было впервые сформулировано французскими невропатологами в 1959 г. В 1966 г. Папа Римский Пий XII определил понятие смерти как отделение души от тела, а не момент остановки сердца.

В 1967 г. в Лондоне была выдвинута концепция мозговой смерти, тогда же в Великобритании впервые было осуществлено изъятие почек у донора с бьющимся сердцем. Теоретическая и правовая основа, определившая понятие мозговой смерти в США, была принята в 1968 г.

Медицинская и юридическая общественность согласились, что при смерти мозга человека можно считать умершим, даже если сердце его бьется, а дыхание поддерживается искусственно. Таким образом, в практической медицине утвердилось новое понятие «смерть мозга», которое более полно отвечает требованиям современной медицины и нуждам трансплантологии.

Смерть мозга наступает при полном и необратимом прекращении всех функций головного мозга, регистрируемом при работающем сердце и искусственной вентиляции легких.

Смерть мозга эквивалентна смерти человека.

Основные причины развития смерти мозга:

- тяжелая черепно-мозговая травма;
- нарушения мозгового кровообращения различного генеза;

- асфиксии различного генеза;
- внезапная остановка сердечной деятельности с последующим ее восстановлением – постреанимационная болезнь.

Смерть мозга развивается в результате резкого повышения внутричерепного давления и обусловленного им прекращения мозгового кровообращения.

3. ДИАГНОСТИКА СМЕРТИ МОЗГА

Установление диагноза «смерть мозга» является самостоятельной и независимой диагностической процедурой, не связанной с деятельностью трансплантологической службы, которая заинтересована в получении донорских органов с максимальным потенциалом жизнеспособности, а значит, косвенным образом – в постановке данного диагноза. Чтобы исключить малейшую предвзятость, участие трансплантологов и специалистов по изъятию органов в констатации смерти потенциального донора полностью исключается.

Основным документом, регламентирующим диагностику смерти мозга в Российской Федерации, является «Инструкция по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга», утвержденная Приказом МЗ РФ и РАМН № 460 от 20.12.2001 г. (приложение 2).

Утвержденной формой регистрации является «Протокол установления смерти мозга» (приложение 2).

Непременным условием установления диагноза смерти мозга является исключение воздействия на организм лекарственных препаратов, угнетающих ЦНС и нервно-мышечную передачу, интоксикаций, инфекционных поражений мозга, метаболических нарушений, вызванных критическими сдвигами кислотно-основного и электролитного баланса, эндокринными расстройствами.

Диагноз смерти мозга не рассматривается до тех пор, пока не исключены следующие патологические состояния: интоксикации, включая лекарственные (в первую очередь обусловленные воздействием психотропных препаратов, миорелаксантов), первичная гипотермия, гиповолемический шок, метаболические эндокринные комы.

Полное и устойчивое отсутствие сознания (кома)

Атония всех мышц. Констатация снижения мышечного тонуса возможна при проведении теста пассивного сгибания-разгибания конечности. Не менее показательно пальпаторное исследование мышечного тонуса: мышцы и их сухожилия теряют эластичность, становятся дряблыми на ощупь. Вследствие гипотонии повышается объем движений в суставах; при исследовании объема движений фиксируется переразгибание в коленном и локтевом суставах (тест на переразгибание). Во время клинического обследования больного ректальная температура должна быть выше 35 °С, а систолическое артериальное давление выше 90 мм рт. ст. (при более низком

АД должна быть предпринята попытка его медикаментозного повышения путем внутривенного введения вазоконстрикторов).

Диагноз смерти мозга может быть достоверно установлен на основании клинических тестов!

Минимальное оснащение стационара для диагностики смерти головного мозга составляет: газовый анализатор, кислородный контур, следящий монитор с контролем ЭКГ и АД.

В соответствии с инструкцией по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга предусмотрен комплекс клинических критериев, наличие которых обязательно для установления диагноза смерти мозга:

- Отсутствие реакции на сильные болевые раздражители в области болевых точек. Болевые точки на голове (точки Керера) соответствуют проекции черепных нервов: надглазничная (2 см выше середины брови) – проекция I ветви тройничного нерва; верхнечелюстная (ниже зрачка, в области скуловой дуги) – проекция II ветви тройничного нерва; подбородочная (ниже угла рта, в области нижней челюсти) – проекция III ветви тройничного нерва; подзатылочная (граница внутренней и средней трети расстояния между сосцевидным отростком и остистым отростком II шейного позвонка) – большого затылочного нерва. При пальпации указанных точек не должна появляться болевая гримаса и любые активные движения (отрицательный симптом Керера). Отсутствие мимической реакции при надавливании на глазные яблоки (отрицательный симптом Мондонеци).
- Отсутствие рефлексов, замыкающихся выше шейного отдела спинного мозга. Необходимо отметить, что при необратимом поражении стволовых структур выпадают не только физиологические рефлексы (сухожильные, надкостничные, рефлексы со слизистых), но и патологические рефлексы, замыкающиеся на уровне ствола. Угнетение рефлекса констатируется лишь при полном отсутствии рефлекторной реакции при проведении диагностической пробы.

Предлагаем следующий алгоритм тестирования церебральных рефлекторных дуг:

- Перкуссия надбровной дуги. Рефлекторная реакция – мигательное движение век (надбровный рефлекс).
- Перкуссия кончика носа. Рефлекторная реакция – вытягивание губ (назолабиальный рефлекс).
- Перкуссия губ. Рефлекторная реакция – вытягивание губ (хоботковый рефлекс).
- Перкуссия нижней челюсти. Рефлекторная реакция – смыкание челюстей (нижнечелюстной рефлекс).
- Штриховое растирание кожи лба. Рефлекторная реакция – смыкание челюстей, смещение нижней челюсти в сторону – симптом Холмгрена.

- Раздражение роговицы. Рефлекторная реакция – мигательное движение век (корнеальный рефлекс), смещение нижней челюсти (симптом Зельдера).
- Раздражение задней стенки глотки. Рефлекторная реакция – рвотное движение (глочный рефлекс).
- Раздражение гортани и трахеи трахеальным катетером, фибробронхоскопом. Рефлекторная реакция – кашлевые движения (трахеальный рефлекс).
- Отсутствие реакции зрачков на свет (при отсутствии медикаментозной денервации глаза). Обязательным является выпадение как прямой (при прямом воздействии светового пучка на данный глаз), так и содружественной (при воздействии светового пучка на противоположный глаз) реакции. Ширина зрачков при полном поражении ствола превышает 5 мм. Узкие зрачки свидетельствуют о сохранности отдельных стволовых структур.
- Отсутствие спонтанных движений глаз. Взор должен быть фиксирован по центру и не отклоняться при поворотах головы.
- Отсутствие окулоцефалических рефлексов, которые проявляются рефлекторным поворотом глаз в сторону, противоположную пассивному повороту головы (головы и глаз куклы феномен).
- Отсутствие окуловестибулярных рефлексов. Проверяется путем медленного (в течение 10 с) вливания холодной (20 °С) воды в наружный слуховой проход катетером, подсоединенным к шприцу Жане (калорическая проба). Альтернативный вариант – гальваническая проба; проводится путем воздействия на лабиринт гальванического тока, генерируемого специальными устройствами. Пробы считаются отрицательными при отсутствии нистагма и движений глаз в ответ на производимое раздражение.
- Отсутствие самостоятельного дыхания, подтвержденного с помощью теста апноэтической оксигенации (приложение 2).
- Разъединительный тест (приложение 2).

Смерть головного мозга не всегда сопровождается утратой спинальной активности. За счет сохранности спинальных рефлекторных дуг у человека могут сохраняться отдельные рефлексы, синкинезии, автоматизмы, в том числе:

- сухожильные рефлексы – в 35% случаев;
- подошвенное сгибание – в 60%;
- тройное сгибание – в 35%;
- брюшные рефлексы – в 40%;

При сгибании головы могут отмечаться:

- движение в плече – в 25% случаев;
- движение в бедре – в 45%;
- сокращение мышц брюшной стенки – в 75%.

Другие относительно часто встречающиеся феномены:

- Симптом Лазаря – сложение рук в положении молящегося, сгибание туловища на 30–40 градусов, переход в полусидящее положение, реже – сокращение мышц нижних конечностей во время проведения разъединительного теста.
- Децеребрационные судороги – тонические судороги, возникающие в ответ на тактильную или болевую стимуляцию;
- Повороты головы в разные стороны при раздражении кожи предплечий.

В том случае, если из-за повреждения мягких тканей головы, шеи, барабанных перепонок и пр. оценка вышеперечисленных клинических критериев затруднена, пациенту проводится дополнительное исследование – электроэнцефалография. Критерием смерти мозга является отсутствие биоэлектрической активности мозга, превышающей 2 мкВ, при непрерывном 30-минутном исследовании. После появления на ЭЭГ стойкой изоэлектрической линии остановка сердечной деятельности и другие необратимые изменения в организме происходят в течение суток. Исследование проводят сначала в стандартном режиме, затем с двойным усилением. Во избежание появления артефактов, связанных с сердечной деятельностью, электрод необходимо накладывать на правую руку. Еще более предпочтительны игольчатые (платино-иридиевые) электроды, в количестве не менее 8, располагаемые по системе «10–20%», и 2 ушных, устанавливаемых на сосцевидном отростке; при этом заземляющий электрод устанавливается на центральной части лба. В обязательном порядке во время записи ЭЭГ проводится световая, звуковая и болевая стимуляция продолжительностью не менее 10 мин. Диагноз смерти мозга исключается при выявлении любой электрической активности мозга – как спонтанной, так и вызванной.

Для укорочения регламентированной продолжительности наблюдения пациента возможно проведение панангиографии магистральных артерий головы. Исследуются обе общие сонные и обе позвоночные артерии с интервалом 30 мин. Среднее артериальное давление во время исследования должно быть не менее 80 мм рт. ст. Однако данное исследование не является обязательным для установления смерти мозга; отсутствие в стационаре ангиографической установки не может служить препятствием для ее констатации. Решающим в этом случае является наличие анализатора газового состава крови, необходимого для проведения разъединительного теста.

Диагноз смерти мозга устанавливается комиссией врачей того лечебно-профилактического учреждения, в котором находится больной, в составе реаниматолога-анестезиолога с опытом работы в отделении интенсивной терапии и реанимации не менее 5 лет и невролога с аналогичным стажем работы по специальности.

При проведении специальных исследований в состав комиссии могут включаться специалисты по дополнительным методам исследования с опытом работы по специальности не менее 5 лет, которые могут приглашаться на консультативной основе из других лечебных учреждений.

Назначение состава комиссии и утверждение протокола установления смерти мозга производится заведующим реанимационным отделением, в котором находится больной, а в период его отсутствия – ответственным дежурным врачом данного лечебного учреждения.

Заполненный протокол диагностики смерти мозга в обязательном порядке вклеивается в историю болезни.

После установления смерти мозга и оформления протокола реанимационные мероприятия, включая ИВЛ, могут быть прекращены или к работе с трупом может быть допущена бригада по изъятию органов. В том случае, если немедленное изъятие органов невозможно, проводится комплекс мероприятий, направленных на поддержание жизнедеятельности внутренних органов – кондиционирование донора.

4. ВЕДЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ДОНОРА

Ведение потенциального донора органов осуществляется анестезиологами-реаниматологами. Принципиально важным является учет следующих фактов. Потенциальный донор органов – это пациент реанимационного отделения с повреждением головного мозга различного генеза с возможным неблагоприятным прогнозом для жизни. На этом этапе пациенту проводится весь комплекс показанных ему лечебно-диагностических мероприятий, целью которых является спасение жизни и функциональное восстановление. Все проводимые больному мероприятия фиксируются в установленном порядке в истории болезни пациента.

Основные задачи реаниматолога:

- не потерять потенциального донора,
- сохранить оптимальное состояние органов.

Нарушение центральных регуляторных механизмов при возникновении СМ вызывает глубокие нарушения гомеостаза в организме донора. Несмотря на оптимальную патогенетическую терапию и поддержку искусственной вентиляцией легких (ИВЛ), остановка сердца у доноров со СМ развивается в течение 48–72 часов. Поэтому чрезвычайно важны: раннее распознавание атонической комы и правильное реанимационное пособие – процедура кондиционирования (ведения) потенциального донора. Кондиционирование донора-трупа – это абсолютно новая область медицины, ранее не известная ни врачам, ни ученым, ни обществу и появившаяся только в последние десятилетия в связи с развитием трансплантологии. Ранее изучались патофизиологические изменения, сопутствующие процессу умирания.

4.1. Интенсивная терапия при кондиционировании направлена на защиту донорских органов от ишемического повреждения. Это достигается поддержкой адекватной перфузии органов и тканей.

При ведении донора целесообразно придерживаться **«правила 100»**:

- систолическое АД не ниже 100 мм рт. ст.;
- ЦВД – 100 мм вод. ст.;
- пульс – 100 уд./мин;
- диурез – не менее 100 мл/ч;
- гемоглобин – 100 г/л;
- Pa O₂ – 100 мм рт. ст.

Первым шагом в интенсивной терапии должна быть достаточная волевическая нагрузка. Не следует опасаться больших объемов инфузии. Иногда потребность во внутривенном введении жидкости может достигать 10–15 л/сут и более (до 100 мл/кг/сут и более). После устранения гиповолемии гемодинамические показатели могут удерживаться самостоятельно или на фоне минимальных доз вазопрессоров.

Целевым уровнем ЦВД, свидетельствующем о достаточной волемии, является величина 100 мм вод. ст. Безопасным уровнем ЧСС является величина 100 уд./мин. Подтверждением адекватной перфузии почек является скорость мочеотделения 100 мл/час. Необходимо добиться устранения или уменьшения микроциркуляторных нарушений

С целью коррекции гиповолемии можно использовать следующие растворы для внутривенных инфузий:

- р-р глюкозы – 5–10%;
- р-р хлорида натрия – 0,9%;
- р-р гидрооксиэтилкрахмала –10%;
- полиглюкин;
- р-р альбумина 10%.

При выраженной полиурии (более 1000 мл/час) и прогрессирующем нарушении гемодинамики помимо введения восполняющих потери растворов возможно интраназальное введение вазопрессина для достижения диуреза 100–200 мл/час.

При достижении темпа диуреза 100 мл/ч и более следует помнить о поддержании адекватного водно-электролитного баланса (уровень калия в плазме необходимо поддерживать на уровне не ниже 4 ммоль/л). С этой целью можно использовать поляризующую смесь, в состав которой входят:

- глюкоза 20% – 200 мл;
- хлорид калия 3% – 200 мл;
- панангин – 30 мл;
- инсулин регулярный – 16 ЕД.

Объем внутривенных инфузий определяется достижением оптимальных показателей гемодинамики и диуреза (см. «правило 100»).

Необходим баланс между темпом диуреза и объемом внутривенных инфузий. В противном случае существует реальная опасность развития отека легких и других внутренних органов.

Если имеется выраженная гипернатриемия (более 160 ммоль/л), часто присутствующая у больных в критическом состоянии, необходимо прово-

дить терапию, направленную на купирование гипернатриемии. Высокий уровень натрия в донорских органах приводит после трансплантации к неконтролируемому отеку паренхимы пересаженного органа и его дисфункции. Поэтому в этих случаях в составе инфузионной терапии должны преобладать растворы глюкозы или глюкозо-солевые растворы. Одновременно с коррекцией гипернатриемии будет достигнута коррекция гиперосмолярного синдрома, вызывающего повреждение паренхиматозных органов.

Целевой уровень натрия в плазме крови <155 ммоль/л, уровень калия ≥ 4 ммоль/л, уровень осмоляльности <320 мосмоль/л.

Довольно часто у доноров со смертью мозга удается поддерживать АД стабильным только на фоне адекватной инфузионной терапии, без применения симпатомиметических препаратов. Если для поддержания систолического АД на уровне 100 мм рт. ст. недостаточно инфузионной терапии, необходимо применение симпатомиметических препаратов с кардиотоническим эффектом.

На фоне восполнения объема циркулирующей крови инфузионной терапией симпатомиметические препараты желательно использовать в следующих максимальных дозировках:

- допамин (дофамин) – не более 10 мкг/кг/мин;
- добутамин – не более 10 мкг/кг/мин;
- адреналин $<0,1$ мкг/кг/мин;
- норадреналин – 2–4 мкг/кг/мин.

Однако использование таких вазопрессорных симпатомиметических препаратов, как адреналин, норадреналин и мезатон, нежелательно, поскольку их применение вызывает значительную периферическую вазоконстрикцию и снижение перфузионного кровотока во внутренних органах.

Важным аспектом кондиционирования донора-трупа является обеспечение оптимальной вязкости и текучести крови, что позволяет предотвратить развитие микротромбозов внутренних органов и сохранить их функциональную пригодность. Достичь этих целей позволяет достаточный объем инфузионной терапии, предотвращающий развитие гемоконцентрации, и использование антикоагулянтов (гепарин в дозе 10 тыс. ед. каждые 4 часа). Целевой уровень гематокрита – 30, свертываемости крови – >10 мин.

В случае если у донора-трупа имеется клиническая картина ДВС-синдрома в стадии гипокоагуляции, то для снижения опасности паренхиматозных кровоизлияний в донорских органах и их последующего повреждения следует провести трансфузию одногруппной свежезамороженной плазмы в дозе 600–800 мл.

Несомненно, смерть головного мозга критически изменяет гомеостаз организма, в том числе гормональный. Повреждается гипоталамус – высшее звено эндокринной регуляции – и наступает гормональный дисбаланс. На этом основании некоторыми авторами предлагается корректировать этот дисбаланс назначением заместительной гормональной терапии. Назначение глюкокортикоидных гормонов патогенетически оправдано и может

преследовать сразу несколько целей: стабилизация гемодинамики, уменьшение выраженности системного воспаления и его органоповреждающего действия, снижение иммуногенности донорских органов и в результате – улучшение результатов трансплантации. Рекомендуемые препараты – преднизолон в дозе 10 мг/кг/сут или целестон в эквивалентной дозировке.

4.2. Оптимизация вентиляционной поддержки

Для достижения адекватной оксигенации и подбора оптимальных режимов вентиляции необходим регулярный мониторинг газов и кислотно-основного состояния крови, а также использование пульсоксиметрии. Парциальное давление кислорода в крови (P_{aO_2}) должно поддерживаться на уровне 70–100 мм рт. ст. Для адекватной оксигенации тканей насыщение гемоглобина кислородом по данным пульсоксиметрии должно быть не менее 95%. Также важно поддерживать рН крови в пределах нормы 7,35–7,45.

Следует помнить, что при длительности искусственной вентиляции более двух суток у донора могут наблюдаться пневмония, ателектазы, а иногда и отек легких. Очень важно вовремя диагностировать эти состояния и изменить режим вентиляции таким образом, чтобы обеспечить эффективный газообмен. Если не планируется изъятие легких, допустимо увеличение фракции кислорода во вдыхаемой смеси до 100%. Важно регулярно санировать органы дыхания с помощью трахеальных катетеров или фиброbronхоскопа.

Непосредственно перед транспортировкой донора в операционную фракцию кислорода во вдыхаемой смеси следует увеличить до 100%.

4.3. Профилактика инфекций

Развитие системной инфекции у доноров может привести к непригодности внутренних органов для трансплантации.

Для ранней профилактики инфекционных осложнений у донора необходимо тщательно санировать трахеобронхиальное дерево, регулярно промывать антисептическими растворами мочевого катетер, проводить профилактику пролежней, антибактериальную терапию по профилактической схеме.

4.4. Нормотермия

При смерти мозга нарушается гипоталамический контроль за температурой тела. Ректальная температура должна поддерживаться на уровне не ниже 35 °С. Для поддержания нормотермии могут быть использованы:

- подогретые внутривенные растворы;
- подогреваемые матрацы, грелки;
- одеяла.

Согревание должно проводиться со скоростью 1,8 °С/час. Если делать это быстрее – возможно развитие гипокалиемии аритмии.

4.5. Анемия

Причинами развития анемии у потенциальных доноров чаще всего являются кровотечения вследствие травмы и гемодилуция возникающая в процессе интенсивной терапии.

Гемотрансфузия – при снижении НВ ниже 80 г/л, Нт менее 30%.

5. ИЗЪЯТИЕ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ У ТРУПА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Разрешение (или обоснованный отказ) на изъятие органов и (или) тканей у трупа для трансплантации дает руководитель лечебного учреждения (главный врач), а в его отсутствие – ответственный дежурный (администратор).

В том случае, когда требуется проведение судебно-медицинской экспертизы, разрешение на изъятие органов и (или) тканей у трупа должно быть согласовано с судебно-медицинским экспертом и районным прокурором. Запрет на изъятие может быть получен лишь в том случае, если изъятие органов способно помешать проведению экспертизы и установлению причины смерти.

Изъятие органов для трансплантации осуществляется специалистами регионального или федерального центра органного донорства, прошедшими специальную подготовку.

Органы, подлежащие изъятию, определяются специалистами центров, производящих трансплантацию, на основании предварительной и интраоперационной оценки их функциональной пригодности для трансплантации.

Изъятие органов (донорская операция) осуществляется в условиях операционной, предоставляемой лечебным учреждением, в котором находится потенциальный донор.

Изъятие донорских органов после выполнения донорской операции оформляется специальным актом: «Акт об изъятии донорских органов» обязательно вклеивается в историю болезни донора» – и является неотъемлемой частью документации о доноре, которая вклеивается в историю болезни (приложение 8).

5.1. Мультиорганное изъятие

У пациента с установленной смертью мозга возможно изъятие нескольких органов в соответствии с концепцией мультиорганного донорства, которая базируется на следующих принципах:

- каждый потенциальный донор должен оцениваться как мультиорган-ный;
- от каждого донора должно быть забрано максимальное число органов, пригодных для пересадки нескольким реципиентам;

- процедура мультиорганного изъятия должна быть организована и проведена таким образом, чтобы не было скомпрометировано или повреждено функциональное состояние ни одного органа;
- изымаемые органы не следует подвергать воздействию тепловой ишемии.

Один мультиорганный донор – это 4–7 спасенных реципиентов.

5.2. «Асистолические» доноры

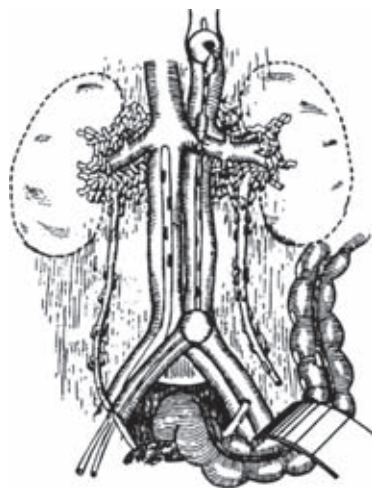
Неоспоримый интерес представляет изъятие органов у доноров с необратимой остановкой сердечной деятельности («асистолические» доноры). Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют об относительной резистентности почек к тепловой ишемии в течение 10–60 минут. При этом следует иметь в виду, что сочетание тепловой и холодной ишемии органа во время консервации, а также реперфузионное воздействие на орган во время трансплантации могут привести к неблагоприятным последствиям.

В настоящее время во всем мире доноры с «небьющимся сердцем» составляют не более 1–6% от всех доноров. В то же время интерес к ним вновь возрастает с учетом существующего дефицита донорских органов. В России работа с ними является ежедневной практикой. Большинство донорских почек, полученных реципиентами за последние 5 лет в Москве, Московской области и Санкт-Петербурге получено от «асистолических» доноров.

В большинстве зарубежных центров для лучшей сохранности почек при работе с асистолическими донорами принят протокол заготовки, отмывки и начальной консервации почек «*in situ*» с применением двухбаллонного трехпросветного катетера, вводимого в инфраренальную аорту доступом через бедренную артерию. При этом консервация и охлаждение донорского органа начинается сразу в теле донора, еще до изъятия: за счет гипотермии понижается «кислородный запрос» почек, консервирующим раствором отмывается кровь из донорского органа, существенно улучшаются технические условия изъятия из-за расширения временных параметров.

После констатации смерти реаниматологами отделения интенсивной терапии хирургом службы забора органов выполняется доступ к бедренным сосудам в бедренном треугольнике. Катетеризация общей бедренной артерии занимает обычно не больше 1,5–2 минут. В аорту вводится двухбаллонный катетер. Нижний баллон наполняется 20 мл физиологического раствора, потягиванием в каудальном направлении он фиксируется в области бифуркации аорты, сразу после чего начинается перфузия абдоминального региона консервирующим раствором, затем раздувается верхний баллон, окклюзирующий аорту выше почечных артерий. Через бедренную вену устанавливается катетер в нижнюю полую вену для выведения перфузата и декомпрессии сосудистого русла.

Неоспоримыми деонтологическими и этическими преимуществами данной методики, используемой при работе с асистолескими донорами, является отсутствие необходимости выполнения лапаротомии спустя короткий период времени после констатации смерти пациента. Консервация начинается в отделении реанимации, и только потом труп-донор транспортируется в операционную, где выполняется операция изъятия. Данная методика позволяет в некоторых случаях при определенных условиях производить изъятие печени от доноров с небьющимся сердцем.



6. ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ ПРИНЦИПЫ И АЛГОРИТМ ДЕЙСТВИЙ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ДОНОРА

При выявлении потенциального донора заведующий отделением реанимации или отв. реаниматолог обязаны информировать ответственного за организацию и контроль выполнения программы органного донорства стационара, а в ночное время, выходные и праздничные дни – ответственного дежурного администратора.

Ответственный за организацию и контроль выполнения программы органного донорства (в соответствии с функциональными обязанностями) должен:

1. Поставить в известность главного врача или лицо, его замещающее, о наличии потенциального донора.
2. Сообщить о пациенте в региональный координационный центр органного донорства (ответственному сотруднику межтерриториального центра органного донорства)

Необходимая информация о пациенте для бригады органного донорства:

1. Диагноз.
2. Возраст.
3. Группа крови, Rh-фактор.
4. Время пребывания в реанимации и длительность ИВЛ.
5. Результаты анализов на RW, ВИЧ, HBs, HCV.
6. Общеклинические показатели и поддерживающая терапия (АД, ЧСС, Sat O₂, ЦВД, почасовой диурез, применяемые вазопрессоры и их доза (мкг/кг/мин)).
7. Результаты биохимического и клинического анализов крови.
8. Медицинский и социальный анамнез.

9. Данные Rg-графии органов грудной клетки.

10. Эпизоды сердечно-легочной реанимации:

- а) длительность асистолии,
- б) непрямой массаж сердца (время),
- в) дефибриляция (количество).

До прибытия бригады органного донорства следует проводить интенсивную терапию, направленную на поддержание показателей гемодинамики и защиту органов от ишемии.

Реаниматологи стационара и невролог проводят мероприятия по диагностике смерти мозга в соответствии с «Инструкцией по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга» (Приказ МЗ РФ от 20.12.01. № 460) и при ее установлении ответственный реаниматолог и невролог заполняют и подписывают протокол установления смерти мозга.

Ответственный за организацию и контроль выполнения программы органного донорства по прибытии бригады органного донорства:

- 1) ставит в известность главного врача стационара или лицо, его замещающее, а в ночное время, выходные и праздничные дни – ответственного администратора, который при отсутствии причин, препятствующих изъятию, подписывает разрешение на изъятие в «Акте об изъятии органов у донора-трупа для трансплантации»;
- 2) при необходимости ставит в известность и получает разрешение судмедэксперта;
- 3) в случае наступления необратимой остановки сердечной и дыхательной деятельности организует консилиум врачей-специалистов для констатации смерти человека в соответствии с Приказом МЗ РФ от 04.03.2003 г. № 73.

Органное изъятие выполняется только после получения разрешения администрации стационара и судмедэксперта.

Дальнейшие действия, связанные с выполнением изъятия, осуществляются бригадами центра донорства и трансплантационных центров при содействии и участии ответственного за организацию и контроль выполнения программы органного донорства ЛПУ или ответственного дежурного администратора.

7. ОФОРМЛЕНИЕ ДОКУМЕНТАЦИИ

История болезни оформляется в соответствии с общепринятыми требованиями, предъявляемыми к оформлению медицинской документации.

Время смерти устанавливается в соответствии с «протоколом установления смерти мозга» или с записью консилиума о констатации смерти вследствие необратимой остановки сердечной и дыхательной деятельности. После чего в истории болезни делается запись: *«Констатирована смерть больного в ... ч. ... мин. Труп передан бригаде органного донорства. Подпись врача».*

«Протокол установления смерти мозга» с данными подтверждающих методов исследования вклеивается в историю болезни.

На титульном листе истории болезни лечащим врачом выносятся маркировка *«На патологоанатомическое вскрытие»* или *«На судебно-медицинское вскрытие»* – в зависимости от причины смерти.

После выполнения донорской операции в историю болезни в обязательном порядке вклеивается заполненный и подписанный «Акт об изъятии органов у донора-трупа для трансплантации». Копия акта остается у бригады органного донорства.

Приложение № 1

**Закон Российской Федерации
от 22 декабря 1992 года № 4180-1
«О трансплантации органов и (или) тканей человека»**

*(по состоянию на 14.02.2007 г. в ред. ФЗ № 160-ФЗ от 16.10.2006 г.;
№ 15-ФЗ от 09.02.2007 г.)*

Настоящий Закон определяет условия и порядок трансплантации органов и (или) тканей человека, опираясь на современные достижения науки и медицинской практики, а также учитывая рекомендации Всемирной организации здравоохранения.

Трансплантация (пересадка) органов и (или) тканей человека является средством спасения жизни и восстановления здоровья граждан и должна осуществляться на основе соблюдения законодательства Российской Федерации и прав человека в соответствии с гуманными принципами, провозглашенными международным сообществом, при этом интересы человека должны превалировать над интересами общества или науки.

Раздел I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Статья 1. Условия и порядок трансплантации органов и (или) тканей человека

Трансплантация органов и (или) тканей от живого донора или трупа может быть применена только в случае, если другие медицинские средства не могут гарантировать сохранения жизни больного (реципиента) либо восстановления его здоровья.

Изъятие органов и (или) тканей у живого донора допустимо только в случае, если его здоровью по заключению консилиума врачей-специалистов не будет причинен значительный вред.

Трансплантация органов и (или) тканей допускается исключительно с согласия живого донора и, как правило, с согласия реципиента.

Органы и (или) ткани человека не могут быть предметом купли-продажи. Купля-продажа органов и (или) тканей человека влечет уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Операции по трансплантации органов и (или) тканей реципиентам производятся на основе медицинских показаний в соответствии с общими правилами проведения хирургических операций.

Статья 2. Перечень органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации

Объектами трансплантации могут быть сердце, легкое, почка, печень, костный мозг и другие органы и (или) ткани, перечень которых определяется Министерством здравоохранения Российской Федерации совместно с Российской академией медицинских наук.

Действие настоящего Закона не распространяется на органы, их части и ткани, имеющие отношение к процессу воспроизводства человека, включающие в себя репродуктивные ткани (яйцеклетку, сперму, яичники, яички или эмбрионы), а также на кровь и ее компоненты.

Статья 3. Ограничение круга живых доноров

Изъятие органов и (или) тканей для трансплантации не допускается у живого донора, не достигшего 18 лет (за исключением случаев пересадки костного мозга) либо признанного в установленном порядке недееспособным.

Изъятие органов и (или) тканей не допускается, если установлено, что они принадлежат лицу, страдающему болезнью, представляющей опасность для жизни и здоровья реципиента. Изъятие органов и (или) тканей для трансплантации у лиц, находящихся в служебной или иной зависимости от реципиента, не допускается.

Принуждение любым лицом живого донора к согласию на изъятие у него органов и (или) тканей влечет уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Статья 4. Учреждения здравоохранения, осуществляющие забор, заготовку и трансплантацию органов и (или) тканей человека

Забор и заготовка органов и (или) тканей человека, а также их трансплантация осуществляются в государственных и муниципальных учреждениях здравоохранения.

Перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека, перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, а также правила осуществления деятельности указанных учреждений утверждаются федеральным органом исполнительной власти, осуществляющим функции по выработке государственной политики и нормативно-правовому регулированию в сфере здравоохранения и социального развития, совместно с Российской академией медицинских наук

Статья 5. Медицинское заключение о необходимости трансплантации органов и (или) тканей человека

Медицинское заключение о необходимости трансплантации органов и (или) тканей человека дается консилиумом врачей соответствующего учреждения здравоохранения в составе лечащего врача, хирурга, анестези-

олога, а при необходимости врачей других специальностей на основании инструкции Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Статья 6. Согласие реципиента на трансплантацию органов и (или) тканей человека

Трансплантация органов и (или) тканей человека осуществляется с письменного согласия реципиента. При этом реципиент должен быть предупрежден о возможных осложнениях для его здоровья в связи с предстоящим оперативным вмешательством. Если реципиент не достиг 18 лет либо признан в установленном порядке недееспособным, то такая пересадка осуществляется с письменного согласия его родителей или законного представителя.

Пересадка органов и (или) тканей реципиенту без его согласия либо без согласия его родителей или законного представителя производится в исключительных случаях, когда промедление в проведении соответствующей операции угрожает жизни реципиента, а получить такое согласие невозможно.

Статья 7. Действие международных договоров

Если международным договором, в котором участвует Российская Федерация, установлены иные правила, чем те, которые указаны в настоящем Законе, то действуют правила международного договора.

Раздел II. ИЗЪЯТИЕ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ У ТРУПА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Статья 8. Презумпция согласия на изъятие органов и (или) тканей

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 его органов и (или) тканей после смерти для трансплантации реципиенту.

Статья 9. Определение момента смерти

Органы и (или) ткани могут быть изъяты у трупа для трансплантации, если имеются бесспорные доказательства факта смерти, зафиксированного консилиумом врачей-специалистов.

Заключение о смерти дается на основе констатации необратимой гибели всего головного мозга (смерть мозга), установленной в соответствии с процедурой, утвержденной Министерством здравоохранения Российской Федерации.

В диагностике смерти в случае предполагаемого использования в качестве донора умершего запрещается участие трансплантологов и членов бригад, обеспечивающих работу донорской службы и оплачиваемых ею.

Статья 10. Разрешение на изъятие органов и (или) тканей у трупа

Изъятие органов и (или) тканей у трупа производится с разрешения главного врача учреждения здравоохранения при условии соблюдения требований настоящего Закона.

В том случае, когда требуется проведение судебно-медицинской экспертизы, разрешение на изъятие органов и (или) тканей у трупа должно быть дано также судебно-медицинским экспертом с уведомлением об этом прокурора.

Раздел III. ИЗЪЯТИЕ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ У ЖИВОГО ДОНОРА ДЛЯ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Статья 11. Условия изъятия органов и (или) тканей у живого донора

Изъятие органов и (или) тканей у живого донора для их трансплантации может осуществляться только в интересах здоровья реципиента и в случае отсутствия пригодных для трансплантации органов и (или) тканей трупа или альтернативного метода лечения, эффективность которого сопоставима с эффективностью трансплантации органов и (или) тканей.

Изъятие органов и (или) тканей у живого донора для трансплантации реципиенту допускается при соблюдении следующих условий:

если донор предупрежден о возможных осложнениях для его здоровья в связи с предстоящим оперативным вмешательством по изъятию органов и (или) тканей;

если донор свободно и сознательно в письменной форме выразил согласие на изъятие своих органов и (или) тканей;

если донор прошел всестороннее медицинское обследование и имеет заключение консилиума врачей-специалистов о возможности изъятия у него органов и (или) тканей для трансплантации.

Изъятие у живого донора органов допускается, если он находится с реципиентом в генетической связи, за исключением случаев пересадки костного мозга.

Статья 12. Права донора

Донор, изъявивший согласие на пересадку своих органов и (или) тканей, вправе:

требовать от учреждения здравоохранения полной информации о возможных осложнениях для его здоровья в связи с предстоящим оперативным вмешательством по изъятию органов и (или) тканей;

получать бесплатное лечение, в том числе медикаментозное, в учреждении здравоохранения в связи с проведенной операцией.

Статья 13. Ограничения при пересадке органов и (или) тканей у живого донора

У живого донора может быть изъят для трансплантации парный орган, часть органа или ткань, отсутствие которых не влечет за собой необратимого расстройства здоровья.

Раздел IV. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ УЧРЕЖДЕНИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И ЕГО ПЕРСОНАЛА

Статья 14. Ответственность за разглашение сведений о доноре и реципиенте

Врачам и иным сотрудникам учреждения здравоохранения запрещается разглашать сведения о доноре и реципиенте.

Разглашение таких сведений влечет ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Статья 15. Недопустимость продажи органов и (или) тканей человека

Учреждению здравоохранения, которому разрешено проводить операции по забору и заготовке органов и (или) тканей у трупа, запрещается осуществлять их продажу.

Действие настоящего Закона не распространяется на препараты и пересадочные материалы, для приготовления которых использованы тканевые компоненты.

Статья 16. Ответственность учреждения здравоохранения

Если здоровью донора или реципиента причинен вред, связанный с нарушением условий и порядка изъятия органов и (или) тканей либо условий и порядка трансплантации, предусмотренных настоящим Законом, учреждение здравоохранения несет материальную ответственность перед указанными лицами в порядке, установленном законодательством Российской Федерации.

Президент Российской Федерации

Приложение № 2

Зарегистрировано в Минюсте РФ
17 января 2002 г. № 3170

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ
от 20 декабря 2001 г. № 460

**ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ИНСТРУКЦИИ
ПО КОНСТАТАЦИИ СМЕРТИ ЧЕЛОВЕКА
НА ОСНОВАНИИ ДИАГНОЗА СМЕРТИ МОЗГА**

В соответствии с Законом Российской Федерации от 22 декабря 1992 г. № 4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (Ведомости Съезда народных депутатов Российской Федерации и Верховного Совета Российской Федерации, 1993, № 2, ст. 62) приказываю:

Утвердить Инструкцию по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга.

Министр
Ю.Л. Шевченко

Приложение
Утверждено
Приказом Минздрава России
от 20.12.2001 № 460

**ИНСТРУКЦИЯ ПО КОНСТАТАЦИИ СМЕРТИ
ЧЕЛОВЕКА НА ОСНОВАНИИ ДИАГНОЗА
СМЕРТИ МОЗГА**

I. Общие сведения

Смерть мозга наступает при полном и необратимом прекращении всех функций головного мозга, регистрируемом при работающем сердце и искусственной вентиляции легких. Смерть мозга эквивалентна смерти человека.

Решающим для констатации смерти мозга является сочетание факта прекращения функций всего головного мозга с доказательством необратимости этого прекращения.

Право на установление диагноза смерти мозга дает наличие точной информации о причинах и механизмах развития этого состояния. Смерть мозга может развиваться в результате его первичного или вторичного повреждения.

Смерть мозга в результате его первичного повреждения развивается вследствие резкого повышения внутричерепного давления и обусловленного им прекращения мозгового кровообращения (тяжелая закрытая черепно-мозговая травма, спонтанные и иные внутричерепные кровоизлияния, инфаркт мозга, опухоли мозга, закрытая острая гидроцефалия и др.), а также вследствие открытой черепно-мозговой травмы, внутричерепных оперативных вмешательств на мозге и др.

Вторичное повреждение мозга возникает в результате гипоксии различного генеза, в т. ч. при остановке сердца и прекращении или резком ухудшении системного кровообращения вследствие длительно продолжающегося шока и др.

II. Условия для установления диагноза смерти мозга

Диагноз смерти мозга не рассматривается до тех пор, пока не исключены следующие воздействия: интоксикации, включая лекарственные, первичная гипотермия, гиповолемический шок, метаболические эндокринные комы, а также применение наркотизирующих средств и миорелаксантов.

Поэтому первое и неперемное условие установления диагноза смерти мозга заключается в доказательстве отсутствия воздействия лекарственных препаратов, угнетающих ЦНС и нервно-мышечную передачу, интоксикаций, метаболических нарушений (в том числе тяжелых электролитных, кислотно-основных, а также эндокринных) и инфекционных поражений мозга. Во время клинического обследования больного ректальная температура должна быть стабильно выше 32 °С, систолическое артериальное давление не ниже 90 мм рт. ст. (при более низком АД оно должно быть поднято внутривенным введением вазопрессорных препаратов). При наличии интоксикации, установленной в результате токсикологического исследования, диагноз смерти мозга до исчезновения ее признаков не рассматривается.

III. Комплекс клинических критериев, наличие которых обязательно для установления диагноза смерти мозга

3.1. Полное и устойчивое отсутствие сознания (кома).

3.2. Атония всех мышц.

3.3. Отсутствие реакции на сильные болевые раздражения в области тригеминальных точек и любых других рефлексов, замыкающихся выше шейного отдела спинного мозга.

3.4. Отсутствие реакции зрачков на прямой яркий свет. При этом должно быть известно, что никаких препаратов, расширяющих зрачки, не применялось. Глазные яблоки неподвижны.

3.5. Отсутствие корнеальных рефлексов.

3.6. Отсутствие окулоцефалических рефлексов.

Для вызывания окулоцефалических рефлексов врач занимает положение у изголовья кровати так, чтобы голова больного удерживалась между кистями врача, а большие пальцы приподнимали веки. Голова поворачивается на 90 градусов в одну сторону и удерживается в этом положении 3–4 с, затем – в противоположную сторону на то же время. Если при поворотах головы движений глаз не происходит и они стойко сохраняют срединное положение, то это свидетельствует об отсутствии окулоцефалических рефлексов. Окулоцефалические рефлексы не исследуются при наличии или при подозрении на травматическое повреждение шейного отдела позвоночника.

3.7. Отсутствие окуловестибулярных рефлексов. Для исследования окуловестибулярных рефлексов проводится двусторонняя калорическая проба. До ее проведения необходимо убедиться в отсутствии перфорации барабанных перепонок. Голову больного поднимают на 30 градусов выше горизонтального уровня. В наружный слуховой проход вводится катетер малых размеров, производится медленное орошение наружного слухового прохода холодной водой (температура +20 град. С, 100 мл) в течение 10 с. При сохранной функции ствола головного мозга через 20–25 с появляется нистагм или отклонение глаз в сторону медленного компонента нистагма. Отсутствие нистагма или отклонения глазных яблок при калорической пробе, выполненной с двух сторон, свидетельствует об отсутствии окуловестибулярных рефлексов.

3.8. Отсутствие фарингеальных и трахеальных рефлексов, которые определяются путем движения эндотрахеальной трубки в трахее и верхних дыхательных путях, а также при продвижении катетера в бронхах для аспирации секрета.

3.9. Отсутствие самостоятельного дыхания. Регистрация отсутствия дыхания не допускается простым отключением от аппарата ИВЛ, так как развивающаяся при этом гипоксия оказывает вредное влияние на организм и прежде всего на мозг и сердце. Отключение больного от аппарата ИВЛ должно производиться с помощью специально разработанного разъединительного теста (тест апноэтической оксигенации).

Разъединительный тест проводится после того, как получены результаты по пп. 3.1–3.8. Тест состоит из трех элементов:

а) для мониторинга газового состава крови (PaO_2 и PaCO_2) должна быть канюлирована одна из артерий конечности;

б) перед отсоединением вентилятора необходимо в течение 10–15 минут проводить ИВЛ в режиме, обеспечивающем нормокапнию (PaCO_2 – 35–45 мм рт. ст.) и гипероксию (PaO_2 не менее 200 мм рт. ст.) – $\text{FiO}_2 =$

1,0 (т. е. 100% кислород), подобранная VE (минутная вентиляция легких), оптимальный РЕЕР (ПКЭД – положительное конечное экспираторное давление);

в) после выполнения пп. а и б аппарат ИВЛ отключают и в эндотрахеальную или трахеостомическую трубку подают увлажненный 100% кислород со скоростью 6 л в минуту. В это время происходит накопление эндогенной углекислоты, контролируемое путем забора проб артериальной крови. Этапы контроля газов крови следующие: 1) до начала теста в условиях ИВЛ; 2) через 10–15 минут после начала ИВЛ 100% кислородом; 3) сразу после отключения от ИВЛ, далее через каждые 10 минут пока $PaCO_2$ не достигнет 60 мм рт. ст. Если при этих или более высоких значениях $PaCO_2$ спонтанные дыхательные движения не восстанавливаются, разъединительный тест свидетельствует об отсутствии функций дыхательного центра ствола головного мозга. При появлении минимальных дыхательных движений ИВЛ немедленно возобновляется.

IV. Дополнительные (подтверждающие) тесты к комплексу клинических критериев при установлении диагноза смерти мозга

Диагноз смерти мозга может быть достоверно установлен на основании клинических тестов (см. пп. 3.1–3.9). Дополнительные тесты выполняются после выявления признаков, описанных в пп. 3.1–3.9. ЭЭГ-исследование (см. п. 4.1) обязательно проводится для подтверждения клинического диагноза смерти мозга во всех ситуациях, где имеются сложности в выполнении пп. 3.6–3.7 (травма или подозрение на травму шейного отдела позвоночника, перфорация барабанных перепонок). Панангиография магистральных артерий головы (см. п. 4.2) проводится для укорочения необходимой продолжительности наблюдения (см. п. 5).

4.1. Установление отсутствия электрической активности мозга выполняется в соответствии с международными положениями электроэнцефалографического исследования в условиях смерти мозга. За электрическое молчание мозга принимается запись ЭЭГ, в которой амплитуда активности от пика до пика не превышает 2 мкВ, при записи от скальповых электродов с расстоянием между ними не меньше 10 см и при сопротивлении до 10 кОм, но не меньше 100 Ом. Используются игольчатые электроды, не менее 8, расположенные по системе «10–20%», и 2 ушных электрода. Межэлектродное сопротивление должно быть не менее 100 Ом и не более 10 кОм, межэлектродное расстояние – не менее 10 см. Необходимо определение сохранности коммутаций и отсутствия непредумышленного или умышленного создания электродных артефактов. Запись проводится на каналах энцефалографа с постоянной времени не менее 0,3 с при чувствительности не больше 2 мкВ/мм (верхняя граница полосы пропускания частот не ниже 30 Гц). Используются аппараты, имеющие не менее 8 каналов. ЭЭГ регистрируется при би- и монополярных отведениях. Электрическое молчание коры мозга в этих условиях должно сохраняться не менее 30 ми-

нут непрерывной регистрации. При наличии сомнений в электрическом молчании мозга необходима повторная регистрация ЭЭГ. Оценка реактивности ЭЭГ на свет, громкий звук и боль: общее время стимуляции световыми вспышками, звуковыми стимулами и болевыми раздражениями не менее 10 минут. Источник вспышек, подаваемых с частотой от 1 до 30 Гц, должен находиться на расстоянии 20 см от глаз. Интенсивность звуковых раздражителей (щелчков) – 100 дБ. Динамик находится около уха больного. Стимулы максимальной интенсивности генерируются стандартными фото- и фоностимуляторами. Для болевых раздражений применяются сильные уколы кожи иглой.

ЭЭГ, зарегистрированная по телефону, не может быть использована для определения электрического молчания мозга.

4.2. При определении отсутствия мозгового кровообращения производится контрастная двукратная панангиография четырех магистральных сосудов головы (общие сонные и позвоночные артерии) с интервалом не менее 30 минут. Среднее артериальное давление во время ангиографии должно быть не менее 80 мм рт. ст.

Если при ангиографии выявляется, что ни одна из внутримозговых артерий не заполняется контрастным веществом, то это свидетельствует о прекращении мозгового кровообращения.

V. Продолжительность наблюдения

5.1. При первичном поражении мозга для установления клинической картины смерти мозга длительность наблюдения должна быть не менее 6 часов с момента первого установления признаков, описанных в пп. 3.1–3.9. По окончании этого времени проводится повторная регистрация результатов неврологического осмотра, выявляющая выпадение функций мозга согласно пп. 3.1–3.8. Разъединительный тест (см. п. 3.9) повторно не выполняется. Данный период наблюдения может быть сокращен, если сразу же после установления выпадения функций мозга в соответствии с пп. 3.1–3.9 проводится двукратная панангиография магистральных артерий головы, выявляющая прекращение мозгового кровообращения (см. п. 4.2). В данной ситуации смерть мозга констатируется без дальнейшего наблюдения.

5.2. При вторичном поражении мозга для установления клинической картины смерти мозга длительность наблюдения должна быть не менее 24 часов с момента первого установления признаков, описанных в пп. 3.1–3.9, а при подозрении на интоксикацию длительность наблюдения увеличивается до 72 часов. В течение этих сроков каждые 2 часа производится регистрация результатов неврологических осмотров, выявляющих выпадение функций мозга в соответствии с пп. 3.1–3.8. Данный период наблюдения также может быть сокращен, если сразу же после установления выпадения функций мозга в соответствии с пп. 3.1–3.9 проводится двукратная панангиография магистральных артерий головы, выявляющая прекращение мозгового кровообращения (см. п. 4.2).

При проведении регистрации неврологических осмотров необходимо учитывать, что спинальные рефлексы и автоматизмы могут наблюдаться в условиях продолжающейся ИВЛ.

VI. Установление диагноза смерти мозга и документация

6.1. Диагноз смерти мозга устанавливается комиссией врачей лечебно-профилактического учреждения, где находится больной, в составе реаниматолога-анестезиолога с опытом работы в отделении интенсивной терапии и реанимации не менее 5 лет и невролога с таким же стажем работы по специальности. Для проведения специальных исследований в состав комиссии включаются специалисты по дополнительным методам исследований с опытом работы по специальности не менее 5 лет, в том числе и приглашаемые из других учреждений на консультативной основе. Назначение состава комиссии и утверждение Протокола установления смерти мозга производится заведующим реанимационным отделением, где находится больной, а во время его отсутствия – ответственным дежурным врачом учреждения.

6.2. В комиссию не могут включаться специалисты, принимающие участие в заборе и трансплантации органов.

6.3. Основным документом является Протокол установления смерти мозга, который имеет значение для прекращения реанимационных мероприятий и для изъятия органов. В Протоколе установления смерти мозга должны быть указаны данные всех исследований, фамилии, имена и отчества врачей – членов комиссии, их подписи, дата, час регистрации смерти мозга и, следовательно, смерти человека (приложение).

6.4. Ответственными за постановку диагноза смерти человека являются врачи, установившие смерть мозга, того лечебно-профилактического учреждения, где больной умер.

6.5. Настоящая Инструкция не распространяется на установление смерти мозга у детей.

Приложение

к Инструкции по констатации
смерти человека на основании
диагноза смерти мозга

ПРОТОКОЛ УСТАНОВЛЕНИЯ СМЕРТИ МОЗГА

Фамилия Имя Отчество _____

Дата рождения _____

Возраст _____

№ истории болезни _____

Диагноз заболевания, приведшего к смерти мозга _____

Комиссия в составе:

врача-анестезиолога-реаниматолога _____

врача-невролога _____

врачей-специалистов _____

в течение _____ часов обследовали состояние больного

и констатируют, что:

I. Исключены следующие факторы,
препятствующие установлению диагноза смерти мозга
(констатация факторов отмечается словом «исключено»)

Артериальное систолическое давление ниже 90 мм рт. ст.

(указать цифры) _____

Ректальная температура ниже 32 °С

(указать цифры) _____

– интоксикации, включая лекарственные _____

– миорелаксанты _____

– наркотизирующие средства _____

– метаболические или эндокринные комы _____

– гиповолемический шок _____

– первичная гипотермия _____

II. Зарегистрированы следующие признаки,
указывающие на прекращение функции больших полушарий
и ствола головного мозга
(констатация признаков и данных дополнительных тестов
отмечается словом «да»)

полное и устойчивое отсутствие сознания (кома) _____

отсутствие самостоятельного дыхания _____

отсутствие реакции на сильные болевые раздражители (надавливание
на тригеминальные точки, грудину) и любых других рефлексов,
замыкающихся выше шейного отдела спинного мозга _____

атония всех мышц _____

зрачки не реагируют на свет _____

диаметр зрачков больше 5 мм _____

отсутствие корнеальных рефлексов _____

отсутствие окулоцефалических рефлексов _____

отсутствие окуловестибулярных рефлексов _____

отсутствие фарингеальных и трахеальных рефлексов (при движении
эндотрахеальной трубки и санации дыхательных путей) _____

отсутствие самостоятельного дыхания во время разъединительного теста
(уровень PaCO_2 должен быть не менее 60 мм рт. ст.) _____

а) PaCO_2 в конце проверки апноэ (указать цифры) _____

б) PaO_2 в конце проверки апноэ (в мм рт. ст.) _____

III. Дополнительные (подтверждающие) тесты
(констатация данных дополнительных тестов
отмечается словом «да»)

А. Электроэнцефалограмма (полное электрическое молчание мозга) _____

Б. Церебральная панангиография (отсутствие заполнения внутримозговых
артерий) _____

IV. Комментарии

V. Заключение

Рассмотрев вышеуказанные результаты и руководствуясь в их трактовке Инструкцией по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга, свидетельствуем о смерти больного (фамилия, имя, отчество)

на основании смерти мозга.

Дата _____ (число, месяц, год)
время смерти _____

Подписи врачей, входящих в комиссию:

Приложение № 3

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ПРИКАЗ № 73
от 04.03.2003 г. Москва

**ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ИНСТРУКЦИИ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КРИТЕРИЕВ И ПОРЯДКА
ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОМЕНТА СМЕРТИ ЧЕЛОВЕКА,
ПРЕКРАЩЕНИЯ РЕАНИМАЦИОННЫХ
МЕРОПРИЯТИЙ**

В соответствии со статьей 46 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан от 22 июля 1993 г. № 5487-1 (Ведомости Съезда народных депутатов Российской Федерации и Верховного Совета Российской Федерации, 1993, № 33)

ПРИКАЗЫВАЮ:

Утвердить Инструкцию по определению критериев и порядка определения момента смерти человека, прекращения реанимационных мероприятий (приложение).

Министр
Ю.Л. Шевченко

ИНСТРУКЦИЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ КРИТЕРИЕВ И ПОРЯДКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОМЕНТА СМЕРТИ ЧЕЛОВЕКА, ПРЕКРАЩЕНИЯ РЕАНИМАЦИОННЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

I. Общие сведения

1. Смерть человека наступает в результате гибели организма как целого. В процессе умирания выделяют стадии: агонию, клиническую смерть, смерть мозга и биологическую смерть.

Агония характеризуется прогрессивным угасанием внешних признаков жизнедеятельности организма (сознания, кровообращения, дыхания, двигательной активности).

При клинической смерти патологические изменения во всех органах и системах носят полностью обратимый характер.

Смерть мозга проявляется развитием необратимых изменений в головном мозге, а в других органах и системах частично или полностью обратимых.

Биологическая смерть выражается посмертными изменениями во всех органах и системах, которые носят постоянный, необратимый, трупный характер.

2. Посмертные изменения имеют функциональные, инструментальные, биологические и трупные признаки:

2.1. Функциональные признаки:

- а) Отсутствие сознания.
- б) Отсутствие дыхания, пульса, артериального давления.
- в) Отсутствие рефлекторных ответов на все виды раздражителей.

2.2. Инструментальные признаки:

- а) Электроэнцефалографические.
- б) Ангиографические.

2.3. Биологические признаки:

- а) Максимальное расширение зрачков.
- б) Бледность и/или цианоз, и/или мраморность (пятнистость) кожных покровов.
- в) Снижение температуры тела.

2.4. Трупные изменения:

- а) Ранние признаки.
- б) Поздние признаки.

II. Констатация смерти человека

Констатация смерти человека наступает при смерти мозга или биологической смерти человека (необратимой гибели человека).

Биологическая смерть устанавливается на основании наличия трупных изменений (ранние признаки, поздние признаки).

Диагноз смерть мозга устанавливается в учреждениях здравоохранения, имеющих необходимые условия для констатации смерти мозга.

Смерть человека на основании смерти мозга устанавливается в соответствии с Инструкцией по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга, утвержденной приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20.12.2001 г. № 460 «Об утверждении Инструкции по констатации смерти человека на основании диагноза смерти мозга» (приказ зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 17 января 2002 г. № 3170).

III. Прекращение реанимационных мероприятий

4. Реанимационные мероприятия прекращаются только при признании этих мер абсолютно бесперспективными или констатации биологической смерти, а именно:

- при констатации смерти человека на основании смерти головного мозга, в том числе на фоне неэффективного применения полного комплекса мероприятий, направленных на поддержание жизни;
- при неэффективности реанимационных мероприятий, направленных на восстановление жизненно важных функций в течение 30 минут.

5. Реанимационные мероприятия не проводятся:

- а) при наличии признаков биологической смерти;
- б) при наступлении состояния клинической смерти на фоне прогрессирования достоверно установленных неизлечимых заболеваний или неизлечимых последствий острой травмы, не совместимой с жизнью.

Зарегистрировано в Минюсте РФ
19 июня 2007 г. № 9672

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
№ 357
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
№ 40

ПРИКАЗ
от 25 мая 2007 года

**ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ОРГАНОВ
И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА – ОБЪЕКТОВ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ, ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ
ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ
ЧЕЛОВЕКА, И ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ЗАБОР
И ЗАГОТОВКУ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА**

В соответствии со статьей 4 Закона Российской Федерации от 22 декабря 1992 г. № 4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (Ведомости Съезда народных депутатов Российской Федерации и Верховного Совета Российской Федерации, 1993, № 2, ст. 62; Собрание законодательства Российской Федерации, 2000, № 26, ст. 2738; 2006, № 43, ст. 4412; 2007, № 7, ст. 836) и с целью совершенствования оказания трансплантологической помощи населению Российской Федерации приказываю:

1. Утвердить:

Перечень органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации – согласно приложению № 1;

Перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека согласно приложению № 2;

Перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека согласно приложению № 3.

2. Признать утратившим силу:

Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 15 января 2002 г. № 3159);

Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 4 марта 2003 г. № 83/23 «О внесении дополнений в Приказ Минздрава России и РАМН от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 26 марта 2003 г. № 4328);

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 16 мая 2005 г. № 337/30 «О внесении дополнений в Приказ Минздрава России и РАМН от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 6 июня 2005 г. № 6684);

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 20 января 2006 г. № 31/2 «О внесении дополнений в Приказ Минздрава России и РАМН от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 3 февраля 2006 г. № 7446);

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 18 июля 2006 г. № 542/51 «О внесении дополнений в Приказ Минздрава России и РАМН от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 24 июля 2006 г. № 8106);

Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 9 апреля 2007 г. № 252/24 «О внесении дополнений в Приказ Минздрава России и РАМН от 13 декабря 2001 г. № 448/106 «Об утверждении Перечня органов человека – объектов трансплантации и Перечня учреждений здравоохранения, которым разрешено осуществлять трансплантацию органов» (зарегистрирован Минюстом России 27 апреля 2007 г. № 9361).

*Вр. и. о. министра
здравоохранения и социального развития
Российской Федерации
В.И. СТАРОДУБОВ*

*Президент Российской академии
медицинских наук
М.И. ДАВЫДОВ*

ПЕРЕЧЕНЬ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА – ОБЪЕКТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Органы

1. Сердце.
2. Легкое.
3. Комплекс сердце–легкое.
4. Печень.
5. Почка.
6. Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой.
7. Селезенка.
8. Эндокринные железы (гипофиз, надпочечники, щитовидная железа, паращитовидная железа, слюнная железа, яичко*).
9. Кишечник и его фрагменты.

Ткани

1. Костный мозг.
2. Трахея.
3. Глазное яблоко (роговица, склера, хрусталик, сетчатка).
4. Верхняя конечность и ее фрагменты**.
5. Нижняя конечность и ее фрагменты**.
6. Твердая мозговая оболочка.
7. Кости свода черепа.
8. Нижняя челюсть.
9. Височная фасция.
10. Сосуды (участки сосудистого русла).
11. Сухожилие длинного сгибателя большого пальца.
12. Сухожилие передней большеберцовой мышцы.
13. Широчайшая фасция бедра.
14. Реберный хрящ.
15. Дермальный слой кожи.
16. Подкожно-жировая клетчатка подошвенной области стопы.
17. Фиброзная капсула почки.
18. Серозная капсула печени.
19. Белочная оболочка яичка.

* В эндокринных целях, но не в репродуктивных.

** Требуют проведения забора, типирования, консервации и трансплантации в условиях, аналогичных таковым для органов.

Приложение № 2
к Приказу Минздравсоцразвития России и РАМН
от 25 мая 2007 г. № 357/40

ПЕРЕЧЕНЬ УЧРЕЖДЕНИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Федеральные учреждения здравоохранения

№ п/п	Наименование	Адрес учреждения	Вид трансплан- тации	Примерное закрепление территорий
1	2	3	4	5
1	Федеральное государственное учреждение «Северный медицинский центр им. Семашко Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	163000, г. Архангельск, Троицкий проезд, д.115	Почка	Все субъекты Российской Федерации
2	Федеральное государственное учреждение «Дальневосточный окружной медицинский центр Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, д. 151	Почка Печень	Хабаровский край, Еврейская автономная область
3	Федеральное государственное учреждение «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Росмедтехнологии»	610027, г. Киров, ул. Красноармейская, д. 72,	Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
4	Федеральное государственное учреждение «Российский центр функциональной хирургической гастроэнтерологии Росмедтехнологии»	350000, г. Краснодар, ул. Седина, д. 4	Печень	Все субъекты Российской Федерации
5	Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Росмедтехнологии»	132182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1	Сердце Легкое Почка Печень Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы	Все субъекты Российской Федерации

1	2	3	4	5
6	Государственное учреждение «Российский научный центр хирургии РАМН»	119992, г. Москва, Абрикосовский пер, д. 2	Сердце Легкое Печень Почка Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы	Все субъекты Российской Федерации
7	Государственное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН»	121552, г. Москва, Рублевское шоссе, д. 135	Сердце Сосуды Легкое Почка	Все субъекты Российской Федерации
8	Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней РАМН»	119021, г. Москва, ул. Россолимо, д. 11а	Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации
9	Федеральное государственное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологии»	121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15а	Сердце	Все субъекты Российской Федерации
10	Федеральное государственное учреждение «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70	Почка	Все субъекты Российской Федерации
11	Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт урологии Росмедтехнологии»	105425, г. Москва, ул. 3-я Парковая, д. 51	Почка	Все субъекты Российской Федерации
12	Российская детская клиническая больница Росздрава	117513, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117	Почка Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
13	Государственное учреждение «Гематологический научный центр РАМН»	125167, г. Москва, Новозыковский пер., д. 4а	Почка Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации

1	2	3	4	5
14	Государственное учреждение «Онкологический научный центр РАМН»	115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24	Печень	Все субъекты Российской Федерации
15	Федеральное государственное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. адемика С.Н. Федорова Росмедтехнологии»	127468, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а	Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации
16	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	119881, г. Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2-6	Почка	Все субъекты Российской Федерации
17	Федеральное государственное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца Росмедтехнологии»	105062, г. Москва, ул. Садовая-Черногрозская, д. 14/19	Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации
18	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 6 Федерального медико-биологического агентства»	123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23	Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
19	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 119 Федерального медико-биологического агентства»	141435, Московская область, Химкинский р-н, п/о Новогорск	Почка	Все субъекты Российской Федерации
20	Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН»	630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, д. 14	Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
21	Федеральное государственное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологии»	630055, г. Новосибирск, ул. Речуновская, д. 15	Сердце Почка	Все субъекты Российской Федерации

IV. Методические рекомендации

1	2	3	4	5
22	Федеральное государственное учреждение «Приволжский окружной медицинский центр Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	603001, г. Н. Новгород, Нижне-Волжская наб., д. 2	Почка Печень	Все субъекты Российской Федерации
23	Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт кардиологии Томского научного центра СО РАМН»	634012, г. Томск, ул. Киевская, д. 111а	Сердце	Все субъекты Российской Федерации
24	Федеральное государственное учреждение «Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт Росмедтехнологии»	197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70	Печень Почка	Все субъекты Российской Федерации
25	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии имени В.А. Алмазова Росмедтехнологии»	194156, г. Санкт-Петербург, ул. Пархоменко, д. 15	Сердце Легкое	Все субъекты Российской Федерации
26	Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	195067, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8	Легкое Почка Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
27	Федеральное государственное учреждение «Российский ордена Трудового Красного Знамени, ордена Дружбы народов научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Росмедтехнологии»	193024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 6	Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации
28	Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	410026, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112	Почка	Все субъекты Российской Федерации

1	2	3	4	5
29	Государственное учреждение «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	443079, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89	Почка Печень Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой	Все субъекты Российской Федерации
30	Государственное учреждение науки «Научно-исследовательский институт онкологии им. проф. Н.Н. Петрова Росмедтехнологии»	197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68	Костный мозг	Все субъекты Российской Федерации

Учреждения здравоохранения субъектов Российской Федерации

1	2	3	4	5
31	Государственное учреждение здравоохранения «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа»	308007, г. Белгород, ул. Некрасова, д. 8/9	Почка Печень	Белгородская область
32	Государственное учреждение здравоохранения «Волгоградский областной уронефрологический центр»	404120, Волгоградская область, г. Волжский, ул. Карбышева, д. 86	Почка Печень Поджелудочная железа	Волгоградская область
33	Государственное учреждение здравоохранения «Воронежская областная клиническая больница № 1»	394066, г. Воронеж, Московский проспект, д. 151	Почка	Воронежская область
34	Государственное учреждение здравоохранения «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница»	394036, г. Воронеж, ул. Революции 1905 года, д. 22	Роговица человека трупная	Воронежская область
35	Государственное учреждение здравоохранения «Свердловская областная клиническая больница № 1»	620102, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, д. 185	Почка Печень Сердце	Свердловская область
36	Государственное учреждение здравоохранения «Офтальмологическая клиническая больница» Минздрава Удмуртской Республики	426009, г. Ижевск, ул. Ленина, д. 98-а	Роговица человека трупная	Удмуртская Республика

IV. Методические рекомендации

1	2	3	4	5
37	Государственное учреждение здравоохранения «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница»	664079, г. Иркутск, микрорайон Юбилейный, д. 100	Почка	Иркутская область
38	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского»	350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167	Почка	Краснодарс- кий край
39	Государственное учреждение здравоохранения «Кемеровская областная клиническая больница»	650061, г. Кемерово, проспект Октябрьский, д. 22	Почка Поджелудоч- ная железа	Кемеровская область
40	Государственное медицинское учреждение «Республиканская клиническая больница» Республики Татарстан	420064, г. Казань, ул. Орен- бургский тракт, д. 138	Почка	Республика Татарстан
41	Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского	129100, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2	Почка	Московская область
42	Государственное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского»	129010, г. Москва, Сухаревская площадь, д. 3	Печень Поджелудоч- ная железа Почка Сердце	г. Москва
43	Государственное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 7»	115446, г. Москва, Коломенский проезд, д. 4	Почка	г. Москва
44	Государственное учреждение здравоохранения «Офтальмологическая клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы»	103001, г. Москва, пер. Садовс- ких, д. 7	Роговица человека трупная	г. Москва
45	Областное государственное учреждение здравоохранения «Государственная Новосибирская областная клиническая больница»	630087, г. Новоси- бирск, ул. Немиро- вича-Данчен- ко, д. 130	Почка	Новосибирс- кая область

1	2	3	4	5
46	Государственное учреждение «Санкт-Петербургский государственный научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»	192242, г. Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3	Почка	г. Санкт-Петербург
47	Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городская больница № 31»	197110, г. Санкт-Петербург, проезд Динамо, д. 3	Почка	г. Санкт-Петербург
48	Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городская многопрофильная больница № 2»	194354, г. Санкт-Петербург, Учебный пер. д. 5,	Легкое	г. Санкт-Петербург
49	Государственное учреждение здравоохранения «Самарская клиническая офтальмологическая больница им. Т.И. Брошевского»	443068, г. Самара, ул. Новосадовая, д. 158	Роговица человека трупная	г. Самара
50	Государственное медицинское учреждение «Саратовская областная клиническая больница»	410053, г. Саратов, Смирновское ущелье, д. 1	Почка	Саратовская область
51	Государственное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница»	194291, г. Санкт-Петербург, проспект Луначарского, д. 45-49	Почка	Ленинградская область
52	Государственное лечебно-профилактическое учреждение «Тюменская областная клиническая больница»	625023, г. Тюмень, ул. Котовского, д. 55	Почка	Тюменская область
53	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова Республики Башкортостан»	450005, г. Уфа, ул. Достоевского, д. 132	Почка	Республика Башкортостан
54	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская детская клиническая больница» Республики Башкортостан	450106, г. Уфа, ул. Ст. Кувыкина, д. 98	Почка	Республика Башкортостан

IV. Методические рекомендации

1	2	3	4	5
55	Государственное учреждение «Уфимский НИИ глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»	450077, г. Уфа, ул. Пушкина, д. 90	Роговица человека трупная	Республика Башкортос- тан
56	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 1» им. проф. С.И. Сергеева Минздрава Хабаровского края	680009, г. Хабаровск, ул. Красно- дарская, д. 9	Почка	Хабаровский край
57	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая офтальмологическая больница Минздрава Республики Чувашия»	428014, г. Чебоксары, ул. Ашмари- на, д. 85	Роговица человека трупная	Республика Чувашия
58	Государственное учреждение «Республиканская больница № 1 Национальный центр медицины» Минздрава Республики Саха (Якутия)	677019, г. Якутск, Сергеляхское шоссе, д. 4	Почка родс- твенная	Республика Саха (Якутия)
59	Ярославская областная клиническая больница	150062, г. Ярославль, ул. Яковлевс- кая, д. 7	Почка	Ярославская область

Муниципальные учреждения здравоохранения

1	2	3	4	5
60	Муниципальное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи» г. Владимира	600000, г. Владимир, ул. Горького, д. 5	Почка	Владимирс- кая область
61	Муниципальное медицинское учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1»	460040, г. Оренбург, пр. Гагарина, д. 23	Почка	Оренбургская область
62	Муниципальное учреждение здравоохранения «Омская городская клиническая больница № 1 имени А.Н. Кабанова»	644112, г. Омск, ул. Перелета, д. 7	Почка Печень Поджелудоч- ная железа	Омская область
63	Муниципальное учреждение здравоохранения «Клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.В. Соловьева»	150003, г. Ярославль, Загородный сад, д. 11	Конечности	Ярославская область

Другие ведомственные учреждения здравоохранения

1	2	3	4	5
64	Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко Министерства обороны Российской Федерации	111229, г. Москва, Госпитальная площадь, д. 3	Почка	Все субъекты Российской Федерации
65	Российская военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации	194044, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, д. 6	Почка Сердце Легкое Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации

Приложение № 3
к Приказу
Минздравсоцразвития России и РАМН
от 25 мая 2007 г. № 357/40

ПЕРЕЧЕНЬ УЧРЕЖДЕНИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ЗАБОР И ЗАГОТОВКУ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Федеральные учреждения здравоохранения

№ п/п	Наименование учреждения	Адрес	Вид трансплантации
1	2	3	4
1	Федеральное государственное учреждение «Дальневосточный медицинский центр» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостока, д. 151	Почка Печень
2	Федеральное государственное учреждение «Российский центр функциональной хирургической гастроэнтерологии Росмедтехнологии»	350000, г. Краснодар, ул. Седина, д. 4	Печень
3	Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт трансплантологии и искусственных органов Росмедтехнологии»	132182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1	Сердце Легкое Печень Почка Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы
4	Государственное учреждение «Российский научный центр хирургии РАМН»	119992, г. Москва, Абрикосовский пер., д. 2	Сердце Легкое Печень Почка Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы
5	Государственное учреждение «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН»	121552, г. Москва, Рублевское шоссе, д. 135	Сердце Легкое Почка

1	2	3	4
6	Государственное учреждение «Научно-исследовательский институт глазных болезней РАМН»	119021, г. Москва, ул. Россолимо, д. 11-а	Роговица человека трупная
7	Федеральное государственное учреждение «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологии»	121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, д. 15-а	Сердце
8	Федеральное государственное учреждение «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70	Почка
9	Федеральное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт урологии Росмедтехнологии»	105425, г. Москва, ул. 3-Парковая, д. 51	Почка
10	Федеральное государственное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца Росмедтехнологии»	105062, г. Москва, ул. Садовая-Черногрязская д. 14/19,	Роговица человека трупная
11	Российская детская клиническая больница Росздрава	117513, г. Москва, Ленинский проспект, д. 117	Почка Костный мозг
12	Государственное учреждение «Гематологический научный центр РАМН»	125167, г. Москва, Новозыковский пер., д. 4а	Почка
13	Государственное учреждение «Онкологический научный центр РАМН»	115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24	Печень
14	Федеральное государственное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии»	127468, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а	Роговица человека трупная
15	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 119 Федерального медико-биологического агентства»	141435, Московская область, Химкинский р-н, п/о Новогорск	Почка

IV. Методические рекомендации

1	2	3	4
16	Федеральное государственное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Росмедтехнологии»	630055, г. Новосибирск, ул. Речуновская, д. 15	Сердце Почка
17	Федеральное государственное учреждение «Приволжский окружной медицинский центр Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	603001, г. Н. Новгород, Нижне-Волжская наб., д. 2	Почка Печень
18	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова Росмедтехнологии»	194156, г. Санкт-Петербург, ул. Пархоменко, д. 15	Сердце Легкое
19	Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	195067, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6/8	Легкое Почка Костный мозг
20	Федеральное государственное учреждение «Российский ордена Трудового Красного Знамени, ордена Дружбы народов научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Росмедтехнологии»	193024, г. Санкт-Петербург, ул. 2-я Советская, д. 6	Костный мозг
21	Федеральное государственное учреждение «Центральный научно-исследовательский рентгенорадиологический институт Росмедтехнологии»	197758, г. Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 70	Печень Почка
22	Государственное учреждение «Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»	443079, г. Самара, ул. Чапаевская, д. 89	Почка Печень Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой

23	Саратовский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию	410026, г. Саратов, ул. Большая Казачья, д. 112	Почка
24	Государственное учреждение «НИИ кардиологии Томского научного центра СО РАМН»	634012, г. Томск, ул. Киевская, д. 111а	Сердце

Учреждения здравоохранения субъектов Российской Федерации

1	2	3	4
25	Государственное учреждение здравоохранения «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа»	308007, г. Белгород, ул. Некрасова, д. 8/9	Почка Печень
26	Государственное учреждение здравоохранения «Воронежская областная клиническая больница № 1»	394066, г. Воронеж, Московский проспект, д. 151	Почка
27	Государственное учреждение здравоохранения «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница»	394036, г. Воронеж, ул. Революции 1905 года, д. 22	Роговица человека трупная
28	Государственное учреждение здравоохранения «Волгоградский областной уронефрологический центр»	404120, Волгоградская область, г. Волжский, ул. Карбышева, д. 86	Почка Печень Поджелудочная железа
29	Государственное учреждение здравоохранения «Свердловская областная клиническая больница № 1»	620102, г. Екатеринбург, ул. Волгоградская, д. 185	Почка
30	Государственное учреждение здравоохранения «Иркутская областная ордена «Знак Почета» клиническая больница»	664079, г. Иркутск, микрорайон Юбилейный, д. 100	Почка
31	Государственное учреждение здравоохранения «Офтальмологическая клиническая больница» Минздрава Удмуртской Республики»	426009, г. Ижевск, ул. Ленина, д. 98а	Роговица человека трупная
32	Государственное медицинское учреждение «Республиканская клиническая больница» Республики Татарстан	420064, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 138	Почка

IV. Методические рекомендации

1	2	3	4
33	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского»	350086, г. Краснодар, ул. 1 Мая, д. 167	Почка Печень
34	Федеральный научно-клинический центр охраны здоровья шахтеров Кемеровской области	652509, г. Ленинск-Кузнецкий, 7-й микрорайон	Почка
35	Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского	129100, г. Москва, ул. Щепкина, д. 61/2	Почка
36	Московский координационный центр органного донорства	127018, г. Москва, ул. Двинцев, д. 6	Почка Печень
37	Государственное учреждение здравоохранения «Офтальмологическая клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы»	103001, г. Москва, пер. Садовских, д. 7	Роговица человека трупная
38	Областное государственное учреждение здравоохранения «Государственная Новосибирская областная клиническая больница»	630087, г. Новосибирск, ул. Немировича-Данченко, д. 130	Почка
39	Государственное учреждение здравоохранения «Областная клиническая ортопедо-хирургическая больница восстановительного лечения» Кемеровской области	653014, г. Прокопьевск, ул. Вокзальная, д. 65	Почка
40	Государственное учреждение здравоохранения Пермская областная клиническая больница № 2 «Институт сердца»	614007, г. Пермь, ул. Сибирская, д. 84	Сердце
41	Государственное учреждение «Санкт-Петербургский государственный научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»	192242, г. Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3	Печень Почка Сердце Легкое
42	Государственное учреждение здравоохранения «Ленинградская областная клиническая больница»	194291, г. Санкт-Петербург, проспект Луначарского, д. 45-49	Почка

1	2	3	4
43	Государственное учреждение здравоохранения «Самарская клиническая офтальмологическая больница им. Т.И. Брошевского»	443068, г. Самара, ул. Ново-Садовая, д. 158	Роговица человека трупная
44	Государственное медицинское учреждение «Саратовская областная клиническая больница»	410053, г. Саратов, Смирновское ущелье, д. 1	Почка
45	Государственное лечебно-профилактическое учреждение «Тюменская областная клиническая больница»	625023, г. Тюмень, ул. Котовского, д. 55	Почка
46	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 2» Минздрава Хабаровского края	680009, г. Хабаровск, ул. Павловича, д. 16	Почка
47	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая офтальмологическая больница Минздрава Республики Чувашия»	428014, г. Чебоксары, ул. Ашмарина, д. 85	Глазное яблоко Роговица человека трупная
48	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова Республики Башкортостан»	450005, г. Уфа, ул. Достоевского, д. 132	Почка
49	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская детская клиническая больница» Республики Башкортостан	450106, г. Уфа, ул. Ст. Кувыкина, д. 98	Почка
50	Государственное учреждение «Уфимский научно-исследовательский институт глазных болезней Академии наук Республики Башкортостан»	450077, г. Уфа, ул. Пушкина, д. 90	Роговица человека трупная
51	Государственное учреждение «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины» Минздрава Республики Саха (Якутия)	677019, г. Якутск, Сергеляхское шоссе, д. 4	Почка родственная
52	Ярославская областная клиническая больница	150062, г. Ярославль, ул. Яковлевская, д. 7	Почка

Муниципальные учреждения здравоохранения

1	2	3	4
53	Муниципальное учреждение здравоохранения «Городская больница № 1», г. Кемерово	652470, Кемеровская область, г. Анжеро-Судженск, ул. Кубанская, д. 3	Почка
54	Муниципальное учреждение здравоохранения «Центральная городская больница», г. Березовский	652420, Кемеровская область, г. Березовский, проспект Ленина, д. 2	Почка
55	Муниципальное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи», г. Владимир	600000, г. Владимир, ул. Горького, д. 5	Почка
56	Муниципальное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 3 им. М.Ф. Подгорбунского», г. Кемерово	650099, г. Кемерово, ул. Островского, д. 22	Почка
57	Муниципальное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница № 29», г. Новокузнецк	654038, Кемеровская область, г. Новокузнецк, ул. Советской Армии, д. 49	Почка
58	Муниципальное учреждение здравоохранения «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1», г. Оренбург	460040, г. Оренбург, пр. Гагарина, д. 23	Почка
59	Муниципальное учреждение здравоохранения «Омская городская клиническая больница № 1 им. А.Н. Кабанова»	644112, г. Омск, ул. Перелета, д. 7	Почка
60	Муниципальное учреждение здравоохранения «Клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.В. Соловьева», г. Ярославль	150003, г. Ярославль, Загородный сад, д. 11	Конечности

Другие ведомственные учреждения здравоохранения

1	2	3	4
61	Главный военный клинический госпиталь им. Н.Н. Бурденко Министерства обороны Российской Федерации	111229, г. Москва, Госпитальная площадь, д. 3	Почка
62	Российская военно-медицинская академия им. С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации	194044, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, д. 6	Почка Сердце Легкое Роговица человека трупная

Приложение № 5

Зарегистрировано в Минюсте РФ
14 декабря 2009 г. № 15587

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК

ПРИКАЗ

2 ноября 2009 г. № 863н/78

**О ВНЕСЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ПРИКАЗ МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК ОТ 25 МАЯ
2007 Г. № 357/40 «ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ПЕРЕЧНЯ
ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА – ОБЪЕКТОВ
ТРАНСПЛАНТАЦИИ, ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ
ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ
ЧЕЛОВЕКА, И ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ, ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ЗАБОР
И ЗАГОТОВКУ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА»**

С целью совершенствования оказания трансплантологической помощи населению Российской Федерации приказываю:

Внести изменения в приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академии медицинских наук от 25 мая 2007 г. № 357/40 «Об утверждении перечня органов и (или) тканей человека – объектов трансплантации, перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека, и перечня учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 19 июня 2007 г. № 9672) с изменениями, внесенными приказами Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Российской академией ме-

дицинских наук от 11 сентября 2007 г. № 596/76 (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 15 октября 2007 г. № 10330), от 6 мая 2008 г. № 223н/38 (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 26 мая 2008 г. № 11758), согласно приложению.

*Министр здравоохранения
и социального развития
Российской Федерации
Т.А. ГОЛИКОВА*

*Президент
Российской академии
медицинских наук
М.И. ДАВЫДОВ*

Приложение
к приказу Минздравсоцразвития России и РАМН
от 2 ноября 2009 г. № 863н/78

**ИЗМЕНЕНИЯ, КОТОРЫЕ ВНОСЯТСЯ В ПРИКАЗ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ И РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
МЕДИЦИНСКИХ НАУК ОТ 25 МАЯ 2007 Г. № 357/40
«ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ПЕРЕЧНЯ ОРГАНОВ И (ИЛИ)
ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА – ОБЪЕКТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ,
ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ,
ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ
ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА,
И ПЕРЕЧНЯ УЧРЕЖДЕНИЙ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ,
ОСУЩЕСТВЛЯЮЩИХ ЗАБОР И ЗАГОТОВКУ ОРГАНОВ
И (ИЛИ) ТКАНЕЙ ЧЕЛОВЕКА»**

1. В приложении № 2 «Перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию органов и (или) тканей человека» к приказу:

1) в разделе «Федеральные учреждения здравоохранения»:

а) графу «Вид трансплантации» пункта 5 после слова «Эндокринные железы» дополнить словами «Кишечник и его фрагменты», «Костный мозг», «Трахея», «Верхняя конечность и ее фрагменты», «Нижняя конечность и ее фрагменты»;

б) пункты 6 и 14 изложить в следующей редакции:

«6	Государственное учреждение «Российский научный центр хирургии РАМН»	119991, г. Москва, Абрикосов- ский пер., д. 2	Сердце Легкое Печень Почка Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы Трахея Тонкая кишка	Все субъекты Российской Федерации»
«14	Государственное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН»	115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24	Костный мозг Почка Трахея Легочно-сердечный комплекс Печень	Все субъекты Российской Федерации»;

в) пункты 18 и 19 изложить в следующей редакции:

«18	Федеральное государственное учреждение «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства»	123182, г. Москва, ул. Живописная, д. 46 123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23	Костный мозг Дермальный слой кожи Печень	Все субъекты Российской Федерации»
«19	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 119 Федерального медико-биологического агентства»	141435, Московская область, г. Химки, микрорайон Новогорск	Почка	Все субъекты Российской Федерации»;

г) графу «Вид трансплантации» пункта 25 после слова «Легкое» дополнить словами «Поджелудочная железа», «Костный мозг»;

д) графу «Вид трансплантации» пункта 26 после слова «Костный мозг» дополнить словами «Поджелудочная железа», «Кишечник и его фрагменты», «Трахея», «Глазное яблоко (роговица, склера, хрусталик,

сетчатка)», «Дермальный слой кожи», «Реберный хрящ», «Сосуды (участки сосудистого русла)», «Твердая мозговая оболочка», «Широчайшая фасция бедра»;

е) графу «Вид трансплантации» пункта 28 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная»;

ж) дополнить раздел пунктами 41–42 следующего содержания:

«41	Хабаровский филиал Федеральное государственное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Росмедтехнологии»	680033, г. Хабаровск, ул. Тихоокеанская, д. 211	Роговица человека трупная	Хабаровский край»
«42	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава»	194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2	Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации»;

з) пункты 41–78 считать соответственно пунктами 43–80.

2) в разделе «Учреждения здравоохранения субъектов Российской Федерации»:

а) графу «Вид трансплантации» пункта 47 после слова «Сердце» дополнить словами «Легкое», «Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой», «Костный мозг», «Роговица человека трупная», «Трахея»;

б) графу «Вид трансплантации» пункта 49 после слова «Почка» дополнить словами «Печень»;

в) графу «Вид трансплантации» пункта 51 после слова «Поджелудочная железа» дополнить словами «Роговица человека трупная», «Склера человека трупная»;

г) графу «Вид трансплантации» пункта 54 после слова «Сердце» дополнить словами «Легкое», «Кишечник и его фрагменты», «Селезенка», «Эндокринные железы», «Костный мозг», «Трахея», «Верхняя конечность и ее фрагменты», «Нижняя конечность и ее фрагменты», «твердая мозговая оболочка», «Кости свода черепа», «Нижняя челюсть», «Сухожилия длинного сгибателя длинного пальца», «Широчайшая фасция бедра», «Кожа»;

д) графу «Вид трансплантации» пункта 57 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная», «Печень»;

е) пункты 58 и 60 изложить в следующей редакции:

«58	Государственное учреждение «Санкт-Петербургский государственный научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»	192242, г. Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3	Почка Печень Сердце Легкое Роговица человека трупная Поджелудочная железа	г. Санкт-Петербург»
«60	Санкт-Петербургское государственное учреждение здравоохранения «Городская многопрофильная больница № 2»	194354, г. Санкт-Петербург, Учебный пер., д. 5	Легкое Роговица человека трупная	г. Санкт-Петербург»;

ж) графу «Вид трансплантации» пункта 64 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная»;

з) дополнить раздел пунктами 75–79 следующего содержания:

«75	Государственное краевое учреждение здравоохранения «Красноярская краевая офтальмологическая клиническая больница»	660022, г. Красноярск, ул. Никитина, д. 1в	Роговица человека трупная	Красноярский край»
«76	Государственное учреждение здравоохранения Омской области «Клиническая офтальмологическая больница имени В.П. Выходцева»	644024, г. Омск, ул. Лермонтова, д. 60	Роговица человека трупная	Омская область»
«77	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая офтальмологическая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан»	420012, г. Казань, ул. Бултерева, д. 14	Роговица человека трупная	Республика Татарстан»
«78	Государственное учреждение здравоохранения «Самарская областная клиническая больница имени М.И. Калинина»	443095, г. Самара, ул. Ташкентская, д. 159	Костный мозг	Самарская область»

«79	Государственное учреждение здравоохранения «Челябинская областная клиническая больница»	454076, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 70, стр. 2	Роговица человека трупная	Челябинская область»;
-----	---	---	---------------------------	-----------------------

и) пункты 75–80 считать соответственно пунктами 80–85.

3) раздел «Муниципальные учреждения здравоохранения» дополнить пунктом 84 следующего содержания:

«84	Муниципальное лечебно-профилактическое учреждение «Городская клиническая больница № 1»	654057, г. Новокузнецк, просп. Бардина, д. 30	Роговица человека трупная Склера человека трупная Твердая мозговая оболочка Реберный хрящ	Кемеровская область»;
-----	--	---	--	-----------------------

а) пункты 84–85 считать соответственно пунктами 85–86.

4) раздел «Другие ведомственные учреждения здравоохранения» дополнить пунктом 87 следующего содержания:

«87	Федеральное государственное учреждение «Клиническая больница Управления делами Президента Российской Федерации»	107150, г. Москва, ул. Лосино-островская, д. 45	Роговица человека трупная	Все субъекты Российской Федерации».
-----	---	---	---------------------------	-------------------------------------

2. В приложении № 3 «Перечень учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку органов и (или) тканей человека» к приказу:

1) в разделе «Федеральные учреждения здравоохранения»:

а) графу «Вид трансплантации» пункта 3 после слова «Эндокринные железы» дополнить словами «Кишечник и его фрагменты», «Костный мозг», «Трахея», «Верхняя конечность и ее фрагменты», «Нижняя конечность и ее фрагменты»;

б) пункт 4 изложить в следующей редакции:

«4	Государственное учреждение «Российский научный центр хирургии РАМН»	119991, г. Москва, Абрикосовский пер., д. 2	Сердце Легкое Печень Почка Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой Эндокринные железы Трахея Тонкая кишка»;
----	---	---	--

в) графу «Вид трансплантации» пункта 12 после слова «Почка» дополнить словами «Костный мозг»;

г) пункты 13 и 15 изложить в следующей редакции:

«13	Государственное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН»	115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24	Костный мозг Почка Трахея Легочно-сердечный комплекс Печень»
«15	Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 119 Федерального медико-биологического агентства»	141435, Московская область, г. Химки, микрорайон Новогорск	Почка»

д) графу «Вид трансплантации» пункта 18 после слова «Легкое» дополнить словами «Поджелудочная железа», «Костный мозг»;

е) графу «Вид трансплантации» пункта 19 после слова «Костный мозг» дополнить словами «Поджелудочная железа», «Кишечник и его фрагменты», «Трахея», «Глазное яблоко (роговица, склера, хрусталик, сетчатка)», «Дермальный слой кожи», «Реберный хрящ», «Сосуды (участки сосудистого русла)», «Твердая мозговая оболочка», «Широчайшая фасция бедра»;

ж) графу «Вид трансплантации» пункта 23 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная»;

з) дополнить раздел пунктами 37–39 следующего содержания:

«37	Хабаровский филиал Федеральное государственное учреждение «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н.Федорова Росмедтехнологии»	680033, г. Хабаровск, ул. Тихоокеанская, д. 211	Роговица человека трупная»
«38	Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава»	194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2	Роговица человека трупная»

«39	Федеральное государственное учреждение «Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» Федерального медико-биологического агентства»	123182, г. Москва, ул. Живописная, д. 46 123098, г. Москва, ул. Маршала Новикова, д. 23	Костный мозг Дермальный слой кожи»
-----	---	--	---------------------------------------

и) пункты 37–78 считать соответственно пунктами 40–81.

2) в разделе «Учреждения здравоохранения субъектов Российской Федерации»:

а) графу «Вид трансплантации» пункта 44 после слова «Почка» дополнить словами «Сердце», «Легкое», «Печень», «Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой», «Костный мозг», «Роговица человека трупная», «Трахея»;

б) графу «Вид трансплантации» пункта 45 после слова «Почка» дополнить словами «Печень»;

в) графу «Вид трансплантации» пункта 53 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная», «Печень»;

г) графу «Вид трансплантации» пункта 56 после слова «Легкое» дополнить словами «Роговица человека трупная», «Поджелудочная железа»;

д) графу «Вид трансплантации» пункта 58 после слова «Почка» дополнить словами «Роговица человека трупная», «Сердце», «Легкое», «Печень», «Почка», «Поджелудочная железа с 12-перстной кишкой», «Селезенка»;

е) дополнить раздел пунктами 71–81 следующего содержания:

«71	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С.И. Сергеева»	680009, г. Хабаровск, ул. Краснодарская, д. 9	Роговица человека трупная»
«72	Государственное учреждение здравоохранения «Бюро судебно-медицинской экспертизы»	680042, г. Хабаровск, ул. Воронежская, д. 164	Роговица человека трупная»
«73	Государственное учреждение здравоохранения «Краевая клиническая больница № 2» Министерства здравоохранения Хабаровского края»	680009, г. Хабаровск, ул. Павловича, д. 16	Почка Роговица человека трупная»
«74	Государственное краевое учреждение здравоохранения «Красноярская краевая офтальмологическая клиническая больница»	660022, г. Красноярск, ул. Никитина, д. 1в	Роговица человека трупная

«75	Государственное учреждение здравоохранения «Кемеровская областная клиническая больница»	650066, г. Кемерово, просп. Октябрьский, д. 22	Глазное яблоко Роговица человека трупная Склера человека трупная
«76	Государственное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой медицинской помощи им. Н.В. Склифосовского»	129090, г. Москва, Сухаревская пл., д. 3	Печень Поджелудочная железа Почка Сердце Легкое Кишечник и его фрагменты Селезенка Эндокринные железы Костный мозг Трахея Верхняя конечность и ее фрагменты Нижняя конечность и ее фрагменты Нижняя челюсть Сухожилие длинного сгибателя большого пальца Широчайшая фасция бедра Кожа Кости свода черепа
«77	Государственное учреждение здравоохранения Омской области «Клиническая офтальмологическая больница им. В.П. Выходцева»	644024, г. Омск, ул. Лермонтова, 60	Роговица человека трупная
«78	Государственное учреждение здравоохранения Омской области «Бюро судебно-медицинской экспертизы»	644112, г. Омск, ул. Перелета, д. 9	Роговица человека трупная
«79	Государственное учреждение здравоохранения «Республиканская клиническая офтальмологическая больница Министерства здравоохранения Республики Татарстан»	420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 14	Роговица человека трупная

«80	Государственное учреждение здравоохранения «Самарская областная клиническая больница имени М.И. Калинина»	443095, г. Самара, ул. Ташкентская, д. 159	Костный мозг
«81	Государственное учреждение здравоохранения «Челябинская областная клиническая больница»	454076, г. Челябинск, ул. Воровского, д. 70, стр. 2	Роговица человека трупная»;

ж) пункты 71–81 считать соответственно пунктами 82–92.

з) дополнить раздел «Муниципальные учреждения здравоохранения» пунктами 91–92 следующего содержания:

«91	Муниципальное лечебно-профилактическое учреждение «Городская клиническая больница № 1»	654057, г. Новокузнецк, просп. Бардина, д. 30	Роговица человека трупная Склера человека трупная Твердая мозговая оболочка Реберный хрящ»
«92	Муниципальное учреждение здравоохранения «Омская городская клиническая больница № 1 им. А.Н. Кабанова»	644112, г. Омск, ул. Перелета, д. 7	Роговица человека трупная»;

а) пункты 91–92 считать соответственно пунктами 93–94.

б) дополнить раздел «Другие ведомственные учреждения здравоохранения» пунктом 95 следующего содержания:

«95	Федеральное государственное учреждение «Клиническая больница Управления делами Президента Российской Федерации»	107150, г. Москва, ул. Лосиноостровская, д. 45	Роговица человека трупная».
-----	---	--	-----------------------------

Примечание.

Учреждения здравоохранения осуществляют забор и заготовку органов и (или) тканей человека по своему месту нахождения, а также в соответствии с заключенными соглашениями в учреждениях здравоохранения, в которых в установленном порядке проведена констатация смерти мозга человека.

Статья 5 Закона о погребении и похоронном деле:

1. Волеизъявление лица о достойном отношении к его телу после смерти (далее – волеизъявление умершего) – пожелание, выраженное в устной форме в присутствии свидетелей или в письменной форме: о согласии или несогласии быть подвергнутым паталогоанатомическому вскрытию;
 - о согласии или несогласии на изъятие органов и (или) тканей из его тела;
 - быть погребенным на том или ином месте, по тем или иным обычаям или традициям, рядом с теми или иными умершими;
 - быть подвергнутым кремации;
 - о доверии исполнить свое волеизъявление тому или иному лицу.
2. Действия по достойному отношению к телу умершего должны осуществляться в полном соответствии с волеизъявлением умершего, если не возникли обстоятельства, при которых исполнение волеизъявления умершего невозможно, либо иное не установлено законодательством Российской Федерации.
3. В случае отсутствия волеизъявления умершего право на разрешение действий, указанных в пункте 1 настоящей статьи, имеют супруг, близкие родственники (дети, родители, усыновленные, усыновители, родные братья и родные сестры, внуки, дедушка, бабушка) или иные родственники либо законный представитель умершего, а при отсутствии таковых иные лица, взявшие на себя обязанность осуществить погребение умершего.

КОНСТИТУЦИОННЫЙ СУД РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

4 декабря 2003 г.

№ 459-О

**ОБ ОТКАЗЕ В ПРИНЯТИИ К РАССМОТРЕНИЮ
ЗАПРОСА САРАТОВСКОГО ОБЛАСТНОГО СУДА
О ПРОВЕРКЕ КОНСТИТУЦИОННОСТИ СТАТЬИ 8
ЗАКОНА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
«О ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ И (ИЛИ) ТКАНЕЙ
ЧЕЛОВЕКА»**

Конституционный суд Российской Федерации в составе председателя В.Д. Зорькина, судей М.В. Баглая, Н.С. Бондаря, Г.А. Гаджиева, Ю.М. Данилова, Л.М. Жарковой, Г.А. Жилина, С.М. Казанцева, А.Л. Кононова, Л.О. Красавчиковой, В.О. Лучина, Ю.Д. Рудкина, А.Я. Сливы, В.Г. Стрекозова, О.С. Хохряковой, Б.С. Эбзеева, В.Г. Ярославцева,

заслушав в пленарном заседании заключение судьи О.С. Хохряковой, проводившей на основании статьи 41 Федерального конституционного закона «О Конституционном суде Российской Федерации» предварительное изучение запроса Саратовского областного суда,

установил:

1. Судебная коллегия по гражданским делам Саратовского областного суда обратилась в Конституционный Суд Российской Федерации с запросом о проверке конституционности статьи 8 Закона Российской Федерации от 22 декабря 1992 года «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (в редакции от 20 июня 2000 года), согласно которой 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.

Как следует из представленных материалов, решением Октябрьского районного суда города Саратова от 17 сентября 2002 года было отказано в

удовлетворении иска гражданки Л.В. Житинской к Саратовской областной больнице о взыскании морального вреда. Свои требования истица обосновывала тем, что из акта судебно-медицинского исследования трупа ее сына, скончавшегося в данной больнице, ей стало известно, что сотрудниками больницы у него в целях трансплантации были изъяты обе почки; о соответствующем намерении врачей она не была поставлена в известность, и изъятие произведено без ее согласия. В решении суда указывалось, что статьей 8 Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека», подлежащей применению при рассмотрении данного дела, закрепляется презумпция согласия гражданина или его близких родственников (представителей) на изъятие после смерти его органов для трансплантации.

Судебная коллегия по гражданским делам Саратовского областного суда, куда Л.В. Житинская обратилась с кассационной жалобой, придя к выводу о том, что статья 8 Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» не соответствует Конституции Российской Федерации, приостановила производство по делу и направила в Конституционный Суд Российской Федерации запрос о проверке ее конституционности.

По мнению заявителя, указанная норма лишает гражданина или его близких родственников (представителей) права на волеизъявление о согласии или несогласии на изъятие органов и (или) тканей из его тела после смерти, поскольку не устанавливает обязанность учреждений здравоохранения выяснять прижизненную волю умершего либо волю его близких родственников (представителей) в отношении такого изъятия. Кроме того, поскольку ею не определяется учреждение здравоохранения, обязанное вести учет граждан, не согласных на изъятие органов, и не предусмотрено создание банка соответствующих данных, граждане лишены возможности предварительно зафиксировать факт своего несогласия. Не устанавливается в оспариваемой норме и порядок извещения граждан о смерти родственника (представляемого лица), а также не указывается, на кого возлагается обязанность известить их об этом; тем самым для граждан исключается возможность выразить свое несогласие непосредственно перед изъятием органов в случаях, когда наступление смерти нельзя было предвидеть. При этом, поскольку изъятие донорских органов производится сразу же после констатации смерти человека, родственникам или законным представителям умершего, проживающим в отдаленных районах, практически невозможно сообщить медицинскому учреждению о своем мнении.

Заявитель утверждает, что в силу неопределенности и неясности статьи 8 Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» усмотрение учреждений здравоохранения в отношении осуществления изъятия у умершего человека органов для трансплантации практически не ограничивается, чем нарушаются право человека на до-

стойное отношение к его телу после смерти и принцип равенства, и просит признать ее не соответствующей статьям 2, 15, 17, 18, 19, 21, 45 и 55 Конституции Российской Федерации.

2. Согласно Конституции Российской Федерации человек, его права и свободы являются высшей ценностью, а признание, соблюдение и защита прав и свобод человека и гражданина – обязанность государства (статья 2); каждый имеет право на жизнь и право на охрану здоровья и медицинскую помощь (статья 20, часть 1; статья 41, часть 1). К числу неотъемлемых прав человека относится и закрепленное статьей 22 (часть 1) Конституции Российской Федерации право на личную неприкосновенность, исключаящее незаконное воздействие на человека как в физическом, так и в психическом смысле, причем понятием «физическая неприкосновенность» охватывается не только прижизненный период существования человеческого организма, но и создаются необходимые предпосылки для правовой охраны тела умершего человека. В равной мере это относится и к праву на государственную охрану достоинства личности (статья 21, часть 1, Конституции Российской Федерации), а также к производному от названных конституционных прав праву человека на достойное отношение к его телу после смерти.

При осуществлении такого вида медицинского вмешательства, как трансплантация органов и (или) тканей от одного человека к другому – в условиях возникающей между донором и реципиентом сложной правовой связи и возможного конфликта их интересов – задача достижения должного, не нарушающего права ни одного из них баланса конституционно значимых ценностей и охраняемых прав предопределяет содержание правового регулирования в данной сфере, которое должно учитывать в том числе нравственные, социальные и иные аспекты этого вида медицинского вмешательства.

Как следует из Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека», трансплантация органов и (или) тканей человека является средством спасения жизни и восстановления здоровья граждан и может осуществляться на основе соблюдения законодательства Российской Федерации и прав человека в соответствии с гуманными принципами, провозглашенными международным сообществом, при этом интересы человека должны превалировать над интересами общества или науки (преамбула). Исходя из этого статья 1 названного Закона предусматривает, что трансплантация органов и (или) тканей от живого донора или трупа применяется только в случае, если другие медицинские средства не могут гарантировать сохранение жизни больного (реципиента) либо восстановление его здоровья; изъятие органов и (или) тканей у живого донора допустимо только в случае, если его здоровью по заключению консилиума врачей-специалистов не будет причинен значительный вред и может иметь место исключительно с согласия живого донора; органы и (или) ткани человека не могут быть предметом купли-продажи; купля-

продажа таких органов и (или) тканей, а также реклама этих действий влекут уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации (в частности, пунктом «м» части второй статьи 105 УК Российской Федерации предусмотрена ответственность за убийство в целях использования органов или тканей потерпевшего, статьей 120 – за принуждение к изъятию органов или тканей человека для трансплантации, пунктом «ж» части второй статьи 152 – за куплю-продажу несовершеннолетнего либо совершение иных сделок в форме передачи и завладения несовершеннолетним в целях изъятия у него органов или тканей для трансплантации).

Возможность при соблюдении определенных условий изъятия органов и (или) тканей человека для трансплантации, равно как и запрет принуждения к их изъятию закреплены также статьей 47 Основ законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан от 22 июля 1993 года (в редакции от 27 февраля 2003 года).

Определяя условия и порядок трансплантации, в частности изъятия органов и (или) тканей у трупа с целью пересадки нуждающемуся в этом реципиенту, федеральный законодатель установил в статье 8 Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека» недвусмысленно выраженный запрет на такое изъятие в случае, когда учреждение здравоохранения на момент изъятия было поставлено в известность о том, что при жизни данное лицо либо его близкие родственники или законный представитель заявили о своем несогласии на него.

Таким образом, законодатель в данном случае избрал модель презумпции согласия на изъятие органов и (или) тканей человека после его смерти («неиспрошенное согласие» или «предполагаемое согласие»), трактующую невыражение самим лицом, его близкими родственниками или законными представителями своей воли либо отсутствие соответствующих документов, фиксирующих ту или иную волю, как наличие положительного волеизъявления на осуществление такого изъятия – при том, что никто после смерти не может быть подвергнут данной процедуре, если известно об отрицательном отношении к этому самого лица, его близких родственников, законных представителей.

Презумпция согласия базируется, с одной стороны, на признании негуманным задавать родственникам практически одновременно с сообщением о смерти близкого человека либо непосредственно перед операцией или иными мероприятиями лечебного характера вопрос об изъятии его органов (тканей), а с другой стороны – на предположении, обоснованном фактическим состоянием медицины в стране, что на современном этапе развития трансплантологии невозможно обеспечить выяснение воли указанных лиц после кончины человека в сроки, обеспечивающие сохранность трансплантата.

Необходимым условием для введения в правовое поле презумпции согласия на изъятие в целях трансплантации органов (тканей) человека после

его смерти является также наличие опубликованного для всеобщего сведения и вступившего в силу законодательного акта, содержащего формулу данной презумпции, – тем самым предполагается, что заинтересованные лица осведомлены о действующих правовых предписаниях. В Российской Федерации таким актом является Закон Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека».

Кроме того, российское законодательство не препятствует гражданам зафиксировать в той или иной форме (в том числе нотариальной) и довести до сведения учреждения здравоохранения свое несогласие на изъятие у них органов и (или) тканей после смерти в целях трансплантации, причем нарушение соответствующего волеизъявления влечет наступление юридической ответственности.

Таким образом, оспариваемая в запросе Саратовского областного суда статья 8 Закона Российской Федерации «О трансплантации органов и (или) тканей человека», содержащая формулу презумпции согласия на изъятие в целях трансплантации органов (тканей) человека после его смерти, сама по себе не является неясной или неопределенной, а потому не может рассматриваться как нарушающая конституционные права граждан.

Вместе с тем – в целях соблюдения баланса прав и законных интересов доноров и реципиентов – вопросы, связанные с реализацией гражданином либо его близкими родственниками или законными представителями права заявить письменно или устно о несогласии на изъятие органов и (или) тканей для трансплантации, требуют более детальной (как на законодательном уровне, так и в подзаконных нормативных актах) регламентации, а механизмы информирования граждан о действующем правовом регулировании – развития и совершенствования. Однако разрешение подобных вопросов, как связанных с осуществлением дополнительного правового регулирования, является прерогативой законодателя, как и изменение действующего правового регулирования в данной сфере, на чем настаивает заявитель, полагающий, что оно должно быть основано на модели «испрошенного согласия».

Исходя из изложенного и руководствуясь пунктами 1 и 2 части первой статьи 43 и частью первой статьи 79 Федерального конституционного закона «О Конституционном суде Российской Федерации», Конституционный суд Российской Федерации

определил:

1. Отказать в принятии к рассмотрению запроса Саратовского областного суда, поскольку он не отвечает требованиям Федерального конституционного закона «О Конституционном суде Российской Федерации», в соответствии с которыми такого рода обращения признаются допустимыми, и поскольку разрешение поставленных заявителем вопросов Конституционному суду Российской Федерации неподведомственно.

2. Определение Конституционного суда Российской Федерации по данному запросу окончательно и обжалованию не подлежит.

3. Настоящее Определение подлежит опубликованию в «Вестнике Конституционного суда Российской Федерации».

*Председатель
Конституционного суда
Российской Федерации
В.Д. ЗОРЬКИН*

*Судья-секретарь
Конституционного суда
Российской Федерации
Ю.М. ДАНИЛОВ*

А К Т
изъятия органов у донора-трупа для трансплантации

Стационар, в котором произведено изъятие: _____

Ф.И.О. донора _____

возраст _____ пол _____ № истории болезни _____

диагноз: _____

Изъятие донорского(их) органа(ов) (сердце, печень, почки, легкие и пр.)

произведено после констатации смерти человека по разрешению:

1. Главного врача (ответственного дежурного по ЛПУ) _____

(фамилия, имя, отчество)

2. Судмедэксперта* _____

(фамилия, имя, отчество)

Изъятие донорского(их) органа(ов) производили врачи-хирурги:

(фамилия, имя, отчество)

(учреждение, должность)

Способ изъятия донорского(их) органа(ов)

(описание операции)

Дата и время начала операции и конца изъятия «___» _____ 20 г.

начало _____: _____ окончание _____: _____

Какому учреждению передан(ы) донорский(ие) орган(ы)

* в случаях, когда предполагается судебно-медицинское вскрытие

Подписи:

Главный врач
(ответственный дежурный по ЛПУ) _____

Реаниматолог _____

Судмедэксперт _____

Врач(и)-хирург(и) _____

Министерство здравоохранения и социального развития РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ им. АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

«УТВЕРЖДАЮ»
**директор ФГУ «Федеральный
научный центр трансплантологии
и искусственных органов
им. академика В.И. Шумакова»**
**член-корреспондент РАМН, профессор
С.В. Готье**

«__» _____ 2010 года

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ
РАННЕГО РАЗВИТИЯ ВАСКУЛОПАТИИ
СЕРДЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА
НА ЭТАПЕ ДООПЕРАЦИОННОГО
ОБСЛЕДОВАНИЯ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Москва 2010

Организация-разработчик:

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

Авторы:

Шевченко Ольга Павловна – доктор медицинских наук, профессор, зам. директора по научной работе ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова МЗиСР РФ.

Орлова Ольга Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической и экспериментальной биохимии ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Кунцевич Надежда Викторовна – кандидат медицинских наук, заведующая научно-организационным отделом ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Казаков Эдуард Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением коронарной хирургии и трансплантации сердца ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Кормер Аркадий Яковлевич – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отделения коронарной хирургии и трансплантации сердца ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Честухин Василий Васильевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением рентгено-функциональной диагностики ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

Миронков Борис Леонтьевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отделения рентгено-функциональной диагностики ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ.

АННОТАЦИЯ

Методические рекомендации содержат сведения о прогнозировании наиболее грозного осложнения у реципиентов сердца – болезни коронарных артерий трансплантата, еще на этапе дооперационного обследования. Метод основан на определении концентрации в плазме крови больных сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, маркера аутоиммунных антифосфолипидных реакций – аутоантител к кардиолипину (АКЛ).

Приведены данные о клинической эффективности теста на антитела к кардиолипину у больных сердечной недостаточностью до трансплантации

сердца, а также у реципиентов в первый год после операции. Обоснованы оптимальные сроки измерения уровня антител к кардиолипину с целью прогнозирования раннего развития васкулопатии и даны рекомендации по интерпретации получаемых результатов.

Методические рекомендации предназначены для трансплантологов, кардиохирургов, кардиологов, иммунологов, врачей клинической лабораторной диагностики, широкого круга специалистов, использующих результаты лабораторного анализа в повседневной практике, а также научных сотрудников, ординаторов и аспирантов, преподавателей и студентов медицинских вузов.

ВВЕДЕНИЕ

Современная клиническая трансплантология решает задачи не только спасения неизлечимого больного, но и достижения длительного выживания, реабилитации, возвращения к нормальной жизни пациента. Реальностью современной медицины в нашей стране, как и в мире, является в большей или меньшей степени полноценная жизнь немалого круга людей с донорским сердцем. Только в США живет более 20 000 реципиентов с пересаженным сердцем. В нашей стране число людей, живущих с донорским сердцем, постоянно увеличивается.

Трансплантация сердца как путь спасения больных, страдающих стойкой сердечной недостаточностью, прочно заняла свое место в современной клинической медицине. Эта операция как рутинный метод лечения выполняется не только в Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова, но и в ведущих кардиохирургических и трансплантологических центрах Российской Федерации. Рост длительности выживания реципиентов сердца ставит задачу прогнозирования, профилактики, лечения осложнений, а также требует ознакомления с указанными проблемами более широкого круга специалистов.

В настоящее время реципиенты с трансплантированным сердцем живут более 20 лет. Половина всех пациентов – более 9 лет, а 25% – более 15–17 лет. Наибольшая продолжительность жизни пациента с пересаженным сердцем в мире составила 32 года, а в Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова превысила 17 лет (В.И. Шумаков и соавт., 2008).

Однако, несмотря на достигнутые успехи, главным фактором, определяющим продолжительность и качество жизни реципиентов с пересаженным сердцем, является развитие осложнений.

Ведущее место среди причин смертности реципиентов сердца занимает болезнь коронарных артерий пересаженного сердца (БКАПС), или васкулопатия трансплантата. Это заболевание остается одним из наиболее тяжелых осложнений после пересадки сердца и основной причиной смерти

пациентов, проживших более года после операции (Шумаков В.И. и соавт., 2006, 2008, Taylor D.O. et al., 2000).

Причины развития васкулопатии трансплантата, патогенез данной патологии, меры профилактики и лечения являются предметом интенсивного изучения. Актуальность и значимость указанной проблемы для кардиологии и клинической трансплантологии отражает следующая цитата: «Когда мы научимся по-настоящему понимать процессы, ведущие к развитию сердечной недостаточности, нам уже не понадобится пересаживать сердце. Но пока этого не случилось, нам необходимо понять патогенез и научиться справляться с болезнью коронарных артерий трансплантированного сердца» (Libby P., 2002).

Васкулопатия трансплантата проявляется окклюзионными поражениями коронарных сосудов и повышенным тромбообразованием. В этих процессах могут принимать участие аутоиммунные антифосфолипидные реакции, связанные с циркуляцией в крови антител к фосфолипидам клеточных мембран, в том числе – антител к кардиолипину.

Антитела к кардиолипину (АКЛ) представляют собой популяцию поликлональных аутоантител, которые связываются с кардиолипином клеточных мембран тромбоцитов и эндотелия в присутствии кофактора β_2 гликопротеина-1. Связывание с антителами к кардиолипину приводит к активации эндотелия, индуцирует апоптоз эндотелиальных клеток, что в свою очередь увеличивает прокоагулянтную активность эндотелия. Мишенью для антител к кардиолипину могут являться отдельные белки, экспрессирующиеся на мембранах эндотелиальных клеток и регулирующие процессы свертывания и фибринолиза, такие как белок С, белок S и тромбомодулин. Взаимодействие АКЛ с кардиолипинами на поверхности тромбоцитов оказывает тромбогенный эффект за счет активации и повреждения последних. И, наконец, гиперкоагуляции способствует связывание в процессе антифосфолипидных реакций белка β -2 гликопротеина 1, который является естественным плазменным антикоагулянтом (Насонов Е.Л., 2004; Kaplan S.D. et al., 1992; Hughes G.R.V., 1993; Naviv Y.S., 2000).

Проспективные исследования показали, что повышение уровня АКЛ является независимым фактором риска развития острого инфаркта миокарда у мужчин средних лет. У больных ишемической болезнью сердца и повышенными уровнями антифосфолипидных антител чаще развиваются поздние окклюзии шунта после операции аортокоронарного шунтирования. Установлена достоверная связь повышенных уровней АКЛ с развитием рестеноза после ангиопластики коронарных артерий у больных с ИБС.

Хронический рецидивирующий тромбоз мелких коронарных артерий может приводить к развитию патологии миокарда, которая проявляется в виде нарушений сократительной способности миокарда в сочетании с гипертрофией левого желудочка (Adhiyaman V. et al., 2001; Schofield R.S. et al., 2007). Изучение роли аутоиммунного механизма у больных с кардиомиопатиями показало, что у пациентов, страдающих кардиомиопатией,

как дилатационной, так и гипертрофической, повышенные уровни АКЛ, особенно класса IgG, выявляются чаще, чем у здоровых лиц и больных инфарктом миокарда.

В настоящих методических рекомендациях приведены данные о диагностическом и прогностическом значении антител к кардиолипину у ожидающих трансплантацию сердца больных застойной сердечной недостаточностью, развившейся в терминальной стадии дилатационной и ишемической кардиомиопатии, а также у реципиентов после операции, в отношении наиболее неблагоприятного осложнения – развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца в ранние сроки после трансплантации.

Формула метода

Метод прогнозирования раннего развития васкулопатии сердечного трансплантата путем исследования плазмы крови пациента, ожидающего трансплантацию сердца, отличается тем, что в плазме крови больного сердечной недостаточностью на этапе дооперационного обследования измеряют концентрацию антител к кардиолипину и при выявлении повышенного уровня антител к кардиолипину прогнозируют развитие васкулопатии трансплантата в ранние сроки (первые 3 года) после трансплантации.

Показания к применению метода

1. Прогнозирование раннего, в течение первых трех лет после трансплантации сердца, развития васкулопатии трансплантата у больных в терминальной стадии застойной сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, на этапе дооперационного обследования.

2. У реципиентов в первый год после трансплантации сердца с целью прогнозирования развития васкулопатии трансплантата в более поздние сроки.

Противопоказаний нет.

Материально-техническое обеспечение метода

Измерение концентраций антител к кардиолипину возможно в любой биохимической или иммунологической лаборатории, оснащенной оборудованием для иммуноферментного анализа.

Для получения результатов необходимы наборы реагентов для определения концентраций IgG-антител к кардиолипину методом иммуноферментного анализа, стандартизированные и разрешенные к применению в клинической практике. В настоящей работе использованы наборы реагентов для определения концентраций IgG-антител к кардиолипину производства фирмы «Лаборатория диагностических систем», Россия.

Описание метода

В качестве материала для исследования используется плазма, получаемая из венозной крови пациента. Забор крови производится с соблюдением всех правил асептики и антисептики из периферической вены или центрального венозного катетера, в количестве 5 мл, в гепаринизированную пробирку.

Далее образец крови центрифугируют, отделяя клеточные элементы, при 1500 об./мин в течении 15 мин при температуре 20 °С, плазму отбирают и используют для проведения лабораторного исследования. При необходимости образец плазмы можно замораживать и хранить при температуре –20 °С

Концентрацию IgG-антител к кардиолипину измеряют методом иммуноферментного анализа с использованием диагностических наборов реагентов для определения концентраций IgG-антител к кардиолипину и контрольных материалов (в настоящей работе – наборы реагентов «IgG–АКЛ» производства фирмы «Лаборатория диагностических систем», Россия). Аналитические характеристики набора: чувствительность метода – 3,5 МЕ/мл, коэффициент вариации – 8%, диапазон определяемых концентраций – 7,5–120 МЕ/мл. Референтные значения концентрации, соответствующие уровню у здорового человека – <23 МЕ/мл. На рис. 1 представлена калибровочная кривая, построенная на основании измерения уровня антител к кардиолипину, с использованием наборов реагентов «Лаборатория диагностических систем», Россия.

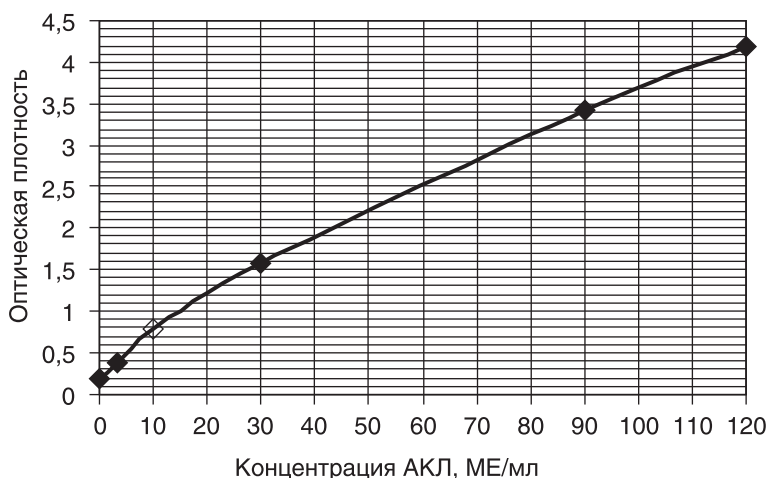


Рис. 1. Калибровочная кривая для определения концентрации АКЛ (наборы реагентов «Лаборатория диагностических систем», Россия)

Характеристика обследованных больных

Исследование проведено в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» МЗиСР РФ (ФНЦТИО) на базе отделения коронарной хирургии и трансплантации сердца, лаборатории клинической и экспериментальной биохимии и отделения лучевой диагностики и рентгенхирургических методов лечения.

Представлены данные о результатах обследования 47 пациентов с сердечной недостаточностью и 30 реципиентов сердца в различные сроки после трансплантации:

– до трансплантации сердца: 47 пациентов с застойной сердечной недостаточностью 3–4 функционального класса по NYHA в возрасте от 17 до 40 лет ($35,5 \pm 7,5$ года), 44 мужчины и 3 женщины, из них 35 пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП) и 12 пациентов с ишемической кардиомиопатией (ИКМП);

– в первый год после трансплантации сердца: 14 пациентов в возрасте от 19 до 45 лет ($37,5 \pm 8,5$ года), 11 мужчин и 3 женщины, у 9 пациентов причиной сердечной недостаточности до ТС была дилатационная, у 5 – ишемическая кардиомиопатия;

– в отдаленные сроки (1–16 лет) после ТС: 30 реципиентов в возрасте от 20 до 65 лет ($46,5 \pm 10,5$ лет), 26 мужчин и 4 женщины. 13 пациентов были обследованы как до, так и в различные сроки после ТС и таким образом включены в две или три группы обследованных пациентов.

У 16 реципиентов была ангиографически подтвержденная болезнь коронарных артерий пересаженного сердца, у 14 реципиентов ангиографических признаков болезни коронарных артерий пересаженного сердца не было.

Все пациенты на момент обследования не имели признаков воспаления и/или инфекции.

Критерии исключения из исследования были следующими:

- наличие двух или более клинико-лабораторных признаков воспаления (повышенное, более 5 мг/л, содержание СРБ, лейкоцитоз или палочко-ядерный сдвиг лейкоцитарной формулы, субфебрильная или фебрильная температура тела, наличие других клинических проявлений или позитивных данных бактериологического исследования);
- наличие у реципиентов морфологических признаков острого клеточно-отторжения более 1В степени, иммуногистохимических признаков гуморального отторжения пересаженного сердца (AMR-1, antibody-mediated rejection по классификации ISHLT).

Все пациенты с застойной сердечной недостаточностью получали медикаментозную терапию в соответствии с индивидуальными показаниями и тяжестью состояния. Все реципиенты сердца получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию.

Взятие крови для исследования производили одновременно с плановым обследованием пациентов, проводимым в специализированных отделениях и лабораториях ФНЦТИО и включающим термометрию, вирусологическое, бактериологическое, электро-, эхокардиографическое исследование, динамику изменений общих и биохимических показателей крови, коагулограмму, общий анализ мочи, определение кислотно-щелочного равновесия. Всем реципиентам сердца проводили морфологическое (в лаборатории клинической патологии, зав. – проф. И.М. Ильинский) и иммуногистохимическое (в лаборатории трансплантационной иммунологии, под рук. проф. Л.В. Белецкой) исследования эндомикардиального биоптата, измерения концентрации циклоспорина А и коронароангиографическое исследование.

АНАЛИЗ ОТДАЛЕННОГО ПРОГНОЗА

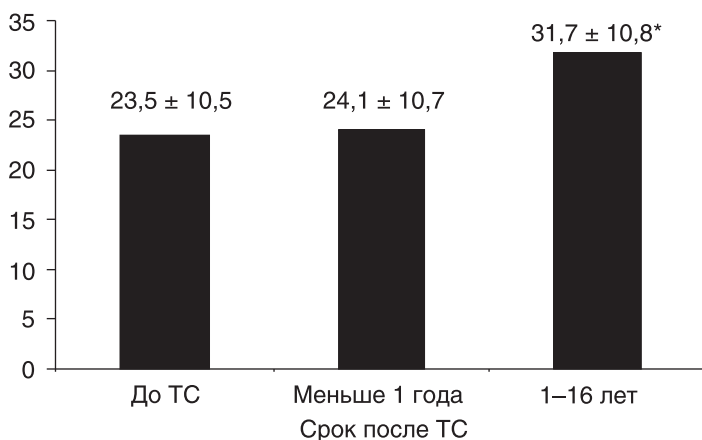
Прогностическое значение уровней антител к кардиолипину определено по результатам проспективного исследования, в которое были включены 32 реципиента, наблюдаемых до и в различные сроки после ТС. Минимальный срок наблюдения составил 3 года, максимальный – 9 лет.

Статистическая обработка результатов исследования производилась с использованием пакета прикладных программ для научно-технических расчетов SPSS 11.5 (LEAD Technologies Inc., США). Достоверность различий количественных параметров в двух группах определялась по t-критерию Стьюдента (для признаков с нормальным распределением).

Уровни антител к кардиолипину у больных сердечной недостаточностью и реципиентов сердца

У больных сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, средний уровень АКЛ составил $23,5 \pm 10,5$ МЕ/мл (от 10 до 52 МЕ/мл, $n = 47$). Повышенные уровни АКЛ (≥ 23 МЕ/мл) были обнаружены у 30 из 47 (63,8%) пациентов. У больных ИКМП и ДКМП средние уровни АКЛ достоверно не отличались: $29,5 \pm 12,7$ МЕ/мл ($n = 12$) и $22,0 \pm 9,7$ МЕ/мл ($n = 35$) соответственно. Повышенные уровни АКЛ чаще встречались у больных ИКМП (у 10 из 12 пациентов, 83%), но также обнаруживались более чем у половины больных ДКМП (20 из 35 больных, 57,1%).

Через год после ТС средний уровень АКЛ составил $24,1 \pm 10,7$ МЕ/мл (от 9 до 70 МЕ/мл, $n = 14$) и достоверно не отличался от такового у пациентов до ТС. В отдаленные сроки (1–16 лет) после ТС средний уровень АКЛ у реципиентов сердца составил $31,7 \pm 10,8$ МЕ/мл (от 6 до 120 МЕ/мл, $n = 30$) и был достоверно выше, чем у больных, ожидающих ТС, и реципиентов сердца в течение первого года после трансплантации (рис. 2).



* $p < 0,05$ в сравнении с пациентами до ТС и реципиентами сердца в первый год после ТС

Рис. 2. Уровень АКЛ у реципиентов сердца в различные сроки после ТС

Приведенные данные показывают, что с увеличением времени, прошедшего после ТС, концентрация АКЛ в плазме крови реципиентов сердца увеличивается.

Прогностическое значение антител к кардиолипину в отношении раннего развития васкулопатии трансплантата

Из общего числа больных с застойной сердечной недостаточностью одиннадцати пациентам в период с 1999 по 2004 гг. была выполнена операция ортотопической трансплантации сердца, и эти пациенты наблюдались в периоды до, в течение первого года и в отдаленные сроки (минимальный срок наблюдения составил 3 года, максимальный – 7 лет) после трансплантации. Уровень АКЛ до трансплантации сердца был стабильно повышен у 6 из 11 пациентов (54,5%) (рис. 3).

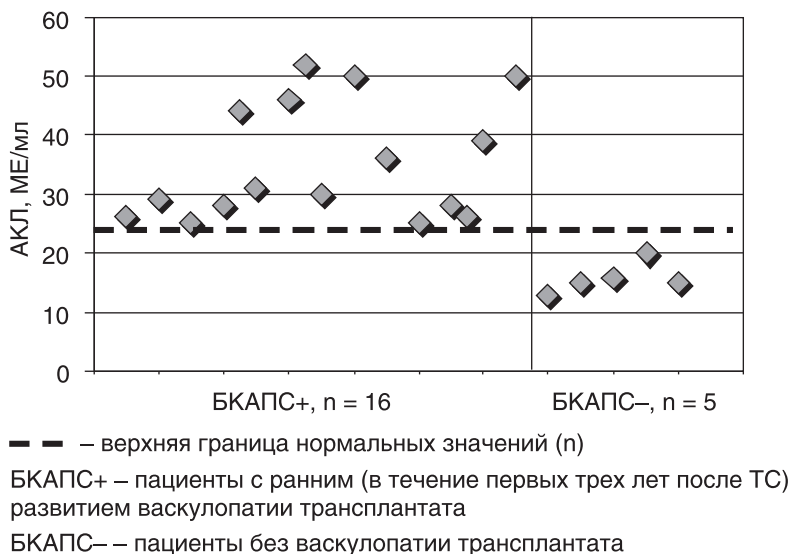


Рис. 3. Исходно повышенные уровни АКЛ у больных сердечной недостаточностью с ранним развитием BKAПC

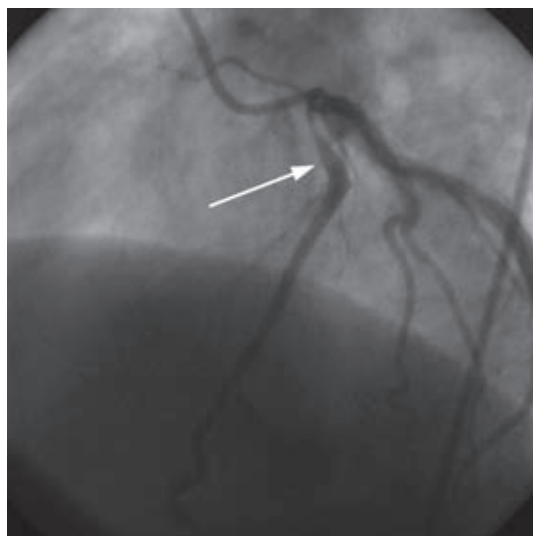
У всех 6 пациентов с исходно повышенными уровнями АКЛ в течение первых трех лет после трансплантации были выявлены ангиографические признаки болезни коронарных артерий пересаженного сердца. У 5 пациентов с уровнем АКЛ до ТС, не превышающим 23 МЕ/мл, в течение первых трех лет и всего последующего периода дальнейшего наблюдения васкулопатии трансплантата выявлено не было.

В качестве клинического примера приводим выписку из истории болезни пациентки Ж., 20 лет, длительное время страдавшей ДКМП.

Пациентке была выполнена трансплантация сердца от донора женского пола 37 лет. Совместима с донором сердца по одному антигену локуса HLA –А. Уровни АКЛ до ТС были повышены – 24, 25 и 28 МЕ/мл. Уровни С-реактивного белка во всех случаях были менее 5 мг/л. После ТС уровни

АКЛ также были повышены, в течение первого года – 26, 23, 24 МЕ/мл. В последующие годы: 19, 24, 25 МЕ/мл. Следует отметить отсутствие клинико-лабораторных признаков воспаления и выраженных морфологических и иммуногистохимических признаков острого отторжения трансплантата в периоды оценки уровней АКЛ. До выявления БКАПС уровень hsCRP составил 2,6; 2,0; 1,6 мг/л, а гомоцистеина – 11; 6,5 и 14,5 мкмоль/л. В течение первых трех лет после трансплантации сердца перенесла один умеренный эпизод острого клеточного отторжения, не было отмечено признаков артериальной гипертензии, а показатели липидного обмена не превышали рекомендованных значений (ХС общ: 4,56 ммоль/л, Хс ЛПНП 1,89 ммоль/л, Хс ЛПВП 2,25 ммоль/л, ТГ 0,92 ммоль/л, ИА 1,03).

На коронарограмме, выполненной на 35-м месяце после ТС, был выявлен стеноз 3-й степени в проксимальной трети передней межжелудочковой ветви, потребовавший выполнения ангиопластики со стентированием коронарных артерий пересаженного сердца (рис. 4).



**Рис. 4. Коронарограмма пациентки Ж. 20 лет. 35 месяцев после ТС.
Стеноз 3-й степени в проксимальной трети
передней межжелудочковой ветви**

Представленный клинический пример наглядно демонстрирует развитие болезни коронарных артерий пересаженного сердца у молодой пациентки с повышенными уровнями АКЛ до трансплантации сердца при отсутствии воспаления, гипергомоцистеинемии и ряда других известных факторов риска (изменений липидного обмена, артериальной гипертензии, отсутствия гистосовместимости по антигенам HLA).

В другом случае рассмотрен пациент С. 1947 г. р. с диагнозом ДКМП. Состояние после трансплантации сердца от 20.02.2001 г. Артериальная гипертензия 1-й степени.

Пациенту была выполнена трансплантация сердца от донора мужского пола 43 лет, совместимого с реципиентом по одному антигену локуса HLA-B. Уровень АКЛ у данного пациента до трансплантации сердца находился ниже пороговых значений (13, 21, 15 МЕ/мл). Уровень hsCRP во всех случаях был менее 5 мг/л. При отсутствии клинико-лабораторных признаков воспаления и выраженных морфологических и иммуногистохимических признаков острого отторжения трансплантата уровни АКЛ были ниже границы нормальных значений и составили: 12, 9, 14, 20, 20, 22 МЕ/мл. Морфологические признаки острого клеточного отторжения пересаженного сердца во всех случаях не превышали степени 1В. На серии контрольных коронарограмм стенотического поражения коронарных артерий отмечено не было.

Таким образом, у данного пациента с уровнями АКЛ до трансплантации сердца, не превышающими нормальных значений, на протяжении всего периода наблюдения болезни коронарных артерий пересаженного сердца выявлено не было.

Представленные результаты показывают, что наличие у пациента повышенного уровня АКЛ до трансплантации сердца связано с развитием васкулопатии пересаженного сердца в ранние сроки (в течение первых трех лет) после операции, что является наиболее тяжелым и неблагоприятным осложнением в отношении дальнейшего прогрессирования васкулопатии трансплантата.

Связь уровней антител к кардиолипину с отдаленным прогнозом у реципиентов сердца

В течение первого года (2–12 месяцев) после ТС повышенные уровни АКЛ были обнаружены у 11 из 14 обследованных (78,6%) реципиентов сердца. Следует отметить, что из 14 реципиентов сердца, обследованных нами в первый год после ТС, у двух пациентов БКАПС развилась в течение первого года, у 7 – признаки васкулопатии трансплантата были выявлены в течение первых трех лет после ТС. У всех 9 реципиентов с развившейся васкулопатией в течение первых трех лет после ТС уровни АКЛ в течение первого года после трансплантации были повышены, средний уровень АКЛ составил $29,9 \pm 13,0$ МЕ/мл (от 16 до 70 МЕ/мл), уровни АКЛ выше верхней границы нормальных значений были обнаружены в 27 из 33 (81,8%) образцов плазмы крови.

У остальных 5 реципиентов, обследованных в первый год после трансплантации, в течение как последующих трех лет после ТС, так и во все время дальнейшего наблюдения (до 9 лет), ангиографических признаков васкулопатии трансплантата выявлено не было. Средний уровень АКЛ у этих пациентов составил $18,3 \pm 4,5$ МЕ/мл (от 9 до 27 МЕ/мл) и был достоверно ниже, чем у реципиентов с развившейся БКАПС в течение первых трех лет после ТС. Однократное повышение уровня АКЛ обнаружено только у двух пациентов, в двух из 24 (8,3%) образцов плазмы крови (рис. 5).

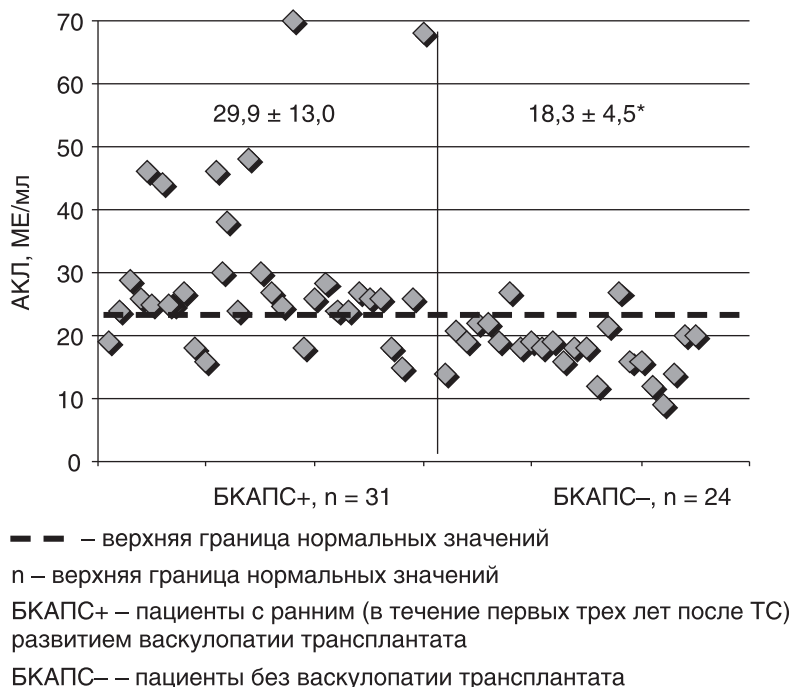


Рис. 5. Повышенные уровни АКЛ в течение первого года после ТС у реципиентов с ранним развитием BKAПC

Результаты проведенного исследования показывают, что наличие стабильно повышенного уровня АКЛ у реципиента в течение первого года после ТС также может иметь прогностическое значение в отношении развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца в ближайшие три года после трансплантации.

В качестве клинических примеров, демонстрирующих связь повышенного уровня антител к кардиолипину до, а также в ранние сроки после ТС, с развитием васкулопатии трансплантата, приводим выписки из историй болезни двух обследованных пациентов. Ниже представлены данные исследований уровня АКЛ у пациента С., наблюдаемого нами до и в течение 7 лет после ТС. У данного пациента васкулопатия трансплантата была диагностирована в течение первого года после трансплантации сердца. У пациента К., наблюдаемого нами до и в течение 9 лет после ТС, васкулопатии пересаженного сердца на протяжении всего периода наблюдения выявлено не было.

Пациент С. 1974 г. р. (и. б. № 552/1999, 1110/2000, 82/2001, 681/2001, 666/2002. 31/2004). Диагноз: ДКМП. Состояние после ортотопической трансплантации сердца от 06.06.2000 г. НК 0-1. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца.

Уровни АКЛ у данного пациента до ТС были повышены: 35 и 25 МЕ/мл. Уровни С-реактивного белка во всех случаях были менее 5 мг/л. После ТС

уровни АКЛ определяли 5 раз. Всякий раз при отсутствии клинико-лабораторных признаков воспаления, выраженных морфологических признаков острого клеточного отторжения (во всех случаях не превышали 1В степени) трансплантата и без иммуногистохимических признаков гуморального отторжения пересаженного сердца уровни были повышенными: 38, 24, 27, 30, 35, 28, 27, 30 МЕ/мл (рис. 6).

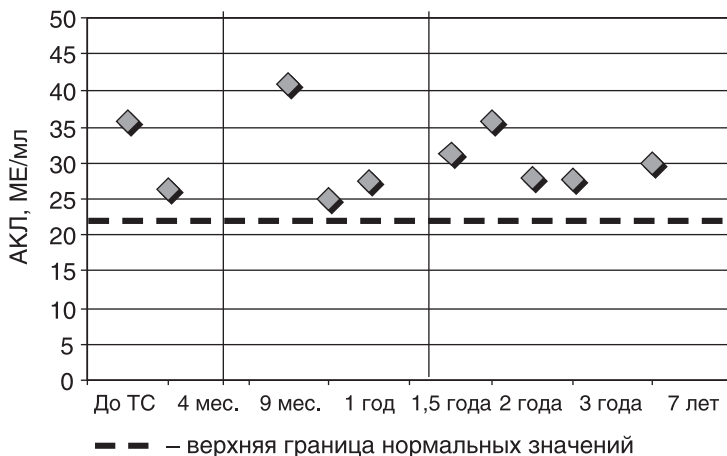


Рис. 6. Уровни АКЛ до и в различные сроки после трансплантации сердца у пациента С. с ранним развитием БКАПС

Таким образом, у данного пациента обнаружено стабильное повышение уровня АКЛ до и в различные сроки после ТС при отсутствии выраженных морфологических и иммуногистохимических признаков острого клеточного и гуморального отторжения пересаженного сердца. По-видимому, у данного пациента в развитии васкулопатии трансплантата значительную роль играют аутоиммунные механизмы: повышенные уровни АКЛ выявлялись до трансплантации сердца и на протяжении последующего периода наблюдения при отсутствии таких факторов риска, как возраст (пациент 1974 г. р.), наличие атеросклероза до трансплантации (исходный диагноз – ДКМП), наличие сопутствующих заболеваний, частых и тяжелых кризов острого отторжения трансплантата, цитомегаловирусной инфекции.

Пациент К. 1950 г. р. (и. б. № 1297/2000, 1458/2001, 706/2002, 1375/2004, 626/2005). Диагноз: ДКМП. Состояние после ортотопической трансплантации сердца от 22.05.1999 г. Остаточные явления острого нарушения мозгового кровообращения. Дизартрия. Артериальная гипертензия 1-й степени. НК 0.

Уровень АКЛ у данного пациента до ТС был 16 МЕ/мл. Уровень С-реактивного белка – менее 5 мг/л. После ТС уровни АКЛ измеряли 8 раз. Всякий раз при отсутствии клинико-лабораторных признаков воспаления, выраженных морфологических (во всех случаях не превышали 1В степени) и

без иммуногистохимических признаков острого отторжения трансплантата уровни АКЛ были ниже верхней границы нормальных значений 18, 18, 12, 20, 6, 13, 16, 18 МЕ/мл (рис. 7). Концентрация уровня СРБ составила 2,3; 3,2; 2,0; 4,0; 2,0; 2,2; 2,7; 2,5 мг/л, соответственно.

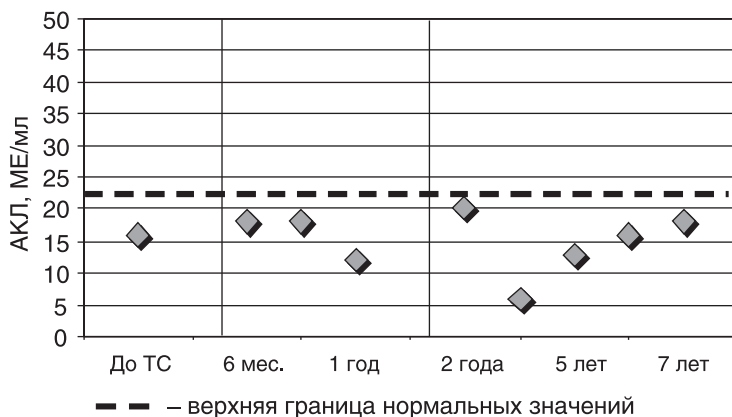


Рис. 7. Уровни АКЛ до и в различные сроки после трансплантации сердца у пациента К. без БКАПС

Таким образом, у данного пациента как до, так и после трансплантации сердца уровни АКЛ не превышали нормальных значений. На протяжении всего периода наблюдения (9 лет) у этого пациента признаков васкулопатии трансплантата выявлено не было.

Относительный риск развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца у больных застойной сердечной недостаточностью и реципиентов в первый год после трансплантации сердца при исходно повышенных уровнях АКЛ

Высчитывали относительный риск (RR) развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца у больных застойной сердечной недостаточностью и у реципиентов в первый год после трансплантации сердца при исходно повышенных уровнях АКЛ. Относительный риск развития БКАПС у больных сердечной недостаточностью и исходным уровнем АКЛ выше верхней границы нормальных значений составил 4,5. С достоверностью 95% относительный риск попадал в пределы 1,5–6,8. Относительный риск развития БКАПС у реципиентов в первый год после трансплантации сердца с уровнями АКЛ выше верхней границы нормальных значений составил 4,0. С достоверностью 95% относительный риск попадал в пределы 1,45–6,5. Для сравнения представлены данные об относительном риске раннего развития васкулопатии трансплантата сердца у больных сердечной недостаточностью с исходным уровнем С-реактивного белка выше 6 мг/л. RR развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца у больных застойной сердечной недостаточностью при повышенных уровнях СРБ составил 1,8, попадал в интервалы 0,55–4,0 и был недостоверен (рис. 8).

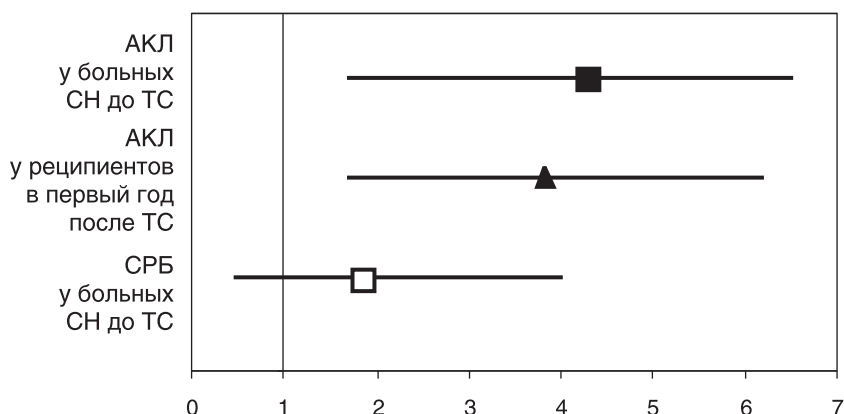


Рис. 8. Связь повышенных уровней АКЛ и СРБ с риском развития васкулопатии трансплантата сердца

Максимальная величина относительного риска (RR) развития БКАПС связана с повышенным уровнем АКЛ.

Клиническая эффективность измерения уровня антител к кардиолипину при васкулопатии трансплантата сердца

В таблице представлена оценка клинической эффективности теста на АКЛ у реципиентов в отдаленные сроки (1–16 лет) после ТС с васкулопатией пересаженного сердца. При оценке диагностического значения АКЛ при развитии васкулопатии трансплантата за верхнюю границу принята концентрация 23 МЕ/мл.

Таблица

Диагностическое значение АКЛ у реципиентов с болезнью коронарных артерий пересаженного сердца

Показатели клинической эффективности теста	Диагностическое значение АКЛ, %
Диагностическая чувствительность	83
Диагностическая специфичность	90
Диагностическая значимость положительных результатов	97,5
Диагностическая значимость отрицательных результатов	76,8

Диагностическая чувствительность повышенных уровней АКЛ у реципиентов с БКАПС составила 83%, это означает, что у 83% реципиентов с БКАПС выявлялись повышенные уровни АКЛ. Диагностическая специфичность составила 90%, т. е. у 90% реципиентов без васкулопатии трансплантата уровень АКЛ не превышал 23 МЕ/мл. Диагностическая значимость положительных результатов – 97,5%, т. е. в 97,5 %, образцов крови пациентов с БКАПС уровень АКЛ превышал 23 МЕ/мл. Диагностическая зна-

чимость отрицательных результатов составила 76,8%, т. е. в 76,8% случаев уровни АКЛ ниже 23 МЕ/мл были обнаружены у пациентов без БКАПС.

РЕКОМЕНДУЕМЫЙ РЕЖИМ ИЗМЕРЕНИЯ УРОВНЯ АКЛ

Измерять уровень антител к кардиолипину у больных сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, с целью определения риска развития БКАПС в ближайшие сроки после трансплантации рекомендуется на этапе дооперационного обследования, одновременно с определением других показателей крови. У реципиентов сердца определять концентрацию антител к кардиолипину рекомендуется также в течение первого года после трансплантации. Исследование необходимо проводить в отсутствие клинико-лабораторных признаков воспаления у реципиентов сердца, кроме того, в отсутствие морфологических и иммуногистохимических признаков острого клеточного или гуморального отторжения трансплантата сердца.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

При повышенных уровнях антител к кардиолипину у больных сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, прогнозируют раннее, в течение первых трех лет после трансплантации, развитие васкулопатии пересаженного сердца.

При повышенных уровнях антител к кардиолипину у реципиентов в первый год после трансплантации прогнозируют развитие васкулопатии пересаженного сердца в ближайшие три года после операции.

Пациенты с высокими уровнями антител к кардиолипину должны быть отнесены к группе высокого риска развития васкулопатии сердечного трансплантата.

Эффективность использования метода

Предлагаемый метод определения концентраций антител к кардиолипину позволяет:

- прогнозировать раннее, в течение первых трех лет после трансплантации, развитие васкулопатии сердечного трансплантата у больных сердечной недостаточностью на этапе дооперационного обследования;
- стратифицировать риск развития васкулопатии трансплантата при обследовании пациентов в терминальной стадии застойной сердечной недостаточности, ожидающих ТС;
- у реципиентов сердца в первый год после трансплантации прогнозировать развитие васкулопатии сердечного трансплантата в ближайшие три года после операции;

- стратифицировать риск развития васкулопатии трансплантата у реципиентов сердца в первый год после трансплантации;
- с высокой диагностической чувствительностью (83%) и специфичностью (90%) выявлять васкулопатию трансплантата у реципиентов в отдаленные сроки (1–16 лет) после трансплантации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца* / Под ред. В.И. Шумакова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 160 С.
2. *Насонов Е.Л.* Антифосфолипидный синдром. – М.: «Литтерра», 2004. – 440 С.
3. *Олефиренко Г.А., Червякова Н.В., Шевченко О.П.* Повышение уровня антител к кардиолипину (АКЛ) при осложнениях у реципиентов с пересаженным сердцем. – Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – № 9. – С. 42.
4. *Олефиренко Г.А.* Антитела к кардиолипину при сердечно-сосудистых заболеваниях. – Лаборатория. – 2003. – № 2. – С. 14–15.
5. *Орлова О.В., Халилулин Т.А., Шевченко А.О.* Антитела к кардиолипину при коронарной болезни сердца и сердечного трансплантата. – Лаборатория. – 2007. – № 4. – С. 6–7.
6. *Трансплантация сердца* / Под ред. В.И. Шумакова. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. – 400 С.
7. *Шевченко О.П., Орлова О.В., Казаков Э.Н. и др.* Повышение уровней антител к кардиолипину у инфицированных вирусами реципиентов сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 4. – С. 5–10.
8. *Шумаков В.И., Шевченко О.П., Орлова О.В. и др.* Васкулопатия трансплантированного сердца: синергизм провоспалительных, проатерогенных факторов и вирусной инфекции. – Вестник РАМН. – 2006. – № 11. – С. 8–14.
9. *Шумаков В.И., Шевченко О.П., Орлова О.В. и др.* Антитела к кардиолипину при болезни коронарных артерий пересаженного сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 1. – С. 45–49.
10. *Шумаков В.И., Шевченко О.П., Казаков Э.Н. и др.* Прогностическое значение антител к кардиолипину при васкулопатии трансплантированного сердца // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – № 3. – С. 59–64.
11. *Adhiyaman V., Donepudi R., Douglas F., Kumwenda M.J.* Antiphospholipid syndrome presenting as cardiac failure. – QJM. – 2001. – Vol. 94. – P. 504–504.
12. *Ambrosi P., Garcon D., Riberi A. et al.* Association of mild hyperhomocysteinemia with cardiac graft vascular disease. – Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 138. – P. 347–350.
13. *Arbustini E., Dal Bello B., Morbini R. et al.* Factors increasing the risk of allograft vascular disease in heart transplant recipients. – G. Ital. Cardiol. – 1997. – Vol. 27 (10). – P. 985–999.
14. *Avivi I., Lanur I. et al.* Hyperhomocysteinemia is common in patients with antiphospholipid syndrome and may contribute to expression of major thrombotic events. – Blood Coagul Fibrinolysis. – 2002. – Vol. 13. – P. 234–237.

15. *Cooke G.E., Eaton G.M., Whitby G. et al.* Plasma atherogenic markers in congestive heart failure and posttransplant (heart) patients // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2000. – Vol. 36. – P. 509–516.
16. *Haviv Y.S.* Association of anticardiolipin antibodies with vascular injury: possible mechanisms // *J. Postgrad. Med.* – 2000. – Vol. 76. – P. 625–628.
17. *Hughes G.R.V.* The antiphospholipid syndrome: ten years on. – *Lancet.* – 1993. – Vol. 324. – P. 341–344.
18. *Kaplan S.D., Chartash E.K., Pizzarello R.A., Furil R.A.* Cardiac manifestation of antiphospholipid syndrome // *Am. Heart J.* – 1992. – Vol. 124. – P. 1331–1338.
19. *Libby P., Ridker P.M., Masery A.* Inflammation and atherosclerosis. – *Circulation.* – 2002. – Vol. 105. – P. 1135–1143.
20. *Schofield R.S., Aranda J.M., Shoemaker S.B. et al.* Cardiac transplantation in patients with anti-phospholipid antibodies // *J. Heart Lung Transplant.* – 2007. – Vol. 26. – P. 299–301.
21. *Taylor D.O., Yowell R.L., Kfoury A.G. et al.* Allograft coronary artery disease: clinical correlations with circulating anti-HLA antibodies and the immunopathologic pattern of vascular rejection // *J. Heart Lung Transp.* – 2000. – Vol. 70. – P. 518.
22. *Weis M., Von Scheidt W.* Cardiac allograft vasculopathy. – *Circulation.* – 1997. – Vol. 96. – № 6. – P. 2069–2077.

Министерство здравоохранения и социального развития РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

**«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ им. АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»**

«Утверждаю»
директор ФГУ «Федеральный
научный центр трансплантологии
и искусственных органов
им. академика В.И. Шумакова»
член-корреспондент РАМН, профессор
С.В. Готье

«__» _____ 2010 года

**ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ
АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ
ПО СХЕМЕ БАНФФ-1995**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Москва 2010

Организация-разработчик:

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

АННОТАЦИЯ

В методических рекомендациях приведены основные правила приготовления гистологических препаратов экспресс-биопсий аллотрансплантированной печени, критерии адекватности биоптата для диагностики патологии, определение понятия острого отторжения аллотрансплантированной печени, качественная и полуколичественная оценка острого отторжения аллотрансплантированной печени, а также клинико-морфологические корреляции в соответствии с Международной классификацией Банфф – 1995.

Методические рекомендации предназначены для врачей-гепатологов, трансплантологов, патологов, интернов и студентов старших курсов медицинских вузов.

Методические рекомендации разработаны и составлены коллективом авторов: профессором Ильинским И.М., кандидатом медицинских наук Можейко Н.П., врачом-патологом Шкаловой Л.В., профессором Цирульниковой О.М.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	145
Методика приготовления гистологических препаратов экспресс-биопсий и адекватность биоптата аллотрансплантированной печени	146
Определение понятия острого отторжения аллотрансплантированной печени	147
Качественная оценка острого отторжения аллотрансплантированной печени	148
Полуколичественная оценка острого отторжения аллотрансплантированной печени	148
Основные клинические и лабораторные показатели при остром отторжении аллотрансплантированной печени.....	153
Клинико-морфологические корреляции при остром отторжении аллотрансплантированной печени	153
Рекомендуемая литература.....	154

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ортотопическая аллотрансплантация печени является безальтернативным методом лечения пациентов в терминальной стадии печеночной недостаточности. Эта операция сохраняет им жизнь и обеспечивает высокий уровень реабилитации.

14 февраля 2010 года в «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» состоялась Всероссийская конференция «Трансплантация печени в России: 20 лет спустя», на которой были не только отмечены основные вехи развития проблемы в нашей стране, но и обобщены результаты работы трансплантационных центров за этот период.

Первые операции трансплантации печени от трупных доноров в СССР были выполнены в РНЦХ РАМН 14 февраля 1990 года (А.К. Ерамишанцев, С.В. Готье, А.Г. Шерцингер, А.В. Пугаев, В.М. Лебезев и О.Г. Скипенко) и в НИИ трансплантологии и искусственных органов 27 февраля того же года (В.И. Шумаков и Я.Г. Мойсюк). В России первая операция трансплантации левого латерального сектора печени от живого родственного донора была осуществлена 20 марта 1997 года (С.В. Готье), а первая в мире пересадка правой доли печени – 4 ноября 1997 года (С.В. Готье).

На этот момент пересадка печени выполняется не только в центрах Москвы (ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздравсоцразвития РФ», Московский городской Центр трансплантации печени НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского) и Санкт-Петербурга (РНЦРХТ), но и в региональных центрах (ОКБ № 1, Екатеринбург; ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород). К началу 2010 года в России выполнено более 520 пересадок печени трупных и живых родственных доноров.

Успешное развитие отечественной программы трансплантации печени в последние годы ведет к вовлечению все возрастающего числа врачей, в том числе и патологов, в лечебный процесс этого контингента пациентов. Несмотря на хорошую раннюю и удовлетворительную позднюю выживаемость аллотрансплантированной печени, актуальным остается вопрос диагностики различных осложнений, и в первую очередь острого отторжения трансплантированной печени.

Известны многочисленные классификации острого отторжения аллотрансплантированной печени: Миннесотская (D.C. Snover et al., 1987), Ганноверская (J. Kemnitz et al., 1989), Бирмингемская (B. Dousset et al., 1993), Лондонская (S. Datta Gupta et al., 1995) и др. Все эти классификации имели и положительные, и отрицательные стороны. В 1995 году в Банффе по рекомендации экспертной группы была принята Международная система градации острого отторжения аллотрансплантированной печени. На сегодня классификация острого отторжения аллотрансплантированной печени по Банфф-1995 принята большинством трансплантологических центров.

МЕТОДИКА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЭКСПРЕСС-БИОПСИЙ И АДЕКВАТНОСТЬ БИОПТАТА АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Методика приготовления гистологических препаратов экспресс-биопсии аллотрансплантированной печени. Толстоигольный биоптат аллотрансплантированной печени после фиксации промыть проточной водой, а затем залить в парафин, предварительно проведя его обезвоживание путем проводки через ряд спиртов возрастающей крепости, далее последовательно пропитать хлороформом, смесью хлороформа с парафином и чистым парафином:

10% раствор нейтрального формалина на 30 минут.

Промыть водопроводной водой – 5 минут.

70° спирт – 5 минут.

80° спирт – 5 минут.

96° спирт¹ – 5 минут.

96° спирт² – 5 минут.

100° спирт¹ – 5 минут.

100° спирт² – 5 минут.

Хлороформ + 100° спирт (1:1) – 2 минуты.

Хлороформ¹ – 1 минута.

Хлороформ² – 1 минута.

Парафин + хлороформ – 1 минута в термостате при t 67°.

Парафин¹ на 5 минута в термостате при t 67°.

Парафин² на 5 минута в термостате при t 67°.

Парафин³ на 5 минута в термостате при t 67°.

Заливка в парафин.

Из парафиновых блоков приготовить с помощью ротационного микротомы гистологические срезы толщиной 4 мкм и наклеить их на предметные стекла. Перед окрашиванием гистологические препараты депарафинировать:

Ксилол¹ – 5 минут.

Ксилол² – 5 минут.

Абсолютный¹ спирт (100°) – 2 минуты.

Абсолютный² спирт (100°) – 2 минуты.

96° спирт¹ – 2 минуты.

96° спирт² – 2 минуты.

70° спирт – 2 минуты.

Дистиллированная вода – 2 минуты.

Два гистологических препарата окрасить гематоксилином и эозином (обзорная окраска), один гистологический препарат – трихромом по Массону (дифференцированное окрашивание соединительной и мышечной ткани),

один гистологический препарат – PAS-реакция (выявление нейтральных мукополисахаридов, гликогена, гиалиноза сосудов).

В общей сложности на приготовление гистологических препаратов толстоигольных биоптатов аллотрансплантированной печени уходит около 4–5 часов. Поэтому при условии получения материала в утренние часы результаты гистологического исследования биоптатов аллотрансплантированной печени становятся доступными во второй половине того же рабочего дня. Это чрезвычайно важно для своевременного начала лечения пациентов, у которых острое отторжение было подтверждено результатами морфологического исследования.

Исследование гистологических препаратов осуществляется в световом микроскопе с использованием различных объективов ($\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 100$).

Адекватность биоптата аллотрансплантированной печени

Пункционный толстоигольный биоптат аллотрансплантированной печени считается адекватным, если в гистологическом срезе имеется пять или более портальных треугольников, так как именно в них появляются основные изменения, характерные для острого отторжения и других видов патологии.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОНЯТИЯ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Острое отторжение аллотрансплантата печени, также как и других аллотрансплантированных органов, является ответом иммунной системы реципиента на чужеродные антигены и представляет собой реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Поэтому это осложнение развивается только в конце первой недели после трансплантации печени при недостаточном уровне базовой иммуносупрессии. В основе патологии при остром отторжении печени лежат воспалительные и некротические процессы. В соответствии с принятой международной классификацией Банфф-1995 острое отторжение аллотрансплантата печени определяется как «воспаление аллотрансплантата, вызванное генетическими различиями между донором и реципиентом, при котором прежде всего повреждаются междольковые желчные протоки и эндотелий портальных вен и печеночных венул, иногда печеночной артерии и ее ветвей».

Экспертная группа Банфф-1995 не рекомендует для острого отторжения трансплантата печени употреблять такие синонимы, встречающиеся в литературе, как:

- раннее отторжение,
- клеточное отторжение,
- недуктопеническое отторжение,
- отторжение без потери протоков,
- обратимое отторжение.

КАЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

В соответствии с критериями Банфф-1995 качественная оценка острого отторжения основана на степени и распространенности воспалительного процесса в портальных треугольниках (табл. 1). При наличии незначительной воспалительной инфильтрации только в отдельных портальных треугольниках диагностируется «неопределенная» степень острого отторжения. При умеренной степени острого отторжения, в отличие от легкой степени, воспалительная инфильтрация имеет место в большинстве или во всех портальных треугольниках. При тяжелой же степени воспалительный процесс распространяется и на перипортальную зону с разрушением пограничной пластинки, а кроме того, может быть и воспаление в области центральных вен долек: инфильтрация стенки вен, перивенулярная инфильтрация лимфоцитами и перивенулярный некроз гепатоцитов.

Таблица 1

Качественная оценка острого отторжения аллотрансплантированной печени (*International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. – Hepatology. – 1995. – Vol. 22. – P. 648–654*)

Степень отторжения	Критерии
Неопределенная	Воспалительный инфильтрат в портальных трактах незначительный для постановки диагноза острого отторжения
I степень (легкая)	Умеренная инфильтрация не всех триад, не выходящая за пределы портальных треугольников
II степень (умеренная)	Умеренная инфильтрация большинства или всех портальных треугольников
III степень (тяжелая)	Воспаление как при средней степени с переходом его на перипортальную зону. От средней до тяжелой перивенулярной воспалительной инфильтрации, которая распространяется на паренхиму печени с развитием перивенулярного некроза гепатоцитов

ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Полуколичественную оценку степени острого отторжения осуществляют на основании так называемого индекса активности острого отторжения (**RAI**), который получается от сложения степени воспаления трех структур биоптата: портальных треугольников, желчных протоков и вен (**RAI** = степень воспаления портальных трактов + степень воспаления желчных про-

токов + степень воспаления вен). Степень воспаления каждой из структур определяется в баллах от 0 до 3.

Морфология при различной степени воспаления портальных треугольников при остром отторжении аллотрансплантированной печени представлена в табл. 2. Если только часть портальных треугольников инфильтрирована малыми лимфоцитами (рис. 1), то это соответствует слабой степени воспаления (1 балл).

Таблица 2

Показатель активности острого отторжения по степени портального воспаления (*International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. – Hepatology. – 1995. – Vol. 22. – P. 648–654*)

Критерии	Баллы
Инфильтрация главным образом лимфоцитами меньшей части триад	1
Экспансия воспаления на большинство или все триады, инфильтрат состоит из лимфоцитов, лимфобластов, нейтрофилов и эозинофилов	2
Экспансия воспаления не только на большинство или все триады, но и на перипортальную паренхиму, в инфильтрате большое количество лимфобластов и эозинофилов	3

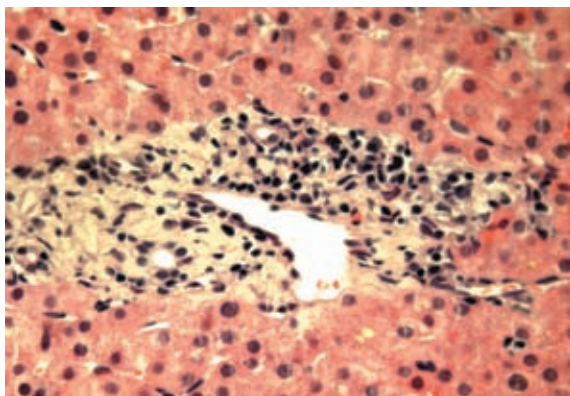


Рис. 1. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация ограничивается зоной портального треугольника на 1 балл. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Если большинство или все портальные треугольники воспалены и кроме малых лимфоцитов в воспалительном инфильтрате присутствуют лимфобласты, нейтрофильные и эозинофильные лейкоциты, то имеет место умеренное воспаление портальных трактов (2 балла). Тяжелая степень портального воспаления (3 балла) диагностируется при разрушении пограничной пластинки с вовлечением в воспалительный процесс перипортальной паренхимы в большинстве или во всех портальных треугольниках (рис. 2).

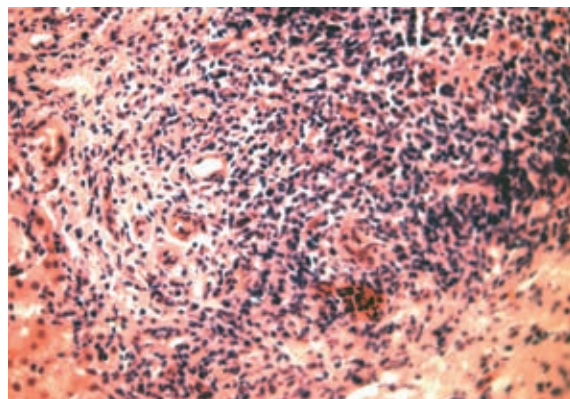


Рис. 2. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация выходит за пределы портального треугольника с разрушением пограничной пластинки (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Различные степени воспаления желчных протоков при остром отторжении аллотрансплантированной печени представлены в табл. 3. При легкой степени воспаления желчных протоков (1 балл) только меньшая часть их инфильтрирована лимфоцитами; кроме того, наблюдаются дистрофические изменения и увеличение ядерно-цитоплазматического индекса эпителиоцитов (рис. 3).

Таблица 3

Показатель активности острого отторжения по степени воспалительного повреждения желчных протоков (*International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. – Hepatology. – 1995. – Vol. 22. – P. 648–654*)

Критерии	Баллы
Меньшая часть желчных протоков инфильтрирована мононуклеарами и только умеренные реактивные изменения эпителиоцитов с увеличением ядерно-цитоплазматического соотношения	1
Большинство или все желчные протоки инфильтрированы воспалительными клетками. Во многих протоках имеются дегенеративные изменения эпителия типа ядерного плеоморфизма, нарушения полярности и вакуолизация цитоплазмы	2
Как выше при 2-й степени, но в большинстве или во всех желчных протоках, а также повреждение их просветов	3

При умеренной степени (2 балла) в воспалительный процесс вовлечены большинство или все желчные протоки. При тяжелой степени (3 балла) к изменениям умеренной степени присоединяется повреждение просветов желчных протоков (рис. 4).

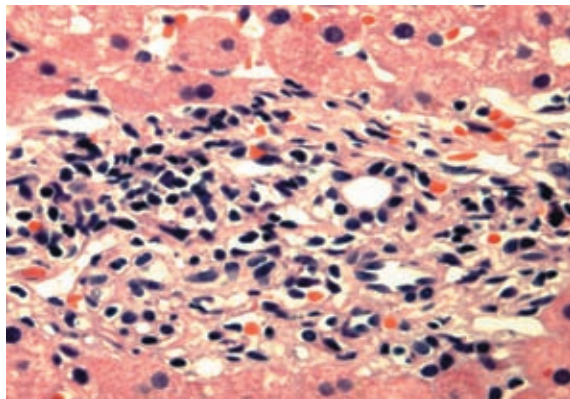


Рис. 3. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация выходит за пределы портального треугольника с разрушением пограничной пластинки (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. ×400

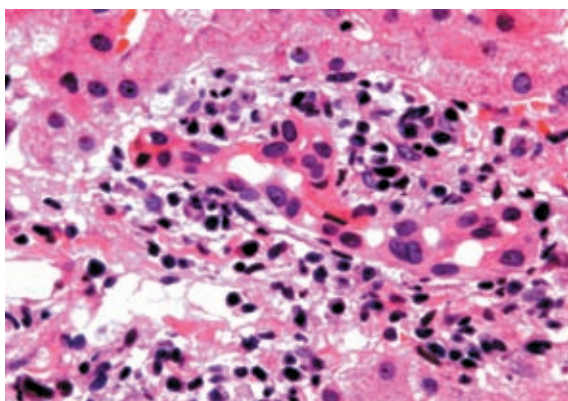


Рис. 4. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация, реактивные изменения эпителиоцитов и повреждение просвета желчного протока (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Степень воспаления стенки вен при остром отторжении аллотрансплантированной печени представлены в табл. 4. Учитывается воспаление как вен портальных треугольников, так и центральных вен долек печени. Инфильтрация лимфоцитами субэндотелиальной зоны части портальных и/или центральных вен соответствует легкой степени (1 балл). Если же в воспалительный процесс вовлечены большинство или все вены, то это соответствует умеренной степени флебитов (2 балла). Распространение воспаления на перивенулярные зоны с некрозом гепатоцитов соответствует тяжелой степени (3 балла) флебитов аллотрансплантированной печени.

Таблица 4

Показатель активности острого отторжения по степени воспаления вен (*International Working Party. Terminology for hepatic allograft rejection. – Hepatology. – 1995. – Vol. 22. – P. 648–654*)

Критерии	Баллы
Субэндотелиальная инфильтрация лимфоцитами части портальных и/или центральных вен	1
Субэндотелиальная инфильтрация лимфоцитами большинства или всех портальных и/или центральных вен	2
Как выше при 2-й степени, но воспаление распространяется на перивенулярные зоны паренхимы с развитием некроза гепатоцитов	3

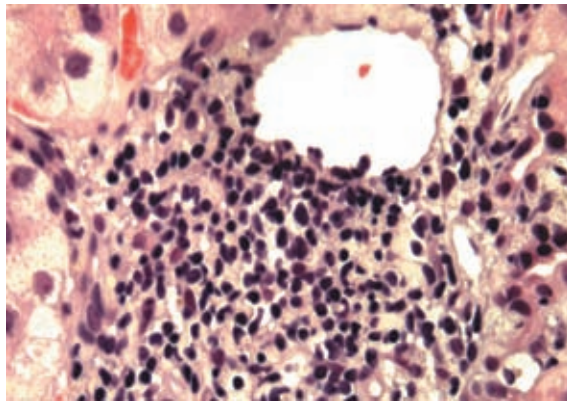


Рис. 5. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация стенки вены в портальном треугольнике (1 балл). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

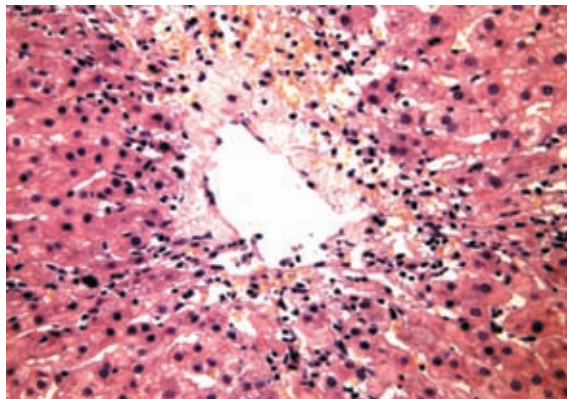


Рис. 6. Острое отторжение аллотрансплантированной печени. Воспалительная инфильтрация стенки центральной вены распространяется на прилегающую паренхиму с повреждением гепатоцитов (3 балла). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

От величины индекса активности зависит степень острого отторжения:

RAI 0-2 – отторжение отсутствует;

RAI 3 – «неопределенное»;

RAI 4-5 – легкая степень;

RAI 6-7 – умеренная степень;

RAI 8-9 – тяжелая степень.

ОСНОВНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ И ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ОСТРОМ ОТТОРЖЕНИИ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

При интерпретации результатов гистологического исследования биоптатов аллотрансплантированной печени патолог должен опираться не только на морфологическую картину, но также на клинические и лабораторные данные. Поэтому в направлении на исследование биоптата необходимо давать краткую клиническую характеристику пациента и основные лабораторные показатели. Очень важным является срок между трансплантацией печени и выполнением биопсии, так как клиника острого отторжения обычно появляется в интервале между 5 и 30 днями после трансплантации печени. Признаки острого отторжения в более поздние сроки могут наблюдаться у больных, которые получают базовую иммуносупрессию в дозах, меньших терапевтического уровня.

В рекомендациях Банфф-1995 указывается, что клинические данные на ранней стадии умеренного острого отторжения часто отсутствуют. В поздней стадии или при тяжелой степени острого отторжения клинические проявления включают лихорадку, отеки, цианоз и болезненность аллотрансплантата. Желчь часто становится светлого цвета, и ее количество уменьшается. Иногда развивается асцит из-за увеличения печени в связи с повышенным внутривнутрипеченочным давлением.

Дисфункция печени обычно проявляется как сопутствующее неселективное повышение уровня некоторых или всех стандартных показателей: общий билирубин, аланинаминотрансфераза, аспаргатаминотрансфераза, глутамилтранспептидаза, щелочная фосфатаза, лейкоцитоз и эозинофилия.

КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КОРРЕЛЯЦИИ ПРИ ОСТРОМ ОТТОРЖЕНИИ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Патогистологический диагноз острого отторжения не обязательно означает, что отторжение клинически значимо и требует лечения. Это касается «неопределенного» и легкого острого отторжения. Однако у этих пациентов целесообразно проведение повторной биопсии через одну-две недели.

При умеренном остром отторжении также может отсутствовать клиника и изменение лабораторных тестов, но при этом, как правило, требуется проведение антикризовой терапии. При тяжелом остром отторжении пациентам в облигатном порядке следует проводить антикризовую терапию и усиление базовой иммуносупрессивной терапии. Не леченные, клинически значимые острые кризы отторжения аллотрансплантированной печени приводят к необратимым структурным и функциональным изменениям. Неполное купирование острых кризов ведет к развитию хронического отторжения аллотрансплантированной печени. Поэтому после проведения антикризового лечения даже при нормализации клиники и лабораторных показателей рекомендуется повторение биопсии с целью определения восстановления гистологической картины трансплантата.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. *Очерки клинической трансплантологии* / Под ред. С.В. Готье. – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2009. – 360 с.
2. *Трансплантология. Руководство для врачей* / Под ред. академика В.И. Шумакова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. – 540 с.
3. *Шереметьева Г.Ф., Морозова М.М.* Морфологический мониторинг пересаженных органов // В кн.: Клиническая трансплантология / Под ред. Б.А. Константинова. – М.: «Арт-Арт», 2004. – С. 256–303.
4. *International Working Party.* Terminology for hepatic allograft rejection. – Hepatology. – 1995. – Vol. 22. – P. 648–654.
5. *Datta Gupta S., Hudson M., Burroughs A.K. et al.* Grading of cellular rejection after orthotopic liver transplantation // Hepatology. – 1995. – Vol. 21. – P. 46–57.
6. *Demetris A.J., Batts K.P., Dhillon A.P. et al.* Banff Schema for Grading Liver Allograft Rejection: An International Consensus Document // Hepatology. – 1997. – Vol. 25. – № 3. – P. 658–663.
7. *Dousset B., Hubscher S.G., Padbury R.T. et al.* Acute liver allograft rejection-is treatment always necessary // Transplantation. – 1993. – Vol. 55. – P. 529–534.
8. *Horoldt B.S., Burattin M., Gunson B.K. et al.* Does the Banff Rejection Activity Index Predict Outcome in Patients With Early Acute Cellular Rejection Following Liver Transplantation? // Liver Transpl. – 2006. – Vol. 12. – P. 1144–1151.
9. *Kemnitz J., Ringe B., Cohnert T.R. et al.* Bile duct injury as part of diagnostic criteria for liver allograft rejection // Hum. Pathol. – 1989. – Vol. 20. – P. 132–143.
10. *Snover D.C., Freese D.K., Sharp H.L. et al.* Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection // Am. J. Surg. Pathol. – 1987. – Vol. 11. – № 1. – P. 1–10.

**V. ДИССЕРТАЦИИ
ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ
«ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ
И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ»,
ЗАЩИЩЕННЫЕ В 2010 г.**

**ПЕРЕЧЕНЬ СОВЕТОВ ПО ЗАЩИТЕ
ДОКТОРСКИХ И КАНДИДАТСКИХ
ДИССЕРТАЦИЙ, УТВЕРЖДЕННЫХ
(ПРОДЛЕННЫХ) ПРИКАЗАМИ
РОСОБРНАДЗОРА (РЕДАКЦИЯ 25 ИЮЛЯ
2008 ГОДА), ПРИНИМАЮЩИХ К ЗАЩИТЕ
ДИССЕРТАЦИИ ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ
14.01.24 ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ
И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ**

Д 208. 055. 01 при ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Приказ Председателя ВАК № 1925-1333 от 09.09.09 г.

Д 212. 203. 09 при ГУ ВПО «Российский университет дружбы народов».

Приказ Председателя ВАК № 1–9 от 18. 01. 08 г.

Д 001. 027.02 при ГУ «Российский научный центр хирургии им. академика Б.В. Петровского» РАМН.

Приказ Председателя ВАК № 1–4 от 18.01.08 г.

**АВТОРЕФЕРАТЫ ДИССЕРТАЦИЙ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
ДОКТОРА НАУК**

Валов Алексей Леонидович

**ФАЗОВО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ
МИКРОСКОПИЯ И КОМПЬЮТЕРНАЯ
МОРФОЦИТОМЕТРИЯ
В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ДИСФУНКЦИЙ ПОЧЕЧНОГО
АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА И ОЦЕНКЕ
ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОКРИЗОВОЙ
ТЕРАПИИ**

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ГУ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».

Научные консультанты:

доктор медицинских наук,
профессор
доктор медицинских наук,
профессор

Ватазин Андрей Владимирович

Василенко Ирина Анатольевна

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

«Трансплантация органов, одно из чудес двадцатого века, продолжает спасать и улучшать жизни сотен тысяч пациентов по всему миру», – так справедливо записано в итоговом документе Стамбульского саммита (2008), посвященного проблемам трансплантологии.

Результаты аллотрансплантации трупной почки (АТПП) с каждым годом улучшаются, что закономерно обусловлено интенсивным развитием трансплантационной иммунологии, разработкой эффективных методов иммунодепрессии, совершенствованием хирургической техники, диагностики и лечения возникающих осложнений.

Вместе с тем на современном этапе развития трансплантологии очевидно, что аллотрансплантат, к сожалению, в разные сроки после операции утрачивает свою функцию. При этом различные по патогенезу осложнения и изменения в трансплантированной почке клинически могут проявляться однотипно, как правило, снижением или прекращением функции аллотрансплантата.

Большинство определяемых клинических, инструментальных и лабораторных признаков не являются строго специфичными для верификации причин почечной дисфункции, включая острое отторжение почечного аллотрансплантата (Сандриков В.А., Садовников В.И., 2001; Danovitch G.M., 2001; Tinckam K.J. et al., 2004). Однотипные изменения могут регистрироваться в различных комбинациях вследствие острого канальцевого некроза, инфекционных, хирургических и урологических осложнений, токсичности ингибиторов кальциневрина и других лекарственных средств и т. д. (Арзуманов С.В. и соавт., 2005; Шумаков В.И. и соавт., 2006; Dalton R.S. et al., 2005).

Безусловно, своевременная и точная диагностика изменений, развивающихся в аллотрансплантате и обуславливающих нарушение его функции, занимает важнейшее место в клинической трансплантологии, определяет лечебную тактику и прогноз (Abele R. И соавт., 1992; Thorogood F.J. и соавт., 1999; Ватазин А.В. и соавт., 2000; Шумаков В.И. и соавт., 1998).

Общепризнанно, что морфологические методы исследования являются наиболее достоверными в дифференциальной диагностике не только патологических, но и функциональных процессов, протекающих в пересаженной почке.

В то же время целый ряд морфологических изменений не всегда являются строго специфичными для того или иного вида осложнений. Это имеет особое значение при диагностике комбинированных поражений пересаженного органа, например, при ишемическом повреждении и острой реакции отторжения или ишемическом и нефротоксическом повреждении трансплантата циклоспорином А, такролимусом и др.

В этой связи особое значение принадлежит совершенствованию методов морфологического исследования иммунокомпетентных клеток реципиента и оптимизации мониторинга иммунного статуса. К интенсивно разрабатываемым способам диагностики относятся новейшие оптические компьютерные лазерные системы (Автандилов Г.Г., 2008; Александров М.Т. с соавт., 1996; Cherny V.V. et al., 1995).

В 1995 году Василенко И.А. и соавт. для витальной оценки морфофункционального состояния клеток периферической крови, в том числе и им-

мунокомпетентных клеток, предложили использовать метод компьютерной лазерной фазовой морфометрии (КФМ). Первые результаты применения компьютерной морфометрии для оценки иммунного статуса реципиентов почечного трансплантата оказались весьма обнадеживающими (Ватазин А.В. с соавт., 2006; Метелин В.Б. с соавт., 2004, 2007). Вместе с тем предварительные исследования показали, что необходимость определения целого комплекса размерных показателей лимфоцитов, проведения многоуровневого математического анализа и сложность интерпретации полученных данных в определенной степени ограничивают возможности метода, тем более для экспресс-диагностики ранней дисфункции почечного трансплантата.

В этой связи разработка новых методических подходов к анализу морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток на основе витальной компьютерной фазометрии непосредственно ядерных структур лимфоцитов может иметь не только научное значение для детального исследования патогенетических звеньев реакции отторжения трансплантированного органа, но и весьма важный практический результат для оперативной оценки иммунореактивности и прогнозирования состояния реципиента, а также построения индивидуализированных лечебно-реабилитационных программ, сравнения эффективности различных видов терапии, своевременного выявления осложнений, побочных и/или неблагоприятных эффектов лечения.

Все сказанное касается раннего посттрансплантационного периода. Вместе с тем, несмотря на значительный прогресс клинической трансплантологии, 5-летняя выживаемость трансплантированной почки составляет лишь около 70%, а 10-летняя – 52% (Столяревич Е.С. с соавт., 2001; Томилина Н.А. с соавт., 2003).

По общему признанию, среди причин, ограничивающих срок жизни почечного аллотрансплантата, главную роль играет хроническая трансплантационная нефропатия (ХТН).

В качестве возможных факторов, приводящих к ХТН, специалисты рассматривают возраст и пол реципиента; характер начальной функции трансплантата и ранние кризы отторжения; уровень креатинина плазмы на момент биопсии; выраженность артериальной гипертонии, протеинурии и гематурии; а из морфологических проявлений – выраженность тубуло-интерстициального склероза, присутствие хронической трансплантационной гломерулопатии и гломерулосклероза, васкулопатии и наличие морфологических признаков активности отторжения (Багдасарян А.Р. с соавт., 2003; Балакирев Э.М. с соавт., 2003; Мойсюк Я.Г. с соавт., 2003; de V.Edwardes M.D. et al., 2004; Fine L.G. et al., 2000; Nankivell V.J. et al., 2001).

Значимость ряда из них уже достоверно определена в многочисленных исследованиях (Столяревич Е.С. с соавт., 2001, 2003; Шумаков В.И. с соавт., 2000; Elster E. et al., 2004). Роль других, особенно в эру современной иммуносупрессии, продолжает обсуждаться и пересматриваться.

При этом одной из главных причин нарушения функции и потери трансплантата многие авторы считают процесс отторжения пересаженного органа (Ким И.Г., 1999; Томилина Н.А. с соавт., 2003; Kreis N.A., Ponticelli C., 2001; Mauiyyedi S. et al., 2001; Paul L.C., 2001).

Наиболее ярким доказательством влияния иммунных факторов на развитие ХТН являются данные, демонстрирующие связь между острым и хроническим отторжением (Cosio F.G. et al., 1997; Baeten D. et al., 2004).

Некоторые авторы в рамках ХТН даже выделяют самостоятельную нозологическую форму, имея в виду исключительно антигензависимый процесс, морфологическим проявлением которого является фибропролиферативный васкулит и хроническая трансплантационная гломерулопатия (Kreis N.A., Ponticelli C., 2001; Mautyyedi S. et al., 2001).

Не вызывает сомнения, что пункционная биопсия остается основным методом верификации ХТН. Однако неспецифичность морфологических признаков в классификации Banff, а также выраженная полиморфность клинической картины и особенностей течения ХТН диктуют необходимость разработки и клинического применения новых оригинальных методов, включая изучение функциональной активности иммунокомпетентных клеток.

В связи со сказанным, исследование динамики морфометрических характеристик иммунокомпетентных клеток методом витальной компьютерной фазометрии на различных этапах посттрансплантационного периода позволит, на наш взгляд, в определенной мере конкретизировать некоторые механизмы действия иммунных факторов в патогенезе острого и хронического отторжения ренального трансплантата, изучить их взаимосвязь с неспецифическими причинами и морфологическими проявлениями дисфункции пересаженной почки, что и явилось основанием для выполнения настоящего исследования.

Цель исследования

Разработать и внедрить в клиническую практику метод витальной компьютерной фазовой морфометрии клеток крови, включая денситометрию ядерного хроматина, для дифференциальной доклинической диагностики дисфункций почечного аллотрансплантата в раннем и отдаленном посттрансплантационном периоде.

Задачи исследования

Для реализации цели исследования были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить особенности морфофункционального состояния клеток крови (лимфоцитов, нейтрофилов, эритроцитов и тромбоцитов) и динамики их изменений в процессе проведения заместительной почечной терапии и в раннем посттрансплантационном периоде на этапе индукции иммуносупрессии;

2) разработать прогностически значимый критерий (индекс функциональной активности лимфоцитов) доклинической диагностики острой реакции отторжения почечного аллотрансплантата;

3) определить возможности фазовой морфометрии в оценке функциональной активности иммунокомпетентных клеток для дифференциальной диагностики дисфункции почечного трансплантата иммунного и неиммунного характера в раннем послеоперационном периоде;

4) провести сравнительный анализ структуры хроматина интерфазных ядер лимфоцитов практически здоровых добровольцев, изменения денситометрических параметров ядер лимфоцитов при их активации *in vitro*, а также *in vivo* у пациентов в раннем посттрансплантационном периоде;

5) изучить изменения функциональной активности лимфоцитов на основе денситометрических показателей морфофункционального состояния их ядерных структур после проведения противокризисовой терапии для оценки эффективности программ иммуносупрессии;

6) провести сравнительный анализ данных компьютерной морфометрии лимфоцитов, клиничко-лабораторных исследований и результатов пункционной биопсии хронической трансплантационной нефропатии;

7) определить степень информативности данных компьютерной морфометрии лимфоцитов в диагностике хронического отторжения трансплантата.

Научная новизна

Работа открывает новое научное направление в трансплантологии, позволяющее на основе витальной компьютерной фазовой морфометрии иммунокомпетентных клеток, включая денситометрию ядерного хроматина лимфоцитов, оценить их функциональную активность, прогнозировать развитие криза отторжения на доклинической стадии, дифференцировать причины дисфункции почечного аллотрансплантата иммунного и неиммунного характера и оценить эффективность противокризисовой терапии.

Впервые изучены особенности морфофункционального состояния живых клеток крови (лимфоцитов, нейтрофилов, эритроцитов и тромбоцитов) и динамика их изменений в процессе проведения заместительной почечной терапии и в раннем посттрансплантационном периоде на этапе индукции иммуносупрессии.

Это позволило создать базу данных для разработки прогностически значимого критерия – индекса функциональной активности лимфоцитов (патент РФ на изобретение № 2348932, 2009) для доклинической диагностики острой реакции отторжения ренального аллотрансплантата.

Впервые изучены морфометрические изменения иммунокомпетентных клеток в раннем послеоперационном периоде при развитии дисфункции почечного трансплантата иммунного и неиммунного характера, что позволило своевременно начать патогенетически детерминированное лечение.

В экспериментах *in vitro* изучены денситометрические параметры ядер лимфоцитов периферической крови при переходе клеток от состояния

покоя к активной пролиферации. Определены качественные и количественные показатели функционального состояния клеточных ядер, которые являются маркерами метаболической и пролиферативной активности лимфоцитов.

Впервые методом компьютерной фазовой морфометрии выявлена функциональная гетерогенность ядер циркулирующих лимфоцитов до и после аллотрансплантации трупной почки в раннем посттрансплантационном периоде. Для оценки морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток на основе витальных денситометрических параметров предложен показатель функциональной активности ядер лимфоцитов.

Впервые изучены особенности ядерного полиморфизма циркулирующих Т- и В-лимфоцитов у больных с признаками острой реакции отторжения почечного трансплантата до и после проведения противокризисовой терапии.

На основе результатов проспективного и ретроспективного анализа установлены и количественно оценены особенности изменений клеточного звена иммунитета при хронической трансплантационной нефропатии.

Практическая значимость

Внедрение когерентной фазово-интерференционной микроскопии и компьютерной морфоцитометрии, включая денситометрию ядерного хроматина лимфоцитов, в клиническую практику позволило оценить функциональную активность иммунокомпетентных клеток, прогнозировать развитие криза отторжения на доклинической стадии, дифференцировать причины дисфункции почечного аллотрансплантата иммунного и неиммунного характера, своевременно начать патогенетически детерминированную терапию и оценить эффективность противокризисовой терапии.

Полученные данные о динамике морфофункционального статуса клеток крови у больных ТХПН представляются важными не только для теоретической, но и для практической медицины, в том числе клинико-лабораторной диагностики, поскольку позволяют объективизировать оценку состояния различных систем организма на этапе предтрансплантационного ведения пациентов, как в соответствии с общими принципами реконвалесценции, так и их индивидуальными особенностями.

Изучение морфометрических изменений иммунокомпетентных клеток в раннем послеоперационном периоде при развитии дисфункции почечного трансплантата иммунного и неиммунного характера позволило своевременно начать патогенетически детерминированное лечение и предупредить развитие тяжелых поражений трансплантата вплоть до его потери.

Практическим результатом выполненной работы явилась разработка индекса активности клеток (ИАК) субпопуляций лимфоцитов для дифференциальной диагностики острой реакции отторжения при дисфункциях нефротрансплантата (патент РФ на изобретение «Способ диагностики отторжения почечного аллотрансплантата» № 2348932, 2009).

Это позволило на доклинической стадии распознавать начало острой реакции отторжения и тем самым уменьшить частоту потерь пересаженных органов в раннем послеоперационном периоде, а также улучшить отдаленные результаты трансплантации.

Разработанные дифференциально-диагностические цитологические критерии реактивных изменений ядер лимфоцитов на основе исследования морфоденситометрических характеристик хроматина и особенностей ядрышково-ядерного соотношения расширили возможности витальной компьютерной морфометрии в оценке функционального состояния ядер лимфоцитов. Предложенный показатель ядерной активности лимфоцитов (FA) является ранним и объективным маркером их пролиферативного потенциала. Проведение мониторинга денситометрических показателей ядер циркулирующих лимфоцитов обеспечивает своевременное выявление изменений иммунореактивности реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде, что в свою очередь позволяет проводить уточняющую экспресс-диагностику острой реакции отторжения нефротрансплантата, прогнозировать результаты лечения, оценивать эффективность противокризисовой терапии и, таким образом, улучшить результаты трансплантации.

Показано значение метода компьютерной морфометрии в комплексном обследовании реципиентов при выявлении признаков поздней дисфункции ренального трансплантата.

Практическое применение полученных сведений позволило разработать и предложить рациональные подходы к профилактике, ранней диагностике и лечению ХТН с целью снижения темпов ее прогрессирования и улучшить, таким образом, отдаленные результаты трансплантации почки.

В целом результаты проведенных исследований способствуют оптимизации тактики ведения больных после АТПП в раннем и позднем посттрансплантационном периоде.

Внедрение результатов в практику

Полученные результаты внедрены в практическую деятельность отделения хронического гемодиализа с пересадкой почки ГУ МОНКИ им. М.Ф. Владимирского. Материалы исследования и результаты используются в преподавании на кафедре эфферентной медицины, клинической и оперативной нефрологии ФУВ МОНКИ.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 29 печатных работ, среди которых 9 работ опубликовано в журналах, рекомендуемых ВАК, получен 1 патент на изобретение.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на: III Российском конгрессе по патофизиологии с меж-

дународным участием «Дизрегуляционная патология органов и систем», Москва 19–22 октября 2004 г.; 6 Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» и 11 Научной конференции Европейского общества химиотерапии инфекционных заболеваний, Москва, 15–18 сентября 2004 г.; VI Съезде научного общества нефрологов, Москва, 2005 г.; V Конгрессе РААКИ, Москва, 2007 г.; Научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа», Москва, 2009 г.; совместной научно-практической конференции отделения хронического гемодиализа с пересадкой почки, отделения хирургической гемокоррекции и детоксикации и кафедры эфферентной медицины, клинической и оперативной нефрологии, Москва, 2009 г.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 138 отечественных и 230 зарубежных источников.

Диссертация изложена на 341 странице машинописного текста, содержит 43 таблицы и 61 рисунок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика больных и методы исследований

Ретро- и проспективные исследования проведены в 4 группах больных с терминальной почечной недостаточностью, а именно: 1) в предтрансплантационном периоде и на этапе индукции иммуносупрессии; 2) при дисфункциях трансплантата, обусловленных не иммунными и иммунологическими проблемами; 3) при кризе отторжения (денситометрии ядерного хроматина); 4) при хронической трансплантационной нефропатии.

Все больные находились на лечении в отделении хронического гемодиализа с пересадкой почки ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского в период с 2001 по 2009 гг. Всего обследовано 199 больных в пред- и посттрансплантационном периоде. Помимо этого, морфоцитометрические исследования проведены у 90 практически здоровых лиц.

У 33 больных (27 мужчин – 81,8% – и 6 женщин – 18,9%) хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии, находившихся на лечении в отделении хронического гемодиализа с пересадкой почки ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского с 2001 по 2005 гг. проведена морфоцитометрия эритроцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и тромбоцитов в предтрансплантационном периоде на этапе заместительной почечной терапии. Мужчин было 27 (81,8%), женщин – 6 (18,9%). Средний возраст больных составил $38,7 \pm 3,5$ года. У 11 из них провели в режиме реального времени

мониторинг морфофункционального состояния эритроцитов, нейтрофилов, Т- и В-лимфоцитов в течение раннего послеоперационного периода. Группу сравнения составили 30 соматически здоровых лиц (18 мужчин и 12 женщин), средний возраст $36,9 \pm 3,1$ года.

У 60 реципиентов почечного аллотрансплантата проведена морфоцитометрия субпопуляций лимфоцитов в раннем посттрансплантационном периоде с целью дифференциальной диагностики причин дисфункции почечного трансплантата иммунного и неиммунного характера. Под наблюдением находились 30 мужчин и 30 женщин. Возраст пациентов составлял от 18 до 65 лет (средний возраст $39,9 \pm 12,5$ года). По характеру дисфункции обследованные пациенты были разделены на 3 подгруппы.

Первую подгруппу составили 15 больных (средний возраст $37,6 \pm 15,0$ лет), которые в раннем послеоперационном периоде имели стабильную функцию почечного аллотрансплантата. Пациенты этой подгруппы не имели хирургических, иммунологических, инфекционных и других осложнений.

Во вторую подгруппу были включены 12 пациентов (средний возраст $38,9 \pm 9,0$ лет), у которых причиной дисфункции в раннем послеоперационном периоде явился иммунологический конфликт. Диагноз верифицировался только после морфологического подтверждения.

Третью подгруппу составили 32 человека (средний возраст $40,1 \pm 13,3$ года), у которых в раннем послеоперационном периоде была дисфункция почечного аллотрансплантата без иммунологического конфликта.

Для определения показателей нормального состояния иммунореактивности нами была обследована группа (30 человек) практически здоровых лиц. Средний возраст в группе здоровых лиц составил $34,2 \pm 11,8$ года.

Денситометрия ядерного хроматина лимфоцитов выполнена у 36 больных с терминальной стадией ХПН (3-я группа), которым произведена трансплантация почки в 2005–2008 гг. в МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

В исследовании участвовали 18 мужчин и 18 женщин в возрасте от 20 до 59 лет (средний возраст $42 \pm 9,5$ лет).

Для определения показателей нормы морфофункционального состояния ядерных структур лимфоцитов были обследованы 30 практически здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 59 лет (средний возраст $36 \pm 7,6$ года).

Наконец, 4-ю группу составили 70 реципиентов аллогенного почечного трансплантата (54 мужчины и 16 женщин), находившихся на лечении в ОХГ и ТП МОНИКИ с 2001 по 2005 гг. включительно. Из них 33 пациента были обследованы в раннем послеоперационном периоде на 20–30-е сутки после аллотрансплантации (группа сравнения), 37 – в отдаленном периоде (от 4 до 48 месяцев после операции, в среднем через $19,9 \pm 2,7$ месяца после трансплантации). Средний возраст больных на момент обследования составил $35,9 \pm 3,2$ года. При этом у 23 реципиентов отмечалась удовлетво-

рительная и стабильная функция трансплантата, у 14 пациентов была диагностирована хроническая трансплантационная нефропатия, подтвержденная морфологически. Контрольную группу составили 30 соматически здоровых лиц (18 мужчин и 12 женщин), средний возраст $36,9 \pm 3,1$ года.

Во всех 4 группах больных иммуносупрессивная индукционная терапия включала внутривенное капельное введение моноклональных антител к рецептору IL-2 (симулект или зенопакс), Циклоспорин А (ЦсА) и болюсное введение метилпреднизолона в дозе 250–750 мг перед васкуляризацией почечного аллотрансплантата.

Использовался протокол трехкомпонентной базовой иммуносупрессии, который назначался через 6–12 часов после операции: ЦсА в начальной дозе 5 мг/кг в сутки; глюкокортикостероиды – преднизолон в начальной дозе 0,5 мг/кг; селективные цитостатики – Селлсепт (2000 мг в сутки) или майфортик (1440 мг в сутки)

Во всех случаях органы были получены от трупных доноров. Среднее время холодовой ишемии донорской почки составило $22,1 \pm 2,6$ ч. Степень HLA-совместимости оценивали по числу антигенов HLA донора, совпадающих с антигенами HLA реципиента. Уровень предсуществующих антител у реципиента определяли в стандартном комплемент-зависимом лимфоцитотоксическом тесте. Острое отторжение почечного трансплантата купировали «пульсами» метилпреднизолона до общей дозы 1,5–3,0 г. При стероидрезистентных кризах применялся антитимоцитарный глобулин – АТГ (Фрезениус). Для оценки адекватности получаемой дозы ЦсА всем больным после трансплантации почки определялась концентрация ЦсА в цельной крови иммунофлюоресцентным анализатором «ТДХ» фирмы «Abbott». Всем пациентам проводились стандартные клинико-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые доплеровские исследования, динамическая нефросцинтиграфия.

Исследование клеток крови и оценку иммунологического статуса больного проводили на проточном лазерном цитометре ДАКО с использованием моноклональных антител (МАТ) производства ДАКО, меченных ФИТЦ и фикоэритрином.

Для исследования морфофункционального состояния клеток крови использовали экспресс-метод витальной компьютерной фазовой морфометрии на основе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва), представляющего собой интерферометр Линника на базе модифицированного и автоматизированного МИИ-4 (ЛОМО, Ленинград) (Василенко И.А. с соавт., 1995).

Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних, а также величины дисперсии, среднего квадратического отклонения и анализа асимметричности

распределения. Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критериям Колмагорова-Смирнова или Стьюдента. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

Компьютерная морфометрия клеток крови на диализной стадии и этапе индукции иммуносупрессии

В самом начале работы мы сосредоточили внимание на оценке структурно-функционального статуса клеточных элементов систем организма, обеспечивающих базовый уровень гомеостаза и участвующих в патогенезе ХПН: гемостаза, эритрона, адаптивного и естественного иммунитета.

Нами были получены и охарактеризованы фазово-интерференционные портреты живых тромбоцитов, эритроцитов, нейтрофилов и Т-, В-лимфоцитов периферической крови условно здоровых лиц (группа контроля) и больных хронической почечной недостаточностью в терминальной стадии (ТХПН) (рис. 1).

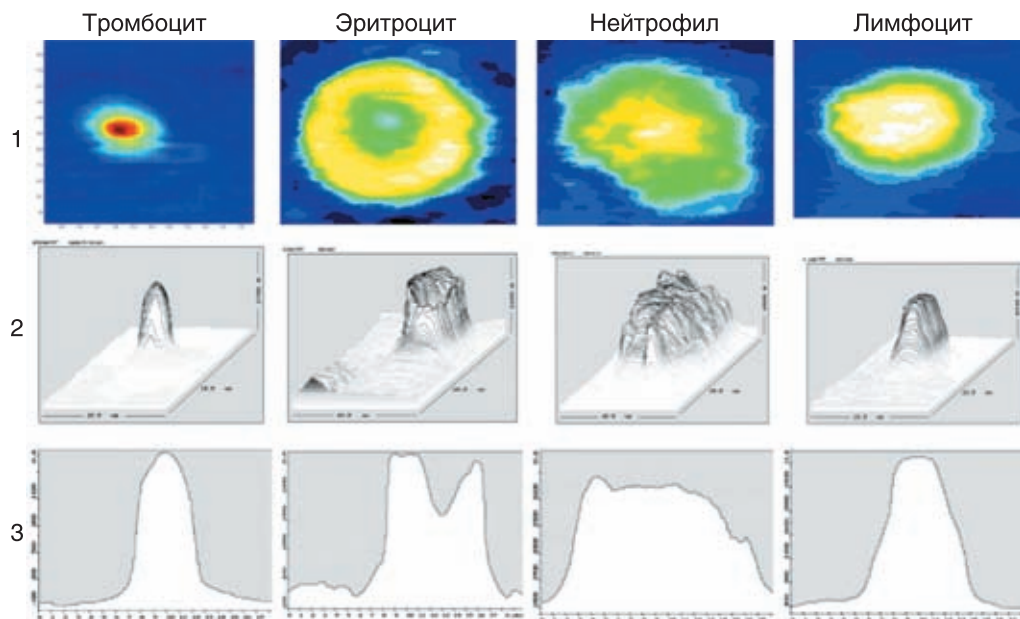


Рис. 1. Фазово-интерференционные портреты клеток периферической крови (по данным компьютерной фазово-интерференционной микроскопии): 1 – топограмма, 2 – трехмерное изображение, 3 – оптический профиль клетки

При исследовании тромбоцитарного звена гемостаза установлено, что в условиях физиологической нормы подавляющее большинство тромбоцитов представлено плоскими, округлыми клетками покоя с гладкой или складчатой поверхностью — «гладкие» и «рифленые» дискоциты, соответствующие I типу (рис. 2).

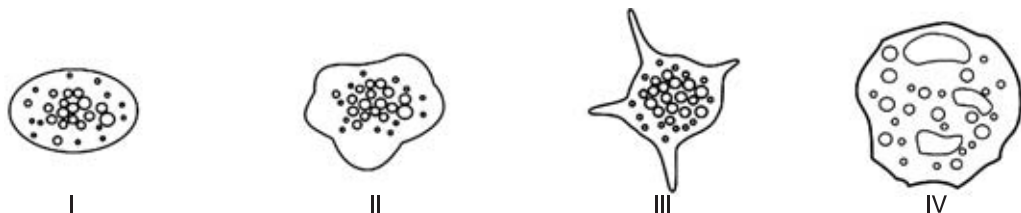


Рис. 2. Схема морфофункциональных типов тромбоцитов периферической крови: I – тромбоцит «покоя»; II – тромбоцит с низким уровнем активности; III – высоко активированный тромбоцит; IV – дегенеративно-измененный тромбоцит

II и III тип тромбоцитов составляют клетки с низким и высоким уровнем функциональной активности, неправильной формы, имеющие короткие или длинные отростки. К IV морфологическому типу относят дегенеративно-измененные тромбоциты.

Наши исследования показали, что у здоровых добровольцев 63% тромбоцитов были представлены клетками «покоя», 21% – тромбоцитами с низким уровнем активации (II тип). Количество высоко активированных клеток с длинными отростками-«антеннами» составляло 12% (III тип), а дегенеративно-измененных (IV тип) – 4%. У больных ХПН тромбоциты «покоя» составляли 51,3%. 33,2% клеток были представлены клетками с низким уровнем активации (II тип); 13,7% относились к III типу, а к дегенеративно-измененным, исчерпавшим функциональный резерв клеткам – всего 1,4%.

Полученные результаты свидетельствуют, что для больных ХПН характерен повышенный уровень функциональной активности тромбоцитарного звена: присутствие в циркуляции крупных клеток преимущественно II и III типа.

При исследовании эритроцитов установлено, что по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы средние по популяции значения периметра, фазовой высоты, площади и объема эритроцитов у больных ТХПН снижены в среднем на 5,5; 8; 5 и 10% соответственно.

Коэффициент сферичности (величина отношения площади поверхности эритроцита к его объему (S/V), позволяющий косвенно оценить степень деформируемости клеток, ниже значений нормы на 30,4%. Средний диаметр эритроцитов оставался практически неизменным. Однако популяционный анализ этого показателя выявил, что в периферической крови условно здоровых лиц 80% эритроцитов представлены нормоцитами (клетки с диаметром 8–10 мкм), 14% – «макроцитами» (с диаметром более 10 мкм) и 6% – «микроцитами» (диаметр менее 8 мкм). В то время как у больных ХПН количество «нормоцитов» снижается до 71%, а «макро-» и «микроцитов» составляет 17 и 12% соответственно. Оценка морфологических типов эритроцитов показала, что содержание дискоцитов, эхиноцитов, сфероцитов и овалоцитов составляет в среднем $41,5 \pm 5,2$, $11,7 \pm 3,9$, $43,6 \pm 2,5$, $3,2 \pm$

0,6%. В группе условно здоровых лиц отмечалась иная морфологическая картина: $87,3 \pm 4,7\%$ дискоцитов, $4,0 \pm 2,8\%$ эхиноцитов, $7,8 \pm 3,1\%$ сфероцитов и $0,9 \pm 0,3\%$ овалоцитов. При этом отношение значений всех трансформированных эритроцитов к абсолютному количеству дискоцитов – индекс трансформации – у больных ХПН (1,41) был значительно выше, чем у здоровых доноров (0,14), что позволило количественно охарактеризовать наличие и степень выраженности пойкилоцитоза.

Исследование морфофункционального состояния живых нейтрофильных лейкоцитов периферической крови (Нф) больных ТХПН показало, что средние по популяции значения диаметра, периметра, площади и объема Нф крови больных ТХПН достоверно ниже соответствующих показателей в группе условно здоровых лиц. Так, диаметр снижен на 14%, периметр на 11%, высота на 7%, площадь на 12%, а объем на 36,5%.

Снижение величин диаметра, периметра и площади Нф объясняется, по-видимому, уменьшением количества псевдоподий и некоторым выравниванием мельчайших, не обнаруживающихся светооптическими методами микрофотоирования складок клеточной мембраны.

Нами проведен анализ морфологической структуры нефиксированных и неокрашенных живых функционирующих нейтрофильных гранулоцитов. Выделено 3 основных морфологических типа нейтрофилов: I – клетки округлой формы с четко выраженными границами; II – клетки разнообразной формы и размера с неровной, бугристой поверхностью, границы достаточно четкие, отмечаются хорошо сформированные псевдоподии; III – клетки разнообразной формы и размера с нечеткими размытыми границами, цитоплазма просветленная, рыхлая, сильно вакуолизированная.

Установлено, что у больных ТХПН число функционально-полноценных зрелых нейтрофилов (II морфологический тип) снижается на 22% по сравнению с донорской группой. При этом среди циркулирующего пула в 1,5 раза увеличено содержание Нф с низкой активностью (I морфологический тип) и практически в 2 раза – старых клеток, исчерпавших свой функциональный резерв (III морфологический тип) (рис. 3).

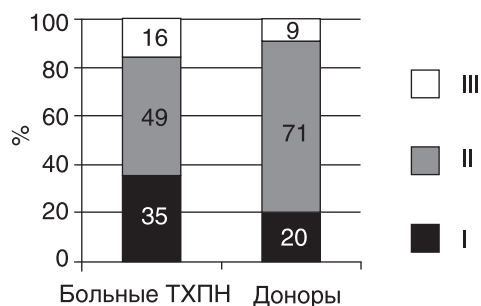


Рис. 3. Соотношение морфологических типов нейтрофильных гранулоцитов периферической крови доноров и больных ТХПН, %. I, II, III – морфологические типы нейтрофилов

По результатам хемилюминесцентного (ХЛ) анализа не выявлено достоверных различий в величине спонтанной ХЛ нейтрофилов доноров и больных ТХПН (рис. 4).

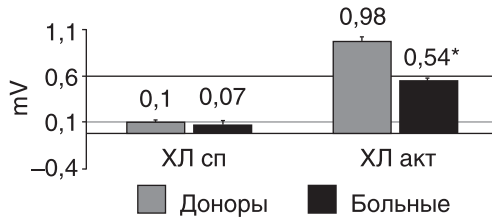


Рис. 4. Показатели интенсивности спонтанной (ХЛ сп) и активированной (ХЛ акт) хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови доноров и больных ТХПН

В то же время после стимуляции ответ Нф контрольной группы был достоверно выше. При ХПН низкий уровень активированной Хл свидетельствует о дисфункции фагоцитов, что приводит к неполноценности эффекторных реакций этих клеток, в частности фагоцитоза, и, следовательно, к снижению их защитного противомикробного действия.

Нами не зарегистрировано значимых изменений клеточных параметров Т-лимфоцитов у обследованных больных. Средние по популяции размерные показатели Т-клеток изменялись в диапазоне контрольных величин. В то время как для В-лимфоцитов было характерным достоверное уменьшение диаметра (на 7,5%), периметра (на 8%) и площади (на 12,5%). Фазовая высота, напротив, увеличивалась (на 5%). Фазовая высота мононуклеарной клетки отражает степень упаковки хроматина в ядре: чем выше показатель, тем более плотными являются ядерные структуры. То есть данная величина позволяет косвенно оценить пролиферативный потенциал лимфоцита. На основании результатов КФМ было показано, что в В-звене иммунитета имеются признаки функциональной недостаточности, связанной, очевидно, с подавлением В-клеточной активации.

Анализ внутрипопуляционного распределения Т-лимфоцитов по величине их диаметра также не выявил каких-либо изменений в составе этих клеток. В популяции же В-клеток на 12% увеличено содержание малых и практически в 2 раза снижено количество больших лимфоцитов.

Несмотря на отсутствие значимых изменений средних значений диаметра, периметра, высоты, площади и объема витальных фазово-интерференционных портретов Т-лимфоцитов, индекс асимметричности гистограмм распределения Т-клеток по этим параметрам у больных ТХПН достоверно (в 2 и более раз) превышает соответствующие показатели контрольной группы. Такое изменение степени симметричности вариационных рядов свидетельствует о возможных внутрипопуляционных перестройках, о появлении отдельных групп клеток с иными структурно-метаболическими характеристиками.

Полученные результаты нашли подтверждение при анализе иммунокомпетентных клеток больных ТХПН методом проточной цитометрии.

Результаты иммунофенотипирования, проведенные в рамках нашего исследования (табл. 1), подтвердили данные компьютерной фазометрии лимфоцитов.

Так, внутри популяции Т-лимфоцитов зарегистрировано увеличение численности Т-хелперов и, в соответствии с правилом «слепого гомеостаза», конкурентное снижение CD8⁺ клеток.

Иммунорегуляторный индекс превышает диапазон допустимых значений. Незначительно снижен уровень НК-лимфоцитов. Кроме того, выявлено снижение экспрессии всех маркеров, характеризующих состояние В-клеток.

При исследовании гуморального иммунитета отмечен дисбаланс содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови: незначительное увеличение содержания IgG и IgA при снижении IgM.

Таблица 1

Процентное содержание основных субпопуляций лимфоцитов у больных ТХПН

Показатель	Больные ТХПН	Донор
cD3+	78,5 ± 5,8	69,5 ± 3,1
CD4+	50,5 ± 4,2	38,0 ± 5,0
CD8+	15,3 ± 1,0	27,3 ± 3,2
CD20+	8,3 ± 2,2	9,3 ± 2,7
HLA-DR+	9,1 ± 1,2	7,8 ± 1,8
CD38+	38,9 ± 5,3	28,5 ± 3,3
CD25+	4,1 ± 0,8	3,1 ± 0,8
CD16+	8,1 ± 3,6	14,7 ± 2,3
CD11b+	19,3 ± 2,9	23,1 ± 5,1
CD50+	95,9 ± 3,7	93,9 ± 2,5
CD45RA+	60,2 ± 5,5	59,3 ± 7,1
CD5+	80,5 ± 3,6	68,3 ± 4,9
CD7+	74,3 ± 6,8	67,0 ± 5,9
CD71+	1,5 ± 0,4	2,1 ± 0,9
CD95+	43,5 ± 3,9	37,5 ± 6,8
CD4+/CD8+	3,25 ± 0,9	1,8 ± 0,3
Показатели гуморального иммунитета		
Показатель	Больные ТХПН (n = 7)	Доноры (n = 7)
Иммуноглобулин G	170,3 ± 10,9	146,5 ± 7,1
Иммуноглобулин A	148,7 ± 40,5	113,0 ± 2,9
Иммуноглобулин M	115,0 ± 12,3	151,3 ± 5,2

Приведенные данные свидетельствуют о том, что у больных ТХПН, находящихся на лечении программным гемодиализом, имеет место снижение некоторых показателей иммунологической реактивности организма, соответствующее состоянию приобретенного иммунодефицита.

У 11 из описанных выше больных нами проведено мониторинговое исследование показателей КФМ и клинико-лабораторных данных в течение раннего послеоперационного периода (20–30 суток). После пересадки почки у 9 реципиентов (81,8%) была отмечена немедленная и стабильная функция трансплантата. В 2 случаях диагностированы эпизоды криза отторжения, которые купировали введением метипреда.

По результатам КФМ нами установлено, что после 10-х суток происходит увеличение размерных фазовых параметров эритроцитов, отражающее процесс нормализации структурно-метаболического статуса эритроцитов, увеличения уровня гемоглобина, улучшения морфологического состава популяции и повышения содержания ретикулоцитов, т. е. стимуляции эритропоэза.

Анализ морфометрических параметров Нф показал, что в первые сутки после операции практически все фазовые клеточные показатели (фазовые диаметр, периметр, площадь и объем) значительно (на 10–40%) превышают величины, соответствующие контрольной группе. К 10-м суткам наблюдается их нормализация и последующая стабилизация клеточных параметров в пределах нижней границы значений физиологической нормы.

Не исключено, что причиной таких изменений, особенно в первые сутки после АТП, является непосредственная реакция клеточных факторов неспецифической защиты на оперативное вмешательство и наличие раневой поверхности (Ватазин А.В. с соавт., 2002; Descamps-Latscha B., 1994).

Последующие же трансформации структурно-метаболического статуса Нф связаны с влиянием антибиотиков и иммуносупрессивной терапией. Для этого периода (1–30-е сутки после АТП) характерно низкое (на уровне нижней границы контрольных величин) содержание лимфоцитов, количество моноцитов также остается в пределах физиологической нормы.

Установлено, что 5-е сутки послеоперационного периода как в Т-, так и в В-звене, характеризуются наиболее значимыми изменениями размерных параметров клеток. Причем у Т-лимфоцитов достоверно увеличиваются все оптико-геометрические показатели, а у В-клеток – только высота и объем.

Однако, по-видимому, эти изменения связаны не столько с нарушением иммунологических процессов у больных, сколько с острой реакцией организма на оперативное вмешательство и начало интенсивной иммуносупрессии. Последующий анализ демонстрирует постепенную нормализацию результатов морфометрии, и к 20-м суткам наблюдения клеточные показатели становятся сопоставимыми с группой контроля (соматически здоровые лица).

Полученные результаты нашли подтверждение при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов с помощью моноклональных антител. К 20-м суткам уровень экспрессии практически всех анализируемых антигенов был сопоставим с показателями нормы. Исключением оставалось только низкое количество активированных Т-лимфоцитов и содержание натуральных киллеров как результат влияния иммуносупрессивной терапии.

Выявленные закономерности изменения МФС лимфоцитов при бескризовом течении послеоперационного периода легли в основу морфометрического стандарта для выявления возможных иммунологических проявлений при возникновении эпизодов криза отторжения.

Индекс клеточной активности в оценке морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток

Для оптимизации мониторинга иммунореактивности реципиентов почечного аллотрансплантата в раннем послеоперационном периоде нами предложен расчетный индекс, характеризующий функциональное состояние иммунокомпетентных клеток периферической крови (патент на изобретение № 2348932, 2009).

Исходную количественную информацию о клетке получают в виде нормированных на длину волны значений оптической разности хода.

Математический анализ этой количественной информации позволяет получить двумерные фазовые изображения, 3D-изображения, профили фазовой высоты в произвольных сечениях и т. д. (рис. 5)

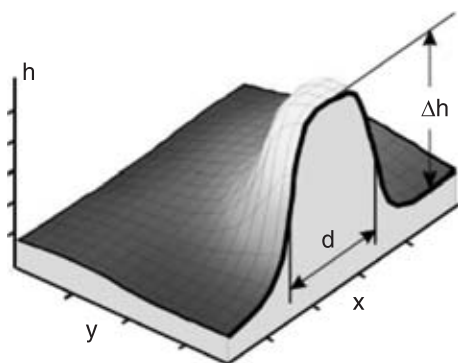


Рис. 5. Схематическое 3D изображение размерных показателей фазово-интерференционного портрета лимфоцита: d – фазовый диаметр, h – высота

Величины фазовой высоты и объема характеризуют состояние ядерных структур. Известно, что конденсированный хроматин метаболически менее активен в отношении синтеза ДНК, но оптически является более плотным по сравнению с его диффузной формой. Следовательно, чем выше фазовая высота, тем ниже пролиферативный потенциал лимфоцита.

Следовательно, отношение h / d , где **h – фазовая высота ядра, d – диаметр ядра**, представляет собой индекс гетерогенности ядерных структур мононуклеарных клеток, или, иначе, индекс клеточной активации (ИКА).

Расчетные значения ИАК для 95% Т-лимфоцитов периферической крови у соматически здоровых лиц составляют 0,20–0,30. Уменьшение процента Т-клеток с величиной индекса 0,20 в циркулирующей популяции

свидетельствует о повышении их функциональной активности, а увеличение – об угнетении.

При исследовании В-звена иммунитета было установлено, что для 95% В-лимфоцитов периферической крови соматически здоровых лиц расчетные значения ИАК составили 0,15–0,35. Соответственно, уменьшение процента В-лимфоцитов с величиной индекса 0,15 в циркулирующей популяции свидетельствует о повышении их функциональной активности, а увеличение – об угнетении (табл. 2).

Зарегистрированные нами изменения активационного статуса циркулирующих Т-лимфоцитов в группе пациентов с неосложненным течением послеоперационного периода могут быть связаны с ишемическим повреждением почечного трансплантата. Это состояние у больных с первичной функцией в среднем заканчивается к 10-м суткам, характеризуется восстановлением азотовыделительной функции и уменьшением выброса антигенов поврежденного нефроэпителия аллотрансплантата.

По-видимому, именно эти изменения отражаются на динамике ИАК Т-лимфоцитов смещением в сторону активации с максимальными значениями на 3-и сутки. Начиная с 10-х суток снижается антигенная нагрузка на организм и происходит превалирование иммуносупрессии. На этом сроке в клиническом протоколе осуществляется плановое постепенное уменьшение базовой иммуносупрессии.

Таблица 2

Процентное содержание Т- и В-лимфоцитов с различной величиной ИАК в циркулирующей популяции клеток у реципиентов почечного аллотрансплантата в раннем послеоперационном периоде

Сутки	Содержание, %	
	В-лимф ИАК ≤ 0,15	Т-лимф ИАК ≤ 0,2
Контроль	25,1	2,8
0-е сутки	8,8*	3,3
3-и сутки	3,7*	7,7
5-е сутки	15,4	6,2
8-е сутки	6,8*	7,0
11-е сутки	2,9*	0,0*
13-е сутки	4,1*	2,5*
16-е сутки	9,3*	6,5
19-е сутки	2,6*	0,0*
22-е сутки	12,2	3,5

* Достоверно относительно контроля при $p < 0,01$.

Анализ результатов посуточного мониторинга величины ИАК в циркулирующей популяции В-лимфоцитов показал, что у реципиентов до трансплантации почки процент ИАК $< 0,15$ В-лимфоцитов не превышал 8,8%, в то время как у соматически здоровых лиц этот показатель был почти втрое выше и составил 25,1%.

Таким образом, можно считать, что колебания ИАК в пределах от 2,0 до 7,7% (в среднем $3,8 \pm 2,9\%$) для Т-лимфоцитов и от 2,6 до 9,3% (в среднем $6,8 \pm 4,5\%$) для В-лимфоцитов у пациентов с неосложненным течением раннего послеоперационного периода являются нормальными.

Полученные данные позволяют нам рекомендовать разработанный индекс активности клеток (ИАК) в качестве объективного критерия оценки иммунореактивности реципиентов почечного аллотрансплантата. При этом динамика величины ИАК пациентов с неосложненным течением послеоперационного периода может быть использована как нормативные показатели для проведения сравнительной диагностики возможных посттрансплантационных осложнений.

Компьютерная фазовая морфометрия иммунокомпетентных клеток при неосложненном течении раннего посттрансплантационного периода.

Для определения нормативных величин размерных параметров живых функционирующих иммунокомпетентных клеток методом КФМ были исследованы Т- и В-лимфоциты ($n = 1500$) периферической крови практически здоровых людей ($n = 30$). Установлено, что у здоровых людей средний в популяции диаметр (D) Т-лимфоцитов составил $7 \pm 1,13$ ($M \pm \sigma$), периметр (P) – $20,4 \pm 3,16$ ($M \pm \sigma$), высота (H) – $2,2 \pm 0,41$ ($M \pm \sigma$), площадь (A) – $30,3 \pm 10,1$, объем (V) – $36,5 \pm 13,95$ ($M \pm \sigma$).

В популяции В-лимфоцитов диаметр (D) клеток составлял $9,20 \pm 2,26$ мкм ($M \pm \sigma$), периметр (P) – $27,60 \pm 6,67$ мкм ($M \pm \sigma$), высота (H) – $1,8 \pm 0,47$ мкм ($M \pm \sigma$); площадь (A) – $52,6 \pm 24,77$; объем (V) – $45,8 \pm 22,9$ ($M \pm \sigma$).

Данные величины были приняты нами как состояние функционального покоя Т- и В-лимфоцитов, что позволило в дальнейшем использовать полученные данные в качестве контрольных значений.

Рис. 6 иллюстрирует динамику посуточных изменений фазово-интерференционных параметров Т-лимфоцитов реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде при неосложненном течении.

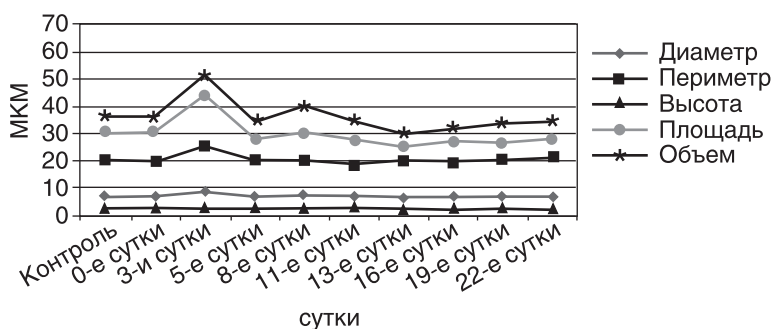


Рис. 6. Динамика посуточных изменений Т-лимфоцитов реципиентов почечного аллотрансплантата

Начиная с 5-х суток изменения параметров Т-лимфоцитов проходят в пределах статистических достоверностей, и усредненные значения могут приниматься за нормативные показатели для сравнительного анализа.

Морфометрические параметры В-лимфоцитов, характеризующие их морфологические и функциональные особенности, позволяют количественно оценить характер реакций клеточного звена гуморального иммунитета. На рис. 7 представлена динамика посуточных изменений размерных параметров в популяции В-лимфоцитов при неосложненном течении раннего посттрансплантационного периода.

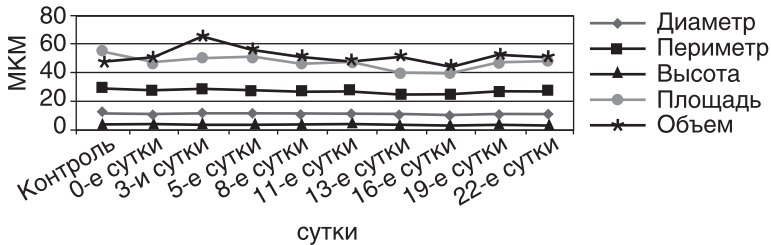


Рис. 7. Динамика посуточных изменений В-лимфоцитов реципиентов ПАТ. По оси абсцисс – сутки после трансплантации, по оси ординат – величина морфометрических параметров (мкм)

Динамика размерных показателей В-клеток начиная с 5-х суток проходит в пределах статистических достоверностей, и их усредненные значения могут приниматься за нормативные показатели для сравнительного анализа.

Роль фазовой морфоцитометрии иммунокомпетентных клеток в дифференциальной диагностике дисфункций почечного аллотрансплантата

Среди наблюдаемых нами пациентов у 12 человек (6 мужчин и 6 женщин) был диагностирован иммунологический конфликт. Средний возраст в данной группе мужчин составил $41,7 \pm 10,2$ года, женщин $36,1 \pm 7,7$ года.

Следует отметить, что в данной группе на момент регистрации и проведения противокризисовой терапии пациенты не имели бактериальных, вирусных и грибковых инфекций.

В табл. 3 суммированы данные величины ИАК Т-лимфоцитов обследованных реципиентов почечного аллотрансплантата.

Таблица 3

Данные морфометрии Т-лимфоцитов в циркулирующей популяции клеток на момент реакции отторжения, %

ИАК Т-клеток	Реакция отторжения		Неосложненное течение		После антикривозой терапии	
	М	Σ	М	σ	М	σ
<0,2%	19,0*	5,9	5,1	2,6	3,8*	2,9
>0,2%	81,0*	5,9	94,9	2,6	96,2	2,9

* Достоверно относительно группы с неосложненным течением при $p < 0,01$.

Является очевидным, что при реакции отторжения наблюдается достоверное (практически в 4 раза) увеличение процента клеток с ИАК < 2,0. Эффективность антикризисовой терапии подтверждается снижением процента клеток с данной величиной ИАК. В В-популяции на начальной стадии острого отторжения процент активных лимфоцитов остается невысоким, ИАК практически не отличается от показателя пациентов с неосложненным течением – $7,9 \pm 4,5\%$ против $6,8 \pm 4,5\%$, соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Данные морфометрии В-лимфоцитов в циркулирующей популяции клеток на момент реакции отторжения, %

ИАК В-клеток	Реакция отторжения		Неосложненное течение		После антикризисовой терапии	
	М	σ	М	Σ	М	σ
<0,15	7,9	4,5	17,4	5,8	6,8	4,5
>0,15	92,1	4,5	82,6	5,8	93,2	4,5

* Достоверно относительно группы с неосложненным течением при $p < 0,01$.

У 32 из обследованных нами реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде диагностировали дисфункцию трансплантата без иммунологического конфликта.

Установлено, что среди причин дисфункций, на фоне которых проводили дифференциальную диагностику с реакцией отторжения, на первом месте стоял острый изолированный канальцевый некроз – 40,6% ($n = 13$). Вирусная инфекция была выявлена у 21,9% ($n = 7$). Лимфатическая киста явилось причиной дисфункции у 12,5% пациентов ($n = 4$). К редким осложнениям, которые мы наблюдали, относились тромбоз почечной вены аллотрансплантата – 9,4% ($n = 3$), грибковая инфекция – 6,3% ($n = 2$) и некроз мочеточника – 6,3% ($n = 2$).

Первичная функция трансплантата была выявлена в данной группе у 31,3% ($n = 10$), отсроченная функция – у 59,4% ($n = 19$), и в 9,3% ($n = 3$) мы наблюдали отсутствие функции трансплантата вследствие хирургических осложнений – раннего тромбоза почечной вены трансплантата.

Результаты исследования морфометрических показателей Т- и В-лимфоцитов периферической крови у больных с дисфункцией почечного аллотрансплантата суммированы в табл. 5.

Анализ полученных данных показал, что достоверное увеличение показателей диаметра, периметра, площади и объема при снижении показателей высоты Т-лимфоцитов были зарегистрированы у больных с грибковой инфекцией. При этом процент активных Т-лимфоцитов оставался на уровне $10,4 \pm 2,9\%$, что выше показателей Т-клеток у реципиентов с неосложненным течением, но ниже, чем у пациентов с диагностированным иммунологическим конфликтом.

Таблица 5

Данные морфометрии Т-лимфоцитов в циркулирующей популяции клеток на момент выявления дисфункции аллотрансплантата

Причина дисфункции	D	P	H	A	V	ИАК < 0,2, %
Неосложн. течение	6,9 ± 1,2	19,9 ± 3,9	2,2 ± 0,5	28,5 ± 12,7	34,4 ± 14,4	3,5 ± 2,9
Лимфоцеле	6,1 ± 1,2	17,2 ± 3,5	2,1 ± 0,4	22,3 ± 9,0	21,2 ± 8,7	2,9 ± 2,1
Тромбоз вены ПАТ	6,7 ± 1,2	19,0 ± 3,8	1,9 ± 0,3	26,6 ± 11,7	28,2 ± 11,2	9,8 ± 3,2
ЦМВ-инфекция	6,8 ± 1,2	19,5 ± 3,4	2,4 ± 0,5	28,0 ± 9,7	33,5 ± 16,0	4,0 ± 3,1
Грибковая инфекция	8,2 ± 1,3	23,8 ± 4,0	2,1 ± 0,4	38,7 ± 12,7	38,7 ± 16,8	10,4 ± 2,9
ОКН	6,4 ± 1,5	18,5 ± 4,4	2,1 ± 0,3	23,2 ± 13,1	26,7 ± 14,0	5,3 ± 3,2

При вирусных осложнениях имелась тенденция к снижению всех показателей. Но процент активных Т-лимфоцитов на момент выявления вирусной инфекции не отличался от такового в группе неосложненного течения. У больных с тромбозом сосудов почечного аллотрансплантата в раннем послеоперационном периоде (диагноз подтвержден с помощью доплеровского исследования) мы наблюдали тенденцию к снижению средней в популяции высоты при отсутствии изменений остальных показателей. При этом ИАК составил $9,8 \pm 3,2\%$. Этот относительно высокий процент активных клеток, вероятнее всего, объяснялся некрозом почечной ткани.

Морфометрические параметры В-лимфоцитов при выявлении лимфоцеле достоверно не отличались от аналогичных показателей В-клеток реципиентов почечного аллотрансплантата с неосложненным течением послеоперационного периода (табл. 6). В то же время величина ИАК составила $2,9 \pm 2,5\%$, что вдвое ниже, чем в группе сравнения.

Таблица 6

Данные морфометрии В-лимфоцитов в циркулирующей популяции клеток на момент выявления дисфункции аллотрансплантата

Причина дисфункции	D	P	H	A	V	ИАК < 0,2, %
Неосложн. течение	8,6 ± 1,9	24,9 ± 6,1	2,1 ± 0,5	42,8 ± 24,8	49,0 ± 24,4	6,8 ± 4,5
Лимфоцеле	8,7 ± 1,6	25,0 ± 4,8	2,0 ± 0,4	43,4 ± 14,9	44,7 ± 16,5	2,9 ± 2,5
Тромбоз вены ПАТ	9,5 ± 2,0	26,8 ± 5,9	1,8 ± 0,4	50,9 ± 20,7	44,5 ± 23,5	14,3 ± 4,6
ЦМВ-инфекция	8,8 ± 1,0	24,7 ± 3,1	2,3 ± 0,6	41,7 ± 11,0	50,9 ± 18,7	17,1 ± 3,6
Грибковая инфекция	8,9 ± 1,8	26,0 ± 5,4	2,0 ± 0,6	46,9 ± 18,0	42,3 ± 21,4	18,3 ± 5,1
ОКН	9,2 ± 2,1	26,4 ± 6,1	1,9 ± 0,5	48,6 ± 22,8	49,7 ± 28,4	14,6 ± 3,2

Пациенты, потерявшие почечный трансплантат вследствие тромбоза почечных сосудов, имели наибольшие показатели активации В-клеточного звена. Так, мы отмечали увеличение морфометрических показателей диаметра, площади, периметра при уменьшении высоты и объема, а значения ИАК увеличивались до $14,3 \pm 4,6\%$.

У больных, имевших вирусные осложнения, активация В-клеточного звена была схожей с изменениями, зарегистрированными при грибковой инфекции. Однако обращало внимание резкое увеличение среднего объема циркулирующих В-лимфоцитов. Значения ИАК также были сопоставимы с подобным показателем у пациентов с грибковыми инфекциями ($17,1 \pm 3,6\%$)

Реакция активации морфометрических показателей В-лимфоцитов при грибковой инфекции была невыраженной. При этом следует отметить, тенденцию к уменьшению среднего объема В-клеток. ИАК составил $18,3 \pm 5,1\%$. У реципиентов с отсроченной функцией трансплантата, причиной которой стал острый канальцевый некроз, выявлен высокий уровень активности В-звена иммунитета. Диаметр, периметр и объем клеток в циркулирующей популяции были достоверно выше, чем в группе сравнения, а величина средней фазовой высоты снижалась до $1,9 \pm 0,5$ мкм.

Процент активных клеток составил $14,6 \pm 3,2\%$, что несколько ниже, чем в подгруппах больных с вирусной и грибковой инфекцией, но значительно выше, чем у пациентов, не имевших осложнений в раннем послеоперационном периоде.

Таким образом, морфоцитометрия позволяет проводить дифференциальный диагноз при дисфункциях трансплантата, обусловленных как иммунологическими, так и не иммунными проблемами.

Морфофункциональное состояние ядерных структур лимфоцитов в оценке иммунного статуса реципиентов ренального трансплантата

В качестве модели *in vitro* для изучения перехода клеток от состояния покоя к активной пролиферации нами были выбраны лимфоциты периферической крови, активированные фитогемагглютинином (ФГА). В исследованиях были получены доказательства, что компьютерная фазовая морфометрия (КФМ) позволяет выявить детальные изменения фазовых параметров лимфоцитов, непосредственно связанные с их активацией. Исследования образцов с интактными лимфоцитами, находящимися в интерфазе, показали, что на их топограммах четко визуализируются цитоплазма, ядро и слабоконтрастное ядрышко (рис. 8).

Для активации лимфоцитов к взвеси клеток *in vitro* добавляли в качестве индуктора активации ФГА с экспозицией в течение 1 часа при 37°C . После инкубации проводили компьютерную морфометрию активированных лимфоцитов (рис. 9).

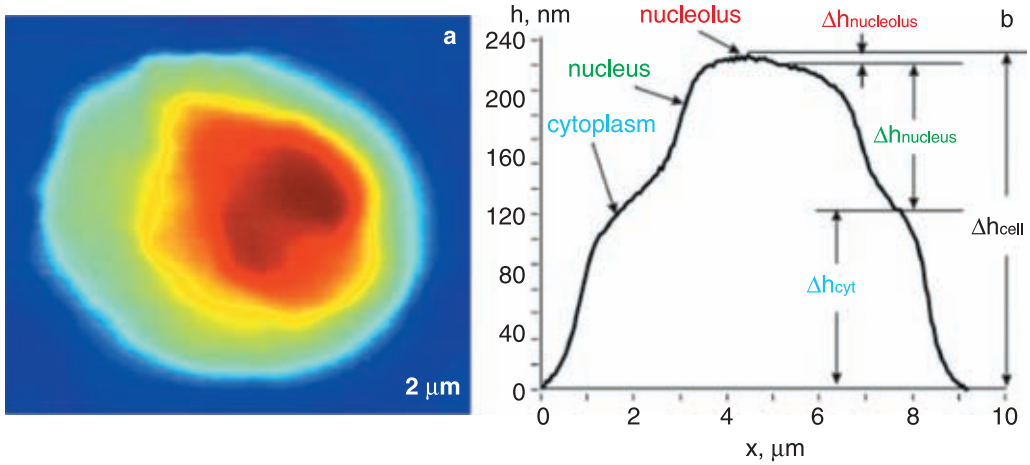


Рис. 8. Топограмма и фазовый профиль интактного Т-лимфоцита периферической крови

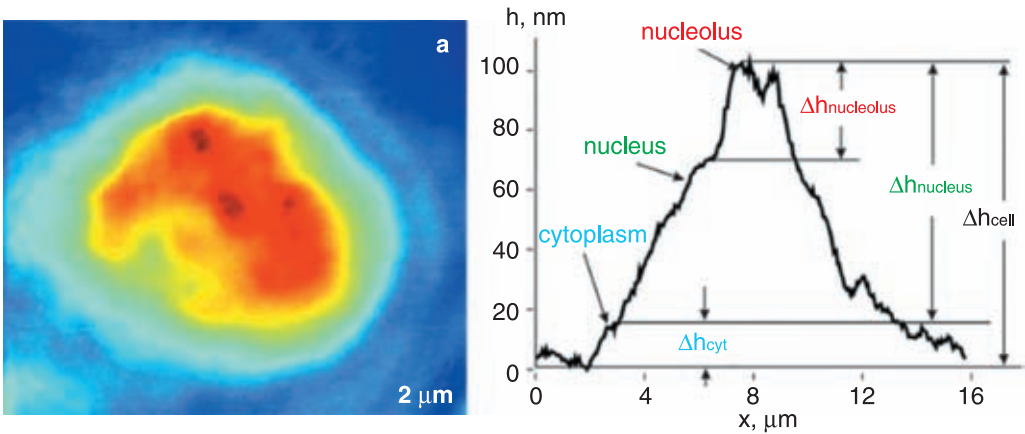


Рис. 9. Топограмма и фазовый профиль активированного Т-лимфоцита периферической крови

Изучение динамики морфометрических показателей в процессе активации показало, что уже в течение одного часа после добавления ФГА фазовая высота клетки и ее ядра достоверно снижается практически в 1,5 и более раз (с $220,0 \pm 39,0$ нм до $95,0 \pm 24,0$ нм). Снижение фазовой высоты сопровождается существенными изменениями в морфологии лимфоцита: уменьшается фазовая толщина цитоплазмы, на фоне ядра выделяется контрастное ядрышко, в котором перераспределяется хроматин, и появляются множественные фибриллярные центры.

Следовательно, при активации клетки в ядре происходит перераспределение гетерохроматина к периферии, заметное снижение его электронной плотности, а в ядрышке идентифицируются множественные фибриллярные центры, окруженные плотным фибриллярным и гранулярным компонентом.

Фазовая высота любой моноклеарной клетки зависит в первую очередь от степени упаковки хроматина в ядре и активности процессов белкового синтеза. Таким образом, фазовая высота – объективный количественный параметр, отражающий степень активации лимфоцитов и позволяющий регистрировать процесс в самой ранней фазе.

Снижение уровня анизотропии ядра лимфоцита может интерпретироваться как показатель, свидетельствующий о переходе гетерохроматина в эухроматин, что указывает на биологическую активацию хроматина, и является предпосылкой для появления матричной активности ДНК.

Ядерный полиморфизм циркулирующей популяции лимфоцитов может быть охарактеризован с использованием показателя функциональной активности ядра (FA) как величина, обратно пропорциональная фазовой высоте (PH) каждой клетки в выборке по формуле:

$$FA = (3 \cdot n_3 + 2 \cdot n_2 + n_1 + 0 \cdot n_0) / n,$$

где FA – функциональная активность ядра; n_3 – количество клеток с $PH \leq 1,5 \mu\text{м}$; n_2 – с $PH > 1,5$, но $\leq 2 \mu\text{м}$; n_1 – с $PH > 2$, но $\leq 2,5 \mu\text{м}$; n_0 – с $PH > 2,5$; n – число клеток в выборке.

При проведении фазометрии ядерных структур лимфоцитов здоровых добровольцев и больных ТХПН на стадии заместительной почечной терапии установлено, что у практически здоровых лиц значение FA составило $1,83 \pm 0,1$ для Т- и $1,85 \pm 0,1$ для В-лимфоцитов. Полученные высокие показатели связаны с преобладанием лимфоцитов со средним и низким значениями фазовой высоты, т. е. функционально активных клеток. Значения функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов больных ТХПН и практически здоровых лиц (доноров) представлены в табл. 7.

Таблица 7

FA Т- и В-лимфоцитов больных ТХПН ($M \pm \sigma$)

Группы	Значение FA Т-лимфоцитов	Значение FA В-лимфоцитов
Доноры (n = 30)	$1,83 \pm 0,1$	$1,85 \pm 0,1$
Больные ТХПН (n = 36)	$1,56 \pm 0,15^*$	$1,54 \pm 0,2^*$

Примечание. Достоверность различий $p < 0,05$; * – отличается от контроля.

Как для Т-, так и для В-лимфоцитов больных ТХПН характерно достоверное уменьшение функциональной активности ядер клеток. На основании полученных результатов можно предположить, что в Т- и В-звене иммунитета имеются признаки функциональной недостаточности, связанной, очевидно, с подавлением клеточной активации. В то же время полученные данные не позволяют оценить пролиферативный потенциал лимфоцитов, а лишь характеризуют изменение состояния иммунореактивности пациентов с терминальной стадией ХПН.

Морфометрический анализ ядерных структур лимфоцитов у 18 реципиентов почечного трансплантата с неосложненным послеоперационным

течением показал следующее. Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови у реципиентов почечного трансплантата с неосложненным течением раннего послеоперационного периода представлены в табл. 8.

На 4–5-е сутки зарегистрированы наименьшие значения ядерной активности лимфоцитов, что, вероятно, связано с проведением интенсивной иммуносупрессии в эти сроки, а также реакцией организма на оперативное вмешательство. К 8–10-м суткам наблюдается рост и стабилизация показателя ядерной активности в связи с адаптационными процессами перестройки морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток при реализации реакции трансплантационного иммунитета.

Таблица 8

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови при неосложненном течении (M ± σ)

ФА	До АТП	Сутки после АТП				
		5-е	8-е	13-е	21-е	28-е
Т-лимфоциты	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3*	1,3 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*	1,4 ± 0,3*	1,4 ± 0,2*
В-лимфоциты	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2*	1,4 ± 0,2	1, ± 0,11*	1,4 ± 0,3*	1,4 ± 0,1*

Примечание. * – достоверность различий $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Нами проведено проспективное обследование 12 больных в раннем посттрансплантационном периоде при отсроченной функции трансплантата. Проведенное исследование ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови методом компьютерной фазовой морфометрии у реципиентов почечного трансплантата с отсроченной функцией представлено в табл. 9.

Таблица 9

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата с отсроченной функцией (M ± σ)

ФА	До АТП	Сутки после АТП				
		5-е	8-е	13-е	21-е	28-е
Т-лимфоциты	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,2*	1,2 ± 0,3*	1,3 ± 0,1*	1,3 ± 0,15*	1,2 ± 0,2*
В-лимфоциты	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,1*	1,4 ± 0,12*	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,2*

Примечание. * – достоверность различий $p < 0,05$.

Из представленных данных видно, что у реципиентов почечного трансплантата происходит достоверное уменьшение функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов, что характеризует степень подавления иммунореактивности пациентов в процессе иммуносупрессии. При этом не выявлено достоверно значимых различий снижения иммунореактивности при первичной и при отсроченной функцией трансплантата (без иммунологического конфликта).

У 6 больных проведен мониторинг ядерной активности Т- и В-лимфоцитов при остром отторжении трансплантата. При этом отмечено значительное увеличение функциональной активности ядер Т- и/или В-клеток.

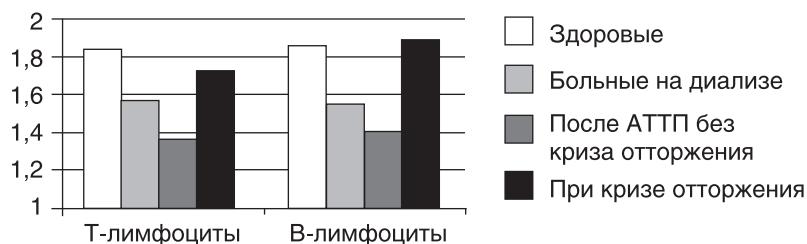


Рис. 10. Мониторинг ядерной активности Т- и В-лимфоцитов

При наличии острого отторжения по клеточному типу наблюдался подъем ядерной активности Т-лимфоцитов до $1,71 \pm 0,05$, т. е. на 25,7% по сравнению с пациентами с неосложненным течением раннего послеоперационного периода. При кризе отторжения по сосудистому типу показатель ядерной активности составил $1,88 \pm 0,1$, что на 35% выше, чем в группе с течением послеоперационного периода без иммунологического конфликта.

Таким образом, внедрение и использование в клинической практике показателя функциональной активности ядер лимфоцитов позволило своевременно диагностировать развитие острого отторжения на доклинической стадии и начать соответствующее лечение.

Мы также изучили морфометрические характеристики ядерных структур лимфоцитов при проведении антикризовой терапии у приведенных выше 6 больных.

Острое отторжение почечного трансплантата купировали «пульсами» метилпреднизолона до общей дозы 1,5–3,0 г. При стероидрезистентных кризах применялся антитимоцитарный глобулин – АТГ (Фрезениус).

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата представлены в табл. 10.

Таблица 10

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата (M ± σ)

ФА	При неосложненном течении	При кризе отторжения	После проведения противокризовой терапии
Т-лимфоцитов	$1,36 \pm 0,1$	$1,71 \pm 0,05$	$0,97 \pm 0,2$
В-лимфоцитов	$1,39 \pm 0,1$	$1,88 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$

Из представленных данных видно, что на фоне проводимой противокризовой терапии как для Т-, так и для В-лимфоцитов характерно достоверное уменьшение функциональной активности ядер клеток. ФА достигает значе-

ний, сопоставимых с показателями в группе с неосложненным течением и даже ниже.

Таким образом, показатель функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов характеризует степень подавления иммунореактивности пациентов в процессе иммуносупрессии при лечении острого отторжения почечного трансплантата.

Определение ядерной активности циркулирующих лимфоцитов позволило провести оценку эффективности противокризисной терапии. При выявлении стероидрезистентного криза отторжения своевременно проводилось лечение препаратами поликлональных антител. Благодаря ранней диагностике острого отторжения и адекватно проведенной терапии потерь трансплантатов не наблюдалось.

Морфофункциональное состояние иммунокомпетентных клеток реципиентов ренального трансплантата в отдаленном послеоперационном периоде

Исследования выполнены у 70 реципиентов почечного трансплантата (54 мужчины и 16 женщин). Из них 33 пациента были обследованы в раннем послеоперационном периоде на 20–30-е сутки после аллотрансплантации (группа сравнения), 37 – в отдаленном периоде (от 4 до 48 месяцев после операции, в среднем $19,9 \pm 2,7$ месяца). При этом у 23 реципиентов отмечалась удовлетворительная и стабильная функция трансплантата, у 14 пациентов была диагностирована хроническая трансплантационная нефропатия, подтвержденная морфологически. Контрольную группу составили 30 соматически здоровых лиц (18 мужчин и 12 женщин), средний возраст $36,9 \pm 3,1$ года.

При исследовании морфофункционального состояния Т-лимфоцитов в отдаленном периоде (в среднем $19,9 \pm 2,7$ месяца после АТП) у реципиентов со стабильной функцией трансплантата мы не отметили значимых изменений по сравнению с данными КФМ, полученными на 20–30-е сутки после трансплантации (группа сравнения). Достоверно уменьшался только средний фазовый объем клеток (на 16%).

В популяция В-лимфоцитов по-прежнему наблюдался выраженный супрессивный эффект проводимой терапии. Все фазовые показатели В-клеток оставались в пределах значений аналогичных параметров, зарегистрированных в раннем послеоперационном периоде (20–30-е сутки после АТП).

При анализе популяционного состава Т-клеток обращает внимание увеличение содержания больших лимфоцитов (16,3 против 5,2% в раннем послеоперационном периоде). Этот факт был подтвержден и результатами иммунограмм данной группы реципиентов: отмечалось увеличение процента цитотоксических лимфоцитов (28,3 против 17,3%, $p < 0,05$), натуральных киллеров (30,7 против 11,4%, $p < 0,05$), активированных Т-клеток (17,2 против 11,4%, $p > 0,05$).

Диаграмма распределения популяции В-клеток по диаметру оставалась практически неизменной. Содержание малых, средних и больших В-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата в отдаленные сроки после операции составило 47,5, 41,3 и 11,2% против 41,3, 45,8 и 12,9% в раннем послеоперационном периоде, соответственно.

Из 37 реципиентов, обследованных в отдаленные сроки после АТП, у 14 (37,8%) была диагностирована и верифицирована морфологически хроническая трансплантационная нефропатия (ХТН). В этой подгруппе 9 пациентам (64,3%) был поставлен диагноз изолированной ХТН; у 4 больных (28,6%) ХТН сочеталась с признаками острого отторжения трансплантата (пограничные изменения); у 1 пациента (7,1%) обнаружен возвратный гломерулонефрит.

У этих 9 больных с изолированной ХТН не обнаружено признаков активации Т-клеточного звена иммунитета. Все морфометрические показатели оставались сопоставимыми с аналогичными параметрами в группе реципиентов со стабильной функцией трансплантата.

В популяции В-клеток обнаружены значимые изменения их морфофункциональных показателей. Практически на 20% увеличились диаметр, периметр и площадь клеток. Фазовая высота и объем, напротив, снизились на 12–15%. Следовательно, морфометрические показатели именно В-клеток могут служить диагностическими критериями прогрессирования ХТН.

Для 4 пациентов с диагнозом ХТН в сочетании с признаками острого отторжения (склероз интерстиция, атрофия канальцев, выраженная инфильтрация мононуклеарными клетками интерстиция, тубулиты и артерииты – инфильтрация лимфоцитами стенок канальцев и артерий) было установлено, что наряду с выраженными изменениями морфофункционального состояния В-лимфоцитов отмечались и достоверные изменения размерных показателей Т-клеток.

ВЫВОДЫ

1. Фазово-интерференционная микроскопия и компьютерная морфометрия клеток крови позволяют на предтрансплантационном этапе объективизировать морфофункциональное состояние эритрона для оптимизации корригирующей гемотерапии, выявить структурно-метаболические изменения нейтрофилов, что может являться предиктором гнойно-септических осложнений, установить степень приобретенного иммунодефицита, а также создать базу данных для оценки иммунологического статуса в посттрансплантационном периоде.

2. Индекс функциональной активности иммунокомпетентных клеток представляет собой расчетную величину, получаемую при фазово-интерференционной микроскопии нативных лимфоцитов, отражающую степень конденсации хроматина и, соответственно, метаболическую активность в

отношении синтеза ДНК, что позволяет оценить и спрогнозировать функциональную готовность иммунокомпетентных клеток.

3. Витальная морфометрия иммунокомпетентных клеток может быть использована как скрининг-метод, определяющий вектор диагностического поиска при дисфункции трансплантата. В случаях иммунологического конфликта отмечается оптико-морфометрическая активация Т-клеточного звена при отсутствии реакции со стороны В-лимфоцитов. При дисфункциях нефротрансплантата, не связанных с реакцией отторжения, отсутствуют признаки активации Т-лимфоцитов; В-клетки, напротив, реагируют активацией.

4. В экспериментах *in vitro* установлены дозо- и времязависимые эффекты изменения денситометрических показателей ядер лимфоцитов. Фазовая высота живой клетки отражает особенности ядерного полиморфизма и может рассматриваться в качестве раннего критерия пролиферативной активности лимфоцита (ФА). У пациентов без криза отторжения величина ФА Т- и В-клеток снижается до 1,21 и 1,35. При остром отторжении на фоне базовой иммуносупрессии наблюдается прогрессирующее увеличение функциональной активности лимфоцитов: величина ФА составляет $\geq 1,8 \pm 0,1$.

5. Эффективность противокризовой терапии может быть количественно оценена по динамике значений показателя функциональной активности ядер лимфоцитов: снижение ФА до 1,4, свидетельствует об эффективности проводимого лечения.

6. При хронической трансплантационной нефропатии в популяции В-лимфоцитов увеличиваются фазовые диаметр, периметр и площадь (на 19–20%) и уменьшаются высота и объем (на 15–18%), отражая состояние активации В-клеток на фоне ареактивности Т-звена иммунитета. Изменения морфометрических показателей Т- и В-лимфоцитов достоверно коррелируют с данными клинико-лабораторных исследований и соответствуют результатам пункционной биопсии нефротрансплантата при различных видах морфологических проявлений ХТН.

7. Характер изменений морфометрических показателей Т- и В-лимфоцитов соответствует уровню иммунного реагирования реципиента почечного трансплантата, а разница в величине клеточных параметров по отношению к значениям нормы увеличивается с прогрессированием хронической трансплантационной нефропатии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение компьютерной фазовой морфометрии целесообразно для проведения многопланового анализа тяжести состояния больных ТХПН в предтрансплантационном периоде, поскольку КФМ является малоинвазивным, оперативным, объективным и информативным методом точной количественной оценки морфофункционального статуса живых клеток крови при использовании наименьших материальных и технических затрат.

2. Для улучшения результатов трансплантации необходимо учитывать морфофункциональные особенности нейтрофильных лейкоцитов. Использование с этой целью метода КФМ при комплексном обследовании больных ТХПН позволяет количественно оценить состояние неспецифических защитных возможностей организма и прогнозировать риск развития инфекционных осложнений в раннем послеоперационном периоде.

3. У реципиентов почечного трансплантата целесообразно применение компьютерной фазовой морфометрии лимфоцитов в раннем послеоперационном периоде в качестве скринингового метода оценки состояния иммунной системы, что позволяет определить диагностический вектор при определении причин дисфункции почечного трансплантата.

4. Показатель ядерной активности лимфоцитов в раннем послеоперационном периоде целесообразно определять каждые 3–4 дня. Повышение показателя ядерной активности является показанием для проведения тщательного лабораторно-инструментального обследования, направленного на подтверждение острой реакции отторжения трансплантата.

5. Во время проведения противокризисовой терапии следует определять показатель ядерной активности лимфоцитов каждые 2 дня для контроля эффективности проводимого лечения.

6. С целью выявления ранних признаков развития ХТН реципиентам почечного трансплантата показано проведение компьютерной морфометрии лимфоцитов не менее 1 раза в месяц в качестве скринингового экспресс-теста для оценки уровня иммунного реагирования. Для успешной интерпретации результатов компьютерной морфометрии необходимо учитывать характер и степень изменения морфометрических параметров лимфоцитов.

7. Данные прижизненной морфометрии лимфоцитов в совокупности с результатами рутинных клинико-лабораторных исследований и морфологического анализа почечного биоптата позволяют наиболее объективно оценить тяжесть состояния реципиента и спрогнозировать возможность дальнейшего развития различных клинико-морфологических вариантов ХТН.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Метелин В.Б., Минаев В.Л., Валов А.Л., Конрадов А.А., Василенко И.А., Бабакова С.В.* Компьютерная фазово-интерференционная микроскопия в биологии и медицине // Актуальные проблемы морфологии: Сб. научных трудов. – Красноярск, 2004. – С. 180–182.
2. *Метелин В.Б., Василенко И.А., Тугарев А.А., Бабакова С.В., Ватазин А.В., Валов А.Л., Марьяновский Б.М., Геращенко М.А.* Компьютерная морфометрия иммунокомпетентных клеток у реципиентов почечного трансплантата // Материалы III Российского конгресса по патофизиологии с международным участием «Дизрегуляторная патология органов и систем». Москва, 19–22 октября 2004 г. – С. 233.

3. Щербакова Е.О., Ватазин А.В., Будникова Н.Е., Агафонова С.Г., Валов А.Л., Савицкая К.И., Русанова Е.В. Лечение и профилактика инфекций мочевой системы у реципиентов ренального трансплантата // Материалы 6 Российской конференции «Современные проблемы антимикробной химиотерапии» и 11 научной конференции Европейского общества химиотерапии инфекционных заболеваний. Москва, 15–18 сентября 2004 г. – С. 26.
4. Ветчинникова О.Н., Ватазин А.В., Валов А.Л., Марьяновский Б.М., Детиненко И.Н., Геращенко М.А., Астахов П.В. Состояние клеточного гомеостаза у больных терминальной ХПН на этапе диализной терапии // VI Съезд научного общества нефрологов: Сборник тезисов. – М., 2005. – С. 205.
5. Детиненко И.Н., Ватазин А.В., Валов А.Л., Янковой А.Г., Василенко И.А., Метелин В.Б. Компьютерная морфометрия в диагностике хронической трансплантационной нефропатии // VI Съезд научного общества нефрологов: Сборник тезисов. – М., 2005. – С. 220–221.
6. Ватазин А.В., Василенко И.А., Валов А.Л., Астахов П.В., Метелин В.Б., Геращенко М.А., Степанов В.А., Цалман А.Я. Морфометрические параметры иммунокомпетентных клеток как критерий ранней диагностики отторжения ренального трансплантата // Актуальные вопросы современной клинической медицины. – Пенза: информационно-издательский центр ПГУ, 2006. – С. 58–59.
7. Метелин В.Б., Валов А.Л., Ватазин А.В., Василенко И.А. Морфометрические критерии ранней диагностики острого отторжения ренального трансплантата // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 3, прил. 1. – С. 79.
8. Филипцев П.Я., Ватазин А.В., Нестеренко И.В., Минина М.Г., Валов А.Л., Янковой А.Г., Макеев Д.А. Использование маргинальных трупных доноров в клинической трансплантации почки // Хирургия. – 2007. – № 11. – С. 63–68.
9. Vasilenko I., Savushkin A., Reshetnyak T., Bichkova I., Nesterenko I., Zaguzin A., Valov A. The clinical relevance of platelet heterogeneity and activation. // J. Thromb. Haemost. – 2007. – Vol. 97, № 4. – P. 536.
10. Нестеренко И.В., Ватазин А.В., Филипцев П.Я., Янковой А.Г., Минина М.Г., Макеев Д.А., Валов А.Л. Результаты трансплантации трупных почек, полученных от возрастных маргинальных доноров // Общественное здоровье и здравоохранение. – 2008. – № 1. – С. 77–79.
11. Метелин В.Б., Валов А.Л., Нестеренко И.В. Роль компьютерной фазовой микроскопии в клинической практике // Цитометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: РИАЛТЕКС, 2008. – С. 51–54.
12. Степанов В.А., Арзуманов С.В., Валов А.Л., Ватазин А.В., Василенко И.А. Морфометрия иммунокомпетентных клеток в экспресс-диагностике иммунологического конфликта у реципиентов почечного аллотрансплантата // Цитометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты. – М.: РИАЛТЕКС, 2008. – С. 61–63.
13. Vlasova E., Vasilenko I., Koshelev R., Valov A., Pashkin I. Assessment of trombosis risk using platelet parameters in elderly patients with chronic renal failure // Haematologica. – 2008. – Vol. 93, Suppl. 1. – P. 129.
14. Арзуманов С.В., Ватазин А.В., Москалец О.В., Валов А.Л., Синютин А.А. Иммунологический мониторинг и роль sCD30 в диагностике острого отторжения

- трансплантированной почки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 4. – С. 11–14.
15. *Власова Е.А., Суслов В.П., Ващук И.А., Пашкин И.Н., Валов А.Л.* Влияние процедуры программного гемодиализа на морфофункциональное состояние тромбоцитов больных хронической почечной недостаточностью // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2009. – Т. 25, № 1, прил. (часть II). – С. 520.
 16. *Валов А.Л., Метелин В.Б., Василенко И.А., Цалман А.Я.* Компьютерная цитодиагностика криза отторжения ренального трансплантата // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2009. – Т. 25, № 1, прил. (часть II). – С. 749.
 17. *Василенко И.А., Кардашова З.З., Тычинский В.П., Вишенская Т.В., Лифенко Р.А., Валов А.Л., Иванюта И.В., Агаджанян Б.Я.* Клеточная диагностика: возможности витальной компьютерной микроскопии // Вестник последипломного медицинского образования. – 2009. – № 3–4. – С. 64–68.
 18. *Василенко И.А., Валов А.Л., Ватазин А.В., Нестеренко И.В., Круглов Е.Е.* Некоторые особенности морфофункционального состояния тромбоцитов периферической крови доноров и реципиентов почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 4. – С. 69–74.
 19. *Ватазин А.В., Василенко И.А., Валов А.Л., Метелин В.Б., Цалман А.Я.* Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 4. – С. 18–25.
 20. *Цалман А.Я., Метелин В.Б., Валов А.Л., Ватазин А.В., Василенко И.А.* Функциональное состояние хроматина лимфоцитов как критерий диагностики острого отторжения ренального аллотрансплантата // Тезисы докладов научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа». – М., 2009. – С. 87.
 21. *Степанов В.А., Ватазин А.В., Василенко И.А., Метелин В., Крстич М.Д., Валов А.Л.* Мониторинг противокризовой терапии реакции отторжения почечного трансплантата // Тезисы докладов научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа». – М., 2009. – С. 75.
 22. *Степанов В.А., Василенко И.А., Ватазин А.В., Крстич М.Д., Валов А.Л., Цалман А.Я.* Использование индекса активации иммунокомпетентных клеток в доклинической диагностике острого отторжения почечного трансплантата // Тезисы докладов научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа». – М., 2009. – С. 74
 23. *Цалман А.Я., Метелин В.Б., Василенко И.А., Валов А.Л., Ватазин А.В.* Функциональная активность ядер лимфоцитов как критерий диагностики острого отторжения ренального аллотрансплантата // Материалы II Московской региональной научно-практической конференции (с международным участием) «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты». 28–29 мая. – М. – С. 92–94.

24. Степанов В.А., Ватазин А.В., Василенко И.А., Метелин В.Б., Валов А.Л. Диагностика реакции отторжения почечного трансплантата на основе расчетного индекса активации клеток // Материалы II Московской региональной научно-практической конференции (с международным участием) «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 28–29 мая 2009 г. – М.: ООО Амалайн. – С. 80–81.
25. Василенко И.А., Ватазин А.В., Метелин В.Б., Степанов В.А., Валов А.Л. Способ диагностики отторжения почечного аллотрансплантата // Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентным и товарным знакам «Изобретения. Полезные модели». – 2009. – № 7 от 10.03.2009.
26. Ватазин А.В., Василенко И.А., Щербакова Е.О., Метелин В.Б., Валов А.Л. Компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике хронической трансплантационной нефропатии // Терапевтический архив. – 2010. – № 4. – С. 17–21.
27. Валов А.Л., Василенко И.А., Ватазин А.В., Троянский И.В., Метелин В.Б., Цалман А.Я. Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов как неинвазивный метод диагностики острого отторжения почечного аллотрансплантата // Альманах клинической медицины. – 2009. – № 20. – С. 77–82.
28. Vasilenko I., Metelin V., Valov A., Tychinsky V., Vishenskaya T. Optical imaging of living platelet architecture and function in real time // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2009. – Vol. 7, Suppl. 2. – PPMO–729.
29. Ватазин А.В., Василенко И.А., Пасов С.А., Арзуманов С.В., Валов А.Л., Щербакова Е.О., Метелин В.Б., Степанов В.А., Цалман А.Я., Лабурдова Е.В., Агафонов Б.В. Компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике ранних кризов отторжения ренального аллотрансплантата: Учебное пособие. – М.: ООО «Вега-сервис», 2009. – 20 с.

Еремеева Марина Викторовна

СТИМУЛЯЦИЯ АНГИО/МИОГЕНЕЗА ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ И АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ КЛЕТОК- ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

14.00.41 Трансплантология и искусственные органы

14.00.06 Кардиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в Научном центре сердечно-сосудистой хирургии
им. А.Н. Бакулева РАМН.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАМН

Бокерия Лео Антонович

доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАМН

Голухова Елена Зеликовна

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая сердечная недостаточность – заболевание многофакторное. Применяемые на сегодня методы лечения способны замедлить развитие болезни, но постепенно заболевание прогрессирует и становится рефрактерным в отношении «традиционной» терапии. На поздних стадиях единственно эффективным методом лечения остается пересадка сердца. Однако возможности применения трансплантации сердца жестко ограничены дефицитом донорских органов. Поэтому в настоящее время сложилась настоятельная потребность в разработке и внедрении альтернативных методов лечения.

Стимуляция регенерации поврежденного органа – следующий после замещения способ лечения. Успех такого лечения существенным образом

зависит от понимания молекулярных и клеточных механизмов развития сердечной недостаточности, ее прогрессирования и регрессии в результате регенерации миокарда. В связи с этим представляется важным изучение факторов, детерминирующих, а также ограничивающих регенеративные возможности организма взрослого. Открытым остается также вопрос о сохранении способности к регенерации в конечно-дифференцированных тканях человека.

В колоссальном потоке современных исследований на данную тему отчетливо прослеживаются три основных направления. *Во-первых*, это создание имплантируемых протезов левого желудочка. Конкретные механизмы восстановления сердечной функции у больных при данном методе лечения остаются неясными, однако предполагается активация регенерации зрелых клеток либо стимуляция миграции стволовых клеток сердца или костного мозга в пораженный участок миокарда. Эта последняя возможность подкрепляется фактом обнаружения повышенного содержания факторов привлечения стволовых клеток (инсулин-подобного фактора роста 1 и фактора 1 стромы) в миокарде пациентов после операции (Assmus B. et al., 2002; Adams G. et al., 2007).

Вторым активно развивающимся в последние 20 лет направлением является применение генной терапии для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы и сердечной недостаточности в частности (Isner J., 2002; Henry T. et al., 2003). Несмотря на связанные с этим направлением большие ожидания и огромный энтузиазм исследователей, реальный прогресс весьма ограничен, что объясняется как трудностью разработки эффективного метода доставки соответствующего гена в пораженный участок, так и сложностью выбора подходящего гена. Дополнительной возможностью служит применение клеточной терапии в качестве средства доставки «терапевтического» гена. В целом генная терапия остается перспективной возможностью стимуляции регенерации миокарда – как сама по себе, так и в сочетании с другими способами регенеративной терапии. Однако успех этого направления полностью зависит от интенсивности исследовательской работы.

Третьей по порядку изложения, но не по важности, возможностью регенеративной терапии сердечной недостаточности является клеточная терапия. На экспериментальных моделях было продемонстрировано, что кардиомиоциты плода могут формировать межклеточные контакты с клетками миокарда, однако практической перспективы применения данный источник стволовых клеток не имеет (Strauer B., 2003). Наиболее практичной в настоящее время возможностью представляется использование аутологичных либо гомологичных стволовых клеток взрослого, выделяемых из костного мозга, крови, жировой ткани, скелетных мышц или непосредственно из сердца. На экспериментальных моделях сердечной недостаточности была продемонстрирована потенциальная способность клеток из вышеперечисленных источников улучшать функцию миокарда (Szmitko P. et al., 2003).

Нуждается в дальнейшей отработке еще целый ряд вопросов, таких как оптимизация выбора клеток для введения и способа введения, недостаточное выживание введенных клеток и низкая скорость их пролиферации после инъекции, а также способность введенных клеток к трансдифференцировке и интеграции либо к воздействию на оставшийся жизнеспособным миокард через паракриновый эффект. Прояснение этих основных моментов необходимо для оптимизации условий клеточной терапии, сочетающей максимальный клинический эффект с минимумом осложнений.

Целью настоящей работы стала разработка безопасных и эффективных методов генной и клеточной терапии, которые могли бы использоваться изолированно или в дополнение к существующим традиционным хирургическим методам для лечения ряда сердечно-сосудистых заболеваний.

Задачи исследования

1. Проанализировать и охарактеризовать состояние миокарда в предполагаемой зоне введения терапевтических агентов для стимуляции ангио/миогенеза.

2. На модели ишемии задней конечности крысы исследовать эффективность полученных нами генетических препаратов VEGF₁₆₅ и bFGF.

3. В культуре *in vitro*, а также путем непосредственного анализа выделяемых *ex-vivo* стволовых клеток-предшественников охарактеризовать их фенотип, а также пролиферативный и дифференцировочный потенциал.

4. На ограниченном контингенте больных с ИБС и ХИНК провести оценку эффективности клинического применения генетических препаратов – стимуляторов ангиогенеза.

5. На ограниченном контингенте больных с сердечной недостаточностью и ХИНК провести оценку эффективности клинического применения стволовых клеток-предшественников для стимуляции ангио- и миогенеза.

6. Выработать и обосновать критерии отбора, а также рациональные и безопасные методы доставки и тактику применения генетических и клеточных препаратов для лечения больных с сердечно-сосудистой патологией.

Научная новизна работы

Создана уникальная плазмидная конструкция, позволяющая эффективно экспрессировать ген VEGF₁₆₅ в тканях, и обоснована перспективность его применения для стимуляции ангиогенеза в процессе ревазуляризации ишемизированных тканей.

Впервые продемонстрирована большая по сравнению с CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клетками способность клеток CD133⁺/CD34⁻/VEGFR-2⁺ к дифференцировке в направлении эндотелиального ростка, и тем самым обоснована большая перспективность использования маркера CD133 по сравнению с CD34 для выделения стволовых клеток с целью лечения ишемической болезни сердца и хронической ишемии нижних конечностей.

Впервые показано, что в зависимости от локализации ишемии, внутримышечное и/или интраартериальное введение CD133⁺ аутологичных костномозговых клеток-предшественников ведет к достоверному улучшению перфузии вследствие формирования новой сосудистой сети.

Практическая значимость работы

Разработанная на основе гена VEGF₁₆₅ генетическая конструкция внедрена в клиническую практику НЦССХ им. А.Н. Бакулева и успешно применяется для лечения больных ишемической болезнью сердца и хронической ишемией нижних конечностей с целью реваскуляризации пораженных тканей. В результате изучения потенциала к пролиферации, дифференциации и регенерации стволовых клеток костного мозга разработаны и внедрены в клиническую практику НЦССХ им. А.Н. Бакулева методы клеточной терапии ишемической болезни сердца и хронической ишемии нижних конечностей.

Материалы работы могут быть рекомендованы к применению в научно-педагогической деятельности кардиохирургических центров нашей страны, в которых осуществляется квалификационная подготовка специалистов, работающих в кардиологии и кардиохирургии.

Результаты данной работы внедрены в клиническую практику Научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, а также материалы диссертации используются в курсе лекций для аспирантов и ординаторов, в сертификационном курсе для сердечно-сосудистых хирургов, проходящих обучение на базе НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН.

Положения, выносимые на защиту

Дополнительная стимуляция процессов ангио/миогенеза в ишемизированных тканях ведет к улучшению прогноза течения заболевания и улучшению качества жизни больных ишемической болезнью сердца и хронической ишемией нижних конечностей.

Применение плазмидной генетической конструкции (ангиостимулин) безопасно для больного, позволяет эффективно экспрессировать ген VEGF₁₆₅ и может быть использована для индукции репаративного ангиогенеза в ишемизированных тканях.

Популяция стволовых CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток-предшественников обладает большим дифференцировочным потенциалом в направлении неоангиогенеза по сравнению с CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клетками, что обуславливает их большую терапевтическую эффективность.

Терапевтическая эффективность аутотрансплантации стволовых CD133⁺-клеток определяется в том числе способом введения. В то время как интра-миокардиальный способ достоверно улучшает перфузию ишемизированного миокарда, интракоронарное введение не оказывает влияния на данный параметр.

Апробация диссертации состоялась 8 мая 2009 года на заседании апробационного совета НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН.

Публикации. По теме опубликовано 43 научные работы, из них 16 – в центральной (в том числе зарубежной) печати объемом более 100 страниц.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 186 страницах, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, характеристика материалов и методов исследования, результаты, обсуждение), выводов, практических рекомендаций и указателя литературы из 6 отечественных и 323 зарубежных источников. Диссертация содержит 40 таблиц и 70 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Методы экспериментальных исследований

Гистологическая оценка экспрессии факторов ангиогенеза и рецепторов к ним. Для окраски срезов тканей миокарда использовали моноклональные антитела: анти-CD34 Dako Corp., Дания; анти-CD31 Dako Corp., Дания; анти-VEGF Santa Cruz Bio-tech., U.S.A.; анти-Flt-1 Santa Cruz Bio-tech, U.S.A.; анти-Flk-1 Santa Cruz Bio-tech, U.S.A.; анти-Thrombospondin Boehringer Manhiem, Германия; анти-CD95, анти-CD95L Novocastra. Биопсийный материал ишемизированного участка миокарда размером не менее 5×3 мм забирали во время операции КШ. Материал немедленно помещали в 10%-ный раствор нейтрального формалина. Проводка и заливка биопсийного материала в парафин проводилась по стандартной методике. Выдержка в 10%-ном нейтральном формалине не превышала 24–36 часов. Для оценки экспрессии факторов ангиогенеза и других факторов роста использовались срезы толщиной 4 мкм. Срезы депарафинировали и дегидратировали по стандартной методике. Для восстановления структуры антигенов срезы обрабатывались в Target Retrieval Solution (Dako) на водяной бане в течение 30 мин при 95–99 °С. Для блокирования эндогенной пероксидазы и неспецифического связывания срезы инкубировали с 3%-ным H_2O_2 15 мин, а затем с 1%-ным БСА – 15 мин при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами проводили от 30 до 60 мин (в зависимости от вида антител) при комнатной температуре. После инкубации срезы промывали в PBS. Визуализация первичных антител производилась с помощью системы 4SAB plus kt (Dako Corp.) согласно инструкции. Препараты докрашивали гематоксилином и заключали в бальзам. Подсчет количества сосудов проводился в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 200$ – 250 .

Электронная микроскопия интраоперационной биопсии миокарда зоны, расположенной рядом с постинфарктной аневризмой левого желудочка. У 16 больных с постинфарктной аневризмой ЛЖ были взяты интраоперационные биопсии миокарда ЛЖ из зоны, расположенной рядом с постинфарктной аневризмой левого желудочка. Биопсийный материал фиксировали в растворе 2,5%-ного глутарового альдегида и 1%-ного параформальдегида на

фосфатном буфере (рН 7,4), дофиксировали в 1,5%-ном растворе четырехокси-осмия, обезвоживали, заливали в аралдит. На ультратоме Leica изготавливали полутонкие и ультратонкие срезы. Полутонкие срезы ткани окрашивали по методу ШИК с докраской метиленовым синим, изучали под световым микроскопом. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе Philips CM100.

Получение плазмидной конструкции, содержащей ген васкулоэндотелиального фактора роста VEGF₁₆₅ (ангиостимулин). Последовательность человеческого гена VEGF была получена из базы данных Genom Database с помощью программы Entrez (NM003376). Для получения гена к его последовательности были синтезированы праймеры: к 5' концу гена TGO GGC CGA AAC CAT GA и CGG CTC ACC GCC TCG GCT T к 3' концу гена. Праймер к 5' концу гена был выбран с учетом последовательности Козак, обеспечивающей эффективное начало трансляции. Для обеспечения возможности проверки экзогенного белкового продукта гена VEGF был также синтезирован праймер на 3' конец гена, который помимо последовательности гена содержал эпитоп распознавания антителами полигистидиновой последовательности, необходимой для последующей очистки белка. Для удобства клонирования и анализа праймеры также включали сайты узнавания уникальными рестриктазами, не содержащимися в последовательности гена. Сайт Eco RI для 5' концевого праймера и SmaI сайт для 3' концевого праймера. Фрагменты ДНК, соответствующие по размерам VEGF₁₆₅ и VEGF₁₂₁, элюировались из геля после рестрикции и очищались с помощью набора фирмы Qiagen. Конструкция, содержащая ген VEGF₁₆₅, была изготовлена на основе вектора pBK-CMV neo (Stratagene). Полученные плазмиды встраивали в соответствующий штамм *Escherichia coli* с целью наработки белка в процессе ферментации с последующей очисткой препарата из клеточного лизата на аффинных колонках с антителами, специфичными к гистидиновому хвосту молекулы.

Исследование эффективности ангиостимулина *in vivo* в тесте с матригелем. В экспериментах использовали мышей-самок C57Bl/6 в возрасте 6–8 недель. Матригель (BD Bioscience, Discovery Labware) при 4 °C смешивали со 100 нг/мл VEGF (Becton Dickinson Labware) либо с клетками, трансфицированными геном VEGF₁₆₅. Смесь Матригеля затем вводили подкожно мышам в подмышечную впадину, где он полимеризовался с формированием имплантата, который удаляли на 7 день, фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24–36 часов и заключали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм докрасивались гематоксилин-эозином и по Мейсону (Masson's trichrome, Sigma Diagnostic). Общий индекс клеточной инвазии определялся при анализе изображений срезов, полученных с помощью цифровой камеры. Количество мигрировавших клеток определялось подсчетом процента области, занятой эндотелиальными клетками, к общей области Матригеля.

Исследование эффективности ангиостимулина на модели ишемии нижних конечностей. В эксперименте использовались крысы Vistar, взрослые

особи массой 200–250 граммов обоего пола. Для изучения ангиогенного эффекта испытываемых препаратов была создана модель хронической ишемии скелетной мышцы конечности крысы. Под внутривенным наркозом раствором тиопентала производилась перевязка бедренной артерии крысы нитью Prolen на двух уровнях – проксимальном и дистальном. На 10-е сутки после перевязки артерии из области ишемии брался кусочек ткани для гистологического исследования, вводился ген ангиогенного фактора в различных дозах. На 30-е сутки после введения препарата брался на гистологический анализ кусочек ткани из места инъекции. Блоки ткани скелетной мышцы замораживали при помощи охлажденного до $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ петролейного эфира. Срезы толщиной 10 мкм приготавливали в криостате Leica. Свежезамороженные срезы скелетной мышцы окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону, выявляли активность сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы. Активность ферментов определяли по методике Burstone M.S., регистрируя восстановление соли нитросинего тетразолия до синего диформаза.

Методика оценки эффективности препаратов по плотности капиллярной сети в ишемизированной ткани. Блоки ткани скелетной мышцы фиксировали в 4%-ном нейтральном формалине и заливали в парафин. Парафиновые срезы скелетной мышцы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону. Оценка плотности капиллярного русла проводилась при увеличении $\times 1000$ с использованием иммерсии. Подсчитывалось количество открытых капилляров при оценке не менее 10 полей зрения на срез. Сравнивались полученные данные от одного животного до введения препарата и через 30 дней после введения.

Метод выделения и получения аутологичных клеток-предшественников CD133⁺. Использовалась стандартная методика пункции костного мозга под местной анестезией из крыла подвздошной кости в количестве 40 мл. Пункция помещалась в 2×50 мл пробирки с 5 мл PBS и 200 U/мл гепарина. Полученная масса разводилась 1 : 2 средой RPMI 1640, содержащей 0,02% коллагеназы В и 100 U/мл ДНК-азы. Осторожно перемешивалась при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 мин. После фильтрации через фильтр 40 мкм выделялся весь пул мононуклеаров методом центрифугирования (35 мин – 400 g – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) на градиенте плотности Ficoll. Выделенные мононуклеары двукратно отмывали в растворе PBS, содержащем 2 mM EDTA, центрифугировали (10 мин – 300g – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Подсчитывали концентрацию мононуклеаров в камере Горяева. Оставляли финальный объем 300 мкл PBS/не более 10^8 клеток для последующей магнитной сепарации CD133⁺. Для ингибирования неспецифического связывания добавляли FcR-блокирующий реагент (100 мкл). Инкубировали 10 мин при $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. После чего сразу вносили антитела CD133 на микросферах (100 мкл) и инкубировали 30 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. После отмывки в десятикратном объеме раствора PBS (10 мин – 300 g – $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) ресуспендировали осадок в 500 мкл буфера. Для магнитной сепарации использовали MS колонки. После подсчета и оценки жизнеспособности клетки помещали в

инкубатор (37 °С, 0,5% CO₂) в бессывороточной среде X-VIVO 15 согласно рекомендациям GMP, где сохраняли в течение 1–2 суток до процедуры введения пациенту. Для введения CD133⁺ клетки-предшественники разводили в физиологическом растворе (2 мл), содержащем 20% аутологичной сыворотки пациента.

Метод проточной цитофлюориметрии (FACS). Цитометрический анализ проводился с использованием программ MultiGraph и FlowJo.

Иммуноцитохимический анализ. Мононуклеары были выделены на градиенте фикола и в концентрации 4×10^6 помещены в 24-луночный планшет, предварительно покрытый человеческим фибронектином (10мкг/мл) (Sigma), в эндотелиальной основной среде EBM (CellSystems) с добавлением компонентов SingleQuots и 20% FCS. После культивирования (4 суток) были удалены неприкрепившиеся клетки и прикрепившиеся оставлены для цитохимического анализа.

Для анализа эндотелиального фенотипа выделенных клеток-предшественников использовали 1,1-dioctadecyl-3,3,39,39-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated LDL (Dil-Ac-LDL) (CellSystems). Клетки инкубировали в среде с 2,4 мкг/мл Dil-Ac-LDL 60 мин при 37 °С. После отмывки в PBS клетки фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида в PBS 10 мин при 20 °С в темноте. Затем клетки отмывали и инкубировали с FITC-меченным Ulex europaeus agglutinin I (Sigma) в течение 60 мин в темноте. Клетки, позитивные и по Dil-Ac-LDL, и по лектину, были идентифицированы как эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП) и подсчитаны в каждой лунке. Два независимых исследователя подсчитывали количество ЭКП в каждой лунке трижды в 6 полях зрения.

2. Материалы и методы исследования в клинике

Общая характеристика больных. В клиническое исследование по оценке эффективности стимуляции ангиогенеза при применении генного препарата «ангиостимулин» и фракции клеток CD133⁺ был включен всего 101 пациент (29 пациентов с ишемической болезнью сердца, 29 пациентов с хронической сердечной недостаточностью различной этиологии и 43 пациента, страдающих ишемией нижних конечностей).

Группа 1: 11 пациентов (средний возраст $49 \pm 8,7$ года, средний класс стенокардии напряжения $3,0 \pm 0,77$ ФК CCS, ФВ ЛЖ $52,8 \pm 9,2\%$), которым было выполнено КШ в сочетании с введением генного препарата «Ангиостимулина».

Группа 2: 13 пациентов (средний возраст $51,4 \pm 6,7$ лет, средний класс стенокардии напряжения $3,23 \pm 0,73$ ФК CCS, ФВ ЛЖ $50,8 \pm 8,8\%$), которым при проведении КШ был введен генный препарат «Ангиостимулин» и проведена ТМРЛ.

Группа 3: 5 пациентов (средний возраст $56,8 \pm 9,8$ лет, средний класс стенокардии напряжения $3,4 \pm 0,65$ ФК CCS, ФВ ЛЖ), которым было выполнено ТМЛР в сочетании с введением «Ангиостимулина».

Группа 4: 10 пациентов (средний возраст $56,7 \pm 10,5$ лет) с ИБС (стенокардия напряжения III–IV ФК CCS) и ХСН (III–IV ФК NYHA, ФВ ЛЖ = $37,7 \pm 13,7\%$), которым были введены клетки CD133⁺.

Группа 5: 12 пациентов (средний возраст $43,1 \pm 14,8$ лет) с ДКМП и ХСН (III–IV ФК NYHA, ФВ ЛЖ = $28,4 \pm 7,2\%$), которым были введены клетки CD133⁺.

Группа 6: 7 пациентов (средний возраст $55,1 \pm 14,1$ лет) с длительным ревматическим анамнезом, после операции протезирования митрального клапана со сроком послеоперационного периода не менее 1 года, при отсутствии поражения аортального клапана и с сохранной функцией протеза митрального клапана, при отсутствии атеросклеротического поражения коронарных артерий, подтвержденного данными коронарографии, со сниженной сократительной функцией миокарда ЛЖ по данным эхокардиографии (ФВ ЛЖ = $36,4 \pm 10\%$, III–IV ФК NYHA). Всем пациентам этой группы при проведении коронароангиографии были введены транскатетерно интрамиокардиально CD133⁺-клетки.

Группа 7: 14 пациентов, страдающих ХИНК, которым были введены клетки-предшественники CD133⁺.

Группа 8: 29 пациентов с ХИНК, которым был введен «Ангиостимулин».

Стандартная электрокардиография (ЭКГ) выполнялась на 6/12 канальном электрокардиографе MWZ BIOSET 8000 (Германия) со скоростью лентопротяжного механизма 25 мм/сек до и после операции в 12 стандартных отведениях.

Эхокардиография (ЭхоКГ) выполнялась на аппарате Hewlett Packard Sonos 5500 с использованием трансторакального S4 и чрезнащеводного Omniplane II датчиков до и после операции. Определение конечных размеров и объемов полости ЛЖ в систолу и диастолу выполнялось из стандартных позиций по методике Teichkholtz. Оценка фракции выброса миокарда левого желудочка осуществлялась по модифицированному методу Simpson из апикальной 4-камерной проекции. Из этой же проекции проводилось измерение конечно-диастолического объема левого желудочка (КДО ЛЖ, мл) и конечно-систолического объема ЛЖ (КСО ЛЖ, мл) по формуле «площадь-длина» в модификации Simpson.

Проба с физической нагрузкой (тредмил-тест) выполнялась на системе сопровождения нагрузочных проб «Burdic Quest» (США) по протоколу Bruce с применением системы 12 модифицированных отведений ЭКГ по методу Mason-Likar на фоне отмены антиангинальных препаратов в утренние часы до операции и перед выпиской пациентов после операции. Производилась оценка толерантности к физическим нагрузкам, оценивалась длительность нагрузки и наличие ЭКГ-критериев ишемии.

Рентгеноэндоваскулярные методы исследования артерий. Всем пациентам с заболеваниями сердца была сделана вентрикулоангиография. В группе пациентов с ХИНК было выполнено ангиографическое исследование магистральных сосудов нижних конечностей. Селективная коронароан-

гиография на этапе дооперационного обследования выполнялась на ангиографических установках «Angioscop D» фирмы Siemens (Германия) и «Integris – 3000» фирмы Phillips (Голландия) под местной анестезией по методу M. Jadcinski с введением катетера в бедренную артерию по S. Seldinger. Применялся контраст «Омнипак». Анализ ангиограмм выполняли на установке «Integris – V3000» со скоростью киносъемки 25–50 кадров в секунду на пленку фирмы «Kodak». Характер и степень поражения коронарного русла определяли по классификации Ю.С. Петросяна и Л.С. Зингермана.

Синхронизированная с ЭКГ однофотонная эмиссионная компьютерная томография миокарда (синхро-ОФЭКТ). Проба с дозированной физической нагрузкой выполнялась на велоэргометре «Meditronic» фирмы Hellige (Германия) с помощью 12-канального электрокардиографа фирмы «Bioset-800» в положении сидя по стандартному протоколу, принятому в НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Реконструкцию полученных томограмм выполняли с применением стандартной программы AUTOSPECT-plus, реализующей механизм обратного проецирования фильтрованных проекций.

Позитронная эмиссионная томография (ПЭТ). Для оценки метаболизма глюкозы применяли радиофармпрепарат (РФП) – фтордезоксиглюкозу, меченную фтором (^{18}F -FDG), которую синтезировали по двухстадийному методу R. Namacher и соавторов на автоматизированном модуле синтеза производства фирмы «Nuclear Interface» (Германия). За 1 час до введения РФП пациенты получали перорально 50 г глюкозы с целью увеличения концентрации глюкозы в крови и подавления потребления жирных кислот в миокарде, что способствовало более высокому накоплению ^{18}F -FDG в миокарде и лучшей его визуализации. Исследование осуществляли на позитронном эмиссионном томографе «Exact 47» фирмы «Siemens» в статическом режиме сбора данных через 40 мин после внутривенной инъекции 370 МБк РФП. Эмиссионное сканирование длилось 20 мин, а трансмиссионное – 10 мин.

Оценка транскутанного напряжения кислорода в тканях осуществлялась с помощью монитора ТСМ-2 фирмы «Radiometer» (Дания) исходно перед введением стимулятора ангиогенеза, через 1, 3 и 6 месяцев после введения (в некоторых случаях дополнительно через 9 месяцев и 1 год). Во время исследования пациент находился в горизонтальном положении на спине с выпрямленными конечностями. Фиксация датчика осуществлялась по стандартной технологии, рекомендуемой фирмой-изготовителем прибора в первом межпальцевом промежутке на тыле стопы. Показатели регистрировались не ранее, чем через 20 минут после помещения откалиброванного датчика на место измерения.

Ультразвуковая доплерография сосудов нижних конечностей проводилась до операции на аппарате Hewlett-Packard Sonos 5500 с линейным сосудистым мультисекторным датчиком. Оценивалась проходимость сосудов, состояние комплекса интима-медиа-адвентиция, состояние просвета сосудов с оценкой степени их стенозирования.

Изучение качества жизни проводилось при помощи опросника общего назначения – Короткая Версия Опросника Здоровья – 36 (MOS 36-item Short – Form Health Survey, или MOS SF – 36), разработанного в США в рамках исследования MOS (Medical Outcome Study, англ. – Изучение Медицинских Результатов).

Статистическая обработка данных. Результаты, представленные в работе, выражались как среднее значение \pm стандартное отклонение. При сравнении зависимых переменных использовался W-критерий Уилкоксона, независимых – T-критерий Манна–Уитни. Результаты считались статистически достоверными при значениях $p < 0,05$. Все расчеты проводились при помощи программы «Statistica 6.0» Copyright © Stat Soft, Inc.

Методы введения ангиогенного фактора. «Ангиостимулин» вводился на заключительном этапе операции коронарного шунтирования интрамиокардиально в общей дозе 1000 мкг в зону, нуждающуюся в стимуляции неоангиогенеза. 11 пациентам препарат был введен на заключительном этапе операции, 13 пациентам дополнительно к КШ и введению препарата проводилась ТМЛР. Суммарная доза препарата делилась на 4 интрамиокардиальные инъекции (по 250 мкг). Область введения определялась на основании результатов коронароангиографии, сцинтиграфии миокарда, позитронно-эмиссионной томографии, как область ишемизированного, но жизнеспособного миокарда, не подлежащая хирургической реваскуляризации по техническим причинам (плохое дистальное русло, малый диаметр коронарной артерии).

Транскатетерно интракоронарно изолированно клетки CD133+ вводили 6 пациентам. Первоначально выполнялась селективная коронарография, затем ретроградная катетеризация ЛЖ и ЛВГ. Производилась смена катетера и под флюороскопическим контролем в полость ЛЖ проводили 7F Gaid катетер, кончик которого был установлен в область введения, которая определялась заранее на основании данных КГ и сцинтиграфии миокарда. Через Gaid-катетер проводилась специальная гибкая игла 3,5F с ограничителем вкола 0,3 мм для интрамиокардиальной пункции (с выбросом гибкой иглы) и выполнялись последовательные (по часовой стрелке) инъекции аутологичных клеток-предшественников CD133+ (в объеме 200–250 мкл) под флюороскопическим контролем положения кончика иглы. Заключительным этапом выполнялась ЛВГ.

Интрамиокардиально клеточный препарат CD 133+ вводили на заключительном этапе операции. 12 пациентам клеточный препарат был введен путем интрамиокардиальной транскатетерной инъекции. 4 пациентам препарат был введен интрамиокардиально транскатетерно (через полость ЛЖ).

В дополнение к хирургической реваскуляризации или при изолированном введении ангиогенных факторов все пациенты с поражением миокарда получали стандартную кардиальную терапию.

Введение стимулятора ангиогенеза (ангиостимулина либо клеток-предшественников) при ХИНК производилось однократно внутриартериально

в магистральную артерию пораженной нижней конечности с помощью катетера, после выполнения исходной ангиографии или внутримышечно обкалыванием икроножной мышцы в области пораженной артерии через 4–5 вколов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Результаты экспериментальных исследований

В результате иммуноморфологического исследования полученных в ходе оперативного вмешательства тканей ишемизированного миокарда больных ИБС нами зарегистрирован параллелизм в экспрессии стимулирующих ангиогенез факторов в тканях и рецепторов к этим факторам на отвечающих клетках. При этом в значительной степени подавляется экспрессия маркеров апоптоза на клетках сосудов сердца. Таким образом, в ишемизированном миокарде активизируются механизмы формирования новых кровеносных сосудов, способных компенсировать недостаток кровотока и ишемию в пораженном участке. Нам удалось показать, что в результате хирургической реваскуляризации миокарда с помощью КШ происходит стимуляция эндогенного компенсаторного ангиогенеза. По-видимому, дополнительное введение факторов, стимулирующих ангиогенез (в частности, ДНК, кодирующей VEGF) при ишемии миокарда, может способствовать более эффективным результатам хирургического лечения, а также в сочетании с лазерным воздействием, поддерживая уровень экспрессии ангиогенных факторов, необходимый для терапевтического ангиогенеза.

По данным гистологического анализа, у всех больных в анализируемой зоне миокарда содержание соединительной ткани было повышено: у 4 больных наблюдали выраженный склероз, у 2 больных – умеренный. В интерстиции у половины больных отмечены отдельные жировые клетки, у одного больного – единичные тучные клетки. КМЦ у всех больных были гипертрофированы (средний поперечный диаметр составил от $28,96 \pm 6,17$ до $32,21 \pm 7,03$ мкм). Большинство КМЦ демонстрировало разную степень утраты миофибрилл: слабую, умеренную или значительную, – с накоплением в саркоплазме повышенного количества гликогена. Наибольшая степень утраты миофибрилл была типична для КМЦ, расположенных в зонах миокарда с более выраженным склерозом.

Электронно-микроскопическое исследование выявило характерные изменения ультраструктуры КМЦ. Ядра этих клеток, как правило, имели сильно извитые контуры, содержали эухроматин с небольшими глыбками гетерохроматина и крупные ядрышки. В околоядерной зоне располагались митохондрии, гранулы гликогена, отложения липофусцина, цистерны и везикулы аппарата Гольджи. У 5 из 6 обследованных больных в некоторых КМЦ рядом с везикулами аппарата Гольджи были обнаружены спе-

цифические предсердные гранулы, у 3 больных в околядерной области КМЦ встречались хорошо развитые цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума. Большинство КМЦ демонстрировало четко организованный сократительный аппарат. Миофибриллы этих клеток имели параллельное расположение, между ними находились цепочки митохондрий межмиофибрилярной популяции. В некоторых КМЦ были выявлены области саркоплазмы, утратившие миофибриллы и заполненные несократительными структурами, в том числе митохондриями, расширенными везикулами саркоплазматического ретикулума. В межмиофибрилярной и околядерной зонах КМЦ всех больных определялись отдельные митохондрии с зонами расхождения крист, заполненные хлопьевидным содержанием матрикса. Вставочные диски КМЦ были интенсивно развиты, имели зигзагообразные контуры, включали соединения типа *fascia adherence*, в меньшей степени – десмосомы и щелевые контакты. У 2 больных некоторые вставочные диски КМЦ демонстрировали локальные расхождения контактирующих мембран. У большинства больных в отдельных КМЦ были обнаружены множественные вставочные диски, расположенные на расстоянии 1–3 саркомеров. Характерным признаком многих КМЦ была дилатация каналов Т-системы. Содержание гликогена в КМЦ сильно варьировалось, обычно оно было повышено в клетках с расширенными зонами утраты миофибрилл. Иногда в клетках выявляли скопления гликогена, окруженные мембранами, которые в ряде случаев могли входить в состав миелиноподобных образований. Миелиноподобные фигуры были обнаружены у большинства больных в некоторых КМЦ. Как правило, они располагались под сарколеммой. В отдельных КМЦ присутствовали мелкие жировые капли. Во всех изученных образцах миокарда выявлен умеренный или выраженный склероз, описанный в литературе как характерный признак миокарда больных ИБС (Zimmer G. et al., 1992), в том числе больных с постинфарктной аневризмой ЛЖ (Su X. et al., 2000). Размеры КМЦ были значительно выше нормы, при которой, как установлено (Maron B.J. et al., 1975), диаметр КМЦ составляет 10–15 мкм. Средний диаметр КМЦ у разных КМЦ демонстрировал ультраструктурные признаки, типичные для гипертрофированных больных находился в пределах от $28,96 \pm 6,17$ до $32,21 \pm 7,03$ мкм, что соответствовало тяжелой степени гипертрофии миокарда по классификации В. Kunkel, M. Schneider (1987). Таким образом, результаты морфологического исследования миокарда демонстрируют наличие в нем склеротических изменений, тяжелой степени гипертрофии КМЦ с началом их перестройки по типу дедифференцировки, что сопряжено со снижением их сократительной способности, а также выявлены дистрофические изменения КМЦ. Полученные результаты свидетельствуют, что у больных ИБС с постинфарктной аневризмой присутствуют значительные патологические изменения миокарда ЛЖ, что является основанием для целенаправленного применения клеточной и генной терапии для стимуляции регенеративных и ангиогенных процессов в пораженном миокарде.

В работе получена и оценена плазмидная конструкция, содержащая ген васкулоэндотелиального фактора роста VEGF₁₆₅ (ангиостимулин). На модели ишемии задней конечности крысы и в тесте с матригелем продемонстрирована эффективность препарата и обоснована перспективность его применения для стимуляции ангиогенеза в процессе реваскуляризации ишемизированных тканей. Было выявлено, что эта конструкция позволяет эффективно экспрессировать ген VEGF₁₆₅ в тканях экспериментальных животных. Также в эксперименте продемонстрированы высокая переносимость и отсутствие токсичности препарата. Для изучения эффективности ангиогенных препаратов VEGF₁₆₅ и bFGF была создана модель хронической ишемии скелетной мышцы задней конечности крысы. Достоверный прирост количества капилляров был обнаружен через 30 дней после введения гена VEGF₁₆₅, даже при введении минимальной в нашем исследовании (250 мкг) дозы препарата. Плотность капиллярной инфильтрации мышечной ткани после введения гена bFGF не отличалась от таковой в контроле (физиологический раствор). При изучении проангиогенной активности генных препаратов в тесте с матригелем клетки человека линии HEK 293 были трансфецированы плазмидой, содержащей ген VEGF₁₆₅. В качестве контроля использовался аналогичный препарат, не экспрессирующий белок VEGF₁₆₅.

С целью более полной характеристики стволовых клеток-предшественников мы выделяли CD133⁺ клетки методом магнитной сепарации на покрытых антителами бусах из костного мозга больных ИБС. Анализ на проточном цитофлуориметре позволил выявить наличие двух субпопуляций в составе данной клеточной фракции: большая CD34⁺/CD133⁺ (69 ± 3% от всех CD133-положительных клеток) и меньшая CD34⁺/CD133⁺ (29 ± 3%) субпопуляции. Обе эти субпопуляции в равной мере экспрессируют на поверхности рецептор к VEGF (99%) и не экспрессируют моноцитарно-макрофагальный маркер CD14.

В процессе культивирования в условиях, благоприятствующих дифференцировке в эндотелиальные клетки, на протяжении 4 дней в популяции CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁻-клеток параллельно с усилением экспрессии CD34 и маркера эндотелиальных клеток CD31 было зарегистрировано прогрессивное снижение экспрессии CD133 на клеточной поверхности. Тем самым наши данные показывают, что субпопуляция клеток-предшественников CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ находится на более продвинутой стадии дифференцировки в направлении эндотелиальных клеток по сравнению с CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁻-клетками. Дополнительно было проанализировано поглощение DiIAc-LDL и связывание лектина *U. europaeus* клетками. При этом удалось продемонстрировать, что в большей степени двойное положительное окрашивание этими специфическими для клеток эндотелия маркерами свойственно субпопуляции CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺-клеток по сравнению с CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁻-клетками (рис. 1). В отличие от этой последней субпопуляции клеток-предшественников, двойное положительное окрашивание по маркерам эндотелия проявляется уже через 24 часа культивирования, что

позволяет предположить, что их более высокий дифференцировочный потенциал в направлении зрелых клеток эндотелия может быть связан с более высокой адгезивностью этих клеток. В связи с этим предположением в тестах на адгезивность нам удалось показать, что стимулированная SDF-1 и зависящая от β_1 -интегрина адгезия выше в субпопуляции CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ клеток по сравнению с CD34⁺/CD133⁺/VEGFR-2⁺ клетками (рис. 2).

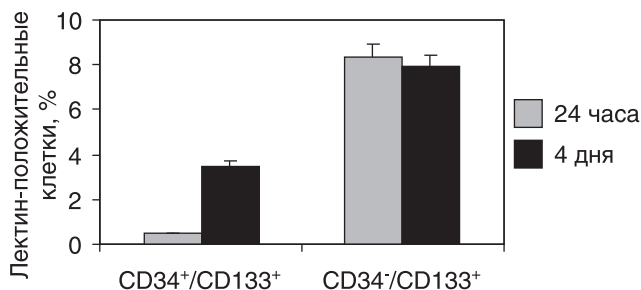


Рис. 1.

Выделенные методом магнитной сепарации клетки разделяли на CD34⁺ и CD34⁻ субпопуляции, культивировали в основной эндотелиальной среде. В обозначенные на рисунке сроки по методике, приведенной в главе «Материалы и методы», определяли поглощение Dil-Ac-LDL и присоединение лектина U eugoraeus. (*P < 0,05 по сравнению с CD34⁺/CD133⁺-клетками, культивированными в течение 24 часов; #P < 0,05 по сравнению с CD34⁺/CD133⁺-клетками, культивированными в течение 4 дней).

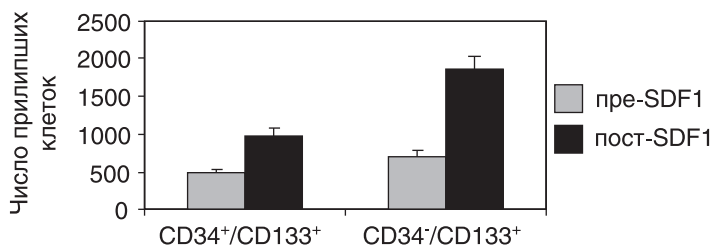


Рис. 2.

Прилипание обозначенных на рисунке субпопуляций ЭПК к покрытому фибронектином предметному стеклу в присутствии или отсутствии SDF-1 (100 nmol/L, 5 min) оценивали под световым микроскопом (x100) путем прямого подсчета прилипших клеток после 3 интенсивных отмывок 1x PBS. Для каждой группы оценивали по 5 препаратов (*P < 0,05 по сравнению с нестимулированными клетками; #P < 0,05 по сравнению с SDF-1-стимулированными CD34⁺/CD133⁺ клетками).

В итоге экспериментальных исследований была отработана методика получения высокоочищенной популяции CD133⁺ стволовых клеток костного мозга. Показано, что данная популяция состоит из двух субпопуляций: менее зрелых CD133⁺/CD34⁻/VEGFR-2⁺-клеток и более дифференцирован-

ных CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток. В экспериментах *in vitro* установлено, что субпопуляция CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток обладает большим по сравнению с CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клетками потенциалом к дифференцировке в направлении эндотелиального ростка. Тем самым обоснована большая перспективность использования маркера CD133 по сравнению с CD34 для выделения стволовых клеток с целью лечения ИБС и ХИНК.

2. Результаты клинического применения ангиогенных факторов

На ограниченном контингенте больных (n = 101) с ишемическим поражением миокарда и при ишемии нижних конечностей проанализирована эффективность трансплантации генного препарата и клеток-предшественников для стимуляции регенеративных процессов.

Препарат «Ангиостимулин» был введен 29 пациентам, страдающим ИБС. Из 29 пациентов исходно 24 (83%) находились в III–IV ФК стенокардии (ССС), после операции большинство пациентов (21 человек, 84%) относились к I и II ФК. 11 пациентам было выполнено КШ в сочетании с введением генного препарата «Ангиостимулина». 13 пациентам при проведении КШ был введен генный препарат «Ангиостимулин» и проведена ТМРЛ. 5 пациентам было выполнено ТМЛР в сочетании с введением «Ангиостимулина», в дальнейшем эта группа выбыла из наблюдения. Сравнение результатов лечения проводилось между 1-й группой (КШ + VEGF) и 2-й группой (КШ + VEGF + ТМЛР). Значительно снизилась потребность в приеме нитратов и возросла толерантность к нагрузке у пациентов обеих групп. При оценке изменения сократимости миокарда ЛЖ по данным ЭхоКГ было выявлено в леченных, а также в смежных к пролеченным сегментах обеих групп, наблюдался прирост количества нормокинетичных и уменьшение гипо- и акинетичных сегментов. При оценке индекса региональной сократимости было определено достоверное уменьшение значения WMSI в первой группе при оценке всех пациентов вместе в сроки от 2 месяцев. Во второй группе также отмечается небольшая, однако недостоверная положительная динамика. Большая выраженность данной тенденции у пациентов 1-й группы, возможно, связана с более тяжелым исходным состоянием сократимости миокарда у этих больных.

При оценке изменения перфузии миокарда оперированных больных с помощью ОФЭКТ с ^{99m}Tc-тетрофосмином все сегменты в обеих группах пациентов были подразделены на 3 подгруппы: леченные, смежные к леченным и нелеченные.

Леченные сегменты: у пациентов *1-й группы* (АКШ + VEGF) отмечается достоверное увеличение накопления РФП при нагрузке в ранние сроки после операции (до 1 месяца), затем наблюдается некоторая тенденция к снижению (статистически недостоверная), но с сохранением положительного эффекта в сравнении с дооперационным исследованием (табл. 1). В покое наблюдаются схожие изменения, но не такие существенные, как при нагрузке. У пациентов

2-й группы (АКШ + ТМЛР + VEGF) в нагрузке в раннем постоперационном периоде наблюдаются схожие с 1-й группой достоверные изменения (прирост накопления РФП в сроки до 1 месяца), а также, в отличие от 1-й группы, наблюдается достоверный прирост перфузии в отдаленном постоперационном периоде (1 год). Изменения в покое менее выражены (недостоверный прирост в 1-й месяц, положительная динамика в отдаленном периоде).

Смежные сегменты: у пациентов 1-й группы при исследовании в нагрузке отмечен незначительный, но достоверный прирост накопления РФП и далее – достоверное снижение (даже в сравнении с исходным накоплением) при наблюдении до 1 года (табл. 2). Наблюдения в покое повторяют результаты исследования в нагрузке. У пациентов 2-й группы мы не нашли достоверных изменений при исследовании в нагрузке. В покое отмечено незначительное достоверное снижение накопления РФП ко 2–4-му месяцам и затем небольшой прирост в сроки до 1 года.

Таблица 1

Показатели накопления РФП в леченных сегментах исходно и в различные сроки после операции у пациентов 1-й и 2-й групп, %

№	Срок наблюдения (п/о)	Накопление РФП в леченных сегментах: Me (10–90%)			
		На нагрузке		В покое	
		1-я группа n = 100	2-я группа n = 132	1-я группа n = 132	2-я группа n = 132
1	Исходно	58 (29–80)	63 (41–84)	68 (34–83)	68 (49–86)
2	До 1 месяца	70 (41–85)	71 (50–86)	69 (44–88)	73 (51–90)
3	2–4 месяца	66 (42–82)	69 (49–85)	70 (49–86)	70 (52–87)
4	6–8 месяцев	65 (39–80)	69 (50–83)	67 (45–83)	70 (51–83)
5	1 год	64 (32–78)	80 (64–90)	64 (37–86)	79 (58–88)
p < 0,05		1–2, 1–3, 1–4, 1–5	1–2, 1–3, 1–4, 1–5, 2–3, 2–4, 2–5, 4–5	1–2, 1–3, 2–4, 3–5	1–5, 2–3, 2–5, 4–5

Таблица 2

Показатели накопления РФП в смежных сегментах исходно и в различные сроки после операции у пациентов 1-й и 2-й групп, %

№	Срок наблюдения (п/о)	Накопление РФП в смежных сегментах: Me (10–90%)			
		На нагрузке		В покое	
		1-я группа n = 41	2-я группа n = 56	1-я группа n = 44	2-я группа n = 56
1	Исходно	52 (29–65)	58 (38–76)	56 (39–73)	60 (42–74)
2	До 1 месяца	55 (34–73)	57 (43–73)	57 (36–77)	58 (46–71)
3	2–4 месяца	46 (33–59)	59 (43–70)	51 (40–76)	57 (41–76)
4	6–8 месяцев	46 (30–59)	56 (41–80)	52 (37–72)	60 (45–77)
5	1 год	44 (30–54)	61 (47–73)	46 (34–54)	64 (59–81)
p < 0,05		1–2, 2–3, 2–4, 2–5	-	1–2, 2–3, 2–4, 3–4, 3–5	1–3, 1–5, 2–3, 2–5, 3–4, 4–5

Каких-либо существенных изменений в нелеченных сегментах не выявлено.

При оценке площади дефектов перфузии в динамике было выявлено, что у пациентов обеих групп отмечалось существенное уменьшение площади ДП (%) как при нагрузке, так и в покое в 1-й месяц после операции в сравнении с дооперационными значениями. Помимо этого, практически исчезает разница площадей дефектов при нагрузке и в покое, что свидетельствует о редукции ишемии миокарда. В 1-й группе в дальнейшем наблюдалось постепенное увеличение площади дефекта в течение года наблюдений, не достигшее, однако, дооперационных значений. Во 2-й группе небольшое увеличение площади дефектов в 2–4 месяца сменялось второй волной снижения к 6–12 месяцам наблюдения. Суммарно результаты изучения динамики площадей дефектов перфузии повторяют тенденции, обнаруженные при сегментарной оценке накопления РФП.

Аутологичные клетки-предшественники CD133⁺ были введены 22 пациентам с хронической сердечной недостаточностью различной этиологии. Все пациенты находились под динамическим наблюдением, в течение которого им было проведено комплексное обследование в различные сроки после операции. Из 22 пациентов исходно 9 (41%) находились в III ФК и 13 (59%) в IV ФК СН по классификации. В послеоперационном периоде у большинства пациентов (68%) отмечается переход в более благоприятный функциональный класс сердечной недостаточности классификации NYHA. После операции улучшение в функциональном классе сердечной недостаточности наблюдается как у пациентов с ИБС, так и у больных с ДКМП. Средний ФК исходно составил: в группе ИБС – $3,4 \pm 0,5$, в группе ДКМП – $3,75 \pm 0,45$; после операции достоверно уменьшился и составил при обследовании в отдаленном периоде (к 1 году): в группе ИБС – $2,0 \pm 0,6$, в группе ДКМП – $2,0 \pm 0,4$. У больных ИБС достоверно снизился функциональный класс стенокардии по классификации CCS. Толерантность к нагрузке возросла у пациентов обеих групп, что было подтверждено при проведении тредмил-теста. При проведении ЭхоКГ также было выявлено достоверное улучшение сократимости миокарда ЛЖ в группах пациентов, страдающих ИБС и ДКМП.

При оценке индекса региональной сократимости было получено достоверное уменьшение значения WMSI в группе ИБС, в группе ДКМП небольшая положительная динамика оказалась недостоверной. Данные отличия в динамике сократимости между больными ИБС и ДКМП предположительно связаны с более благоприятным исходным состоянием миокарда ЛЖ у больных ИБС.

При сравнении до- и послеоперационных объемных показателей ЛЖ выявлено достоверное уменьшение КДО и КСО ЛЖ в обеих группах. В группе пациентов с ИБС до операции КДО составил $262,0 \pm 53,2$ (122–335) мл/м², КСО – $173 \pm 69,5$ (55–279) мл/м², а к 1 году после операции $207,4 \pm 40,5$ (97–253) мл/м² и $114,2 \pm 43,5$ (47–222) мл/м² соответственно.

У больных ДКМП КДО и КСО в различные сроки после вмешательства так же достоверно уменьшались по сравнению с исходными значениями: КДО $296,3 \pm 56,2$ (186–394) мл/м² против $222,7 \pm 49,1$ (187–257) мл/м²; КСО $214,8 \pm 51,4$ (116–289) мл/м² против $143,7 \pm 38,2$ (99–170) мл/м². Тенденция к уменьшению объемных показателей ЛЖ у больных с ДКМП менее выражена, что объясняется более тяжелым исходным состоянием миокарда в данной группе больных.

Анализ посегментарной сократимости по данным ЭхоКГ показал, что и у больных ИБС, и ДКМП отмечается положительная динамика к 1 году после клеточной кардиомиопластики (ККМП). У больных ИБС количество нормокинетических сегментов увеличилось на 14%. У пациентов с ДКМП через 1 год после процедуры ККМП отмечали уменьшение количества сегментов со значительным гипокинезом, акинетических сегментов не наблюдали, нормокинетические сегменты составили 6%.

При оценке перфузии миокарда ЛЖ с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) с ^{99m}Tc-тетрофосмином все сегменты в обеих группах пациентов были подразделены на 2 подгруппы: леченные (согласно зонам миокарда, в которые были введены аутологичные клетки-предшественники CD133⁺), и нелеченные. Сначала были проанализированы средние показатели накопления РФП (%) в каждой группе без разделения их по степени исходного нарушения перфузии. При этом в леченных сегментах у пациентов ИБС отмечалось достоверное увеличение накопления РФП (прирост от 10% и более) на нагрузке в поздние сроки после операции (к 1 году). В покое не наблюдалось достоверных изменений перфузии миокарда в этих зонах. У пациентов ДКМП на нагрузке также наблюдался достоверный прирост перфузии в отдаленном постоперационном периоде (прирост накопления РФП в сроки к 1 году). Изменений перфузии в покое не отмечали. Результаты исследования нелеченных сегментов показали, что для них характерно отсутствие каких-либо существенных изменений в динамике.

Чтобы оценить эффективность методики, дополнительно была проанализирована динамика количества нормально перфузируемых и с различной степенью нарушения перфузии сегментов до операции и через 1 год после вмешательства. Оказалось, что количество нормально перфузируемых сегментов увеличилось только в группе леченных сегментов у больных ИБС и ДКМП, при этом количество сегментов с различной степенью нарушения перфузии уменьшилось. В нелеченных сегментах, аналогичных изменений выявлено не было. При анализе показателей систолического утолщения в леченных сегментах исходно и в различные сроки после операции также отмечается достоверно положительная динамика. В нелеченных сегментах не было обнаружено достоверного изменения показателя систолического утолщения.

На рисунках 3 и 4 представлена динамика величины дефектов перфузии (ДП) на нагрузке и в покое у больных ДКМП и ИБС. Как видно из

рисунков, у пациентов обеих групп отмечается существенное уменьшение площади ДП (%) как на нагрузке, так и в покое к 1 году после операции в сравнении с дооперационными показателями. Помимо этого, отмечается незначительное уменьшение разницы площади дефекта перфузии на нагрузке и в покое.

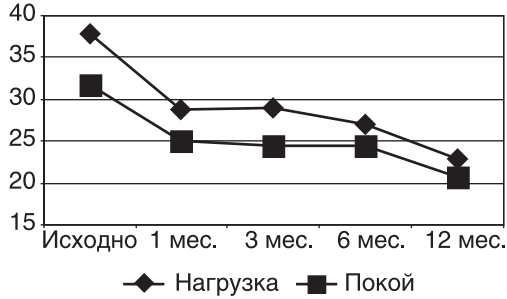


Рис. 3. Динамика величины дефектов перфузии (ДП) исходно и в различные сроки после операции на нагрузке и в покое у больных ИБС

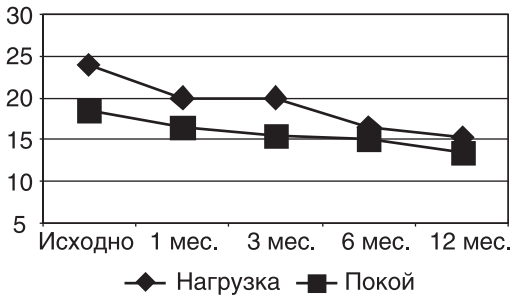


Рис. 4. Динамика величины дефектов перфузии (ДП) исходно и в различные сроки после операции на нагрузке и в покое у больных ДКМП

Для оценки клинической эффективности клеточной кардиомиопластики в зависимости от способа введения аутологичных клеток-предшественников CD133+ проводилась оценка перфузии миокарда в динамике после операции у 6 больных с изолированным интракоронарным способом введения CD133+ (группа 1) и у 4 пациентов при изолированном интрамиокардиальном транскатетерном способе доставки клеточного материала (группа 2). Всего у данной группы пациентов было проанализировано 200 миокардиальных сегментов, из которых леченных – 104, нелеченных – 96. Для анализа эффективности способа введения клеток использовали интегральный показатель прироста накопления РФП к году после операции относительно исходного уровня. В леченных сегментах при интрамиокардиальном способе введения накопление РФП достоверно увеличивалось на нагрузке в сегментах с умеренным, значительным и выраженным снижением перфузии в среднем на 20% относительно исходного уровня. В сегментах с вы-

раженным нарушением перфузии накопление РФП хотя достоверно и увеличивалось, но ни в одном сегменте в послеоперационных исследованиях уровень накопления РФП не превышал 50% от максимального. В сегментах с исходно нормальной перфузией достоверных изменений выявлено не было. При интракоронарном способе введения накопление РФП также увеличивалось, но ни в одном сегменте не было выявлено достоверной разницы изменения перфузии ни на нагрузке, ни в покое. Прирост накопления РФП не превышал в среднем 10%. В нелеченных сегментах достоверной и выраженной разницы в показателях накопления РФП, в исходно нормально перфузируемых сегментах и в сегментах с различными типами нарушения перфузии до операции и в зависимости от способа введения CD133⁺ выявлено не было ни на нагрузке, ни в покое. При анализе показателей систолического утолщения в леченных сегментах исходно и в различные сроки после операции также отмечается более выраженная достоверно положительная динамика при интрамиокардиальном способе введения клеток. В нелеченных сегментах не было обнаружено достоверного изменения показателя систолического утолщения. У пациентов обеих групп отмечается существенное уменьшение площади ДП (%) как на нагрузке, так и в покое к 1 году после операции в сравнении с дооперационным. Однако при интрамиокардиальном введении клеток эта тенденция выражена более явно.

Качество жизни пациентов с ИБС и ДКМП после лечения с помощью аутологичных клеток-предшественников CD133⁺ достоверно улучшилось по всем шкалам опросника SF – 36. Достоверное улучшение качества жизни наблюдается уже спустя 3 месяца после вмешательства и постепенно возрастает к 1 году в сравнении с исходными значениями.

Результаты терапевтического применения аутологичных клеток-предшественников CD133⁺ у пациентов с ревматическим анамнезом и хронической сердечной недостаточностью.

При сравнении результатов ЭхоКГ исследования пациентов до и после введения клеток CD133⁺ было отмечено достоверно уменьшение размеров ЛЖ (КДО, КСО, КДР и КСР), что сопровождалось улучшением сократительной функции ЛЖ.

Результаты применения терапевтического ангиогенеза при ХИНК

При применении терапевтического ангиогенеза при ХИНК побочных эффектов после введения стимуляторов ангиогенеза отмечено не было. Уровень мочевины в сыворотке пациентов, получивших «Ангиостимулин», в динамике значимо не отклонялся от нормальных показателей (15–50 мг/%) в течение всего периода наблюдения.

Через 1 месяц после введения стимулятора клиническое улучшение состояния нижней конечности отмечалось в 80% случаев. Заживление трофических язв через 1,5–3 месяца наблюдалось в 3 из 6 случаев, положительная динамика со стороны долго не заживающих послеоперационных ран – так-

же в 3 случаях. Отмечалось уменьшение болевого синдрома у пациентов. При раздельном анализе эффект лечения через 1 месяц более выражен у пациентов 1-й группы ($p < 0,05$): клиническое улучшение появилось у 90% пациентов 1-й группы и у 73% больных 2-й группы. Если во 2-й группе клиническое улучшение ограничилось минимальным (+1 по Рутерфорду), то в 1-й в 40% случаев возникло умеренное улучшение (+2 по Рутерфорду). Через 3 месяца клинический эффект наступил у 100% пациентов в обеих группах. В 1-й группе умеренное улучшение отмечено у 78% пациентов, а во 2-й – у 57%; минимальное в 1-й группе – у 22% больных, во 2-й – у 43%.

К 6-му месяцу эффект сохраняется у всех пациентов 1-й группы и у 81% – 2-й группы. Положительная динамика в обеих группах в лучшем случае не превысила «+2» по Рутерфорду (умеренное улучшение), однако и ухудшения по причинам, связанным с исследованием, отмечено не было. Возврат состояния конечности к исходному установлен в 2 случаях во 2-й группе исследования (19%), что обусловлено атроэмболией из аорты.

В отдаленном периоде (больше 6 месяцев) обследовано 3 пациента. По причине стабильной положительной динамики со стороны нижних конечностей и отсутствия отрицательной со стороны других артериальных бассейнов им не проводилась дополнительная терапия. У двоих из них наступило клиническое выздоровление (полностью исчезли симптомы ишемии) через 9 месяцев после введения стимулятора ангиогенеза (клетки-предшественники); у одного – достигнутый к 6-му месяцу эффект (умеренное улучшение) сохраняется уже в течение 2 лет.

Средний прирост напряжения кислорода через 1 месяц в 1-й группе составил 7,5 мм рт. ст., во 2-й группе – 6,5 ($p < 0,05$ в обеих группах), через 3 месяца в 1-й группе – 14,0 мм рт. ст., во 2-й – 10,4 ($p < 0,05$ в обеих группах по сравнению с исходными данными и данными через 1 месяц), через 6 месяцев в 1-й группе – 16,0 мм рт. ст., во 2-й – 13,0 ($p < 0,05$ в обеих группах по сравнению с исходными данными и данными через 1 месяц и через 3 месяца для 1-й группы). Средний прирост напряжения кислорода в 1-й группе выше на всех этапах наблюдения, но статистическая достоверность получена лишь через 3 месяца ($p < 0,05$).

При анализе результатов транскутанного напряжения кислорода в 1-й группе в зависимости от способа введения стимулятора наблюдалось достоверное увеличение показателя $Tk PO_2$. При внутриаrтериальном введении клеток-предшественников в течение 3 месяцев, при внутримышечном – в течение всего периода наблюдения. Средний прирост PO_2 при внутримышечном введении клеток-предшественников выше на всех этапах наблюдения, но статистической достоверности различий между группами с разными способами введения стимулятора не получено ($p > 0,05$).

Для оценки толерантности к физической нагрузке у пациентов с перемежающейся хромотой проводился тредмил-тест. ДББХ и МДХ достоверно увеличиваются в течение всего периода наблюдения: в меньшей степени за первый месяц, в большей – за последующие месяцы. Через 1 месяц ДББХ

увеличивается на 0,58 минуты, через 3 месяца еще на 1,88 минуты, через 6 месяцев – на 3,17 минуты (суммарно за 6 месяцев на 5,63 минуты). МДХ к 6 месяцу возросла на 5,82 минуты. В 2 случаях через 3 месяца и в 4 (44%) – через 6 месяцев тредмил-тест прекращен через 12 минут (512 метров) по причине его полного выполнения (переход во 2А степень ХИНК).

Через 3 месяца после введения стимулятора ангиогенеза появление новых видимых коллатеральных сосудов отмечено у всех ангиографически обследованных пациентов. В среднем увеличение коллатеральной сети в 1-й группе составило $+2,28 \pm 0,75$ ($p > 0,05$, $n = 7$), во 2-й – $+2,0 \pm 0,45$ ($p < 0,01$, $n = 11$). Установлена прямая достоверная связь между динамикой увеличения коллатеральной сети и изменением клинического статуса конечности (по Рутерфорду), транскутаным напряжением кислорода, средним показателем перфузии. Возраст и исходная тяжесть ишемии конечности достоверно не влияли на увеличение количества коллатеральных сосудов по данным ангиографии.

Клиническое улучшение состояния нижних конечностей оказало существенное влияние на качество жизни пациентов. Физическая активность (ФА), показатель влияния болезни на выполнение физических нагрузок, достоверно ниже принятого за норму показателя качества жизни здоровой популяции г. Санкт-Петербурга исходно в обеих группах ($p < 0,05$). В динамике наблюдается улучшение данного параметра. В 1-й группе значимо ФА возрастает к 3 месяцу, приближаясь к нормальному значению через 6 месяцев. Во 2-й группе лишь через 6 месяцев установлено значимое увеличение ФА, не достигшей нормального значения ($p < 0,05$), что, вероятно, обусловлено преклонным возрастом пациентов и большим количеством сопутствующих заболеваний.

Интенсивность боли и ее влияние на повседневную деятельность достоверно снижается, и, соответственно, увеличивается показатель болевого фактора (БФ) через 3 месяца в обеих группах исследования. Значимого отличия между показателями БФ на различных этапах наблюдения у пациентов 1-й группы и нормальным значением установлено не было. Во 2-й группе значение БФ существенно ниже нормального уровня в течение первых 3 месяцев и приближается к нормальному значению к 6-му месяцу.

Общее здоровье (ОЗ) на момент заполнения опросника и перспектив лечения достоверно отличалось на начальном этапе в обеих группах от нормального значения. В последующем данный показатель приближается к нормальному даже во 2-й группе, где отсутствует значимый прирост ОЗ, что подтверждает наличие положительной динамики в лечении.

В отличие от показателя ОЗ жизнеспособность (ЖС) сравнима с нормальным значением, а через 6 месяцев в 1-й группе – превышает его ($p < 0,05$), что объясняется значительным улучшением эмоционального настроения пациентов на фоне улучшения физического состояния. То же можно сказать и о психическом здоровье (ПЗ) пациентов. При исходно значительно сниженном ПЗ у пациентов 1-й группы по сравнению с нормальным

значением ($p < 0,05$), уже в течении первого месяца эмоциональная картина меняется – ПЗ стремится к нормальному. Показатель РПП (влияния эмоционального состояния на жизнедеятельность) достоверно увеличивается у пациентов 2-й группы через 1 месяц, у пациентов 1-й группы – через 3 месяца. Социальная активность ожидаемо возрастает, достоверно не отличаясь от нормального значения. Часть пациентов (6 человек – 24 %) изменили планы на будущее: трое снова начали, а трое продолжили работать после длительного перерыва.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Значительное число больных ИБС (от 5 до 21% по разным оценкам) имеют противопоказания к реваскуляризации хирургическими и интервенционными методами, либо у них таким способом не удается достичь полной реваскуляризации (de Feyter P., 1992; Mukherjee D. и соавт., 1999) и снять симптоматику стенокардии. В такой ситуации целесообразно рассматривать возможность применения терапевтического ангиогенеза, позволяющего обеспечить полноценный кровоток путем стимуляции формирования новых сосудов (Laham R. и соавт., 2000). Аналогичным образом заметное количество больных хронической ишемией нижних конечностей (до 5%) страдают от остаточных симптомов после хирургии и традиционной терапии (Baumgartner I. и соавт., 2000). Несомненно, в этой группе больных терапевтический ангиогенез выглядит перспективным дополнением хирургического лечения. Более того, тяжелая сердечная недостаточность – прогрессирующий синдром, характеризующийся необратимой утратой миоцитов – теоретически может быть компенсирована за счет стимуляции регенерации миоцитов, т. е. миогенеза.

Первый этап нашего исследования был посвящен созданию генетической конструкции для терапевтической стимуляции ангиогенеза у нуждающихся в этом больных. В качестве перспективных генов-кандидатов были выбраны VEGF₁₆₅ и bFGF. Полученные на основе рВК-СМV генетические конструкции эффективно воспроизводятся в культуре *E. coli* и с высокой степенью чистоты могут быть выделены из клеточного лизата на колонках фирмы Qiagen. Созданная таким образом конструкция позволяет относительно легко нарабатывать значительные (15–50 мг за один цикл выделения) количества плазмидной ДНК, пригодной для введения больным. Мы остановились на плазмидной конструкции в качестве стимулятора ангиогенеза, основываясь, во-первых, на относительной дешевизне и простоте получения значительного количества препарата, во-вторых, на данных об эффективной экспрессии плазмидной ДНК в мышечной ткани (Tripathy и соавт., 1996), и в-третьих, из-за опасения осложнений, связанных с применением у больных вирусного вектора (Marshall и соавт., 2003). Последующее исследование токсичности и переносимости препаратов подтвердило безопасность их применения в эксперименте на животных, и в перспек-

тиве – для лечения больных. Первично эффективность препарата VEGF₁₆₅ была проверена в стандартном тесте с матригелем. Продемонстрирована экспрессия кодируемого плазмидой белка VEGF₁₆₅ в человеческих клетках НЕК 293, а имплантация крысе помещенных в матригель трансфицированных плазмидой клеток приводила к эффективной стимуляции процессов ангиогенеза в коже.

Следующим этапом нашего исследования стала проверка эффективности сконструированных препаратов на модели хронической ишемии скелетной мышцы задней конечности крысы. Сравнительное изучение эффективности двух генетических конструкций показало, что через 30 дней после введения в зону ишемии даже минимальной из использованных нами в эксперименте доз (250 мкг/животное) VEGF₁₆₅ отмечается достоверное по сравнению с контролем увеличение плотности капиллярного русла, в то время как введение даже максимальной в рамках данного исследования дозы bFGF (750 мкг/животное) не оказывает существенного влияния на кровоток в ишемизированной конечности. Ангиогенная эффективность белковых препаратов FGF была продемонстрирована в ряде экспериментов на животных, как при локальном, так и при интракоронарном способах введения (Lazarous D. и соавт., 2000; Rajanayagam M. и соавт., 2000). В то же время результаты клинических испытаний белковых и генетических препаратов FGF далеко не так однозначны (Ruel M. и соавт., 2002; Simons M. и соавт., 2002). На данном этапе наших исследований мы решили сосредоточиться на клинических испытаниях содержащей VEGF₁₆₅ плазмиды (препарат «Ангиостимулин»).

Поскольку ишемия органа приводит в том числе к истощению регенеративных возможностей за счет уменьшения числа резидентных стволовых клеток, введения ангиогенных факторов может оказаться недостаточно для полноценного восстановления функции органа. В этой связи привлекательной альтернативой выглядит использование стволовых плюрипотентных клеток. Эндотелиальные клетки-предшественники (ЭКП) представляют собой гетерогенную группу клеток, характеризующую экспрессией ряда поверхностных маркеров, таких как CD34, CD133 и VEGFR-2 (KDR или Flk-1), способностью накапливать DiI-Ac-LDL и связывать считающиеся специфичными для эндотелия лектины, такие как *Ulex europaeus*. Маркер стволовых клеток CD34 в меньшем количестве выявляется также на зрелых клетках эндотелия, и поиск более специфичных маркеров привел к обнаружению CD133, с высокой плотностью экспрессируемого на незрелых стволовых клетках, и утрачиваемого в процессе дифференцировки (Handgretinger R. и соавт., 2003). Предполагается, что в популяции ЭПК наличествуют две субпопуляции: более примитивная CD133⁺/CD34⁻/VEGFR-2⁻ и более зрелая CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺. Нашей задачей было более подробно исследовать субпопуляционный состав ЭПК, а также фенотипически и функционально охарактеризовать эти клетки в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Использованный в нашей работе способ выделения позволяет с высокой эффективностью получать очищенный препарат аутологичных стволовых клеток пациента. На выходе с колонки мы получали 1–3 млн стволовых клеток.

Анализ поверхностного фенотипа выделяемых клеток позволил продемонстрировать наличие в костном мозге обследованных пациентов CD133⁺/CD34⁻ субпопуляции стволовых клеток, которые в дальнейшем дифференцируются в субпопуляцию, экспрессирующую CD133⁺/CD34⁺, и в ходе последующей дифференцировки в соответствующих условиях *in vitro* приобретают фенотип зрелых эндотелиальных клеток. В то же время эта субпопуляция CD133⁺/CD34⁻ ЭКП функционально оказалась более активной, чем теоретически более зрелая субпопуляция ЭКП CD133⁺/CD34⁺. В условиях *in vitro* эта субпопуляция клеток-предшественников после обработки SDF-1 более активно прилипает к обработанной фибронектином поверхности и более эффективно дифференцируется в зрелые эндотелиальные клетки по сравнению с субпопуляцией CD133⁺/CD34⁺-клеток.

Со времени первого сообщения в научной литературе (Asahara T. и соавт., 1997) было принято считать, что фенотип ЭКП определяется экспрессией на поверхности маркеров CD34 и VEGFR-2. В дальнейшем, обнаружение маркера стволовых клеток CD133 (Peichev M. et al., 2002), экспрессия которого в отличие от CD34 утрачивается по мере дифференцировки ЭКП в клетки эндотелия, позволило подразделить популяцию ЭКП на субпопуляцию CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺, предположительно состоящую из более ранних клеток-предшественников, и субпопуляцию CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁻-клеток, предположительно далее продвинувшуюся по пути дифференцировки эндотелиального ростка (Peichev M. с соавт.). Полученные нами данные указывают на вероятность существования третьей, потенциально более примитивной субпопуляции ЭКП, определяемой экспрессией на поверхности CD133 и VEGFR-2 при отсутствии экспрессии CD34. Этот вывод подкрепляется результатами, полученными Guo Y. и соавт. В своей работе они показали, что в процессе культивирования *in vitro* CD34-отрицательные стволовые клетки, выделенные из костного мозга мышей, приобретают способность экспрессировать CD34, т. е. CD34⁻ стволовые клетки могут быть предшественниками CD34⁺ клеток. Аналогичным образом в нашем исследовании CD133⁺/CD34⁻ ЭКП из костного мозга человека дифференцировались в CD133⁺/CD34⁺ клетки при культивировании *in vitro* в условиях, способствующих дифференцировке в эндотелиальные клетки. Описанная нами субпопуляция CD133⁺/CD34⁻ ЭКП отличается от субпопуляции ЭКП, описанной Rehman и соавторами, поскольку последнюю характеризует высокий уровень экспрессии CD14 (95,7%) и низкий уровень экспрессии CD133 (0,16%) на поверхности клеток, в то время как исследованные нами CD133⁺/CD34⁻ не экспрессируют CD14. Kuci S. и соавторы (Hangretinger R. и соавт., 2003) показали, что получаемая при культивировании *in vitro* мононуклеаров человеческой крови в присут-

твии Flt3/Flk2 лиганда и интерлейкина-6 субпопуляция стволовых CD133⁺-клеток не экспрессирует CD34 и обладает способностью репопулировать костный мозг мышей с двойной мутацией: тяжелым комбинированным иммунодефицитом и диабетом I типа. После трансплантации эти клетки приживались на значительно более длительное время, чем свежесыведенные CD34⁺-клетки. Кроме того, на ограниченном контингенте больных (6 пациентов) было показано, что трансплантация CD133⁺-клеток ведет к улучшению функционирования миокарда в постинфарктный период (Stamm С. et al., 2003). Наблюдение за пересаженными бестимусным мышам CD133⁺ клетками-предшественниками из пуповинной крови человека показало, что они участвуют в формировании капиллярной сети в ишемизированной задней конечности, стимулируют процессы неоваскуляризации и способствуют восстановлению ишемизированных тканей задней конечности. Тем не менее конкретные механизмы, опосредующие миграцию стволовых клеток в ишемизированные ткани, а также регуляция и механизм регенеративного действия CD133⁺ стволовых клеток требуют дальнейшего, более углубленного экспериментального исследования.

Хотелось бы подчеркнуть, что, по нашему мнению, субпопуляция CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ ЭКП костномозгового происхождения играет ключевую роль в регенерации эндотелия и восстановлении поврежденных тканей. Учитывая их высокую регенеративную способность, представляется рациональной трансплантация таких клеток в терапевтических целях. По результатам наших экспериментов мы предполагаем, что субпопуляция CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток содержит предшественники CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток и обладает более высоким по сравнению с последними потенциалом восстановления сосудистого русла. Полученные нами данные расширяют современные представления о гетерогенности популяций ЭКП и могут иметь значение для лечения ишемической болезни сердца и патологии магистральных сосудов.

При ИБС в основе всех патологических процессов лежит, как правило, постепенное прогрессирование артериальной недостаточности с нарушением периферической макрогемодинамики в результате развития стенотических и облитерирующих процессов в артериях. Прежде всего это касается микроциркуляторных расстройств, которые развиваются вторично из-за низкого перфузионного давления (Савельев В.С. и соавт., 1997). Отмечаются поражение капилляров, питающих мышечные волокна конечностей, дегенеративные изменения эндотелия в них и агрегация форменных элементов крови. Поэтому клиника тяжелой ишемии определяется как микроциркуляторными нарушениями, так и изменениями гемореологическими. Несостоятельность капиллярного кровообращения является одним из ведущих факторов в развитии грубых трофических нарушений у пациентов с декомпенсацией капиллярного кровотока (Казаков Ю.И. и соавт., 1997). Следует отметить, что даже при идеально выполненной операции микроциркуляция в конечности не нормализуется в течение 2–3 лет после опе-

рации и ухудшается из-за продолжающегося прогрессирования основного патологического процесса. Поэтому все пациенты после операции нуждаются в продолжении консервативной терапии, независимо от исхода хирургического лечения (в том числе по причине сопутствующего поражения других артериальных бассейнов). Больным же с неоперабельным поражением дистального артериального русла нижних конечностей, слабым развитием коллатеральных путей кровотока и, соответственно, минимальным клиническим улучшением и при отсутствии динамики после операции (по результатам нашего исследования всего в 15% случаев) помимо принятого объема консервативной терапии требуется более интенсивное воздействие на коллатеральное русло глубокой бедренной и подколенной артерий.

При клиническом применении генных технологий (плазмидной конструкции VEGF₁₆₅) для лечения хронической критической ишемии нижних конечностей (терапевтическая доза препарата составляет 1000 мкг (Isner J. и соавт., 1999) различной этиологии (атеросклероз и облитерирующий тромбангиит), по данным литературы, уже через 1 месяц после введения препарата получен статистически достоверный положительный результат. Максимальный терапевтический эффект отмечен к третьему месяцу. Сходная динамика установлена и нами. У большей части пациентов (до 71%) полностью прекратились или уменьшились боли покоя (до 86%, по данным литературы), у 4 из 5 пациентов зажили или значительно уменьшились трофические язвы (57–67%, по данным литературы), на 10,4–13 мм рт. ст. увеличилось транскутанное напряжение кислорода, показатели перфузии конечности по данным лазерной доплеровской флоуметрии, в среднем на 0,1 – индекс лодыжечного давления (по данным литературы, на 0,15–0,19), на 1,88 минуты – длительность безболевой ходьбы (на 1,3 минуты, по данным литературы); возросло количество новообразовавшихся видимых коллатеральных сосудов на уровне колена, голени и стопы по данным ангиографического исследования – средний прирост составил $+2,0 \pm 0,45$ (по разным данным литературы, в среднем $+1,3 \pm 0,04$). В той или иной степени к 3-му месяцу клиническое улучшение отмечается у всех пациентов (90% пациентов, по данным литературы), при этом умеренное улучшение по шкале Рутерфорда – в 57 % случаев (50%, по данным литературы (Baumgartner I. и соавт., 1998).

ВЫВОДЫ

Активизация восстановительных процессов в ишемизированных тканях достигается путем индукции в них процессов ангио/миогенеза, которые могут быть усилены применением ангиогенезстимулирующих факторов.

Созданная плазмидная конструкция ангиогенного препарата – ангиостимулин – биосовместима, нетоксична, позволяет эффективно экспрессировать ген VEGF₁₆₅ и может быть использована для индукции репаративного ангиогенеза в ишемизированных тканях.

Высокоочищенная популяция CD133⁺ стволовых клеток костного мозга состоит из двух субпопуляций: менее зрелых CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁻-клеток и более дифференцированных CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺-клеток, причем субпопуляция CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ клеток обладает более высоким потенциалом дифференцировки в направлении неоангиогенеза.

Клетки CD133⁺ обладают более выраженной ангиогенной активностью по сравнению с CD34⁺, и поэтому именно эти клетки должны использоваться для стимуляции ангиогенеза при лечении ишемической болезни сердца и хронической ишемии нижних конечностей.

Препарат «Ангиостимулин» улучшает перфузию миокарда в наиболее пораженных ишемией сегментах, и этот эффект сохраняется не менее года.

При сравнительной оценке эффективности способов введения аутологичных костномозговых клеток-предшественников CD133⁺ для стимуляции регенеративных процессов в миокарде показано, что при интрамиокардиальном введении отмечается достоверное улучшение перфузии в леченных сегментах с исходно умеренным и значительным снижением перфузии. При интракоронарном способе введения достоверных изменений показателей перфузии получено не было.

Как при артериальном, так и при внутримышечном введении аутологичных клеток-предшественников CD133⁺ или гена VEGF₁₆₅ зарегистрировано образование новой сосудистой сети при лечении ХИНК.

После аутотрансплантации клеток-предшественников CD133⁺ достоверно улучшалось качество жизни больных ИБС и ХИНК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исходя из результатов проведенных исследований, представляется целесообразным применение внутримышечного введения генного препарата VEGF₁₆₅ (ангиостимулина) при ишемии миокарда и хронической ишемии нижних конечностей (с учетом критериев включения и исключения пациентов).

Использование аутологичных костномозговых клеток-предшественников CD133⁺ можно рекомендовать для лечения сердечной недостаточности в сочетании с хирургическими методами, при этом наиболее эффективным является метод изолированного интрамиокардиального введения.

При лечении ХИНК можно рекомендовать как внутриаартериальное, так и внутримышечное введение аутологичных клеток-предшественников CD133⁺ или ангиостимулина (гена VEGF₁₆₅).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бокерия Л.А., Еремеева М.В. Современное состояние и перспективы использования ангиогенеза в лечении ишемической болезни сердца // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2000. – № 2. – С. 57–61.

2. **Еремеева М. В., Голухова Е.З.** Факторы ангиогенеза при ишемии. Стимуляция неоангиогенеза в миокарде // Лекции по кардиологии, в 3-х томах / Под ред. Бокерия Л.А. и Голуховой Е.З., изд. НЦССХ им. А.Н. Бакулева. – М., 2001. – С. 161–170.
3. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М. В., Киселев С.Л.** Стимуляция неоангиогенеза при ишемии миокарда. Первый этап доклинических испытаний плазмидной ДНК VEGF. Пятая ежегодная сессия Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева // Бюллетень НЦССХ им Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2001. – № 3. – С. 136.
4. **Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Э.С. Полякова.** Разработка клинико-диагностических критериев отбора больных ИБС для применения терапевтического ангиогенеза // Седьмой всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2001. – № 3. – С. 231.
5. **Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Полякова Э.С., Серов Р.А.** Про- и антиангиогенные факторы при ишемической болезни сердца в зависимости от степени выраженности атеросклероза // VI ежегодная сессия НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2002. – № 3. – С. 161.
6. **Еремеева М., Golukhova E., Alshibaya M., Berishvili I., Bockeria L.** Angiogenic factors production stimulated by different methods of myocardial revascularisation. 8-th International Local Drug Delivery meeting and cardiovascular course on Radiation and molecular strategies, Geneva, Switzerland. – 2002. – P. 18.
7. **Еремеева М.В., Golukhova E.Z., Bockeria L.A.** Endogenous angiogenesis activation in ischemic heart disease patients: different methods of myocardial revascularization of strategies for therapeutic angiogenesis. In book «Angiogenesis bench to bedside», 2003, Medical and Engineering Publishers Inc. – P. 275–292.
8. **Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Полякова Э.С., Какучая Т.Т., Лукашкин М.А.** Прогностическая значимость определения уровня pro-ANP и pro-BNP для оценки степени сердечной недостаточности и эффективности терапевтического ангиогенеза // VII ежегодная сессия НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2003. – № 3. – С. 161.
9. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Асланиди И.П., Еремеева М.В., Мерзляков В.Ю., Беришвили И.И., Клюева А.Ф., Какучая Т.Т., Полякова Э.С., Лукашкин М.А.** Экспериментальное и клиническое исследование препаратов на основе генов ангиогенных факторов (VEGF и bFGF человека) при ишемии // VII ежегодная сессия НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2003. – С. 161.
10. **Еремеева М., Bockeria L., Golukhova E., Kiselev S.L., Polyakova E., Lukashkin M.A.** Different methods of revascularization combined with intramyocardial VEGF gene transfer administration in IHD patients. International Journal of Medical Implants and Devices. Medical and Engineering Publishers, Inc, USA. – 2003. – Vol. 1, No 1. – P. 100–155.

11. **Eremeeva M., Bockeria L., Golukhova E., Kiselev S.L., Polyakova E., Lukashkin M.A.** Intramyocardial VEGF gene administration in IHD patients during different methods of surgical revascularisation. Angiogenesis: Novel basic science insights and human therapy. Keystone symposia 2004 abstract book. – P. 12.
12. **Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Полякова Э.С.** Диагностика сердечной недостаточности с помощью определения концентраций предшественников натрийуретических пептидов в плазме крови больных ИБС // Девятый всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – М., 2003, ноябрь. – С. 326.
13. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Асланиди И.П., Еремеева М.В., Мерзляков В.Ю., Бершвили И.И., Ключева А.Ф., Какучая Т.Т., Полякова Э.С., Лукашкин М.А.** Первые результаты клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена VEGF₁₆₅ человека // Девятый всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов. Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2003. – № 11. – С. 326.
14. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В., Полякова Э.С.** Использование предшественников натрийуретических пептидов в диагностике сердечной недостаточности ишемической этиологии до и после операции аортокоронарного шунтирования // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». – 2004. – Т. 5. – № 3. – С. 156–161.
15. **Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З., Еремеева М.В., Гнучев Н.В., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Ким А.И., Асланиди И.П., Вахромеева М.Н., Какучая Т.Т., Полякова Э.С., Лукашкин М.А., Волковская И.В., Демидова О.А.** Возможности использования генных и клеточных технологий для лечения сердечно-сосудистых заболеваний // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». – 2004. – № 3. – С. 19–38.
16. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Джитава Т.Г., Чеботарева, Еремеева М.В.** Некоторые особенности клинического течения, диагностики и ревазуляризации миокарда у больных ишемической болезнью сердца, страдающих сахарным диабетом // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». – 2004. – № 3. – С. 89–96.
17. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др.** Первый опыт клинического применения терапевтического ангиогенеза с использованием гена VEGF₁₆₅ человека // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания. Креативная кардиология. Новые технологии в диагностике и лечении заболеваний сердца». – 2004. – № 4. – С. 134–142.
18. **Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др.** Новые подходы к лечению ишемической болезни сердца: терапевтический ангиогенез в сочетании с хирургической ревазуляризацией миокарда // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 76. – № 6. – С. 25–30.
19. **Бокерия Л.А., Георгиев Г.П., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др.** Генные и клеточные технологии при лечении сердечно-сосудистых заболеваний (опыт НЦ

- ССХ им. А.Н. Бакулева). Сердечно-сосудистые заболевания: проблемы трансплантологии. – 2004. – Т. 5, № 7. – С. 70–91.
20. *Bockeria L.A., Golukhova E.Z., Ereemeeva M.V., I.I. Berishvili.* Gene and cell therapy: alternative approach for myocardial revascularization. Proceedings of the 6th International Congress on Coronary Artery Disease 2005, Istanbul, Turkey, 29 oct.– 1 nov. – 2005. – P. 383–386.
 21. *Бокерия Л.А., Глянцев С.П., Серов Р.А., Еремеева М.В. и др.* От открытия клетки к ее лечению (к 165-летию учения о клетке). Ч. 1. Клиническая физиология кровообращения. – 2005. – № 1. – С. 14–23.
 22. *Бокерия Л.А., Глянцев С.П., Серов Р.А., Еремеева М.В. и др.* От открытия клетки к ее лечению. Ч. 2. Клиническая физиология кровообращения. – 2005. – № 2. – С. 19–29.
 23. *Бокерия Л.А., Глянцев С.П., Серов Р.А., Еремеева М.В. и др.* От открытия клетки к ее лечению. Ч. 3. Клиническая физиология кровообращения. – 2005. – № 3. – С. 5–12.
 24. *Бокерия Л.А., Муратов Р.М., Беридзе И.З., Асланиди И.П., Никитина Т.Г., Еремеева М.В., Волковская И.В.* Новый подход к хирургическому лечению клапанной и дилатационной кардиомиопатии // Сердечно-сосудистые заболевания: клапанная патология сердца. – 2005. – Т. 6, № 6. – С. 9–13.
 25. *Ereemeeva M., Golukhova E., Bockeria L., Volkovskaya I., Chigogidze N. et al.* Cell therapy by mesenchymal stem cells (CD133+) in advanced coronary artery disease and dilative cardiomyopathy: clinical experience // The J. of cardiovascular surgery. – June 2005. – Vol. 46, suppl. 1. – № 3. – P. 120. 15-th World Congress WSCTS, Vilnius, June 19–23 2005.
 26. *Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Еремеева М.В. и др.* Первые результаты терапевтического ангиогенеза у пациентов с ишемической болезнью сердца с использованием гена VEGF165 человека. Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2005. – № 3. – С. 123–131.
 27. *Bockeria L., Golukhova E., Ereemeeva M. et al.* Experimental rationale and the first experience of therapeutic angiogenesis using VEGF165 gene in patients with ischemic heart disease // The J. of cardiovascular surgery. – June 2005. – Vol. 46, suppl. 1. – № 3. – P. 47. 15-th World Congress WSCTS, Vilnius, June 19–23 2005.
 28. *Ereemeeva M.V., Golukhova E.Z., Volkovskaya I.V., Chigogidze N.A., Aslanidi I.P., Vachromeeva M.N., Svobodov A.A., Bockeria L.A.* Stem cells (CD133+) therapy in advanced coronary artery disease and dilative cardiomyopathy: clinical experience. 12-th International Local Drug Delivery meeting and cardiovascular course on Revascularization & molecular strategies, feb. 2–4. – 2006. – P. 102.
 29. *Бокерия Л.А., Спиридонов А.А., Еремеева М.В., Аракелян В.С., Демидова О.А.* Первый опыт комбинированного лечения хронической ишемии нижних конечностей с использованием стимуляторов неоангиогенеза // Сердечно-сосудистые заболевания: ангиология и сосудистая хирургия. 2006. – Т. 7. – № 4. – С. 73–80.
 30. *Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В.* Опыт лечения хронической ишемии нижних конечностей с помощью генного препарата сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF₁₆₅ – ангиостимулина // Сер-

- дечно-сосудистые заболевания: ангиология и сосудистая хирургия. – 2006. – Т. 7. – № 1. – С. 74–81.
31. *Golukhova E.Z., Bockeria L.A., Ereemeeva M.V. et al.* Clinical application of mesenchymal stem cells (CD 133⁺) in patients with advanced coronary artery disease and dilative cardiomyopathy. *Europace suppl.*, Vol. 8, suppl. 1, June 2006, 15-th World Congress in Cardiac Electrophysiology and Cardiac Techniques, June 14–17, 2006, Nice, France.
 32. *Golukhova E.Z., Bockeria L.A., Ereemeeva M.V. et al.* First experience of therapeutic angiogenesis using VEGF₁₆₅ gene in patients with ischemic heart disease and its experimental rationale. *Europace supplements*, Vol. 8, suppl.1, June 2006, 15-th World Congress in Cardiac Electrophysiology and Cardiac Techniques, June 14–17, 2006, Nice, France.
 33. *Golukhova E.Z., Bockeria L.A., M.V. Ereemeeva et al.* VEGF165 gene in therapy the treatment of patients with ischemic heart disease. 16-th World Congress of cardiothoracic surgeons. 2006, Ottawa, Canada. – P. 82.
 34. *Golukhova E.Z., Bockeria L.A., Ereemeeva M.B. et al.* Mesenchymal stem cells (CD133⁺) in the treatment of patients with advanced coronary artery disease and dilative cardiomyopathy: results of the pilot study. 16-th World Congress of cardiothoracic surgeons, 2006, Ottawa, Canada. – P. 83.
 35. *Еремеева М.В., Голухова Е.З., Чигогидзе Н.А. и др.* Генная и клеточная терапия для стимуляции ангио/миогенеза при сердечно-сосудистых заболеваниях. Поиск наиболее безопасных, но эффективных подходов // Ежегодная сессия НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2006. – № 3. – С. 215.
 36. *Еремеева М.В., Голухова Е.З., Чигогидзе Н.А. и др.* Лечение сердечно-сосудистых заболеваний и терапевтический ангио/миогенез. Поиск наиболее безопасных, но эффективных подходов // Всероссийский XII съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2006. – № 5. – С. 266.
 37. *Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Голухова Е.З., Ким А.И. и др.* Клеточные и генные технологии в кардиохирургии. Поиск наиболее безопасных, но эффективных подходов // Всероссийская научно-практическая конференция и выставочная экспозиция «Высокие медицинские технологии», 25–26 сентября 2007 года. – С. 114.
 38. *Бокерия Л.А., Еремеева М.В., Серов Р.А., Чудиновских Ю.А.* Резидентные стволовые клетки миокарда: роль в клеточном гомеостазе миокарда и потенциально возможные направления их применения в лечении сердечной недостаточности // Всероссийский XIII съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2007. – № 6. – С. 297.
 39. *Бокерия Л.А., Голухова Е.З., Чигогидзе Н.А., Асланиди И.П., Еремеева М.В., Никитина Т.Г., Какучая Т.Т., Шурупова И.В., Волковская И.В., Свободов А.В.* Результаты клинических исследований с использованием клеточных технологий в лечении пациентов с застойной сердечной недостаточностью // Всероссийский XIII съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2007. – № 6. – С. 296.

40. Бокерия Л.А., Демидова О.А., **Еремеева М.В.**, Аракелян В.С. Использование стимуляторов ангиогенеза в лечении хронической ишемии нижних конечностей // Всероссийский XIII съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2007. – № 6. – С. 296.
41. Bockeria L., **Eremeeva M.**, Suchacheva T., Chudinovskikh J. Resident human cardiac stem cells: role in cardiac cellular homeostasis and in different heart diseases. Baltic Summer School 2008: Genetic and clinical aspects of arrhythmias. Abstract book.
42. Бокерия Л.А., **Еремеева М.В.**, Серов Р.А., Чудиновских Ю.А. Резидентные стволовые клетки миокарда: роль в клеточном гомеостазе миокарда и потенциально возможные направления их применения в лечении сердечной недостаточности // Всероссийский XIV съезд кардиохирургов. Бюллетень НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания». – 2008. – С. 290.
43. **Еремеева М.В.** Возможности применения стволовых клеток и клеток-предшественников для стимуляции ревазуляризации и регенерации органов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. XII, № 1. – С. 86.

Столяревич Екатерина Сергеевна

ХРОНИЧЕСКАЯ ДИСФУНКЦИЯ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ: МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА, ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ, ПОДХОДЫ К ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

14.03.02 Патологическая анатомия

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор	Томилина Наталья Аркадьевна
доктор медицинских наук, профессор	Ильинский Игорь Михайлович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Аллотрансплантация почки (АТП) к нашему времени стала рутинным методом радикального лечения терминальной хронической почечной недостаточности (тХПН). Однако прогресс клинической нефротрансплантологии относится, главным образом, к первым годам после операции, тогда как «потери» трансплантатов в отдаленном посттрансплантационном периоде все еще остаются весьма значительными. Если к концу первого года после операции число функционирующих трансплантатов достигает 90% и более, то к 10–15 годам оно составляет лишь около 50% и даже ниже [Scientific Registry of Transplant Recipients., 2007; Meier-Kriesche H.U., 2004; Opelz J.CTS, 2008].

Основными причинами «потерь» трансплантированной почки в отдаленные сроки после трансплантации являются смерть реципиента с функционирующим трансплантатом и прогрессирующая хроническая дисфункция трансплантата с исходом в тХПН, включающая в себя широкий спектр патологий, различающихся по своей природе.

Важнейшими из них признается нефросклероз вследствие хронического нефротоксического эффекта ингибиторов кальциневрина (циклоспорина или такролимуса) и/или отторжение – позднее острое, либо хроническое. Бесспорную роль играют также неспецифический тубуло-интерстициальный склероз и рецидив основного заболевания в трансплантате.

Заболевания пересаженной почки в большинстве случаев характеризуются латентным течением и практически полным сходством клинико-функциональных проявлений. Поэтому верификация повреждения трансплантата и выявление его доминирующего патогенетического механизма в настоящее время возможны только методами прижизненной морфологической диагностики.

Однако и морфологическая диагностика тоже не исчерпывает всех вопросов, в том числе при интерпретации изменений, характерных для таких важнейших патологий трансплантата, как острое отторжение и хроническая CNI-нефротоксичность.

Хотя в условиях современной иммуносупрессии частота острого отторжения, особенно раннего, значительно снизилась, значение поздних кризов, субклинического и хронического отторжения для отдаленной судьбы трансплантата остается высоким. Участие в этих процессах различных механизмов иммунного ответа определяет необходимость выделения различных форм острого и хронического отторжения, что, в свою очередь, требует дальнейшего изучения особенностей морфологической картины и данных иммунофлюоресценции для уточнения их диагностического и прогностического значения [Nickeleit V., Magil A.B., Hara S., Cizek M., Pefaur J.].

Если отторжение является важнейшей причиной формирования необратимой прогрессирующей дисфункции в первые годы после трансплантации, то по мере удлинения посттрансплантационного периода на первый план выступает нефротоксичность, индуцированная ингибиторами кальциневрина (CNI-нефротоксичность), частота которой, по данным протокольных биопсий, достигает 100% к 10 годам после АТП [Nankivell B.]. Поэтому проблема предупреждения, своевременного распознавания и медикаментозной коррекции CNI-нефротоксичности находится в настоящее время в центре внимания клинической нефротрансплантологии.

В типичных случаях CNI-нефротоксичность, характерным признаком которой является CNI-ассоциированная артериолопатия с сопутствующим склерозом интерстиция, развивается на фоне повышенной экспозиции ингибиторов кальциневрина [Суханов А.В., 2004; Nizze H., 1988; Naesens M., 2009]. В связи с этим весьма актуальна оптимизация мониторинга последней, поскольку хорошо известно, что уровень препарата в пробе крови, взя-

той накануне очередного приема (Co), наиболее часто используемый для лекарственного мониторинга, применительно к циклоспорину не является достаточно надежным показателем экспозиции препарата. В качестве альтернативы предлагались другие подходы к решению этого вопроса, однако и к настоящему времени вопрос об оптимальных фармакокинетических критериях для предупреждения и торможения дисфункции трансплантата в поздние сроки после операции остается открытым.

В отличие от CNI-ассоциированной артериолопатии дозозависимый характер другого морфологического варианта CNI-нефротоксичности – тромботической микроангиопатии – до настоящего времени не доказан. Предполагается, что в ее развитии участвует целый ряд дополнительных факторов, включая действие других иммуносупрессантов (таких как ОКТЗ или АТГ, сиролимус), бактериальных и вирусных инфекций и прочие [Ponticelli C., 2000; Pham P., 1999; Robson M., 2003, Saikali J., 2003].

В целом анализ современной литературы с несомненностью свидетельствует о том, что отдаленная судьба трансплантированной почки определяется прежде всего режимом иммуносупрессии. Поэтому интенсивные поиски, направленные на разработку новых комбинаций отдельных классов иммуносупрессантов, обеспечивающих профилактику острого и хронического отторжения трансплантата при минимизации побочных эффектов, и в первую очередь нефротоксического повреждения и инфекционных осложнений, продолжают и в настоящее время [Wavamunno M.D.]

Весьма перспективным в этом отношении является изучение возможностей модуляции иммуносупрессивной терапии с целью предупреждения и лечения поздней дисфункции трансплантата, обусловленной как отторжением, с одной стороны, так и CNI-нефротоксичностью – с другой.

В частности, для решения проблемы CNI-нефротоксичности обнадеживающие перспективы открывают новые протоколы с использованием ингибиторов пролиферативного сигнала в комбинации с низкими дозами ингибиторов кальциневрина. По этому поводу, однако, получены лишь первые данные, нуждающиеся в дальнейшем подтверждении. С учетом сложных лекарственных взаимодействий требуют уточнения и режимы дозирования этих препаратов.

С другой стороны, введение в практику нефротрансплантологии такролимуса открыло новые перспективы для совершенствования профилактики терапии отторжения. Это, в частности, подтверждается рядом клинических исследований, демонстрирующих более эффективное подавление активности отторжения после конверсии с циклоспорина на такролимус [Blume C., 2001; Jordan M., 1999; Kliem V., 1999]. Однако мнения по этому вопросу неоднозначны. Остается предметом дискуссии эффективность перехода на такролимус при тяжелом гуморальном отторжении и хроническом отторжении, особенно если они развиваются на фоне распространенного нефросклероза [Maroun T., 1998; Manu M., 1999; Lee W., 2005; Boratynska M., 2006].

Наконец, одним из подходов к торможению прогрессирования хронической дисфункции трансплантата, морфологическим субстратом которой является формирующийся нефросклероз любой природы, является фармакологическая блокада внутрипочечной ренин-ангиотензиновой системы. Ее эффективность была доказана при поражении нативных почек, однако результаты исследований по их применению после трансплантации почки не столь однозначны [Томилина Н.А., Багдасарян А.Р., 2004; Opelz G., 2006] и требуют уточнения.

Перечисленные выше вопросы явились предметом изучения настоящей работы.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось: изучить частоту, причины, клинико-функциональные и морфологические характеристики, закономерности течения и предикторы исхода хронической дисфункции трансплантированной почки и разработать на основе полученных данных новые подходы к ее профилактике и лечению.

Задачи исследования

1. Изучить частоту, сроки развития и прогностическое значение хронической дисфункции почечного трансплантата.
2. Выявить факторы риска развития хронической дисфункции трансплантата.
3. Проанализировать морфологическую структуру и причины хронической дисфункции трансплантата в зависимости от срока после операции
4. Изучить особенности течения различных морфологических вариантов позднего острого отторжения и выделить факторы, влияющие на его прогноз.
5. Выявить различия в механизмах развития, течения, морфологической картине и прогнозе двух основных форм нефротоксичности, вызванной ингибиторами кальциневрина: CNI-ассоциированной артериолопатии с сопутствующим склерозом интерстиция и тромботической микроангиопатии.
6. Оценить диагностическое и прогностическое значение отдельных фармакокинетических параметров циклоспорина и определить их оптимальный уровень, обеспечивающий предупреждение как поздних кризов отторжения, так и циклоспориновой нефротоксичности.
7. Определить наиболее эффективный и безопасный режим терапии препаратами микофеноловой кислоты. Оценить частоту и выраженность побочных эффектов, вызванных действием этих препаратов.
8. Определить показания и оценить эффективность и безопасность поздней конверсии на такролимус и ингибиторы пролиферативного сигнала с учетом особенностей морфологической картины поздней дисфункции трансплантированной почки.

9. Оценить эффективность использования иАПФ при различных вариантах патологии трансплантированной почки.

Научная новизна работы

Уточнены основные морфологические характеристики различных вариантов поздней дисфункции почечного трансплантата и определено их диагностическое и прогностическое значение. Впервые гетерогенная по своей природе поздняя дисфункция трансплантата проанализирована в совокупности клинических, лабораторных и морфологических параметров с учетом данных фармакокинетического исследования. В рамках уже существующих нозологий (острое и хроническое отторжение, хроническая СNI-нефротоксичность, хроническая трансплантационная нефропатия) выделены отдельные типы патологии трансплантата, различающиеся по механизмам развития, морфологической картине, особенностям течения и подходам к терапии. Разработаны показания и режимы конверсии на новые иммуносупрессивные препараты в соответствии с особенностями морфологической картины, лежащей в основе дисфункции. Определено диагностическое значение отдельных фармакокинетических параметров циклоспорина, впервые изучавшихся в совокупности с другими клинико-функциональными и морфологическими характеристиками. Получены новые данные о возможности торможения прогрессирования хронической дисфункции трансплантата модуляцией иммуносупрессии путем конверсии на такролимус или ингибиторы пролиферативного сигнала. Оценена эффективность фармакологической блокады ренин-ангиотензиновой системы при различных морфологических вариантах хронической дисфункции трансплантата.

Практическая значимость работы

Разработаны новые подходы к лекарственному мониторингу терапии циклоспорином, значительно снижающие риск развития отторжения или хронической СNI-нефротоксичности, и определены оптимальные значения ряда фармакокинетических параметров. Обоснована необходимость прижизненного морфологического исследования биоптатов трансплантированной почки для диагностики причин поздней ее дисфункции и разработки подходов к ее лечению. Определены морфологические предикторы прогноза поздней дисфункции, обусловленной как острым поздним и хроническим отторжением, так и хронической СNI-нефротоксичностью, и на этой основе разработаны показания конверсии на такролимус и ингибиторы пролиферативного сигнала, а также предложены режимы дозирования этих препаратов. Продемонстрирована эффективность применения ингибиторов АПФ при хронической дисфункции трансплантата для улучшения отдаленных результатов трансплантации почки, а также выявлены различия в эффективности подобной терапевтической тактики при разных морфологических вариантах последней.

Положения, выносимые на защиту

1. Хроническая дисфункция трансплантата в значительной степени определяет отдаленные результаты трансплантации почки. Основным фактором риска развития дисфункции трансплантата является неадекватность (недостаточность либо избыточность) иммуносупрессивной терапии.
2. Острое отторжение является одной из наиболее частых причин дисфункции трансплантата, в том числе и в поздние сроки после трансплантации почки. Морфологический тип отторжения и присутствие гуморального компонента – независимые предикторы прогноза при позднем отторжении трансплантата.
3. Выделение двух вариантов CNI-нефротоксичности (CNI-ассоциированной артериолопатии с сопутствующим склерозом интерстиция и TMA), различающихся по своей природе, особенностям течения и прогнозу, позволяет оптимизировать подходы к терапии реципиентов с CNI-ассоциированным повреждением трансплантата.
4. Появление новых классов иммуносупрессантов – такролимуса и ингибиторов пролиферативного сигнала – существенно расширяет возможности как профилактики, так и лечения поздней дисфункции трансплантата. При своевременной морфологической верификации причины дисфункции изменение режима ИСТ в совокупности с оптимизацией мониторинга терапии циклоспорином и использованием ингибиторов АПФ позволяет замедлить темпы прогрессирования нефропатии и улучшить отдаленные результаты АТП

Связь с планом НИР ФГУ «ФНЦТИО имени академика В.И. Шумакова» МЗ и СР РФ

Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ (НИР) ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» МЗ и СР РФ, исходящий номер 669/12 от 22.04.09, номер государственной регистрации 01200902610.

Внедрение результатов работы в практику

Полученные автором результаты внедрены в практическую деятельность отделения нефрологических проблем трансплантации почки ФНЦТИО им. В.И. Шумакова, нефрологического отделения ГКБ № 52, отделения оперативной нефрологии и хирургической гемокоррекции ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», отделения по пересадке почки Российской детской клинической больницы. Основные положения диссертационной работы Е.С. Столяревич могут быть рекомендованы для применения в отделениях трансплантации почки, хирургических и терапевтических отделениях, занимающихся лечением больных с почечным трансплантатом. Результаты исследований используются в учебном процессе на кафедре нефрологии ФПДО МГМСУ (зав. кафедрой – проф. д. м. н. Томилина Н.А.).

Апробация работы и публикации

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на совместном заседании отделения нефрологических проблем трансплантации почки ФНЦТИО им. В.И. Шумакова и кафедры нефрологии ФПДО МГМСУ 19.01.2010 г.

Содержание диссертационной работы было представлено на III, IV и V всероссийских съездах по трансплантологии и искусственным органам (Москва, 2005, 2007 и 2009), VI, VII и VIII международных семинарах «Неделя нефрологии в Москве» (Москва, 2007, 2008 и 2009), Научно-практической конференции нефрологов Казахстана (Алматы, 2008), Российской научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной нефрологии» (Москва, 2008), Российской научной конференции с международным участием «Фундаментальные исследования в уронефрологии» (Саратов, 2009), нефрологической конференции «Белые ночи – 2009» (Санкт-Петербург, 2009), всероссийской конференции «Трансплантология, XXI век» к 40-летию ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» (Москва, 2009). Стеновые доклады по материалам диссертационной работы были представлены на XLI, XLII, XLIII и XLIV конгрессах Европейской ассоциации диализа и трансплантации (ERA-EDTA 2004–2007 гг.), XII и XIV конгрессах Европейского общества трансплантологов (ESOT 2005 и 2009), Всемирном конгрессе общества трансплантологов (Бостон, 2006 г.). Основные положения работы изложены в 25 опубликованных научных трудах, из них 12 – в центральных рецензируемых изданиях.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 241 странице машинописного текста и состоит из введения, обзора литературных данных, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 78 рисунками и 33 таблицами. Список используемой литературы включает 367 источников, в числе которых 23 отечественных и 344 зарубежных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Характеристика больных

Проанализированы материалы наблюдений 1055 пациентов, поступивших под наблюдение отделения нефрологических проблем трансплантации почки ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени В.И. Шумакова». Случаи потери трансплантата в течение первого послеоперационного месяца были исключены из исследования. Мужчины составляли 62,2% (656 чел.), женщины – 37,8% (399 чел.) от общего числа

пациентов. Возраст пациентов находился в диапазоне от 10 до 69 лет и в среднем составил $37,8 \pm 14,2$ года. Основной причиной терминальной ХПН был хронический гломерулонефрит (43,9%), далее по частоте следовали аномалии развития мочевой системы (10,7%), сахарный диабет (9,1%), поликистоз почек (5,7%), хронический пиелонефрит (3,7%), почечно-каменная болезнь (2,8%), пурпура Шенлейна–Геноха (2,2%) и гипертонический нефроангиосклероз (2,1%). Амилоидоз почек, подагра, системные заболевания, наследственные нефропатии и хронический тубулоинтерстициальный нефрит наблюдались в единичных случаях. У 13,3% больных диагноз основного заболевания установить не удалось, поскольку первые симптомы заболевания были выявлены в стадии почечной недостаточности.

В 82,2% случаев производилась пересадка трупной почки и в 17,8% – трансплантация от живого родственного донора. В 91,2% имела место первичная аллотрансплантация почки, в 8,4% – вторичная, и 4 реципиента перенесли третью операцию АТП.

Функция трансплантата началась сразу после включения в кровоток у 658 пациентов (62,4%), в 397 случаях (37,6%) начальная функция РАТ была отсроченной.

К моменту начала наблюдения 95% реципиентов получали 3-компонентную иммуносупрессию, включавшую циклоспорин А (93%) либо такролимус (2%), преднизолон и цитостатик (азатиоприн или препараты микофеноловой кислоты) и 5% – 2-компонентную ИДТ (преднизолоном и циклоспорином). Конверсия на такролимус выполнена у 55 пациентов, 74 пациента были переведены на ингибиторы пролиферативного сигнала (36 человек получали рапамицин и 38 – сертикан).

Кризисы отторжения купировали пульсовым введением кортикостероидов в суммарной дозе 1,5–3,0 г. При рефрактерности к кортикостероидам использовались поликлональные (АТГ) или моноклональные (ОКТ-3) антитела. АТГ применялся в дозе 3–5 мг/кг/сут, ОКТ-3 – в дозе 5мг/кг в течение 10–14 суток. В случаях гуморального отторжения применялись сеансы плазмафереза, в ряде случаев с введением внутривенного человеческого иммуноглобулина.

Срок наблюдения составлял от 1 до 81 мес., в среднем $29,5 \pm 21,1$ мес. При этом короткие сроки наблюдения (менее 12 мес.) относятся к случаям быстрого прогрессирования дисфункции и определяются временем наступления «почечной смерти», в остальных случаях длительность наблюдения составляла не менее 12 мес.

У 355 пациентов с дисфункцией трансплантата выполнено 385 пункционных биопсий трансплантата. Дисфункция характеризовалась уровнем креатинина в плазме крови от 0,15 до 0,45 ммоль/л (в среднем $0,27 \pm 0,15$ ммоль/л), и/или появлением протеинурии более 1 г/сут либо стойкой микрогематурии, сохранявшейся в течение месяца и более. Демографические характеристики этих пациентов не отличались от таковых в общей группе. Так, соотношение мужчин и женщин составляло 63/37%, возраст

пациентов – $37,9 \pm 11,7$ года. Сроки выявления дисфункции РАТ находились в диапазоне от 3 до 177 мес. (в среднем $42,3 \pm 37$ мес.) после АТП.

Срок наблюдения с момента биопсии находился в диапазоне от 1 до 70 мес., в среднем $39,2 \pm 3,4$ мес. Как и в общей группе, короткие сроки наблюдения относились к случаям быстрого прогрессирования дисфункции, а в остальных случаях составляли не менее 12 мес. На настоящий момент у 102 человек наблюдение завершено в связи с рецидивом терминальной ХПН.

У 83 реципиентов выполнено 123 фармакокинетических исследования в сроки от 6 до 146 месяцев после АТП (в среднем $33,8 \pm 28,7$ мес.). В этой группе на момент проведения исследования 28 пациентов (34%) имели стабильную удовлетворительную функцию трансплантата, у 55 человек (66%) отмечалась дисфункция трансплантата, которая у 49 из них (89%) была верифицирована морфологически.

Клинико-функциональные методы исследования

При анализе клинического течения ХТН особое внимание уделялось оценке таких клинических проявлений поражения почек, как показатели артериального давления (АД) и мочевого синдрома. Уровень АД определялся при каждом посещении в условиях амбулаторного наблюдения («офисное АД»). Оценивали также показатель среднего АД, который рассчитывался как $1/3(\text{АД}_{\text{сист}} - \text{АД}_{\text{диаст}}) + \text{АД}_{\text{диаст}}$. О мочевом синдроме судили по данным общего анализа мочи и суточной экскреции белка. Периодичность обследования составляла от 1 раза в 10–14 дней до 1 раза в 4–6 месяцев в зависимости от срока после АТП.

Функциональное состояние трансплантата оценивали по уровню креатинина в плазме крови и скорости клубочковой фильтрации. Концентрация креатинина определялась колориметрическим методом Bonsnes and Taussky. Скорость клубочковой фильтрации определяли по формуле Кокрофта–Голта (K-DOKI 2002).

О скорости изменения функции трансплантата судили по динамике СКФ, а также по величине, обратной уровню креатинина ($1/\text{Pcr}$), которая является общепризнанным критерием оценки темпов прогрессирования нефропатии. Динамику изменения этого параметра определяли по отношению $\Delta 1/\text{Pcr}$ к длительности наблюдения.

Морфологические методы исследования

Морфологическое исследование биоптатов включало световую микроскопию и иммунофлюоресцентное исследование. Показанием к биопсии было выявление дисфункции трансплантата, проявлявшейся стойким повышением уровня креатинина крови выше $0,13$ ммоль/л и снижением скорости клубочковой фильтрации ниже 60 мл/мин и/или протеинурии выше $0,5$ г/сут в ряде случаев в сочетании с гематурией.

Патоморфологическому изучению подвергались кусочки ткани, полученные при пункционной биопсии трансплантата. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, затем промывали водопроводной

водой, проводили через серию спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Из полученных блоков приготавливали срезы толщиной 3–4 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином, по Массону и шифф-реактивом. Исследование проводили в проходящем свете светового микроскопа. Биоптат считался репрезентативным, если в нем имелось не менее 7 клубочков и 1 артерии.

Иммунофлюоресцентное исследование выполнялось на замороженных срезах толщиной 4 мкм с моноклональными FITC-мечеными антителами к IgG, IgM, IgA, C3-фрагменту комплемента (ДАКО) и C4d-фрагменту комплемента (Quidel).

Исследование фармакокинетических характеристик циклоспорина А

С целью оценки фармакокинетических характеристик экспозиции циклоспорина А выполнялось полное фармакокинетическое исследование с определением концентрации СуА в течение 12 часов после приема препарата (до приема, через 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8 и 10 часов после приема циклоспорина). При этом анализировались: C_0 – концентрация циклоспорина через 12 часов после приема препарата; C_2 – концентрация циклоспорина через 2 часа после приема препарата; C_{max} – максимальная концентрация циклоспорина; T_{max} – время достижения максимальной концентрации; AUC – площадь под кривой «концентрация–время»; AP – профиль абсорбции (площадь под кривой «концентрация–время» в течение первых 4 часов после приема препарата)

Расчет AUC производился по правилу трапеции, либо по формулам:

$AUC(C_0 + C_1 + C_3) = 5,189 * C_0 + 1,267 * C_1 + 4,15 * C_3 + 135,1$ [Gaspari F., 1997].

$AUC(C_0 + C_2) = 990 + 10,74 * C_0 + 2,88 * C_2$ [Einecke G., 2001].

Уровень циклоспорина в крови определялся специфическим РИА-методом (CycloTrac SR, DiaSorin).

Диагностические критерии клинико-функциональных показателей

Функцию трансплантата оценивали как удовлетворительную, если концентрация креатинина плазмы не превышала 0,13 ммоль/л, а СКФ была не ниже 60 мл/мин. О стойкой дисфункции трансплантата говорили при повышении уровня креатинина и/или снижении СКФ, сохраняющейся в течение 3 и более месяцев. При этом отдельно выделялись ранняя стойкая дисфункция, то есть случаи неполного восстановления функции трансплантата после операции, и поздняя дисфункция, если она выявлялась после периода полного восстановления функции.

Кризис отторжения диагностировался по быстрому прогрессирующему снижению функции трансплантата, часто в сочетании с протеинурией и гематурией, и верифицировались морфологически. Кризис считался необратимым при рефрактерности к терапии и рецидиве тХПН в срок до 3 месяцев с момента его диагностики, и частично обратимым, если он завершался формированием стойкой дисфункции трансплантата.

Артериальную гипертонию констатировали при повышении АД выше 140/90 мм рт. ст. и/или при потребности в гипотензивной терапии.

Протеинурия оценивалась как минимальная при уровне менее 0,5 г/сут, умеренная 0,5–1,0, и выраженная >1 г/сут.

Морфологические критерии диагностики поздней патологии трансплантата

В структуре поздней патологии РАТ выделялись следующие морфологические варианты: острое и хроническое отторжение трансплантата (ХОТ), острая и хроническая нефротоксичность ингибиторов кальциневрина, возвратная или *de novo* патология, а также неспецифический тубуло-интерстициальный склероз (ТИС) и атрофия канальцев (изменения, именуемые ранее хронической трансплантационной нефропатией (ХТН).

Острое отторжение диагностировалось в соответствии с критериями классификации Banff (2005 г.) на основании оценки светооптической картины (выраженность интерстициальной инфильтрации и степени поражения стенки канальца лимфоцитами (тубулита), наличия и тяжести артериита (рис. 1А, Б) и данных иммунофлюоресценции с определением свечения С4D-компонента комплемента (рис. 2).

Хроническое отторжение диагностировалось при наличии хронической трансплантационной васкулопатии либо хронической трансплантационной гломерулопатии (Banff, 2005) (рис. 3).

Об активном хроническом отторжении говорили при сочетании этих признаков со свечением С4D-компонента комплемента по базальным мембранам перитубулярных капилляров.

Морфологическим проявлением острого нефротоксического эффекта ингибиторов кальциневрина считалась изометрическая вакуолизация клеток проксимальных канальцев, появление в них микрокальцификатов.

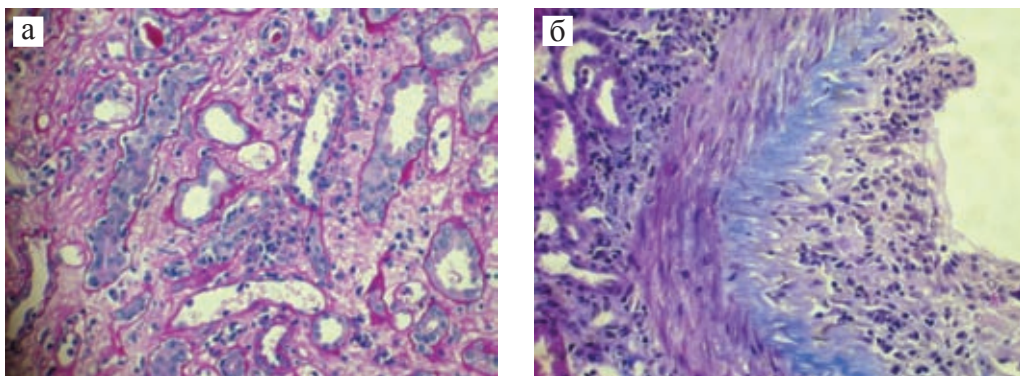


Рис. 1. Острое отторжение трансплантата:

- а – тубулоинтерстициальный вариант Banff-1. (PAS-реакция. ×250);**
б – сосудистый клеточный вариант (Banff-2).
(Трихром по Массону. ×400)

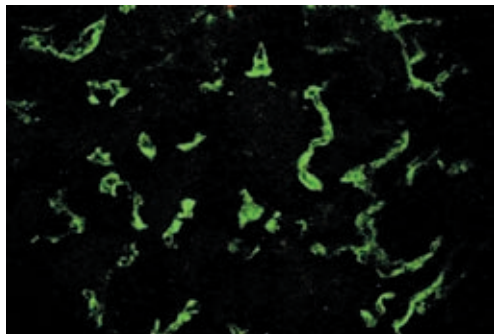
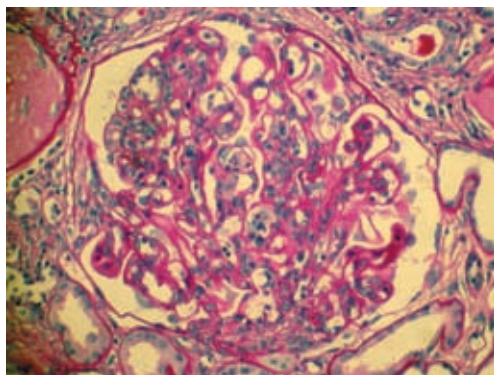


Рис. 2. Свечение C4d на перитубулярных капиллярах



**Рис. 3. Хроническая трансплантационная гломерулопатия:
(PAS-реакция. ×250)**

Хроническая CNI-нефротоксичность диагностировалась по присутствию CNI-ассоциированной артериолопатии, основным проявлением которой является нодулярный периферический артериологиалиноз (рис. 4а). Тяжесть артериолопатии оценивается в соответствии с критериями, предложенными Sis и Colvin [Sis B., 2006; Colvin R.B., 1998]. Помимо этого для дополнительной оценки распространенности артериологиалиноза определялся процент артериол с явлениями гиалиноза относительно общего числа артериол в препарате.

Отдельно выделялись случаи тромботической микроангиопатии (ТМА), как особой формы CNI-нефротоксичности, которая диагностировалась при выявлении тромбоза капилляров клубочков, артериол и мелких артерий, набухании эндотелия сосудов и расширении субэндотелиального пространства (рис. 4б), либо двойных контуров стенок капилляров клубочка и фиброинтимальной пролиферации сосудистой стенки по типу «луковой шелухи», характерных для поздней ее стадии.

Возвратная и *de novo* гломерулярная патология были объединены в одну группу, поскольку в подавляющем большинстве случаев морфологическая верификация патологии собственных почек, приведшей к развитию тХПН,

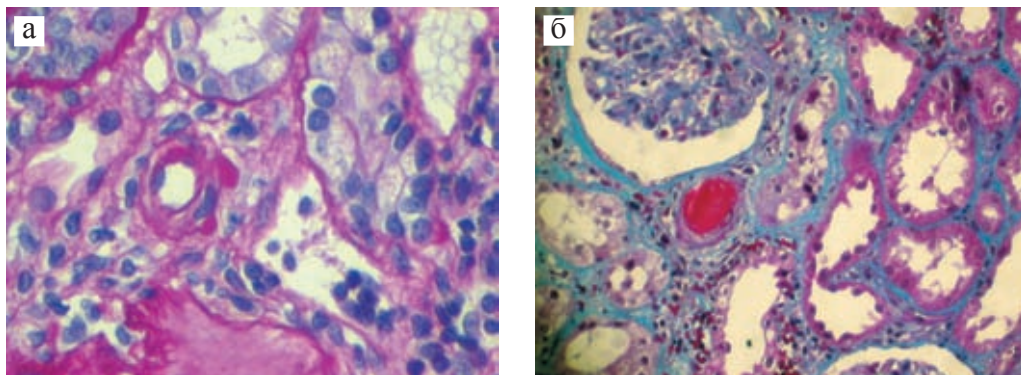


Рис. 4. Хроническая нефротоксичность ингибиторов кальциневрина: а – периферический нодулярный артериологалиноз (PAS-реакция. $\times 400$); б – тромботическая микроангиопатия трансплантата. (Трихром по Массону. $\times 400$)

не проводилась. Характер поражения определялся по светооптической картине и данным иммунофлюоресценции.

Под неспецифическим тубулоинтерстициальным склерозом (ТИС) и атрофией канальцев понимали нефросклероз, природу которого невозможно уточнить методами морфологической диагностики. Эта категория включает случаи ишемически-реперфузионного поражения трансплантата, артериальной гипертензии, хронической обструктивной нефропатии, а также фиброз интерстиция и атрофию канальцев в исходе острого отторжения, вирусной или бактериальной инфекции трансплантата, на поздней стадии которых характерные черты патологии, вызвавшей процесс склерозирования, уже отсутствуют (Banff 2005).

При этом основным критерием тяжести поражения трансплантата является распространенность фиброза интерстиция и атрофии канальцев, которые оценивались полуколичественно в зависимости от площади почечной паренхимы, занимаемой участками фиброза интерстиция и атрофии канальцев в соответствии с критериями Banff-классификации (Banff 1997)

Эти же критерии рассматривались для оценки выраженности нефросклероза при ХОТ, хронической CNI-нефротоксичности, возвратной и *de novo* патологии.

Выраженность гломерулосклероза определялась по проценту полностью склерозированных клубочков.

Статистическая обработка данных

При статистической обработке данных переменные, имеющие нормальное распределение, описывались как среднее \pm среднее квадратичное отклонение ($X \pm \sigma$). Для переменных с распределением, отличным от нормального, вычислялись медиана и интерквартильный размах. Статистический межгрупповой анализ данных проводился с помощью двустороннего кри-

терия Стьюдента, внутригрупповой – с применением парного критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различия качественных признаков использовался точный критерий Фишера и χ^2 -критерий. Для признаков, распределение которых отлично от нормального – критерии Манна–Уитни и Краскела–Уоллиса. Результаты считались статистически достоверными при значениях $p < 0,05$.

Вероятность потери трансплантата, так же как и относительный риск развития дисфункции трансплантата в зависимости от действия различных факторов, оценивалась по актуриальной выживаемости трансплантата, рассчитанной по методу Каплана–Майера, и в многофакторной регрессионной модели Кокса. Применение последней позволило оценить влияние каждого из изучаемых факторов при их совокупном взаимодействии на течение нефропатии, в том числе с использованием данных незавершенных наблюдений. Пациенты, умершие с функционирующим трансплантатом, считались выбывшими из наблюдения.

Достоверность различий кривых актуриальной выживаемости устанавливалась с помощью статистических тестов Log rank и Breslow. Результаты считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Данные были обработаны при помощи статистического пакета программ SPSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Частота хронической дисфункции трансплантата, ее прогностическое значение и факторы риска

Стойкая дисфункция трансплантата диагностирована у 294 из 850 пациентов (34%). Ее частоту в различные сроки после операции демонстрирует рисунок 8, из которого видно, что у 17% всех реципиентов дисфункция была исходом тяжелого ишемически-реперфузионного повреждения, следствием которого было неполное восстановление функции трансплантата. В остальных случаях дисфункция развивалась на более поздних сроках: в течение первого года она была выявлена дополнительно у 10,6%, а к 2 годам – у 17,9% реципиентов. В последующем темпы прироста реципиентов с дисфункцией несколько замедлялись, и в целом дисфункция трансплантата к 5 годам после АТП имела место у 42,4% пациентов (рис. 5).

В целом стойкая дисфункция значительно сокращала сроки функционирования трансплантированной почки, 7-летняя выживаемость трансплантата в этих случаях составляла 69%, тогда как у реципиентов без хронической дисфункции этот показатель был равен 96% (рис. 6а). При этом ранняя дисфункция влияла прежде всего на ближайший прогноз (1-летняя выживаемость трансплантата – 91,8%; 5-летняя – 80,5%), тогда как поздняя дисфункция в большей степени сказывалось на отдаленных результатах операции (1-летняя выживаемость РАТ – 97,4%; 5-летняя выживаемость – 68,5%) (рис. 6б).

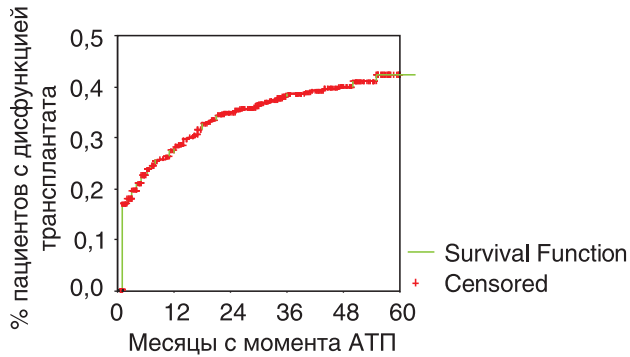


Рис. 5. Частота стойкой дисфункции трансплантата в разные сроки после АТП

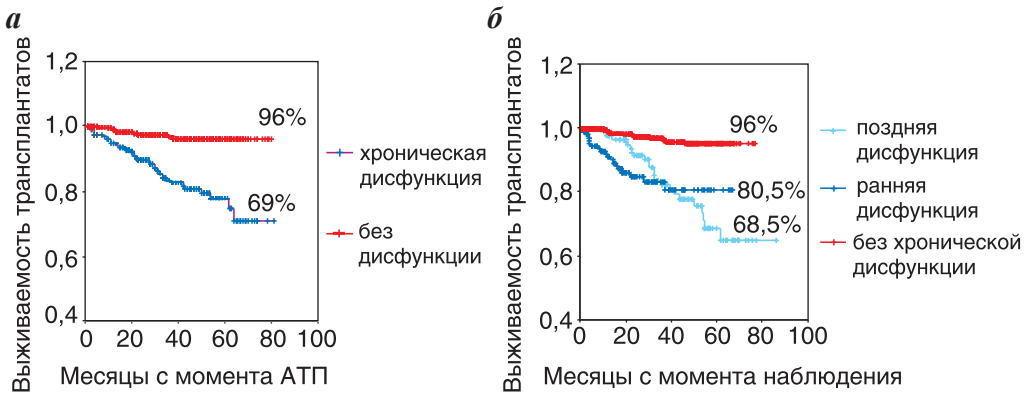


Рис. 6. Влияние стойкой дисфункции трансплантата на отдаленные результаты трансплантации почки: а – в целом и б – в зависимости от срока развития

Более того, как показал анализ в модели Кокса, в случаях формирования стойкой дисфункции к концу первого посттрансплантационного года риск потери трансплантата в отдаленные сроки после операции возрастает в 2,3 раза (RR-2,28; $p = 0,01$).

При анализе в регрессионной модели Кокса факторов риска развития ранней дисфункции подтвердилось самостоятельное значение острого канальцевого некроза, клиническим проявлением которого является отторженная функция трансплантата, (RR-2,79, $p = 0,000$), ранних кризов отторжения (RR-1,89, $p = 0,0015$) и клинически манифестной вирусной инфекции (ЦМВ и герпес) (RR-1,69, $p = 0,009$). Латентная вирусемия (положительная PCR ДНК ЦМВ в крови) самостоятельного значения не имела.

В развитии поздней дисфункции РАТ наибольшее значение имеют поздние кризы отторжения (RR-2,69, $p = 0,0000$), которые, будучи в большинстве случаев лишь частично обратимыми, приводят к стабилизации функции трансплантата на уровне начальной ХПН и формированию стойкой

дисфункции трансплантата. Значительно меньшую роль играли эпизоды раннего отторжения ($R=1,62$, $p = 0,03$).

Морфологическая структура поздней дисфункции РАТ: характер доминирующих патологий и скорость прогрессирования

При анализе морфологической картины по данным пункционных биопсий выяснилось, что наиболее частой причиной поздней дисфункции трансплантата была хроническая нефротоксичность ингибиторов кальциневрина (СНИ-нефротоксичность), которая выявлялась в 27,5% случаев. Второй по частоте причиной снижения функции РАТ оказалось острое отторжение трансплантата, которое, включая случаи пограничных изменений, выявлялось у 24,2% всех случаев, еще 9,4% случаев приходилось на хроническое отторжение трансплантата. В 17,7% основным морфологическим проявлением нефропатии был неспецифический нефросклероз (хроническая трансплантационная нефропатия), и у 15,3% реципиентов был диагностирован хронический гломерулонефрит трансплантата (возвратный либо развившийся *de novo*). Таким образом, по характеру доминирующих изменений при поздней патологии трансплантата можно выделить следующие группы патологий:

1) антиген-опосредованные, связанные с активацией аллоиммунного ответа (острое и хроническое отторжение), доля которых суммарно составляет 33,6%;

2) нефротоксичность ингибиторов кальциневрина (острая и хроническая СНИ-нефротоксичность), суммарно – 30,1%;

3) возвратная и *de novo* патология трансплантата (18,4%), включающая помимо гломерулонефрита диабетическую нефропатию, а также случаи рецидива первичной гипероксалурии и амилоидоза почки;

4) Нефросклероз, вызванный неспецифическими причинами, не связанными ни с активацией иммунного ответа, ни с нефротоксическим действием препаратов (17,7%).

Демографические и клинико-функциональные характеристики реципиентов с различными вариантами поздней дисфункции в целом не различались, за исключением более выраженного нарушения функции трансплантата в дебюте острого отторжения (уровень креатинина крови составлял $0,34 \pm 0,19$ ммоль/л при остром отторжении и $0,24 \pm 0,12$ ммоль/л при других вариантах дисфункции; $t = 6,1$; $p < 0,01$). Также обращала на себя внимание высокая инфицированность вирусами гепатита у реципиентов с хроническим отторжением трансплантата, которая отмечалась в половине всех случаев ХОТ (в 78% из них – гепатит С), тогда как при дисфункции другой этиологии частота выявления гепатита не превышала 31,5% ($t = 2,59$; $p < 0,05$).

Характер патологии в значительной степени зависел от срока после АТП. Так, дисфункция, выявляемая в течение первого года после АТП, в

36% развивалась в исходе острого отторжения. По мере увеличения срока после АТП частота острого отторжения постепенно снижалась, достигая 15,6% через 5 и более лет после операции, частота же хронического отторжения, напротив, увеличивалась с 4,2 до 14,4% в те же сроки наблюдения. Частота хронической СNI-токсичности увеличивалась с 14,7% на первом году до 25–26% после 2 лет. Острая нефротоксичность СNI наблюдалась почти исключительно в первый год после операции, в более поздний период ее частота не превышала 1,5%. В случаях же когда СNI-токсичность проявлялась ТМА, в первые 5 лет ее частота не зависела от срока после операции, снижаясь лишь в поздние сроки после АТП. Частота возвратной патологии, будучи невысокой в первый год после операции (10%), в течение последующих 5 лет выявлялась в 17–20% нефробиоптатов. Также неизменной оставалась и частота встречаемости неспецифического нефросклероза (13–19%) (табл. 1).

Таблица 1

Частота различных причин поздней дисфункции трансплантата, выявленной в различные сроки после операции

Срок (мес.)	n	Криз (%)	ХОТ (%)	Хр.СуА (%)	О.СуА (%)	ТМА	ГН	ХТН	Другое
3–12	95	35,8	4,2	14,7	8,4	7,4	9,5	17,9	2,1
12–24	68	30,9	4,4	19,1	1,5	7,5	20,6	14,7	
24–60	126	18,3	11,9	26,1	0	7,1	15,9	19,0	
>60	96	15,5	14,4	24,7	1,0	2,0	16,5	17,5	8,2

Темпы прогрессирования дисфункции трансплантата и, соответственно, отдаленный прогноз нефропатии у пациентов с хронической дисфункцией определялись прежде всего ее морфологическим субстратом (табл. 2).

Таблица 2

Выживаемость трансплантата с момента выявления дисфункции в зависимости от ее причины

Патология	Выживаемость		
	12 мес.	24 мес.	36 мес.
Острое отторжение (n = 92)	69,0%	59,3%	49,6%
Хроническое отторжение (n = 36)	59,7%	40,2%	40,2%
Хр СNI-нефротоксичность (n = 99)	80,3%	73,6%	66,8%
Неспецифический ТИС (n = 71)	82,6%	73,9%	68,9%
Гломерулонефрит (n = 59)	85,2%	85,2%	82,3%
Остр. СNI-нефротоксичность (n = 8)	100%	100%	100%

В случаях, когда дисфункция была обусловлена активацией иммунного ответа (острое и хроническое отторжение), 3-летняя выживаемость трансплантата с момента ее выявления составила 49,6% для острого и 40,2% для хронического отторжения. Более благоприятным оказался 3-летний прогноз при хронической СNI-нефротоксичности (66,8%) и неспецифическом

нефросклерозе (68,9%). Наконец, при гломерулонефрите трансплантата и острой CNI-нефротоксичности темпы прогрессирования нефропатии были минимальными (3-летняя выживаемость – 82,3 и 100% соответственно).

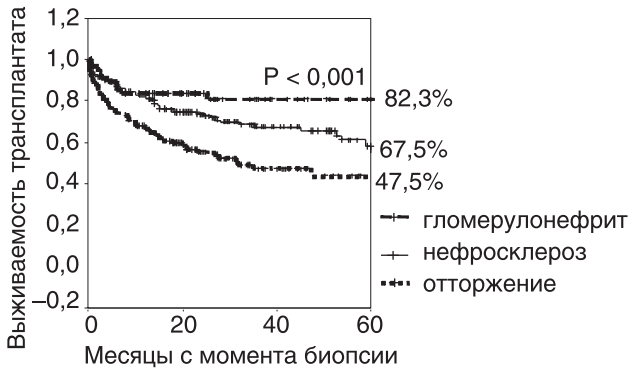


Рис. 7. Темпы прогрессирования нефропатии в зависимости от природы дисфункции (случаи острого и хронического отторжения объединены, также как и случаи CNI-нефротоксичности и неспецифического нефросклероза)

Таким образом, в целом темпы прогрессирования отторжения (острого и хронического) оказались значимо более высокими, чем при нефросклерозе, вызванном причинами, не связанными с иммунным ответом, или возвратной и *de novo* патологии (рис. 7).

Позднее острое отторжение: клинико-морфологическая характеристика, течение и прогноз

Частота встречаемости, причины и значение для прогноза

Поздние кризы отторжения трансплантата являются одной из наиболее частых причин дисфункции трансплантата. Они развиваются примерно у 7–9% реципиентов почечного аллотрансплантата, что повышает риск потери трансплантата в 5,4 раза по сравнению с бескризовым течением (RR-5,36; $p < 0,0001$).

В большинстве случаев поздние кризы отторжения развивались на фоне неадекватной иммуносупрессивной терапии, которая была обусловлена отсутствием комплаентности реципиентов (16% случаев), низкой абсорбцией циклоспорина при применении его генерических препаратов (15%), невозможностью применения полной дозы препаратов микофеноловой кислоты при минимальной поддерживающей дозе стероидов (6%), а также при значительном снижении дозы циклоспорина (12%), показаниями к чему были саркома Капоши либо тяжелая циклоспориновая нефротоксичность с элементами ТМА. В 11% случаев криз отторжения развился на фоне вирусного поражения трансплантата (преимущественно ЦМВ), еще в 6% случаев признаки острого отторжения представляли собой остаточные

явления раннего, не полностью купированного криза. (Эти две последние причины преобладали в течение первого года после АТП). В остальных случаях (34%) причину острого отторжения выявить не удалось.

Интересно, что у пациентов с вирусным гепатитом С по сравнению с не инфицированными этим вирусом отмечалась явная тенденция к увеличению частоты поздних кризов отторжения (10,2% vs 5,6%, $p = 0,08$), тогда как для вирусного гепатита В такой тенденции не отмечалось, частота отторжения составляла 6,5 и 6,2% ($p = 0,5$).

Характеристика морфологической картины

Морфологическая картина позднего острого отторжения проанализирована по материалам 97 пункционных биопсий. С целью выявления гуморального компонента отторжения у 76 пациентов было выполнено также иммунофлюоресцентное исследование с определением С4D-компонента комплемента.

Наиболее часто (61%) позднее острое отторжение развивалось по интерстициальному типу (1а и 1б по Banff-классификации), значительно реже (25%) выявлялся сосудистый тип отторжения (2а, 2б и 3 по Banff-классификации). Еще в 14% случаев отмечались пограничные изменения, что расценивается как подозрение на острое отторжение (рис. 8).

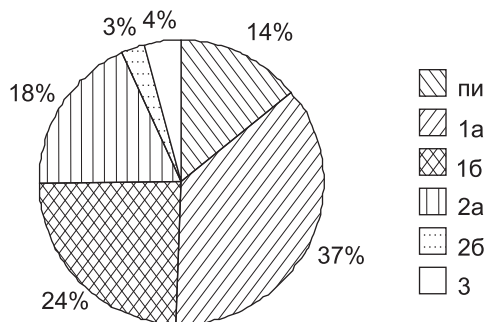


Рис. 8. Морфологическая структура поздних кризов отторжения

Функционально-морфологические корреляции

Анализ клинико-морфологических корреляций выявил тесную связь между выраженностью дисфункции трансплантата и тяжестью морфологических изменений, с одной стороны ($r = 0,32$; $p = 0,002$), и распространенностью тубуло-интерстициального склероза с другой ($r = 0,51$; $p < 0,001$) (рис. 9).

Гуморальное отторжение было диагностировано у 28 из 76 пациентов (36,8%). При этом свечение С4d выявлялось, хотя и с различной частотой, при всех вариантах отторжения, включая пограничные изменения. Наиболее часто, однако, оно наблюдалось при тяжелых сосудистых его вариантах (в 83% случаев при отторжении 2б–3-й ст.), тогда как при отторжении по интерстициальному типу (1а и 1б), а также при клеточном вариане сосу-

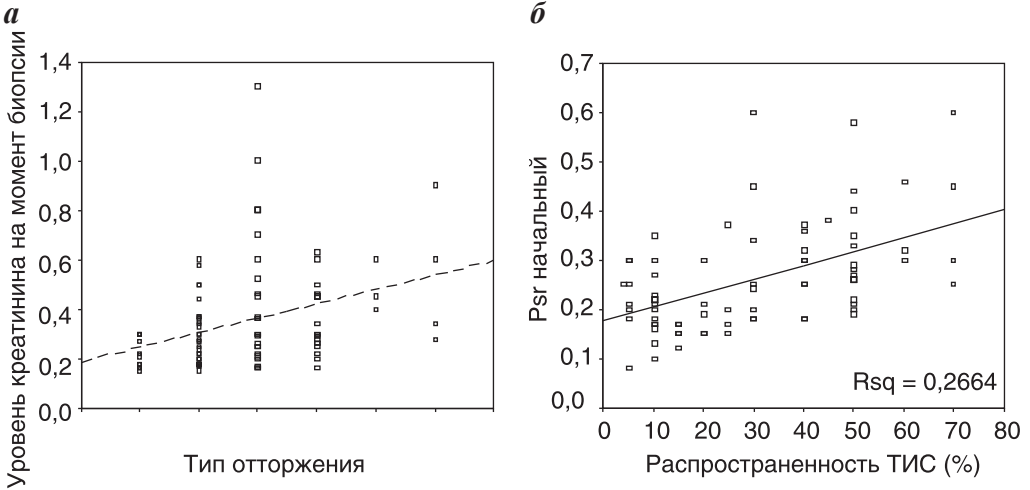


Рис. 9. Уровень креатинина крови на момент биопсии в зависимости от морфологического варианта отторжения (а) и распространенности ТИС в дебюте отторжения (б)

дистого отторжения (2а) частота выявления C4d была ниже и примерно одинаковой (55, 40 и 45%) (рис. 10). У 5 пациентов гуморальное отторжение ассоциировалось с признаками ТМА.

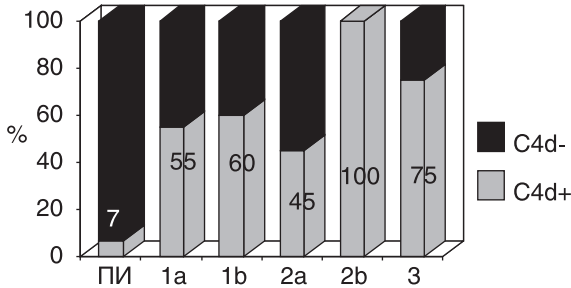


Рис. 10. Присутствие гуморального компонента, определяемого по свечению C4d-фрагмента комплемента на перитубулярных капиллярах, в зависимости от морфологического варианта отторжения

Предикторы прогноза при остром позднем отторжении

Однолетняя выживаемость трансплантатов с момента диагностики позднего криза отторжения составила 69%, 3-летняя выживаемость не превышала 42%. При этом вероятность потери трансплантата тесно коррелировала с типом отторжения. Другим предиктором быстрого снижения функции трансплантата оказалось свечение C4d на перитубулярных капиллярах. Причем снижение выживаемости трансплантатов у C4d-положительных пациентов не зависело от особенностей морфологической картины (рис. 11).

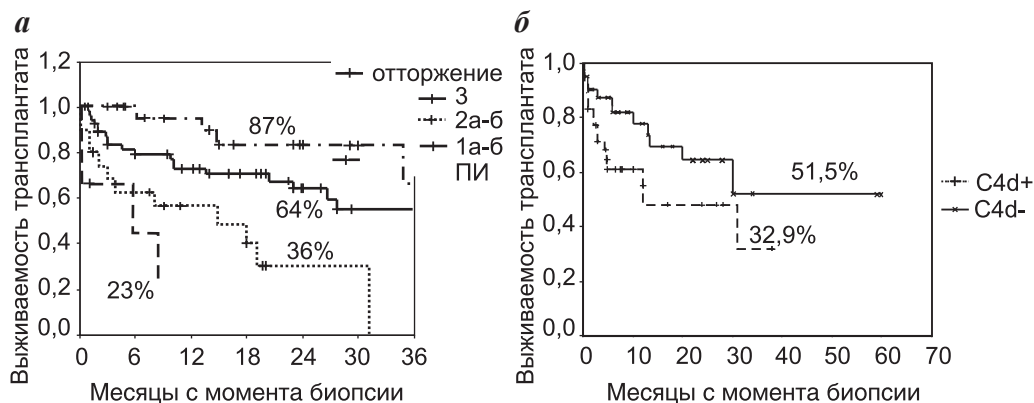


Рис. 11. Темпы прогрессирования острого отторжения в зависимости от особенностей его морфологической картины (а) и присутствия гуморального компонента (б)

Анализ прогностического значения различных факторов для исхода позднего острого отторжения в регрессионной модели Кокса показал, что важнейшим клиническим предиктором является тяжесть дисфункции на момент верификации диагноза: повышение уровня креатинина на 0,1 ммоль/л увеличивает риск потери трансплантата на 80% ($p < 0,0001$). Из особенностей морфологической картины независимыми прогностическими факторами оказались тип отторжения по Banff-классификации, присутствие гуморального компонента и распространенность склероза интерстиция. Так, увеличение степени отторжения на каждую градацию повышает риск потери трансплантата на 48% ($p = 0,004$); вероятность утраты трансплантата при гуморальном отторжении (C4d+) в 2,5 раза выше, чем при клеточном ($p = 0,02$); по мере нарастания тубуло-интерстициального склероза относительный риск увеличивается на 30% на каждые дополнительные 10% площади склероза ($p = 0,005$). Выраженность гломерулосклероза, так же, как и сочетание острого отторжения с признаками хронического отторжения, значения для прогноза не имели.

CNI-нефротоксичность: клиничко-морфологическая характеристика, течение и прогноз

Как и другие авторы, мы выделяли 2 основных варианта хронической CNI-нефротоксичности: CNI-ассоциированную артериолопатию (CNI-АА) и тромботическую микроангиопатию (ТМА). Их сравнительная характеристика приводится в табл. 3.

Анализ частоты развития, клинической картины, фармакокинетических параметров и прогноза выявляет значительные различия этих патологий. Так, ТМА развивается в более ранние сроки после АТП, дебютирует более выраженной дисфункцией трансплантата и характеризуется тяжелой артериальной гипертензией и несколько более выраженной протеинурией

Таблица 3

Клинико-лабораторные показатели и особенности морфологической картины при различных вариантах СNI-нефротоксичности и неспецифическом нефросклерозе (ХТН)

Признак	ТМА (n = 23) Группа 1	СуА-АА Группа 2 (n = 71)	ХТН (n = 62) Группа 3
Срок	27,5 ± 28,4 22 (7,4; 33,0) *	42,2 ± 36,1 30 (15; 54)	47,7 ± 37,0 34 (21; 68,2)
Возр.	33,6 ± 11,4 34 (23; 44)	36,5 ± 10,1 36 (0,28; 0,45)	40,0 ± 13,2 38 (30; 50,7)
Креат. исх.	0,31 ± 0,09* 0,27 (0,23; 0,4)	0,24 ± 0,13 0,2 (0,17; 0,25)	0,26 ± 0,13 0,2 (0,18; 0,32)
СКФ исх.	26,7 ± 9,2* 25,5 (20,4; 29,8)	41,5 ± 16,1 40,3 (28,3; 53,9)	38,1 ± 15,4 3861 (25,1; 47,3)
АД	115,5 ± 9,7* 116 (102; 117)	106,3 ± 8,3 104 (101,5; 112)	106,0 ± 7,9 105,5 (102; 112,5)
Прот	0,96 ± 1,1	0,69 ± 0,09 0,3 (0,1; 1,0)	0,6 ± 0,7 0,3 (0,1; 1,0)
А/Г	33,7 ± 22,8 38 (10,8; 50) **	45,2 ± 19,4 45 (30; 57)**	9,2 ± 15,5 0 (0; 13,5)
Нодул. А/Г	21,2 ± 17,0 20 (10,7; 30) **	32,5 ± 17,8 30 (20; 43,5)*	2,8 ± 6,5 0 (0; 0)
ТИС	31,3 ± 18,3 38 (15; 45)	28,6 ± 18,2 27,5 (10; 40)**	36,9 ± 20,4 40 (17,5; 50)
Г/С	12 ± 18 7 (0; 12)	12,9 ± 14,8 7 (0; 22,5)	21,3 ± 24,8 12,5 (0; 32)
AUC	4178,7 ± 1500 4413 (2850; 5370)	5127 ± 1291** 4948 (4489; 5778)	3560,8 ± 1276,2 3544 (2522; 4637,5)
Стах	8,3 ± 5,3 6,9 (4,7; 9,9)	8,4 ± 3,4 8,2 (6,1; 9,9)	6,2 ± 3,1 6,2 (3,4; 9,0)
Вир. инфекция	56,5% *	19,1%	17,7%
3-летн. выж	43,0*	80,5	64,9

* p < 0,05 в сравнении с 2 остальными группами.

** p < 0,05 в сравнении с группой 3.

по сравнению с СNI-АА. С точки зрения морфологии распространенность нодулярного артериологалиноза у пациентов с ТМА оказалась более низкой, а распространенность фиброза интерстиция и атрофии канальцев – значительно более высокой, чем при СNI-АА без признаков ТМА. Выраженность гломерулосклероза при этом не различалась. Средние значения AUC были максимальными у пациентов с СNI-АА, и лишь при этой форме СNI-нефротоксичности они были значимо выше, чем при ХТН без признаков нефротоксичности СNI (табл. 3).

Клинико-морфологические корреляции при CNI-нефротоксичности

При CNI-АА без явлений ТМА выявлялась тесная корреляция между выраженностью нодулярного артериологиалиноза, оцененного по проценту пораженных артериол, и экспозицией циклоспорина, оцененной по площади под кривой концентрация–время (AUC). Коэффициент корреляции составил 0,375 ($p < 0,01$) (рис. 12а).

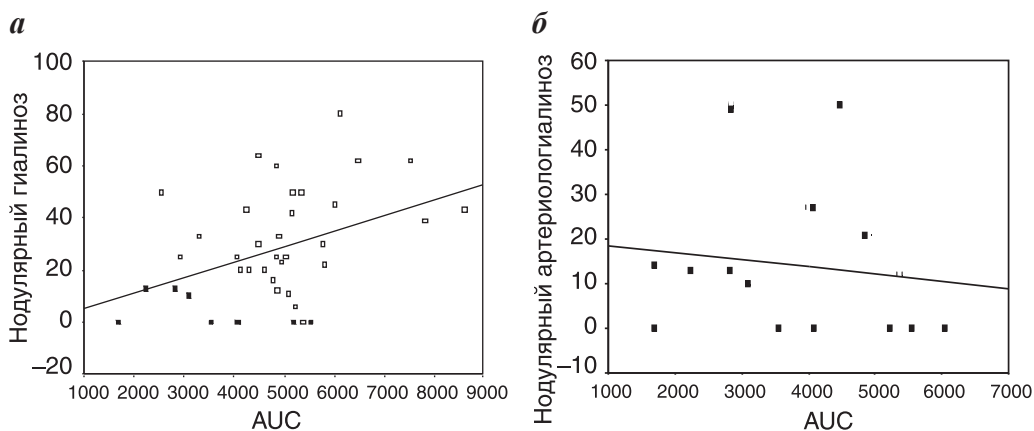


Рис. 12. Взаимосвязь между экспозицией циклоспорина, оцененной по AUC, и выраженностью нодулярного артериологиалиноза при CNI-АА без ТМА (А) и при ТМА

В отличие от этого при CNI-нефротоксичности, проявляющейся ТМА, выраженность артериологиалиноза, в большинстве случаев сопутствовавшего явлениям ТМА, так же, как и тяжесть поражения артериол (некротические и тромботические изменения), не зависела от фармакокинетических параметров ($r = -0,045$ и $r = -0,135$ соответственно; $P-NS$). Естественно, таким образом, предположить, что поражение артериол при CNI-индуцированной ТМА не носит дозозависимого характера (рис. 12б).

С другой стороны, обращает на себя внимание высокая частота сопутствующей ТМА вирусной инфекции. Она выявлялась в 56,5% (13 из 23 случаев), что оказалось значимо выше, чем при СуА-АА и ХТН (19,1 и 17,7% соответственно; $p < 0,05$). При этом преобладали случаи ЦМВ-инфекции (9 реципиентов), у 4 больных имела место тяжелая распространенная герпес-вирусная инфекция.

Подходы к профилактике поздней дисфункции трансплантата

Как следует из представленных данных, основными причинами поздней дисфункции трансплантата были варианты патологии, обусловленные недостаточно эффективной (острое и хроническое отторжение) либо избыточной (CNI-нефротоксичность) иммуносупрессией. Это определило разработку подходов к профилактике и лечению поздней дисфункции, которые включают в себя оптимизацию мониторинга и модуляцию иммуносупрессивной терапии.

Оптимизация мониторинга терапии циклоспорином

Исследование фармакокинетических параметров в зависимости от функционального состояния трансплантата было проведено у 83 пациентов.

По данным биопсии были выделены группы пациентов с острым отторжением, хронической СуА-нефротоксичностью, и стабильной дисфункцией трансплантата (включавшей случаи неспецифического нефросклероза (ХТН) либо гломерулонефрита). Еще 28 пациентов имели стабильную удовлетворительную функцию трансплантата.

Средние фармакокинетические показатели при различном функционально-морфологическом состоянии трансплантата представлены в табл. 4 и на рис. 12, из которых видно, что важнейшие фармакокинетические параметры у реципиентов со стабильной удовлетворительной функцией, как и у имевших стабильную дисфункцию трансплантата, оказались практически одинаковыми. В то же время выявлялись четкие различия в фармакокинетических параметрах при остром отторжении и СNI-нефротоксичности: уровень АUC при кризе отторжения оказался значимо ниже, а при СуА-нефротоксичности – значимо выше, чем при ХТН/ГН. Точно так же концентрация циклоспорина через 2 часа после приема препарата была снижена при кризе отторжения и повышена при СуА-нефротоксичности.

Таблица 4

Основные фармакокинетические параметры препаратов циклоспорина при различном функционально-морфологическом состоянии трансплантата

Группы		C0	Cmax	C2	AUC
1	Стабильная функция (n = 28)	132,0 (114,5; 175,5,0)	831,0 (675,0; 1163,0)	619,0 (359,5; 941,0)	4326,5 (2926,0; 5173,1)
2	ХТН/ГН *, ** (n = 25)	117,5 (103,8; 142,0)	837,0 (710,8; 998)	758,0 (366,3; 885,0)	3982,1 (3511,9; 4519,8)
3	Криз (n = 12)	102,0 (71,2; 127,3)	292,0* (1402,0; 634,0)	177,0** (115,5; 667,0)	1695,9** (1240,4; 3001,8)
4	СуА-токсичность (n = 18)	139,0 (123,3; 176,7)	934 (727,0; 1638,0)	885,5 (643,0; 1254,0)	4894,8* (4001,5; 6036,3)

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,01$ – в сравнении со всеми остальными состояниями трансплантата.

При этом важно подчеркнуть, что значения C0 во всех четырех сравниваемых группах практически не различались (рис. 13), что убедительно демонстрирует недостаточную эффективность определения C0 для мониторинга терапии циклоспорином по сравнению с АUC.

Для 2-часовой концентрации циклоспорина (C2) определить оптимальный уровень не удалось. При различных значениях этого показателя в диапазоне от 500 до 1000 нг/мл стабильная функция наблюдалась примерно с одинаковой частотой (66–68%).

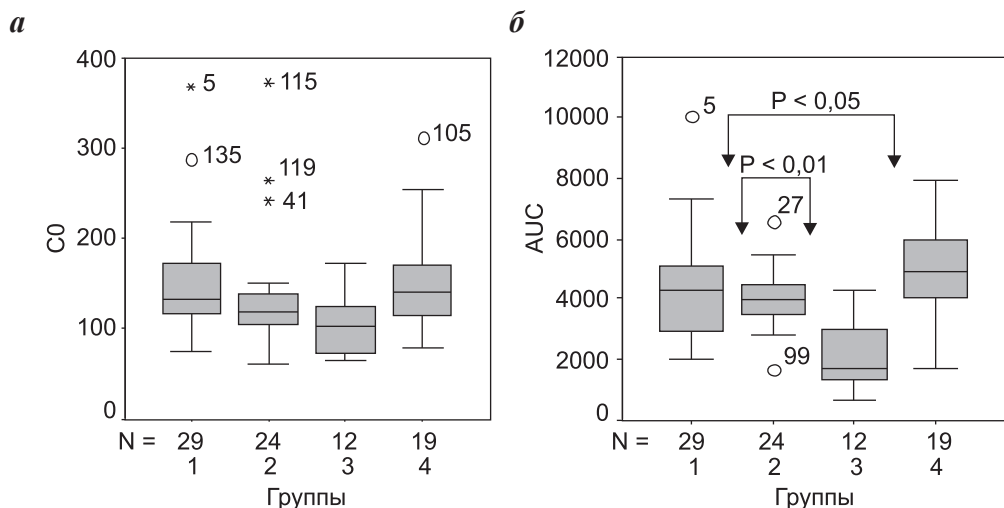


Рис. 13. Значения C0 (А) и AUC (Б) при различных состояниях трансплантата (1 – стабильная функция; 2 – ХТН/ГН; 3 – позднее отторжение; 4 – СуА-нефротоксичность

Одним из возможных объяснений этому факту могут быть значительные различия во времени достижения пика концентрации СуА (Tmax) у исследованных нами реципиентов. Время достижения максимальной концентрации СуА в крови колебалось от 1 до 8 часов, и лишь в 45% случаев оно составляло 2 часа. У 15% реципиентов максимальная концентрация препарата достигалась в течение первого часа после приема препарата, у 22% пациентов – через 3 часа и у 12% – через 4 часа после приема.

Таким образом, наши наблюдения не подтверждают исключительное значение C2 для характеристики максимальной концентрации циклоспорина в крови, что могло быть связано с применением не только оригинального, но и генерических препаратов циклоспорина. Использование же AUC для оценки экспозиции препарата также невозможно в клинической практике из-за крайней трудоемкости и дороговизны этого метода. Поэтому для уточнения вопроса об оптимальных фармакокинетических параметрах мы проанализировали корреляцию между значениями концентрации СуА в различных точках фармакокинетической кривой и измеренной AUC. Наиболее тесная связь была получена для C3. Еще более точные значения были получены при определении нескольких точек и расчете AUC по формулам, предложенным различными авторами. Наилучшие результаты были получены при определении 3 точек фармакокинетической кривой (C0, C1 и C3) и расчетом AUC по формуле, предложенной F. Gaspari [Gaspari F., 1997] (табл. 5, рис. 14).

С целью определения оптимальных значений расчетной AUC мы изучили частоту возникновения кризов отторжения и СуА-нефротоксичности при различных значениях этого параметра. Выяснилось, что при величине

Таблица 5

Корреляция между измеренными либо вычисленными параметрами фармакокинетической кривой и AUC, определенной в полном фармакокинетическом исследовании

Точки	C0	C1	C2	C3	C4	AP	AUC по C0 + C1 + C3	AUC по C0 + C2	AP по C0 + C1
r2	0,3	0,34	0,65	0,68	0,58	0,81	0,89	0,8	0,51

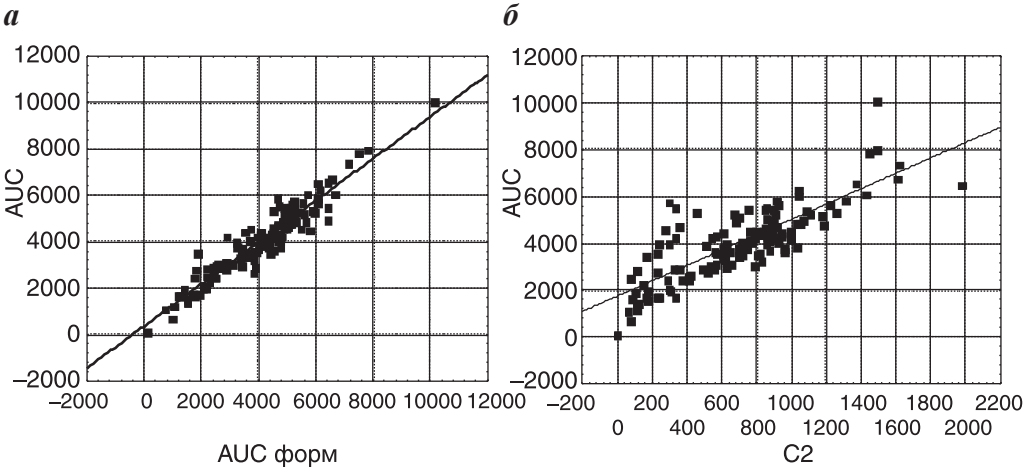


Рис. 14. Корреляция между AUC, вычисленной по формуле (а), и C2 (б) с AUC, полученной в полном фармакокинетическом исследовании

AUC < 3500 нг/мл/ч возрастала частота поздних кризов отторжения (38%), а при AUC более 4500 нг/мл/ч – частота СуА-нефротоксичности (46%), тогда как при значениях этого показателя от 3500 до 4500 нг/мл/мин кризов отторжения не наблюдалось вообще, а стабильная функция трансплантата имела место в 85% случаев.

Таким образом, оптимальным для поздних сроков после АТП представляется уровень AUC от 3500 до 4500 нг/мл/ч, при котором стабильная функция отмечалась у подавляющего числа пациентов (рис. 15).

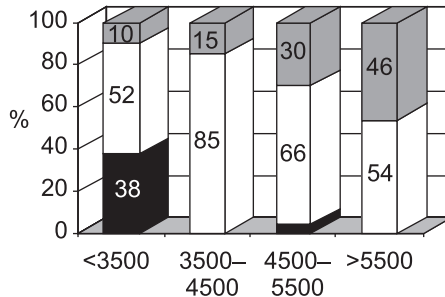


Рис. 15. Функционально-морфологическое состояние трансплантатов при различных значениях AUC

Таким образом, наши данные свидетельствуют о преимуществах определения AUC по 3 точкам фармакокинетической кривой перед мониторингом по C₂ в поздние сроки после АТП. Это исследование может быть рекомендовано всем пациентам с дисфункцией трансплантата, а у пациентов со стабильной функцией трансплантата оно может использоваться 1–2 раза в год в качестве профилактики как острого отторжения, так и нефротоксичности циклоспорина, особенно в условиях использования не только оригинального, но и генерических препаратов циклоспорина.

Значение препаратов микрофеноловой кислоты для профилактики и лечения поздней дисфункции трансплантата

Другим направлением в изучении путей повышения эффективности иммуносупрессии был анализ отдаленных результатов АТП в зависимости от применения в схеме ИСТ препаратов микрофеноловой кислоты, который выявил их существенные преимущества перед азатиоприном. Частота поздних кризов отторжения у пациентов, получавших азатиоприн, составила 7,8%, а поздняя дисфункция трансплантата – 26%, тогда как на фоне приема микрофенолатов эти показатели были равны 3,6 и 11% соответственно ($p < 0,05$).

В случае уже имеющейся дисфункции трансплантата микрофенолаты оказались высокоэффективны для торможения темпов прогрессирования нефропатии у пациентов с поздним кризом отторжения (2-летняя выживаемость составила 66 против 30% у получавших азатиоприн) (рис. 16).

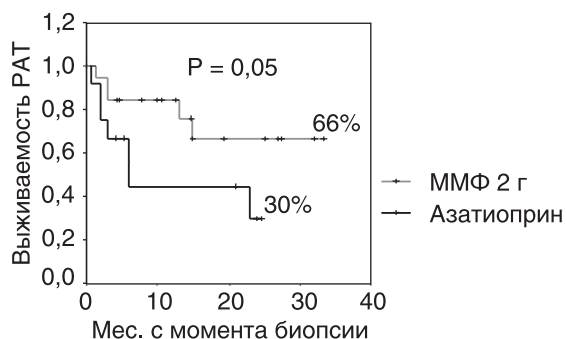


Рис. 16. Выживаемость трансплантатов с момента верификации диагноза у пациентов с острым отторжением трансплантата, получавших терапию микрофенолатами либо азатиоприном

Однако в случаях, когда дисфункция трансплантата была вызвана другими причинами (хроническое отторжение трансплантата, хроническая СNI-нефротоксичность, возвратная патология и др.), преимуществ микрофенолатов перед азатиоприном выявить не удалось: выживаемость трансплантатов в этих группах составила 65 и 61% у получавших азатиоприн либо микрофенолаты соответственно.

В целом на фоне приема препаратов микрофеноловой кислоты показатели выживаемости трансплантатов оказались более высокими по сравнению с

такowymi у пациентов, получавших азатиоприн (94 vs 89% к четырем годам наблюдения). Эти различия оказались статистически не значимыми, что, вероятно, связано с небольшим количеством анализируемых случаев и относительно короткими сроками наблюдения.

Однако описанные преимущества в эффективности терапии микофенолатами в составе 3-компонентной иммуносупрессивной терапии относились лишь к тем случаям, когда препарат был применен в полной дозе, составляющей 2 г/сут для селлсепта и 1,44 г/сут для майфортика. У 167 пациентов, получавших препарат нерегулярно либо в неполной дозе, никаких преимуществ перед азатиоприном, не отмечалось. Частота поздних кризов отторжения в этой группе оказалась даже несколько более высокой, чем на фоне приема азатиоприна, и составила 9,6 vs 7,8%. При этом в многофакторном анализе было выявлено самостоятельное независимое значение этого фактора: вероятность развития позднего отторжения была в 2,6 раза выше, чем при использовании полной дозы ММФ ($p = 0,01$), тогда как у пациентов, получавших азатиоприн, этот показатель был равен 2,2.

Среди всех случаев непереносимости препарата наиболее частой причиной снижения дозы либо его отмены оказались вирусные инфекции (прежде всего ЦМВ и герпес-вирус) – 30% случаев, гематологические осложнения (лейкопения, анемия) – 21%, осложнения со стороны ЖКТ (диарея, тошнота, рвота, боли в животе) – 10% и онкологические заболевания – 3%. Еще в 36% случаев причины отмены не были связаны с истинной непереносимостью препарата.

Подходы к лечению хронической дисфункции трансплантата

Иммуносупрессивная терапия у пациентов с хронической СNI-нефротоксичностью

Нефротоксичность ингибиторов кальциневрина является наиболее частой причиной изменения ИСТ, направленного на снижение дозы этих препаратов вплоть до полной их отмены. Однако снижение дозы ингибиторов кальциневрина без усиления других компонентов ИСТ ведет к ослаблению иммуносупрессивного эффекта в целом и увеличению риска развития острого отторжения. Возможными мерами предупреждения острого отторжения в таких случаях является терапия препаратами микофеноловой кислоты в полной дозе либо перевод пациентов на ИСТ на базе ингибиторов пролиферативного сигнала (ИПС), что позволяет значительно снизить дозу СNI и даже отказаться от их применения, сохраняя при этом высокую эффективность иммуносупрессии.

В группе пациентов, получавших низкую дозу СNI в сочетании с микофенолатами, положительный эффект (повышение СКФ на 10% и выше) непосредственно после коррекции дозы циклоспорина (первые 3 месяца) был достигнут в 49% случаев. В 32% случаев отмечалась стабилизация функции на уровне начальной ХПН и у 19% (12 из 63) пациентов отмечалось прогрессирующее снижение СКФ, в том числе потребовавшее возобновления

лечения ГД у 9 из них в течение первых 3 месяцев после коррекции дозы СНИ. За 3 года наблюдения потери РАТ составили 38% (23 пациента). Одной из причин быстрого прогрессирования дисфункции была ТМА как основное проявление нефропатии – она наблюдалась у 5 пациентов из 23 (22%). Однако у пациентов со стабилизацией функции ее частота была лишь незначительно более низкой (6 из 40 – 15%). Еще в 6 случаях (26%) причиной неблагоприятного исхода, по-видимому, было выявление нефропатии на поздней стадии, характеризующейся распространенным фиброзом интерстиция (более 50% площади паренхимы). В группе со стабилизацией функции таких пациентов было лишь 4 (10%). Острое отторжение на фоне снижения дозы циклоспорина было зафиксировано в 4 случаях. Однако судить об истинной частоте острого отторжения в данной группе не представляется возможным, поскольку повторные биопсии выполнялись редко даже в случае прогрессирующего снижения функции РАТ.

У 36 пациентов с морфологически верифицированной СНИ-нефротоксичностью была выполнена конверсия на ИСТ на базе ИПС (17 человек получали рапамицин и 19 – сертикан). Срок наблюдения составил от 4 до 24 месяцев (в среднем $12,5 \pm 5,2$ мес.). Доза циклоспорина снижалась до достижения целевой концентрации 30–50 нг/мл, с $214,5 \pm 55,8$ мг/сут до $95,0 \pm 36,7$ мг/сут, в среднем на 55,7%. У 5 пациентов ингибиторы кальциневрина были полностью отменены. Целевая концентрация ИПС составляла 3–8 нг/мл для пациентов, получавших низкие дозы циклоспорина, и 12–15 нг/мл в случаях полной отмены ингибиторов кальциневрина. Эффективность конверсии оценивали по динамике креатинина крови и СКФ. В целом перевод на ИПС оказался эффективным у 25 пациентов, с улучшением либо стабилизацией функции РАТ (69% от всех случаев). случаев морфологически верифицированного острого отторжения трансплантата не отмечалось, однако в 11 случаях отмечалось прогрессирование дисфункции. Потери трансплантата составили 19,4% (7 случаев из 36). В 5 случаях отмечались побочные эффекты – нарастание протеинурии.

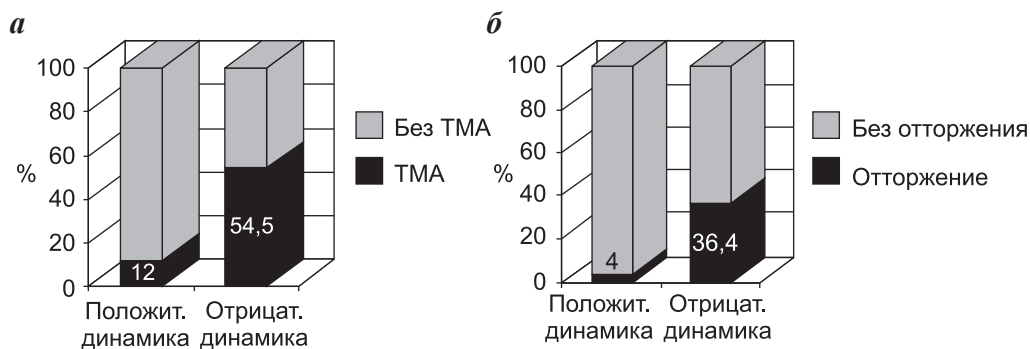


Рис. 17. Частота встречаемости ТМА (а) и элементов отторжения (б) по данным биопсии на момент конверсии на ИПС у пациентов с положительной и отрицательной динамикой клиренса креатинина

При проведении однофакторного анализа выяснилось, что у пациентов с прогрессирующим течением значительно чаще отмечалась ТМА как основное проявление нефротоксичности (6 случаев из 11 – 54,5%), а также сочетание признаков СНИ-нефротоксичности с элементами острого либо активного хронического отторжения (4 из 11 – 36,4%), тогда как в группе пациентов с положительной динамикой клиренса креатинина эти признаки встречались значительно реже: 12% для ТМА; и 4% для признаков отторжения ($p = 0,012$ и $p = 0,023$ соответственно) (рис. 17).

Распространенность интерстициального склероза также оказалась значительно большей у пациентов с прогрессированием нефропатии, где ее медиана составила 40% (25; 40) почечной паренхимы, тогда как в группе с положительной динамикой этот показатель был равен 25% (10; 40) ($p = 0,034$).

В целом перевод пациентов с признаками СНИ-нефротоксичности на терапию на базе ИПС привел к стабилизации функции РАТ у большинства пациентов: средние значения уровня креатинина снизились с 0,22 (0,17; 0,31) ммоль/л до 0,175 (0,15; 0,21) ммоль/л через месяц после конверсии и 0,17 (0,15; 0,28) ммоль/л к концу наблюдения. СКФ повысилась с 36,4 (23,1; 48,5) мл/мин до 47,6 (32,2; 63,4) мл/мин и 45,2 (25,4; 69,2) мл/мин соответственно (рис. 18).

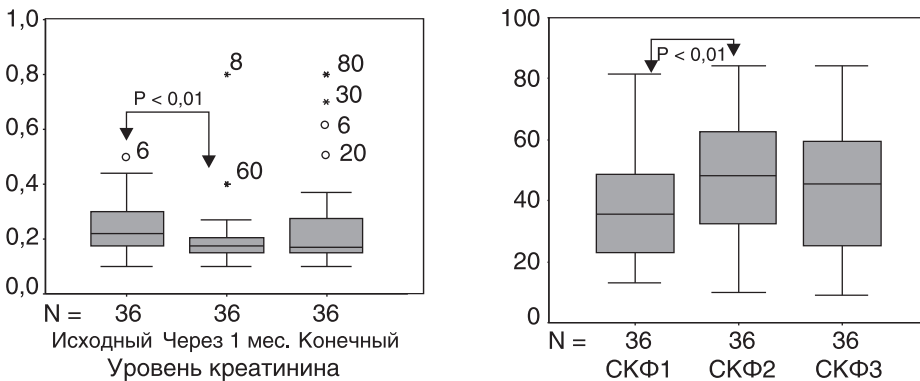


Рис. 18. Уровень креатинина (А) и СКФ (Б) у пациентов с СНИ-нефротоксичностью после конверсии на ИПС

При сравнении результатов вышеописанных подходов к лечению СуА-нефротоксичности оказалось, что 2-летняя выживаемость трансплантатов после снижения дозы СуА на фоне продолжавшейся терапии ММФ либо конверсии на ИПС не различалась, составляя 77,3 и 74,1% соответственно ($p = 0,87$) (рис. 19, а).

Наиболее тяжелым был прогноз в случаях СуА-токсичности, проявлявшейся ТМА. При этом из 17 пациентов с ТМА, получавших ММФ, 10 потеряли трансплантат в течение 2 лет с момента развития дисфункции, у 7 отмечалась стабилизация функции трансплантата, тогда как из 6 пациен-

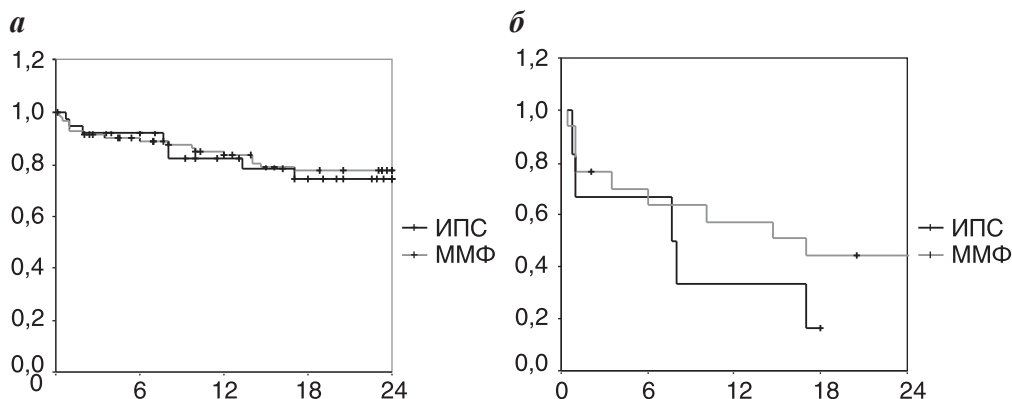


Рис. 19. Выживаемость трансплантов при СуА-нефротоксичности в целом (а) и при СуА-ассоциированной ТМА (б) в зависимости от режима иммуносупрессии

тов с ТМА, переведенных на ИПС, лишь в одном случае удалось сохранить функцию трансплантата. Таким образом, 2-летняя выживаемость составила 44,6 и 16,7% у получавших ММФ и ИПС соответственно. Несмотря на то что эти различия статистически не достоверны ($p = 0,25$), перевод пациентов с ТМА на терапию ИПС представляется нецелесообразным.

С другой стороны, в случаях СуА-нефротоксичности, не сопровождавшейся прогностически неблагоприятными факторами, такими как ТМА, сопутствующее острое отторжение и распространенный ТИС (более 50% паренхимы), 2-летняя выживаемость трансплантатов после снижения дозы СуА составила 100% независимо от режима ИСТ. Темпы прогрессирования нефропатии, оцененные по углу наклона величины обратной креатинину крови ($1/PCr$) у этих пациентов были минимальными и не различались между группами ($0,045 \pm 0,13$ и $0,067 \pm 0,17$; $p = 0,59$).

Таким образом, создается впечатление, что конверсия на ИПС эффективна у пациентов с СNI-ассоциированной нефропатией без признаков ТМА и сопутствующего отторжения, не сопровождающейся распространенным фиброзом интерстиция и атрофией канальцев. В случаях когда СNI-нефротоксичность проявляется ТМА, более оправданным представляется снижение дозы СNI на фоне поддерживающей терапии препаратами микофеноловой кислоты.

Тем не менее для оценки влияния конверсии на ИПС на темпы прогрессирования нефропатии за счет торможения формирования нефросклероза необходимы более длительные сроки наблюдения.

Подходы к лечению позднего острого и хронического отторжения

Для оценки эффективности конверсии на такролимус при остром и активном хроническом отторжении были проанализированы отдаленные результаты АТП у пациентов с этой патологией в зависимости от режима ИСТ. В исследуемую группу были включены 44 пациента с морфологически ве-

рифицированным отторжением, переведенных на ИСТ на базе такролимуса и находившихся под наблюдением не менее 6 мес. (либо до наступления «почечной смерти»). Контрольную группу составили 84 пациента, продолжавших терапию СуА после морфологической верификации отторжения и наблюдавшихся не менее 6 месяцев. Средняя длительность наблюдения составляла $10,5 \pm 7,5$ мес. в группе такролимуса и $22,5 \pm 21,2$ мес. в контрольной группе. Группы были сопоставимы по основным демографическим и клиническим показателям. Средний уровень креатинина плазмы на момент биопсии значимо не различался и составлял $0,34 \pm 0,19$ ммоль/л (медиана $0,29$ ммоль/л) в группе циклоспорина и $0,28 \pm 0,19$ ммоль/л (медиана $0,25$ ммоль/л) в группе такролимуса ($p = 0,13$). Морфологическая структура острого отторжения в обеих группах была сопоставима. Не различались группы и по морфологическим характеристикам трансплантата, непосредственно не связанным с отторжением, но отражающим состояние пересаженной почки, на фоне которого отторжение произошло, и потенциально имеющим значение для прогноза: так, распространенность ТИС составляла $27,2 \pm 19,7\%$ vs $33,1 \pm 20,4\%$ а выраженность гломерулосклероза – $11,1 \pm 14,4\%$ vs $11,3 \pm 17,0\%$ для циклоспорина и такролимуса соответственно.

В течение первых 6 месяцев наблюдения в группе пациентов, переведенных на такролимус, отмечалось улучшение функции трансплантата – снижение уровня креатинина с $0,25$ ($0,18; 0,3$) ммоль/л до $0,19$ ($0,15; 0,25$) ммоль/л и $0,17$ ($0,14; 0,27$) ммоль/л через 1 и 6 месяцев после конверсии ($p = 0,02$).

У пациентов, продолжавших терапию циклоспорином, отмечалась лишь кратковременная тенденция к улучшению функции трансплантата: снижение креатинина $0,30$ ($0,2; 0,41$) ммоль/л до $0,26$ ($0,17; 0,72$) ммоль/л в течение первого месяца, с последующим прогрессированием дисфункции и повышением креатинина до $0,30$ ($0,2; 0,8$) ммоль/л через 6 месяцев (рис. 20).

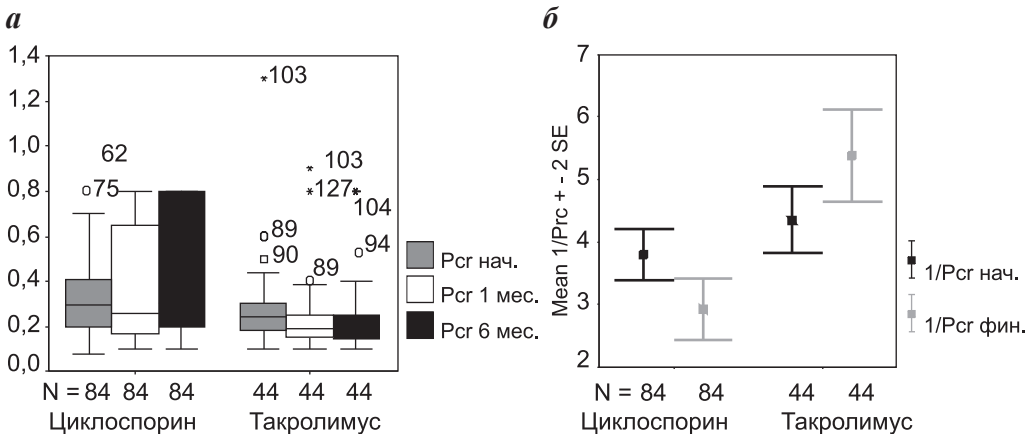


Рис. 20. Динамика функции трансплантата, оцененная по изменению уровня креатинина крови (а) и величины, обратной креатинину (1/Pср) (б), у пациентов с поздним отторжением трансплантата в зависимости от режима ИСТ

При анализе отдаленных результатов у пациентов, находившихся под наблюдением не менее 12 мес. (81 человек в группе циклоспорина и 24 человека в группе такролимуса), сохранялись те же закономерности: стабилизация функции в исследуемой группе по сравнению с прогрессирующим дисфункцией в контрольной группе. В целом динамика функции трансплантата за все время наблюдения, оцененная как по углу наклона величины, обратной уровню креатинина ($1/P_{\text{Cr}}/\text{мес.}$) так и по динамике СКФ (мл/мин/мес.), носила разнонаправленный характер ($p = 0,009$).

В целом данные однолетней выживаемости свидетельствуют о тенденции к улучшению прогноза в случаях конверсии: этот показатель составлял 84,2% на такролимусе и 63,2% на циклоспорине соответственно ($p = 0,01$) (рис. 21).

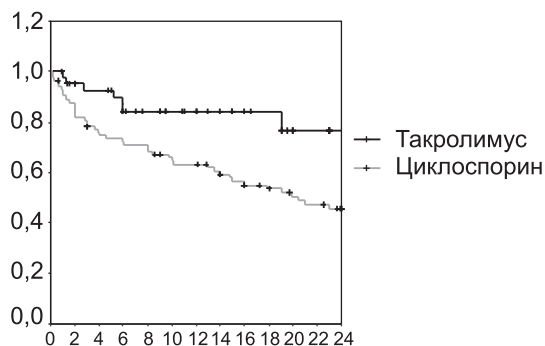


Рис. 21. Выживаемость трансплантатов при позднем остром либо активном хроническом отторжении в зависимости от режима ИСТ

При более подробном анализе отдельных частных случаев отторжения, таких как активное хроническое отторжение и пограничные изменения, отмечались сходные закономерности в темпах прогрессирования нефропатии, однако статистической значимости эти различия не достигали, возможно, из-за небольшого числа наблюдений.

Применение ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) для торможения прогрессирования поздней дисфункции трансплантата

Ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ) широко применяются в клинической нефрологии для торможения прогрессирования различных нефропатий. Учитывая важнейшее значение активации ренин-ангиотензиновой системы в возникновении и прогрессировании тубуло-интерстициального склероза независимо от его природы, назначение иАПФ считается патогенетически оправданным подходом к нефропротекции как в собственных почках, так и в трансплантате.

Для оценки нефропротективного эффекта иАПФ были проанализированы отдаленные результаты выживаемости трансплантатов у 367 пациентов с поздней дисфункцией трансплантата, сохранявших функцию трансплантата через месяц после морфологической верификации диагноза.

Различия в выживаемости трансплантатов, выявлявшиеся уже в течение первого года после верификации диагноза (70,9% vs 91,2%), сохранялись и усугублялись на протяжении последующих лет, к 5 годам наблюдения превышая 25% (45,4% vs 74,2%; $p = 0,0000$) (рис. 22, а).

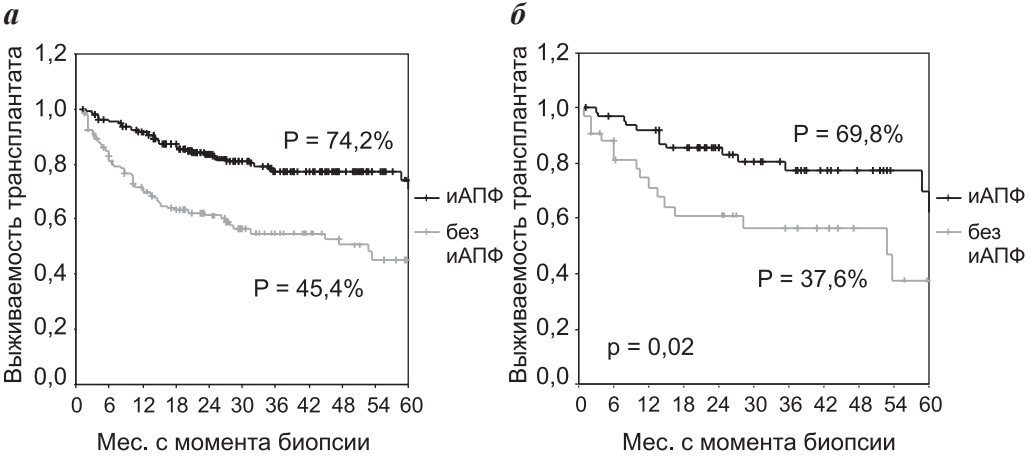


Рис. 22. Темпы прогрессирования поздней дисфункции в целом (а) и СНИ-нефротоксичности (б) в зависимости от применения иАПФ

При анализе нефропротективного действия иАПФ в зависимости от типа дисфункции оказалось, что этот эффект был наиболее выраженным при СНИ-нефротоксичности (рис. 22, б).

В случаях отторжения (острого и хронического), так же как и при неспецифическом нефросклерозе и гломерулонефрите трансплантата, отмечалась лишь тенденция к снижению темпов прогрессирования нефропатии на фоне приема иАПФ (65,3% vs 53,6%; $p = 0,17$; 77,9% vs 56,7%; $p = 0,1$ и 86,7% vs 81,5%; $p = 0,5$ соответственно).

Таким образом, применение ингибиторов АПФ у реципиентов с хронической дисфункцией почечного трансплантата позволяет замедлить темпы прогрессирования нефропатии и улучшить отдаленные результаты АП. Особенно эффективны эти препараты при поражении трансплантата, индуцированном нефротоксическим действием ингибиторов кальциневрина.

ВЫВОДЫ

1. Хроническая дисфункция трансплантата значительно ухудшает отдаленные результаты трансплантации почки, снижая 5-летнюю выживаемость трансплантатов с 95% у пациентов без хронической дисфункции до 69% при ее наличии. Стойкая дисфункция трансплантата развивается почти у 40% реципиентов к 5 годам после операции, причем примерно у половины из них она наблюдается непосредственно с момента трансплантации (неполное восстановление функции).

2. Основным фактором риска развития дисфункции трансплантата является неадекватность (недостаточность либо избыточность) иммуносупрессивной терапии, которая выявлена почти в 2/3 всех случаев снижения функции трансплантата в поздние сроки после АТП. Важнейшими причинами хронической дисфункции трансплантата по данным пункционных биопсий оказалась хроническая нефротоксичность ингибиторов кальциневрина (27,5% случаев), острое (24,2%) и хроническое (9,4%) отторжение трансплантата. К более редким причинам относятся неспецифический фиброз интерстиция и атрофия канальцев (17,7%) и хронический гломерулонефрит трансплантата – возвратный либо развившийся *de novo* (15,3%).
3. Темпы прогрессирования дисфункции трансплантата и, соответственно, отдаленный прогноз, определяются прежде всего природой дисфункции и ее морфологическим субстратом. Наиболее тяжелым прогнозом характеризуется дисфункция трансплантата, обусловленная активацией иммунного ответа (3-летняя выживаемость трансплантатов составляет 49,6 и 40,2% при остром и хроническом отторжении). Несколько благоприятнее прогноз при хронической CNI-нефротоксичности и неспецифическом нефросклерозе (66,8 и 68,9% соответственно). При острой CNI-нефротоксичности и хроническом гломерулонефрите прогрессирование дисфункции было минимальным (100 и 82,3% с момента верификации диагноза соответственно).
4. Основным фактором, определяющим вероятность ответа на терапию и исход острого позднего отторжения, является уровень креатинина на момент верификации диагноза, который, в свою очередь, определяется характером иммунного ответа (активация преимущественно клеточного либо клеточного и гуморального звена иммунитета), типом отторжения (интерстициальный либо сосудистый его вариант) и распространенностью тубуло-интерстициального склероза. Каждый из перечисленных морфологических факторов имеет самостоятельное статистически значимое влияние на прогноз позднего отторжения.
5. Хроническая нефротоксичность ингибиторов кальциневрина может проявляться двумя принципиально различными по своей природе формами – CNI-ассоциированной артериолопатией в сочетании с интерстициальным склерозом и тромботической микроангиопатией. Первая является дозозависимым процессом, морфологические проявления которого тесно коррелируют с экспозицией циклоспорина, оцененной по площади под кривой «концентрация – время» (AUC), тогда как вероятность развития тромботической микроангиопатии не зависит от фармакокинетических параметров, но может провоцироваться действием других эндотелиотоксических факторов, таких как вирусная инфекция.
6. Традиционно используемый для мониторинга терапии циклоспорином показатель его концентрации в крови натошак (C0) недостаточно четко коррелирует с экспозицией препарата и клинико-функциональным

состоянием трансплантата. В условиях использования не только оригинального, но и генерических препаратов циклоспорина оптимальным является мониторинг с определением 3 точек фармакокинетической кривой (C₀, C₁ и C₃) и расчетом AUC по формуле Gaspary. Оптимальные значения для AUC, вычисленной по этой формуле, находятся в диапазоне от 3500 до 4500 нг/мл/ч.

7. Использование препаратов микофеноловой кислоты в составе 3-компонентной иммуносупрессивной терапии на основе циклоспорина более эффективно, чем применение азатиоприна как для предупреждения острого отторжения, так и для торможения темпов его прогрессирования, но при условии их регулярного приема в полной дозе (2,0 г/сут для ММФ и 1,44 г/сут для микофенолата натрия).
8. Конверсия с циклоспорина на такролимус повышает эффективность лечения позднего острого и активного хронического отторжения, обеспечивая повышение 1-летней выживаемости трансплантата на 20% по сравнению с продолжением иммуносупрессии на основе циклоспорина.
9. При хронической CNI-нефротоксичности возможны два подхода к профилактике и лечению: снижение дозы CNI на фоне поддерживающей терапии препаратами микофеноловой кислоты либо назначение ингибиторов пролиферативного сигнала (сиролимус, эверолимус) с одновременной минимизацией дозы циклоспорина. Однако второй подход противопоказан в случаях CNI-нефротоксичности, проявляющейся ТМА, и при сопутствующем остром отторжении. Эффективность назначения ингибиторов пролиферативного сигнала снижается при распространенном нефросклерозе (более 50% паренхимы).
10. Использование ингибиторов АПФ/блокаторов рецепторов к ангиотензину II тормозит прогрессирование хронической дисфункции трансплантата, что способствует повышению 5-летней выживаемости трансплантатов на 30%, причем эффект проявляется в максимальной степени при CNI-индуцированной нефропатии.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Биопсия почки является единственным методом диагностики причины хронической дисфункции и должна выполняться во всех случаях развития подобной дисфункции независимо от срока после АТП.

Для оценки тяжести острого отторжения и определения оптимальной тактики его лечения помимо изучения светооптической картины необходимо выполнение иммунофлуоресцентного исследования с определением C4d-фрагмента комплемента.

Морфологические варианты CNI-нефротоксичности (CNI-ассоциированная артериолопатия и тромботическая микроангиопатия) различаются по механизмам развития, клинической картине, сроках и частоте развития, особенностям течения и прогнозу, что требует и различных подходов к терапии.

Всем пациентам с дисфункцией трансплантата должно выполняться укороченное фармакокинетическое исследование с определением концентрации циклоспорина натощак и через 1 и 3 часа после приема препарата и расчетом AUC по формуле.

В случаях острого и активного хронического отторжения может быть рекомендована конверсия с циклоспорина на такролимус.

При развитии хронической дисфункции трансплантата, обусловленной нефротоксическим действием ингибиторов кальциневрина, конверсия на ингибиторы пролиферативного сигнала может быть рекомендована пациентам, по данным биопсии не имеющим признаков ТМА и сопутствующего отторжения трансплантата, а также при распространенности интерстициального склероза и атрофии канальцев менее 25% площади паренхимы. В случаях СNI-нефротоксичности, проявляющейся ТМА, переход на ингибиторы пролиферативного сигнала нецелесообразен.

Фармакологическая блокада PAC целесообразна при всех видах хронической дисфункции трансплантата и особенно в случаях нефросклероза, развившегося в результате нефротоксического действия ингибиторов кальциневрина. Назначение иАПФ и БРА в этих случаях позволяет добиться значительного снижения темпов прогрессирования нефропатии.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Томилина Н.А., Ким И.Г., Столяревич Е.С., Бирюкова Л.С., Багдасарян А.Р., Ильинский И.М.* Проблема отдаленных результатов трансплантации почки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2002. – № 3. – С. 58
2. *Томилина Н.А., Столяревич Е.С., Багдасарян А.Р., Ким И.Г., Суханов А.В., Тырин В.В., Ильинский И.М.* Хроническая трансплантационная нефропатия: патогенетические механизмы, подходы к лечению // Нефрология. – 2003. – Т. 7, приложение 1. – С. 66–67.
3. *Bagdasaryan A.R., Stolyarevich E.S., Suckhanov A.V., Iljinsky I.M., Tomilina N.A.* Renoprotective effect of enalapril in chronic allograft nephropathy // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2003. – Vol. 18. – Suppl. 4. – P. 499.
4. *Багдасарян А.Р., Столяревич Е.С., Ким И.Г., Суханов А.В., Ильинский И.М., Томилина Н.А.* Влияние эналаприла на скорость прогрессирования хронической трансплантационной нефропатии // Нефрология и диализ. – 2003. – Т. 5, № 1. – С. 33–42.
5. *Багдасарян А.Р., Столяревич Е.С., Суханов А.В., Тырин В.В., Федорова Н.Д., Томилина Н.А.* Ренопротективный эффект эналаприла при различных клинических вариантах хронической трансплантационной нефропатии // Нефрология и диализ. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 287–288.
6. *Столяревич Е.С., Суханов А.В., Багдасарян А.Р., Томилина Н.А.* К вопросу об оптимизации мониторинга терапии препаратами циклоспорина в поздние

- сроки после аллотрансплантации почки // Нефрология и диализ. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 145–154.
7. *Суханов А.В., Столяревич Е.С., Котенко О.Н., Томилина Н.А.* Хроническая нефротоксичность циклоспорина А: функционально-морфологическая характеристика и клинические проявления в поздние сроки после аллотрансплантации почки // Нефрология и диализ. – 2004. – Т. 6, № 2. – С. 170–177.
 8. *Томилина Н.А., Багдасарян А.Р., Столяревич Е.С., Суханов А.В., Ильинский И.М., Тырин В.В.* Ренопротективный эффект эналаприла при хронической трансплантационной нефропатии. Терапевтический архив. – Т. 6. – 2004.
 9. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Tomilina N.A.* Cyclosporine pharmacokinetics in long-term Kidney graft recipients and relation to renal graft pathology. Abstract book of the XLI ERA-EDTA Congress. Lissbon. May 2004.
 10. *Sukhanov A.V., Stolyarevich E.S., Kotenco O.N., Tomilina N.A.* Cyclosporine-associated arteriopathy correlates with blood CsA-levels measured by AUC // Journal of American Society of Nephrology. – Oct. 2004. – Vol. 15. – P. 754.
 11. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Bagdasaryan A.R., Ilyinsky I.M., Kotenco O.N., Tomilina N.A.* The relation between the efficacy of enalapril for the prevention of CAN progression and the grade of glomerulosclerosis Nephrology Dialysis Transplantation. – June 2005. – Vol. 20, Suppl. 5. – P. 173.
 12. *Столяревич Е.С.* Симпозиум «Новое в терапии микофенолатами. Майфортик – шаг вперед» // Нефрология и диализ. – 2005. – Т. 7, № 2. – С. 188–192.
 13. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Bagdasaryan A.R., Kotenco O.N., Tomilina N.A.* The efficacy of enalapril for the prevention of CAN progression depends on the grade of interstitial fibrosis. Nephrology. – June 2005. – Vol. 10, (Suppl). – P. 222.
 14. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Bagdasaryan A.R., Kotenko O.N., Tomilina N.A.* Enalapril attenuate the progression of Cyclosporine nephropathy. Transplant international. – Vol. 18, Suppl 1. – P. 137.
 15. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Kotenko O.N. and Tomilina N.A.* Late renal allograft dysfunction: causes and outcome Abstract book of the XLI III ERA-EDTA Congress. Glasgow. – July 2006. – P. 508.
 16. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Kotenko O.N., Frolova N.F. and Tomilina N.A.* Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation: the prevalence, probable causes and prognosis // Am. J. Transplant. – 2006. – 6 (Suppl 2). – P. 948.
 17. *Stolyarevich E.S., Baranova F.S., Kotenko O.N., Tomilina N.A.* Pharmacokinetic characteristics and clinical efficacy of generic cyclosporine formulations compared to Sandimmune Neoral // Supplement to American Journal of transplantation and Transplantation // Am. J. Transplant. – 2006. – 6 (Suppl 2).
 18. *Столяревич Е.С.* Сандиммун-Неорал и генерические препараты циклоспорина; проблема взаимозаменяемости // Нефрология и диализ. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 141–147.
 19. *Stolyarevich E.S., Sukhanov A.V., Rudakova L.Y., Kotenko O.N. and Tomilina N.A.* Histologic features associated with poor prognosis of late acute rejection Abstract book of the XLI IV ERA-EDTA Congress. Barselona June 2007.
 20. *Ягудина Р.И., Куликов А.Ю., Толкушин А.Г., Столяревич Е.С.* Фармакоэкономические аспекты иммуносупрессивной терапии Сандиммуном Неоралом и

- генерическими препаратами циклоспорина при трансплантации почки // Нефрология и диализ. – 2007. – Т. 9, № 4. – С. 395–401.
21. **Столяревич Е.С., Ведерникова Р.Н., Томилина Н.А.** Переносимость препаратов микофеноловой кислоты у пациентов с гастроинтестинальными побочными эффектами на поздних сроках после аллотрансплантации почки // Нефрология и диализ. – 2007. – Т. 9, № 2. – С. 180–186.
 22. **Мойсюк Я.Г., Столяревич Е.С., Томилина Н.А.** Болезни почечного трансплантата. Нефрология Национальное руководство. – 2009. – С. 629–682.
 23. **Stolyarevich E.S., Artyukhina L.Y., Frolova N.F., Kurenkova L.G., Tomilina N.A.** Results of conversion to everolimus in patients presenting with calcineurin inhibitor nephrotoxicity // Abstract book of the XIV ESOT Congress. Paris. September 2007.
 24. **Столяревич Е.С., Томилина Н.А.** Поздняя дисфункция трансплантированной почки: морфологическая структура, критерии диагностики // Трансплантология. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 19.
 25. **Столяревич Е.С., Томилина Н.А.** Поздняя дисфункция трансплантированной почки: причины, морфологическая характеристика, подходы к профилактике и лечению // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 114–122.

**АВТОРЕФЕРАТЫ ДИССЕРТАЦИЙ
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА НАУК**

Великий Дмитрий Алексеевич

**ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ
КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ
НАРУШЕНИЙ ПРИ АУТОИММУННОМ
САХАРНОМ ДИАБЕТЕ I ТИПА
(экспериментальное исследование)**

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

14.03.03 Патологическая физиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор

Онищенко Нина Андреевна

Поздняков Олег Михайлович

Актуальность темы

Несмотря на определенные достижения медикаментозной терапии последних лет, сахарный диабет (СД) и его тяжелые сосудистые осложнения по-прежнему остаются одной из ведущих причин ранней инвалидизации и гибели людей во всех странах мира [Gillespie К.М., 2006]. По современным представлениям, СД I типа является тяжелым прогрессирующим аутоиммунным заболеванием, в основе которого лежит глубокая дисрегуляция иммунной системы, при которой имеет место повышенный апоптоз и гибель островковых клеток поджелудочной железы на фоне ингибирования их восстановительной регенерации.

В последние годы во всем мире стали активно изучаться возможности применения клеточных технологий, в частности трансплантации стволо-

вых/прогениторных клеток костного мозга (ККМ), для индукции восстановительных процессов в поврежденных органах. Была показана эффективность применения этих клеток при моделировании на животных заболеваний сердечно-сосудистой системы [Pittenger M.F., Martin B.J., 2004; Iso Y. et al., 2007], опорно-двигательного аппарата [De Kok I.J. et al., 2003; Awad H.A. et al., 2003; Murphy J.M. et al., 2003], неврологических нарушений [Iihoshi S. et al., 2004; Zappia E. et al., 2005; Zhang J. et al., 2005], повреждений легких, печени, почек [Ortiz L.A. et al., 2003; Fang B. et al., 2004; Togel F. et al., 2005]; в клинической практике ККМ использовали для восстановления функции сердца [Perin E.C. et al., 2003; Stamm C. et al., 2004; Rosenzweig A., 2006], регенерации костной ткани [Arthur A. et al., 2009] и ингибирования реакции «трансплантат против хозяина» [Ringden O. et al., 2006].

Показана терапевтическая эффективность ККМ (моноклеарной и стромальной фракций) и на экспериментальных моделях некоторых аутоиммунных заболеваний [van Bekkum D.W., 2004; Zappia E. et al., 2005; Zhang J. et al., 2005; Augello A. et al., 2007], которая, как полагают, связана с коррекцией популяционного состава иммунорегуляторных клеток [Herrmann M.M. et al., 2005; de Kleer I. et al., 2006] и достигается устранением цитокинового дисбаланса в организме [Aggarwal S., Pittenger M.F., 2005].

Приступая к своим исследованиям, мы полагали, что применение стволовых/прогениторных ККМ при СД I типа, при котором роль аутоиммунных механизмов повреждения островковых клеток патогенетически значима, может оказаться весьма перспективным способом коррекции клинических проявлений СД I типа. Однако исследований по коррекции ККМ аутоиммунного СД I типа мы не обнаружили. Только в работе Hasegawa et al. (2007) были приведены результаты коррекции аутоиммунного СД I типа ККМ. Но в этой работе были использованы животные, генетически предрасположенные к развитию СД I типа, следовательно, результаты, полученные в этих опытах, дают искаженное представление о возможностях реагирования адаптивных систем организма, и потому генетическая модель не может быть использована для оценки эффективности восстановительных процессов в островковых клетках поджелудочной железы у животных с аутоиммунным СД I типа без генетических дефектов развития их иммунной системы.

Обычно используемые экспериментальные модели СД I типа – аллоксановая и стрептозотоциновая – являются цитотоксическими, избирательно повреждают β -клетки поджелудочной железы и сопровождаются фиброзирующей регенерацией поджелудочной железы без сопутствующего развития в ней аутоиммунного повреждения [Nir T. et al., 2007].

Отсутствие адекватной модели аутоиммунного СД I типа на генетически не предрасположенных животных и отсутствие данных об эффективности коррекции патогенетических нарушений СД I типа на такой экспериментальной модели путем трансплантации аутологичных ККМ позволило нам сформулировать цели и задачи настоящего исследования.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение эффективности трансплантации аутологичных клеток костного мозга для коррекции патогенетических нарушений на модели аутоиммунного СД I типа.

Для достижения указанной цели нами были поставлены следующие задачи:

Создать адекватную модель аутоиммунного СД I типа и оценить ее пригодность для изучения иммунных механизмов развития аутоиммунного СД I типа и эффективности клеточной терапии при этом заболевании.

Оценить целесообразность предварительного культивирования аутологичных клеток костного мозга от животных с аутоиммунным СД I для восстановления функциональной и биорегуляторной активности этих клеток.

Выявить наличие функционально активных трансплантированных клеток костного мозга (маркер – GFP) в органах животных с аутоиммунным СД I типа при длительных сроках наблюдения (60 суток) и установить связь присутствия жизнеспособных клеток с восстановлением функции поврежденных органов.

Сравнить эффективность коррекции клинических, морфологических и иммунных нарушений при СД I типа в зависимости от дозы (кратности введения) аутологичных клеток костного мозга.

Сравнить эффективность коррекции клинических, морфологических и иммунных нарушений при СД I типа в зависимости от стадии (тяжести) развития заболевания.

Связать терапевтическую роль клеток костного мозга с восстановлением структуры и функции органов иммуногенеза, устранением иммунной дисрегуляции в организме и индукцией иммунной толерантности для коррекции клинических проявлений, развивающихся при аутоиммунном СД I типа.

Выполнение работы осуществлялось в рамках темы: «Разработка методов лечения сахарного диабета I типа аутологичными клетками костного мозга» по заданию Минздравсоцразвития РФ на 2007–2010 гг. (регистрационный номер 0120.0800280 от 04.12.07 г.).

Научная новизна

Впервые для изучения патогенетических нарушений при аутоиммунном СД I типа и их коррекции методами клеточной терапии разработана и охарактеризована иммунопатологическая модель аутоиммунного СД I типа у генетически не предрасположенных животных. Новизна модели подтверждена выдачей патента на изобретение № 2400822 «Способ моделирования сахарного диабета I типа у крыс» от 27.09.2010. Гистологическими и морфометрическими методами показано, что при моделировании СД I типа имеет место уменьшение площади островков Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы (ПЖ), снижение количества β -клеток в них, а также наличие выраженной воспалительной инфильтрации в ОЛ ПЖ. Установлено, что развитие аутоиммунного СД I типа сопровождается по-

вышением уровня провоспалительных цитокинов в организме на фоне гипоплазии ткани селезенки. Показано, что среди клеток воспалительного инфильтрата находятся различные популяции Т-клеток, с присутствием которых связано поддержание аутоиммунного воспаления в ОЛ ПЖ. Аутоиммунный механизм повреждения инсулярного аппарата островковой ткани ПЖ подтвержден выполнением адоптивного переноса СД интактным животным путем трансплантации спленоцитов от животных с аутоиммунным СД I типа.

Показано, что при использовании аутологичных ККМ для лечения аутоиммунного СД I типа необходимо проводить предварительное культивирование этих клеток для восстановления их биорегуляторной активности, ингибированной хроническим заболеванием (стрессом).

Установлено, что эффективность коррекции патогенетических нарушений у животных с аутоиммунным СД I типа при трансплантации аутологичных ККМ находится в непосредственной зависимости от суммарной дозы (кратности введения) клеток, а также от стадии развития заболевания. При этом более выраженный эффект был отмечен при многократной трансплантации ККМ на начальной стадии заболевания, что характеризовалось наиболее выраженным снижением уровня глюкозы по сравнению с другими экспериментальными сериями, достоверно более значительным повышением площади ОЛ ПЖ и количества β -клеток в них, а также снижением выраженности воспалительной инфильтрации ОЛ ПЖ. Показано, что многократная трансплантация ККМ на начальной стадии заболевания сопровождается также новообразованием островков вблизи протоков ПЖ.

Показано, что аутологичные ККМ нормализуют углеводный обмен на фоне устранения иммунной дисрегуляции в организме и восстановления морфофункциональных компартментов органов иммуногенеза (тимус и селезенка), дисфункция которых развивается при аутоиммунном СД I типа, а также на фоне снижения уровня провоспалительных цитокинов. При пилотном исследовании содержания Т-регуляторных клеток установлено, что ККМ тормозят процессы активации иммунной реактивности при СД I типа, и это происходит за счет повышения содержания клеток с супрессивными свойствами. Впервые высказано предположение, что корригирующий эффект клеточной терапии аутологичными ККМ является результатом коррекции и восстановления иммунного баланса в организме за счет восстановления морфофункциональной активности центральных органов иммуногенеза и активации процессов как центральной, так и периферической толерантности.

Практическая значимость работы

Разработана иммунопатологическая модель аутоиммунного СД I типа у крыс, на которой были изучены иммунные механизмы развития данного заболевания; показана связь их развития с торможением процессов репаративной регенерации органов иммуногенеза, а также изучены условия и

показана возможность коррекции нарушений, возникающих при аутоиммунном СД I типа, методами клеточной терапии.

Показано, что для осуществления эффективной терапии СД I типа необходимо осуществить иммунокоррекцию в организме с помощью тканевых регуляторных пептидов, выделяемых ККМ для индукции иммунной толерантности и активации процессов репаративной регенерации поврежденных органов. Установлено, что клеточную терапию культивированными аутологичными ККМ целесообразно использовать как на начальной стадии, так и на стадии развернутых клинических проявлений СД I типа, но особенно клеточная терапия показана на начальной стадии заболевания, то есть на этапе сохранения в организме резервов восстановительной регенерации как островкового аппарата, так и органов иммуногенеза, способствующих поддержанию процессов толерантности.

Установлена необходимость предварительного культивирования аутологичных ККМ для восстановления их исходно нарушенной биорегуляторной (иммунорегуляторной) активности. Показано, что эффективность трансплантации ККМ для коррекции патогенетических нарушений при СД I типа зависит от суммарной дозы (кратности введения) клеток, а также от стадии развития заболевания.

Показано, что наиболее выраженный эффект коррекции клинических, иммунологических и морфологических нарушений в организме животных с аутоиммунным СД I типа наблюдается при многократной трансплантации ККМ на начальной стадии развития заболевания. Однократная трансплантация ККМ как на начальной стадии, так и на стадии развернутых клинических проявлений СД I типа, и многократная трансплантация ККМ на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа снижают темпы развития необратимых нарушений во внутренних органах и потому являются целесообразной процедурой в комплексной терапии аутоиммунного СД I типа.

Положения выносимые на защиту

Разработанная иммунопатологическая модель аутоиммунного СД I типа является адекватной экспериментальной моделью, так как воспроизводит клинические, иммунологические и морфологические нарушения в организме, свойственные данному заболеванию. Эта модель может быть использована для оценки эффективности новых способов коррекции патогенетических нарушений при аутоиммунном СД I типа, в том числе при трансплантации аутологичных ККМ.

Предварительное культивирование моноклеарных и стромальных клеток аутологичного костного мозга *in vitro* является важным этапом подготовки их к проведению клеточной терапии аутоиммунного СД I типа, так как позволяет устранить иммунодисрегуляторное влияние на них хронического патологического (аутоиммунного) процесса и восстановить их биорегуляторную активность.

Эффективность коррекции патогенетических нарушений при аутоиммунном СД I типа путем трансплантации аутологичных ККМ зависит от суммарной дозы (кратности введения) клеток, а также от стадии развития заболевания.

Наиболее выраженный клинический эффект, характеризующийся длительной нормализацией уровня гликемии, устранением иммунной дисрегуляции в организме и активацией процессов репаративной регенерации в островковой ткани поджелудочной железы и других органах наступает при многократной трансплантации аутологичных ККМ на начальной стадии развития аутоиммунного СД I типа.

Апробация диссертации

Апробация диссертации состоялась 29 сентября 2010 г. на заседании объединенной межлабораторной научной конференции ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Материалы и основные положения работы доложены и обсуждены: на IX Съезде научного общества гастроэнтерологов России (г. Москва, 2–5 марта 2009 г.); на конференции «Клеточные технологии и регенеративная медицина в хирургии и трансплантологии» (г. Москва, 2009 г.); на Всероссийской конференции «Клеточные исследования и технологии в современной биомедицине» (г. Тула, 9–10 ноября 2009 г.); на V Всероссийском съезде трансплантологов (г. Москва, 8–10 октября 2010 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 5 в центральных рецензируемых журналах. По теме диссертации получен патент на изобретение № 2400822 «Способ моделирования сахарного диабета I типа у крыс» от 27.09.2010 г.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 144 страницах печатного текста. Состоит из введения, обзора литературы (глава I), характеристик материала и методов исследования (глава II), результатов собственных исследований (глава III и IV), обсуждения полученных результатов (глава V), выводов, практических рекомендаций и списка цитированной литературы (185 источников, из них 16 – отечественных и 169 – зарубежных). Работа иллюстрирована 41 рисунком и 10 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика экспериментального материала. Для решения поставленных задач работа проводилась по трем основным направлениям – по пути создания адекватной модели аутоиммунного СД I типа на генетичес-

ки не предрасположенных животных и изучения динамики патофизиологических изменений в состоянии этих животных; по пути отработки протокола получения и применения клеточных технологий и по пути изучения эффективности коррекции клинических и морфологических проявлений СД I типа с помощью аутологичных ККМ.

Вся эта работа была выполнена на 365 экспериментальных животных, из которых 345 – крысы породы Wistar и 20 – трансгенные мыши линии B10.GFP. Все экспериментальные животные содержались в условиях свободного доступа к воде и пище на рациональном питании, соответствующем нормативам ГОСТа. Все исследования проводились в лаборатории биотехнологии стволовых клеток ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ. Распределение животных по разделам экспериментальной работы представлено в табл. 1.

В I разделе обрабатывалась технология моделирования аутоиммунного СД I типа, а также были получены биохимические, морфологические и патофизиологические доказательства создания адекватной иммунопатологической модели аутоиммунного СД I типа. Во II разделе обрабатывалась технология получения первичных культур мононуклеарных клеток (МНК) и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга (КМ) и устанавливались сроки их прекультивирования. Срок формирования монослоя при культивировании ММСК КМ от животных с аутоиммунным СД I типа рассматривался как оптимальный срок для культивирования ММСК; была установлена пригодность использования флуоресцирующих ККМ от трансгенных мышей B10.GFP с геном зеленого белка для маркировки введенных в организм клеток; установлены сроки пребывания меченых клеток в организме в жизнеспособном состоянии. В III разделе работы были получены и изучены терапевтические эффекты трансплантации аутологичных ККМ (мононуклеарной и стромальной фракций) при аутоиммунном СД I типа у крыс.

В III разделе работы было выполнено 4 серии опытов с внутривенным (в хвостовую вену) введением ККМ. В 1-й серии опытов забор ККМ производили однократно через 7 суток после окончания моделирования СД I типа (на начальной стадии заболевания). Из полученной порции ККМ выделяли две фракции клеток, которые вводили последовательно: МНК КМ – после 4-х суток культивирования в количестве 6×10^6 клеток, а ММСК КМ после 12-х суток культивирования в количестве 4×10^6 клеток. Во 2-й серии опытов забор ККМ также производили однократно, но через 30 суток после окончания моделирования СД I типа (на стадии развернутых клинических проявлений заболевания). Выделенные из полученной порции ККМ две фракции клеток также вводили последовательно после культивирования в суммарной дозе 10×10^6 клеток. В 3-й серии опытов забор ККМ производили трехкратно – через 7, 21 и 35 суток после окончания моделирования СД I типа (начальная стадия заболевания). Выделенные из каждой порции ККМ две фракции клеток вводили последовательно: МНК КМ –

Таблица 1

Распределение животных по разделам экспериментальной работы

Раздел работы	Выполненные исследования	Вид животных	Кол-во животных
I. Моделирование аутоиммунного СД I типа	Патофизиологическая характеристика аутоиммунной модели СД I типа и изучение иммунозависимых механизмов ее формирования	Крысы Wistar	150
	Выполнение адоптивного переноса аутоиммунного СД I типа интактным животным	Крысы Wistar	15
II. Отработка техники применения клеточных технологий в эксперименте	Отработка технологии выделения различных фракций ККМ и их культивирования	Крысы Wistar	20
		Мыши B10.GFP	10
	Определение сроков формирования монослоя ММСК КМ при культивировании от животных с аутоиммунным СД I типа	Крысы Wistar	10
	Идентификация ККМ от трансгенных мышей, содержащих ген GFP, в культуре и органах после трансплантации	Мыши B10.GFP	10
III. Исследование эффекта трансплантации аутологичных ККМ (моноклеарной и мультипотентной мезенхимальной стромальной фракций) при аутоиммунном СД I типа	Однократное получение и трансплантация двух фракций аутологичных ККМ на начальной стадии развития аутоиммунного СД I типа	Крысы Wistar	25
	Однократное получение и трансплантация двух фракций аутологичных ККМ на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа	Крысы Wistar	25
	Трехкратное получение и трансплантация двух фракций аутологичных ККМ на начальной стадии развития аутоиммунного СД I типа	Крысы Wistar	25
	Трехкратное получение и трансплантация двух фракций аутологичных ККМ на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа	Крысы Wistar	25
	Контроль	Крысы Wistar	50
Итого			365

после 4-х суток культивирования в количестве 6×10^6 клеток, а ММСК КМ после 12-х суток культивирования в количестве 4×10^6 клеток. Суммарная доза вводимых клеток в этой серии составила: МНК КМ – 18×10^6 , ММСК КМ – 12×10^6 клеток на одно животное. В 4-й серии опытов забор ККМ также производили трехкратно, но через 30, 44 и 58 суток после окончания моделирования СД I типа (стадия развернутых клинических проявлений заболевания). Выделенные из каждой порции ККМ две фракции клеток также вводили последовательно после культивирования в суммарной дозе 30×10^6 клеток на одно животное.

Технология выполнения культуральных исследований

Получение и ведение культур МНК КМ

Мононуклеарную фракцию клеток получали из аспирата КМ животных. Для этого под эфирным наркозом из костномозгового канала большеберцовых костей получали ККМ путем промывания полости этих костей фосфатно-буферным раствором, содержащим 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина с помощью иглы 18G, насаженной на шприц. Суспензию ККМ центрифугировали при 1500 об/мин 3–5 минут, осадок клеток ресуспендировали в растворе для лизиса эритроцитов (114 мМ NH_4Cl , 7,5 мМ KHCO_3 , 100 мкМ EDTA) в течение 5 мин и повторно центрифугировали. Гемолизированный супернатант удаляли отсасыванием, а клеточный осадок ресуспендировали в питательной ростовой среде DMEM («Панэко»), содержащей 25 мМ HEPES, 0,58 г/л глутамина, 100 мкг/л гентамицина, 10% бычьей эмбриональной сыворотки («HyClone», USA), 5 мкг/л инсулина. Эти клетки представляли собой преимущественно МНК КМ, которые затем высаживали на чашки Петри в количестве 2,0–2,5 млн кл/мл и культивировали при 37 °С в CO_2 -инкубаторе, в атмосфере воздуха с 5% CO_2 и 95% влажности с целью очистки и повышения функциональной и биорегуляторной активности этих клеток. Через 4 суток культура ККМ содержала до 50% округлых не прикрепившихся МНК и до 50% прикрепившихся к пластику распластанных фибробластоподобных клеток ММСК КМ. Не прикрепившиеся к пластику клетки отбирали и затем использовали в опытах на животных для трансплантации как очищенную от стромальных (пластикадгезивных) клеток мононуклеарную фракцию ККМ. Полученная культура МНК КМ содержала $80,2 \pm 9,6\%$ лимфоцитов, $18,7 \pm 1,3\%$ моноцитов и $1,1 \pm 1,4\%$ гранулоцитов (при окраске по Романовскому–Гимзе), а также $2,5 \pm 0,3\%$ $\text{CD34}^+/\text{CD45}^+$ клеток (по данным проточной цитофлуориметрии с использованием крысиных моноклональных АТ фирмы «Abcam», США).

Получение и ведение культур ММСК КМ

Получение аспирата ККМ, его обработку лизирующим раствором, отмывание, центрифугирование и посев на культуральный пластик в питатель-

ной ростовой среде DMEM описано выше. Далее через 4 суток не прикрепившиеся клетки отбирали, а к оставшимся пластикадгезивным клеткам в ростовую среду добавляли основной фактор роста фибробластов (bFGF) («Sigma», USA) 20 нг/мл для стимуляции пролиферативной активности ММСК КМ. Культивирование ММСК производилось в течение 12 суток с заменой ростовой среды через каждые 3 суток. На 12-е сутки культивирования на чашках Петри возникали колонии ММСК с фибробластоподобной морфологией, образующие примерно 80–90% монослой (колонии ММСК от интактных животных образуют 90% монослой на 9-е сутки культивирования). Данный клеточный материал, представляющий собой прикрепившиеся к пластику распластаные фибробластоподобные клетки (ММСК), был признан пригодным для трансплантации, так как сохранял популяционную активность и не содержал погибшие клетки. Гомогенность культуры ММСК КМ подтверждена иммуногистохимически путем выявления коллагена I типа с помощью кроличьих моноклональных АТ («Имтэк»).

Техника моделирования аутоиммунного СД I типа

Аутоиммунный СД I типа моделировали по разработанной нами технологии путем попеременного введения субдиабетогенных (малотоксичных) доз стрептозотоцина (STZ) и адьюванта Фрейнда. STZ вводили внутрибрюшинно трехкратно с интервалом в 7 суток. При этом во время первого введения количество STZ определяли из расчета 25 мг/кг массы тела животного; во время второго введения – 20 мг/кг; во время третьего введения – 25 мг/кг. При этом каждое введение STZ осуществляли после 12 часов голодания, а за сутки перед каждым введением STZ для неспецифической активации иммунной системы животным внутрибрюшинно вводили 1 мл неполного адьюванта Фрейнда. Общий срок моделирования аутоиммунного СД I типа составил 14 суток.

Методы исследования

В работе применен комплекс клинических, биохимических, морфологических и иммунологических методов исследования. Общий объем специализированных исследований, выполненных в динамике при проведении работы, представлен в табл. 2. Кроме того, у всех животных экспериментальных серий опытов еженедельно определялся уровень глюкозы в периферической крови и производилось взвешивание животных.

Биохимическое исследование крови

Содержание глюкозы в периферической крови измеряли натошак еженедельно с помощью прибора «One Touch Ultra» («Life Scan», «Johnson and Johnson», США) через 12 часов после последнего приема пищи.

Морфологическое исследование органов

Гистологические и гистохимические методы исследования. Изучение структурных нарушений в паренхиме внутренних органов проводи-

Таблица 2

Количество выполненных специализированных исследований

Методы исследования		Количество исследований
Морфологические исследования	Гистологическое исследование:	
	ПЖ	80
	тимуса	35
	селезенки	35
	почки	35
	Морфометрическое исследование:	
	ПЖ	30
	тимуса	20
	селезенки	20
Иммуногистохимические исследования:	с использованием АТ к инсулину	20
	с использованием АТ к PCNA	20
	с использованием АТ к CD3, CD8, CD45R, CD20 и CD79 α	20
Иммуноферментный анализ	Определение провоспалительных цитокинов: TNF α , IL-1 β , IFN γ	95
Проточная цитофлуометрия	Определение количества CD4CD25Foxp3 Treg-клеток	10
Флуоресцентная микроскопия	Идентификация трансплантированных ККМ от мышей линии B10.GFP	20
Итого		440

ли морфологическими методами. Для этого после 12-часового голодания животных декапитировали под эфирным наркозом, извлекали поджелудочную железу, которую затем фиксировали в растворе Буэна. Состояние ОЛ ПЖ и их функциональную активность оценивали на срезах ПЖ, окрашенных гематоксилином и эозином. Тимус, селезенку и почки каждого животного фиксировали в 10%-ном формалине, затем готовили парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином для последующего выявления и оценки степени тяжести структурных нарушений в органах.

Морфометрическое исследование ткани ПЖ, тимуса и селезенки. Материал для исследования ПЖ был взят из средней части тела ПЖ и морфометрические исследования проводили с учетом всех обнаруженных ОЛ в поле зрения (от 0 до 30). Проводили подсчет средней площади ОЛ, среднего количества клеток в островках ОЛ. В селезенке осуществляли измерение средней площади лимфоидных фолликулов. В тимусе рассчитывали процентное соотношение объемной плотности коркового и мозгового слоев. Эти расчеты проводили под микроскопом фирмы «NIKON» (Япония) при увеличении $\times 200$ в микрометрах (mkm^2) на компьютере с использованием программы «т-Морфология», фирма «Телемедсистема».

Методы иммуногистохимического исследования

Для иммуногистохимического (ИГХ) выявления пролиферативной активности клеток островковой части ПЖ и степени ее выраженности был применен иммунопероксидазный метод с АТ (фирмы «ДАКО», Дания) на маркер репликации ДНК PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Фазово-контрастную микроскопию материала проводили на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония). Интенсивность ИГХ реакции оценивали визуально под микроскопом. Индекс пролиферации клеток с помощью PCNA вычисляли как среднее число меченых ядер на 100 учтенных ядер. Подсчет меченых ядер проводили в репрезентативных полях зрения (100) с относительно равномерным распределением клеток инфильтрата, сверху вниз и слева направо. Для ИГХ определения инсулинпродуцирующих клеток в эндокринной части ПЖ использовали мышинные моноклональные АТ к инсулину фирмы «ДАКО», Дания. С целью иммунофенотипирования клеток воспалительного инфильтрата в ткани ПЖ использовали набор мышинных моноклональных и поликлональных антител к CD3, CD8, CD45R, CD20 и CD79 α (фирма «ДАКО», Дания). Положительное цитоплазматическое окрашивание соответствующими АТ оценивали полукольцевым методом по степени выраженности – от слабой (несколько положительно окрашенных клеток), что было оценено нами как «+», до выраженной (тотальное положительное цитоплазматическое окрашивание клеток) – «+++».

Исследование цитокинового статуса в сыворотке крови

Для подтверждения зависимости процессов восстановительной регенерации и аутоиммунной деструкции от состояния иммунного баланса в организме, маркерами которого являются цитокины, в работе оценивали содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови животных. Содержание в сыворотке крови животных провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью тест-систем «Diamed» (Швейцария).

Определение содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови

Для определения содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови лимфоциты крыс метили крысиными антителами к CD4, CD25 и Foxp3 фирмы «eBioscience» США и проводили подсчет концентрации Т-регуляторных клеток на проточном цитофлуориметре фирмы «Beckman Coulter», США.

Определение жизнеспособности клеток в культуре

Жизнеспособность культивированных МНК и ММСК КМ определяли перед трансплантацией по окраске трипановым синим. Жизнеспособность клеток перед трансплантацией составляла $95 \pm 2\%$.

Методы идентификации трансплантированных ККМ в культуре и в органах реципиента

Для идентификации трансплантируемых клеток в качестве доноров клеток были использованы трансгенные мыши линии B10.GFP, в ядрах клеток которых содержится ген, продуцирующий белок с зеленой флуоресценцией. Фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию клеточного материала и криосрезы внутренних органов доноров и реципиентов проводили на микроскопе фирмы «NIKON» (Япония). Флуоресцентную микроскопию проводили с использованием ультрафиолетового излучения с длиной волны 390 нм. Для фотографирования использовали цифровой фотоаппарат фирмы «OLYMPUS» (Япония).

Методы статистической обработки

Статистическую обработку результатов производили на персональном компьютере с использованием специального статистического пакета Bio-stat; достоверность различий между сравниваемыми группами оценивали по критерию t-Стьюдента с учетом поправки Бонферонни. В таблицах приведены средние значения величин, где \pm стандартное отклонение (SD). Различия считали достоверными при $p < 0,05$ (статистический пакет, рекомендованный ВОЗ, Epi Info 5.0).

Необходимо отметить, что отработка отдельных этапов работы проводилась совместно и при непосредственном участии врача отделения коронарной хирургии и трансплантации сердца ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ А.Р. Закирьянова, сотрудников лаборатории биотехнологии стволовых клеток ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ (зав. лаб. – д. м. н., профессор Н.А. Онищенко), ассистента кафедры патологической анатомии ММА им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития РФ О.В. Барановой, сотрудников лаборатории патоморфологии ГУ «НИИ ОПП» РАМН (зав. лаб. – член-корр. РАМН, профессор О.М. Поздняков), а также сотрудников вивария ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ (зав. виварием – П.В. Аврамов). Всем им выражаю свою сердечную благодарность за помощь в работе.

Результаты исследования

Для оценки терапевтических возможностей трансплантации аутологичных ККМ и пригодности их для коррекции патогенетических нарушений при аутоиммунном СД I типа нами была разработана аутоиммунная модель этого заболевания. Известные модели аутоиммунного СД I типа, которые были созданы у генетически предрасположенных животных – у крыс линии BB (BioBreeding) и у мышей линии NOD (Non-Obese Diabetic), – были отклонены нами из-за того, что генетические модели СД I типа дают искаженное представление о регенерации островковой ткани ПЖ вследствие измененного реагирования адаптивных и компенсаторных систем организ-

ма. Экспериментальные модели на генетически не предрасположенных животных, в основе которых лежит химически индуцированный СД, с помощью введения стрептозотоцина (однократно в дозе 65 мг/кг) или аллоксана (однократно в дозе 80–100 мг/кг) также имеют свои недостатки [Arai T. et al., 1996; Babaya N. et al., 2005; Hosokawa M. et al., 2001], в частности STZ, повреждая β -клетки ПЖ, индуцирует фиброзирующую регенерацию ПЖ без развития аутоиммунного повреждения. В связи с указанными обстоятельствами свою работу мы начали с разработки и создания новой модели аутоиммунного СД I типа у крыс, не предрасположенных к развитию СД I типа.

Для обоснования адекватности разработанной нами модели аутоиммунного СД I типа, для выявления патогенетических и патофизиологических нарушений, протекающих на местном и системном уровнях при моделировании СД I типа на генетически не предрасположенных животных, нами было использовано 150 животных (крысы-самцы породы Wistar). При исследовании показателей углеводного обмена у животных с аутоиммунной моделью СД I типа нами было отмечено достоверное увеличение уровня глюкозы уже через 3–4 дня после последнего введения STZ. К концу третьей недели после последнего введения STZ уровень глюкозы был равен 18–20 ммоль/л. В дальнейшем происходило нарастание и стабилизация уровня глюкозы, достоверно сохраняющаяся в течение 5–6 месяцев (табл. 3). Клинически отмечалась полиурия, полидипсия и достоверное снижение массы тела животных по сравнению с контролем.

Таблица 3

Динамика изменения показателей уровня глюкозы и массы тела у крыс с аутоиммунным СД I типа

Сутки после окончания моделирования СД I типа	Уровень глюкозы, ммоль/л			Масса тела		
	30-е	60-е	90-е	30-е	60-е	90-е
Норма	5,2 ± 0,6	5,5 ± 0,8	5,6 ± 1,2	331 ± 32	372 ± 36	424 ± 38
Аутоиммунный СД I типа	18,4 ± 4,6*	21,6 ± 4,3*	23,9 ± 4,7*	265 ± 45	243 ± 42*	234 ± 47*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

Стабильно высокий уровень глюкозы в крови свидетельствовал о развитии выраженных структурных нарушений в эндокринной части ПЖ. При гистологическом исследовании нами была обнаружена выраженная воспалительная инфильтрация ОЛ с замещением воспалительными элементами большей их части. Сами же островки были без четких границ с явлениями выраженного отека межклеточного вещества и гидropической дистрофией β -клеток. Отмечались признаки тотального некроза клеток в ОЛ, окруженных клетками воспалительного инфильтрата. При морфометрическом

исследовании ПЖ отмечено достоверное уменьшение площади ОЛ ПЖ и количества в них клеток (табл. 4), причем гибель ОЛ происходила на фоне глубокой иммунной дисрегуляции в организме. Так, в селезенке крыс при СД I типа отмечались явления прогрессирующей гипоплазии. Площадь лимфоидных фолликулов селезенки была достоверно снижена более чем в два раза по сравнению со здоровыми животными.

Таблица 4

Морфометрическая характеристика ПЖ и селезенки здоровых крыс и крыс с аутоиммунным СД I типа (через 4 мес. после окончания моделирования СД I типа)

Сутки после окончания моделирования СД I типа	Норма	Аутоиммунный СД I типа
Площадь ОЛ ПЖ (мкм ²)	64152,7 ± 490	11318,8 ± 738*
Количество клеток в ОЛ ПЖ	226 ± 40	81 ± 27*
Площадь фолликулов селезенки (мкм ²)	77348,8 ± 513	30693,8 ± 1047,2*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

Лимфоидные фолликулы селезенки были с явлениями гипоплазии и атрофии, в большинстве наблюдений фолликулы не имели центров размножения. Подтверждением развития иммунного дисбаланса в организме служат результаты динамического измерения содержания провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс. На разных сроках после окончания моделирования СД I типа происходило достоверное повышение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) по сравнению с интактными животными.

Для подтверждения аутоиммунных механизмов развивающегося инсулита нами было проведено определение иммунофенотипической принадлежности клеток воспалительного инфильтрата ОЛ с помощью набора моноклональных АТ к различным популяциям Т- и В-клеток. Анализ результатов проведенного иммуногистохимического исследования показал, что в ОЛ ПЖ крыс с аутоиммунным СД I типа среди клеток инфильтрата преобладают Т-клетки, особенно CD8 цитотоксические лимфоциты, а экспрессия В-клеточных маркеров отсутствовала или имела слабо выраженный характер.

Еще одним доказательством аутоиммунной природы разработанной иммунопатологической модели СД I типа служат результаты внутривенного адоптивного переноса лимфоцитов селезенки от животных с аутоиммунным СД I типа (на 40-е сутки эксперимента) интактным крысам и индукция у них аутоиммунного СД I типа. Оказалось что у интактных животных уже через 2–3 недели после адоптивного переноса спленоцитов происходило повышение уровня глюкозы в крови и наступало развитие клиники СД. Через 4 месяца клинические и морфологические показатели у этих крыс имели достоверные отличия от показателей здоровых животных, а уровень глюкозы был стабильно повышен (табл. 5).

Таблица 5

Клинические и морфологические показатели исходно здоровых крыс после адоптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа (через 4 месяца)

Показатели	Результат адоптивного переноса спленоцитов от крыс с аутоиммунным СД I типа	Аутоиммунный СД I типа (контроль)	Норма
Уровень глюкозы, ммоль/л	14,8 ± 3,9*	24,4 ± 4,8*	6,2 ± 1,2
Масса тела, г	321 ± 24*	233 ± 18*	439 ± 20
Площадь ОЛ ПЖ, мкм ²	33247,2 ± 895*	11318,8 ± 738*	64152,7 ± 490
Количество клеток в ОЛ ПЖ	144 ± 36	81 ± 27*	226 ± 40

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

При морфологическом исследовании имели место признаки воспалительной инфильтрации ОЛ иммунными клетками с последующими дистрофическими изменениями ОЛ ПЖ, что подтвердило специфическую аутоиммунную природу индуцированного нами СД I типа.

При морфологическом исследовании почек животных с аутоиммунным СД I типа были выявлены выраженные изменения. Эпителий дистальных и проксимальных канальцев местами был с явлениями атрофии, местами с признаками белковой и жировой дистрофии, набухший, просветы канальцев несколько расширены, заполнены эозинофильными и PAS-положительными массами. В строме отмечались явления выраженного полнокровия сосудов всех калибров, мелкие диапедезные кровоизлияния.

Описанные выше результаты позволяют признать созданную нами модель адекватной аутоиммунной моделью СД I типа на не предрасположенных животных. Модель СД I типа является устойчивой и максимально приближенной к клинике и потому была использована для поиска и оценки эффективности новых способов лечения данного заболевания, в том числе для оценки терапевтических эффектов трансплантации аутологичных ККМ.

Приступая к оценке эффективности корректирующей терапии аутологичными ККМ при аутоиммунном СД I типа, нам необходимо было прежде всего обеспечить применение ККМ с высокой иммунорегуляторной активностью. Это было особенно важным при использовании аутологичных ККМ, у которых в условиях патологической ауторегуляции, сложившейся при СД I типа, ингибируется популяционная и миграционную активность, а поэтому они снижают или даже утрачивают свои терапевтические регулирующие функции. Для восстановления иммунорегулирующих функций

полученные ККМ больного животного подвергали предварительному культивированию *in vitro* в культуральных питательных средах. О восстановлении исходно сниженной биорегуляторной активности ККМ крыс с СД I типа в процессе культивирования судили по изменению популяционной активности этих клеток (по скорости образования монослоя клеток в культуре). Проведенное нами культивирование аутологичных ККМ (ММСК) показало, что достижение ими монослоя происходит на 12–13-е сутки, тогда как при культивировании клеток от здоровых животных – на 9–10-е сутки. Эти данные, с одной стороны, подтверждают исходно сниженную иммунорегуляторную активность ММСК КМ от животных с аутоиммунным СД I типа, а с другой стороны, показывают, что к 12–13-м суткам происходит ее восстановление, поэтому именно этот срок был использован нами при культивировании этих клеток перед применением.

Для контроля эффективности ККМ необходимо также иметь представление о длительности их пребывания в биоактивном состоянии в организме после трансплантации. Для идентификации трансплантируемых ККМ в тканях реципиента в качестве доноров клеток были использованы трансгенные мыши линии B10.GFP с геном зеленого белка. Наше исследование показало, что через 60 суток после трансплантации ККМ введенные клетки присутствуют в разных органах (ПЖ, селезенке, почках) и не погибают, а сохраняют свою жизнеспособность, что позволило связать возникающие в этих органах изменения (морфологические и функциональные) со стимуляцией в этих органах процессов адаптации, компенсации и восстановительной регенерации.

При выборе адекватного способа клеточной терапии СД I типа нам было необходимо определить эффективные дозы (кратность введения) ККМ, а также определить ту стадию болезни, на которой коррекция патогенетических нарушений СД I типа является наиболее эффективной. Наше исследование показало, что после однократного введения двух фракций ККМ как на начальной (серия № 1), так и на стадии развернутых клинических проявлений заболевания (серия № 2), отмечается некоторая положительная динамика изменения уровня глюкозы в периферической крови, причем в первой серии на раннем сроке введения клеток она была более выраженной (табл. 6). Однако добиться стойкого и продолжительного эффекта снижения уровня глюкозы с помощью однократного введения аутологичных ККМ нам не удалось.

При гистологическом исследовании состояния ПЖ у животных с СД I типа после однократной трансплантации ККМ как на начальной, так и на стадии развернутых клинических проявлений заболевания также не были выявлены позитивные изменения. Большая часть ОЛ была неправильной формы с размытыми контурами. Количество клеток в островках было снижено, сохраненные клетки располагались преимущественно по периферии островков небольшими группами, окружая большую зону некротизированной ткани, а также располагаясь вокруг центральной зоны отека межклеточ-

Таблица 6

Средние показатели уровня глюкозы у крыс через 30, 60 и 90 суток после однократного введения двух фракций ККМ на начальной стадии (серия № 1) и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа (серия № 2)

Серии опытов	Уровень глюкозы (ммоль/л)		
	30 суток	60 суток	90 суток
Серия № 1	15,5 ± 3,3*	19,1 ± 4,2	21,2 ± 4,7
Серия № 2	20,6 ± 3,9	24,1 ± 4,6	24,7 ± 4,3
Аутоиммунный СД I типа	24,7 ± 4,3	24,9 ± 4,8	25,5 ± 4,6
Норма	5,5 ± 0,84	5,7 ± 0,75	5,9 ± 0,93

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей контроля (аутоиммунный СД I типа).

точной стромы островка. Сохранились признаки незначительной лимфоидной инфильтрации в периферических участках, местами инфильтрация носила выраженный характер. При морфометрическом исследовании ПЖ и селезенки крыс с СД I типа после однократного введения ККМ нами не было выявлено достоверных отличий от контроля.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что несмотря на определенные положительные изменения однократная трансплантация ККМ как на начальной, так и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа является недостаточной для достижения выраженного и пролонгированного терапевтического эффекта. Исходя из этого мы предположили, что повышение дозы (кратности введения) клеток при многократной трансплантации ККМ как на начальной, так и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа, может усилить эффективность клеточной терапии и позволит добиться устранения иммунной дисрегуляции в организме, а также достигнуть активации процессов репаративной регенерации в островковой ткани ПЖ.

В сериях опытов с многократной трансплантацией ККМ нами была отмечена более стабильная и продолжительная положительная динамика показателей веса и уровня глюкозы в крови, чем в опытах с однократной трансплантацией ККМ. Между тем выраженность клеточной терапии на начальной (серия № 3) и на стадии развернутых клинических проявлений заболевания (серия № 4) была неодинакова. Наилучшие показатели коррекции уровня глюкозы в крови у животных были получены при многократной трансплантации клеток на начальной стадии развития СД I типа (табл. 7).

При гистологическом исследовании ПЖ животных после многократной трансплантации ККМ на начальной стадии заболевания была выявлена достоверно положительная динамика. Границы островков были четкими, признаков лимфоидной инфильтрации ОЛ не отмечалось. Количество клеток, а также расположение их в островках варьировалось: часть островков была клеточного вида, а часть – с признаками отека межклеточной стро-

Таблица 7

Средние показатели уровня глюкозы у крыс через 30, 60 и 90 суток после многократного введением двух фракций ККМ на начальной стадии (серия № 3) и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа (серия № 4)

Серии опытов	Уровень глюкозы (ммоль/л)		
	30 суток	60 суток	90 суток
Серия № 3	$8,6 \pm 3,8^*) \wedge$	$8,8 \pm 4,6^*) \wedge$	$10,3 \pm 4,8^*$
Серия № 4	$13,3 \pm 4,4^*$	$14,1 \pm 4,3^*$	$14,8 \pm 4,6^*$
Аутоиммунный СД I типа	$24,7 \pm 3,7$	$24,9 \pm 4,2$	$25,5 \pm 3,8$
Норма	$5,5 \pm 0,84$	$5,7 \pm 0,75$	$5,9 \pm 0,93$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей контроля (аутоиммунный СД I типа); \wedge – $p > 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

мы и диффузным расположением сниженного количества клеток. Среди ацинарных структур были обнаружены группы по 4–6 мелких клеток с базофильной цитоплазмой, подобно β -клеткам, что, вероятнее всего, свидетельствовало о формировании «новых» регенераторных островков. Аналогичные скопления базофильных клеток были найдены и вокруг вставочных и выводных протоков. Подобных скоплений клеток в серии диабетического контроля нами обнаружено не было.

У животных с многократной трансплантацией ККМ на начальной стадии заболевания иммуногистохимически выявлялись инсулинпродуцирующие (АТ к инсулину) и активно пролиферирующие (АТ к PCNA) клетки в островках различного размера. β -клетки занимали центральные отделы островков, располагались плотными скоплениями среди несколько отечной стромы. Также мы отмечали наличие положительно окрашенных клеток среди ацинусов экзокринной части в виде очень мелких групповых скоплений (от 2 до 5 клеток), часть новообразованных мелких островков располагалась вблизи протоков ПЖ, что объясняло нормализацию показателей клинического состояния животных с СД I типа.

При морфометрическом исследовании ПЖ животных с многократной трансплантацией ККМ на начальной стадии развития СД I типа отмечено достоверное увеличение как площади ОЛ, так и количества в них клеток. При морфометрическом исследовании тимуса отмечено достоверное расширение коркового слоя, при исследовании селезенки отмечено достоверное увеличение площади лимфоидных фолликулов. Эти данные подтверждают, что ККМ стимулируют восстановление иммунного баланса в организме и что это восстановление проходит через фазу гиперактивации функции центральных и периферических органов иммуногенеза (табл. 8).

При морфологическом исследовании селезенки отмечалась выраженная гиперплазия лимфоидной ткани, что проявилось в образовании лимфоидных фолликулов среднего и крупного размера, с относительно четки-

ми границами и большими центрами размножения. Явления выраженной пролиферации клеток фолликулов были подтверждены при иммуногистохимическом исследовании с использованием АТ к PCNA. Положительное ядерное окрашивание клеток центральных отделов лимфоидных фолликулов в зонах размножения свидетельствовало о пролиферации спленоцитов в селезенке.

Таблица 8

Морфометрическая характеристика ПЖ, селезенки и тимуса крыс через 30 суток после многократного введения двух фракций ККМ на начальной стадии и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа

	Многократное введение суммы фракций ККМ		Аутоиммунный СД I типа	Норма
	на начальной стадии	на стадии развернутых клинических проявлений		
Площадь ОЛ ПЖ, мкм ²	44284,01 ± 1756* [^])	31078,4 ± 1852*	11318,8 ± 738	64152,7 ± 490
Количество клеток в ОЛ ПЖ	142 ± 23*	126 ± 28	81 ± 27	226 ± 40
Площадь фолликулов селезенки, мкм ²	107527,6 ± 21129,7*	83639,2 ± 18753,2*	30693,8 ± 1047,2	77348,8 ± 513
Объемная плотность зон тимуса, %	Корковый слой	70,2 ± 14,0*	–	52,29 ± 2,59
	Мозговой слой	29,2 ± 5,8*	–	47,71 ± 2,29
Индекс соотношения коркового слоя к мозговому	2,3 ± 0,46*	–	0,61 ± 0,12	1,096 ± 0,07

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей контроля (аутоиммунный СД I типа); [^] – $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей в серии с многократным введением двух фракций ККМ на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа.

Отражением нормализации морфофункционального состояния органов иммунной системы служит и нормализация динамики изменения профиля цитокинов в сыворотке крови животных с СД I типа после многократной трансплантации ККМ на начальной стадии заболевания. Было установлено, что под влиянием аутологичных ККМ происходит постепенное снижение уровня провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α).

Положительная динамика у этих животных отмечена и со стороны почек – одного из главных «органов-мишеней» при СД I типа. Происходило снижение выраженности дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев, исчезновение эозинофильных и PAS-

положительных масс в просвете извитых канальцев и собирательных трубочек в отличие от почек животных с СД I типа.

Поскольку положительное влияние многократного введения ККМ на начальной стадии СД I типа мы связываем преимущественно с устранением иммунной дисрегуляции, снижением иммунной реактивности и индукцией иммунной толерантности в организме, то при введении ККМ мы считали необходимым изучить один из показателей развития иммунной толерантности. Нами впервые было выполнено исследование определения содержания Т-регуляторных клеток в периферической крови крыс. По его результатам отмечено, что после завершения многократной трансплантации ККМ на начальной стадии развития СД I типа происходит повышение концентрации CD4CD25Foxp3 Т-клеток в периферической крови крыс, по сравнению с животными с СД I типа (табл. 9).

Таблица 9

Расчетные значения концентрации CD4CD25Foxp3 Т-клеток в периферической крови крыс в норме, при аутоиммунном СД I типа и в 3-й серии опытов, %

Серии опытов	Концентрация CD4CD25Foxp3 Т-клеток в периферической крови крыс, %
Серия опытов № 3 (через 30 суток после введения ККМ)	6,78
Аутоиммунный СД I типа (через 4 мес. после окончания моделирования)	0,97
Норма	3,5 ± 1,5

Таким образом, наше исследование выполненное на аутоиммунной модели СД I типа показало, что наиболее выраженный эффект коррекции патогенетических нарушений, возникающих при СД I типа, путем трансплантации ККМ наблюдается при введении достаточно больших биологически активных доз ККМ на начальной стадии развития заболевания, когда еще сохранены адаптационные резервы организма и регенерационные резервы ПЖ. Результаты нашей работы позволяют рекомендовать этот метод коррекции патогенетических нарушений при СД I типа в составе комплексной медикаментозной терапии на начальных стадиях развития этого тяжелого прогрессирующего заболевания.

ВЫВОДЫ

1. Созданная модель аутоиммунного СД I типа у крыс является адекватной экспериментальной моделью для изучения иммунопатологических механизмов развития аутоиммунного СД у генетически не предрасположенных животных, так как воспроизводит характерные клинические, морфологические и иммунологические изменения в организме. Создан-

ная модель пригодна для оценки эффективности коррекции патогенетических нарушений, возникающих при данном заболевании, путем трансплантации аутологичных ККМ (моноклеарной и стромальной фракций).

2. Культивирование (активирование) моноклеарной и стромальной фракций клеток аутологичного КМ *ex vivo* является важным этапом подготовки их к трансплантации животным с СД I типа, так как позволяет восстановить их сниженную пролиферативную и иммунорегуляторную активность, обусловленную хроническим аутоиммунным заболеванием, а также увеличить клеточную массу, необходимую для проведения эффективной клеточной терапии.
3. Пролонгированное поддержание восстановительного морфогенеза в поврежденных органах при моделировании аутоиммунного СД I типа и введении ККМ обусловлено длительным (по крайней мере до 60 суток) сохранением жизнеспособности введенных клеток, что подтверждается маркерной люминесценцией введенных в организм реципиента ККМ, полученных от мышей B10.GFP с геном зеленого белка.
4. Трансплантация аутологичных ККМ животным с аутоиммунным СД I типа позволяет корригировать клинические и морфологические нарушения в островковой ткани ПЖ за счет устранения предрасполагающей иммунной дисрегуляции в организме.
5. Выраженность терапевтического эффекта от применения аутологичных ККМ у крыс с аутоиммунным СД I типа находится в прямой зависимости от дозы (кратности введения) используемых ККМ, а также от срока их применения (стадии развития заболевания).
6. Однократная трансплантация аутологичных ККМ как на начальной, так и на стадии развернутых клинических проявлений аутоиммунного СД I типа, а также многократная трансплантация аутологичных ККМ на стадии развернутых клинических проявлений заболевания не сопровождаются выраженным и стабильным снижением уровня глюкозы в крови и не сопровождаются выраженным восстановлением структуры островковой ткани ПЖ и органов иммуногенеза.
7. Многократная трансплантация аутологичных ККМ на начальной стадии развития аутоиммунного СД I типа позволяет добиться выраженного пролонгированного и стабильного снижения уровня глюкозы в крови, индуцировать процессы восстановительной регенерации и ингибировать процессы аутоиммунной деструкции в островках Лангерганса ПЖ, существенно ослабив выраженность воспалительной инфильтрации. Это нашло отражение в увеличении количества инсулинпродуцирующих клеток и пролиферативной активности островковых клеток ПЖ, а также в индукции новообразования островков Лангерганса (скопления 4–6 β -клеток), примыкающих к ацинарным протокам ПЖ.
8. Коррекция клинических нарушений и деструктивных изменений в островковой ткани ПЖ при многократном введении ККМ на начальной

стадии развития СД I типа обусловлены коррекцией иммунного гомеостаза в организме, что нашло отражение в снижении иммунной реактивности – снижение содержания провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) в крови, восстановление структурных компартментов в центральных (тимус) и периферических (селезенка) органах иммуногенеза и в индукции иммунной толерантности – повышение процентного содержания CD4CD25Foxp3 Treg-клеток, обладающих супрессорными свойствами.

9. Многократное введение аутологичных ККМ на начальной стадии заболевания может служить средством патогенетической терапии аутоиммунного СД I типа, и его целесообразно использовать в комплексной медикаментозной терапии на начальной стадии развития этого тяжело прогрессирующего заболевания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Созданная иммунопатологическая модель аутоиммунного СД I типа может быть использована в качестве адекватной модели аутоиммунного СД I типа в эксперименте для отработки новых способов лечения и профилактики этого заболевания, в том числе методами клеточной терапии.
2. Для восстановления сниженной иммунорегуляторной активности клеток аутологичного костного мозга с хроническими аутоиммунными заболеваниями (например, с аутоиммунным СД I типа) перед трансплантацией их необходимо культивировать (активировать) – мононуклеарную фракцию клеток – 4–5 суток, стромальную фракцию клеток – 12–14 суток.
3. Для проведения терапии клетками костного мозга могут быть использованы методики выделения и культивирования ККМ, отработанные в настоящем исследовании.
4. Для эффективной коррекции патогенетических нарушений и профилактики повреждений внутренних органов, возникающих при аутоиммунном СД I типа, трансплантацию культивированных аутологичных ККМ необходимо проводить многократно уже на начальных стадиях развития заболевания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Поздняков О.М., Онищенко Н.А.* Трансплантация клеток костного мозга и пуповинной крови как способ коррекции аутоиммунных механизмов развития сахарного диабета I типа. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – 2 (XI). – С. 67–74.

2. **Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Клименко Е.Д., Поздняков О.М., Онищенко Н.А.** Многократная трансплантация прекультивированных аутологичных клеток костного мозга индуцирует процессы восстановительной регенерации β -клеток при моделировании аутоиммунного сахарного диабета. Материалы IX съезда научного общества гастроэнтерологов России, II совместной школы последипломного образования АГА и НОГР, XXXV сессии ЦНИИГ. 2–5 марта 2009 г. – С. 170–171.
3. **Закирьянов А.Р., Великий Д.А., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Клименко Е.Д., Поздняков О.М., Онищенко Н.А.** Сравнительная характеристика экспериментальных моделей сахарного диабета с аутоиммунным и цитотоксическим компонентами. Материалы IX съезда научного общества гастроэнтерологов России, II совместной школы последипломного образования АГА и НОГР, XXXV сессии ЦНИИГ. 2–5 марта 2009 г. – С. 176–177.
4. **Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Клименко Е.Д., Поздняков О.М., Онищенко Н.А.** Активация процессов регенерации в поджелудочной железе и коррекция метаболических нарушений при трансплантации аутологичных клеток костного мозга на модели аутоиммунного сахарного диабета. Материалы конференции «Клеточные технологии и регенеративная медицина в хирургии и трансплантологии». – 2009. – С. 38–40.
5. **Закирьянов А.Р., Гуреев С.В., Онищенко Н.А., Васильев К.Н., Сухачев А.А., Великий Д.А., Казаков Э.Н., Готье С.В.** Первый клинический опыт трансплантации аутологичных клеток костного мозга для коррекции метаболических нарушений у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с сахарным диабетом II типа. Материалы конференции «Клеточные технологии и регенеративная медицина в хирургии и трансплантологии». – 2009. – С. 40–41.
6. **Онищенко Н.А., Артамонов С.Д., Крашенинников М.Е., Башкина Л.В., Никольская А.О., Шагидулин М.Ю., Великий Д.А.** Клетки костного мозга донора как регуляторы индукции иммунной толерантности в организме реципиента при аллогенной пересадке органов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – 4 (XI). – С. 97–102.
7. **Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.** Трансплантация прекультивированных аутологичных клеток костного мозга на разных стадиях развития аутоиммунного сахарного диабета у крыс. Материалы всероссийской конференции «Клеточные исследования и технологии в современной биомедицине». – Тула, 2009. – С. 39–40.
8. **Артамонов С.Д., Онищенко Н.А., Башкина Л.В., Сускова В.С., Крашенинников М.Е., Никольская А.О., Великий Д.А.** Роль систем врожденного и адаптивного иммунитета в развитии деструктивного иммунного ответа организма на аллотрансплантат // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – 3 (XII). – С. 112–121.
9. **Артамонов С.Д., Онищенко Н.А., Башкина Л.В., Сускова В.С., Крашенинников М.Е., Никольская А.О., Великий Д.А.** Система ауто толерантности и ее функционирование при трансплантации аллогенных органов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – 3 (XII). – С. 121–128.
10. **Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б., Поздняков О.М.** Коррекция аутоиммунных механизмов развития сахарного

диабета I типа методами клеточной терапии // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – 9. – С. 34–42.

11. **Великий Д.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А., Поздняков О.М., Клименко Е.Д., Кобозева Л.П., Мичунская А.Б.** Многократная трансплантация прекультивированных аутологичных клеток костного мозга на разных стадиях аутоиммунного сахарного диабета у крыс. Материалы V Всероссийского съезда трансплантологов. 8–10 октября 2010. – С. 254–255.
12. **Артамонов С.Д., Великий Д.А., Онищенко Н.А., Крашенинников М.Е., Башкина Л.В., Никольская А.О.** Принципы выработки устойчивой толерантности после аллогенной пересадки органа с помощью дендритных клеток, выделенных из костного мозга донора. Материалы V Всероссийского съезда трансплантологов. 8–10 октября 2010. – С. 289–290.
13. **Патент:** Закирьянов А.Р., Великий Д.А., Онищенко Н.А., Клименко Е.Д., Поздняков О.М. Патент на изобретение № 2400822 «Способ моделирования сахарного диабета I типа у крыс» от 27.09.2010.

Давыдов Дмитрий Сергеевич

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ СПОРОБАКТЕРИНА В КАРДИОХИРУРГИИ

03.02.03 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание

ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
кандидат медицинских наук, доцент

Осипова Ирина Григорьевна
Габриэлян Нина Индзаровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Особенностью кардиохирургических вмешательств с использованием искусственного кровообращения является повышение риска микробной контаминации и эндогенного инфицирования внутренних органов и крови (Coleman C.I., 2007; Deitch E.A., 2002; Velasco E., 1996). Для профилактики инфекционных осложнений при операциях с использованием искусственного кровообращения, в зависимости от доминирующих видов возбудителей внутрибольничных инфекций, применяют антибиотики различных групп – цефалоспорины, карбапенемы, гликопептиды, в т. ч. препараты группы резерва, а также сочетания антибиотиков. Тем не менее, несмотря на использование новейших антибактериальных препаратов, процент гнойно-септических осложнений в кардиохирургии остается высоким. Летальность у больных с генерализованными гнойно-септическими осложнениями достигает 40% (Diekema D.J., 2005).

Резистентность возбудителей нозокомиальных инфекций к антибактериальным препаратам различных групп, в том числе и препаратам группы резерва (ванкомицин, линезолид, тиенам), неуклонно повышается (Боке-рия Л.А., 2007; Murphy G.J., 2001). Известно, что антибиотики обладают рядом существенных неблагоприятных эффектов – вызывают развитие дисбиозов (в т. ч. кандидозов), снижение иммунитета, нередко являются причиной токсических, аллергических и других клинически значимых осложнений. Затраты на применение антибиотиков составляют ощутимую долю бюджета клинического учреждения (Габриэлян Н.И., 2008; Solomkin J.S., 2001). Проблема предупреждения инфекций в кардиохирургии, как и в хирургии в целом, поиска альтернативных препаратов для профилактики и лечения инфекционных осложнений с каждым годом не теряет актуальности. Особый интерес при этом представляют пробиотики – препараты из живых бактерий. Назначение пробиотиков хирургическим больным позволяет уменьшить отрицательное воздействие антибиотиков (Шендеров Б.А., 2001; Surawicz С.М., 1989; Bonn D., 2003).

В последние годы в Российской Федерации применяются зарубежные и отечественные препараты на основе живых бактерий р. *Bacillus*. Бактерии р. *Bacillus* широко распространены в окружающей среде и являются одним из основных компонентов микрофлоры почв, воды, воздуха, и человек в процессе жизнедеятельности постоянно контактирует с ними. Данные микроорганизмы, будучи одним из важных компонентов экзогенной микрофлоры, являются транзиторными микроорганизмами микробиоценоза человека. Бактерии р. *Bacillus* характеризуются рядом свойств, определяющих их преимущество перед другими микроорганизмами, используемыми в качестве основы пробиотиков. Многосторонними механизмами действия бацилл являются антагонистическая активность в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, высокая энзимная активность, продукция лизоцима, антибиотиков и антибиотикоподобных веществ, детоксицирующая активность (Смирнов В.В., 1982; Сорокулова И.Б., 1999; Осипова И.Г., 2005; Muscettolla M., 1992; Kosak T., 1998; Urdaci M.C., 2004).

К числу препаратов, содержащих в основе бактерии р. *Bacillus*, относится российский споровый пробиотик споробактерин сухой (штамм *Bacillus subtilis* 534). Препарат рекомендован МЗ РФ с 1992 г. для применения в клинической практике для лечения острых кишечных инфекций (ОКИ), воспалительных процессов и ран различного генеза, профилактики гнойно-септических осложнений до и после хирургических операций. В 2000 г. в РФ зарегистрирована новая лекарственная форма «Споробактерин жидкий, суспензия для приема внутрь», препарат также показан для лечения ОКИ, дисбиозов, профилактики послеоперационных гнойно-септических осложнений в гинекологии. Однако споробактерин никогда не применялся в кардиохирургии и трансплантологии.

Осиповой И.Г. (1997) доказана безопасность штамма *Bacillus subtilis* 534 и препарата «споробактерин сухой». Однако в этих исследованиях исполь-

зовались лиофилизат и суточная культура штамма 534, содержащие в основном вегетативные клетки и лишь незначительное количество спор. В препарате «споробактерин жидкий» содержатся споры штамма *Bacillus subtilis* 534 в 7%-ном растворе натрия хлорида, и, по мнению ряда исследователей, в препарате на конце срока годности могут накапливаться метаболиты, обладающие токсигенными свойствами. Вышеизложенное обуславливает актуальность проведения экспериментального изучения споробактерина жидкого в опытах *in vivo* и *in vitro*, в частности безопасности, антагонистической активности в отношении клинических штаммов, выделенных от пациентов кардиохирургического профиля с послеоперационными инфекционными осложнениями (ПИО), антибиотикоустойчивости и т. д., для дальнейшего применения препарата в кардиохирургии и трансплантологии.

Цель настоящего исследования – экспериментальное изучение эффективности пробиотического препарата «споробактерин жидкий» (штамм *B. subtilis* 534) для обоснования его практического применения в целях профилактики гнойно-септических послеоперационных осложнений у пациентов кардиохирургического профиля и внедрения в систему лечебных мероприятий.

Задачи исследования

1. Изучить безопасность пробиотика «споробактерин жидкий».
2. Исследовать видовой состав микроорганизмов – возбудителей гнойно-воспалительных осложнений, выделенных от пациентов кардиохирургического профиля, провести количественный анализ и определить чувствительность к антибиотикам.
3. Провести сравнительное изучение *in vitro* ингибирующей активности антибиотиков и споробактерина в отношении клинических штаммов, выделенных от пациентов кардиохирургического профиля с послеоперационными инфекционными осложнениями.
4. Провести сравнительное изучение иммуномодулирующего действия коммерческих иммуномодуляторов и споробактерина *in vitro* на модели нейтрофилов, выделенных из крови пациентов стационара ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова.
5. Оценить сравнительную эффективность споробактерина и традиционной антибиотикотерапии, применяемой для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений у пациентов кардиохирургического профиля.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное изучение безопасности препарата «споробактерин жидкий» *in vivo*.

Выявлена стабильно высокая антагонистическая активность препарата «споробактерин жидкий» в отношении клинических штаммов условно патогенных микроорганизмов, обладающих множественной лекарственной

устойчивостью, в т. ч. метициллинрезистентностью и β -лактамазной активностью.

Впервые в опытах *in vitro* проведена сравнительная оценка модулирующего действия споробактерина жидкого и коммерческих иммуномодуляторов на функциональную активность нейтрофилов человека.

Впервые продемонстрирована равная эффективность бациллярного пробиотического препарата при профилактике послеоперационных гнойно-септических осложнений в сравнении с антибиотиками при оценке средней продолжительности периода реабилитации.

Впервые выявлены преимущества использования споробактерина в сравнении с введением антибиотиков при оценке клинической эффективности.

Практическая значимость

Выявлена антагонистическая активность споробактерина жидкого в отношении клинических условно-патогенных микроорганизмов – возбудителей гнойно-воспалительных послеоперационных осложнений, выделенных от пациентов кардиохирургического профиля.

Доказано отсутствие побочных действий и высокая лечебно-профилактическая эффективность споробактерина при инфекционных послеоперационных осложнениях у пациентов кардиохирургического профиля.

Соотношение стоимости лечения и пребывания пациентов в стационаре при использовании споробактерина и антибиотиков составляет 1:9, и это подтверждает экономическую целесообразность применения споробактерина.

Результаты проведенных исследований легли в основу методических указаний «Применение пробиотика споробактерина для профилактики послеоперационных осложнений в кардиохирургии», которые применяются в стационаре ФНЦТИО.

Получен патент РФ № 2350329 «Способ профилактики послеоперационных гнойно-септических осложнений в кардиохирургии».

Положения, выносимые на защиту

- Результаты доклинического исследования свидетельствуют, что споробактерин жидкий соответствует требованиям безопасности, предъявляемым к медицинским иммунобиологическим препаратам, применяемым в качестве лекарственных средств.
- Доминирующими группами возбудителей гнойно-воспалительных осложнений в послеоперационном периоде в кардиохирургии являются *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, представители сем. *Enterobacteriaceae*.
- Споробактерин жидкий проявляет высокую антагонистическую активность в отношении основных возбудителей послеоперационных нозокомиальных инфекций и модулирующую активность в отношении фагоцитов крови человека в опытах *in vitro*.

- Споробактерин жидкий обладает высокой профилактической и терапевтической эффективностью при послеоперационных инфекционных осложнениях у пациентов кардиохирургического профиля.

Личный вклад соискателя

Автору принадлежат участие в разработке концепции и направления исследований, непосредственное осуществление экспериментальных исследований, анализ и теоретическое обобщение полученных данных, формулирование выводов. В работе использованы материалы, полученные автором в соавторстве с сотрудниками лаборатории диагностических бактериальных препаратов с коллекцией микроорганизмов и клиники лабораторных животных ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора и лаборатории гнойно-септических осложнений и эндотоксикозов ФГУ Федерального научного центра трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздравсоцразвития. Автор выражает глубокую благодарность руководителям и всем сотрудникам за неоценимую помощь в выполнении данной работы. Особая благодарность д. м. н. Горской Е.М. и к. б. н. Мефеду К.М. за действенную помощь и поддержку.

Апробация работы и публикации

Основные результаты проведенных исследований были опубликованы и доложены на Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2006, 2008); XIV Российском научном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2007); I Международном конгрессе «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания. Фундаментальные и клинические аспекты» (Санкт-Петербург, 2007); Международной конференции, посвященной 110-летию Пермского НПО «Биомед» (Пермь, 2008); II Всероссийском съезде микологов (Москва, 2008); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Биологическая безопасность в современном мире» (Оболensk, 2009); XXXII Международном конгрессе Общества «Микробная экология и болезни» (SOMED) (Санкт-Петербург, 2009).

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании Ученого совета ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

По теме диссертации опубликованы 16 печатных работ, в т. ч. в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации, получен Государственный патент РФ на изобретение и разработаны Методические рекомендации.

Объем и структура работы

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, заключения, выводов, списка литературы и прило-

жения. Работа изложена на 105 страницах текста компьютерной верстки и иллюстрирована 17 таблицами и 14 рисунками. Список литературы представлен 218 источниками (85 отечественных и 133 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Материалы:

- «Споробактерин жидкий, суспензия для приема внутрь», производство ООО «Бакорен» (г. Оренбург), производственные серии (n = 9);
- *патогенные и условно-патогенные штаммы микроорганизмов* (n = 255), выделенные от больных с послеоперационными инфекционными осложнениями, находившихся в стационаре ФНЦТИО на реабилитации после операций по коррекции клапанных поражений сердца и аортокоронарного шунтирования;
- *антибиотики* (АБ): ампициллин, оксациллин, доксициклин, эритромицин, стрептомицин, тетрациклин, гентамицин, линкомицин, моксифлоксацин, цефуроксим, тобрамицин, хлорамфеникол, фузидин, рифампин, амикацин, цефотаксим, офлоксацин, цефалексин, цефазолин, цефамандол, цефтазидим, ципрофлоксацин, имипенем, цефтриаксон, цефепим, цефоперазон, нетилмицин, меропенем, линезолид, сульперазон, ванкомицин, пefлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин, цефокситин, пенициллин, азитромицин, полимиксин, азтреонам, азлоциллин, тикарциллин (+ клавулоновая кислота), амоксициллин (+ клавулоновая кислота), триметоприм/сульфометоксазол;
- *иммуномодулирующие препараты:*
 - габриглобин, иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения сухой (Ивановская станция переливания крови, г. Иваново)
 - спленоид, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения (ЗАО «ПромИнвест», г. Москва)
 - тимоген, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения (ЗАО «Цитомед», г. Санкт-Петербург)
 - пирогенал, раствор для инъекций (филиал «Медгамал» НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, г. Москва)
 - полиоксидоний, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций и местного применения (НПО «Петровакс Фарм», г. Москва).
- *лабораторные животные:*
 - мыши (обоего пола) линии «black» и F (CBAxBI), массой 10–16 г (n = 100);
 - мыши беспородные (обоего пола), массой 10–16 г (n=200).
- *питательные среды*, традиционно применяемые в микробиологических исследованиях, в т. ч. пр-ва компании Laboratorios Conda (Испания) и НПО «Микроген» (РФ).

Методы

Безопасность препарата «споробактерин жидкий» оценивали по отсутствию токсичности, токсигенности и вирулентности в соответствии с методическими рекомендациями (Смирнов В.В. с соавт., 1983), острой и хронической токсичности препарата в соответствии с РД 42-28-8-89. В исследованиях использовали серии препарата «споробактерин жидкий» в начале срока годности и по его окончании.

Критерием оценки являлось отсутствие гибели животных и положительная динамика групповой массы.

При изучении острой токсичности препарат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин, осадок разводили 0,9%-ным раствором натрия хлорида, затем однократно вводили белым беспородным мышам в следующих дозах: *per os* – 10^{11} КОЕ/мл, внутривенно (в/в) – 5×10^{10} КОЕ/0,5 мл, внутривенно (в/в) – 5×10^9 КОЕ/0,5 мл. Контрольные группы животных получали физиологический раствор аналогично и в соответствующем объеме.

При изучении хронической токсичности животным препарат вводили *per os* ежедневно в дозе 10^5 КОЕ/0,5 мл, в течение 21 сут. Первая контрольная группа животных ежедневно *per os* получала по 0,5 мл физиологического раствора в течение 21 сут, вторая группа животных была интактная.

При выполнении экспериментов на животных руководствовались «Правилами гуманного обращения с лабораторными животными» (СП №1045-73, 2003).

Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) проводили общепринятыми методами (Биргер, 1992; Bergey, 1986).

Определение антибиотикочувствительности (АБЧ) нозокомиальных штаммов проводили диско-диффузионным методом на среде Мюллера–Хинтона в соответствии со стандартами CLSI (ранее NCCLS). Использовали диски фирмы Becton Dickinson. Диагностическая панель состояла из 42 антибиотиков различных групп. Определение зон задержки роста осуществляли на приборе «Озирис» (Biorad, Франция) с использованием экспертной системы, позволяющей учитывать минимальную ингибиторную концентрацию антибиотиков, природную резистентность микроорганизмов, метициллин-резистентность и бета-лактамазную активность бактерий.

Для выявления бактериемии образцы крови культивировались в аппаратном комплексе VactAlert (BioMerieux, Франция). Идентификацию выделенных культур условно-патогенных микроорганизмов проводили с применением коммерческих тест-систем API (BioMerieux, Франция). Исследование биологических свойств микроорганизмов (гемолизин-продукции, плазмокоагуляции и др.) осуществляли общепринятыми методами.

Определение антагонистической активности споробактерина в отношении выделенных нозокомиальных штаммов УПМ проводили методом отсроченного антагонизма (ФСП 42-02160735-06). Антагонистическую ак-

тивность считали нулевой при зоне задержки роста тест-штамма до 5 мм, низкой – от 5 до 10 мм, высокой – от 10 до 20 мм, очень высокой – свыше 20 мм. В соответствии с принятой практикой антагонистическую активность считали эффективной при средних и высоких показателях (Осипова, 2005).

Результаты всех доклинических исследований оценивали на основании данных 3 последовательно проведенных экспериментов.

В течение 2006–2008 гг. проводилось клиническое исследование, в которое было включено 276 пациентов стационара ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова». Пациенты были рандомизированы по виду оперативного вмешательства, возрасту, полу, наличию факторов риска ПИО и разделены на 2 группы. К факторам дооперационного риска относили наличие очагов инфекции, сопутствующие заболевания, проведение повторных операций на сердце и др. Все операции проведены в условиях искусственного кровообращения (ИК). В качестве интраоперационных факторов учитывались длительность ИК, искусственная вентиляция легких (ИВЛ), проведение реторакотомии, постановка внутриаортального баллона, объем кровопотери.

Первая группа – основная (в послеоперационном периоде у больных применялся только споробактерин), вторая группа – сравнения (в послеоперационном периоде использованы антибиотики по обычной схеме). Введение антибиотиков пациентам обеих групп проводили до операции, в процессе операции, а также в отделении реанимации, время пребывания в котором больных, как правило, не превышало 24 ч. После перевода в профильное отделение инъекционное введение антибиотиков, назначенных после скрининговых исследований АБЧ УПМ, выделяемых у пациентов, продолжали только пациентам 2-й группы. Пациентам 1-й группы после перевода в отделение назначали курс споробактерина. Препарат назначали перорально по 2–5 мл 2 раза в день в течение 10–14 сут.

Пациентам обеих групп проводили обычные клинико-лабораторные исследования (ЭКГ, Эхо-КГ, коронарография, гемограммы и др.), мониторинг динамики температурных реакций, состояния ран, мест введения подключичных катетеров; учитывали длительность антибиотикотерапии, смену антибиотиков, необходимость использования проблемных антибиотиков, спектр выделяемой микрофлоры, уровень ее резистентности к антибиотикам и подбор наиболее адекватного иммуномодулятора в реабилитационном периоде.

Проводили сравнительное изучение *in vitro* иммуномодулирующего действия коммерческих иммуномодуляторов и споробактерина на модели нейтрофилов крови пациентов стационара ФНЦТИО методом люминолзависимой хемилюминесценции (Владимиров Ю.А., 1989). Вычисляли индекс стимуляции (ИС) по формуле:

$$\text{ИС} = (\text{O} - \text{K}) / \text{K},$$

где O – число импульсов в системе нейтрофилов, полученных от пациентов, в сочетании со споробактерином и/или иммуностимуляторами; K – число импульсов в интактной системе нейтрофилов.

Полученные данные обработаны с помощью методов вариационной статистики, позволяющих вычислять параметры достоверной значимости результатов исследования по общепринятым методикам (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962; Гланц, 1999). Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием непарного t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты в таблицах и на рисунках представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное изучение эффективности пробиотического препарата «споробактерин жидкий»

Всестороннее исследование биологической безопасности препарата «споробактерин жидкий» на организм животных показало, что препарат не вирулентен, не токсичен, а его метаболиты не токсигенны. Полученные результаты позволяют считать препарат безвредным. Исследования образцов препарата с истекшим сроком годности подтверждают стабильность показателей безопасности на протяжении всего периода длительного хранения.

При изучении острой и хронической токсичности выявлено, что во время периода наблюдения животные были здоровы, активны, поведенческие реакции не нарушались, масса тела не снижалась; побочные эффекты или осложнения, связанные с введением препарата, не выявлены. Гистологические исследования подтвердили отсутствие патологических изменений в тканях и внутренних органах лабораторных животных. Не отмечено значимой разницы в селезеночном индексе мышей контрольной и опытной групп животных. В процессе исследований не удалось определить величину показателя LD_{50} . Можно предположить, что данные показатели для штамма *B. subtilis* 534 составляют при в/б введении более 10×10^{10} КОЕ/0,5 мл и при в/в введении – 5×10^{10} КОЕ/0,5 мл. Таким образом, проведенные исследования острой и хронической токсичности показали, что споробактерин жидкий не вызывает во внутренних органах и ЦНС животных изменений, указывающих на наличие токсического действия при введении доз, даже значительно превышающих человеческие.

Полученные результаты подтверждают, что споробактерин жидкий безопасен даже на конце срока годности и не вызывает каких-либо патологических изменений в организме лабораторных животных, следовательно, данное исследование доказывает полное соответствие препарата требованиям по безопасности, предъявляемым к МИБП.

Следующим этапом работы стало изучение видового состава микроорганизмов – возбудителей послеоперационных нозокомиальных инфекций,

выделенных из разных образцов биосубстратов, полученных от пациентов кардиохирургического профиля. В рамках данного исследования выделено 255 штаммов грамположительных (гр+) и грамотрицательных (гр-) микроорганизмов разных групп. Наибольшая обсемененность гр+ микрофлорой выявлялась в образцах крови, отделяемого раны, смывов с сосудистых катетеров; гр- микроорганизмы преобладали в отделяемом трахеи и моче (рис. 1).

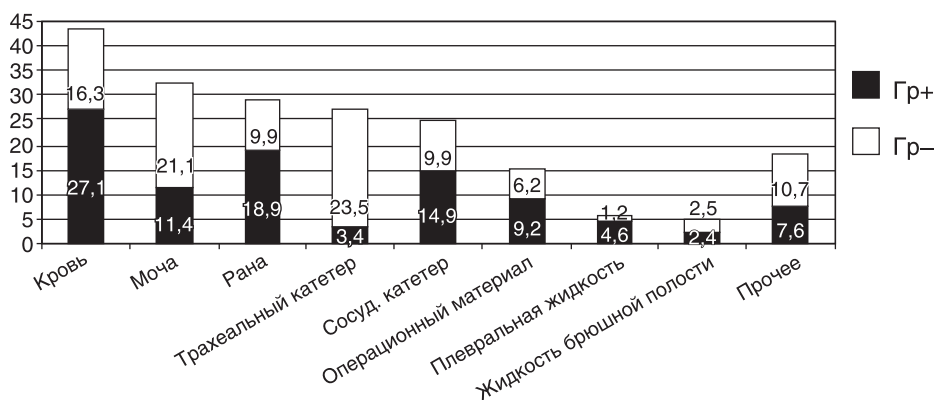


Рис. 1. Распределение по субстратам условно-патогенных микроорганизмов, выделенных от пациентов с ПИО

Анализ видового состава выделенных УПМ (рис. 2) показал, что гр+ микроорганизмы преобладали и составили 68,2% (174 штамма), при этом доминировали коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) – 44,2%, бактерии рода *Enterococcus* и *S. aureus* составили, соответственно, 20,1 и 19,1%. В небольшом количестве (около 16,6%) выделялись бактерии родов: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Aerococcus*. Среди гр- микрофлоры (81 штамм) чаще всего обнаруживались бактерии рода *Pseudomonas*, в частности *P. aeruginosa* (43,2%); затем представители семейства *Enterobacteriaceae* (30,9%), бактерии родов *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* выделяли в 18,5% случаев.

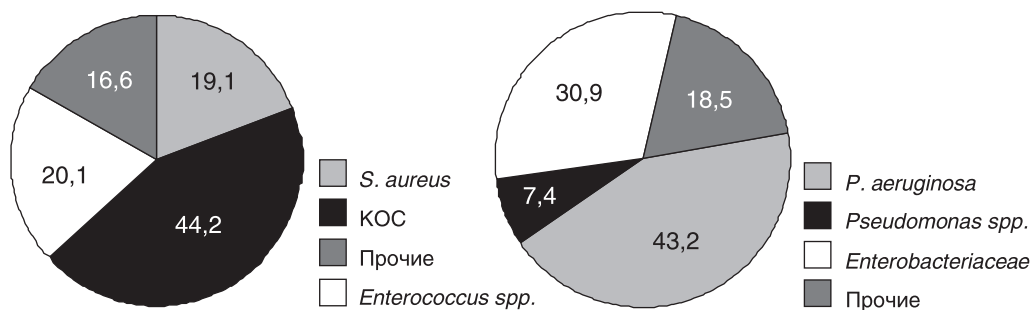


Рис. 2. Распределение по видам условно-патогенных микроорганизмов, выделенных у пациентов с ПИО

Проведен анализ этиологической значимости различных видов УПМ в развитии послеоперационных инфекционных осложнений. КОС обнаружены у 30% пациентов, *P. aeruginosa* обнаружена у 16% пациентов, бактерии р. *Enterococcus* и *S. aureus* – у 13%, бактерии кишечной группы – у 10%, кандиды – у 4% (рис. 3).

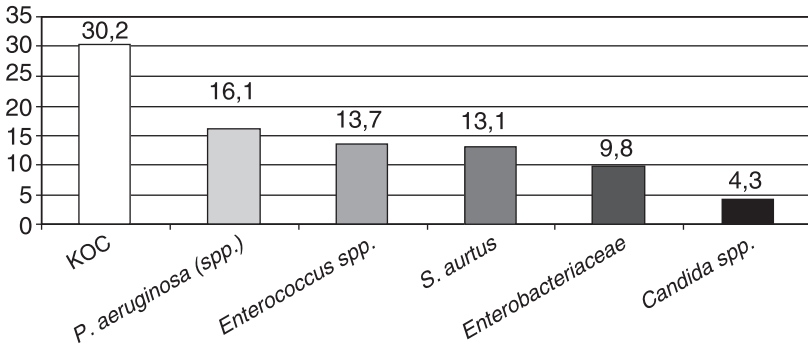


Рис. 3. Частота выделения УПМ у пациентов кардиохирургического профиля при ПИО

Одним из общепризнанных показателей эффективности пробиотических препаратов является антагонистическая активность (АА) в опытах *in vitro*. В опубликованных ранее работах (Никитенко, 1992; Осипова, 2001, 2003) показана выраженная антагонистическая активность споробактерина сухого в отношении различных УПМ, в том числе тех, которые являются этиологически значимым фактором развития нозокомиальных инфекций. При изучении АА споробактерина в отношении УПМ, выделенных у пациентов кардиохирургического профиля, выявлено, что препарат проявлял стабильную АА (средние и высокие показатели). Отмечено, что на уровень АА споробактерина влияет источник выделения микроорганизмов (табл. 1). Так, 88% гр+ штаммов, выделенных из трахеального катетера, были чувствительны к споробактерину (АА средняя или высокая), а 100% гр- штаммов, выделенных из внутрисосудистых катетеров, были устойчивы.

Таким образом, показано, что споробактерин проявляет АА в отношении 70,1% гр+ и 19,5% гр- микроорганизмов. При этом выявлены различия уровня АА споробактерина, зависящие от вида и штамма микроорганизмов. Величина зон задержки роста *S. haemolyticus* и *E. faecalis* существенно превышает этот показатель для *S. xylosus* и *E. faecium*. Процент штаммов стафилококков, рост которых подавлялся споробактерином, колеблется от 44% (*S. xylosus*) до 100% (*S. saprophyticus* и *S. warneri*); процент чувствительных штаммов энтерококков варьировался от 50% (*E. faecalis*) до 75% (*E. faecium*) (табл. 2)

При исследовании чувствительности выделенных клинических штаммов к АБ выявлена высокая устойчивость УПМ к антибактериальным пре-

Таблица 1

**Антагонистическая активность споробактерии в отношении штаммов УПМ,
выделенных из различных субстратов**

№ п/п	Всего	Гр+	АА, ср, мм	п Гр+ штаммов, чувствительных к споробактерии (ВЧ – СЧ – НЧ), шт (%)	Гр–	АА, ср, (мм)	п Гр- штаммов, чувствительных к споробактерии (ВЧ – СЧ – НЧ), шт (%)
Кровь	60	47	15,33 ± 3,8	8 (17,0%) – 22 (46,8%) – 17 (35,2%)	13	1,2	0 (0%) – 1 (7,7%) – 12 (92,3%)
Рана	41	33	15,27 ± 3,2	5 (15,1%) – 17 (51,2%) – 11 (33,3%)	8	0	0 (0%) – 0 (0%) – 8 (100%)
Моча	37	20	12,51 ± 3,3	2 (10,0%) – 13 (65%) – 5 (27,8%)	17	3,2	0 (0%) – 6 (35,3%) – 11 (64,7%)
Трахеальный катетер	25	6	17,17 ± 2,4	3 (50%) – 2 (33,3%) – 1 (16,7%)	19	1,9	0 (0%) – 3 (15,8%) – 16 (84,2%)
Подкл. катетер	28	22	11,88 ± 1,6	2 (9,1%) – 14 (63,6%) – 6 (27,3%)	6	0	0 (0%) – 0 (0%) – 6 (100%)
Плевр. жидкость	9	8	15,72 ± 3,2	3 (37,5%) – 4 (50%) – 1 (12,5%)	1	0	0 (0%) – 0 (0%) – 1 (100%)
Ж-ть бр. полости	6	4	19,44 ± 1,4	2 (50%) – 1 (25%) – 1 (25%)	2	0	0 (0%) – 0 (0%) – 2 (100%)
Опер. материал	25	18	14,15 ± 5,1	6 (33,3%) – 9 (50%) – 3 (16,7%)	7	9,1 ± 2,1	0 (0%) – 4 (40%) – 3 (60%)
В/с катетер	6	4	9,17 ± 1,9	0 (0%) – 3 (75%) – 1 (25%)	2	0	0 (0%) – 0 (0%) – 2 (100%)
Дренаж	3	1	21,67 ± 3,3	1 (100%) – 0 (0%) – 0 (0%)	2	2,9	0 (0%) – 1 (50%) – 1 (50%)
Перфузаты	4	2	11,67 ± 1,1	0 (0%) – 2 (100%) – 0 (0%)	2	13,1 ± 1,1	0 (0%) – 2 (100%) – 0 (0%)
Фурункулы	2	2	25,4 ± 7,0	1 (50%) – 1 (50%) – 0 (0%)	–	–	–
Электрод	2	2	0	0 (0%) – 0 (0%) – 2 (100%)	–	–	–
Киста	2	2	8,67 ± 1,5	0 (0%) – 1 (50%) – 1 (50%)	–	–	–
Бронхоскоп	1	–	–	–	1	0	0 (0%) – 0 (0%) – 1 (100%)
Зев	4	3	0	0 (0%) – 0 (0%) – 3 (100%)	1	0	0 (0%) – 0 (0%) – 1 (100%)
Всего	255	174	–	33–89–52 (18,9% – 51,2% – 29,9%)	81	–	0 – 15 – 66 (0% – 18,5% – 81,5%)

Примечание. ВЧ – высокая чувствительность, СЧ – средняя чувствительность, НЧ – низкая чувствительность.

Таблица 2

**Показатели антагонистической активности споробактерина
в отношении различных видов стафилококков и энтерококков**

Тест-штаммы	Кол-во штаммов	Зоны задержки роста тест-штаммов споробактерином (мм)	% штаммов, чувствительных к споробактерину
<i>S. aureus</i>	32	15,42 ± 5,7	63,5
<i>S. epidermidis</i>	24	15,4 ± 1,9	68,2
<i>S. haemolyticus</i>	17	17,4 ± 2,1	76,4
<i>S. xylosus</i>	9	9,9 ± 1,1	44,4
<i>S. saprophyticus</i>	5	13,5 ± 1,7	100
<i>S. warneri</i>	5	11,3 ± 1,6	100
Всего КОС	77	14,33 ± 3,0	77,9
<i>E. faecium</i>	16	11,8 ± 2,5	75
<i>E. faecalis</i>	16	15,8 ± 2,9	50

паратам различных групп (рис. 4). Так, установлено, что процент метицилин-резистентных (MR+) золотистых стафилококков от общего количества исследованных штаммов в исследованной выборке достигает 81,5%, MR+ КОС – более 65%. Чувствительность энтерококков к АБ, за исключением ванкомицина, составила лишь 29,1%. β-лактамазная активность установлена для 73% энтеробактерий.

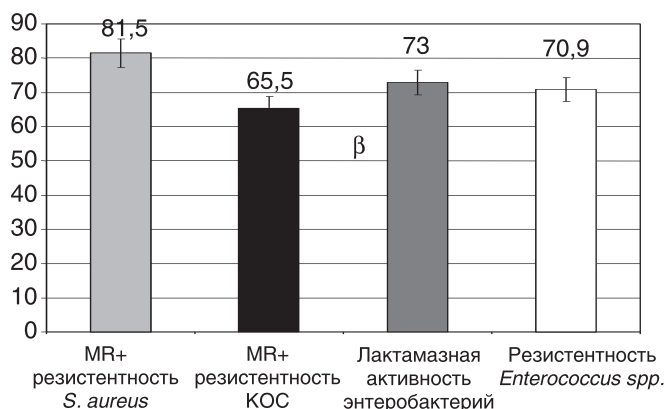


Рис. 4. Устойчивость к антибиотикам УПМ, выделенных от пациентов стационара ФНЦТИО в период 2006–2008 гг. от пациентов кардиохирургического профиля

Одновременное определение антибиотикочувствительности штаммов нозокомиальных бактерий и чувствительности их к споробактерину явилось следующим этапом исследований.

В клиниках кардиохирургического профиля в структуре микроорганизмов, этиологически значимых в возникновении послеоперационных ос-

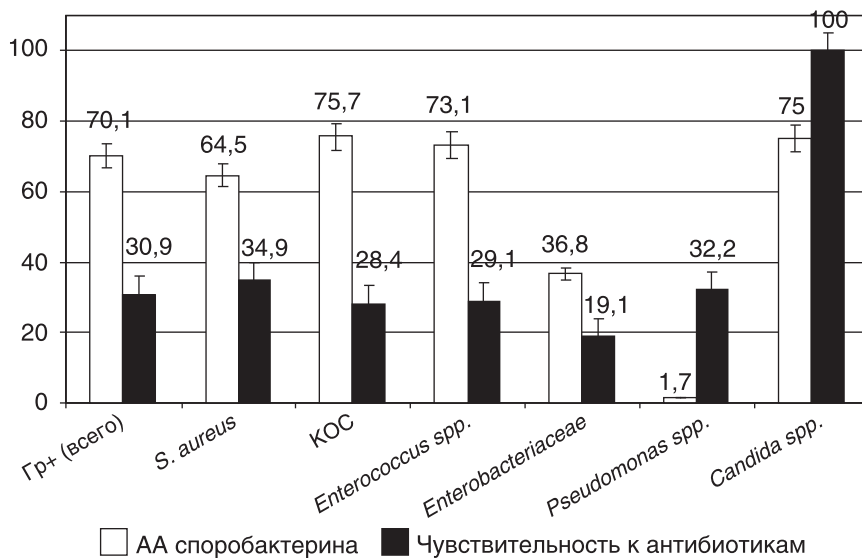


Рис. 5. Сравнительная активность споробактерина и антибиотиков в отношении УПМ

ложнений, преобладают стафилококки разных видов. У штаммов *S. aureus*, выделенных из различных субстратов, средний показатель эффективности споробактерина был высоким при задержке роста 64,5% штаммов золотистого стафилококка. В то же время в результате преобладания метициллин-резистентных штаммов чувствительность стафилококков к антибиотикам составила 35,1%. 75,7% штаммов КОС, выделенных из различных субстратов (кровь, моча, отделяемое ран и трахеи), обладали высокой чувствительностью к споробактерину, тогда как чувствительность к антибиотикам была низкой и находилась на уровне 28,4%.

В отношении энтерококков также отмечен высокий уровень задержки роста штаммов споробактерином (73,1%), при этом чувствительность к антибиотикам составила 29,1%. Исключение составил ванкомицин, чувствительность к которому выявлена у всех исследованных штаммов. Споробактерин также проявил высокую активность в отношении других гр+ микроорганизмов – микрококков, аэрококков (62,5% штаммов). При этом антибиотикочувствительность микрококков, аэрококков и других гр+ бактерий составила 40,8%. Необходимо также отметить проявление высокой АА споробактерина в отношении грибов р. *Candida* (рис. 5).

При сравнительном изучении воздействия антибиотиков и споробактерина на гр- микроорганизмы для штаммов энтеробактерий *Enterobacter spp.*, *E. coli*, *Serratia spp.*, *Klebsiella spp.* и др. установлено, что споробактерин был эффективен в отношении 36,8% штаммов. При этом чувствительность указанных штаммов бактерий к антибиотикам составила лишь 19,1%.

Для штаммов *Pseudomonas spp.*, в том числе *P. aeruginosa*, характерна множественная резистентность к антибиотикам (67,8%) при отсутствии или низких показателях АА споробактерина.

Прочие изученные штаммы гр- бактерий – *Burkholderia sepacia*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* – были устойчивы как к антибиотикам, так и к споробактерину.

Таким образом, в отношении основных возбудителей нозокомиальных инфекций в стационаре ФГУ ФНЦТИО большую, чем у споробактерина, эффективность, удалось установить только для 2 антибиотических препаратов – линезолида и ванкомицина. Эти препараты входят в группу резерва (т. н. проблемные антибиотики) и применяются только по жизненным показаниям.

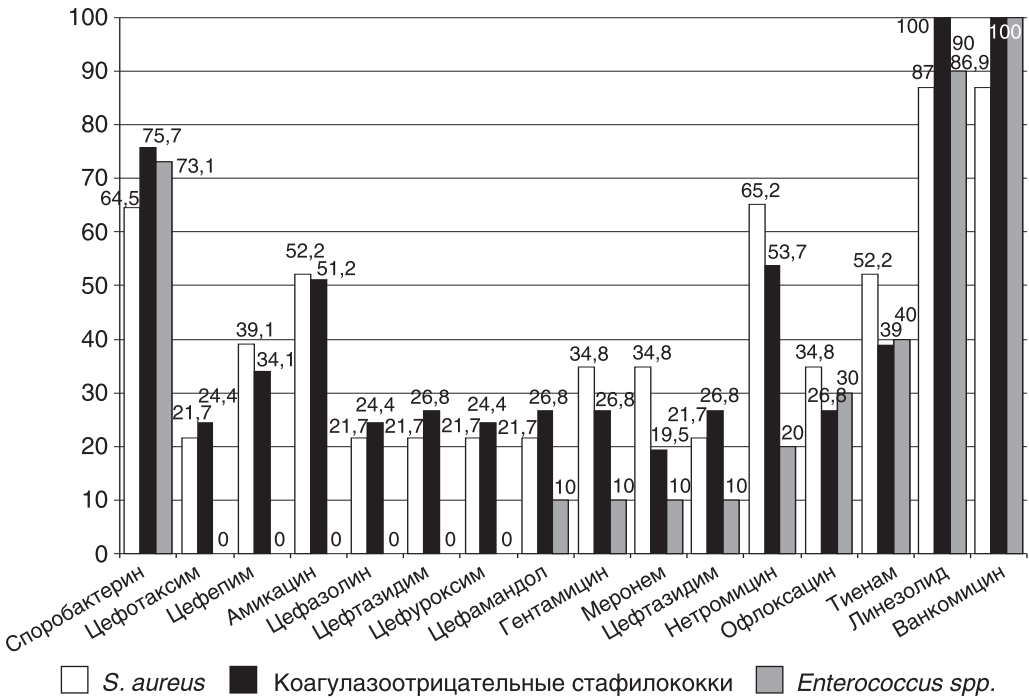


Рис. 6. Чувствительность нозокомиальных УПМ к споробактерину и антибиотикам различных групп

Перед назначением иммуномодулирующих препаратов пациентам в послеоперационном периоде в стационаре ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова методом люминолзависимой хемилюминесценции проводят скрининговые лабораторные исследования по определению модулирующего действия препаратов на функциональную активность фагоцитов крови *in vitro*. Исследовали иммуномодулирующее действие споробактерина в сравнении и сочетании с иммуномодуляторами, применяемыми при профилактике послеоперационных инфекционных осложнений

в кардиохирургии. Показано, что споробактерин повышал фагоцитирующую активность нейтрофилов крови человека в 2,3 раза по сравнению с контролем и в среднем в 1,6 раза по сравнению с другими иммуномодуляторами (рис. 7). При совместном применении споробактерина и других иммуномодуляторов синергетического эффекта не выявлено, за исключением совместного введения споробактерина и габриглобина, при котором отмечалось повышение индекса стимуляции функциональной активности нейтрофилов на 25% по сравнению с показателями совместного применения споробактерина и других иммуномодуляторов. Полученные результаты обосновывают возможность применения споробактерина при профилактике ПИО в кардиохирургии в качестве иммуномодулятора.

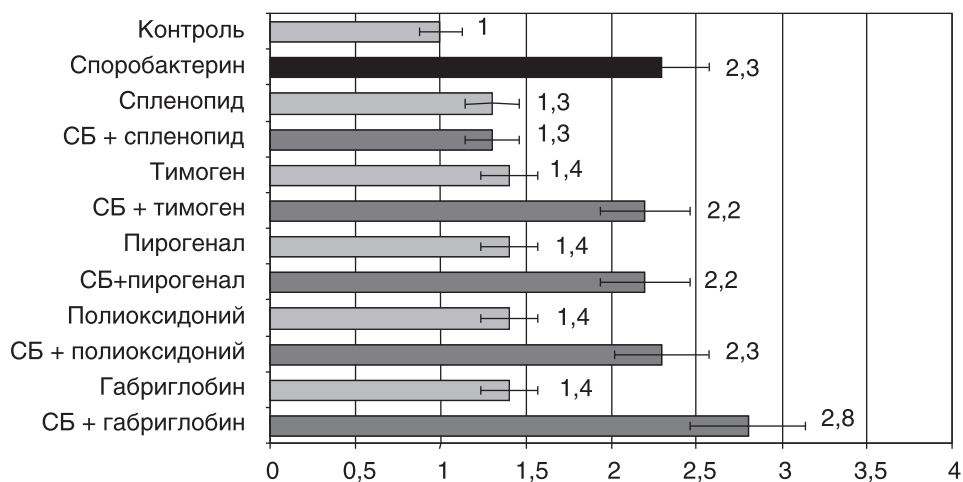


Рис. 7. Индекс стимуляции функциональной активности клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы различными иммуномодуляторами в опытах *in vitro*

В исследование клинической эффективности применения споробактерина при профилактике послеоперационных инфекционных осложнений были включены 276 пациентов. Распределение пациентов по типам хирургического вмешательства представлено на рис. 8.

Сравнение пациентов опытной и контрольной групп по наличию факторов риска развития ПИО до начала исследования показало, что в 1-й группе пациенты с наличием бактериального эндокардита составили 10,1%, а во 2-й группе – 8,7%. Повторных операций у пациентов 1-й группы было несколько больше – 7,2% против 5,8%. Пациентов с реторакотомией и кровопотерей более 500 мл в 1-й группе по сравнению со 2-й было соответственно в 3 и 2,2 раза больше (рис. 9). Таким образом, опытная группа пациентов оказалась более тяжелой по клиническим показателям, чем группа сравнения.

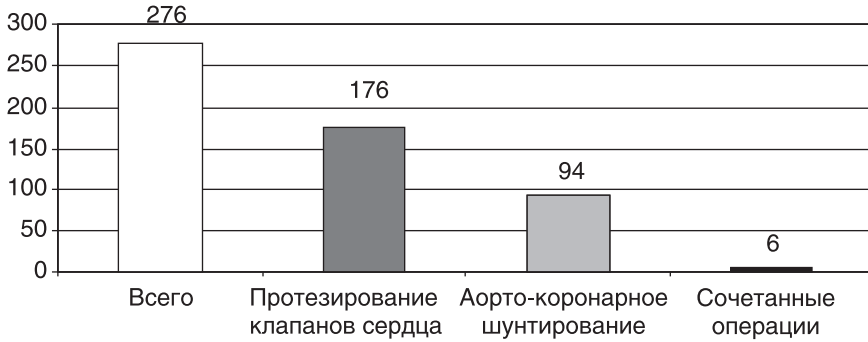


Рис. 8. Характеристика хирургических вмешательств у пациентов опытной и контрольной групп



Рис. 9. Характеристика пациентов опытной и контрольной групп по наличию факторов риска развития ПИО до начала исследования

Применение споробактерина, как показали результаты клинических и лабораторных исследований, не приводило к неблагоприятным отклонениям в динамике послеоперационного восстановительного периода у большинства наблюдаемых пациентов. Повышение температуры до 37,5 °С более двух сут наблюдалось у 13 пациентов опытной группы (9,4%) и у 24 пациентов контрольной группы (17,4%) (рис. 10). Длительность температурного периода у больных на фоне приема споробактерина не превышала 3–5 сут. Повышение температуры у пациентов контрольной группы было более длительным и требовало смены антибиотиков.

У всех больных с лихорадкой проводили бактериологическое исследование крови. Установлено, что у пациентов основной группы посеvy крови оказались во всех случаях стерильными. В контрольной группе у 15 пациентов (10,9%) обнаружена бактериемия. Основную часть выделенных микроорганизмов (7 штаммов) представляли MR+ КОС, устойчивые к используемым АБ. У 4 пациентов выделены *S. aureus*; у 3 из них штаммы оказались метициллин-резистентными. Выделены также 4 высокорез-

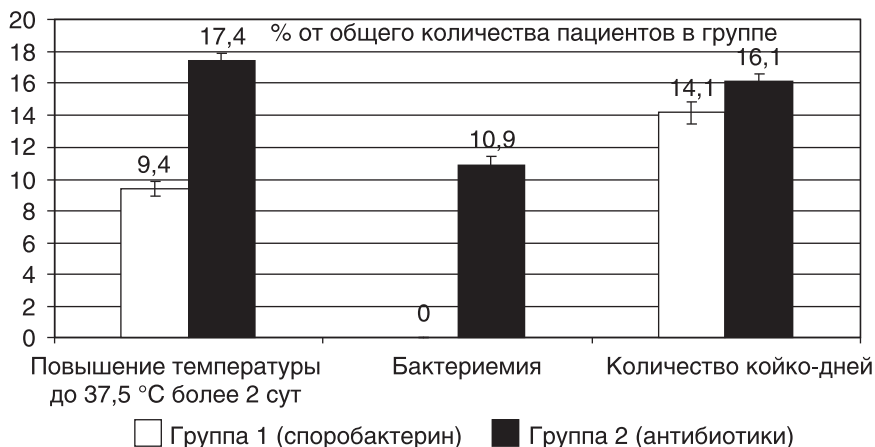


Рис. 10. Основные клинические показатели послеоперационного периода у пациентов опытной и контрольной групп

зистентных штамма *Enterococcus faecalis*, по 1 штамму *Micrococcus luteus*, *Aerococcus viridans*, *Corynebacterium spp.*

В группе больных, получавших споробактерин, послеоперационный период протекал без осложнений и не требовал замены препарата и применения дополнительных лекарственных средств, в том числе антибиотиков. В группе, получавшей антибиотики, 47% пациентов по тем или иным показаниям проведена смена назначенных ранее препаратов. При этом 26% пациентов назначены антибиотики резерва (проблемные АБ) – тиенам, меропенем, ванкомицин, линезолид из-за длительного повышения температуры и выявления бактериемии.

Среднее количество койко-дней для 1-й группы составило 14,1 сут, для 2-й группы – 16,1 сут.

Приведенные данные показали целесообразность и эффективность применения спорового пробиотика в раннем послеоперационном периоде после операций с ИК у тяжелого контингента кардиохирургических пациентов, получивших короткий курс АБ (1–1,5 сут). Подсчет стоимости антибиотикотерапии показал, что соотношение стоимости назначаемых препаратов в обследуемых группах пациентов составило в относительных единицах 1 : 9.

Микробиологический мониторинг спектра бактериемий в стационаре ФНЦТИО им. акад. В.И. Шумакова в период 2006–2009 гг. показывает, что из 206 исследованных штаммов преобладающими возбудителями инфекций кровотока являются КОС – 45,1%, *S. aureus* – 11,7%, *Enterococcus spp.* – 10,2%, обладающие множественной лекарственной устойчивостью. В проведенных исследованиях показана выраженная АА споробактерина против гр+ микроорганизмов, в том числе выделенных из крови, и грибов рода *Candida*. Полученные клинические данные по эффективности альтернативного антибиотикам применения споробактерина в послеопераци-

онном периоде у кардиохирургических больных позволяют полагать, что данные *in vitro* и клинические данные совпадают.

Помимо прямого антагонистического действия, активность споробактерина в отношении возбудителей ПИО может быть связана с восстановлением нормального микробиоценоза кишечника – резервуара условно-патогенной микрофлоры при дисбактериозах, как правило, регистрируемых у кардиохирургических пациентов. Немаловажное значение в оценке преимуществ использования споробактерина имеет факт минимизации длительности применения АБ, что способствует уменьшению дисбиотических изменений в кишечнике и повышению неспецифической резистентности. Пробиотик лишен побочных действий.

Таким образом, экспериментальное изучение споробактерина жидкого выявило его безопасность, высокую специфическую активность, переносимость и клиническую эффективность при профилактике гнойно-септических послеоперационных осложнений у пациентов кардиохирургического профиля, что явилось обоснованием внедрения препарата в практику кардиохирургии.

ВЫВОДЫ

Пробиотический препарат «споробактерин жидкий» соответствует всем требованиям безопасности, предъявляемым медицинским иммунологическим препаратам, предназначенным для клинического применения, по показателям общей, острой и хронической токсичности, токсигенности, вирулентности.

У пациентов кардиохирургического профиля с гнойно-воспалительными послеоперационными осложнениями выделяются преимущественно грамположительные микроорганизмы (68% от общего числа), в том числе коагулазоотрицательные стафилококки – 44,2%; бактерии р. *Enterococcus* – 20,1%; *S. aureus* – 19,1%. Среди грамотрицательной микрофлоры преобладают бактерии р. *Pseudomonas* – 50,6% и бактерии сем. *Enterobacteriaceae* – 30,9%.

При исследовании чувствительности выделенных клинических штаммов условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам установлено, что метициллин-резистентность обнаружена у 81,5% штаммов *S. aureus* и 65,5% коагулазоотрицательных стафилококков. β -лактамазная активность выявлена у 73% бактерий кишечной группы. Резистентность энтерококков к антибиотикам (за исключением ванкомицина) составила 70,9%.

Споробактерин жидкий проявляет высокую антагонистическую активность в отношении штаммов микроорганизмов, являющихся основными возбудителями нозокомиальных инфекционных осложнений в послеоперационном периоде, в том числе обладающих множественной резистентностью к антибиотикам. При этом частота выявления чувствительности нозокомиальных условно-патогенных микроорганизмов к споробактерину

выше данного показателя для антибиотиков, применяемых для профилактики послеоперационных инфекционных осложнений.

Установлено, что споробактерин жидкий в опытах *in vitro* интенсифицирует фагоцитирующую активность нейтрофилов крови человека.

Доказано микробиологическое и клиническое преимущество применения препарата «споробактерин жидкий» (по показателям длительности периода повышенной температуры, отсутствия бактериемии, длительности пребывания пациентов в стационаре и экономическим затратам) при профилактике гнойно-септических послеоперационных осложнений у пациентов кардиохирургического профиля.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Мефед К.М., Осипова И.Г., Давыдов Д.С.* Результаты комплексного исследования безопасности штаммов-пробиотиков рода *Bacillus* // Материалы научной конференции «Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний». – Н. Новгород. – 2006. – С. 236.
2. *Мефед К.М., Давыдов Д.С., Осипова И.Г., Шарая В.С., Васильева Е.А.* Применение споровых пробиотиков в мировой практике // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – М., 2006. – С. 66.
3. *Стяжкин К.К., Васильев Н.Т., Поберий И.А., Забокрицкий А.Н., Рогожин А.З., Сирик М.С., Чебыкин А.М., Давыдов Д.С., Мефед К.М.* 10-летний опыт серийного производства и применения пробиотика «Биоспорин» и новые задачи // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2006. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – М., 2006. – С. 89–90.
4. *Мефед К.М., Осипова И.Г., Васильева Е.А., Давыдов Д.С.* Результаты сравнительного исследования новых ветеринарных пробиотиков Ирилис и Пацифлор // Вестник РУДН. Серия «Медицина». Юбилейный выпуск № 2 (34) – 2006. – С. 27–31.
5. *Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Осипова И.Г., Горская Е.М., Арефьева Л.И.* Сравнительное изучение активности споробактерина и антибиотиков к нозокомиальным штаммам условно патогенных бактерий // Клиническое питание. – № 1–2. – 2007. – С. 31.
6. *Давыдов Д.С., Мефед К.М., Осипова И.Г., Васильева И.А.* Мировое применение споровых пробиотиков в практике здравоохранения // Клиническое питание. – № 1–2. – 2007. – С. 36.
7. *Давыдов Д.С., Мефед К.М., Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Осипова И.Г.* Антагонистическая активность споровых пробиотиков в отношении клинических штаммов грибов р. *Candida*, выделенных от пациентов кардиохирургического профиля // Современная микология в России. Т. 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. – 2008. – С. 288–289.

8. *Осипова И.Г., Мефед К.М., Давыдов Д.С.* Коррекция экспериментального дисбактериоза пробиотиками // Биопрепараты. – № 1. – 2008. – С. 9–15.
9. *Габриэлян Н.И., Давыдов Д.С., Горская Е.М., Спирина Т.С., Осипова И.Г.* Антагонизм *in vitro* споробактерина в отношении нозокомиальных штаммов микробов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 6. – С. 12–18.
10. *Габриэлян Н.И., Казаков Э.Н., Арефьев Л.И., Мякишев В.Б., Сенченко О.Р., Спирина Т.С., Давыдов Д.С., Осипова И.Г., Горская Е.М., Илюхина Н.Н., Вавилов П.Н., Сускова В.С.* Использование споробактерина в послеоперационном периоде у пациентов кардиохирургического профиля // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – № 6. – С. 62–66.
11. *Давыдов Д.С., Мефед К.М., Осипова И.Г., Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Илюхина Н.Н., Вавилов П.Н., Сускова В.С., Кривов И.А.* Применение споробактерина в послеоперационном периоде // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Вакцинология 2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней». – М., 2008. – С. 45.
12. *Габриэлян Н.И., Арефьева Л.И., Давыдов Д.С., Осипова И.Г., Мефед К.М. и др.* Применение пробиотика споробактерина для профилактики инфекционных осложнений в кардиохирургии. Методические указания. – М., 2009. – 24 с.
13. *Давыдов Д.С., Мефед К.М., Осипова И.Г.* Использование споробактерина в кардиохирургии при послеоперационных инфекционных осложнениях // Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Биологическая безопасность в современном мире. – Оболенск, 2009. – С. 229–232.
14. *Мефед К.М., Давыдов Д.С., Осипова И.Г.* Актуальные вопросы безопасности споровых пробиотиков // Научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Биологическая безопасность в современном мире. – Оболенск, 2009. – С. 240–242.
15. *Давыдов Д.С., Мефед К.М., Осипова И.Г., Габриэлян Н.И., Горская Е.М.* Обоснование профилактики нозокомиальных послеоперационных инфекций пробиотическими препаратами на основе спорообразующих бактерий р. *Vacillus* // Материалы 6-й Объединенной научной сессии и 2-го Международного конгресса по пробиотикам. – Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2009. – № 4. – С. 39.
16. Государственный патент РФ № 2350329 «Способ профилактики послеоперационных гнойно-септических осложнений в кардиохирургии». Заявка № 2007130634. Приоритет изобретения 10 августа 2007 г. Срок действия 10 августа 2027 г. // Шумаков В.И., Габриэлян Н. И., Горская Е.М., Осипова И.Г., Васильева Е.А., Давыдов Д.С., Мефед К.М. и др.

Корнилов Максим Николаевич

ВЫБОР МЕТОДИКИ КАВАЛЬНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ПРИ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Мойсюк Ян Геннадиевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Общепризнано, что ортотопическая трансплантация печени (ОТП) является единственным радикальным методом лечения терминальной стадии заболеваний печени [Busuttil R.W., 2003; Broering D.C., 2004; Готье С.В., 2008]. Достижения последних лет сделали данную процедуру рутинной во многих трансплантологических центрах мира [Reddy K.S., 2000; Busuttil R.W., 2006]. Количество выполняемых в год трансплантаций печени в США составляет 21,4 на 1 млн населения, в странах Европы данный показатель варьируется от 10,6 до 26,3, составляя в среднем 13,6 [Newsletter transplant, 2008]. Аналогичные расчеты, проведенные по трансплантации печени в России, демонстрируют крайне низкие показатели – 0,6–0,86 на 1 млн населения [Филин А.В., 2008; Готье С.В., Мойсюк Я.Г., 2009]. Столь низкие показатели связаны с ограниченным числом центров, занимающихся данной проблемой, и повсеместным дефицитом донорских органов. Для увеличения количества трансплан-

таций в мировую практику введено понятие «доноры с расширенными критериями» – ECD (extended criteria donors), а хорошие результаты трансплантации органов от таких доноров показывают, что классические критерии их пригодности вовсе не абсолютны [Busuttill R.W., 2005; Nguyen J.H., 2009]. Но четкие определения расширенных критериев до сих пор не даны, напротив, под этим термином понимается набор критериев в зависимости от опыта и возможностей конкретного центра [D'Alessandro A.M., 2005; Maluf D.G., 2006]. В данной ситуации особое значение приобретает организация и методология оперативного вмешательства у донора и реципиента, что, соответственно, позволяет уменьшить нежелательные эффекты исходного повреждения печени, холодовой и тепловой ишемии [Strasberg S.M., 1994.; D'Alessandro A.M., 2005; Feng S., 2006]. Для совершенствования хирургической техники предложены различные варианты восстановления венозного оттока: «классическая» методика T. Starzl [Starzl T., 1963], а также получившие широкое распространение альтернативные методики с сохранением нижней полой вены (НПВ) реципиента [Tzakis A.G., 1989; Belghiti J., 1992; Lerut J., 1994]. Современная тенденция состоит в преимущественном использовании модификаций имплантации печени с сохранением НПВ реципиента и отказе от систематического использования вено-венозного обхода (ВВО) [Chari R.S., 1998; Lerut J., 1999; Mehrabi A., 2008]. По гемодинамическому профилю течение имплантации печени без обходного вено-венозного шунтирования аналогично классической трансплантации печени с использованием ВВО [Belghiti J., 1989; Nasraway S.A., 1995, Reddy K.S., 2000].

В современной литературе значительное число работ посвящено преимуществам и недостаткам той или иной методики имплантации печени. Однако до сегодняшнего момента нет отражения выбора методики кавальной реконструкции в зависимости от интраоперационных находок, конверсии с одной техники на другую. Нередко после выполнения лапаротомии и начала гепатэктомии становится очевидно, что невозможно выполнить первоначальный план операции в связи с анатомическими особенностями, массивным спаечным процессом либо в связи с такими осложнениями, как острая массивная кровопотеря [Мойсюк Я.Г., 2008]. Остается спорным вопрос об использовании печени от донора с «расширенными» критериями, в частности о выборе хирургической тактики, направленной на минимизацию сроков холодовой и тепловой ишемии [Takada Y., 1998; Feng S., 2006; Shiftman M.L., 2006]. Вышесказанное определило актуальность, цели и задачи данного исследования.

Цель исследования

Обосновать индивидуальный подход к выбору методики восстановления эфферентного кровотока (кавальной реконструкции) при ортотопической трансплантации трупной печени

Задачи исследования

1. Изучить варианты техники трансплантации трупной печени без использования вено-венозного обхода.
2. Разработать оптимальную хирургическую тактику в зависимости от интраоперационных условий.
3. Сравнить интраоперационные параметры (время тепловой и холодовой ишемии, длительность беспеченочного периода и операции в целом) при использовании вено-венозного обхода и без него.
4. Проанализировать структуру осложнений, течение раннего и отдаленного послеоперационного периодов.
5. Ретроспективно оценить характеристики донорской популяции и уточнить критерии отбора печеночных трансплантатов.

Научная новизна

Впервые в отечественной практике обоснован индивидуальный подход к выбору методики восстановления эфферентного кровотока (кавальной реконструкции) при трансплантации трупной печени. При этом установлено, что оптимальной является методика операции с сохранением нижней полой вены реципиента, а предпочтительным техническим вариантом – формирование кава-кавального анастомоза по типу «конец в бок». Внедрение данной методики в клинику позволило значительно оптимизировать периоперационные факторы, неблагоприятно влияющие как на трансплантат, так и на реципиента, а именно – время вторичной тепловой ишемии, время холодовой ишемии, время беспеченочного периода и продолжительность операции.

Разработанная методика операции и ее модификации, в том числе при сплит-трансплантации и ретрансплантации, сокращают время вторичной тепловой ишемии в 2,5 раза, длительность беспеченочного периода – в 2 раза, что благоприятно сказывается на начальной функции трансплантата и течении раннего послеоперационного периода. Детальная проработка техники операции и анализ интра- и послеоперационных осложнений позволили предложить оптимальную хирургическую тактику в зависимости от интраоперационных условий на этапах гепатэктомии и имплантации трупной печени. На основе анализа донорской популяции определены наиболее значимые факторы, влияющие на функцию трансплантата в раннем послеоперационном периоде.

Практическая значимость работы

Детально представлены варианты техники выполнения ортотопической трансплантации печени, включая нестандартные хирургические ситуации. Обоснована целесообразность выполнения гепатэктомии с сохранением кровотока по нижней полой вене реципиента. При этом показано, что краевое пережатие нижней полой вены не оказывает значимого влияния на гемодинамическую стабильность реципиента. Обосновано, что диссекция кавальных ворот должна осуществляться только при условии контроля во-

ротной и нижней полой вены в над- и подпеченочном отделе. Разработан алгоритм действий хирурга при осложненной гепатэктомии, что позволяет выбрать оптимальную тактику для снижения риска оперативного пособия и возникновения ранних послеоперационных осложнений, связанных с реконструкцией нижней полой вены. Доказаны преимущества кавальной реконструкции по типу «конец в бок», которая отличается воспроизводимостью и простотой выполнения и не приводит к нарушению оттока от трансплантата. При анализе донорской популяции показана допустимость использования органов от доноров с «расширенными критериями» при соблюдении сформулированных подходов на этапах отбора доноров, оперативного вмешательства и ведения ближайшего послеоперационного периода. Практические рекомендации могут быть использованы в условиях многопрофильных хирургических стационаров на начальном этапе организации программы трансплантации печени.

Внедрение результатов исследования

Основные положения диссертационной работы внедрены в клиническую практику в отделении трансплантации почки и печени ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» (г. Москва); Московском городском центре трансплантации печени; НИИ Скорой помощи им Н.В. Склифосовского (г. Москва); ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр Росздрава» (г. Нижний Новгород); ГУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа» (г. Белгород).

Апробация диссертации состоялась 17 июля 2009 года на межотделенческой конференции ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на:

1. Конференции с международным участием «Клиническая трансплантация органов» – Москва, 26–27 сентября 2007 г.
2. IV Международной конференции «Высокие технологии XXI века» – Испания, Бенидорм, 28 октября – 4 ноября 2007 г.
3. Научно-практической конференции «Актуальные вопросы трансплантации печени и органного донорства» – Санкт-Петербург, 1 июня 2007 г.
4. Международном конгрессе Европейского общества по трансплантации органов – Чехия, Прага, 29 сентября – 3 октября 2007 г.
5. XIV Международном конгрессе хирургов-гепатологов стран СНГ «Актуальные проблемы хирургической гепатологии» – Санкт-Петербург, 19–21 сентября 2007 года.
6. II Научно-практической конференции хирургов и урологов «Высокие технологии в медицине» – Нижний Новгород, 16 мая 2008 г.
7. Первой международной конференции по торако-абдоминальной хирургии – Москва, 5–6 июня 2008 г.

8. Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы трансплантологии» – Минск, 9–10 октября 2008 г.

9. IV Всероссийском съезде трансплантологов – Москва, 9–10 ноября, 2008 г.

10. III Конгрессе московских хирургов «Неотложная и специализированная хирургическая помощь» – Москва, 14–15 мая 2009 г.

Публикации

По теме диссертации опубликована 21 научная работа, в том числе 4 – в центральной рецензируемой печати.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста и содержит введение, обзор литературы, главу с описанием клинических наблюдений и методов исследования, две главы, посвященные результатам собственных исследований и их обсуждению, а также выводы, практические рекомендации и список литературы, который включает 214 источников, в том числе 20 отечественных и 194 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 52 рисунками и 4 таблицами, а также дополнена 5 клиническими наблюдениями.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Диссертационное исследование основывается на материале, полученном в процессе реализации программы трансплантации трупной печени в период с февраля 1990 по март 2009 гг. За указанный период выполнено 67 операций ортотопической трансплантации печени от трупного донора взрослым реципиентам (рис. 1).

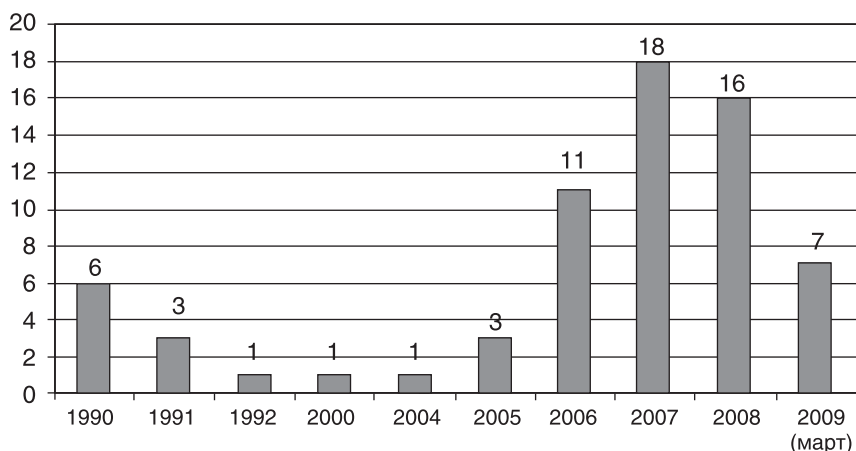


Рис. 1. Распределение количества операций по годам

Основную группу (ОГ) составили пациенты, оперированные в период с декабря 2004 по март 2009 гг. включительно. За этот период было выполнено 56 операций у 53 больных (3 ретрансплантации). В основной группе донорами печеночных аллотрансплантатов стали лица от 18 до 71 года, при этом медиана возраста составила 40 (27,5–48,5) лет. Мужчин – 26 (46,4%), женщин – 30 (53,6%). Аортальная перфузия применялась во всех наблюдениях, в качестве консервирующего раствора использовался Кустодиол.

Контрольную группу (КГ) составили пациенты, оперированные в 1990–2000 гг. За 10-летний период было выполнено 11 операций у 10 больных (1 ретрансплантация). Донорами печеночных аллотрансплантатов в КГ стали лица от 18 до 55 лет, при этом медиана возраста составила 31,7 (29–33) года. Женщин – 5 (45%), мужчин – 6 (55%). Только в одном наблюдении возраст донора превышал 40 лет, и этот донор 55 лет был использован для urgentной ретрансплантации печени. Перфузию и консервацию донорского органа осуществляли растворами: UW – 7 (63,63%), Евроколлинз – 3 (27,27%), Кустодиол – 1 (9,09%) случаев. Изъятие производилось с использованием комбинированной перфузии печени, канюлировались аорта и воротная вена. Для объективной оценки печеночных трансплантатов была использована модифицированная шкала S. Feng [2006] (DRI – donor risk index), а также шкала, предложенная R. Bussutil [2006] (DI – donor index).

В основной группе наблюдались 53 реципиента в возрасте от 18 до 63 лет, медиана возраста составила 45 (36–52 лет) лет. Мужчин – 19 (35,8%), женщин – 34 (64,2%). Контрольную группу составили 10 реципиентов – 5 мужчин и 5 женщин. Возраст реципиентов находился в пределах от 31 до 51 года, при этом медиана возрастного показателя составила 37,5 (36–41) лет. Распределение реципиентов по нозологическим формам представлено в табл. 1.

Таблица 1

Распределение пациентов по нозологическим формам

Показатели	Основная группа (n = 53)	Контрольная группа (n = 10)
ПБЦ	12 (22,6%)	2 (20%)
ПСХ	4 (7,5%)	0
Аутоиммунный гепатит	5 (9,4%)	0
Вирусные гепатиты	16 (30,2%)	3 (30%)
Поликистоз печени	1 (1,9%)	0
Токсический цирроз печени	7(13,2%)	2 (20%)
Рак печени	2 (3,8%)	3 (30%)
Синдром Бадда–Киари	3(5,6%)	0
Врожденный фиброз печени	1 (1,9%)	0
Метаболические болезни печени	2 (3,8%)	0
Итого	53 (100%)	10 (100%)

В основной группе трансплантация печени выполнялась в большинстве наблюдений с сохранением нижней полой вены реципиента без использования вено-венозного обхода по разработанному в процессе исследования алгоритму выполнения операции.

В контрольной группе все операции выполнены по классической методике, что предусматривает выполнение гепатэктомии у реципиента вместе с позадипеченочным отделом нижней полой вены. В течение беспеченочного периода использован веновенозный обход центрифужным насосом «Biorpump» («Biomedicus», США).

В послеоперационном периоде осуществлялись ежедневный клинико-лабораторный контроль, ежедневное ультразвуковое исследование брюшной полости с доплеровским картированием на диагностическом аппарате «Sonoline Antaries» («Siemens», Германия). Для оценки состояния сосудистого русла трансплантата выполнялась спиральная компьютерная томография на аппаратном комплексе «Somatom Sensation-64» («Siemens», Германия). При анализе группы признаков производилась проверка на нормальность распределения. Критический уровень значимости при проверке гипотез принимался равным 0,05. Для количественных дискретных и непрерывных интервальных данных использовали критерий Манна–Уитни (U) для двух групп, при выдвижении гипотезы о значимости различий между несколькими группами использовали критерий Крускала–Уоллиса (K). Статистическая обработка результатов проведена с помощью пакета программ Statistica 6.0 for Windows (Statsoft Inc., USA)

Результаты исследования

В процессе выполнения работы реализована идеология выполнения операции без вено-венозного обхода с сохранением нижней полой вены. Только в 3 (5,4%) наблюдениях нами планировалась и была применена «классическая» методика имплантации печени с ВВО. В 12 (21,4%) наблюдениях методика была модифицирована в соответствии с интраоперационной ситуацией – выполнялось пережатие НПВ реципиента. В 41 (73,2%) наблюдении операции выполнены с сохранением нижней полой вены без ее пережатия. Таким образом, главные отличия внутри основной группы заключались в способе формирования кава-кавального анастомоза.

Варианты формирования кава-кавальных анастомозов в основной группе представлены на рис. 2.

В 85,7% (48 операций) трансплантаций печени нам удалось избежать резекции нижней полой вены реципиента. После выполнения лапаротомии и мобилизации печени производили отделение паренхимы печени от передней поверхности позадипеченочного отдела НПВ. На завершающем этапе прошивали и пересекали сначала правую, затем срединную и левую печеночную вены. Одновременно с этим на отдельном столике второй бригадой хирургов выполнялась экстракорпоральная обработка трансплантата в со-

«Классический»	→ с ВВО	1
	→ без ВВО	7
«Бок в бок»	→	24
«Конец в бок»	→ с полным пережатием НПВ	4
	→ с сохранением кровотока по НПВ	17
«Piggy-back»	→ с ВВО	2
	→ без ВВО	1

Рис. 2. Варианты формирования кава-кавальных анастомозов

ответствии с избранной методикой имплантации. При формировании анастомоза по типу «бок в бок» ушивали над- и подпеченочный сегменты НПВ, по ее задней стенке производили венотомию. При помощи специального зажима типа Сатинского выполнялось продольное боковое отжатие передней стенки НПВ реципиента, достаточное для рассечения нижней поллой вены на протяжении до 6 см (рис. 3).

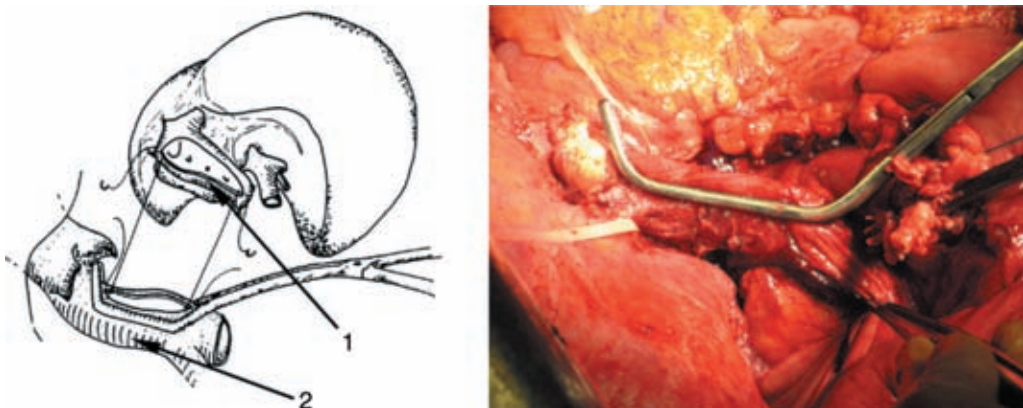


Рис. 3. Частичное боковое отжатие с сохранением кровотока по НПВ: 1 – задняя стенка НПВ трансплантата рассечена; 2 – НПВ реципиента частично пережата, рассечена по передней поверхности

При формировании анастомоза по типу «бок в бок» НПВ донора рассеклась на протяжении, соответствующем венотомии со стороны реципиента (рис. 4, а).

Для удобства и сокращения времени выполнения кава-кавального анастомоза нами внедрен оригинальный способ формирования анастомоза по типу «конец в бок», который применен в 21 (37,5%) наблюдении, в том числе при сплит-трансплантации и ретрансплантации (рис. 4, б).

В результате анализа накопленного опыта нами предложен алгоритм интраоперационных действий хирурга при гепатэктомии и трансплантации

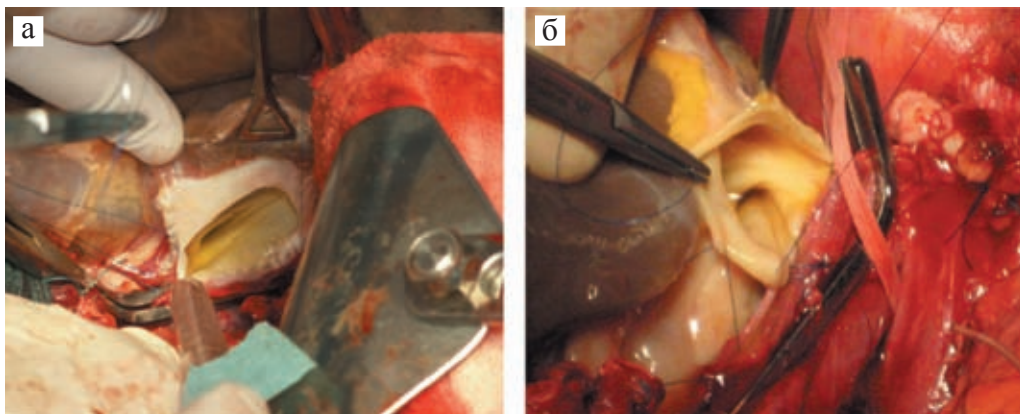


Рис. 4. Формирование анастомоза по типу «бок в бок» (а) и «конец в конец» (б)

печени с сохранением НПВ, в том числе при нестандартных ситуациях в ходе операции, направленный на следующее:

1. Снижение сроков вторичной тепловой ишемии трансплантата.
2. Сокращение времени пережатия воротной вены (беспеченочного периода).
3. Максимально быстрое выполнение операции.
4. Сокращение кровопотери.
5. Обеспечение безопасности больного при возникновении жизнеугрожающего массивного кровотечения (рис. 5).

Внедрение новых методик оперативного вмешательства, разработанного алгоритма позволило существенным образом повлиять на периоперационные параметры трансплантации печени. Для более детального анализа периоперационных характеристик в основной группе нами была выделена подгруппа реципиентов, у которых использован ВВО (3 наблюдения). В результате упрощения процедуры восстановления эфферентного кровотока, уменьшения числа формируемых анастомозов значительно снизилось время вторичной тепловой ишемии (рис. 6).

В основной группе, подгруппе без ВВО медиана времени вторичной тепловой ишемии составила 40 (35–50) минут, минимальное время тепловой ишемии в ОГ составило 20, максимальное – 70 минут, тогда как в контрольной группе – 102,5 (90–110) минуты, минимальное значение находилось на уровне 52 минут, максимальное – 159 минут ($p_u = 0,00003$).

В подгруппе реципиентов основной группы, оперированных с веновенозным обходом, медиана времени вторичной тепловой ишемии находилась на уровне 60 минут ($p_u = 0,012$ при сравнении с ОГ без ВВО). Снижение времени тепловой ишемии произошло главным образом за счет изменения методики оперативного вмешательства. Наложение лишь одного анастомоза при восстановлении эфферентного кровотока позволяет более быстро сформировать соустье, выполнить реперфузию трансплантата и снизить

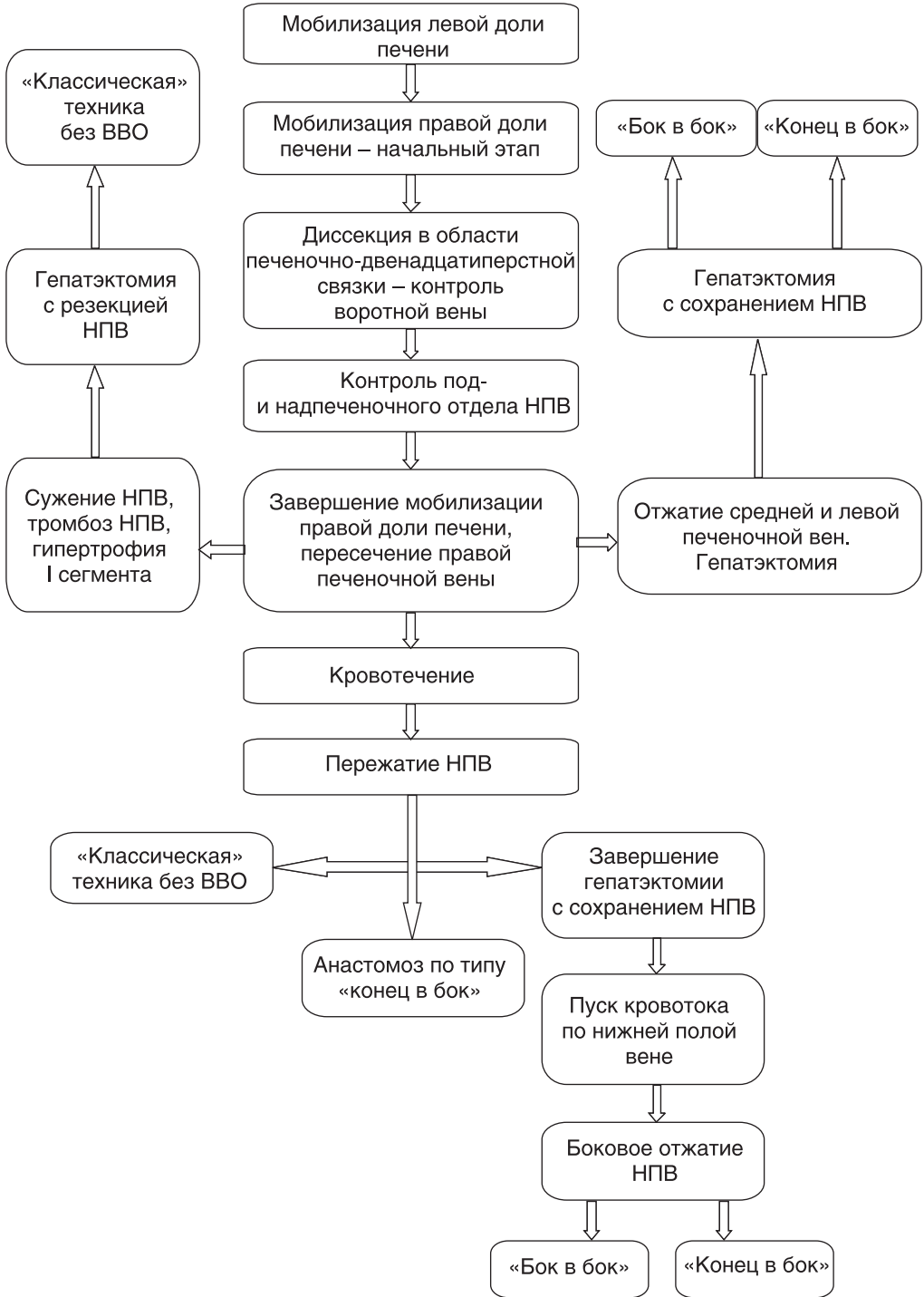


Рис. 5. Интраоперационный алгоритм выбора методики кавальной реконструкции

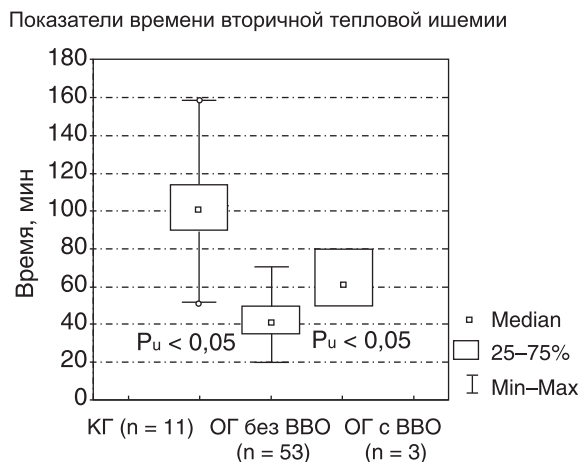


Рис. 6. Распределение показателя времени тепловой ишемии

негативные влияния вторичной тепловой ишемии. Вместе с тем период имплантации печени влияет не только на трансплантат. Длительность беспеченочного периода сказывается на состоянии организма реципиента. В основной группе продолжительность этого периода значимо ниже, чем в контрольной (рис. 7).



Рис. 7. Распределение времени беспеченочного периода

Медиана длительности беспеченочного периода в основной группе составила 55 (40–69) минут, при минимальном значении 26 минут, максимальном – 130 минут, тогда как в группе сравнения медиана составила 110 (87–126) минут ($p_u = 0,0035$). При анализе подгрупп основной группы медиана времени беспеченочного периода в подгруппе с применением ВВО составила 126 ± 20 минут. При сравнении внутри группы $p_u = 0,00052$.

Совокупность вышеперечисленных условий позволила снизить время оперативного вмешательства у этого тяжелого контингента больных, состав-

вив 580 (500–650) минут в основной группе, подгруппе без использования ВВО и 655 (585–793) минут в группе сравнения. Однако в данном случае имеется лишь тенденция к значимости $p_u = 0,06$. В основной группе, подгруппе с вено-венозным обходом продолжительность операции составила 725 (710–1040) минут. Большая продолжительность оперативного вмешательства в данной группе пациентов обусловлена значительными техническими трудностями на этапе гепатэктомии (рис. 8).

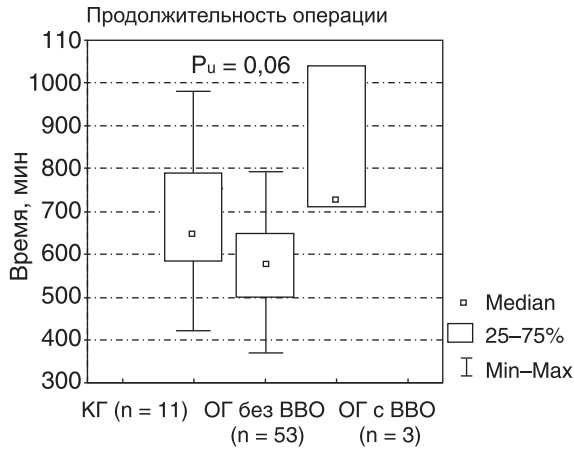


Рис. 8. Распределение продолжительности оперативного вмешательства

Наряду с координацией взаимодействия донорской и реципиентской бригад оптимизация хирургической техники выполнения гепатэктомии позволила уменьшить время холодовой ишемии трансплантата (рис. 9).

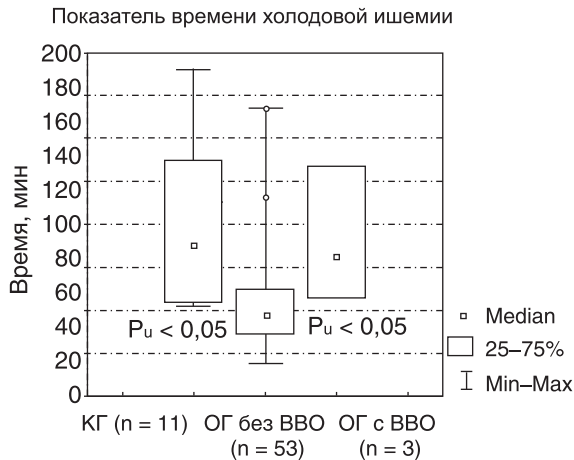


Рис. 9. Показатель времени холодовой ишемии

Медиана времени холодовой ишемии в контрольной группе составила 550 (420–750) минут, тогда как в основной группе, подгруппе без ВВО

данный показатель составил 389 (278–870 минут) минут. Время холодовой ишемии в основной группе в подгруппе с вено-венозным обходом составило 532 ± 155 (430–736) минут. При попарном сравнении между группами получены значимые различия ($p_u < 0,05$). Следует отметить, что при ожидаемом увеличении времени холодовой ишемии, как в случае дистанционного изъятия печени, возрастает роль минимизации времени вторичной тепловой ишемии трансплантата, что достигается использованием одного из видов операции с сохранением нижней полой вены.

Прецизионная техника при выполнении оперативного вмешательства по внедренным в клинику методикам, использование аппаратной реинфузии крови позволило существенным образом снизить объем кровопотери, а следовательно, количество использованных препаратов крови (рис. 10).



Рис. 10. Количество использованной эритроцитарной массы

В основной группе (подгруппа без использования ВВО) медиана количества использованной эритроцитарной массы составила 989 (630–1590) мл. В основной группе (подгруппа с ВВО) медиана количества, использованной эритроцитарной массы составила 1220 (330–4101) мл, различия не значимы, $p_u > 0,05$. В контрольной группе данный показатель составил 5787 (4800–12390) мл. При попарном сравнении с подгруппами основной группы $p_u < 0,05$.

Объем использованной плазмы крови в основной группе, подгруппе без ВВО составил 4010 (2400–5530) мл. В подгруппе, где использован ВВО, медиана составила 4830 (4660–11140) мл, тогда как в КГ медиана данного показателя была равна 5000 (2800–5400) мл (рис. 11).

В основной группе случаев интраоперационной летальности не наблюдалось. Анализ послеоперационных осложнений показал, что наиболее часто встречались пневмо- и гидроторакс, острая почечная недостаточность.

Спектр осложнений представлен в табл. 2.

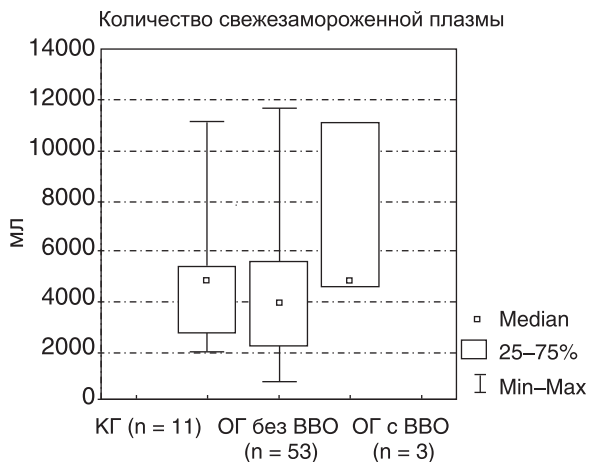


Рис. 11. Количество использованной свежемороженой плазмы

Таблица 2

Осложнения раннего послеоперационного периода

Осложнения	ОГ (%)
<i>Внутрибрюшные осложнения</i>	
Кровотечение	5 (9,4%)
Желчный перитонит	1 (1,8%)
Жидкостные скопления	2 (3,7%)
Абсцесс брюшной полости	1 (1,8%)
<i>Органная недостаточность</i>	
Острая дыхательная недостаточность	2 (3,7%)
Острая почечная недостаточность	7 (13%)
Острая печеночная недостаточность	3 (5,6%)
<i>Внутригрудные осложнения</i>	
Пневмо-гидроторакс	10 (18,9%)
Пневмония	3 (5,6%)
Итого	33

Следует отметить, что указанные осложнения не имели прямой связи с методикой выполнения операции. При динамическом наблюдении за проходимостью кава-кавального анастомоза ни в раннем, ни в позднем послеоперационном периоде признаков блока венозного оттока не выявлено ни в одном наблюдении (рис. 12).

В основной группе в раннем послеоперационном периоде (до 3 месяцев) погибло 6 реципиентов, что составило 11,3%. Одна больная погибла от рецидивирующего кровотечения из варикозно расширенных вен пищевода на 8-е сутки послеоперационного периода. Отсутствие начальной функции трансплантата стало причиной смерти 3 (50%) реципиентов, смерть вследствие сепсиса наступила в двух наблюдениях на 15-е и 40-е сутки

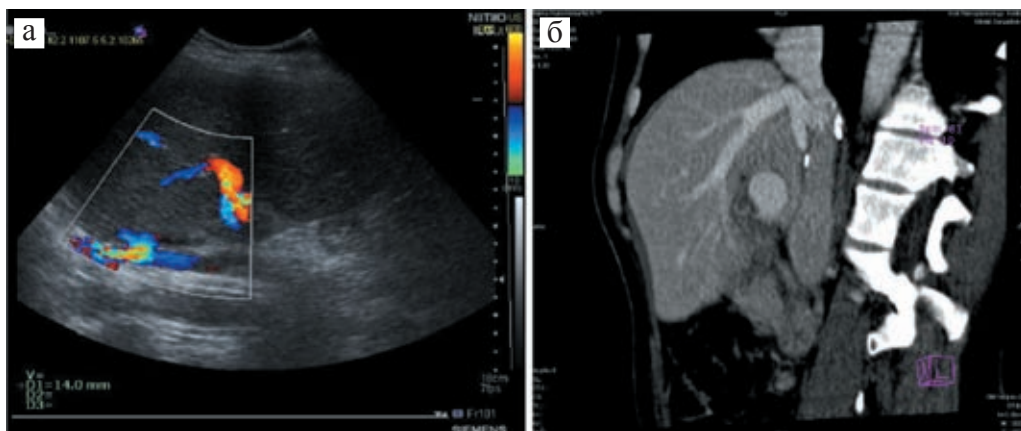


Рис. 12. УЗ-картина анастомоза по типу «конец в бок» через 14 суток после трансплантации (а); компьютерная томография реципиента через 1,5 года после трансплантации, анастомоз по типу «бок в бок» (б)

после операции. В одном наблюдении септический процесс развился на 20-е сутки после ретрансплантации печени (40-е сутки после первичной операции), выполненной по поводу тяжелой дисфункции трансплантата. Во втором случае функция трансплантата стабильная, однако на 10-е сутки послеоперационного периода развилась пневмония фульминантного течения, и реципиент погиб на 15-е сутки.

В отдаленном послеоперационном периоде в одном наблюдении смерть больного наступила через 3,5 месяца в отделении реанимации в связи с прогрессирующим угнетением функций головного мозга (центральный понтинный миелолиз). Смерть одной больной наступила через 4,5 месяца в результате гнойного холангита, развившегося после попытки эндоскопической дилатации стриктур внутрипеченочных желчных протоков. Один реципиент погиб через 1 год и 2 месяца после рецидива гепатоцеллюлярной карциномы.

В результате реализации программы трансплантации печени в клинике института с декабря 2004 года достигнуто существенное улучшение результатов при возрастающем количестве ежегодно выполняемых операций. Показатель годичной выживаемости реципиентов составил 85%, показатель 5-летней выживаемости – 82,5% (рис. 13).

Проведенный ретроспективный анализ донорской популяции показал, что более 75% из 56 использованных доноров относились к категории доноров с расширенными критериями. Показатель DRI для основной группы составил в среднем 1,31 (1,08–1,44), что выходит за пределы значений стандартного донора – 1,1 (рис. 14). Показатель DI для данной группы составил в большинстве наблюдений 1, что также соответствует показателю донора с расширенными критериями (рис. 15).

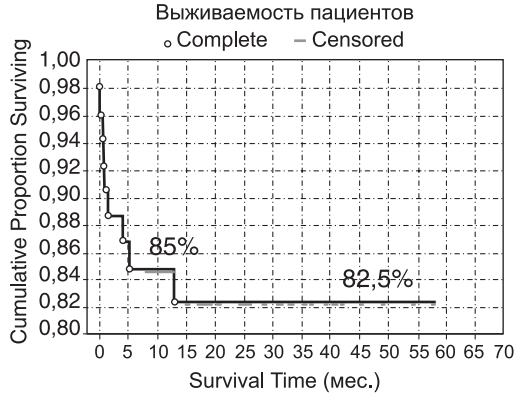


Рис. 13. Выживаемость реципиентов

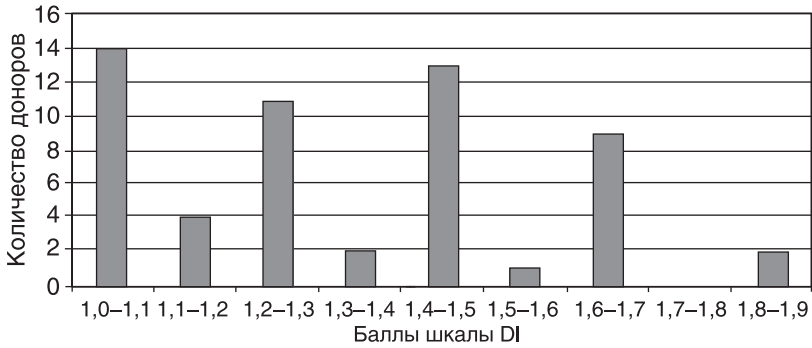


Рис. 14. Распределение показателя DRI основной группы

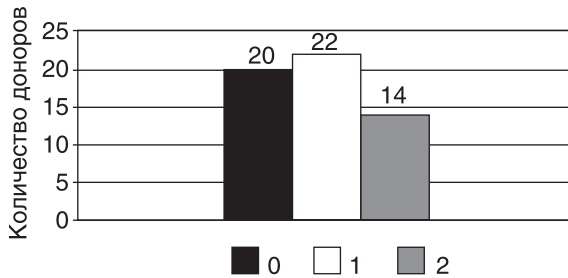


Рис. 15. Распределение показателя DI основной группы

Таким образом, в результате выполнения работы внедрена методика трансплантации печени с сохранением нижней полой вены реципиента без использования вено-венозного обхода, что минимизирует основные периоперационные показатели (время холодовой и вторичной тепловой ишемии трансплантата, потребность в препаратах крови), а это имеет существенное значение для потенциально поврежденного субоптимального печеночного трансплантата. Разработанный алгоритм операции позволяет выбрать оптимальную тактику в сложных интраоперационных ситуациях,

предотвратить осложнения при выполнении гепатэктомии и имплантации печени, улучшить течение послеоперационного периода.

ВЫВОДЫ

1. Операция ортотопической трансплантации печени в 85% наблюдений может быть успешно проведена с сохранением нижней полой вены реципиента без использования вено-венозного обхода, без значимых нарушений гемодинамики. Предпочтительным вариантом кавальной реконструкции является формирование кава-кавального анастомоза «конец в бок».
2. При развитии нестандартных ситуаций или угрожающих жизни осложнений в ходе гепатэктомии (сужение, тромбоз, выраженная гипертрофия I сегмента, нарушение целостности нижней полой вены, трудно-контролируемое кровотечение) целесообразным и безопасным является временное пережатие нижней полой вены. Переход на «классическую» методику без ВВО потребовался в 7 (12,5%) наблюдениях и не сопровождался значимыми нарушениями гемодинамики и функции почек.
3. Разработанный алгоритм операции сокращает время вторичной тепловой ишемии в 2,5 раза ($p_u < 0,05$), длительность беспеченочного периода – в 2 раза ($p_u < 0,05$) по сравнению с «классической» методикой с ВВО, что благоприятно сказывается на начальной функции трансплантата и течении раннего послеоперационного периода.
4. К серьезным осложнениям раннего послеоперационного периода, не связанным с методикой выполнения операции, относятся: первично нефункционирующий трансплантат (5,4%), острая почечная недостаточность (13%). В структуре послеоперационной летальности (11,3%) ведущим является отсутствие функции трансплантата (50%). Нарушений венозного оттока от трансплантата при выполнении кава-кавального анастомоза «бок в бок» или «конец в бок» в сроки до 5 лет после операции не наблюдается.
5. Современный дефицит донорских органов определяет вынужденную необходимость использования субоптимальных трансплантатов печени от доноров с расширенными критериями, доля которых превышает 75%. В этой связи оптимизации хирургической техники выполнения операции принадлежит важная роль в достижении показателя 1- и 5-летней выживаемости 85 и 82,5% соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При оценке трансплантата следует ориентироваться на следующие объективные критерии: возраст донора, количество и дозы вазопрессоров, уровень натрия сыворотки крови, длительность пребывания в отделе-

- нии реанимации, визуальная и пальпаторная характеристика (цвет, консистенция, наличия отека, острота края печени).
2. Определение донора с расширенными критериями включает в себя: возраст более 50 лет, доза допамина более 15 мкг/кг/мин, одновременное использование катехоламинов и вазопрессоров, натрий сыворотки крови более 160 ммоль/л, причина смерти – острое нарушение мозгового кровообращения, длительность пребывания в отделении реанимации – более 7 суток.
 3. Пределом допустимых показателей следует считать возраст 70 лет, натрий сыворотки крови не более 180 ммоль/л, а также сочетание не более двух факторов из определения донора с расширенными критериями. При неудовлетворительной визуальной оценке трансплантата следует воздержаться от изъятия печени, даже если донор соответствует стандартным критериям.
 4. При постановке в лист ожидания для оценки нижней полой и воротной вен необходимо провести спиральную компьютерную томографию для предварительного выбора технического варианта операции.
 5. Гепатэктомия предпочтительно осуществляться с сохранением нижней полой вены реципиента. При этом диссекция кавальных ворот печени может выполняться только после осуществления контроля воротной и нижней полой вены в над- и подпеченочном отделе.
 6. В случае возникновения массивного кровотечения при мобилизации нижней полой вены следует прибегнуть к временному пережатию воротной и полой вен.
 7. Если предполагается длительное полное пережатие нижней полой вены без использования ВВО на этапе имплантации, предварительно следует проводить ее пробное пережатие в течение 5 минут. При нестабильной гемодинамике перед гепатэктомией следует произвести анестезиологическую коррекцию.
 8. Кава-кавальный анастомоз должен быть максимально широким для предупреждения нарушения венозного оттока. При анастомозировании «бок в бок» рассечение НПВ донора должно достигать уровня печеночных вен. При наложении анастомоза «конец в бок» следует максимально укорачивать надпеченочный сегмент НПВ донора, при ее недостаточном диаметре рассекать заднюю стенку.
 9. При ретрансплантации печени в ранние сроки кава-кавальный анастомоз должен осуществляться по методике «конец в бок».

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н., Ерошенко Е.Б.* Поликистозная болезнь печени // Клиническая гепатология. – М., 2007. – № 3. – С. 47–48.
2. *Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н. и др.* Трансплантация печени – опыт НИИ трансплантологии и искусственных органов // Материалы

- IV международной конференции «Высокие технологии XXI века», Испания, Бенидорм, 28 октября – 4 ноября 2007 г. – С. 18.
3. *Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н. и др.* Оптимизация иммуносупрессивной терапии после ортотопической трансплантации печени // Материалы конференции «Клиническая трансплантация органов», Москва, 26–27 сентября 2007 г. – С. 98–99.
 4. *Мойсюк Я.Г., Шаршаткин А.В., Илжанов М.И., Корнилов М.Н. и др.* Опыт ортотопической трансплантации трупной печени с сохранением нижней полой вены реципиента // «Актуальные проблемы хирургической гепатологии»: мат. XIV Междунар. конгр. хирургов-гепатологов стран СНГ, Санкт-Петербург, 19–21 сентября 2007 г.
 5. *Попцов В.Н., Мойсюк Я.Г., Ухренков С.Г., Кузьмина Н.А., Корнилов М.Н. и др.* Грубые нарушения сердечного ритма в раннем периоде после повторной ортотопической трансплантации печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2007. – № 5. – С. 13–19.
 6. *Шумаков В.И., Милосердов И.А., Корнилов М.Н. и др.* Оптимизация иммуносупрессивной терапии после ортотопической трансплантации печени // «Актуальные вопросы трансплантации печени и органного донорства»: тез. докл. – СПб., 2007. – С. 86–87.
 7. *Шумаков В.И., Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н. и др.* Улучшение результатов трансплантации трупной печени: анализ двух периодов становления и развития программы в одном центре // Материалы конференции «Клиническая трансплантация органов», Москва, 26–27 сентября 2007 г. – С. 97–98.
 8. *Шумаков В.И., Мойсюк Я.Г., Шаршаткин А.В., Корнилов М.Н. и др.* Оптимизация выполнения трансплантации трупной печени // Материалы конференции «Актуальные вопросы трансплантации печени и органного донорства»: тез. докл. – СПб., 2007. – С. 23.
 9. *Шумаков В.И., Шаршаткин А.В., Милосердов И.А., Корнилов М.Н. и др.* Улучшение результатов трансплантации трупной печени: анализ двух периодов становления и развития программы в одном центре // «Актуальные вопросы трансплантации печени и органного донорства»: тез. докл. – СПб., 2007. – С. 97–99.
 10. *Moysyuk Y.G., Sharshatkin A.V., Iljanov M.I., Miloserdov I.A., Kornilov M.N.* Improved results of liver transplantation from extended criteria donors by shortening of the preservation, warm ischaemic and operative times // Abstr. for the 13th Congress of the European Society for organ transplantation. – Prague, 2007. – P. 275.
 11. *Багненко С.Ф., Резник О.Н., Мойсюк Я.Г., Корнилов М.Н. и др.* Первый успешный опыт дистанционного забора печени в Российской Федерации. Перспективы межрегиональной трансплантационной координации // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 3. – С. 3–6.
 12. *Корнилов М.Н., Милосердов И.А., Мойсюк Я.Г., Готье С.В.* Интраоперационный алгоритм выбора техники трансплантации трупной печени // Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов. – М., 2008. – С. 196–197.

13. **Корнилов М.Н., Милосердов И.А., Попцов В.Н., Мойсюк Я.Г., Готье С.В. и др.** Интраоперационный выбор техники кавальной реконструкции при ортотопической трансплантации печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – М., 2008. – № 5 (43). – С. 17–22.
14. **Мойсюк Я.Г., Корнилов М.Н., Милосердов И.А.** Альтернативные хирургические техники при трансплантации печени // Материалы первой международной конференции по торако-абдоминальной хирургии. Москва, 5–6 июня 2008 г. – С. 185.
15. **Мойсюк Я.Г., Корнилов М.Н., Милосердов И.А.** Опыт трансплантации печени без использования вспомогательного кровообращения // «Состояние и перспективы трансплантологии»: мат. междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2008. – С. 179–182.
16. **Мойсюк Я.Г., Корнилов М.Н., Милосердов И.А., Ярошенко Е.Б.** Минимизация иммуносупрессии и отдаленные результаты трансплантации трупной печени // Материалы первой международной конференции по торако-абдоминальной хирургии. Москва, 5–6 июня 2008 г. – С. 184.
17. **Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н.** Варианты дренирования желчных путей при трансплантации печени // Медицинский альманах. Спецвыпуск. Высокие технологии в медицине. – 2008 (май). – С. 37.
18. **Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н., Ерошенко Е.Б.** Эволюция подходов к иммуносупрессивной терапии после трансплантации печени // Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов. – М., 2008. – С. 200–201.
19. **Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н., Ерошенко Е.Б. и др.** Проблемы отдаленного периода после трансплантации печени // Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов. – М., 2008. – С. 219–221.
20. **Шумаков В.И., Козлов И.А., Попцов В.Н., Мойсюк Я.Г., Корнилов М.Н.** Опыт трансплантации печени в одном центре: современные технологии и проблемы улучшения результатов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 1. – С. 5–13.
21. **Мойсюк Я.Г., Милосердов И.А., Корнилов М.Н.** Выбор тактики восстановления эфферентного кровотока при ортотопической трансплантации печени // «Неотложная и специализированная хирургическая помощь»: мат. конф. III Конгресса московских хирургов. – М., 2009. – С. 166.

Мурашов Николай Сергеевич

**ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ
ИНФЕКЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ
ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ПОДДЕРЖКЕ
КРОВООБРАЩЕНИЯ**

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

03.02.03 Микробиология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Научные руководители:

кандидат медицинских наук, доцент,
заслуженный деятель науки РФ
доктор медицинских наук,
профессор

Габриэлян Нина Индзаровна
Толпекин Владимир Евгеньевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Методы механической поддержки кровообращения (МПК) – внутриаортальная контрпульсация (ВАКП), левожелудочковый обход (ЛЖО) и искусственное сердце (ИС) – все чаще стали применяться в кардиохирургии при тяжелой (медикаментозно не купируемой) острой сердечной недостаточности (ОСН) (А. Kantrowitz и соавт., 1986; R. Ott и соавт., 1993; Q. Fraizer и соавт., 1995; L. Mc. Bride и соавт., 1999; Д.В. Шумаков, В.Е. Толпекин,

2006). Было установлено, что применение методов МПК позволяет достоверно снизить летальность от рефрактерной ОСН при остром инфаркте миокарда, а также у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения (Д.В. Шумаков, 2000; Д.В. Шумаков, В.Е. Толпекин, 2006).

Однако серьезным препятствием на пути продвижения методов МПК в широкую клиническую практику являются опасные для жизни осложнения (кровотечения, тромбоз, инфекционные осложнения (ИО), дыхательная и почечная недостаточность и др.), среди которых ИО занимают одно из главных мест как по частоте, так и тяжести проявлений (W. Holman, 2004; C. Coleman, 2007 и др.).

Признается, что основными причинами возникновения ИО являются: биологическое несовершенство материалов, используемых в конструкциях исполнительных механических устройств (в частности разрушительный контакт клеток крови с полимерной поверхностью насоса, отсутствие адекватной многофакторной регуляции их работы), контаминация микробами входных и выходных магистралей, а также контактирующих с ними тканей, широкое использование инвазивных лечебных и диагностических процедур и существование в организме больных с хронической и острой сердечной недостаточностью исходного иммунодефицитного состояния. Все эти факторы, включая развивающийся «эндокардит» исполнительного устройства, создают в организме благоприятные условия для развития системной воспалительной реакции и последующей массивной бактериальной аутоагрессии, что на фоне сниженной чувствительности бактериальных штаммов к антибиотикам способствует манифестации ИО (S. Gordon с соавт., 2001; R. Hetzer с соавт., 2002; В.И. Шумаков с соавт., 2003)

Для предотвращения развития ИО при МПК сегодня проводятся исследования по совершенствованию конструкции насосов крови и биополимеров, применяемых для их изготовления, упрощаются методики проведения МПК. Для борьбы с уже развившейся инфекцией используются антибиотики широкого спектра действия, чувствительные к большинству нозокомиальных бактериальных штаммов.

Между тем исследований, в которых бы направленно изучалась роль нозокомиальной флоры в развитии ИО у больных при проведении механической поддержки кровообращения, оценивалось бы состояние внешней среды, где проводится лечение этих больных и роль защитных иммунных реакций организма в противодействии факторам распространения инфекции, а также разрабатывались бы эффективные схемы терапии ИО не только с помощью антибактериальных препаратов, но и иммунокорректорами и методами аферезной терапии, включая плазмаферез, до настоящего времени не проводилось.

Отсутствие таких исследований предопределило цели и задачи настоящего исследования.

Цель исследования

Выявить наиболее значимые факторы риска развития инфекционных осложнений, их влияние на летальность и разработать протоколы мероприятий по снижению частоты и тяжести течения инфекционных осложнений при проведении ВАКП и ЛЖО.

Задачи исследования

1. Проанализировать частоту развития инфекционных осложнений, их анатомическую локализацию и этиологическую принадлежность возбудителей инфекции у больных с ИБС при проведении механической поддержки кровообращения.
2. Выявить основные факторы риска развития инфекционных осложнений и рисков летального исхода, связанные с ними при функционировании гибридной системы «организм – насос».
3. Изучить влияние чувствительности к антибиотикам, выделенной нозокомиальной флоры у больных с механической поддержкой кровообращения, на частоту развития инфекционных осложнений и связанную с этим летальность.
4. Оценить возможности метода индивидуального подбора иммунокорректоров и лечебную эффективность протокола, разработанного на этой основе, в снижении частоты инфекционных осложнений и летальности у больных при ВАКП и ЛЖО.
5. Изучить санитарно-эпидемиологическое состояние объектов окружающей среды стационара и выявить маркеры их санитарного неблагополучия; разработать мероприятия по улучшению противoinфекционной профилактики и терапии у больных с механической поддержкой кровообращения в условиях стационара.

Научная новизна

Впервые проведено сравнительное исследование различий спектра инфекционных возбудителей, их чувствительности к антибиотикам и влияния на исход МПК у больных с ВАКП и обходом левого желудочка сердца. Выявлено, что важнейшими факторами, предрасполагающими к развитию инфекционных осложнений, являются выраженный преобладающий иммунный дисбаланс в организме больного, преобладание Гр- флоры в основных очагах инфекции и раннее проявление ПОН. Показано, что снизить частоту и тяжесть инфекционных осложнений у больных с посткардиотомной острой сердечной недостаточностью при МПК можно не только путем совершенствования техники операций, но и путем раннего применения индивидуально подобранных иммуномодуляторов (полиоксидоний, спленопид, миелопид), применения антибиотиков, а также поддержания на высоком уровне санитарно-эпидемиологического состояния окружающей среды наряду со строжайшим соблюдением правил асептики и антисептики медицинским персоналом, особенно при длительных сроках МПК.

Практическая значимость работы

Впервые показано, что в механической поддержке кровообращения нуждаются больные с ОН, у которых исходно имеет место развитие выраженной иммунной недостаточности, которую необходимо контролировать и корректировать иммуномодуляторами после осуществления индивидуального подбора препаратов. Выявлены предикторы развития инфекционных осложнений у больных с внутриаортальной контрпульсацией и обходом левого желудочка, связанные с кардиохирургической операцией и установкой в организме механических устройств; установлена роль санитарно-показательных бактерий как маркеров эпидемиологического неблагополучия стационара. Для диагностики возбудителя инфекционных осложнений предложено проводить одновременно посев из разных тканей организма (рана, трахея, слюна, кровь, моча), для проверки и подтверждения диагноза проводить посевы повторно. Выявлен спектр инфекционных агентов, ответственных за развитии инфекционных осложнений, чаще всего представленный Гр- микроорганизмами, и подтверждена связь Гр- флоры с высокой летальностью больных, находящихся на ЛЖО. Показано, что из-за наличия многочисленных входных ворот для инфекции, связанных с установкой механических устройств, осуществляющих механическую поддержку кровообращения, а также из-за предсуществующего иммунодефицитного состояния у больных, необходимо постоянно проводить эпидемиологический мониторинг и мероприятия, направленные на улучшение санитарно-гигиенического состояния, соответствующие режиму работы операционных.

Личный вклад соискателя

Автор принимал участие в разработке концепции и направления исследований, самостоятельно осуществил обобщение полученных данных и их статистическую обработку, формулирование выводов и практических рекомендаций.

Автор выражает глубокую благодарность руководителям и всем сотрудникам за неоценимую помощь в выполнении данной работы.

Апробация работы. Материалы и основные положения доложены:

1) на 11-м Всероссийском съезде сердечно-сосудистых хирургов, Москва 2005 г.;

2) 4-м Всероссийском съезде трансплантологов памяти академика В.И. Шумакова, Москва 2008 г.;

3) Межотделенческой конференции сотрудников лаборатории «Гнойно-септических осложнений и эндотоксикозов» и лаборатории «Вспомогательного кровообращения и искусственного сердца» ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, Москва 2009 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, 4 из них в центральной рецензируемой печати.

Объем и структура работы

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, собственных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 124 страницах текста компьютерной верстки и иллюстрирована 11 таблицами и 22 рисунками. Список литературы представлен 161 источниками (72 отечественных и 89 зарубежных).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены клинические наблюдения, подтвержденные данными инструментального, биохимического и бактериального обследования у 234 больных с ишемической болезнью сердца, изолированной или в сочетании с патологией клапанного аппарата, оперированных в условиях искусственного кровообращения в Научно-исследовательском институте трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ за период 1996–2006 гг.

У всех этих больных после окончания операции наблюдалось развитие симптомов острой рефракторной сердечной недостаточности (ОСН), по поводу которой потребовалось применение МПК (ВАКП или ЛЖО), причем из них у 86 пациентов, или в 36,7% наблюдений, на фоне МПК отмечалось развитие различного рода инфекционных осложнений.

Клиническое состояние у всех 86 больных соответствовало определению инфекционного осложнения, данному В.И. Шумаковым с соавт. 2003.

Для включения в анализ в каждом случае длительность МПК должна была равняться или превышать трое суток ($6,4 \pm 0,5$) ($p < 0,01$).

Клиническая характеристика больных

Демографические данные больных, включенных в анализ, представлены в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что первая группа больных с МПК ($n = 234$) и выделенная из нее вторая группа с инфекционными осложнениями ($n = 86$) по демографическим показателям в основном совпадали.

Хотя можно отметить, что во второй группе преобладали лица старше 60 лет – 24,4% против 18,4% в первой группе.

Среди пациентов в обеих группах большую часть составляли лица мужского пола: первая группа 75 и 80,0% соответственно во второй группе.

Перед началом операции большинство больных (94,9%) находилось во ПА или ПБ стадиях недостаточности кровообращения по И.Д. Василенко – В.Х.Стражеско.

В исследование не были включены больные с наличием хронических очагов инфекции, а также хроническими инкурабельными заболеваниями внутренних органов – печени, почек и т. д., пациенты с недостаточной продолжительностью МПК и недостаточно обследованные больные.

Таблица 1

**Демографическая характеристика больных (234) с развитием ИО
после применения МПК (n = 86)**

Показатель	Число больных			
	Абс. (n = 234) I группа	%	Абс. (n = 86) II группа	%
Возраст, лет:				
Менее 40	28	11,9	9	10,5
40–59	163	69,7	58	67,4
60 и старше	43	18,4	21	24,4
Пол:				
Мужской	175	75,0	69	80,0
Женский	59	25,0	17	19,7
Дооперационные факторы риска:				
Гипертензия	95	40,6	24	27,9
Курение	109	46,6	49	57,0
Сахарный диабет	12	5,1	5	5,8
Инфаркт в анамнезе и предшествующие операции	126	54,0	43	50,0
Стадии НК по И.Д. Василенко – В.Х. Стражеско				
I	14	6,0	5	5,8
IIa	158	67,5	47	54,7
IIб	62	26,5	34	39,5

Пациенты, которым МПК проводилось как I этап ТС, также не вошли в анализируемый материал, поскольку по исходному состоянию, прежде всего стадии недостаточности кровообращения по И.Д. Василенко – В.Х. Стражеско, функциональному классу по НИНА и другим параметрам эти группы больных были несопоставимы с основной группой.

Показатели центральной гемодинамики и сердечного выброса у больных с рефрактерной посткардиотомной ОСН, потребовавших применения МПК представлены в табл. 2.

Как видно из таблицы, показатели центральной гемодинамики и сердечного выброса не имели групповых различий и находились в пределах нормальных величин, поскольку пациенты с критическими нарушениями гемодинамики, которым МПК проводилась в экстренном порядке в анализируемый материал не вошли.

Исходная патология сердца у больных с инфекционными осложнениями на фоне МПК представлена в табл. 3.

Определение понятия «инфекционное осложнение» (ИО)

Выбор тактики антибактериальной терапии требует различать два близких по патогенезу, но различных по этиологии клинических синдромов: «инфекционное осложнение» (ИО) и «эпизод инфекции» (ЭИ).

Таблица 2

**Предоперационные показатели центральной гемодинамики
и функции сердца у больных, потребовавших применения МПК**

Параметры гемодинамики	n = 234 (M ± m, lim)	n = 86 (M ± m, lim)
	1	2
ЧСС/мин	76,4 ± 1,5 (48 – 126)	81,0 ± 2,6 (50 – 118)
Систолическое АД, мм рт. ст.	115,1 ± 7,6 (95 – 143)	109,0 ± 8,8 (98,5 – 149,8)
Диастолическое АД, мм рт. ст.	68,5 ± 5,9 (57 – 105)	63,0 ± 6,8 (50,0 – 95,5)
Среднее АД, мм рт. ст.	73,0 ± 4,6 (63 – 112)	71,5 ± 5,0 (61,0 – 103,0)
СИ, л/мин/м ²	3,0 ± 0,02 (2,5 – 3,6)	3,0 ± 0,03 (2,6,5 – 3,4)
ФИЛЖ	44,0 ± 6,1 (30 – 72)	47,6 ± 8,2 (31 – 69)
ИУО, мл/м ²	26,8 ± 2,5 (21,3 – 30,0)	26,8 ± 2,5 (24,5 – 30,3)

Примечание. 1 – общая группа, больные с посткардиотомной ОСН и МПК; 2 – больные с ИО, развившимися при МПК.

Таблица 3

**Патология сердца у больных с инфекционными осложнениями
на фоне применения МПК (n = 86)**

Характер патологии	Число больных n = 86	%
Приобретенные пороки сердца	5	5,8
Ишемическая болезнь сердца (ИБС)	77	89,5
– изолированная	54	52,8
– с аневризмой ЛЖ	23	26,7
ИБС в сочетании с клапанной патологией	2	2,3
ВПС, ДКМП	2	2,3

Примечание. ВПС – врожденная патология сердца.

На основании опыта клинко-инструментального и бактериологического обследования больных, которым проводилась ВАКП или ЛЖО, понятие «инфекционное осложнение» мы определяли как симптомокомплекс, включающий минимум два из нижеперечисленных симптомов:

- повышение температуры тела до 38–39,5 °С в течение не менее 3–5 суток;
- положительные посевы крови, необходимость применения антибиотиков;
- местное проявление инфекции в области послеоперационной раны или в местах выхода соединительных магистралей наружу.

Показания к применению систем МПК и характеристика

Общим показанием к проведению ВАКП или ЛЖО являлась невозможность отключить больного от аппарата искусственного кровообращения.

Индикацией к ВАКП служили:

- обширный периоперационный инфаркт миокарда со стойкими явлениями синдрома низкого СВ или нестабильностью гемодинамики,
- падение систолического артериального давления ниже $90,0 \pm 8,8$ мм рт. ст. ($p < 0,001$), повышение ДЗЛА до $24,6 \pm 1,0$ мм рт. ст. ($p < 0,01$), ЦВД до $12,2 \pm 0,9$ мм рт. ст. ($p < 0,01$),
- дозы допамина более $9,3 \pm 4,3$ мкг/кг/мин ($p < 0,05$), адреналина свыше $47,0 \pm 2,2$ нг/кг/мин ($p < 0,01$).

Обход левого желудочка сердца применялся:

- при невозможности отключить больного от аппарата ИК, несмотря на коррекцию водно-электролитного баланса и проведение внутриаортальной КП на фоне интенсивной терапии кардиотониками.
- при снижении артериального систолического давления до $68,5 \pm 13,3$ мм рт. ст. ($p < 0,01$), повышении ДЗЛА или давления в левом предсердии до $34,0 \pm 6,1$ мм рт. ст. ($p < 0,05$), повышении ЦВД до $14,3 \pm 3,9$ мм рт. ст. ($p < 0,001$);
- если дозы допамина перед началом ЛЖО составляли $12,3 \pm 6,1$ мкг/кг/мин ($p < 0,05$), адреналина $67,7 \pm 4,8$ нг/кг/мин ($p < 0,01$).

ЛЖО проводили по схемам: «левое предсердие – восходящая аорта» (рис. 1) или «левый желудочек – аорта» без использования искусственного кровообращения с помощью центрифужного насоса ВР-80 «Биопамп» фирмы «Медтроник» (США), или использовали паракорпоральный мембранный насос «Ясень-19» (рис. 2), изготовленный на предприятии НПО им. П.Я. Сухого, Москва.

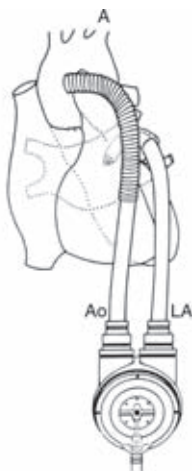


Рис. 1. Схема подключения насоса крови в позицию левое предсердие – восходящая аорта



Рис. 2. Мембранный насос «Ясень-19» для паракорпорального подключения

Хирургическая техника подключения систем МПК

Насосы «Биопамп» и мембранные насосы для проведения механической поддержки, подключались по методике, разработанной в НИИТиЮ (В.И. Шумаков с соавт., 1992). Использовались 2 схемы подключения: «левое предсердие – восходящая аорта», «левый желудочек – восходящая аорта».

Анестезиологическое пособие проводили по методике, принятой в лаборатории анестезиологии НИИТиЮ, руководимой проф. И.А. Козловым в условиях многокомпонентной общей анестезии с использованием в качестве анальгетического компонента фентанила, с искусственной вентиляцией легких респираторами Excel 210 SE BOC OHMEDA, Servoventilator 900C и 900D фирмы «Siemens» Германия.

Искусственное кровообращение и кардиоплегию проводили по методикам, принятым в лаборатории искусственного кровообращения и вспомогательной оксигенации НИИТиЮ Росмедтехнологий (заведующий к. м. н. Ю.Г. Матвеев).

Использовали аппараты ИК фирм «Stockert» (Германия) с мембранными оксигенаторами, фирм «Dideco» (Италия) или «Baxter» (США). ИК проводили, придерживаясь стратегии «a-start», в малопульсирующем режиме с перфузионным индексом 2,4–2,5 л/мин/м²; в условиях гипотермии 26–28 °С; средним АД в пределах 60–90 мм рт. ст.; уровнем гемоглобина не ниже 90 г/л и темпе диуреза 3,5–5,0 мл/кг/г.

Продолжительность анестезиологического пособия колебалась от 305,2 до 668,0, в среднем $434,7 \pm 8,6$ мин, длительность операции – от 205,5 до 596,6, составляя в среднем $362,0 \pm 6,2$ мин, искусственное кровообращение от 62,5 до 323,0, в среднем $123,0 \pm 4,4$ мин.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мониторинг гемодинамики

Проводили регистрацию ЭКГ в I, II, III стандартных отведениях, измерение систолического, диастолического и среднего артериального давления (АДс, АДд, АДср) инвазивным методом. Измерение перечисленных параметров проводили с помощью мониторов UCW (фирма Space Labs) или M1167A (фирма Agilent).

Для изучения насосной функции сердца и кровообращения в малом круге использовали катетеры Swan-Ganz, введенные в легочную артерию по стандартной методике. Сердечный индекс (СИ) измеряли методом болюсной или непрерывной термодилуции с помощью специальных блоков мониторов UGW (фирма Space Labs), M1167A (фирма Agilent) или мониторов фирм Baxter или Ohmeda.

Для катетеризации крупных сосудов и полостей сердца, рентгенконтрастной вентрикулографии и коронарографии использовали комплекс

Angioscop D33, «Siemens» или установку Telemax-1250 фирмы GEM (Бельгия).

Методы контроля инфекции у больных и объектов внешней среды стационара

Бактериологическое исследование проводили в лаборатории эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений института. Забор материала, выделение аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов осуществляли в соответствии с приказом Минздрава РФ № 535 от 2001 г.; анаэробных микробов выявляли в соответствии с методическими рекомендациями по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных неспорообразующими анаэробными бактериями.

У больных после проведения операции исследованию подвергался материал из зева и трахеи, кровь, моча, отделяемое ран, дренажей, сосудистых и других катетеров.

Поскольку однократное исследование крови было малорезультативным, производили 2–3-кратный забор проб крови в течение одного часа, что значительно повышало вероятность выделения возбудителя.

Кровь для исследования забирали из периферической вены, а не из внутрисосудистого катетера.

Оценка иммунологического статуса больных

Определяли количественные и функциональные показатели клеточного и гуморального иммунитета, иммунорегуляторного звена, фагоцитов, уровня апоптоза и системы цитокинов, что позволяло в течение первых двух суток получать необходимую информацию, важную для проведения иммунокорригирующей терапии.

Оценку клеточного звена иммунитета производили иммунофенотипированием лимфоцитов (CD3+, CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD16+CD56+) с помощью дифференцированных и активационных МКАТ, меченных FITC и фикоэритрином методом проточной цитофлюориметрии (Becton Coulter, Франция).

Состояние гуморального звена иммунитета оценивали по содержанию В-л/ф (CD19+).

Фагоцитарную активность нейтрофилов крови определяли по фагоцитозу убитой взвеси *S. aureus*, подсчитывая фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Оксидазную и бактерицидную функцию нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте спектрофотометрическим методом.

Цитокиновый статус (IL1, TNF α , IL2, IL4, IL8, IL5, IL7, IL10, IL12, INF- γ) оценивали методом флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем 11-Plex, предоставленных МНИИ ЭИМ им. Г.Н. Габричевского. Цитокины IL-1Ra и G-CSF определяли методом ИФА («Цитокин», Санкт-Петербург).

Статистическая обработка данных

Для оценки достоверности полученных результатов применяли следующий метод статистической обработки: вычисляли среднее арифметическое значение (M), ошибки средних величин ($\pm m$).

Достоверность различий между средними величинами проводили с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Различия значений и достоверность факторов считали доказанными при уровне вероятности более 95% ($p < 0,05$).

Для оценки факторов риска развития вероятности летального исхода от инфекции при МПК использован метод математического моделирования с использованием программы SPSS 13 и построение корреляции по Канделу (Д.С. Симаков с соавт., 2008).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Инфекционные осложнения у больных ВАКП

Инфекционный процесс как осложнение ВАКП констатировали у больных в тех случаях, когда его проявления развились в течение периода работы НБ в организме у больного или появились в последующие 7 суток после прекращения контрпульсации.

В подавляющем большинстве случаев (60 больных) насос-баллончик вводили в грудную аорту пункционным способом.

Хирургический способ введения баллонного зонда был использован у 4 больных в тех случаях, когда не удавалось пункционное введение баллонного зонда. Длительность процедуры установки баллончика пункционным способом составляла $12,3 \pm 4,8$ мин, при хирургическом $24,0 \pm 9,8$ мин. Выявленные источники инфекции при ВАКП представлены в табл. 4.

Таблица 4

Локализация очагов инфекции у больных при ВАКП

Локализация инфекции	Количество больных, n = 64	% больных
Место введения НБ (паховая область)	9	14,1
Грудина	4	6,3
Кровь (бактериемия)	19	30,1
Средостение	2	3,1
Дыхательные пути	15	23,4
Исполнительное устройство (НБ)	2	3,1

Примечание. Наиболее часто очаг инфекции локализовался в дыхательных путях или имело место развитие бактериемии. Реже первичным очагом инфекции можно было считать место введения баллонного зонда и операционную рану (грудину).

На 60 наблюдений применения ВАКП местные инфекционные осложнения при пункционном способе введения НБ отмечены у 6 больных (10%),

($p < 0,01$). Проявлялись они в области постпункционной гематомы. В таких случаях появлялась местная отечность кожи и подкожной клетчатки, болезненность в покое и при пальпации, гиперемия, редко скудное геморрагическое отделяемое из места пункции, отмечалось повышение $t > 38^{\circ}\text{C}$.

Из раны высевались следующие Гр+ микроорганизмы: у 2 больных – *S. aureus*, у 1 больного – *S. epidermidis*, у 2 пациентов имелось обсеменение смешанной бактериальной флорой: *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. faecalis*. У одного больного посевы из места пункции не дали бактериального роста.

Все больные, за исключением одного, были старше 60 лет ($64,5 \pm 8,3$ ($p < 0,001$)). Возраст являлся фактором риска развития постпункционной гематомы и в последующем местной раневой инфекции, что связано с более выраженными возрастными атеросклеротическими изменениями бедренной артерии. Это и способствовало образованию гематомы.

Среди 4 больных при хирургическом способе введения баллонного зонда в одном случае были высеяны *E. coli*, у 2 больных *S. epidermidis*, у одного пациента обнаружена смешанная флора *E. faecalis* и *S. aureus*.

Во всех случаях выделенная бактериальная флора демонстрировала 22–43% резистентность к антибиотикам.

Ревизия в области пункции бедренной артерии потребовалась в одном случае, ревизия послеоперационной раны при хирургическом введении нососа-баллончика потребовалась в 2 случаях.

Бактериемия на фоне ВАКП отмечена в 19 случаях.

У 4 пациентов (21,1%) бактериемия сопровождалась развитием развернутой картины сепсиса.

Причиной сепсиса явился инфицированный тромб катетера, установленного в верхней полой вене. У этого больного из крови высевался *S. epidermidis*.

У второго и третьего больных, контрпульсация у которых продолжалась в течение 5,5–7 суток, причиной развития септического состояния явилась длительная ИВЛ, осложнившаяся гнойным трахеобронхитом и пневмонией. В крови у этих больных высевался метициллинорезистентный *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

У 4-го источником септического состояния послужил лавсановый протез, подшитый к бедренной артерии, большая часть которого после прекращения процедуры была оставлена *in situ*. В крови этого больного был обнаружен *S. epidermidis*.

Родовой спектр возбудителей, выделенных из крови больных, которым проводилась ВАКП, состоял из ассоциаций *COS* ($n = 6$), *S. epidermidis* ($n = 2$) *S. aureus* ($n = 4$), *Streptococcus spp.* ($n = 2$). Гр- флора была представлена *P. aeruginosa* ($n = 2$), *E. coli* ($n = 2$) и *Klebsiella spp.* ($n = 1$).

Инфекция дыхательных путей: гнойный трахеобронхит и вентиляционно-ассоциированная пневмония были связаны с исходной тяжестью состояния больных и продолжительной искусственной вентиляцией легких. В этих случаях в развитии инфекции особое место занимает MRSA,

S. pneumoniae, у 3 больных были высеяны ассоциации *Acinetobacter spp.*, *K. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa*.

Медиастинит, начальные проявления которого отмечены у 2 больных на 4-е и 6-е сутки после прекращения ВАКП, развился на фоне полиорганной недостаточности и предшествующих нарушений гемостаза, вследствие чего проводилась рестернотомия и ревизия послеоперационной раны по поводу кровотечения.

У обоих пациентов возбудителями являлся MRSA, устойчивый ко всем антибиотикам, кроме ванкомицина.

Летальность, связанная с развитием ИО у больных, которым в комплексе лечения посткардиотомной сердечной недостаточности проводилась ВАКП, составила 10,9% (7 пациентов).

Непосредственными причинами летальных исходов в 3 случаях являлся сепсис и ПОН, в 2 случаях причиной смерти являлась двусторонняя пневмония. Один больной погиб от рецидива сердечной недостаточности, связанной с нарушением целостности НБ, у другого больного смерть наступила в результате кровотечения, вызванного распространением инфекции на общую бедренную артерию.

Инфекционные осложнения левожелудочкового обхода: частота развития и влияние на исход МПК

Показатели гемодинамики перед началом обхода соответствовали состоянию истинного кардиогенного шока, об исходной тяжести состояния больных свидетельствовал также тот факт, что в 5 случаях предварительное проведение ВАКП оказалось неэффективным, вследствие чего ее пришлось экстренно заменить на ЛЖО.

Локализация источников инфекции у больных при ЛЖО представлена в табл. 5.

Таблица 5

Локализация источников инфекции у больных с ЛЖО

Локализация инфекции	Количество больных n = 22	% больных
Магистралы	3	13,6
Операционная рана (грудина)	4	18,2
Насос крови и внутренняя поверхность приводящей магистралы «эндокардит-системы»	1	4,5
Кровь (бактериемия)	12	54,5
Средостение	2	9,1
Дыхательные пути	8	36,4
Инфекция органов мочеполовой системы	2	9,1

Примечание. Источник инфекции в насосе находится на внутренней поверхности выходной магистралы. Превышение количества очагов инфекции по сравнению с количеством больных связано с тем, что у одного и того же пациента определяли несколько бактериальных очагов инфекции.

Местные осложнения в области послеоперационной раны и мест выхода магистралей насоса наружу отмечены у 7 больных, или в 31,8% случаев.

У двух больных посевы из послеоперационной раны были положительными на высокорезистентный к антибиотикам штамм *S. epidermidis* с чувствительностью 19 и 21% соответственно, у 2 пациентов были высеяны ассоциации *S. aureus* и *Enterobacter spp.* с чувствительностью 25,5 и 31,8% соответственно.

Специфичными для паракорпоральных систем ЛЖО источниками инфицирования являлись приводная и отводная магистрали механического насоса крови. Нельзя не отметить, что, несмотря на тщательное соблюдение всех правил асептики и обработки мест выхода магистралей, у 3 (13,6%) из 22 больных имело место бактериологически и морфологически подтвержденное их бактериальное загрязнение, распространившееся на миокард (рис. 3).

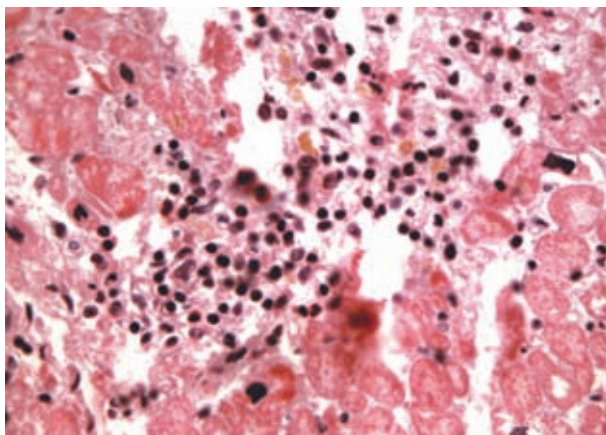


Рис. 3. Гистология миокарда больного К. 36 лет после 23 суток ЛЖО. Лейкоцитарная инфильтрация отекающего миокарда в месте фиксации входной канюли насоса крови, подключенного по схеме «левый желудочек – восходящая аорта». Увеличение $\times 100$

Отделяемое из мест выхода магистралей носило полимикробный характер, с одинаковой частотой отмечался рост полирезистентных штаммов MRSA, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *S. epidermidis*.

Положительные посевы крови больных, находящихся на ЛЖО, отмечены у 12 пациентов. Этиологически значимыми являлись следующие ассоциации микроорганизмов: *COS*, *Enterococcus spp.*, *E. coli* в трех случаях; *Acinetobacter spp.* и *Enterococcus spp.* в двух случаях. В единичных случаях высеивались монокультуры бактерий: *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, и *S. liquefaciens*, *K. pneumoniae*.

Следует отметить, что выделение из крови двух или более микроорганизмов является характерным для больных со сниженной антибактериальной резистентностью и выраженными нарушениями иммунной системы.

Длительность ИВЛ, которая у больных с ЛЖО составила $3,5 \pm 1,4$ суток ($p < 0,01$) против $1,85 \pm 1,65$ суток ($p < 0,05$), провоцировала более частое развитие вентиляционно-ассоциированной пневмонии (ВАП). Последняя в 5 случаях сопровождалась бактериемией и развитием дыхательной недостаточности, осложнялась ДВС-синдромом и полиорганной недостаточностью, что в конечном итоге определило неблагоприятный исход ЛЖО. Легочные осложнения вызывались различными возбудителями, среди которых преобладали ассоциации полирезистентных аэробных Гр- микроорганизмов, таких как *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella spp.* Из Гр+ микроорганизмов этиологическую значимость для развития ВАП имели метициллинорезистентные штаммы *S. aureus*.

Из 22 больных с инфекционными осложнениями, развившимися при обходе левого желудочка, у 4 (18,2%) явления инфекции удалось купировать, это сопровождалось улучшением общего состояния: полным восстановлением дыхательной функции, диуреза, отменой или снижением до минимальных доз симпатомиметиков. Один из больных погиб на 21-е сутки обхода. В это время он был экстубирован, свободен от проявлений инфекции, гемодинамика поддерживалась минимальными дозами допамина (3–4 мкг/кг/мин). Однако в момент рестернотомии, выполненной для изъятия магистралей насоса, развилась фибрилляция, перешедшая в необратимую остановку кровообращения. Трое пациентов были выписаны из клиники.

Таким образом, выживаемость больных с ИО, развившимися при проведении ЛЖО (13,6%), была значительно ниже, чем общая выживаемость больных, которым проводился ВАКП и которая составила 89,1%.

Исследования бактериальной флоры, выделенной у больных с ЛЖО, показали очень низкую ее чувствительность к большинству исследованных антибиотиков. В 2 случаях (9,1%) чувствительность отсутствовала ко всем 25 испытуемым антибиотикам, у 15 больных (68,2%) чувствительность флоры отсутствовала к 10–12 антибиотикам.

Сравнительные данные о совпадении используемых антибиотиков и чувствительности к ним выделяемой флоры, соответственно полученным антибиотикограммам (а/г), представлены в табл. 6.

Таблица 6

Соответствие назначаемых антибиотиков чувствительности выделенной бактериальной флоры у больных с ЛЖО и ВАКП

Метод МПК	Число больных	Всего а/г		Совпадение а/г с АБТ	
		N	%	N	%
ЛЖО	22	17	77,3	5	22,7
ВАКП	59	43	82,9	18	41,9
ВАКП + ЛЖО	5	5	100	2	40,0
Σ	86	65	75,6	25	38,5

Примечание. $p < 0,05$ для ЛЖО, $p < 0,01$ для ВАКП.

Сравнивая результаты бактериологического исследования, проведенного у больных с механической поддержкой методами контрпульсации и больных с обходом левого желудочка сердца, можно отметить, что в группе больных с ЛЖО в качестве возбудителей преобладали высоко резистентные к антибиотикам грамотрицательные микроорганизмы, что следует отнести к факторам, определяющим более высокую опасность развития инфекции.

Факторы риска развития инфекционных осложнений и связанной с ними летальности у больных с ВАКП и ЛЖО

Для выявления причин, способствующих развитию ИО при проведении ВАКП и ЛЖО, провели исследование следующих возможных предикторов их развития.

Были выделены три основные группы факторов риска:

- 1) предоперационные факторы;
- 2) интраоперационные факторы;
- 3) факторы перфузионного и постперфузионного периодов.

В выделенных группах исследовались:

- возраст пациентов,
- длительность проведения МПК > 4 суток,
- длительность ИК > 180 минут,
- длительность основного этапа операции,
- послеоперационное кровотечение и связанная с ним рестернотомия,
- длительность проведения ИВЛ > 2 суток,
- исходный иммунодефицит,
- ранние (в течение первых 12–24 часов) проявления симптомов ПОН,
- преобладание грамотрицательной флоры.

Результаты анализа факторов, способствующих развитию ИО у больных с ВАКП, представлены в табл. 7.

Таблица 7

Факторы риска (в абсолютных цифрах и процентах) развития инфекционных осложнений при ВАКП (n = 64)

Факторы риска	Всего больных		t-критерий Стьюдента
	n = 64	%	
Возраст старше 60 лет	12	18,8	p < 0,2
Пресуществующий иммунодефицит	9/13	69,2	p < 0,001
Длительность операции > 5 ч	21	32,9	p < 0,05
ИК > 180 минут	28	43,8	p < 0,05
Кровотечение ≥ 50 мл/ч и реторакотомия	12	18,8	p < 0,05
ИВЛ > 2 суток	19	29,7	p < 0,001
Длительность ВАКП > 4 суток	9	14,1	p < 0,02
Преобладание Гр- флоры	10	15,6	p < 0,01
Ранняя ПОН	11	17,2	p < 0,001

Таким образом, статистически достоверными предикторами развития ИО при проведении механической поддержки методом ВАКП являются:

- кровотечение в сочетании с рестернотомией, резко увеличивающие опасность развития медиастенита и синдрома ДВС;

- длительность искусственного кровообращения более 180 минут, оказывающая отрицательное влияние на активность системы иммунитета и свертывающую систему крови;

- ИВЛ > 2 суток, что провоцировало развитие легочных осложнений, сепсиса и в последующем полиорганной недостаточности;

- предсуществующий иммунодефицит, который отмечен у 9 больных, которым в предоперационном периоде исследовалось состояние иммунной системы, ранние проявления полиорганной недостаточности.

Для оценки рассматриваемых факторов и рисков, с ними связанных, в предположении, что действует только рассматриваемый фактор, использован показатель относительного риска (RR) развития летальности по группе рассматриваемых факторов (табл. 8).

Соотношение относительных рисков (RR) летальности у больных ИБС и посткардиотомной ОСН при проведении ВАКП

Таблица 8

Результаты оценки относительных рисков RR (relative risk) летальности у больных при проведении ВАКП

Факторы риска	Относительный риск (RR)	t-критерий Стьюдента
Возраст старше 60 лет	0,89 (0,73–2,40)	$p < 0,01$
Предсуществующий иммунодефицит	0,73 (0,53–2,71)	$p < 0,05$
Длительность основной операции	0,90 (0,68–3,12)	$p < 0,01$
Длительность ИК	1,32 (0,82–2,66)	$p < 0,05$
Кровотечение, рестернотомия	1,05 (0,66–3,42)	$p < 0,01$
ИВЛ > 2 суток	1,78 (1,02–2,24)	$p < 0,01$
Длительность ВАКП	0,92 (0,63–4,22)	$p < 0,05$
Ранняя ПОН	1,38 (0,83–3,33)	$p < 0,05$
Преобладание Гр- флоры	1,52 (1,32–2,96)	$p < 0,01$

Относительный риск летальности больных больше 1 с посткардиотомной ОСН при проведении ВАКП указывают на «ухудшающее» влияние таких факторов, как:

- длительность ИК

RR = 1,32 (0,82–2,66), $p < 0,05$;

- длительность ИВЛ более 2 суток

RR = 1,78 (1,02–2,24), $p < 0,01$;

- ранние проявления полиорганной недостаточности

RR = 1,38 (0,83–3,33), $p < 0,05$;

– кровотечения и рестернотомия

RR = 1,05 (0,66–3,42), $p < 0,01$.

Таким образом, статистически достоверными показателями развития летального исхода у больных с инфекционными осложнениями внутриоральной контрпульсации являются: длительность ИК, длительность ИВЛ, ранние проявления полиорганной недостаточности и развитие внутриплеврального кровотечения с рестернотомией.

Факторы риска развития инфекционных осложнений при ЛЖО представлены в табл. 9 ($n = 22$).

Таблица 9

Факторы риска развития инфекционных осложнений при ЛЖО

Факторы риска	Всего больных n = 22		t-критерий Стьюдента
	N	%	
Длительность операции > 5 часов	11	50	$p < 0,05$
ИВЛ > 2 суток	14	63,6	$p < 0,001$
ИК > 180 минут	12	54,6	$p < 0,05$
Реторакотомия и кровотечение	4	18,2	$p < 0,01$
Длительность ЛЖО >4 суток	8	36,4	$p < 0,01$
Предсуществующий иммунодефицит	17	77,3	$p < 0,01$
Ранняя ПОН	6	27,8	$p < 0,001$
Грамм- флора	12	54,6	$p < 0,001$

По критерию относительного риска летальности больных с инфекционными осложнениями левожелудочкового обхода ухудшающими факторами являлись:

– длительность ИВЛ, более 2 суток

RR = 1,63 (1,08–3,64), $p < 0,001$;

– длительность операции более 5 часов

RR = 1,42 (0,82–2,68), $p < 0,05$;

– ранние проявления полиорганной недостаточности

RR = 1,22 (0,73–2,19), $p < 0,001$;

– преобладание Гр- флоры

RR = 1,48 (1,22–3,71), $p < 0,001$;

– предсуществующий иммунодефицит

RR = 1,19 (0,70–2,08), $p < 0,01$.

Анализ предикторов инфекционных осложнений, проведенный у больных с ЛЖО, показал, что в этой группе больных достоверными предикторами летальности являлись:

– длительность операции более 5 часов;

– длительность ИК более 180 минут;

– длительность ИВЛ более 2 суток;

– предсуществующий иммунодефицит, преобладание Гр- флоры.

Особенности бактериологической диагностики инфекционных осложнений у больных при проведении МПК

Данные клинического обследования являются отправной точкой в диагностике ИО в условиях МПК. Другие методы, в том числе и бактериологического, интерпретируются с учетом их возможностей уменьшить частоту ложноположительных диагнозов инфекции. Чувствительность и специфичность бактериологического анализа крови у больных с ИБС, потребовавших применения МПК, ограничены, так как имеются множественные очаги и источники инфекции, поэтому микроорганизмы, выделенные из крови, могут рассматриваться как возбудители лишь в тех случаях, если аналогичные микроорганизмы выделены и из других биологических жидкостей.

При подозрении на развитие ИО у больных с МПК лабораторией «эндотоксикозов и гнойно-септических осложнений» совместно с подразделениями клинического профиля и сотрудниками ОРИТ использовалась следующая схема:

- контроль температуры тела больного каждые 3 часа в сутки с составлением индивидуальной температурной кривой;
- взятие клинических и биохимических анализов крови не реже двух раз в неделю. В зависимости от тяжести состояния пациента и явлений прогрессирования процесса клинические анализы крови могли браться чаще (до 5 раз в неделю);
- кратный отбор материалов для бактериологического исследования крови, мочи, смывов с трахеи, отделяемого операционной раны, поверхности насоса и магистралей (при использовании насосов мембранного типа) на наличие бактериальной флоры;
- при обнаружении роста бактерий в пробах крови, смывов с трахеи и операционной раны проводилась идентификация микроорганизмов и определялась чувствительность высеянной флоры к антибиотикам, для чего использовалась панель, состоящая из 25–30 наименований антибактериальных средств.
- раз в неделю брались анализы крови для оценки состояния иммунной системы больного и проведения ее коррекции иммуномодуляторами;
- по данным комплекса клинических, инструментальных, лабораторных и бактериологических методов исследований делалось заключение о наличии или отсутствии очагов инфицирования раны или органов дыхательной и мочеполовой систем, а также самой системы МПК;
- не реже одного раза в сутки производилась смена повязок и осмотр места выхода магистралей наружу. При необходимости брались мазки для бактериального анализа, после чего ложе вокруг магистралей обрабатывалось специальными антисептиками.

Антибактериальная терапия инфекционных осложнений при проведении МПК

Опыт исследований, проведенных у больных с МПК, у которых выявлены осложнения инфекционной природы, позволяет определить два важнейших правила, которые необходимо соблюдать при проведении антибактериальной терапии:

- как можно более раннее начало адекватной антибактериальной терапии;
- сокращение избыточного и нерационального применения антибиотиков.

Для выполнения первого из указанных выше правил необходимо еще до получения результатов анализов об этиологии возбудителей и их резистентности к антибиотикам начинать антибактериальную терапию, основанную на сведениях о наиболее вероятных локальных, госпитальных возбудителях и их антибактериальной резистентности. Следует иметь в виду, что неоправданное применение новейших широкого спектра антибиотиков повышает риск развития антибиотикорезистентности госпитальных штаммов микроорганизмов.

Для реализации второго условия необходимо совершенствование методов и условий ранней диагностики инфекционных осложнений. Во всех случаях на основании контроля за клиническим состоянием и результатами микробиологического исследования следует стремиться и к сокращению длительности антибактериальной терапии.

Анализируя результаты бактериологических исследований крови и других биологических субстратов, а также объектов внешней среды, было отмечено, что наиболее часто у больных с ВАКП высевались Гр+ кокки, в частности *S. aureus*; при инфекционных осложнениях на фоне ЛЖО возбудителями являлись Гр- бактерии.

Основываясь на этих данных, уже стартовая антибиотикотерапия может оказаться этиопатогенетически точной и эффективной.

Клиническая эффективность антибактериальной терапии у больных, которым проводилась поддержка методом ВАКП, обычно отмечалась через 48–72 часа после ее начала, поэтому стартовую антибактериальную терапию в течение этого периода менять не следует. К этому времени появляются данные о чувствительности флоры к антибиотикам, и в курс терапии возможно внесение соответствующей коррекции.

У больных, находящихся на ЛЖО, эффективность АБТ проявляется в большинстве случаев позднее.

При прогрессирующем ухудшении состояния больного или получении данных о несоответствии вводимых антибиотиков результатам посевов на чувствительность возникает необходимость изменения АБТ.

Иммуноткорригирующая терапия на основе индивидуального подбора иммунокорректоров

На этапе дооперационной медикаментозной поддержки у 26 пациентов с прогрессирующей посткардиотомной сердечной недостаточностью были изучены особенности иммунного статуса.

При этом было установлено, что почти во всех случаях имелись серьезные проявления иммунного дефицита (рис. 4).

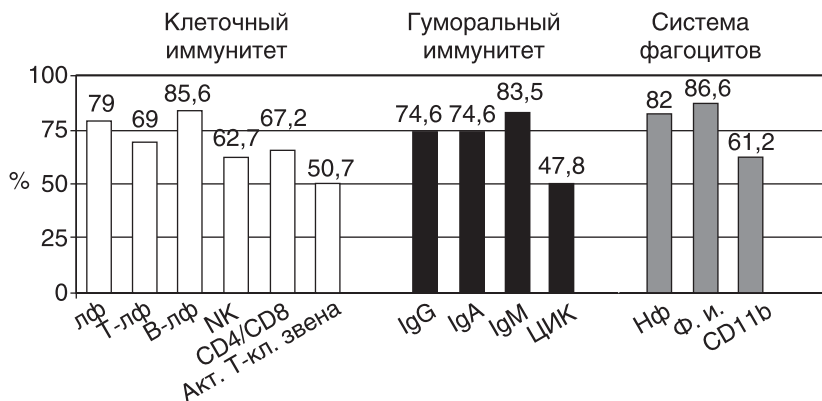


Рис. 4. Частота нарушений основных звеньев иммунной системы у больных СН в процентах от общего количества больных

У 15 больных (58%, $p < 0,05$) иммунодефицит проявлялся недостаточностью Т-клеточного звена и дисбалансом иммунорегуляции; у 16 больных (61,5%, $p < 0,05$) имел место дефицит НК; снижение В-лимфоцитов отмечено у 22 больных (84,6%, $p < 0,01$).

Нарушение гуморального звена иммунитета проявлялось различными вариантами снижения или возрастания отдельных классов иммуноглобулинов у 74–84% больных ($p < 0,01$).

Снижение функции фагоцитов отмечалось у 23 больных (88,5%, $p < 0,01$).

Таким образом, оценка состояния иммунной системы в условиях прогрессирующей СН является первым этапом иммунологического мониторинга и при положительных результатах заставляет ставить вопрос о необходимости иммунокоррекции.

Для активации системы моноцитов/макрофагов и коррекции Т-клеточной иммуносупрессии были использованы отечественные иммунокорректоры, обладающие, так же как полиоксидоний и миелопид и разработанный в НИИТиИО МЗ РФ полицитокинный препарат из ксеноселезенки, влиянием на различные звенья иммунной системы, табл. 10.

Таблица 10

Влияние иммунокорректоров на различные звенья иммунной системы

Звенья иммунитета	Имунокорректоры		
	Полиоксидоний	Миелопид	Спленопид
Клеточное	+++	+++	++++
Гуморальное	++++	++++	+++
Фагоцитоз	+++++	+++	+++++
Иммунорегуляция	++++	+++	+++

Примечание. «+» отражает степень эффективности воздействия иммуномодулятора на звенья иммунитета.

Выявление признаков инфекции до и в период применения МПК, которые сопровождались дисфункцией иммунной системы, служило показанием для проведения иммунокорригирующей терапии.

Такой подход был апробирован у больных с проявлением инфекции при проведении ЛЖО. Проведение семидневного курса полиоксидония или внутримышечно по 25 мг 2 раза в день, миелопида внутримышечно 1 раз в день в течение 5 дней позволило у 5 больных купировать эпизоды инфекции.

На рис. 5 в качестве примера приведены характерные иммунограммы больного Г., 42 лет с ЛЖО в разные сроки иммунотерапии.

Как видно из исследования, показатели иммунной системы перед операцией составляли: лейкоциты 5,0 тыс., лимфоциты 9%, Т-лимфоциты 71,5%, Т-хелперы 26,5%. ИРИ Тх/Тс 0,95, ИЛ – 25,0%, АФП 4500, т. е. имелись отклонения в клеточном звене иммунитета и системе фагоцитоза в сторону недостаточности 2 ст., что позволяло прогнозировать осложнения в плане развития ИО в послеоперационном периоде.

На фоне ЛЖО был проведен курс антибиотико- и аферезной терапии в сочетании с иммунокоррекцией спленопидом и миелопидом (рис. 5 а, б). К 6-м суткам наметилась стойкая тенденция к улучшению состояния: больной не лихорадит, снят с ИВЛ, резко уменьшилась потребность в симпатомиметиках, что нашло отражение и на иммунограмме.

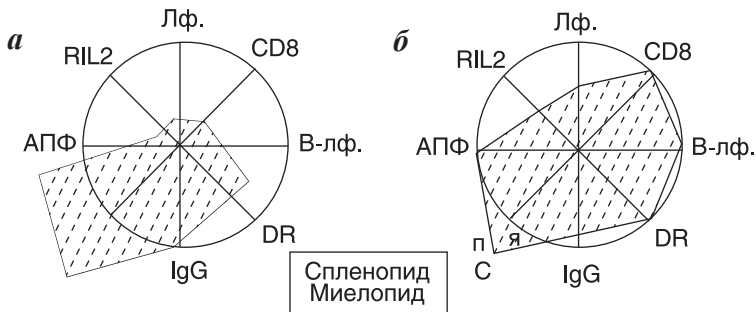


Рис. 5. Результаты иммунокоррекции: а) иммунограмма больного Г. 42 лет на вторые сутки ЛЖО. Вторичная иммунная недостаточность 2 ст. по инфекционному типу с нарушениями клеточного иммунитета и иммунорегуляции; б) на 6-е сутки ЛЖО отмечается увеличение количества лимфоцитов, усиление супрессорных механизмов и киллерной активности лимфоцитов, фагоцитарной функции нейтрофилов

После проведения курса иммунокоррекции спленопидом внутримышечно по 25 мг 2 раза в сутки в течение 5 суток в сочетании с миелопидом 0,5 мл 1 раз в сутки в течение 5 суток показатели иммунограммы вернулись практически к нормальным цифрам. На этом фоне редуцировали и клинические проявления инфекции, МПК была прекращена, больной переведен на поддерживающие дозы катехоламинов.

Таким образом, антибактериальная терапия инфекции у больных с посткардиотомной ОСН, находящихся на ЛЖО, становится более эффективной, если в комплекс терапии вводятся препараты иммунокорригирующего ряда.

Факторы окружающей среды, способствующие развитию инфекционных осложнений при проведении ВАКП и ЛЖО

Кроме гибридной системы «организм – насос», взаимоотношения внутри которой учитываются при разработке насосных устройств и изучении физиологических процессов, в клинических условиях проведения МПК возникает более сложная многофакторная система: «больной – микроорганизм – антибиотики – окружающая среда». В пределах этой системы происходят постоянные изменения первых трех составляющих, меняется контингент больных с уклоном в сторону утяжеления состояния, изменяется устойчивость, вирулентность и этиологический спектр возбудителя, направленно меняются свойства антибактериальных препаратов. Что же касается влияния окружающей среды на развитие инфекционных осложнений при МПК, то этот вопрос практически никем не изучался и этот фактор является постоянным, несмотря на изменение остальных компонентов указанной многофакторной системы.

Между тем, как показывает опыт, все большую роль в развитие инфекционных осложнений начинает играть последний фактор системы – состояние санитарно-гигиенической и эпидемиологической обстановки стационара. При неблагоприятном ее состоянии уже через несколько часов после госпитализации окружающая микрофлора колонизирует кожу и слизистые оболочки пациентов.

Передача инфекции происходит путем непосредственного контакта медперсонала и пациента, а также через контаминированное постельное белье, медицинское оборудование и материалы. Бактериальная «нагрузка» окружающей среды значительно повышается в стационарах кардиохирургического и трансплантационного профиля, где применяются системы механической поддержки, проводится гемодиализ и т. д. При изучении санитарно-бактериологического состояния окружающей среды в ОРИТ и палат, где находятся больные до и после проведения МПК, было показано, что в 31,3% нозокомиальная флора состояла из *S. aureus*, *Enterobacter spp.* 24,1%, *Acinetobacter spp.* 19,3%, *P. aureginosa* 11,6%, *S. epidermidis* 8,2%. Выявлена корреляционная связь между флорой внешней среды и этиологическими факторами инфекции, развивающейся у больных при проведении МПК. Особенно сильная корреляция отмечена между микрофлорой, циркулирующей во внешней среде, и развитием вентиляционно-ассоциированных осложнений со стороны дыхательной системы $r = 0,71$ ($p < 0,001$).

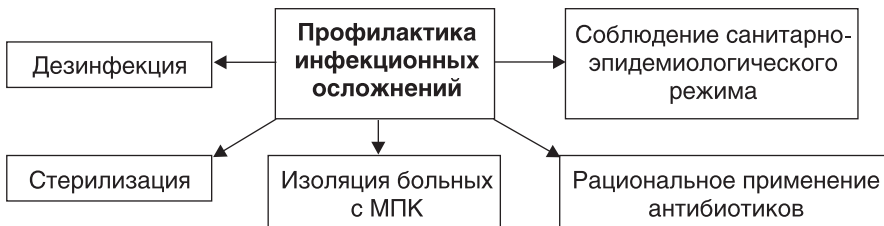
Конкретными примерами могут служить результаты анализа состояния окружающей среды больных П. и М., 28 и 32 лет, которым проводился ЛЖО и у которых, несмотря на эффективную работу насосов крови, отмечено развитие серьезных ИО, источниками которых явились микроорганизмы внешней среды.

Динамический бактериологический анализ показал, что в палате у больного П. раковина и кран были обсеменены *E. coli*, *P. aeruginosa*; холодильник – *P. aeruginosa*; с рубашки больного, рук больного и рук отца получены положительные пробы на *S. aureus*; из воздуха был высеян *S. aureus*. В результатах посева из раны грудины и выхода магистралей постоянно высеивали *S. aureus* и *Enterobacter spp.*

Такая же зависимость контаминации предметов внешней среды отмечена у больного М. Одеядло, пододеяльник контаминированы *S. aureus*; раковина – *P. aeruginosa*; кожа больного – *S. aureus*; стол – *S. rubideae*.

Эти примеры показывают, что современная программа санитарно-гигиенической профилактики, основанная на данных эпидемиологического мониторинга, крайне важна и должна заключаться в следующем: 1) за 2 дня до операции исключаются передвижения посторонних лиц вблизи больного и аппарата МПК, 2) стерильности одежды персонала, осуществляющего лечение и обслуживание аппарата МПК, 3) поддержание асептических условий среды, окружающей больных, стерильность медицинского инструментария, строгое соблюдение правил асептики во время перевязок и проведения любых инвазивных манипуляций, мытье рук до и после прямого контакта с пациентом кожными антисептиками, 4) проведение операций и последующего ведения больных в ОРИТ с однонаправленным потоком воздуха.

Особенности профилактики внутригоспитальной инфекции у больных с МПК можно представить в виде следующей схемы:



ВЫВОДЫ

1. Инфекция является наиболее частым осложнением проведения механической поддержки кровообращения. Если в общей группе больных, оперированных на «открытом сердце», инфекционные осложнения отмечены в 10,9%, то в группе пациентов с механической поддержкой эти осложнения отмечены в 36,7%. Наиболее частыми очагами локализаций инфекции в условиях МПК являются: послеоперационная рана (23,3%), вентиляционно-ассоциированные легочные осложнения (26,7%) и бактериемия (36,1%).
2. Основными возбудителями инфекционных осложнений МПК, выделенных из послеоперационной раны и мест выхода магистралей, являлись Гр+ микроорганизмы *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.* Из Гр- флоры выделялись *P. aeruginosa* и *Acinetobacter spp.* и *E. coli*. При вентиляционно-ассоциированных осложнениях дыхательных путей

- высеивались в основном Гр- штаммы: *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, из Гр+ *S. aureus*. При инфекции крови наиболее частыми патогенами являлись *COS*, *S. aureus*, *Acinetobacter spp.*
3. Бактерии, выделенные из очагов инфекции и крови больных с МПК, демонстрировали высокую устойчивость к большинству антибиотиков. У больных с ВАКП совпадение антибиотикограмм и АБТ составило 41,9%, при ЛЖО совпадение составило 22,7%. Среди больных с ЛЖО в 17,7%, резистентность к антибиотикам составила 100%.
 4. Предикторами развития ИО и связанной с ними летальности у больных с ВАКП являлись: длительность ИК RR = 1,32 (0,82–2,66), $p < 0,05$; длительность ИВЛ более 2 суток RR = 1,78 (1,02–2,24), $p < 0,01$; ранние проявления полиорганной недостаточности RR = 1,38 (0,83–3,33) ($p < 0,05$); кровотечения и рестернотомия RR = 1,05 (0,66–3,42) ($p < 0,01$). Предикторами развития ИО и связанной с ними летальности у больных с ЛЖО являлись: длительность ИВЛ, более 2 суток RR = 1,63 (1,08–3,64), $p < 0,001$; длительность операции более 5 часов RR = 1,42 (0,82–2,68), $p < 0,05$; ранние проявления полиорганной недостаточности RR = 1,22 (0,73–2,19), $p < 0,001$; преобладание Гр- флоры. RR = 1,48 (1,22–3,71), $p < 0,001$; предсуществующий иммунодефицит RR = 1,19 (0,70–2,08), $p < 0,01$.
 5. Терапия инфекционных осложнений в условиях механической поддержки строится на рациональном комплексном применении чувствительных к выделенной бактериальной флоре антибиотиков, индивидуально подобранных иммунокорректоров и при показаниях, методах аферезной терапии.
 6. Профилактика инфекционных осложнений должна осуществляться в условиях усиленного противоэпидемического режима, который предполагает тщательную дезинфекцию и стерилизацию предметов окружающей среды, рациональное применение антибиотиков, периодическое проведение санитарно-эпидемиологического мониторинга. Обнаружение в окружающей среде стационара золотистого стафилококка, бактерий семейства кишечной палочки, синегнойной палочки являются маркерами нарушения правил асептики и антисептики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Опыт применения МПК показал, что основными факторами риска развития ИО у больных с МПК являются: интраоперационные факторы (длительность ИК и ИВЛ), а также преобладание в очагах инфекции грамотрицательной полирезистентной флоры, что требует проведения активной терапии локальных проявлений инфекции и системного применения антибиотиков.
2. Так как в структуре возбудителей инфекционных осложнений механической поддержки кровообращения преобладают Гр- бактерии *E. coli*,

P. aeruginosa, а также *S. aureus*, отличающиеся полирезистентностью к антибиотикам, но сохраняющие чувствительность к препаратам группы фторхинолонов, ванкомицину и тиенаму, патогенетическая терапия должна строиться на применении вышеуказанных препаратов.

3. Обнаружение на предметах окружающей среды санитарно-показательных бактерий золотистого стафилококка, синегнойной палочки и кишечной палочки является показателем санитарно-эпидемиологического неблагополучия, и именно против этих бактерий должны быть направлены санитарно-гигиенические мероприятия – дезинфекция помещений и стерилизация инструментов, а также строгое соблюдение правил асептики медицинским персоналом.
4. Поскольку у больных с МПК имеется исходное нарушение иммунного статуса, необходимо в комплекс антибактериальной терапии включать индивидуально подобранные иммунокорректоры (полиоксидоний, спленопид, миелопид) по разработанной схеме.
5. Для диагностики возбудителей ИО у больных с МПК необходим ежедневный, начиная с первого дня МПК, клинико-бактериологический и санитарно-эпидемиологический мониторинг по разработанной схеме, включающий одновременный посев из разных клинических субстратов (рана, трахея, слюна, кровь, моча), а также смывов с предметов лечебной, диагностической аппаратуры и бытовых приборов, имеющих длительный контакт с больным.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Габриэлян Н.И., Мурашов Н.С., Спирина Т.С., Севостьянова О.А., Арефьева Л.И., Кувырдин Д.А., Толпекин В.Е. Инфекционные осложнения механической поддержки кровообращения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – № 3. – 2005. – С. 65.
2. Габриэлян Н.И., Толпекин В.Е., Шумаков Д.В., Мурашов Н.С., Спирина Т.С., Арефьева Л.И., Горская Е.М. 30-летний опыт применения контрпульсации и обхода желудочков сердца, проблема инфекции // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – № 4. – 2006. – С. 80–82.
3. Габриэлян Н.И., Шумаков Д.В., Толпекин В.Е., Горская Е.М., Спирина Т.С., Арефьева Л.И., Мурашов Н.С. Современные аспекты эпидемиологии нозокомиальных инфекций в сердечно-сосудистой хирургии // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – № 6. – 2006. – С. 65–70.
4. Байков А.Н., Гасанов Э.К., Мурашов Н.С. Оценка эффективности БВО и веноартериальной перфузии // Клиническая трансплантация органов (актуальные вопросы). – 2007. – С. 34–35.
5. Мурашов Н.С., Габриэлян Н.И. Вспомогательное кровообращение: риск развития инфекции при неудаленных магистральных введениях. IV Всероссийский съезд трансплантологов памяти академика В.И. Шумакова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – № 6. – 2008. – С. 73.

Скворцов Андрей Евгениевич

ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ НОРМОТЕРМИЧЕСКОЙ АППАРАТНОЙ ПЕРФУЗИИ У АСИСТОЛИЧЕСКИХ ДОНОРОВ ПОЧЕК

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ГУ СПб. «НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» и ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Резник Олег Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Развитие хирургической техники и революционные открытия в иммуно-супрессивной терапии на рубеже веков сделали в большинстве развитых стран повседневной реальностью пересадку сердца, печени и поджелудочной железы и почек. Однако при наличии юридической и технической возможности выполнения этих операций успехи трансплантологии привели к глобальному ее кризису, не имеющему национальных границ – во всем мире число нуждающихся в пересадке органов не соответствует числу донорских органов. Недостаток донорских органов сегодня можно рассматривать как болезнь, ежегодно уносящую жизнь тысяч пациентов (Rozenthal R., 2006).

Современные подходы к решению проблемы дефицита донорских органов заключаются в пристальном изучении возможности использования доноров, ранее считавшихся непригодными. По данным ряда авторов в Ев-

ропе, несмотря на успехи внедрения инновационных донорских программ, число доноров со смертью мозга (ДСМ) остается постоянным из года в год, и их количество в среднем составляет около 30 на млн населения (Kootstra G., 2002).

Недостаточное количество доноров со смертью мозга и возрастающая потребность в донорских органах в целом создает в настоящее время предпосылки для использования альтернативных источников донорских органов и расширения критериев их приемлемости для трансплантации (Garcia С.Е., 2000; Delmonico F.L., 2000). В литературе такие органы также называют – *organs from the expanded criteria donors*. Многие авторы к данной категории относят органы, полученные от асистолических доноров (АСД) (Koffman G., 2003; Kootstra G., 1995, 1997). Так, например, если в 1998 году в США было представлено всего 67 доноров с асистолией (1,2% от общего числа доноров), то в 2007-м их было 666 (8,2%), что эквивалентно 10-кратному увеличению [<http://www.unos.org/data/accessed02.01.2010>]. При этом основным источником органов от асистолических доноров является практика их получения от «контролируемых» (III класс по Маастрихтской классификации, 1993) доноров (Kootstra G., 2002). Наиболее вероятным в этом аспекте в отечественной практике представляется использование «неконтролируемых» доноров (нАСД), т. е. доноров с необратимой остановкой кровообращения (I и II класс асистолических доноров по Маастр. класс., 1993), появляющихся вне и в пределах стационара до момента оповещения трансплантационной службы.

При работе с асистолическими донорами результаты пересадок находятся в прямой зависимости от степени ишемически-реперфузионного повреждения на этапе изъятия, поэтому качество таких органов часто ставится под сомнение (Land W., 1999; Laskowski I.A., 2001; Lee С.М., 1998). Применение современных органосберегающих технологий, таких как инициальная перфузия, с использованием двухбаллонного трехпросветного катетера, полное охлаждение тела донора, интраперитонеальное охлаждение органов брюшной полости, изолированная аппаратная перфузия, заставляет большинство трансплантологов пересмотреть свое отношение к данной категории доноров (Moysyuk Y.G., 2008; Moers С., 2009; Hoshinaga K., 1995; Hordijk A.J., 2001; Sanchez-Fructoso A.I., 2003).

Идея использования экстракорпоральной перфузии изолированного абдоминального региона с трансмембранной оксигенацией не нова, однако их авторы применяют либо низкотемпературные режимы перфузии, либо не учитывают ключевую роль лейкоцитов в развитии ишемически-реперфузионных повреждений (лейкоцитарную агрессию и лейкоцитарно-эндотелиальную адгезию в микроциркуляторном русле трансплантата при критической тепловой ишемии у доноров) (Ko W.-J., 2000; Lee С.У., 2005; Magliocca J.F., 2005). Патогенез ишемически-реперфузионной травмы в аспекте лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия позволяет рассматривать метод перфузионной консервации как оптимальный способ получе-

ния донорских органов (de Vries A.J., 2003; Harper S., 2006). Возможность перфузионного воздействия на донорский орган определяется тем, что, как показывает ряд публикаций (Иванов К.П., 2004; Linfert D., 2009), одной из основополагающих причин необратимых посмертных изменений донорского органа является блок микроциркуляции лейкоцитарными конгломератами, образующимися в агональном периоде донора, при критическом замедлении и остановке кровотока в тканях. После трансплантации кровь реципиента не поступает в дистальные, заблокированные отделы микроциркуляции органа (no reflow syndrome), возникает шунтирующий кровоток, усугубляющий повреждение (Linfert D., 2009). Эти теоретические предположения и обобщение данных мировой литературы в применении перфузионных технологий (Gomez M., 1993; Lee C.Y., 2005; Matesanz R., 2001; Mores C., 2009; Rowiński W., 2007), в соответствии с особенностями работы центров трансплантации в Российской Федерации, легли в основу принятого исследования для определения возможности получения органов от доноров с внезапной остановкой кровообращения, когда это происходит в стационаре, в отделении реанимации, в приемном покое, в шоковом зале, то есть в таких условиях, когда трансплантационная служба не оповещена заранее о наличии в стационаре пациента – потенциального донора с заболеванием или травмой головного мозга, не совместимыми с жизнью.

В целом в доступной литературе нам не удалось найти описание такого метода получения донорских органов, при котором попытка не сохранения, а восстановления их жизнеспособности после перенесенного длительного периода тепловой ишемии предпринималась бы до осуществления изъятия.

Цель исследования

Увеличение числа пересадок почек за счет применения нормотермической экстракорпоральной изолированной абдоминальной перфузии *in situ* у асистолических доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности.

Задачи исследования

Разработать обоснование, показания к применению и методику проведения нормотермической экстракорпоральной изолированной абдоминальной перфузии *in situ* с применением трансмембранной оксигенации и удалением лейкоцитов из перфузионного контура.

Разработать организационный, перфузионный и хирургический протокол мероприятий при проведении экстракорпоральной нормотермической перфузии органов брюшной полости.

Оценить результаты пересадки почек, полученных от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, с применением нового метода получения почечных трансплантатов.

Сравнить течение послеоперационного периода у реципиентов почек, полученных от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной

деятельности с применением разработанного перфузионного протокола консервации с реципиентами почек, полученных от доноров со смертью мозга.

Научная новизна

Результат исследования представляет собой один из способов увеличения количества эффективных доноров за счет использования перфузионных технологий.

Впервые в отечественной практике разработан и предложен новый оригинальный метод восстановления и сохранения жизнеспособности трансплантатов у асистолических доноров со значительным периодом тепловой ишемии, до 60 и более минут. Восстановление жизнеспособности и функционального резерва трансплантатов происходит до начала изъятия, что достигается путем аппаратного возобновления перфузии ишемизированных органов брюшной полости модифицированной оксигенированной кровью донора после остановки его сердца. Внедрение предложенного протокола в клиническую практику дает возможность использовать доноров и их органы, ранее считавшиеся не пригодными к трансплантации.

Применение органосберегающих перфузионных методик на доэксплантационном этапе способно привести к восстановлению функционального резерва ишемически поврежденных трансплантатов, а индивидуализация схем перфузионной консервации в зависимости от степени ишемического повреждения органа позволит максимально улучшить качество данных органов.

Разработка стратегии и тактики применения аппаратной перфузии на разных этапах при работе с донорами с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности или НАСД позволит влиять на исход и качество донорских органов еще до выполнения трансплантации, а это может привести к частичному решению вопроса дефицита донорских органов.

Практическая значимость работы

Внедрение разработанного протокола в клиническую практику привело к созданию нового способа получения почечных трансплантатов, а также новой логистической модели асистолического донорства, которая состоит в том, что трансплантационная бригада может выезжать в донорский стационар уже после констатации смерти пациента. Результаты исследования могут быть рекомендованы для внедрения в работу всех многопрофильных стационаров экстренной помощи (кардиологической, нейрохирургической, неврологической), центров трансплантации почек и органного донорства.

Положения, выносимые на защиту

1. Оптимальной тактикой при получении почек от доноров с необратимой внезапной остановкой сердечной деятельности и длительным периодом тепловой ишемии является применение способа нормотермической

экстракорпоральной аппаратной перфузии, проводимой *in situ*, с применением трансмембранной оксигенации и удалением лейкоцитов из контура перфузии, для восстановления жизнеспособности донорских органов.

2. Почки, полученные от «неконтролируемых» асистолических доноров с периодом первичной тепловой ишемии до 60 минут и более, с применением органосберегающих перфузионных технологий, являются полноценными трансплантатами.

3. Результаты пересадок почек, полученных с использованием предложенной перфузионной методики *in situ*, не уступают таковым, полученным от ДСМ.

Реализация результатов работы

Результаты исследования внедрены в практическую деятельность Санкт-Петербургского Центра органного и тканевого донорства, отделение трансплантации почки ГБ № 31 Санкт-Петербурга, отделения анестезиологии и реанимации ГУ НИИ скорой помощи им И.И. Джанелидзе, ГУЗ «Городская Александровская больница», ГУЗ «Городская Елизаветинская больница», ГУЗ «Городская больница № 26», ГУЗ «Николаевская больница».

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены на 5-й школе ассоциации трансплантационных координаторов (Санкт-Петербург, 19–20 февраля 2010 г.), на 10-й научно-практической конференции молодых ученых «Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины – 2010», (Санкт-Петербург, 22 апреля 2010 г.), на конференции «Эксплантация и консервация донорских органов» (Санкт-Петербург, 2–4 июля 2009 г.), на 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation (Paris, France, 30 August-2 September 2009 г.), на Organ Donation Congress, 10th ISODP & 16th ETCO, (Berlin, Germany, 4–7 Октября 2009 г.), на American Transplant Congress 2010 (San Diego, CA, USA, 1–5 мая 2010 г.), на the Joint 6th ELTA-ELTR 5th NHBD International meeting (London, GB, 13–15 мая 2010), на заседаниях ученого совета Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе 30.06.2009 и 29.04.2010, на заседании объединенной конференции отделений ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» 14.05.2010 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 5 – в изданиях, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора

На основании анализа результатов автором лично сформулированы показания и противопоказания к применению экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии у асистолических доноров почек, перфузионный и хирургический протокол проведения перфузии, которые

в дальнейшем были апробированы в Центре органного и тканевого донорства. Автор проводил процедуры экстракорпоральной нормотермической перфузии абдоминального региона *in situ* у доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, выполнял эксплантации почек у доноров с применением предложенного протокола и доноров со смертью мозга, вошедших в исследование, и оформлял отчетную документацию. Более чем у половины реципиентов лично была выполнена трансплантация почки. Получена приоритетная патентная справка на изобретение «Способ восстановления жизнеспособности ишемически поврежденных донорских органов» от 30.09.2009 года № 2009136319.

Объем и структура диссертации

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 229 источников, из них отечественных 29 и 200 иностранных авторов, содержит 4 таблицы, 29 рисунков и приложение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика материала

Материалом для анализа послужили статистические данные о 695 потенциальных донорах в период с начала 2007 по 2009 год, в том числе и о 139 эффективных донорах органов (с 2007 по 2009 год). Были изучены медицинские истории и донорские карты 66 пациентов, погибших в отделениях реанимаций Санкт-Петербурга и ставших асистолическими донорами почек, 73 медицинские истории и донорские карты пациентов, ставших донорами со смертью мозга, а также отчеты Бюро судебно-медицинской экспертизы и отчеты Центра органного и тканевого донорства, включившие 386 пациентов, умерших до суток нахождения в донорском стационаре, о которых донорская служба не была оповещена, в связи с внезапностью остановки сердечной деятельности и неэффективностью реанимационных мероприятий, и, как следствие, не рассматривавшихся как «потенциальные» доноры. В ходе проведенного анализа в соответствии с задачами исследования последовательно формировались группы сравнения доноров и реципиентов.

Характеристика донорских групп

В работе использованы результаты эксплантации почечных трансплантатов от 20 доноров со смертью мозга и 11 доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, умерших в первые сутки нахождения в стационаре («неконтролируемых» асистолических доноров), работа с которыми была проведена в течение 2009–2010 гг.

У 11 доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности применялся разработанный протокол экстракорпоральной нормо-

термической аппаратной перфузии *in situ*. Эта группа доноров получила название исследуемой группы. У всех пациентов смерть констатирована в период до суток нахождения в стационаре, из них 3 (27,3%) пациента шокового зала с тяжелой ЧМТ и 8 (72,7%) пациентов, находившихся в отделении реанимации. Экспресс-диагностика инфекций у пациентов исследуемой группы проводилась с помощью набора реагентов для иммунохроматографического анализа.

Операция эксплантации у исследуемой группы доноров выполнялась по принятой методике изъятия донорских органов у доноров со смертью мозга при продолжающейся аппаратной перфузии.

Протокол аппаратной перфузии *in situ* у этой группы приводится ниже, в разделе «Результаты собственных исследований», поскольку является оригинальной разработкой.

В группу сравнения включены 20 доноров с констатированной смертью мозга, у которых выполнялся традиционный протокол изъятия по стандартной методике.

Доноры со смертью мозга были клинически значительно лучше по своим параметрам – статистически значимые различия касались инотропной поддержки вазопрессорами (в исследуемой группе больше $8,1 \pm 0,74$ мкг/кг/мин против $4,1 \pm 0,38$ мкг/кг/мин ($p < 0,05$)), а также показателей диуреза в последний час, в исследуемой группе был ниже $0,35 \pm 0,08$ л, в отличие от $0,74 \pm 0,07$ л в группе сравнения ($p < 0,05$). Следует особенно отметить отсутствие в группе доноров со смертью мозга такого параметра, как первичная тепловая ишемия.

Значимые основные характеристики донорских групп, не зависящие от вида выполненной у доноров операции, представлены в сводной табл. 1.

В результате сравнения групп доноров по основным характеристикам закономерно было бы ожидать худших результатов в группе реципиентов почек, полученных от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности с применением предложенного перфузионного протокола.

Характеристика групп реципиентов

В зависимости от категории донора реципиенты были разделены на 2 группы. Группа реципиентов почек от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, у которых изъятие донорских органов выполнялось с применением предложенного протокола, получила название исследуемой группы, а группа реципиентов почек от доноров со смертью мозга – группы сравнения.

Перед операцией реципиентами исследуемой группы подписывалось информированное согласие на пересадку почки, изъятую с использованием экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии донорских органов *in situ*, согласно решению Этического комитета НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе от 15 июля 2009 г.

Таблица 1

Сводная таблица характеристик донорских групп

Характеристика донорских групп	Исследуемая группа (n = 11)	Группа сравнения (n = 20)	Значение p
Мужчины	9 (81,8%)	13 (65%)	>0,05
Женщины	2 (18,2%)	7 (35%)	>0,05
Возраст, лет	43,1 ± 2,98	45,65 ± 1,8	>0,05
Причина смерти: ЗЧМТ, ОЧМТ¹	6 (54,5%)	3 (15%)	>0,05
ОНМК ²	5 (45,5%)	13 (65%)	>0,05
АГМ ³	–	4 (20%)	<0,05
Инотропная поддержка в течение последних 10 часов мкг/кг/мин	8,1 ± 0,74	4,1 ± 0,38	<0,01
Креатинин сыворотки крови, ммоль/л	0,084 ± 0,004	0,091 ± 0,007	>0,05
Диурез в последний час, литр	0,35 ± 0,08	0,74 ± 0,07	<0,01

¹ – ЗЧМТ, ОЧМТ – закрытая черепно-мозговая травма, открытая черепно-мозговая травма, ² – ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ³ – АГМ – разрыв аневризмы головного мозга.

Группа сравнения включала 20 реципиентов. Необходимо отметить, что в группу вошли только реципиенты, которым операция трансплантации выполнялась в СПб НИИ скорой помощи им И.И. Джанелидзе, что было связано с передачей части почек в другие центры, исследуемая группа – 22.

Реципиентами почек стали больные с терминальной почечной недостаточностью, получающие заместительную почечную терапию разного вида. Их характеристики представлены в табл. 2.

Таблица 2

Сводная таблица – характеристики групп реципиентов

Характеристики групп	Исследуемая группа (n = 22)	Группа сравнения (n = 20)	Значение p
Мужчины	13 (65%)	12 (54,5%)	<0,001
Женщины	7 (35%)	10 (45,5%)	>0,05
Возраст, лет	51,1 ± 1,8	39,9 ± 2,3	<0,001
Гемодиализ	18 (81,8%)	15 (75%)	>0,05
Перитонеальный диализ	4 (18,2%)	4 (20%)	>0,05
Смешанный диализ	–	1 (5%)	>0,05
Срок нахождения на диализе, годы	3,7 ± 0,43	2,43 ± 0,29	<0,05
Хронический гломерулонефрит	19 (86,4%)	15 (75%)	>0,05
Хронический пиелонефрит	1 (4,5%)	3 (15%)	>0,05
Поликистоз почек	2 (9,1%)	2 (10%)	>0,05

Как показано в табл. 2, статистически значимые различия касались следующих характеристик: средний возраст в исследуемой группе составил $51,1 \pm 1,8$ лет, при $39,9 \pm 2,3$ лет в группе сравнения ($p < 0,001$). Это связано с тем, что в соответствии с общепринятой практикой пересадки почечных трансплантатов, полученных от ДРК, последние показаны к трансплантации реципиентам старшей возрастной группы. Закономерно средний срок нахождения на диализе был выше в исследуемой группе реципиентов $3,7 \pm 0,43$ лет, а в группе сравнения $2,43 \pm 0,29$ года ($p < 0,05$).

Подбор пар «донор–реципиент» осуществлялся по группе крови, отрицательной лимфоцитотоксическому тесту («кросс-матч»), по HLA-A-, B-, Dq-антигенам. Иммунологические и серологические исследования выполнены в городской лаборатории иммуногенетики. В группу реципиентов не вошли пациенты с высокой сенсibilизацией и с предшествующими перенесенными операциями трансплантации, а также с числом совпадений по HLA-типу менее двух.

Всем реципиентам – и исследуемой группы, и группы сравнения – была выполнена стандартная операция трансплантации почки. Среднее время вторичной тепловой ишемии при пересадках почек реципиентам от доноров контрольной и опытной групп статистически не различалось и составляло 25–40 минут. Операции пересадки почки выполнялись в отделениях трансплантации почки ГБ № 31 (г. С.-Петербург), НИИ СП им. И.И. Джанелидзе (г. С.-Петербург).

Послеоперационная иммуносупрессия

Реципиенты обеих групп в послеоперационном периоде получали стандартную иммуносупрессивную терапию, представляющую собой трехкомпонентную схему. Начальные дозировки препаратов составили: циклоспорина («Sandimmun», «Sandimmun-Neoral» Sandoz/Novartis) – 4–5 мг/кг в течение первого месяца с корректировкой по данным определения концентрации препарата в крови; прографа («Astellas») 0,15 мг/кг с коррекцией дозировки препарата в зависимости от концентрации препарата в крови; преднизолон – 1 мг/кг массы тела, с последующим снижением дозы, Майфортик 1440 мг в сутки или Селлсепт – 2 г в сутки.

Лечение эпизодов отторжения в обеих группах выполнялось стандартно, проведением «пульс-терапии» по 500 мг солумедрола внутривенно в течение 3–5 дней.

Всем пациентам выполнялось ультразвуковое исследование трансплантата с дуплексным сканированием на 1-е, 3-е, 7-е, 14-е, 21-е сутки. Исследования выполнялись на аппаратах Logic – 4 (USA) и Siemens Sonoline G 60S (Germany), а также Esaote (Italy).

Статистическая обработка данных

Математико-статистическая обработка данных исследования осуществлена с помощью табличного редактора Excel, в частности его модулей

«Анализ данных» и «Мастер диаграмм» и пакета прикладных программ по статистической обработке данных Statistica for Windows.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка протокола экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии *in situ* у асистолических доноров почек (ЭНАП)

При анализе работы донорской службы Санкт-Петербурга за предыдущие годы было выявлено, что число эффективных доноров ($n = 46,3 \pm 0,7$) остается постоянным на протяжении 2007–2009 гг., отмечается относительно постоянное количество потенциальных доноров в течение года ($231,7 \pm 14,3$). Выявлен существенный рост числа пациентов, умерших в течение первых суток нахождения в стационаре от тяжелого повреждения головного мозга различной этиологии в течение последних двух лет. Эта группа «неэффективных» доноров существенна по численности, и за 2009 она увеличилась на 70% ($n = 173$) (рис. 1).

При более подробном рассмотрении досуточной смертности пациентов структура заболеваний, приведших к летальному исходу, была следующей: 55% ($n = 62$) с ЧМТ и 24% ($n = 111$) с ОНМК.

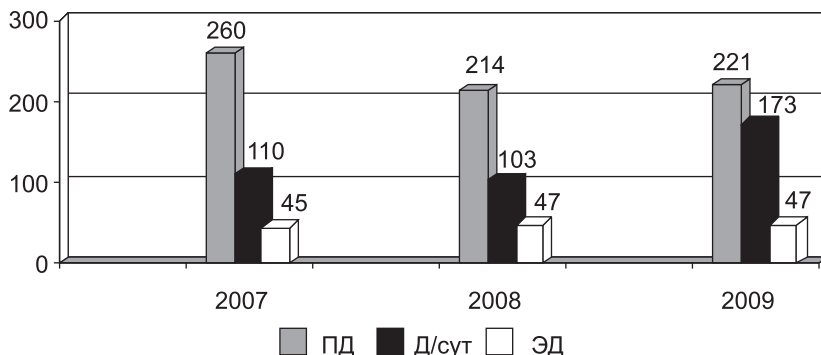


Рис. 1. Данные донорской службы за 2007–2009 гг.: ПД – потенциальный донор; Д/сут – досуточная летальность пациентов с повреждением ГМ; ЭД – эффективный донор

В большинстве случаев о наличии таких пациентов донорская служба не оповещается в связи с внезапностью наступления смерти, а также с невозможностью выполнения операции изъятия в кратчайшие сроки. Таким образом, в результате проведенной оценки донорского потенциала Санкт-Петербурга нами была выделена подгруппа потенциальных асистолических доноров (пациенты, умершие от тяжелого повреждения головного мозга в течение 1-х суток нахождения в стационаре), изъятие органов у которых не состоялось в связи с внезапностью развития у них остановки сердечной деятельности.

В связи с задачами исследования в 2009 году в работе Центра органного и тканевого донорства НИИ скорой помощи было принято новое направление «Использование перфузионных технологий в органном донорстве для клинической трансплантации». Основные методологические аспекты направления были одобрены и приняты на заседании Этического комитета НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе от 15 июля 2009 г.

Согласно решению Этического комитета, потенциальными донорами почек, у которых может выполняться предложенный протокол, являются пациенты, погибшие от черепно-мозговой травмы, нарушений мозгового кровообращения, не старше 55 лет, не рассматривавшиеся как потенциальные доноры, с внезапно развившейся остановкой кровообращения, с проведенным полным комплексом мероприятий сердечно-легочной реанимации и при безуспешности последнего, с констатированной смертью. Данная категория доноров до внедрения в клиническую практику разработанного протокола не использовалась, а донорские органы признавались не пригодными для трансплантации.

В целях определения организационных аспектов работы нами были разработаны и введены в клинический обиход следующие понятия.

«Донор с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности» – это доноры, у которых остановка кровообращения произошла в стационаре (шоковый зал, реанимационная палата, отделение) в то время, когда донорская служба не была заранее оповещена о наличии потенциального донора. Доноры такого типа являются донорами I и II категорий асистолических доноров по Маастрихтской классификации 1993 г., таких доноров принято называть также «неконтролируемыми» асистолическими донорами (НАСД).

«Экстракорпоральная нормотермическая аппаратная перфузия донорских органов с удалением лейкоцитов и трансмембранной оксигенацией» (ЭНАП) – это комплекс мероприятий, при котором производится изолированная абдоминальная нормотермическая аппаратная перфузия *in situ*, с целью восстановления и сохранения функционального состояния ишемически поврежденных донорских органов у доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности.

Для реализации работы была разработана новая модель асистолического донорства, ключевым моментом которой было то, что донорская бригада прибывала к умершему пациенту после констатации биологической смерти.

На основании теоретических предпосылок и разработанных показаний к использованию доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности совместно с Государственным научным центром России ЦНИИ робототехники и технической кибернетики был разработан перфузионный контур для поведения экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии *in situ* у доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности. Способ подключения и компоненты перфузионного контура представлены на рис. 2.

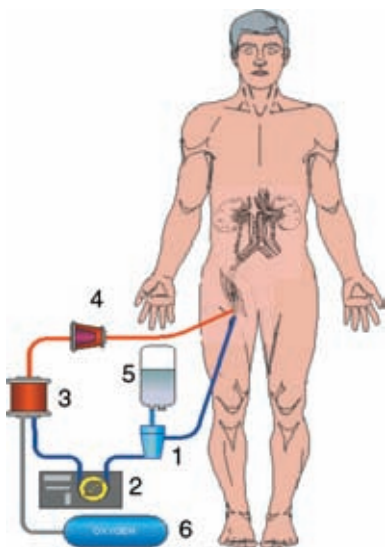


Рис. 2. Общая схема перфузионного контура изолированной абдоминальной нормотермической перфузии с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов. Компоненты перфузионного контура: 1 – венозный резервуар, 2 – мехатронный модуль «МАРС», 3 – оксигенатор, 4 – лейкоцитарный фильтр, 5 – емкость с раствором Кустодиол, 6 – устройство подачи кислорода

Подготовка к работе перфузионного контура осуществлялась в следующей последовательности.

1. Соединение основных компонентов контура производилось с использованием экстракорпоральных перфузионных трубок в последовательности – как показано на рис. 2. Собранный перфузионный контур с помощью пластмассовой магистрали диаметром 3/8 дюйма, идущей из лейкоцитарного фильтра, присоединяли с помощью коннектора к двухбаллонному трехпросветному катетеру, 16F, установленному в бедренной артерии донора. К венозной канюле, установленной в бедренной вене, присоединяли пластмассовую магистраль, соединенную с венозным резервуаром, и таким образом получали замкнутый контур перфузии. Устройство подачи кислорода соединяли с оксигенатором. 3. Управление режимами перфузии осуществлялось кнопками на лицевой панели мехатронного модуля «МАРС». 4. Первичный объем заполнения системы осуществлялся консервирующим раствором «Кустодиол» объемом до 1,2 л с добавлением до 400 мл перфторана и в среднем составлял 1,4–1,6 л.

Протокол проведения экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии с трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов при получении почечных трансплантатов у доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности.

Порядок мероприятий

1. После проведения реанимационных мероприятий и констатации биологической смерти пациента в условиях шокового зала, реанимационной палаты, заполнения соответствующих документов производился забор крови для экспресс-диагностики инфекций (гепатит В, С, ВИЧ, RW)

2. Перфузионная и эксплантационная бригады прибывали в стационар через 20–45 минут после получения разрешения на изъятие у администра-

ции больницы и вызова судебно-медицинского эксперта (СМЭ). Операция эксплантации донорских органов начиналась только после прибытия СМЭ и получения его разрешения на изъятие, в среднем на это уходило от 1,5 до 2 часов.

3. Тело умершего (рассматриваемого теперь как потенциального асистического донора) перемещалось в операционную, где, в случае получения отрицательных результатов экспресс-диагностики инфекций, хирургом службы забора органов выполнялся доступ к бедренным сосудам в правом бедренном треугольнике.

4. Затем к магистральным сосудам бедра подсоединялся контур экстракорпорального аппаратного комплекса для проведения изолированной абдоминальной перфузии.

5. Длительность сеанса «восстановления» функционального состояния ишемически поврежденных донорских почек и время начала изъятия принималось на основании результатов исследования содержания лейкоцитов в перфузионном контуре, при достижении значения в $1 \times 10^9/\text{л}$ и ниже результаты проведения перфузии признавались удовлетворительными.

6. Операция эксплантации выполнялась на фоне продолжающейся перфузии, которая заканчивалась непосредственно перед извлечением органов.

7. После окончания перфузии и эксплантации донорских почек производилась традиционная консервация охлажденным до 4°C раствором Кустодиол, а затем бесперфузионным способом по общепринятой методике в стерильных пластиковых пакетах раствором Кустодиола до момента пересадки.

Протокол перфузии

1. На инициальном этапе перфузия производилась со скоростью 600–800 мл/мин с последовательным увеличением в течение первого часа до уровня 2500 мл/мин, особо следует отметить пульсативный характер перфузии (скорость вращения роликового насоса была не менее 30 об./мин, а давление внутри контура составляло 100–120 мм рт. ст., что создавало имитацию физиологического систоло-диастолического кровообращения).

2. Первичный объем заполнения и необходимость дополнительного введения в контур раствора Кустодиол определялось уровнем гемоглобина в перфузате, который в среднем составил $41,1 \pm 3,75$ г/л, а гематокрита – $0,35 \pm 0,02$.

3. Кислород подавался со скоростью от 250 до 550 мл/мин в зависимости от скорости перфузии в соотношении $\frac{1}{2}$, при этом $p\text{O}_2$ составляло на инициальном этапе в среднем $557,3 \pm 19,3$, а $p\text{CO}_2$ – $91,8 \pm 10,4$, косвенным признаком адекватности оксигенации было наличие артерио-венозной разницы в контуре.

4. Длительность проведения сеанса экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии ишемически поврежденных донорских почек составляло в среднем $158,2 \pm 10,1$ мин, ориентиром служило снижение

уровня лейкоцитов в перфузионном контуре до $0-1 \times 10^9/\text{л}$ от исходных показателей (рис. 3).

5. В качестве перфузата была использована модифицированная кровь асистолического донора. Общая формула перфузата выглядела следующим образом: кровь асистолического донора, Кустодиол до 2 л, гепарин 25 000 ЕД, стрептокиназа 1,5 млн ЕД, Перфторан не менее 400 мл, солумедрол 500 мг, изоптин 5 мг, нитроглицерин 5 мг.

В плановом порядке каждые 30 мин производился отбор проб крови для определения уровня лейкоцитов, гемоглобина, эритроцитов, КЩС перфузата. За исходные показатели нами принимались биохимические и цитологические показатели крови до остановки сердечной деятельности. При выраженности метаболического ацидоза в контур вводился 3%-ный раствор гидрокарбоната натрия в объеме до 600 мл, до момента нормализации рН перфузата (среднее рН 7,0–7,3).

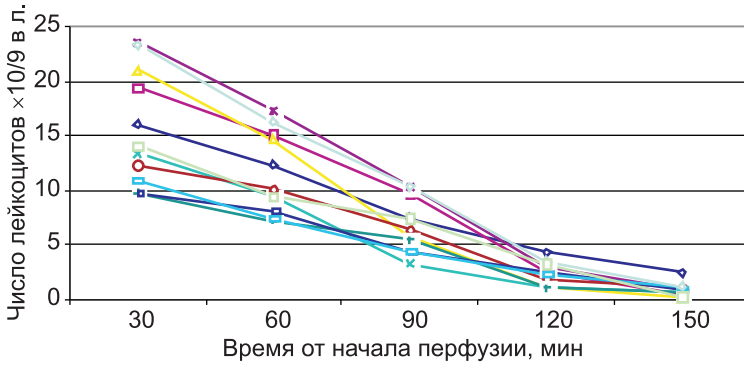


Рис. 3. Динамика редукции числа лейкоцитов в перфузионном контуре в зависимости от времени от начала перфузии

Среднее время от момента остановки сердечной деятельности до начала аппаратной перфузии абдоминального региона составило $76 \pm 4,51$ мин (мин. 45, макс. 92). Следует отметить, что, несмотря на значительный период отсутствия кровообращения у донора, после выполнения описанных выше мероприятий, как правило, во время операции эксплантации, цвет и консистенция органов брюшной полости соответствовал прижизненному, отмечалась перистальтика кишечника и мочеточников в ответ на механические стимулы, у 4 доноров было отмечено выделение мочи до 100 мл в ходе выполнения эксплантации.

Сравнение результатов трансплантаций почек от доноров со смертью мозга и доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности

Основные характеристики сравнения исследуемых групп приведены в табл. 3.

Следует особенно отметить отсутствие в группе доноров со смертью мозга такого параметра, как первичная тепловая ишемия. Данный показатель в исследуемой группе составил $76 \pm 4,51$ мин и являлся значимым параметром, который объективно должен был повлиять на характер начальной функции трансплантата. Статистически значимых различий в сроках ХИ в исследуемой группе и группе сравнения найдено не было ($14,7 \pm 0,7$ ч против $15,1 \pm 0,96$ ч ($p > 0,05$)).

Таблица 3

Сравнительная характеристика ранних послеоперационных результатов

Характеристики	Исследуемая группа (n = 22)	Группа сравнения (n = 20)	Значение p
Время холодовой ишемии, час	$14,7 \pm 0,7$	$15,1 \pm 0,96$	$>0,05$
Немедленная функция (НФТ)	6 (27,3%)	9 (45%)	$<0,05$
Отсроченная функция (ОФТ)	16 (72,7%)	11 (55%)	$<0,05$
Число диализов/30 дней	$6,64 \pm 1,18$	$2,9 \pm 0,8$	$<0,05$
Креатинин сыворотки крови на 21-е сутки, ммоль/л	$0,198 \pm 0,002$	$0,151 \pm 0,002$	$>0,05$
Креатинин сыворотки крови на 90-е сутки, ммоль/л	$0,119 \pm 0,004$	$0,133 \pm 0,011$	$>0,05$
Длительность госпитализации	$34,3 \pm 2,0$	$30,7 \pm 2,5$	$>0,05$
Острое отторжение/30 дней	2(9,1%)	4 (20%)	$<0,05$
Хирургические осложнения	1 (4,5%)	2 (10%)	$>0,05$

Частота развития ОФТ в исследуемой группе реципиентов была выше – в 16 случаях из 22 (72,7%), а в группе сравнения – 11 (55%), $p < 0,05$ (рис. 4).

Достоверное различие определялось в количестве сеансов гемодиализа, потребовавшихся до восстановления функции трансплантатов в раннем послеоперационном периоде (в исследуемой группе $6,64 \pm 1,18$ против $2,9 \pm 0,8$ в группе сравнения ($p < 0,05$)).



Рис. 4. Показатели немедленной и отсроченной функции трансплантатов в исследуемой группе и группе сравнения, %

Несмотря на изначально высокий процент отсроченной функции и большее количество сеансов гемодиализа, не было выявлено статистически значимых различий в уровне сывороточного креатинина в сравниваемых группах уже к 21 суткам: $0,198 \pm 0,002$ ммоль/л, а в группе сравнения $0,151 \pm 0,002$ ммоль/л ($p > 0,05$). На 90-е сутки распределения значений креатинина в исследуемой группе было ниже $0,119 \pm 0,004$ ммоль/л, чем в группе сравнения: $0,133 \pm 0,011$ ммоль/л ($p > 0,05$). Данные приведены графически на рис. 5.

При сравнении особенностей течения послеоперационного периода учитывалась частота возникновения ранних (госпитальных), возникших в течение первого месяца, кризов отторжения. Небольшое количество наблюдений не позволяет произвести точный статистический анализ, но необходимо отметить, что в группе сравнения число кризов было выше и составило 4 (20%) случая против 2 случаев – 9,1% ($p < 0,05$).

Случаев первично нефункционирующего трансплантата в сравниваемых группах реципиентов зафиксировано не было.

Хирургические осложнения были в обеих группах: в одном (4,5%) случае в исследуемой группе потребовалось проведение эндоваскулярной баллонной ангиопластики и стентирования подвздошного сегмента аорты в связи с отслойкой интимы в раннем послеоперационном периоде; в группе сравнения двум (10%) реципиентам в первый месяц после операции потребовалось повторное вмешательство. В одном случае операция выполнялась по поводу кровотечения из области трансплантата, ревизия гематомы, во втором – реоперация была связана с необходимостью реконструкции неоцистуретероанастомоза в связи с выявлением некроза мочеочника.

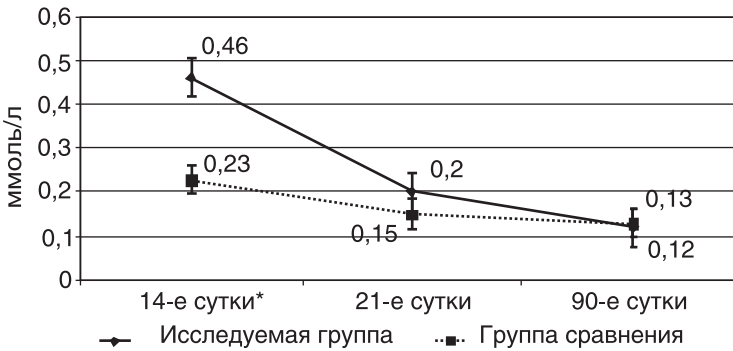


Рис. 5. Динамика снижения уровня креатинина в сыворотке крови по данным всей выборки (* $p < 0,05$)

Был проведен также анализ сроков госпитализации пациентов исследуемой группы и группы сравнения, статистические значимых различий выявлено не было. Срок госпитализации в исследуемой группе составил $34,3 \pm 2,0$ дня, а в группе сравнения $30,7 \pm 2,5$ дня ($p > 0,05$) (рис. 6).

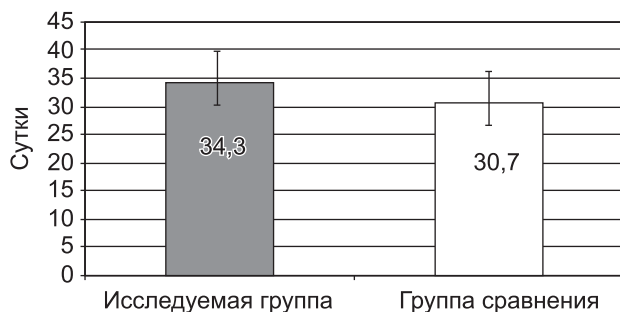


Рис. 6. Средние сроки госпитализации в послеоперационном периоде, дни ($p > 0,05$)

Малое число наблюдений не позволяет провести статистически достоверный анализ показателей, характеризующих данные группы реципиентов, однако следует отметить, что без применения предложенного протокола такие трансплантаты, то есть полученные от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, не были бы использованы.

Таким образом, при сравнении полученных результатов трансплантаций почек в исследуемых группах реципиентов нами было показано, что, применяя протокол экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии, возможна пересадка почек от доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности, о наличии которых донорская служба не была предупреждена заранее, с ранними послеоперационными результатами, не отличающимися от таковых, полученных от доноров со смертью мозга, традиционно считающимся оптимальным источником донорских органов.

С апреля 2009 по январь 2010 гг. донорской службой Санкт-Петербурга было использовано 54 эффективных донора органов. Из них 11 являлись донорами с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности. Таким образом, применение данной методики позволило увеличить пул эффективных доноров более чем на 20%.

ВЫВОДЫ

Применение нормотермической экстракорпоральной аппаратной перфузии в теле донора (*in situ*) является единственным способом восстановления и сохранения жизнеспособности органов у доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения (неконтролируемых асистолических доноров) до начала операции эксплантации.

Возобновление кровообращения *in situ* в изолированном абдоминальном бассейне для восстановления жизнеспособности почек возможно с помощью подключения к аорте и полой вене донора перфузионного контура, состоящего из роликового насоса, венозного резервуара, оксигенатора

и лейкоцитарного фильтра. Катетеризация, сосудистая изоляция бассейна абдоминальной перфузии и доступ к аорте и полой вене осуществляются через бедренные сосуды в сроки до 90 минут после констатации смерти донора. Реабилитационный эффект экстракорпоральной нормотермической перфузии достигается при ее продолженном (120–240 мин) применении и пульсирующем режиме; при использовании в качестве перфузата модифицированной донорской крови, с ее трансмембранной оксигенацией и удалением лейкоцитов из перфузионного контура.

Почечные трансплантаты, полученные от доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения, в раннем послеоперационном периоде показывают удовлетворительные функциональные параметры. Несмотря на высокую частоту развития отсроченной функции трансплантатов, в исследуемой группе в раннем послеоперационном периоде у 16 реципиентов из 22, что составило 72,7%, показатели сывороточного креатинина в исследуемой группе к 3-му месяцу составили в среднем $0,119,4 \pm 0,004$ ммоль/л.

Непосредственные и отдаленные результаты трансплантаций почек, полученных в соответствии с разработанным протоколом, не уступают таковым, полученным при пересадке трансплантатов от доноров со смертью мозга. Так, различия в средних значениях креатинина в сыворотке реципиентов почек, полученных описанным способом, и в группе сравнения к 3-му месяцу после трансплантации не были статистически значимы: $0,119 \pm 0,004$ ммоль/л и $0,133 \pm 0,01$ ммоль/л соответственно ($p > 0,05$). Частота кризов отторжения составила 9,1% в исследуемой группе и 20% в группе сравнения.

С апреля 2009 по январь 2010 гг. донорской службой Санкт-Петербурга было использовано 54 эффективных донора органов. Из них 11 (20%) являлись донорами с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности. Применение нормотермической аппаратной перфузии *in situ* позволяет получать полноценные почечные трансплантаты от доноров, ранее не использовавшихся в отечественной практике, время первичной тепловой ишемии у которых составляет до 60 минут и более, что приводит к существенному увеличению числа доноров почек и расширению эффективного донорского пула.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При работе с донорами с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности со временем первичной тепловой ишемии до 60 минут и более наиболее приемлемым с этической и практической точек зрения является протокол нормотермической экстракорпоральной аппаратной перфузии почек *in situ* с доступом через бедренные сосуды.

Рекомендованный возраст доноров с внезапной необратимой остановкой сердечной деятельности или НАСД для проведения экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии должен быть не более 50 лет

вследствие возрастных атеросклеротических изменений сосудистого русла региона перфузии, что может быть причиной недостаточной перфузии донорских почек, а также являться препятствием для катетеризации бедренных сосудов.

При реализации протокола обязательным условием является наличие в донорском стационаре госпитального трансплантационного координатора, а в арсенале донорской службы – транспорта, оборудованного специальными сигналами, а также экспресс-тест-систем для определения маркеров системных инфекций (гепатиты В, С, ВИЧ, RW).

Перфузионный контур, помимо роликового насоса, должен включать в себя венозный резервуар, позволяющий производить контроль объема перфузата, а также имеющий порты для введения в контур лекарственных препаратов и плановых отборов крови, оксигенатор – для адекватного насыщения кислородом перфузионного раствора и лейкоцитарный фильтр для элиминации лейкоцитов и их конгломератов из региона перфузии.

Восстановление жизнеспособности ишемически поврежденного донорского органа и воздействие на его функциональное состояние возможно только при нормотермической или субнормотермической аппаратной перфузии (температура в контуре 27–35 °С).

Обязательным условием перфузионного восстановления ишемически поврежденных почек является применение пульсативной перфузии за счет использования роликового насоса, скорость вращения которого должна быть не менее 30 раз в мин, что позволяет имитировать систоло-диастолический (физиологический) поток через регион перфузии.

Начальная скорость перфузии должна составлять не менее 500–800 мл/мин с постепенным увеличением до 2500 мл в минуту при давлении в контуре 100–120 мм рт. ст., что обеспечивает адекватную физиологическую перфузию абдоминального региона в теле донора и предотвращает повреждение микроциркуляторного русла высоким перфузионным давлением на инициальном этапе.

Оптимальный уровень оксигенации перфузата достигается при уровне гемоглобина не менее 40 г/л, гематокрите не менее 0,35 и потоке кислорода через оксигенатор 250–500 мл/мин.

Для первичного заполнения перфузионного контура целесообразно использовать консервирующий раствор Кустодиол в объеме не менее 1100 мл и перфторан не менее чем 400 мл.

Длительность восстановления функционального состояния ишемически поврежденных донорских почек и снижения степени ишемически-реперфузионной травмы составляет в среднем $158,2 \pm 10,1$ мин, ориентиром может служить снижение уровня лейкоцитов в перфузионном контуре до $0-1 \times 10^9$ в л.

В контур целесообразно введение: не менее 25% консервирующего раствора (нами наиболее подходящим и доступным для перфузии был признан раствор Кустодиола) позволяет стабилизировать клеточные мем-

браны и уменьшить отек эндотелия и тканей ишемически поврежденных донорских почек; не менее 20% перфторана позволяют улучшать доставку кислорода, метаболизм и газообмен на уровне тканей, что поддерживает минимальный уровень метаболизма в перфузируемых органах. Помимо этого, перфторан способен ослаблять эндотелиальное повреждение, что связано с наличием у него мембранопротективных свойств, со способностью угнетать адгезию, хемотаксис и метаболизм лейкоцитов, а также ослаблять взаимодействия между лейкоцитами и эндотелием, тем самым снижая степень лейкоцит-индуцированного повреждения тканей донорского органа; стрептокиназы и гепарина позволяет осуществлять фармакологическое воздействие на конгломераты активированных лейкоцитов с форменными элементами крови, разобщая их связи, что способствует удалению лейкоцитов и реканализации микрососудистого русла; изоптина как блокатора кальциевых каналов, который предотвращает дальнейшее поступление кальция в клетку, и снижает тем самым степень их повреждения; преднизолона, который подавляет функции лейкоцитов и тканевых макрофагов, ограничивает миграцию лейкоцитов, способствует стабилизации лизосомальных мембран, снижая тем самым концентрацию протеолитических ферментов, уменьшает проницаемость капилляров, обусловленную высвобождением гистамина, а нитроглицерин является фармацевтическим донором NO – эндотелиально-релаксирующего фактора, который снимает спазм гладкой мускулатуры сосудов, улучшая перфузию органа.

Отбор проб перфузата для определения содержания лейкоцитов, гемоглобина, эритроцитов, гематокрита, а также газов крови и КЩС необходимо проводить планоно каждые 30 мин для контроля параметров перфузии и состояния перфузионной среды.

Для проведения аппаратной перфузии *in situ* наиболее удобен двухбаллонный трехпросветный катетер диаметром 12–16 Fr и венозная канюля диаметром 16–18 Fr, венозный резервуар емкостью не менее 4,5 л, роликовый насос с возможностью регулировки внутрисистемного давления и скоростью вращения не менее 30 об./мин.

При канюляции бедренных сосудов рекомендована перевязка бедренных сосудов противоположной нижней конечности для исключения ее из зоны перфузии. Тщательная перевязка всех ветвей бедренной артерии и притоков бедренной вены рекомендована для исключения потерь перфузата из контура и поддержания его постоянного объема.

Операция эксплантации осуществляется на фоне проводимой перфузии (оперативное пособие по изъятию донорских органов не отличается от такового, проводимого у доноров со смертью мозга). После окончания перфузии и эксплантации донорских почек производится традиционная консервация охлажденным до 4 °С раствором Кустодиол, а затем бесперфузионным способом по общепринятой методике в стерильных пластиковых пакетах раствором Кустодиола до момента пересадки.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Резник О.Н., Багненко С.Ф., Мойсюк Я.Г., Логинов И.В., Скворцов А.Е. [и др.] Трансплантация почек от возрастных доноров. Актуальность, первый опыт и перспективы // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 1. – С. 11–21.*
2. *Багненко С.Ф., Мойсюк Я.Г., Скворцов А.Е. [и др.] Реабилитация донорских органов. Направление в консервации или новая парадигма трансплантологии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 3. – С. 17–29.*
3. *Багненко С.Ф., Скворцов А.Е. [и др.] Нормотермическая экстракорпоральная перфузия *in situ* как способ восстановления жизнеспособности почек у доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 1. – С. 61–67.*
4. *Багненко С.Ф., Сенчик К.Ю., Скворцов А.Е. [и др.] Концепция перфузионной реабилитации донорских органов в трансплантологии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2010. – № 2. – С. 78–83.*
5. *Резник, О.Н., Скворцов А.Е. [и др.] Нормотермическая перфузионная реабилитация донорских органов *in situ* после 90-минутной первичной тепловой ишемии // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2010. – № 2. – С. 113–117.*
6. *Багненко С.Ф., Мойсюк Я.Г., Сенчик К.Ю., Логинов И.В., Ананьев А.Н., Скворцов А.Е. [и др.] Применение мехатронного перфузионного модуля «МАРС» в трансплантологии / Робототехника. Взгляд в будущее. Труды международного научно-практического семинара. – Санкт-Петербург, 10–11 марта 2010 г. – Изд-во «Политехника-сервис». – С. 99–101.*
7. *Скворцов А.Е. Экстракорпоральная нормотермическая аппаратная гемоперфузия абдоминальных органов *in situ* у доноров с внезапной необратимой остановкой кровообращения / Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины: сборник тезисов 10-й науч.-практ. конференции молодых ученых. – СПб.: СПбМАПО, 2010. – С. 280–281.*
8. *Skvortsov A.E. The case of ischemically damaged kidneys rehabilitation by Normothermic Extracorporeal perfusion with leucocytes depletion / S.F. Bagnenko [et al.] // Transplant International. – 2009. – Vol. 22. – Suppl. 2. – Abstracts 14th Congress of the European Society for Organ Transplantation, 30 August-2 September 2009, Paris, France. – P. 357.*
9. *Skvortsov A.E. Rehabilitation of ischemically damaged kidneys by normothermic extracorporeal perfusion with leucocytes depletion. First experience / O. Reznik [et al.] // Abstract Supplement of 2009 Organ Donation Congress, 10th ISODP & 16th ETCO, Berlin, Germany. – 2009. – P. 51.*
10. *Skvortsov A.E. Recovery of Kidney from Uncontrolled Donors after Cardiac Death with One Hour Warm Ischemic time by Normothermic Extracorporeal perfusion *in situ* / O. Reznik [et al.] // Amer. J. Transpl. – 2010. – Vol. 10 (Suppl. 4). – Abstracts of the American Transplant Congress 2010. – P. 337.*
11. *Skvortsov A.E. Resuscitation of kidney from uncontrolled donors after cardiac death with one hour warm ischemic time by normothermic extracorporeal perfusion *in situ* with oxygenated and leukocyte-free donors blood / O.N. Reznik [et al.] // Transplant International. – 2010. – Vol. 23. – Suppl. 1. – Abstracts of the Joint 6th ELITA-ELTR 5th NHBD International meeting. – P. 8.*

Сусков Сергей Игоревич

ЦИТОКИНЫ В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПРИ ИСКУССТВЕННОМ И ВСПОМОГАТЕЛЬНОМ КРОВООБРАЩЕНИИ

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Научные руководители

Член-корреспондент РАМН,

доктор медицинских наук, профессор Шумаков Дмитрий Валерьевич
Заслуженный деятель науки РФ,

доктор биологических наук, профессор Зарецкая Юлия Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Внедрение искусственного и вспомогательного кровообращения в хирургическую практику сделало возможным выполнение сложных операций на сердце, включая двухэтапную трансплантацию сердца, и позволило расширить возрастные границы хирургического лечения, в том числе среди больных с сочетанной патологией сердца [Шумаков В.И., Толпекин В.Е., 2000, 2003; Шумаков Д.В., 2009; Nishimura, 2000; Park et al., 2000; Pennington D.C. et al., 2001; Caruso R., 2010].

В то же время для дальнейшего улучшения клинических результатов применения систем механической поддержки кровообращения наряду с

созданием новых и совершенствованием используемых систем вспомогательного кровообращения возникает необходимость решения ряда медико-биологических задач, связанных с дисрегуляцией адаптационно-защитных реакций, приводящих к развитию воспалительного ответа, иммунному и метаболическому дисбалансу и снижению противоинфекционной резистентности. Наличие входных ворот для инфекции через магистральи систем искусственного и вспомогательного кровообращения повышает риск бактериальной агрессии с развитием тяжелых инфекционно-воспалительных процессов и органных дисфункций [Шумаков В.И. и соавт., 2006; Белобородова Н.В., 2008; Гусев Е.Ю. и соавт., 2008; Сускова В.С. и соавт., 2009; Попцов В.Н., 2009; Smedira N.G. et al., 2001; Hotchkiss S.S., 2003], что выдвигает разработку новых информативных методов прогнозирования послеоперационных осложнений в разряд актуальных задач.

В последние годы появились новые данные о роли цитокинопосредованных механизмов в развитии хирургической инфекции и полиорганной недостаточности. Показано, что в результате повреждения и/или инфицирования тканей в организме развивается сложный многокомпонентный каскад последовательных реакций, неотъемлемым звеном которых являются цитокины иммунной системы – функциональные молекулы межклеточных взаимодействий в иммунном ответе [Черных Е.Р. и соавт., 2005; Кетлинский С.А. и соавт., 2008; Hancock J.T. et al., 2001; Blan K.S. et al., 2007; Cinel I. et al., 2009].

Цитокины играют ключевую роль как в развитии защитного воспалительного ответа, так и в регуляции избыточных проявлений системного воспаления. Нарушение цитокинового баланса приводит либо к развитию бактериально-токсического шока и органных дисфункций, что является причиной ранней летальности больных с гнойно-септическими осложнениями, либо к развитию глубокой иммунодепрессии и анергии, что ведет к формированию поздней полиорганной недостаточности [Косякова Н.И. и соавт., 2005; Козлов В.К., 2006; Casey L.C., 2000; Annane D. et al., 2003; Axelsson J. et al., 2010].

В настоящее время определение сывороточных уровней цитокинов используется для оценки тяжести течения патологического процесса; эффективности проводимой терапии; прогнозирования развития тяжелых послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений [Демьянов А.В. и соавт., 2003; Бережная Н.И., 2007; Bone R.S., 1997; Balk R.A., 2002; He Z., Zhao C. et al., 2005; Guani-Guerra E. et al., 2010].

Однако применение цитокинов иммунной системы в качестве маркеров воспаления и прогнозирования осложненного послеоперационного течения в отечественной клинической практике остается ограниченным [Останин А.А. и соавт., 2004; Шевченко О.П., 2009; Железнякова Г.Ф. и соавт., 2009]. Остаются недостаточно изученными особенности продукции цитокинов и прогностическое их значение у больных с исходным иммунодефицитным состоянием при операциях в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения.

Сдерживающим фактором использования цитокиновых параметров для прогнозирования послеоперационных осложнений является также отсутствие четкого алгоритма иммунологического мониторинга, включающего наряду с определением фенотипического состава клеток оценку регуляторных межклеточных взаимодействий, осуществляемых цитокинами. Отсутствие таких данных предопределило цель настоящего исследования.

Цель исследования

Изучить значимость цитокинов иммунной системы для прогнозирования развития и тяжести течения послеоперационных осложнений у больных при искусственном и вспомогательном кровообращении и повысить информативность алгоритма иммунологического мониторинга на основе включения цитокиновых параметров.

Задачи исследования

– Изучить особенности цитокинового статуса у больных с нарастающей сердечной недостаточностью при подготовке к операциям в условиях искусственного кровообращения.

– Исследовать основные закономерности и выявить особенности динамики цитокинов в процессе и в ранние сроки после искусственного кровообращения.

– Оценить уровни цитокинов и их взаимосвязь с клеточными параметрами при вспомогательном кровообращении для определения тактики иммунологического мониторинга при двухэтапной трансплантации сердца.

– Выявить сопряженность между цитокинами иммунной системы и клиническим статусом кардиохирургических больных для обоснования использования их в прогнозировании послеоперационных осложнений.

– Усовершенствовать алгоритм иммунологического мониторинга путем включения цитокиновых параметров для повышения его информативности при прогнозировании развития послеоперационных осложнений.

Научная новизна

Впервые показано, что цитокиновый дисбаланс, отражающий тяжелую форму нарушения иммунной системы, является новым самостоятельным функциональным типом вторичного иммунодефицита, способствующим развитию тяжелых инфекционно-воспалительных процессов и органных дисфункций.

Впервые установлено, что нарушение баланса продукции цитокинов является ранним признаком иммунодефицитных состояний у больных с нарастающей сердечной недостаточностью и предпосылкой для развития иммунозависимых осложнений при хирургическом лечении.

Показана возможность использования цитокиновых параметров для раннего выявления тяжелой иммунодепрессии и контроля за ее разрешением на разных этапах после операций в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения, в том числе двухэтапной трансплантации сердца.

Впервые определены типы основных вариантов цитокиновых реакций, соответствующих: 1 – благоприятному прогнозу, 2 – нарастанию органных дисфункций и риску инфекционных осложнений, 3 – нарастанию дыхательной недостаточности, 4 – неблагоприятному прогнозу после искусственного кровообращения, которые зависят от тяжести дооперационного иммунодефицита, степени выраженности сердечной недостаточности и типа органных дисфункций.

Выявлена сопряженность между параметрами клинического статуса и цитокинами иммунной системы и обоснована возможность их использования для прогнозирования и индивидуального контроля за развитием послеоперационных осложнений и тяжестью их течения у кардиохирургических и трансплантологических больных.

Разработан алгоритм иммунологического мониторинга на этапах хирургического лечения в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения путем применения сочетанной оценки цитокиновых параметров и фенотипического состава клеток иммунной системы, позволивший повысить его прогностическую информативность.

Научно-практическая значимость работы

Выявленные закономерности и варианты динамики цитокинов у кардиохирургических больных до и после операций в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения необходимо учитывать при выборе тактики иммунологического обследования для контроля за развитием послеоперационных осложнений.

Отобраны варианты комбинаций цитокинов на основе их корреляционных взаимосвязей для использования в качестве прогностических параметров развития и тяжести течения послеоперационных осложнений у кардиохирургических и трансплантологических больных.

Обязательными компонентами иммунологического мониторинга наряду с клеточными (апоптоз, иммунорегуляторные субпопуляции лимфоцитов) и фагоцитарными (моноциты, оксидазная активность нейтрофилов) показателями иммунитета должны быть цитокиновые параметры (IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-6, TNF- α), отражающие взаимосвязь между отдельными звеньями иммунной системы.

Определены информативные цитокиновые показатели (IL-6, IL-8, TNF- α) и прогностически значимые периоды для проведения иммунологического мониторинга (ранний период адаптации, лихорадка неясной этиологии, 30-е сутки левожелудочкового обхода – критический срок развития эндокардита систем МПК, замена деталей системы) при вспомогательном кровообращении у больных, ожидающих трансплантацию сердца.

Внедрение результатов в практику

Основные положения диссертационной работы внедрены в клиническую практику и повседневно используются в отделениях анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии, хирургии сердца и вспомо-

гательного кровообращения, коронарной хирургии и трансплантации сердца и реконструктивной хирургии приобретенных пороков сердца ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России.

Апробация диссертации состоялась 1 июля 2010 г. на заседании объединенной научной конференции клинических, экспериментальных отделений и лабораторий ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Материалы и основные положения диссертации доложены:

на XXXI Congress ESAO (Warsaw, Poland, 2004г.); на IX и X Всероссийском научном форуме с международным участием «Дни иммунологии в С.-Петербурге» (2005, 2006 гг.); на 11-th European Congress on Extra-Corporeal Circulation Technology (Italy 2005 г.); на 7-th Symposium of World artificial organ, immynology and Transplantation society (Waits), (Russia., St-Petersburg, 2005 г.); на XII, XIII, XIV и XV всероссийских съездах сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2006–2009 гг.); на VI съезде иммунологов-аллергологов, Российском национальном конгрессе аллергологов и III конференции по иммунотерапии (Москва, 2006 г.); на конференции «Клиническая трансплантация органов» РНЦХ РАМН (Москва, 2007 г.); на объединенных иммунологических форумах (Москва, 2007 и 2008 гг.); на IV Всероссийском съезде трансплантологов им. академика В.И. Шумакова (Москва, 2008 г.); на Национальной конференции «Аллергология и клиническая иммунология – междисциплинарные проблемы» (Москва, 2009 г.); на VII съезде аллергологов-иммунологов СНГ (С.-Петербург, 2009 г.); на всесоюзной конференции «Инфекции в трансплантологии» (Москва, 2009 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ в центральной печати, в том числе 4 статьи в журналах, рецензируемых ВАК.

Диссертационная работа выполнена в рамках зарегистрированной НИ-ОКР (2661/12 от 19.12.07 г., регистрационный № 0120.0800392) темы: «Диагностика и коррекция иммунных нарушений у больных при органной и клеточной трансплантации и операциях на сердце в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения».

Проведенные исследования являются частью разрабатываемой новой стратегии терапии гнойно-септических осложнений у кардиохирургических и трансплантологических больных.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, характеристики больных и методов исследования, 4 глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и библиографического указателя, включающего 199 источников, из них 96 отечественных и 103 зарубежных авторов. Работа представлена на 110 страницах машинописного текста, иллюстрирована таблицами и рисунками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Общая характеристика клинических наблюдений

Поскольку искусственное и вспомогательное кровообращение применяется, главным образом, при операциях на сердце, в настоящее исследование включен анализ результатов обследования 130 кардиохирургических больных, поступивших на плановое хирургическое лечение в период 2005–2010 гг. (табл. 1). Эти больные составили основную группу клинических наблюдений. 20 здоровых доноров крови составили контрольную группу, параметры иммунной системы которых были приняты в качестве нормативных показателей.

Таблица 1

Общая характеристика кардиохирургических больных, составивших основную группу наблюдений

Показатели		ИБС M ± m (min-max)	ППС M ± m (min-max)	ДКМП M ± m (min-max)	Всего M ± m (min-max)
Количество больных, n		75	40	15	130
Пол, n (%):	муж.	58 (77,3)	17 (42,5)	10 (66,6)	85
	жен.	17 (22,7)	23 (57,5)	5 (33,4)	45
Возраст, лет		54 ± 5,7* (43–73)	56,3 ± 7,8* (47–80)	57,6 ± 6,8* (48–78)	56,1 ± 6,7* (43–78)
– Степень сердечной недостаточности		НК 2А–2Б*	НК 2А–2Б*	НК 2А–2Б*	НК 2А–2Б*
– Функциональный класс стенокардии (по NYHA)		ФК III–IV*	ФК III–IV*	ФК III–IV*	ФК III–IV*
Операция в условиях ИК, кол-во		Реваскуляризация миокарда (АКШ) n = 75	Протезирование клапанов (ПК) n = 40	Сочетанная ПК + АКШ операция, n = 15	130
Длительность ИК, мин		130 ± 9* (78–182)	123 ± 12* (67–162)	144 ± 15 (87–200)	132 ± 13* (67–200)
Осложнения (СПОН, СПОД, СВР)					
– начало клинических проявлений п/о, сут		2,1 ± 0,3*	2,4 ± 0,3*	2,0 ± 0,8*	2,2 ± 0,4*
– степень выраженности, сумм. балл SOFA		11,7 ± 2,1*	10,5 ± 0,8*	12,0 ± 1,8*	12,0 ± 1,6*

Примечание. * – $p > 0,05$ – между больными с ИБС, ППС и сочетанными ДКМП. ППС – приобретенные пороки сердца, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия.

Как видно из табл. 1, больные с разной патологией сердца достоверно по возрасту, степени сердечной недостаточности и функциональному классу стенокардии при обследовании до операции, а также по длительности ИК и развитию осложнений (системной воспалительной реакции, органных дисфункций и полиорганной недостаточности) в раннем послеоперационном периоде не различались ($p > 0,05$). У мужчин преобладали операции по реваскуляризации миокарда и сочетанной патологии сердца, тогда как у женщин – операции по реконструкции клапанов сердца. В соответствии с поставленными задачами были определены следующие этапы исследования, включающие изучение:

1 – общих закономерностей и особенностей динамики цитокинов при искусственном и/или вспомогательном кровообращении;

2 – сопряженности динамики цитокинового статуса с клинико-иммунологической тяжестью послеоперационного течения;

3 – информативности использования цитокинов в иммунологическом мониторинге для прогнозирования послеоперационных осложнений.

Иммунологическое обследование проводили по схеме: до, в процессе, на 1-е и 3-е сутки после искусственного кровообращения, а также в процессе левожелудочкового обхода. Показатели иммунного статуса сравнивались с контрольной группой. В ходе иммунологического обследования было проведено 530 развернутых иммунологических анализов с использованием современных стандартизированных методов.

Оценку клеточного звена иммунитета проводили иммунофенотипированием лимфоцитов ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD16^+CD56^+$) с помощью дифференцировочных и активационных МКАТ, меченных FITC и фикоэритрином методом проточной цитофлуориметрии (Becton Coulter, Франция) [Пинегин Б.В., Ярилин В.А., 2001].

Состояние гуморального звена иммунитета оценивали по содержанию В-лимфоцитов ($CD19^+$), концентрации иммуноглобулинов основных классов G, A, M в сыворотке крови методом радиальной иммунодиффузии в геле [Manchini G., 1965], подклассов IgG 1–4 в сыворотке крови ИФА-методом («Вектор-Бест» РФ), уровню низкомолекулярных ЦИК (6% ПЭГ).

Фагоцитарную активность нейтрофилов крови определяли по фагоцитозу убитой взвеси *Staph. aureus*, подсчитывая фагоцитарный индекс и фагоцитарное число. Оксидазную и бактерицидную функцию нейтрофилов оценивали в НСТ-тесте спектрофотометрически и методом люминолзависимой хемилюминесценции [Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., 1995].

Цитокиновый статус (IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, INF- γ) оценивали методом флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, USA) с использованием коммерческих тест-систем 11-Plex [Останин А.А., 2004] и методом ИФА («Цитокин», СПб). Цитокины IL-1Ra и G-CSF определяли методом ИФА («Цитокин», СПб.).

Оценка тяжести клинического состояния больных

Системный воспалительный ответ оценивали по числу лейкоцитов, уровню С-реактивного белка методом турбометрии в капилляре, по полуколичественному тесту на прокальцитонин («BRANMS PCT-Q», Германия) [Aouifi A. et al., 1999]. Рассчитывали лейкоцитарную формулу и лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ) [Кальф-Калиф Я.Я., 1941].

Диагноз сепсиса и септического шока выставляли по критериям согласительной конференции American College of Chest physicians и Society of Critical Care Medicine (1992).

Диагностика органной недостаточности проводилась совместно с отделением анестезиологии, реанимации и интенсивной терапии (зав. д. м. н. В.Н. Попцов) по балльной шкале SOFA (The Sequential Organ Failure Assessment) [Vincent J.L., 1998], включающей оценку коэффициента оксигенации $\text{HiO}_2/\text{FiO}_2$, количества тромбоцитов, общего билирубина, креатинина, уровня артериального давления и дозы катехоламинов. Нарушение сознания оценивали по шкале Глазго. Суммарный балл выше 10 свидетельствовал о наличии СПОН, менее 10 баллов – СПОД.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием прикладных программ Statistica 6 (StatSoft, USA). При нормальном распределении количественных признаков подсчитывали средние значения (M), ошибки средней (m). При оценке качественных признаков подсчитывались их относительные доли (%). В качестве статистических тестов при нормальном распределении количественных признаков с равными выборочными дисперсиями использовали t-критерий Стьюдента. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$. Для оценки связи количественных признаков использовались методы линейной регрессии и корреляции (коэффициент корреляции Пирсона), для сопоставления пропорций – точный критерий Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I. Основные закономерности и особенности цитокинового статуса у кардиохирургических больных до и после операций в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения.

На первом этапе исследований проведено изучение основных закономерностей и особенностей цитокинового статуса у кардиохирургических больных до и после операций в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения.

Известно, что несостоятельность иммунной системы является основным фактором развития и прогрессирования послеоперационных осложнений. При этом тяжелые дисфункции иммунной системы наблюдаются чаще, чем несостоятельность других органов и систем, и сопровождаются

глубокой иммунодепрессией, которая является не только ранним и надежным признаком развития опасных для жизни состояний, таких как сепсис и полиорганная недостаточность, но и во многом обеспечивает их возникновение и последующее нарастание. Это подтверждает необходимость выявления иммунных нарушений и оценки степени их тяжести уже в дооперационном периоде.

1.1. Оценка тяжести иммунных нарушений и цитокинового дисбаланса у больных с нарастающей сердечной недостаточностью при подготовке к операции проведена у 38 больных с ИБС и приобретенными пороками сердца (ППС) с прогрессирующей сердечной недостаточностью, находящихся на медикаментозной поддержке. Степень выраженности тяжелых дисфункций иммунной системы оценивали: 1) по определению субпопуляционного дисбаланса Т-лимфоцитов; 2) количеству апоптотических лимфоцитов (CD95⁺кл.), экспрессирующих маркер апоптоза; 3) бактерицидной и оксидазной активности нейтрофилов и моноцитов, в том числе антигенпрезентирующей их функции; 4) лимфопении и сдвигу лейкоцитарной формулы, информативных для выявления тяжелых иммунодефицитов (табл. 2).

Как видно, независимо от диагноза у обследованных больных с высокой частотой выявлялся повышенный уровень апоптотических лимфоцитов (CD95⁺кл.), экспрессирующих маркер апоптоза (у 78% больных – в 3–5 раз выше N), и повышенная продукция активных форм кислорода в НСТ-тесте (у 86% больных). При этом у больных с ИБС более выражен апоптоз, тогда как у больных с ППС повышена оксидазная активность нейтрофилов ($p < 0,05$). Эти параметры относятся к высокоинформативным показателям для выявления иммунодепрессивных состояний, особенно при наличии сдвига формулы влево, лимфопении и апоптоза. Субпопуляционный дисбаланс Т-лимфоцитов отмечался у более половины всех обследованных больных и был связан с дисбалансом иммунорегуляции за счет снижения/повышения как CD4⁺кл., так и CD8⁺ЦТЛ. Нарушение активации моноцитов (HLA-DR⁺кл.) и Т-хелперов (CD4⁺25⁺кл.) отмечалось реже (у 14 и 22% больных соответственно).

Исследование цитокинового статуса у больных с нарастающей сердечной недостаточностью в дооперационном периоде включало оценку сыровоточных уровней цитокинов иммунной системы с преимущественным провоспалительным (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) и противовоспалительным (IL-10, IL-1Ra) действием, а также уровней G-CSF и регуляторных цитокинов (IL-2, IL-4, IFN- γ).

Индивидуальный анализ спектра и сыровоточных концентраций цитокинов (рис. 1) выявил преобладание повышенных уровней провоспалительного IL-1 β (26%), хемоаттрактанта IL-8 (38%) и костномозгового колониестимулирующего фактора G-CSF (54%) у больных с наличием локальных очагов воспаления и/или при обострении хронических заболеваний. Колебания уровней IFN- γ , IL-6, регулирующих функциональные

Таблица 2

Дисфункции иммунной системы у кардиохирургических больных с сердечной недостаточностью при подготовке к операции (n = 38)

Показатель	Доноры (n = 20)	ИБС (n = 20)		ППС (n = 18)		% больных			
		Me	Min-max	Me	Min-max	<N	N	>N	
Лейкоциты $\times 10^9$	4000–9000	5200	4000–7800	6790	3050–7200	14	72	14	
Лимфоциты	%	25–40	31	28–45	29	18–37	36	64	0
	$\times 10^9$	1700–2500	1639	656–3000	1560	670–2700	29	67	7
Нейтрофилы п/я %	1–8	9*	4–16	10*	5–13	0	50	50	
T-лф.(CD3) %	60–75	71	53–86	59	60–81	14	57	29	
ИРИ (CD4/CD8)	1,5–2,0	3,0*	0,8–3,5	2,9*	1,1–4,0	29	29	42	
Моноциты %	1–7	3	1–7	3	1–3	0	86	14	
Акт. HLA-DR %	8–15	14	6–21	10,5	7–26	14	57	29	
Рец. к IL-2 (CD25) %	1–5	2	1–5	1,8	1–4	22	78	0	
Апоптоз (CD95⁺кл.) %	0–10	41*	22–69	26 * **	22–52	0	22	78	
НСТ-тест (у. е.)	сп.	80–99	67	80–200	157* **	98–206	0	14	86
	инд.	130–256	296*	126–334	317* **	146–452	0	14	86

Примечания. * – $p < 0,05$ – достоверность различий по сравнению с группой доноров, ** – $p < 0,05$ – достоверность различий между группами больных с ИБС и ППС. % больных – частота со сниженными (<), сохраненными (N) и повышенными (>) параметрами.

свойства моноцитов, приближались к средним уровням, тогда как уровни TNF- α у 89% больных не превышали N. Повышение IL-2 у 84% больных было характерно для преобладания Th1 иммунного ответа.

Компенсаторное нарастание IL-1Ra, блокирующего рецепторы IL-1 β на клетках-мишенях и тем самым способствующего сдерживанию развития воспалительной реакции, наблюдалось у 46% обследованных больных.

Проведенный корреляционный анализ (рис. 2) в дооперационном периоде выявил достоверные положительные взаимосвязи между регуляторными, про- и противовоспалительными цитокинами, отражающими функциональное состояние отдельных звеньев иммунной системы.

Так, сопряженные повышения IL-1Ra и IL-4 ($r = 0,28$), IL-6 ($r = 0,48$) и IL-10 ($r = 0,3$) отражает состояние Treg-регуляторного звена; IL-4 и TNF- α ($r = 0,42$) отражает взаимосвязь Th1(клеточного) и Th2 (гуморального) иммунного ответа; IL-6 и IL-10 ($r = 0,62$) свидетельствует о нарастании сердечной недостаточности, TNF- α в сочетании с G-CSF ($r = 0,4$) может служить механизмом повышения процесса апоптоза В-лимфоцитов и нейтрофилов; высокие корреляционные связи между IFN- γ и компонентом комплемента

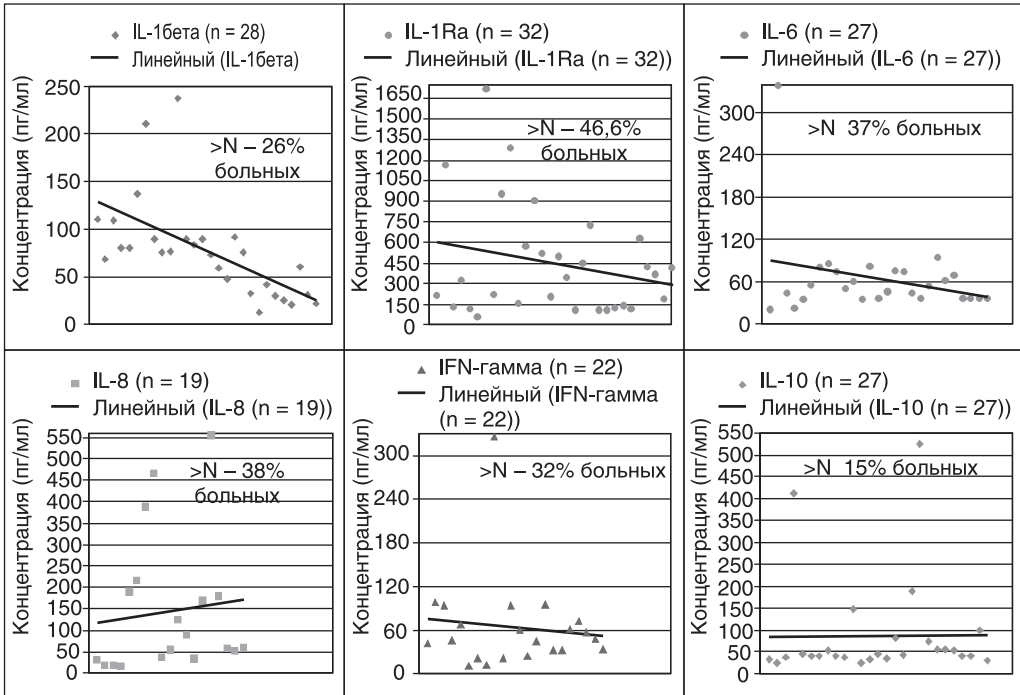


Рис. 1. Индивидуальное распределение спектра и сывороточных концентраций цитокинов у кардиологических больных до операции

С3а ($r = 0,8$) свидетельствуют о развитии воспалительного процесса. В то же время соотношение между IL-1β и IL-1Ra выразалось отрицательным коэффициентом корреляции ($r = -0,11$), что приводило к снижению продукции IL-1β и сдерживанию развития воспалительного процесса в результате негативной эндогенной регуляции IL-1Ra.

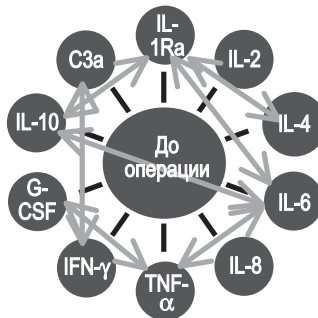


Рис. 2. Корреляционные взаимосвязи (r) между цитокинами до операции (достоверные положительные корреляции обозначены стрелками)

Нарушение корреляционных взаимосвязей цитокинов в процессе иммунного ответа приводит к формированию нового функционального типа вто-

ричного иммунодефицита, проявляющегося развитием цитокинового дисбаланса, и повышению риска развития послеоперационных осложнений.

Таким образом, полученные результаты выявили на фоне тяжелых клеточных дисфункций наличие у большинства обследованных больных вторичного функционального иммунодефицита и высокого риска развития органических дисфункций воспалительного типа, пусковым моментом которых в раннем послеоперационном периоде служит операционная травма и кардиопульмональный обход.

1.2. Цитокиновый статус у кардиохирургических больных с прогрессирующей сердечной недостаточностью на ранних сроках после искусственного кровообращения.

Изучение состояния цитокинового статуса в раннем периоде после операций в условиях искусственного кровообращения было продолжено у обследованных до операции 38 кардиохирургических больных по следующей схеме: до ИК, после ИК, через 12 часов, 1 сутки и 2–3 суток после операции, а также у 10 больных в процессе ИК по схеме: 5 мин ИК, 40 мин ИК, конец ИК, далее по общей схеме. Время ИК варьировало от 111 мин до 195 мин; ишемия миокарда составила 68–87 мин.

В табл. 3 представлен характер общих закономерностей динамики цитокиновых параметров (IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-8, G-CSF, TNF- α , IL-10) в процессе искусственного кровообращения и в раннем периоде после ИК, отражающий развитие защитной воспалительной реакции и механизмов, сдерживающих гиперактивацию воспалительного ответа.

Таблица 3

Динамика цитокинов иммунной системы у кардиохирургических больных до и после искусственного кровообращения (n = 38)

сроки \ ИК	IL-1 β (пг/мл)	IL-1Ra (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)	IL-8 (пг/мл)	G-CSF (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)	TNF- α (пг/мл)
До ИК	68 \pm 12	84 \pm 18	31 \pm 3	39 \pm 15	21 \pm 7	201 \pm 17*	17 \pm 3
5' ИК	110 \pm 21*	356 \pm 45*	18 \pm 5	84 \pm 17*	33 \pm 8	182 \pm 8,4*	22 \pm 4
40' п/ИК	150 \pm 8*	520 \pm 150*	128 \pm 129*	143 \pm 28*	479 \pm 127*	94 \pm 10	19 \pm 7
Конец ИК	160 \pm 30*	392 \pm 60*	129 \pm 22*	154 \pm 33*	717 \pm 346*	75 \pm 4,5	20 \pm 3
12 ч. п/ИК	180 \pm 53*	235 \pm 95*	121 \pm 22*	149 \pm 32*	437 \pm 151	70 \pm 5	18 \pm 1,4
1с. п/ИК	80 \pm 25*	518 \pm 106*	95 \pm 6*	95 \pm 23*	312 \pm 147*	65 \pm 4	32 \pm 3,5
2–3 с. п/ИК	75 \pm 17	406 \pm 26*	237 \pm 18*	71 \pm 21	56 \pm 16	61 \pm 3,7	20 \pm 4
Контр. гр.	57 \pm 15	260 \pm 60	32 \pm 4	57 \pm 12	48 \pm 15	61 \pm 13	28 \pm 7

Примечание. * – $p < 0,05$ – по сравнению с контрольной группой.

Как видно, дооперационные уровни цитокинов не превышали контрольных значений за исключением исходно повышенных показателей концентрации ИЛ-10.

Через 5 мин ИК быстро нарастали концентрации ИЛ-1 β и ИЛ-8, отражающие начало защитной воспалительной реакции в ответ на ИК, с одновременной быстрой продукцией ИЛ-1Ra – общебиологической адаптивно-компенсаторной реакцией сдерживания гиперактивации воспалительного процесса, и сохраняющимся уровнем ИЛ-10 – Treg-регуляции. В процессе искусственного кровообращения пики нарастания ИЛ-1 β , ИЛ-8 и G-CSF приходились на период – «конец ИК – 12 час после ИК», с последующим снижением к 1–3-м суткам после ИК.

В процессе искусственного кровообращения и через 1–3 суток после ИК уровни TNF- α и ИЛ-10 не превышали контрольных значений.

Динамика ИЛ-6 и ИЛ-1Ra – антагониста рецептора к ИЛ-1 β – имела двухфазный характер: первый подъем продукции ИЛ-6 наблюдался во время ИК и 12 ч после ИК (период нарастания миокардиальной недостаточности после пережатия аорты) со снижением к 1-м суткам и вторым подъемом ко 2–3-м суткам (периоду развития ранних послеоперационных осложнений и органных дисфункций). Первое повышение ИЛ-1Ra соответствовало периоду подключения ИК, второе повышение отмечалось через 2–3 суток – период повышения риска развития послеоперационных осложнений.

Индивидуальный анализ цитокиновых параметров в процессе искусственного кровообращения показал увеличение числа больных с повышенными концентрациями исследуемых цитокинов, что позволило выявить особенности и установить основные типы вариантов динамики цитокинового статуса при применении ИК.

Первый тип варианта динамики цитокинового статуса характерен для неосложненного послеоперационного течения при операциях в условиях ИК.

При этом дооперационные показатели цитокинов варьируют в пределах нормативных значений за исключением ИЛ-8. Повышение продукции цитокинов в процессе ИК сдерживается условиями его проведения (гипотермия и др.). К 12 ч после ИК отмечается подъем уровней всех цитокинов (адапционно-компенсаторная реакция) с нормализацией к 3-м суткам (благоприятный прогноз; рис. 3).

При втором варианте отмечаются исходно высокие уровни провоспалительных цитокинов, в том числе G-CSF, стимулирующего дополнительный выброс нейтрофилов из костного мозга, которые свидетельствуют о наличии хронического воспалительного процесса (бакэндокардит и др.). Уже с 5-й мин после начала ИК резко возрастают уровни ИЛ-1Ra и ИЛ-10, сохраняющиеся до конца ИК, при одновременном снижении продукции ИЛ-1 β . Резкий подъем ИЛ-1Ra расценивается как сдерживающий механизм воспалительной реакции на ИК. К концу первых суток все показатели цитокинов возвращаются к норме (нарастание риска органных дисфункций; рис. 4).

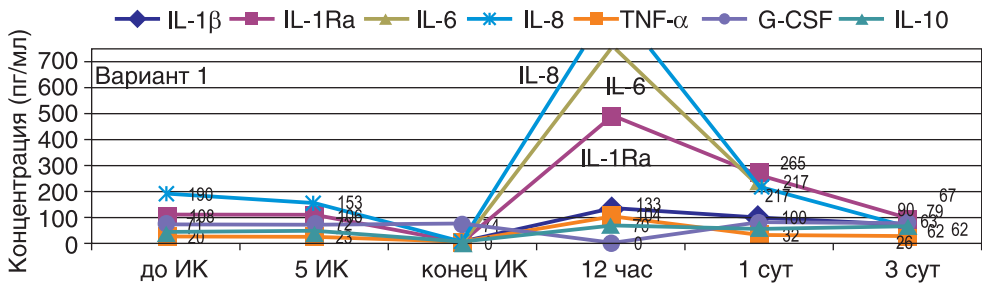


Рис. 3. Вариант 1. Благоприятный прогноз. n = 15 (40%)

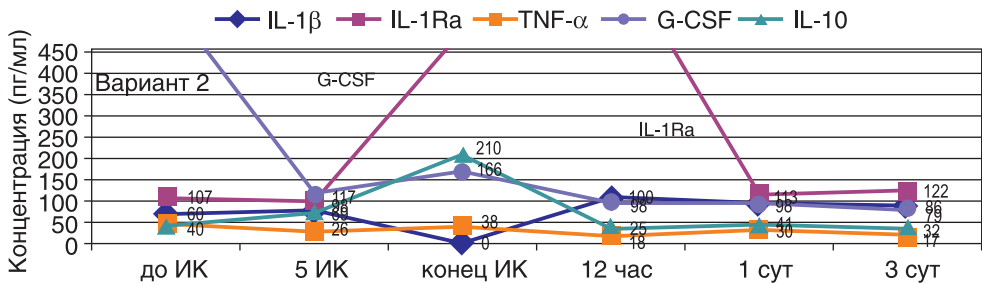


Рис. 4. Вариант 2. Нарастание риска органичных дисфункций. n = 9 (22%)

При третьем варианте динамики цитокинового статуса в конце ИК определяются высокие уровни IL-1Ra, IL-8, G-CSF, а также IL-10, что свидетельствует о нарастании иммуносупрессии в организме. К 12 час их уровни снижаются (кроме IL-1Ra), тогда как возрастает уровень IL-6, отражающий нарушения, связанные с гипоксией миокарда в процессе ИК.

Новый подъем IL-8 и G-CSF на постоянно высоком фоне IL-1Ra может служить прогнозом нарастающей дыхательной недостаточности (рис. 5).

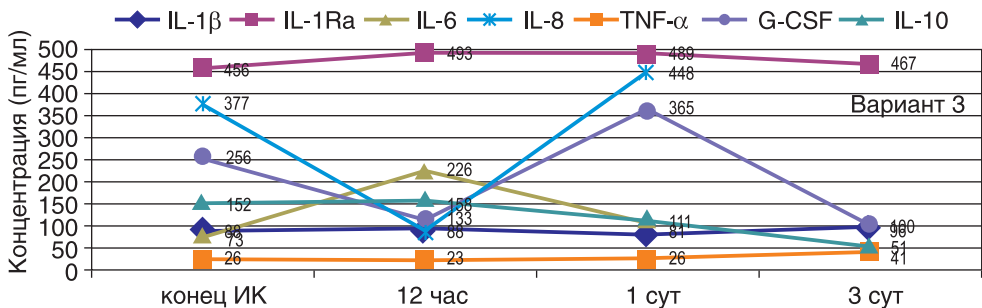


Рис. 5. Вариант 3. Нарастание дыхательной недостаточности. n = 10 (28%)

При четвертом варианте динамики цитокинового статуса высокий уровень IL-1Ra определяется на протяжении раннего послеоперационного периода (в первые 3 сут). Повышение уровней IL-6 и IL-8 к 3-м сут и особенно к 4–6-м суткам может использоваться для прогноза развития тяжелых

инфекционных осложнений и полиорганной недостаточности. Такой вариант наиболее типичен у больных с интраоперационными осложнениями (неблагоприятный прогноз; рис. 6).

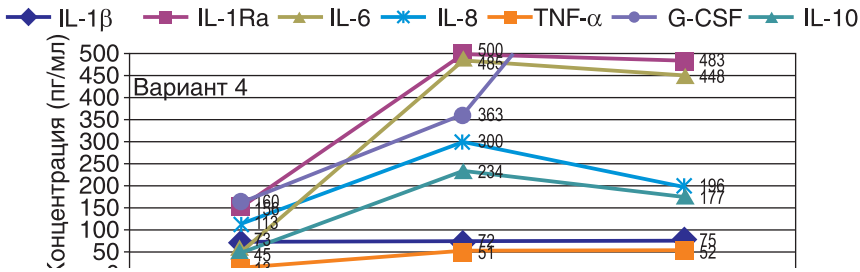


Рис. 6. Вариант 4. Неблагоприятный прогноз. n = 4 (10%)

Таким образом, изучение общих закономерностей динамики как усредненных показателей, так и индивидуального анализа наиболее исследованных в клинике цитокинов иммунной системы, обозначаемых как цитокиновый статус, в раннем периоде после операции в условиях искусственного кровообращения позволило выявить наиболее важные информативные параметры (IL-1Ra, IL-6, IL-8, G-CSF) для прогнозирования генерализации воспалительного ответа и развития органных дисфункций.

1.3. Влияние вспомогательного кровообращения на уровни цитокинов и их сопряженность с клеточными параметрами иммунной системы у больных, ожидающих трансплантацию сердца.

Динамика цитокиновых параметров при вспомогательном кровообращении изучена на этапе механической поддержки кровообращения методом внутриаортальной баллонной контрпульсации и левожелудочкового обхода (ЛЖО) с помощью насоса «Віоритр».

Динамика цитокиновых параметров у кардиохирургических больных с нарастающей сердечной недостаточностью при внутриаортальной баллонной контрпульсации

Показанием к применению внутриаортальной баллонной контрпульсации (ВАБК) явилась неэффективность фармакологической поддержки и прогрессирующая сердечная недостаточность с выраженным синдромом низкого сердечного выброса до или после операции. Динамика цитокиновых параметров при подключении внутриаортальной баллонной контрпульсации исследована у 42 кардиохирургических больных.

Характер реагирования иммунной системы и течение послеоперационного периода при искусственном кровообращении и ВАБК имели общие закономерности и зависели не столько от их длительности, сколько от исходного состояния адаптационно-приспособительных реакций и антиген-специфического иммунного ответа. Динамика продукции цитокинов при ВАБК коррелировала с дисфункцией миокарда и системной воспалительной реакцией.

При эффективном подключении ВАБК уменьшался Т-клеточный иммунодефицит в результате повышения уровня Т-хелперов – ключевой иммунорегуляторной субпопуляции в формировании антиген-специфического иммунного ответа. ВАБК не нарушал адекватного реагирования иммунной системы: снижение гипоксии органов и систем при ВАБК приводило к восстановлению функций иммунокомпетентных клеток, снижению апоптоза.

При быстро нарастающей сердечной недостаточности и недостаточности кровообращения, снижении транспорта кислорода и темпа диуреза требовалось подключение левожелудочкового обхода.

Динамика цитокиновых параметров в процессе вспомогательного кровообращения с использованием левожелудочкового обхода при двухэтапной трансплантации сердца

Иммунологический мониторинг в процессе левожелудочкового обхода у 15 больных при подготовке к двухэтапной пересадке сердца осуществляли в соответствии с выделенными критическими периодами развития системной воспалительной реакции и полиорганной дисфункции, а также активации инфекции (рис. 7).

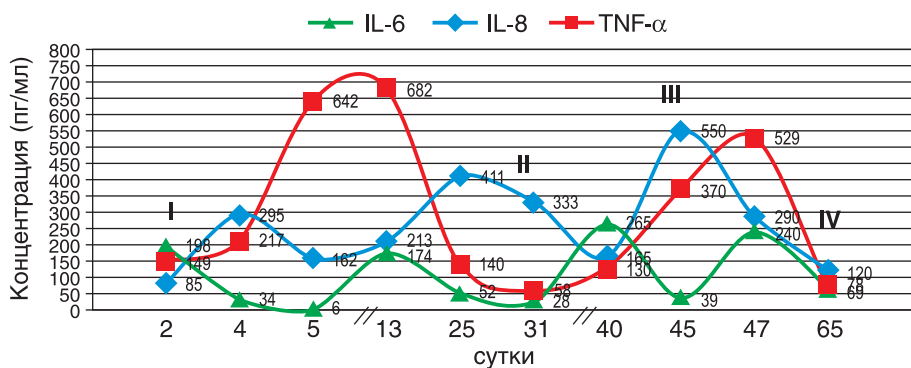


Рис. 7. Динамика цитокиновых параметров в процессе левожелудочкового обхода с помощью насоса «Віорумр» при двухэтапной трансплантации сердца: I – период адаптации, II – развитие «эндокардита системы», III – эпизоды лихорадки и обострения инфекций, IV – замена деталей и удаление системы

На протяжении левожелудочкового обхода отмечался дисбаланс провоспалительных цитокинов. Характер отклонений TNF-α, IL-6 и IL-8 в разные периоды мониторинга имел свои особенности, сопряженные с иммунологическим и клиническим статусом. Так, в 1–2-е сутки (рис. 7, I) после подключения ЛЖО отмечалось повышение уровня IL-6 и IL-8, соответствующее активации нейтрофилов с повышением адгезивных их свойств, а также HLA-DR⁺кл., В-лимфоцитов, ЦИК, характерное для адаптационной реакции.

Нарушением периода реадaptации после ЛЖО можно считать быстрое развитие 2-й фазы СВР, которая проявлялась резким падением количеств

венных показателей клеточного иммунитета (так называемый «иммунный паралич») уже на 4-е сутки после ЛЖО с нарастанием сывороточных уровней TNF- α и IL-6 и сохраняющейся неустойчивой гемодинамикой. Резкий подъем IL-6 уже на 5-е сутки после ЛЖО, сохраняющийся в последующие 7–10 дней, характерен для развития ранней ПОН как результат генерализации СВР, связанной с активацией инфекции, чаще представленной грам-отрицательной флорой без бактериемии.

Эти нарушения являлись сигналом к назначению иммунокорректирующей терапии, направленной на сдерживание выработки провоспалительных цитокинов, и нормализации в первую очередь клеточного иммунитета.

Повышение количества В-лф., IgM, HLA-DR⁺кл., адгезии нейтрофилов с нарастанием сывороточного уровня IL-8 и TNF- α совпадало с появлением на 13–19-е сутки ЛЖО лихорадки неясной этиологии, что было расценено как обострение очагов хронической инфекции (в первую очередь – трахеобронхиты, хронические пневмонии и др.) и требовало детального клинико-иммунологического обследования.

К концу 1-го месяца (рис. 7, II) подключения ЛЖО возрастала опасность так называемого эндокардита систем МПК в результате распространения инфекции по поверхностям магистралей и деталей системы. В этот период помимо усиления антибактериальной терапии необходимо проведение бактериологического и иммунологического мониторинга и иммунокоррекции.

Замена магистралей или нарушения работы деталей системы МПК и возникающие при этом нарушения гемодинамики сопровождались высокими сывороточными уровнями TNF- α и IL-6 (рис. 7, III), клиническими проявлениями инфекции и органной дисфункции. При удалении ЛЖО показатели цитокинов нормализуются (рис. 7, IV).

Таким образом, показано, что цитокины с провоспалительным действием (IL-6, IL-8, TNF- α) при вспомогательном кровообращении являются ключевыми параметрами прогнозирования тяжести осложнений не только в ранние сроки после подключения, но и на протяжении всего периода левожелудочкового обхода насосом «Биопамп» при двухэтапной трансплантации сердца.

Выявлена сопряженность динамики цитокиновых параметров с нарастанием продукции HLA-DR АГ моноцитами (табл. 4), отражающая функциональную активность моноцитарно-макрофагального звена в ответ на инфекцию с формированием очага воспаления и органных дисфункций (1-я фаза СВР). Снижение этих параметров и нарастание уровня «противовоспалительных» цитокинов приводило к иммунодепрессии и клеточной анергии (2-я фаза СВР).

Такие иммунологические показатели, как уровень ЦИК, апоптоза лимфоцитов (CD95⁺кл.), молекул адгезии (CD11b) могут свидетельствовать об активации бактериальной инфекции. При ПОН была выявлена сопряженность Т-клеточной иммунодепрессии с повышением сывороточных уровней IL-6, TNF- α , а также инактивацией моноцитов и снижением Th-рецепции к IL-2. Эти параметры были использованы при иммунологическом обследовании в критические периоды активации инфекции и развития ПОН при вспомогательном кровообращении у больных, ожидающих трансплантацию сердца.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили установить закономерности иммунного реагирования при ВАБК и ЛЖО, отобрать информативные параметры для оценки риска развития и тяжести послеоперационных осложнений, определить оптимальные сроки проведения иммунологического мониторинга и направленность иммуномодулирующей терапии при двухэтапной трансплантации сердца.

Таблица 4

Иммунологические параметры фазы СВР, активации инфекции и развития ПОН

Тип патологии	Иммунологические параметры
Системная воспалительная реакция	IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α Оксидазная активность нейтрофилов Продукция HLA DR АГ моноцитами
Активация инфекции	Th-2, IgM, В-лимфоциты, CD 11b ⁺ кл., >TNF- α →>IL-6
Развитие ПОН	Т-клеточная иммуносупрессия, инаktivация моноцитов, снижение рецепции к IL-2, повышение IL-6, TNF- α

II. Оценка цитокинового статуса у кардиохирургических и трансплантологических больных с клиническими проявлениями полиорганной недостаточности и септических осложнений

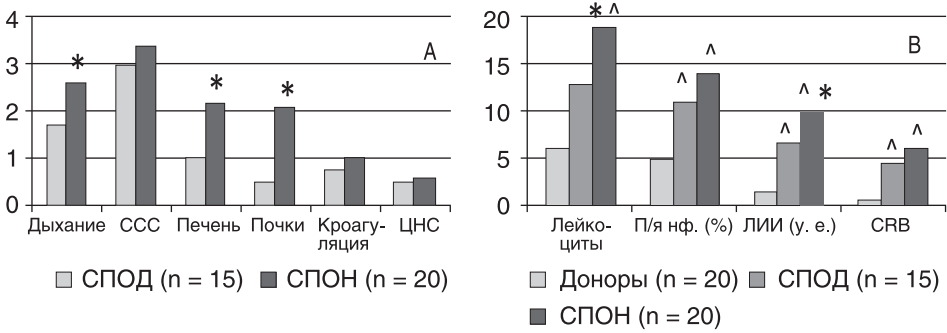
На втором этапе исследована сопряженность между цитокинами иммунной системы и параметрами клинического статуса и обоснована возможность использования цитокинов для прогнозирования послеоперационных осложнений.

2.1. Клинико-иммунологический статус у кардиохирургических и трансплантологических больных с осложненным послеоперационным периодом.

Изучение состояния клинического статуса у 35 кардиохирургических больных с использованием шкалы SOFA (рис. 8А) выявило нарушение функций практически всех основных органых систем, особенно иммунной системы, уже на 1–3-е сутки после операции. Эти нарушения указывали на выраженность проявлений СПОН и сопутствующей ему общей воспалительной реакции, более выраженной при развитии полиорганной недостаточности, чем у больных с органными дисфункциями (рис. 8В).

Суммарный балл по шкале SOFA в группе больных со СПОН был выше ($p < 0,05$), чем в группе СПОД ($11,8 \pm 0,5$ и $7,7 \pm 0,3$ балла соответственно).

Для оценки системного воспаления бактериальной этиологии использовался высокоспецифичный маркер – прокальцитонин (ПКТ). В группе больных со СПОД только в 5% случаев тест на ПКТ был положительным и не превышал 10 нг/мл. У 28% больных группы содержание ПКТ в сыворотке крови было выше 0,5 нг/мл, у 7% – превышало 10 нг/мл, что указывало на развитие инфекционных осложнений в раннем послеоперационном периоде.



* – < 0,05 при межгрупповом сравнении, ^ – p < 0,05 по сравнению с донорами.

Рис. 8. Выраженность полиорганных нарушений (А) и количественные показатели СВР (В) у кардиохирургических больных с осложненным ранним послеоперационным периодом

2.2. Оценка цитокинового статуса и прогностического значения цитокиновых параметров у кардиохирургических больных с осложненным послеоперационным периодом.

Сравнительный анализ содержания цитокинов разных групп у здоровых доноров и кардиохирургических больных с осложненным послеоперационным течением до и после комплексного лечения представлен в табл. 5 и 6.

Таблица 5

Сывороточные уровни про- и противовоспалительных цитокинов у кардиохирургических больных с осложненным послеоперационным периодом до и после комплексной терапии (n = 25)

Осложнения	Провоспалительные цитокины						Противовоспалительные цитокины	
	IL-6 (пг/мл)		IL-8 (пг/мл)		TNF-α (пг/мл)		IL-1Ra (пг/мл)	
	До	После	До	После	До	После	До	После
СПОН (n = 10)	60^ 51–73	55^ 10–188	38^ 34–47	697* ^ 81–2153	1,3^ 0–2,3	4,5*^ 0,4–11	310^ 240–420	168* 150–330
СПОН + сепсис (n = 8)	75^ 62–87	63^ 15–160	108^ 64–139	1343* ^ 89–4366	1,6 1,1–2	5,6* 0,9–6,1	427 ^ 350–570	220* 145–260
СПОН + сепсис + септ. шок (n = 7)	110^ 87–134	310*^ 163–859	118 76–154	1250* 128–2194	2,8 2,4–3,5	4,3 1,5–9,6	1340^ 870–1900	876*^ 485–1150
Доноры (n = 20)	3,3 (2,8–4,5)		1,8 (1,4–2,2)		18 (16–21)		150 (100–250)	

* – p < 0,05 при межгрупповом сравнении, ^ – p < 0,05 по сравнению с донорами.

Комплексная оценка сывороточных уровней 13 основных цитокинов традиционным иммуноферментным анализом (IL-1Ra и G-CSF) и BioPlex-технологией показала, что в отличие от здоровых доноров у больных со СПОН, тяжелым сепсисом и септическим шоком отмечался достоверно более высокий уровень противовоспалительных цитокинов IL-1Ra и IL-10 ($p < 0,05$).

Кроме того, у больных регистрировалось значительное увеличение концентрации мультифункционального цитокина IL-6, который, как известно, на начальных этапах септического процесса вместе с IL-1 β индуцирует острофазный ответ, но в последующем в большей степени проявляет свои противовоспалительные и иммуносупрессорные свойства.

При этом не обнаружено повышение содержания провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α , IL-12). Более того, отмечалось их снижение (средний уровень этих цитокинов находился на нижней границе чувствительности метода).

Таблица 6

Сывороточные уровни регуляторных цитокинов у кардиохирургических больных с осложненным послеоперационным периодом до и после комплексной терапии (n = 25)

Осложнения	Th1-цитокены				Th2-цитокены			
	IL-2 (пг/мл)		IFN- γ (пг/мл)		IL-4 (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)	
	До	После	До	После	До	После	До	После
СПОН (n = 10)	0,5 [^] 0–0,7	6* [^] 0–15	15 [^] 13–17	15 [^] 0–30	5,5 [^] 4–6,5	6 [^] 0–26	8 [^] 7–8,7	2,6* [^] 1–3,5
СПОН + сепсис (n = 8)	0	0	4,8 [^] 4–5,2	2,6* [^] 0–9,4	0	0	8,5 [^] 7,6–9	4,5* 1–15
СПОН + сепсис + септ. шок (n = 7)	0,4 [^] 0–0,8	2,1* [^] 0–11	10,2 [^] 8–12	10,5 [^] 4–13	0,5 [^] 0–1,6	4,4* [^] 0–12	45 [^] 32–57	77* [^] 8–326
Доноры (n = 20)	1,4 (1–16)		23 (13–27)		1,3 (1,1–1,5)		4,3 (3,8–5,1)	

Примечание. «0» – результаты ниже чувствительности BioPlex технологии. * – $p < 0,05$ при межгрупповом сравнении, [^] – $p < 0,05$ по сравнению с донорами.

При анализе сывороточных уровней регуляторных Th1- и Th2-цитокенов (IFN- γ , IL-2 и IL-4, IL-5 соответственно) также выявлено их снижение, т. е. выявленные дисфункции T-клеточного звена при сепсисе являются общими как для Th1- так и Th2-лимфоцитов, а скорее, обусловлены пребыванием их в состоянии анергии.

Содержание в сыворотке крови хемокина IL-8 у больных также достоверно превышало контрольные уровни ($p < 0,05$). Отмечалась сопряженность повышенных уровней противовоспалительных цитокинов (IL-1Ra, IL-6 и IL-10) и хемокина (IL-8) с тяжестью послеоперационных осложнений (СПОН, тяжелый сепсис, септический шок) (SOFA – $11,8 \pm 0,5$, $13,0 \pm 1$, $17,5 \pm 2,1$ балла соответственно).

При септическом шоке до лечения были резко повышены не только уровни противовоспалительных цитокинов, но и TNF- α с одновременным повышением уровня CD95⁺кл., экспрессирующих маркер апоптоза. Отмечалось также нарастание уровня IL-1 β и регуляторного IL-2, что свидетельствовало о цитокиновом дисбалансе с преобладанием иммунодепрессии (коэффициент иммунодепрессии IL-1Ra/TNF- α > 10).

Комплексная оценка уровней 13 основных цитокинов с использованием ИФА и новой современной Bio-Plex-технологии показала, что развитие глубокой иммунодепрессии на фоне снижения функций жизненно важных органов и систем может служить прогнозом развития септических осложнений и подтверждает необходимость включения заместительной иммунотерапии в комплексное лечение кардиохирургических больных после искусственного и вспомогательного кровообращения.

Результаты оценки цитокинового статуса у больных после комплексной терапии (табл. 5 и 6) показали восстановление баланса про- и противовоспалительных цитокинов (коэффициент иммунодепрессии IL-1Ra/TNF- α < 10). Активация функции нейтрофилов с повышением их антигенпрезентирующей способности может запускать активацию Th1, приводя к балансу Th1/Th2. При этом отмечается достоверное повышение ($p < 0,05$) уровней хемокина IL-8 и провоспалительных цитокинов IL-6, IL-1 β , TNF- α , снижающих иммунодепрессию, обусловленную противовоспалительными цитокинами, что расценивалось как благоприятный прогноз. Восстановление цитокинового баланса сопровождалось разрешением синдрома полиорганной недостаточности (сумма баллов по SOFA снижалась с $11,8 \pm 0,5$ до $6,8 \pm 1,9$ балла; $p < 0,05$). У больных с септическим шоком прогноз оставался неблагоприятным.

Таким образом, полученные данные показали, что цитокиновый дисбаланс является одним из ключевых показателей развития и исхода послеоперационных осложнений и подтверждает необходимость разработки нового алгоритма иммунологического мониторинга и повышения его информативности путем включения цитокиновых параметров.

III. Оценка информативности алгоритма комплексного иммунологического мониторинга у кардиохирургических больных при искусственном и вспомогательном кровообращении

При проведении комплексного иммунологического мониторинга были выявлены отклонения количественных и функциональных параметров в разных звеньях иммунной системы, которые могут использоваться для прогнозирования развития и тяжести течения послеоперационных осложнений (рис. 9).

Так, уже в процессе и на раннем этапе после искусственного и вспомогательного кровообращения оправданным являлось определение состояния врожденного и приобретенного иммунитета по соотношению нейтрофилов

и мононуклеаров для оценки истощения адаптационных резервов и анти-микробного потенциала.

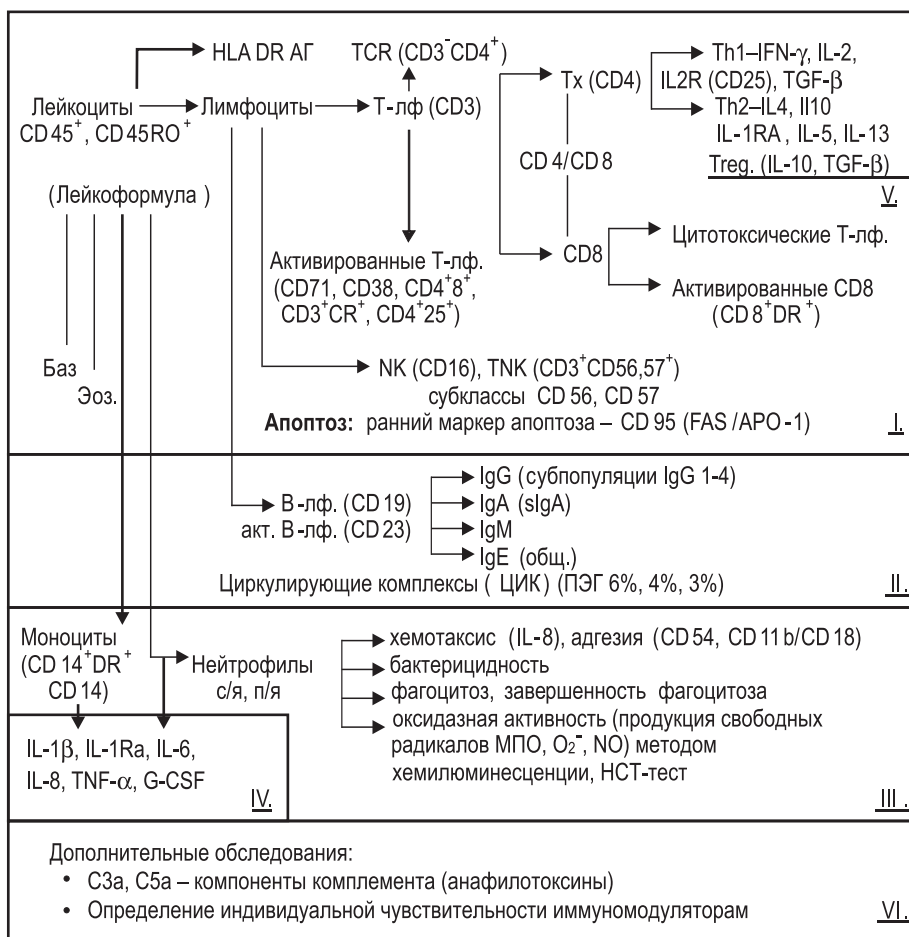


Рис. 9. Схема алгоритма комплексного иммунологического мониторинга: I – клеточный иммунитет, II – гуморальный иммунитет, III – система фагоцитов, IV – про- и противовоспалительные цитокины, V – регуляторные цитокины, VI – дополнительные обследования

Резкая лимфопения в 1-е сутки ($<1200 \times 10^9/\text{л}$) и снижение уровня активированных моноцитов ($\text{CD}14+\text{DR}+ < 30\%$) была сопряжена с развитием инфекционных осложнений на 3–6-е сутки после операции. Перед развитием полиорганной недостаточности наблюдалось снижение иммунорегуляторного индекса ($\text{CD}4+/\text{CD}8+ < 1$, при $n = 2,8-3,0$). Снижение $\text{CD}4+\text{T}$ -хелперов менее 30% приводило к резкому дисбалансу Th1/Th2 иммунного ответа, сопровождающемуся снижением продукции регуляторных цитокинов IL-2 и IFN-γ. Преобладание противовоспалительных цитокинов IL-1Ra,

IL-6, IL-10 усиливало суммарную супрессию иммунного ответа и приводило к цитокиновому дисбалансу, развитию септических осложнений и полиорганной недостаточности. Повышение CD25+кл., экспрессирующих рецептор к IL-2, и пролиферативного ответа лимфоцитов свидетельствовало о нарастании воспалительной реакции, тогда как их снижение было сопряжено с развитием иммунодепрессии и анергии.

Повышение информативности комплексного многокомпонентного исследования иммунной системы с использованием разработанного алгоритма иммунологического мониторинга позволило в одном и том же образце периферической крови одновременно получить данные: 1 – о выраженности адаптационных и компенсаторных реакций и степени интоксикации; 2 – типе и степени вторичной иммунной недостаточности клеточного, гуморального звена и системы фагоцитов; 3 – степени активации параметров разных звеньев иммунитета и антигенпрезентирующих клеток; 4 – состоянии цитотоксического звена иммунитета; 5 – состоятельности антимикробного потенциала; 6 – готовности клеток иммунной системы к апоптозу; 7 – степени оксидазной активности нейтрофилов; 8 – состоянии системы цитокинов; 9 – клеточной анергии и депрессии иммунного ответа; 10 – индивидуальной чувствительности иммунокомпетентных клеток к действию иммуномодуляторов в тестах *in vitro*.

Таким образом, оценка результатов иммунологического мониторинга подтверждает высокую информативность разработанного алгоритма, включающего регуляторные, про- и противовоспалительные цитокины, который позволяет оценить дисфункции иммунной системы, выявляемые как на уровне межклеточных взаимодействий, так и на уровне взаимосвязей между звеньями иммунной системы.

ВЫВОДЫ

1. Исследование цитокинового статуса у больных с нарастающей сердечной недостаточностью в дооперационном периоде позволило выявить наличие функционального типа иммунодефицита, проявляющегося: дисбалансом цитокинов с про-, противовоспалительным и регуляторным действием, преобладанием повышенных уровней IL-1 β , IL-8, G-CSF и IL-2 у 26, 28, 54, и 80% больных соответственно, а также компенсаторным нарастанием IL-1Ra – эндогенного регулятора воспаления.
2. В процессе искусственного кровообращения и в раннем послеоперационном периоде выявлены основные варианты цитокиновых реакций, определяющих тип органных дисфункций, характер и выраженность которых зависят от тяжести дооперационного иммунодефицита и исходной степени сердечной недостаточности. Подтверждена двухфазная динамика развития системной воспалительной реакции после искусственного кровообращения: повышение уровней провоспалительных цитокинов в первой фазе и сменой их на противовоспалительные цитоки-

ны с развитием иммунодепрессии и клеточной анергии во второй фазе, а также ключевая роль IL-1Ra в сдерживании гиперактивации системной воспалительной реакции на протяжении искусственного кровообращения и в раннем послеоперационном периоде.

3. Наиболее информативными цитокиновыми параметрами в условиях вспомогательного кровообращения при двухэтапной трансплантации сердца являются IL-6, IL-8, TNF- α , которые в сочетании с клеточными показателями иммунной системы позволили выявить прогностически значимые периоды для проведения иммунологического мониторинга, контроля за выраженностью компенсаторных реакций и прогнозирования послеоперационных осложнений.
4. Выявленная сопряженность между цитокинами иммунной системы (IL-1Ra, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α) и параметрами клинического статуса кардиохирургических и трансплантологических больных является основанием для использования цитокиновых параметров в прогнозировании послеоперационных осложнений и тяжести их течения.
5. Усовершенствован алгоритм иммунологического мониторинга путем применения сочетанной оценки фенотипического состава клеточных (апоптоз, иммунорегуляторные субпопуляции лимфоцитов), фагоцитарных (моноциты, оксидазная активность нейтрофилов) показателей иммунитета и цитокиновых параметров (IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α), отражающих взаимосвязь между отдельными звеньями иммунной системы.
6. Проведение комплексного иммунологического мониторинга с использованием усовершенствованного алгоритма позволило повысить его информативность в прогнозировании послеоперационных осложнений при искусственном и вспомогательном кровообращении у кардиологических и трансплантологических больных.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Начинать иммунологический мониторинг у больных с нарастающей сердечной недостаточностью следует уже на этапе предоперационной подготовки для раннего выявления цитокинового дисбаланса, предопределяющего развитие послеоперационных осложнений.

У кардиохирургических и трансплантологических больных, оперированных в условиях искусственного и вспомогательного кровообращения, прогнозирование тяжести и контроль за разрешением послеоперационных осложнений рекомендуется проводить с использованием разработанного алгоритма иммунологического мониторинга, включающего сочетанную оценку цитокинового дисбаланса и нарушений параметров клеточного звена иммунитета, характеризующих апоптоз и иммунорегуляцию / иммуносупрессию.

Выявление цитокинового дисбаланса наряду с тяжелыми клеточными дисфункциями иммунной системы является показанием к проведению им-

мунокорректирующей терапии, основанной на индивидуальном подборе иммуномодуляторов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Сускова В.С., Шальнев Б.И., Шумаков Д.В., Сусков С.И. и др.* Иммунологический мониторинг для прогнозирования и лечения инфекционных осложнений при вспомогательном и искусственном кровообращении // Мед. иммунология. – 2000. – Т. 2. – № 2. – С. 198–199.
2. *Хитрик Н.М., Тельнюк Я.И., Сусков С.И. и др.* Критерии прогнозирования инфекционных осложнений у кардиохирургических больных // Мед. иммунология. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 164.
3. *Tolpekin V.E., Suskova V.S., Shumakov D.V., Suskov S.I. et al.* Intraaortic contrpulsation balloon pump (IABP) in elderly patients. (clinic-immunological aspects), XXXI Congress ESAO, Warshaw, Poland, 2004. – P. 97.
4. *Сускова В.С., Ермакова Л.П., Сусков С.И. и др.* Обоснование показаний к иммунокоррекции у больных ИБС старшего возраста при баллонной контрпульсации, 2005 // III Всероссийский съезд по трансплантологии и искусственным органам, Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 48.
5. *Shumakov V.I., Suskova V.S., Tolpekin V.E., Suskov S.I. et al.* Immunocorrection during intraaortic contrpulsation balloon pump (IABP) application in elderly patients with ischemic heart disease // 2005, Italy, 11 th European Congress on extracorporeal circulation technology. – P. 57.
6. *Ермакова Л.П., Сускова В.С., Шумаков Д.В., Сусков С.И. и др.* Влияние превентивной баллонной контрпульсации на развитие СВР и противoinфекционный потенциал у кардиохирургических больных // XI Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов, Бюл. НЦССХ. – 2006. – Т. 3. – С. 273.
7. *Шумаков В.И., Сускова В.С., Емец В.И., Ермакова Л.П., Сусков С.И. и др.* Тактика иммунодиагностики и иммунокоррекции на разных этапах лечения больных при операциях на сердце // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2006. – № 4. – С. 55–61.
8. *Matveev Yu.G., Suskova V.S., Suskov S.I. et al.* Cardiopulmonary bypass with leukocyte filter: reduction in the systemic inflammatory response syndrome // 7-th Symposium of World artificial organ, immunology and Transplantation society (Waits). Russia., St.-Petersburg. – 2006. – P. 59–60.
9. *Shumakov V.I., Suskova V.S., Tolpekin V.E., Suskov S.I. et al.* Clinico-Immunological Aspects of Intraaortic Contrpulsation (IABP) Application Elderly Patients With Ischemic Heart Disease // 7-th Symposium of World artificial organ, immunology and Transplantation society (Waits). Russia., St.-Petersburg. – 2006. – P. 95–96.
10. *Козлова М.Н., Попцов В.Н., Сускова В.С., Лютов А.Г., Шумаков Д.В., Сусков С.И. и др.* Клинико-иммунологическое обоснование применения внутривенного иммуноглобулина G-Габриглобин у больных с синдромом полиорган-

- ной недостаточности после операций с искусственным кровообращением // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2008. – № 6 (44). – С. 34–39.
11. *Сускова В.С., Емец В.И., Ермакова Л.П., Сусков С.И., Козлова М.Н.* Оценка индивидуальной чувствительности иммуномодуляторов у кардиохирургических больных при осложненном послеоперационном периоде // Объединенный иммунологический форум, 2008. Российский иммунологический журнал. – 2008. – Т. 2 (11). – № 2–3. – С. 319.
 12. *Сускова В.С., Быстрых О.А., Емец В.И., Сусков С.И., Ермакова Л.П., Козлова М.Н.* Сопряженность развития послеоперационных осложнений с иммунной недостаточностью у кардиохирургических больных // Национальная конференция «Аллергология и клиническая иммунология – междисциплинарные проблемы», Москва, 2008, Российский аллергологический журнал. Прилож. 1, Материалы конференции. – М., 2008. – № 1. – С. 287–288.
 13. *Сускова В.С., Емец В.И., Ермакова Л.П., Козлова М.Н., Сусков С.И., Попцов В.Н., Шумаков Д.В., Семеновский М.Л., Казаков Э.Н.* Ранняя диагностика иммунных нарушений и их коррекция в лечении полиорганной недостаточности и септических осложнений после операций с искусственным и вспомогательным кровообращением // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т. 9. – № 7. – С. 57–64.
 14. *Сусков С.И., Ермакова Л.П., Козлова М.Н., Сускова В.С., Шумаков Д.В., Попцов В.Н.* Фагоцитарно-цитокиновый мониторинг в раннем периоде после ОТТС для контроля за развитием септических осложнений // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – Т. 11, прилож. – С. 105–106.
 15. *Сускова В.С., Шемакин С.Ю., Сусков С.И., Ермакова Л.П., Кормер А.Я., Шумаков Д.В., Пестрецова Т.В.* Состояние иммунной системы при вспомогательном кровообращении с помощью системы искусственных желудочков сердца «ЕХСОР» в период ожидания трансплантации сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12. – С. 181–182.
 16. *Сусков С.И., Шумаков Д.В., Сускова В.С., Ермакова Л.П., Попцов В.Н., Кормер А.Я., Шемакин С.Ю., Пестрецова Т.В.* Оптимизация клинико-иммунологического мониторинга для прогнозирования послеоперационных осложнений при трансплантации сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – Т. 12. – С. 183–184.

Тимербаев Артем Владимирович

РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО СЕТЧАТОГО ЭНДОПРОТЕЗА ДЛЯ ЭКСТРАКАРДИАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЦА

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Научный руководитель

Доктор медицинских наук

Сергей Николаевич Шурыгин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Многие заболевания, такие, как ишемическая кардиомиопатия, дилатационная идиопатическая кардиомиопатия, клапанная, метаболическая и воспалительная патологии могут приводить к развитию хронической сердечной недостаточности. Конечным итогом этих процессов является ремоделирование сердца, проявляющееся гибелью кардиомиоцитов, дилатацией полостей и снижением насосной функции. «Золотым стандартом» лечения пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности на сегодняшний день является трансплантация сердца. Однако этот метод лечения пока не может получить достаточно широкого распространения из-за дефицита донорских органов и весьма значительных затрат, связанных с обеспечением самой операции и послеоперационного периода.

На протяжении последних десятилетий с целью улучшения функции сердца и обратного моделирования левого желудочка были предложены несколько хирургических методик (Ильинский И.М., 2001; Шумаков В.И. и соавт., 2003; Шумаков В.И. и соавт., 1990). К ним относятся парциальная вентрикулэктомия левого желудочка (операция Batista), динамическая кардиомиопластика (миовентрикулопластика), методы вспомогательного кровообращения и протезирование митрального клапана для уменьшения митральной регургитации.

Опыт применения данных методик дал толчок развитию нового поколения приспособлений, направленных на предотвращение прогрессивной дилатации и восстановление формы левого желудочка путем пассивного механического сдерживания его слабости, адинамической кардиомиопластики (Labrousse L. et al., 2007; Livi U. et al., 2005). Одним из немногих подобных приспособлений является экстракардиальный сетчатый каркас «CorCar» американской компании «Acorn Cardiovascular, St. Paul, MN», изготовленный из полиэтилена терефталата. Экспериментальные и клинические испытания по имплантации экстракардиального сетчатого каркаса «CorCar» показали отсутствие констриктивного процесса и хорошие отдаленные результаты. На сегодняшний день экстракардиальный каркас «CorCar» до сих пор проходит этап клинических исследований. Тем не менее экстракардиальное моделирование сердца остается одним из перспективных направлений органосохраняющих методов лечения заболеваний сердца с синдромом застойной сердечной недостаточности (Sabbah H.N., 2005).

В РНЦХ РАМН им. акад. Б.В. Петровского группой ученых во главе с акад. Б.А. Константиновым и д. м. н. А.В. Коротеевым был разработан и применен в клинике экстракардиальный сетчатый каркас, изготовленный из протеза Gelweave («Vascutek», Великобритания). Имплантация данного экстракардиального сетчатого каркаса позволила увеличить продолжительность жизни больных, улучшить их функциональное состояние более чем на один класс по классификации сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации, предотвратить прогрессирование дилатации сердца, повысить насосную функцию левого желудочка (Константинов Б.А. и соавт., 2006; Коротеев А.В. и соавт., 2008). Однако необходимо отметить, что методика изготовления вышеуказанного эндопротеза является достаточно трудоемкой и не получила пока широкого распространения. Поэтому исследования, направленные на создание новых видов эндопротезов, еще длительное время будут актуальны.

Цель исследования

Разработать новый сетчатый эндопротез для экстракардиального моделирования сердца и провести его испытания в эксперименте.

Задачи исследования

Создать сетчатый эндопротез для экстракардиального моделирования сердца.

Разработать и применить в эксперименте методику операции по имплантации данного экстракардиального эндопротеза на сердце животных.

Провести прижизненную оценку влияния вновь образованной в зоне имплантации соединительной ткани на сократительную функцию миокарда.

Определить площадь спаечного процесса в зоне имплантации эндопротеза при использовании различных вариантов его покрытия («Фторэкс» и «ЭластоПОБ»[®]) и провести сравнительную оценку морфологических характеристик вновь образованной соединительной ткани в различные сроки с момента имплантации.

Научная новизна

Впервые в отечественной практике создан по принципу вязания основы сетчатый эндопротез для экстракардиального моделирования сердца. Разработана и успешно апробирована в эксперименте методика имплантации данного экстракардиального эндопротеза на лабораторных животных.

Проведена прижизненная оценка сократительной функции миокарда экспериментальных животных и подтверждено отсутствие негативного влияния эндопротеза и вновь образованной в зоне имплантации соединительной ткани на систолическую и диастолическую функцию сердца.

Доказано, что лавсановые эндопротезы обладают биологической совместимостью с организмом экспериментального животного. Об этом свидетельствуют отсутствие послеоперационных осложнений, миграции и смещения эндопротезов из зон фиксации, а также образование зрелой соединительной ткани, прорастающей в структуру эндопротеза.

Доказано, что при использовании эндопротезов, покрытых биodeградируемой мембраной «ЭластоПОБ»[®], распространенность спаечного процесса в полости перикарда статистически достоверно меньше.

Практическая значимость

В результате проведенной работы получены данные, подтверждающие возможность дальнейшего использования разработанных эндопротезов в клинических условиях.

Положения, выносимые на защиту

Созданный по принципу вязания основы сетчатый экстракардиальный эндопротез по своим структурно-механическим характеристикам соответствует основным медико-техническим требованиям, предъявляемым к имплантируемым синтетическим материалам.

Разработанная методика имплантации сетчатого эндопротеза в эксперименте позволяет максимально эффективно моделировать эндопротез и минимизировать интраоперационную травму.

Лавсановый эндопротез является биосовместимым медицинским изделием, способствующим образованию соединительно-тканного каркаса в зоне имплантации, не оказывающего негативного влияния на сократительную функцию сердца.

Применение в качестве покрытия эндопротеза биodeградируемой мембраны «ЭластоПОБ»[®] значительно уменьшает распространенность спаечного процесса в зоне имплантации синтетического материала.

Апробация работы

Апробация работы состоялась 25 марта 2010 года на заседании научной конференции клинических и лабораторных подразделений ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва.

Материалы работы доложены и обсуждены на XIV ежегодной сессии Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых, г. Москва, 2010 г.

Публикации

По теме проведенного исследования опубликованы 6 работ в виде статей и тезисов в журналах и сборниках конференций, из них 2 работы в журнале, рекомендованном ВАК Минобразования РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, состоит из списка сокращений, введения, 3 глав, заключения, выводов, списка литературы. Работа содержит 38 рисунков, 20 таблиц. Список литературы включает 102 источника, из них 31 отечественных и 71 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа основана на сравнительном анализе результатов экспериментального изучения нового сетчатого эндопротеза, выполненного по принципу вязания основы и обработанного различными вариантами композитного покрытия. В качестве искусственных материалов для изготовления эндопротеза были использованы сетки, выполненные на основе полиэфирных нитей: «Линтекс-Эслан» и «Линтекс-Фторэкс», г. Санкт-Петербург.

Оценка механических свойств новых эндопротезов

Разработанные эндопротезы как текстильные изделия были подвергнуты стандартным и нестандартным исследованиям механических свойств. Стандартные исследования регламентировались соответствующими ГОСТами и включали: определение геометрических размеров (ГОСТ 12023-86 (СТ СЭВ 997-88)); разрывной нагрузки и разрывного удлинения при одноосном растяжении (ГОСТ 8847-85); разрывной нагрузки и разрывного удлинения при двуосном растяжении (ГОСТ 8847-85); поверхностной плотности (ГОСТ 8846-87). Нестандартные исследования для текстильных изделий включали: изучение размера ячеек; жесткости; объемной пористости; толщины сетки. Стандартные исследования проводились на маятниковой разрывной машине РТ-250. Нестандартные исследования прово-

дились при помощи компьютерной системы с микроскопом и цифровой фотокамерой AXIOSKOP 40. Для обработки полученных данных использовалась программа «ВидеоТест – Морфология 5.0». Жесткость изделия оценивали с помощью прибора ИЖ-3.

В отделе по исследованию биоматериалов ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, возглавляемом д. б. н., профессором В.И. Севастьяновым, с целью улучшения свойств биосовместимости часть новых сетчатых эндопротезов «Эслан» была покрыта биополимерной мембраной «ЭластоПОБ»[®], которая изготавливалась в лабораторных условиях в виде 1% раствора на метилен хлориде. Обработку эндопротеза «Эслан» осуществляли путем его погружения с целью пропитывания в соответствующий раствор основы – биodeградируемой мембраны «ЭластоПОБ»[®] с последующим высушиванием на воздухе, досушиванием при 50 °С в течение 2 часов и вакуумированием в течение 5 часов при комнатной температуре. Полученные материалы упаковывали и стерилизовали γ -излучением (доза 2,5 Мрад).

Экспериментальное исследование новых эндопротезов производили на 20 беспородных собаках разного пола, возрастом 4–5 лет, средний вес которых составил $20 \pm 1,5$ кг. Животные были распределены на три группы: в первой группе 6 особям был имплантирован сетчатый эндопротез «Эслан» сроком на 20 и 30 суток. Во второй группе 6 животным был имплантирован сетчатый композитный эндопротез «Фторэкс» сроком на 20 и 30 суток. Третью группу составили 8 животных, которым был имплантирован сетчатый композитный эндопротез «Эслан + ЭластоПОБ»[®] сроком на 20, 30 и 60 суток (на 20 суток – трем собакам, на 30 суток – трем собакам, на 60 суток – двум собакам).

Описание эксперимента

Исследование было проведено на базе экспериментального корпуса ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ и выполнялось сотрудниками лаборатории подготовки и проведения экспериментальных исследований, возглавляемой д. б. н. Э.К. Гасановым. Перед проведением операции животные были обследованы и подвергнуты 21-дневному карантину. До операции и в послеоперационном периоде животных содержали на стандартной лабораторной пище с использованием витаминов и минеральных добавок при неограниченном количестве воды. Накануне операции собак обследовали по принятой в экспериментальной лаборатории методике: определяли вес животного; проводили аускультацию сердца и легких; измеряли объем грудной клетки; определяли частоту пульса и дыхания. Полученные данные служили для расчета необходимого дыхательного объема при управляемом дыхании во время операции. В течение суток перед операцией собак выдерживали на голодной диете и в течение 6 часов не давали жидкости. В день операции для понижения возбудимости вегетативной нервной системы и в целях предупреждения

развития патологических рефлексов, связанных с выполняемой операцией и наркозом, проводилась специальная фармакологическая подготовка животных. Через 20–30 минут после премедикации животные успокаивались и их доставляли в операционную, где после проведения эхокардиографического исследования производили индукцию в наркоз.

После наступления состояния каталепсии внутривенно вводили 0,2% раствор тиопентала натрия до исчезновения корнеальных рефлексов и сужения зрачков. Интубацию трахеи проводили эндотрахеальными трубками Euromedical 9,0–10,0 без использования ларингоскопа с помощью вязок. Поддержание наркоза осуществлялось тиопенталом натрия в дозе 13,0–26,0 мг/кг в/в, миоплегия поддерживалась листеноном – 1 мг/кг веса в/в. Вентиляцию легких проводили с помощью аппарата РО-9Н по полузакрытому контуру с дыхательным объемом 0,7 л и минутной вентиляцией 7–9 л/мин. Давление на вдохе в течение всей операции поддерживалось положительным на уровне 20–30 см водного столба.

Выполнялась операция экстракардиальной имплантации стерильных сетчатых эндопротезов. После завершения операции животные экстубировались на операционном столе. До операции и через 4 часа после нее профилактически назначался антибиотик линкомицин 0,7 г в/м, далее – один раз в день в течение 10 дней. Аналгезию в послеоперационном периоде проводили нестероидными противовоспалительными средствами (римадил) – 4 мг/кг веса в/в. Дренажи из полости перикарда и переднего средостения удалялись через 2 часа после окончания хирургического вмешательства.

Животных выводили из эксперимента на 20, 30 и 60-е сутки с момента имплантации сетчатого эндопротеза. Премедикация и общая анестезия проводились по стандартной методике. После выполнения левосторонней торакотомии в 4-м межреберье визуально оценивалось сердце с имплантированным эндопротезом (миграция или смещение эндопротеза, количество и локализация спаек между эндопротезом и перикардом). Затем сердце извлекалось для макро- и микроскопического исследования.

Эхокардиографическое исследование

С целью оценки влияния эндопротеза и вновь образованной соединительной ткани на сократительную функцию левого желудочка проводилось эхокардиографическое исследование сердец лабораторных животных накануне имплантации и перед выводом их из эксперимента на 20, 30 и 60-е сутки. Исследование проводилось сотрудниками отделения лучевой диагностики и рентгенохирургических методов лечения ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, возглавляемого д. м. н., проф. В.В. Честухиным, на ультразвуковом аппарате SonoSite-180 PLUS (USA) с использованием одномерного (М), двухмерного (2D) режимов сканирования, цветного доплеровского картирования кровотока, импульсной и непрерывно-волновой доплерографии.

Систолическая функция левого желудочка оценивалась по фракции выброса. Измерялись основные параметры левого желудочка: конечно-систолический размер, конечно-диастолический размер. Фракция выброса, конечно-систолический объем и конечно-диастолический объем левого желудочка рассчитывались по методу Teicholz.

Диастолическую функцию левого желудочка оценивали по результатам исследования трансмитрального диастолического кровотока в импульсном доплеровском режиме. Определяли: 1) максимальную скорость раннего пика диастолического наполнения (Peak E), 2) максимальную скорость трансмитрального кровотока во время систолы левого предсердия (Peak A), 3) отношение максимальных скоростей раннего и позднего наполнения (Peak E/Peak A).

Оценка показателей центральной гемодинамики

С целью изучения влияния экстракардиальной имплантации сетчатого эндопротеза на центральную гемодинамику экспериментальных животных проводилось мониторинговое наблюдение за ее основными показателями. Интраоперационный мониторинг включал: постоянный контроль за ЭКГ во II стандартном отведении, измерение частоты сердечных сокращений, инвазивного артериального давления в бедренной артерии, давления в правом предсердии, давления в легочной артерии и давления заклинивания легочной артерии с помощью катетера Свана–Ганца. Сердечный выброс измеряли методом термодилуции. При этом использовали монитор V. Braun (Germany). Остальные показатели центральной гемодинамики рассчитывали в автоматическом режиме. Катетер Свана–Ганца устанавливали в легочную артерию через левую наружную яремную вену.

Макроскопическая оценка сердца

Макроскопическая оценка сердца выполнялась после повторной торакотомии при выводе животных из эксперимента. Обращалось внимание на расположение сетчатого эндопротеза относительно сердца, наличие спаек и их локализация, наличие жидкости в полости перикарда.

Суммарная площадь спаечного процесса между сетчатым эндопротезом, имплантированным на сердце, и перикардом определялась следующим путем: зона спаечного процесса окрашивалась раствором бриллиантового зеленого, затем делались отпечатки на миллиметровой бумаге с последующим подсчитыванием их суммарной площади.

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование проводилось в отделении клинической патологии ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, возглавляемом д. м. н, профессором И.М. Ильинским. Из каждого сердца из базальной, средней и верхушечной части ЛЖ были получены поперечные срезы толщиной 3 мм. Образцы фиксировались в 10%

растворе формалина и заливались в парафин по стандартной методике. Исследовали 20 макропрепаратов, из которых сделали 252 серийных среза толщиной 5–6 микрон. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином по Массону, и выполнялась ШИФ-реакция. Исследование проводилось с помощью световой микроскопии.

Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных выполнялся с использованием пакета программ Statistica 6.1 (StatSoft, Inc., США) применительно к малым выборкам. Описательная статистика количественных признаков представлена средними и средне-квадратическими отклонениями (в формате $M \pm s$; в случае нормальных распределений) либо медианами и квантилями (в формате $Me [Q_1; Q_3]$). Для проверки гипотезы о виде распределения применялся критерий Шапиро–Уилка.

Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами. Для сравнения несвязанных групп по количественным и порядковым признакам применялся тест Манна–Уитни, для сравнения связанных групп (анализа признаков в динамике) – тест Вилкоксона и дисперсионный анализ по Фридмену. Сравнение несвязанных групп по качественным признакам проводилось с использованием теста Хи-квадрат. При проверке гипотез результаты считались статистически значимыми при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка эндопротеза и результаты исследования его механических свойств

Нами совместно с сотрудниками ООО «ЛИНТЕКС» (г. Санкт-Петербург) был разработан новый сетчатый эндопротез, форма которого максимально приближена к сердцу. Протез изготовлен в виде мешка на основе полиэфирных (лавсановых) нитей по принципу вязания основы (рис. 1). С учетом тщательного подбора животных в эксперименте использовался эндопротез размером 120×100 мм.

Стеновые испытания показали, что разрывная нагрузка при одноосном растяжении в направлении петельного ряда для эндопротезов «Эслан» и «Фторэкс» составила 128Н и 121Н, в направлении петельного столбика – 48Н и 45Н, а разрывная нагрузка при многоосном растяжении – 90Н и 92Н. Эти данные свидетельствуют о достаточной прочности эндопротезов, удовлетворяющей ГОСТ 8847-85.

Исследование разрывного удлинения эндопротезов «Эслан» и «Фторэкс» при одноосном и многоосном растяжении продемонстрировало достаточную их эластичность. Причем удлинение при одноосном растяжении в направлении петельного столбика у эндопротезов было больше (83 и 80%),

чем удлинение в направлении петельного ряда (71 и 69% соответственно). Это говорит о незначительно большей растяжимости эндопротеза в вертикальном направлении в сравнении с поперечным. При многоосном растяжении эндопротезов «Эслан» и «Фторэкс» удлинение составило 87 и 91% соответственно. Все исследованные показатели соответствуют ГОСТ 8847-85.

Данные исследования жесткости на изгиб эндопротезов «Эслан» и «Фторэкс» в направлениях петельного столбика ($7,9 E \cdot J$, сН·мм² и $14,8 E \cdot J$, сН·мм²) и петельного ряда ($12,9 E \cdot J$, сН·мм² и $18,9 E \cdot J$, сН·мм²) свидетельствуют о достаточной эластичности эндопротезов.

Следует отметить, что поверхностная плотность протезов «Эслан» – 37,8 г/м² и «Фторэкс» – 43,7 г/м² подтверждает их низкую материалоемкость, т. е. изделия являются «облегченными» с минимальным объемом синтетического материала, помещаемого в живые ткани. Это позволяет снизить вероятность развития таких имплантат-ассоциированных осложнений, как образование сером, эрозий (проявления воспалительного процесса), нагноений (инфекционных осложнений) и т. д. Следует подчеркнуть, что показатели поверхностной плотности данных эндопротезов соответствуют ГОСТ 8846-87.

Размер ячейки эндопротезов «Эслан» и «Фторэкс» – 5,3 и 4,8 мм², их объемная пористость – 89 и 88% соответственно – характерны для крупноячеистых и макропористых изделий, что облегчает условия для проникновения макрофагов, фибробластов, белковоподобных веществ в структуру синтетического полимера и способствует снижению риска хронического инфицирования. Одновременно с этим уменьшается время и улучшается качество вживления протезов в организм, повышается скорость последующего формирования зрелой соединительной ткани. Оптимальные поверхностная плотность, размер ячейки и объемная пористость данных эндопротезов создают условия для их хорошей биосовместимости и биорезистентности.

Данные лабораторных исследований подтверждают, что новые экстракардиальные эндопротезы «Эслан» и «Фторэкс» изготовлены из биологически инертных лавсановых нитей, обладают оптимальными структурно-механическими и биологическими характеристиками и соответствуют основным медико-техническим требованиям, предъявляемым к подобного рода изделиям (ГОСТ 8847-85, ГОСТ 8846-87).

Образцы сетчатого эндопротеза «Эслан», покрытые в отделе по исследованию биоматериалов ФГУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ биodeградируемым материалом «Эласто-ПОБ»[®], визуально практически не отлича-

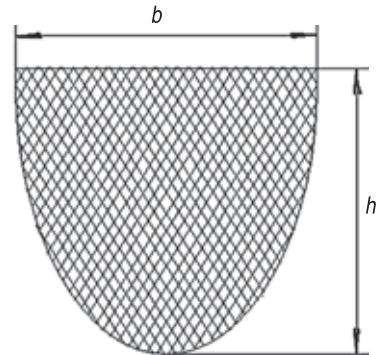


Рис. 1. Сетчатый эндопротез

лись от стандартных лавсановых сеток. Только под микроскопом было видно, что каждый филамент сетки находился внутри «муфты» из биодegradуемого материала «ЭластоПОБ»®. Предполагаемые преимущества нового композитного эндопротеза основываются на сочетании высокой прочности и эластичности лавсанового армирующего каркаса, которые сохраняются в течение всей дальнейшей жизни реципиента, и исключительной биосовместимости покрытия из «ЭластоПОБ»®. Подобная композиция своим присутствием «маскирует» синтетический материал, тем самым позволяя минимизировать ответ организма на операционную и антигенную агрессию.

Результаты экспериментальных операций

Одной из задач исследования была разработка и внедрение в экспериментальную практику операции имплантации сетчатого эндопротеза на сердца животных. Сотрудниками экспериментальной лаборатории были разработаны и впоследствии выполнены 20 подобных операций.

В ходе эксперимента подопытным животным проводилась левосторонняя торакотомия в 4-м межреберье, вскрытие перикарда и ревизия сердца. При помощи линейки измерялся вертикальный размер сердца (от верхушки сердца до атриовентрикулярной борозды). В соответствии с измеренным вертикальным размером сердца в каждом отдельном случае выполнялось моделирование и адаптация эндопротеза путем обрезания излишка ткани хирургическими ножницами по основанию эндопротеза. При моделировании сетчатых эндопротезов с помощью хирургических ножниц распускания, осыпания или разделения полиэфирной комплексной нити на отдельные филаменты не наблюдалось.

На работающем сердце без подключения аппарата искусственного кровообращения осуществлялась экстракардиальная имплантация стерильных сетчатых эндопротезов путем дозированного выведения сердца в рану и натягивания эндопротеза на сердце от верхушки по типу чулка.

Эндопротезы фиксировались несколькими узловыми швами нитью «Surgipro 4/0»: 4–6 узлов по атриовентрикулярной борозде с захватом эндопротеза по периметру, и один – узловой в области бессосудистого участка миокарда верхушки сердца. Течение послеоперационного периода было гладким, каких-либо послеоперационных осложнений, связанных с имплантацией лавсановых эндопротезов, выявлено не было.

Интраоперационные исследования центральной гемодинамики при помощи катетера Свана–Ганса показали, что у всех животных на первоначальных этапах операции до момента имплантации эндопротеза показатели гемодинамики были стабильными и в нормальных пределах. Обращали внимание характерные для данного вида экспериментальных животных тахикардия и умеренная артериальная гипертензия. В период имплантации эндопротеза регистрировались достоверное снижение среднего артериального давления и сердечного выброса (табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследования показателей центральной гемодинамики животных в период имплантации эндопротеза, n = 20, (mean + Std. Dev.)

Показатель ЦГ	1-й этап	2-й этап	3-й этап
АДср (мм рт. ст.)	103,6 ± 3,2	89,5 ± 3,7*	102,1 ± 3,3
ЧСС (уд. мин)	150,3 ± 5,6	164,3 ± 5,8	148,8 ± 6,3
ДЛАСр (мм рт. ст.)	9,6 ± 1,8	12,1 ± 1,9	10 ± 1,7
ДЗЛА (мм рт. ст.)	4,3 ± 1,0	5,6 ± 1,0	4,5 ± 1,0
ОПСС (дин*с/(см5*м2))	2459,3 ± 82,2	2573 ± 155,1	2461,1 ± 117,1
ЛСС (дин*с/(см5*м2))	104,3 ± 45,8	185 ± 70,5*	109,6 ± 46,0
СВ (л/м)	3,2 ± 0,1	2,6 ± 0,1*	3,1 ± 0,1
ДПП (мм рт. ст.)	4,8 ± 0,4	5 ± 0,6	4,8 ± 0,4

*p < 0,05.

Причиной изменений данных показателей центральной гемодинамики являлось выведение сердца в рану, его «вертикализация», что сопровождалось снижением кровенаполнения камер сердца и падением сердечного выброса. Возвращение сердца в рану приводило к приближению данных показателей к исходным значениям. Эпизоды гемодинамической нестабильности удовлетворительно переносились животными, не требовали назначения симпатомиметиков или дополнительной инфузионной терапии.

Данные эхокардиографии

Сравнительная прижизненная эхокардиографическая оценка (на 20-е и 30-е сутки эксперимента, для композитного эндопротеза «Эслан+ЭластоПОБ»[®] дополнительно на 60-е сутки) показала отсутствие влияния исследуемого сетчатого эндопротеза и вновь образованной соединительной ткани на сократительную функцию левого желудочка. Так, ни в одном случае не было обнаружено следов жидкости в полости перикарда животных. Размеры левого желудочка практически не изменялись (конечно-систолический размер 4,1 ± 0,3 см против 3,9 ± 0,3 см, конечно-диастолический размер 5,3 ± 0,2 против 5,2 ± 0,1 см). Имплантация эндопротезов не оказала значительного влияния на систолическую функцию левого желудочка: фракция выброса статистически значимо не изменялась (35 ± 1 против 35,6 ± 2,5%). Не было существенной динамики Peak E (51,6 ± 5,8 против 49 ± 4,3 см/сек) и Peak A (23,6 ± 3,0 против 24,3 ± 2,0 см/сек) и их соотношения PE/PA (2,1 ± 0,2 против 2,0 ± 0,2), что свидетельствовало об отсутствии серьезного влияния эндопротезов на диастолическую функцию левого желудочка.

Результаты макроскопического исследования

При выводе животных из эксперимента на разные сроки после имплантации на сердце сетчатых эндопротезов визуально у всех эксперименталь-

ных животных не было обнаружено признаков их миграции относительно первоначального расположения. Также не было выявлено жидкости в полости перикарда. Во всех случаях отмечались множественные спайки между имплантированным эндопротезом и перикардом, локализовавшиеся преимущественно в области верхушки левого желудочка сердца. Средняя суммарная площадь спаек зависела от вида сетчатого эндопротеза и сроков вывода животных из эксперимента. При визуальном осмотре сердец во всех случаях была выявлена инкапсуляция эндопротезов, предположительно соединительной тканью, желто-розового цвета.

Площадь спаечного процесса между эндопротезом и листками перикарда в случаях использования сетчатого эндопротеза с композитным покрытием «ЭластоПОБ»[®] в сравнении с эндопротезами «Фторэкс» и «Эслан» была достоверно меньше (площадь спаечного процесса на 30-е сутки после имплантации композитного эндопротеза «Эслан + ЭластоПОБ»[®] – $421,3 \pm 103,1$ мм², «Фторэкс» – $1038 \pm 76,7$ мм², «Эслан» – $1467,6 \pm 200,9$ мм², (mean + Std. Dev.) (p < 0,05)) (рис. 2).

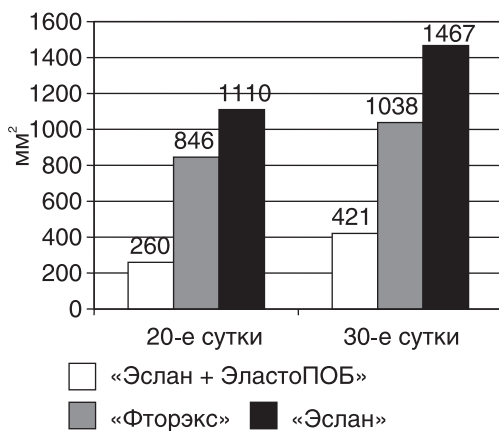


Рис. 2. Площадь спаечного процесса на 20-е и 30-е сутки после имплантации эндопротезов «Эслан», «Фторэкс» и «Эслан + ЭластоПОБ»[®]

Меньшая выраженность площади спаечного процесса между эндопротезом и листками перикарда в случаях использования сетчатого композитного эндопротеза «Эслан + ЭластоПОБ»[®] может иметь определенные преимущества при выполнении повторных операций на сердце или при трансплантации сердца.

Результаты гистологического исследования

Анализируя гистологические данные, характеризующие особенности приживления исследованных разновидностей эндопротезов на сердца животных, можно отметить, что во всех наблюдениях регистрировались близкие по своим характеристикам тканевые реакции.

После имплантации всех исследованных эндопротезов на 20-е сутки с момента операции развивалась тканевая реакция в виде острого неспецифического воспаления, проявляющегося отеком и разобщением волокон окружающих имплантат тканей, нейтрофильной инфильтрацией, признаками перифокального воспаления, тромботическими изменениями кровеносных сосудов, сопровождающимися их полнокровием и очаговыми кровоизлияниями. В случаях использования в эксперименте эндопротезов «Фторэкс» и «Эслан» вокруг их элементов наблюдалось формирование рыхлой соединительной ткани с разнонаправленной ориентацией образующих ее коллагеновых волокон. В наблюдениях с применением протеза «Эслан», обработанного биополимерным покрытием «ЭластоПОБ»[®], ориентация коллагеновых волокон была четкой, что свидетельствовало о большей степени «зрелости» данной соединительной ткани (сравнение групп по качественным признакам с использованием теста Хи-квадрат), т. е. степень интенсивности воспалительной реакции на 20-е сутки в зоне имплантации эндопротезов была отчетливо выражена при использовании «Фторэкс» и «Эслан» и умеренно выражена в зонах имплантации композитного эндопротеза «Эслан + ЭластоПОБ»[®].

На 30-е сутки с момента имплантации эндопротезов «Фторэкс» и «Эслан» отмечено прогрессирующее созревание ранее незрелой соединительной ткани, что проявлялось различной степенью упорядочивания волокон и циркулярной их ориентацией вокруг филаментов. Это сопровождалось уменьшением интенсивности воспалительной реакции. О биологической совместимости исследуемых материалов свидетельствовали отсутствие миграции и смещения эндопротезов из зон фиксации, отсутствие послеоперационных осложнений и образование соединительно-тканной капсулы, прорастающей в структуру эндопротеза. В случаях использования эндопротеза «Эслан» с покрытием «ЭластоПОБ»[®] на данном этапе эксперимента отмечалась значительная степень зрелости соединительной ткани и практически затихание воспалительной реакции.

ВЫВОДЫ

Созданные по принципу вязания основы сетчатые лавсановые экстракардиальные эндопротезы с различными вариантами композитного покрытия обладают оптимальными структурно-механическими характеристиками, которые соответствуют основным медико-техническим требованиям.

Разработанная методика операции имплантации сетчатого экстракардиального эндопротеза на сердце лабораторного животного позволяет минимизировать интраоперационную травму и максимально эффективно моделировать экстракардиальный синтетический материал.

Вновь образованный соединительно-тканый каркас в зоне имплантации эндопротеза достоверно не влияет на сократительную функцию сердца экспериментальных животных.

При использовании сетчатого лавсанового эндопротеза, покрытого биодеградируемым покрытием «ЭластоПОБ»[®], отмечается меньшая интенсивность и ранняя регрессия воспалительной тканевой реакции, заметно ускоренное формирование и созревание соединительной ткани, а также значительно меньшая распространенность спаечного процесса в зоне имплантации, по сравнению с однородными лавсановыми эндопротезами без покрытия и с фторполимерным покрытием.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Шумаков Д.В., Шурыгин С.Н., Тимербаев А.В.* Современные хирургические методы лечения дилатационной кардиомиопатии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 4. – С. 92–96.
2. *Тимербаев А.В., Дмитриев И.В., Гасанов Э.К., Ильинский И.М., Шурыгин С.Н., Шумаков Д.В.* Изучение морфологических свойств соединительной ткани в зоне имплантации различных эндопротезов на миокард собак // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2010. – № 3. – С. 73–80.
3. *Шумаков Д.В., Шурыгин С.Н., Севастьянов В.И., Ильинский И.М., Гасанов Э.К., Тимербаев А.В.* Разработка и экспериментальное исследование нового сетчатого эндопротеза с различными вариантами композитного покрытия, предназначенного для экстракардиального ремоделирования сердца // Московский хирургический журнал. – 2009. – № 6 (10). – С. 23–26.
4. *Шумаков Д.В., Шурыгин С.Н., Ильинский И.М., Севастьянов В.И., Гасанов Э.К., Немец Е.А., Дмитриев И.В., Тимербаев А.В.* Экспериментальное исследование сетчатого лавсанового эндопротеза с нанокompозитным покрытием «ЭластоПоб» при прогрессирующей кардиомиопатии // Тезисы Международного форума по нанотехнологиям, секция нанотехнологии в медицине: онкология и кардиология. – М., 2009.
5. *Тимербаев А.В., Дмитриев И.В.* Изучение свойств соединительной ткани в зоне имплантации нового сетчатого эндопротеза на миокард собак // Тезисы XIV ежегодной сессии Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. – М., 2010.
6. *Тимербаев А.В., Дмитриев И.В.* Оценка влияния нового сетчатого композиционного эндопротеза на основные показатели сократительной функции миокарда собак // Тезисы XIV ежегодной сессии Научного Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. – М., 2010.

Цалман Антон Янович

ИНТЕРФЕРЕНЦИОННАЯ ФАЗОМЕТРИЯ ЯДЕРНЫХ СТРУКТУР ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

(клинико-экспериментальное исследование)

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

14.03.09 Клиническая иммунология, аллергология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в ГУ «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Ватазин Андрей Владимирович
доктор медицинских наук, профессор Василенко Ирина Анатольевна

Актуальность проблемы

Важным фактором ухудшения функции почечного аллотрансплантата является острое отторжение в раннем послеоперационном периоде, поэтому своевременная его диагностика и адекватное лечение являются важными предикторами благоприятного клинического исхода (Divate S.A., 2000; Johnston O., O'kelly P., 2006; Karczewski J., 2008).

В настоящее время диагностика острой реакции отторжения основывается на комплексной оценке клинических симптомов, лабораторных показателей и результатов специальных инструментальных методов, включая ультразвуковое, доплеровское исследование и динамическую нефросцинтиграфию. Однако большинство определяемых признаков не являются строго специфичными для острого отторжения (Сандриков В.А., Садовников В.И., 2001; Danovitch G.M., 2001; Tinckam K.J. et al., 2004). Они могут регистрироваться в различных комбинациях вследствие острого канальцевого некроза, инфекционных, хирургических осложнений,

токсичности ингибиторов кальциневрина и других лекарственных средств (Арзуманов С.В. и соавт., 2005; Шумаков В.И. и соавт., 2006; Dalton R.S. et al., 2005).

Наиболее достоверным методом диагностики острой реакции отторжения (ОРО) в настоящее время остается пункционная биопсия. Однако в связи с инвазивностью данного метода, необходимостью проведения подготовки пациента, наличием ряда противопоказаний и определенно-го риска развития осложнений считать пункционную биопсию «золотым стандартом» дифференциальной диагностики патологических состояний нефротрансплантата можно достаточно условно.

В последнее время активно ведутся научные поиски по разработке инструментальных способов обследования реципиентов почечного аллотрансплантата и использованию лабораторных методов на основе учета и анализа патогенетических факторов дисфункции трансплантированной почки. И если использование современных инструментальных методов в определенной мере ограничено наличием существующих диагностических аппаратов и приборных комплексов, то широкий круг лабораторных тестов продолжает увеличиваться (Сандриков В.А., Садовников В.И., 2001; Шумаков В.И. и соавт., 2006; Pabisiak K. et al., 2004).

Сотрудниками отделения гемодиализа с пересадкой почки ГУ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского был разработан способ диагностики острых реакций отторжения почечного трансплантата на основе измерений витальных морфометрических параметров иммунокомпетентных клеток методом компьютерной фазово-интерференционной микроскопии (патент на изобретение «Способ диагностики отторжения почечного аллотрансплантата» № 2348932, 2009). Однако необходимость определения целого комплекса размерных показателей лимфоцитов, проведение многоуровневого математического анализа и сложность интерпретации полученных данных ограничивают возможность широкого использования метода в клинической практике, тем более для экспресс-диагностики ранней дисфункции почечного трансплантата.

Все вышеизложенное определяет актуальность выбранного направления исследований в плане совершенствования витальной компьютерной морфометрии. Анализ морфофункционального состояния ядерных структур иммунокомпетентных клеток может иметь не только научное значение для детального исследования патогенетических звеньев реакции отторжения трансплантированного органа, но и весьма важный практический результат для оперативной оценки иммунореактивности и прогнозирования состояния реципиента, а также построения индивидуализированных лечебно-реабилитационных программ, сравнения эффективности различных видов терапии, своевременного выявления осложнений, побочных и/или неблагоприятных эффектов лечения. Все это явилось основанием для проведения настоящего исследования.

Цель исследования

Изучить возможности интерференционной фазометрии ядерных структур лимфоцитов в доклинической диагностике острого отторжения почечного трансплантата и оценке эффективности противокризисовой терапии.

Задачи исследования

1. Изучить в режиме реального времени качественные и количественные изменения денситометрических параметров лимфоцитов периферической крови человека при их активации в условиях *in vitro*.

2. Провести сравнительный анализ структуры хроматина интерфазных ядер лимфоцитов периферической крови практически здоровых добровольцев и пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности методом витальной компьютерной морфометрии.

3. Изучить особенности динамики функциональной активности лимфоцитов у пациентов со стабильной и отсроченной функцией трансплантата в раннем посттрансплантационном периоде.

4. Оценить ядерный полиморфизм иммунокомпетентных клеток крови при острой реакции отторжения трансплантата.

5. Проанализировать изменения функциональной активности лимфоцитов на основе денситометрических показателей морфофункционального состояния их ядерных структур после проведения противокризисовой терапии для оценки эффективности программ иммуносупрессии.

Научная новизна

В экспериментах *in vitro* изучены денситометрические параметры ядер лимфоцитов периферической крови при переходе клеток от состояния покоя к активной пролиферации, индуцированной фитогемагглютинином. Определены качественные и количественные показатели функционального состояния клеточных ядер, которые являются маркерами метаболической и пролиферативной активности лимфоцитов.

Впервые методом компьютерной фазовой морфометрии выявлена функциональная гетерогенность ядер циркулирующих лимфоцитов у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности до и после аллотрансплантации трупной почки в раннем посттрансплантационном периоде.

Для оценки морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток на основе витальных денситометрических параметров предложен показатель функциональной активности ядер лимфоцитов (приоритетная справка на получение патента «Способ диагностики отторжения почечного аллотрансплантата» № 2009139822 от 28.10.2009).

Изучены особенности ядерного полиморфизма циркулирующих Т- и В-лимфоцитов у больных с признаками острой реакции отторжения нефротрансплантата и после проведения противокризисовой терапии.

Практическая значимость

Разработаны дифференциально-диагностические цитологические критерии реактивных изменений ядер лимфоцитов на основе исследования морфоденситометрических характеристик хроматина и особенностей ядрышково-ядерного соотношения.

Полученные экспериментальные данные расширяют возможности витальной компьютерной морфометрии в оценке функционального состояния ядер лимфоцитов. Предложенный показатель ядерной активности лимфоцитов является ранним и объективным маркером их пролиферативного потенциала.

Проведение мониторинга денситометрических показателей ядер циркулирующих лимфоцитов позволяет своевременно выявлять изменение иммунореактивности реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде.

Определение ядерной активности циркулирующих Т- и В-лимфоцитов позволяет проводить уточняющую экспресс-диагностику острой реакции отторжения нефротрансплантата, прогнозировать результаты лечения, оценивать эффективность противокризовой терапии.

Внедрение в практику

Основные положения и материалы диссертации внедрены в клиническую практику отделения гемодиализа с пересадкой почки ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского».

Публикации

По результатам выполненных исследований опубликовано 8 печатных работ.

Апробация работы

Основные материалы и положения работы доложены и обсуждены: на 24-й научно-практической конференции «Морфометрия в диагностике болезней», Москва, 2005 г.; 25-й научно-практической конференции «Морфометрия в диагностике болезней», Москва, 2006 г.; I научно-практической конференции «Цитометрия в биологии и медицине: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 2008 г.; II научно-практической конференции «Цитометрия в биологии и медицине: фундаментальные и прикладные аспекты», Москва, 2009 г.; научно-практической конференции сотрудников отделения гемодиализа с пересадкой почки, отделения хирургической гемокоррекции и детоксикации, кафедры эфферентной медицины, клинической и оперативной нефрологии ФУВ ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», Москва, 2010 г.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Показатель функциональной активности ядер лимфоцитов, характеризующий конформационное состояние нуклеолярных белков и степень

деконденсации хроматина, является универсальным количественным критерием пролиферативного потенциала иммунокомпетентных клеток.

2. Величина показателя функциональной активности ядер лимфоцитов может рассматриваться в качестве критерия ранней диагностики острого отторжения почечного трансплантата и эффективности проводимой противокризовой терапии.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 37 отечественных и 105 зарубежных источников.

Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 20 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Клиническая характеристика больных, материал и методы исследования

В исследование включены результаты обследования 36 больных с терминальной стадией ХПН, которым выполнена трансплантация почки в 2005–2008 гг. в ГУ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского». В исследовании участвовали 18 мужчин и 18 женщин в возрасте от 20 до 59 лет (средний возраст $42 \pm 9,5$ года).

Для определения показателей нормы морфофункционального состояния ядерных структур лимфоцитов были обследованы 30 практически здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 59 лет (средний возраст – $36 \pm 7,6$ года).

Причинами, приведшими к терминальной стадии хронической почечной недостаточности, являлись хронический гломерулонефрит 61% ($n = 22$), хронический пиелонефрит 22,2% ($n = 8$), синдром Альпорта 5,6% ($n = 2$), подагра 5,6% ($n = 2$), хронический тубуло-интерстициальный нефрит 5,6% ($n = 2$).

Все больные до аллотрансплантации трупной почки (АТПП) получали заместительную почечную терапию – гемодиализ или перитонеальный диализ. Средний срок нахождения на диализе составил $29,7 \pm 18,4$ мес. Во всех случаях органы были получены от трупных доноров. Среднее время холодовой ишемии донорской почки составило $22,1 \pm 2,6$ ч.

Степень HLA-совместимости оценивали по числу антигенов HLA-донора, совпадающих с антигенами HLA-реципиента. Уровень предсуществующих антител у реципиента определяли в стандартном комплемент-зависимом лимфоцитотоксическом тесте.

В послеоперационном периоде использовали следующий протокол иммуносупрессии: Циклоспорин (ЦсА) 2,5 мг/кг массы тела, Селлсепт 1,5–2 г/сут, Преднизолон 0,5 мг/кг. Зенапакс 1 мг/кг массы тела вводился в/в

перед операцией, на 14-й, 28-й и 42-й дни, метилпреднизолон в/в перед включением почки в кровоток, на 2-е и 4-е сутки.

Острое отторжение почечного трансплантата купировали «пульсами» метилпреднизолона до общей дозы 3,0 г. При стероидрезистентных кризах применялся антитимоцитарный глобулин – АТГ (Фрезениус). При остром отторжении сосудистого или смешанного типа в комплексное лечение включали плазмаферез.

Для оценки адекватности получаемой дозы ЦсА всем больным после трансплантации почки определялась концентрация ЦсА в цельной крови иммуноферментным анализатором «ТDХ» фирмы «Abbott».

Всем пациентам проводились стандартные клинико-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые доплеровские исследования, динамическая нефросцинтиграфия.

Клинико-лабораторное обследование пациентов включало общий и биохимический анализ крови, общий анализ мочи, определение уровня креатинина в сыворотке крови, клиренса креатинина, определение белковых фракций, ферментов АсТ и АлТ, общего холестерина и холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов, концентрации циклоспорина А, вирусологическое и бактериологическое исследования. Для оценки функции пересаженного органа определяли следующие показатели: уровень сывороточного креатинина и мочевины, скорость клубочковой фильтрации, уровень креатинина в моче, уровень общего белка в плазме и моче, уровень суточной протеинурии.

При наличии показаний производилось морфологическое исследование трансплантата. Реципиентам с дисфункцией трансплантата и/или инфекционными осложнениями выполнялось дополнительное иммунологическое обследование.

До и после трансплантации почки все больные обследовались с целью выявления вирусных гепатитов «В», «С»: выполнялось биохимическое исследование сыворотки крови, определялись иммунологические маркеры (антигены и антитела) вирусов гепатита в ИФА. Кровь пациентов с положительными результатами определения иммунологических маркеров гепатитов исследовалась на наличие РНК HCV и ДНК HBV.

При подозрении на развитие бактериальных инфекций проводилось микробиологическое исследование крови, мочи, мокроты, плеврального выпота, раневого отделяемого и т. д. – в зависимости от локализации инфекционных осложнений.

Пункционные биоптаты трансплантата получали в стерильных условиях под местной анестезией и ультразвуковым контролем. Пункции осуществлялись с помощью аппарата для биопсий GT GUN 22 (Италия). Для гистологического исследования биоптаты фиксировали в 10%-ном нейтральном растворе формалина, обезживали в спиртах нарастающей крепости и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5–7 мкм исследовали гистологически, гистохимически и иммуногистохимически.

Оценку полученных данных проводили по классификации Banff 97. Метод витальной компьютерной цитоморфометрии был применен для изучения количественных показателей надмолекулярной организации интерфазного хроматина ядер лимфоцитов периферической крови на базе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва). Больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности на этапе лечения перитонеальным диализом и гемодиализом обследовали однократно.

Реципиентов почечного аллотрансплантата наблюдали в течение раннего послеоперационного периода (30 суток после АТП), осуществляя посуточный мониторинг клинико-лабораторных показателей и выполняя компьютерную фазометрию лимфоцитов.

Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Стандартная обработка выборок включала подсчет значений средних арифметических величин, ошибок средних, а также величины дисперсии, среднего квадратического отклонения и анализа асимметричности распределения. Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критериям Колмагорова–Смирнова или Стьюдента. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

Морфометрический анализ ядерных структур лимфоцитов *in vitro*

В качестве модельной системы *in vitro* для изучения перехода клеток от состояния покоя к активной пролиферации были выбраны лимфоциты периферической крови, активированные фитогемагглютинином (ФГА). В исследованиях были получены доказательства, что компьютерная фазовая морфометрия (КФМ) позволяет выявить детальные изменения фазовых параметров лимфоцитов, непосредственно связанные с их активацией. Исследования образцов с интактными лимфоцитами, находящимися в интерфазе, показали, что на их топограммах четко визуализируются цитоплазма, ядро и слабоконтрастное ядрышко (рис. 1).

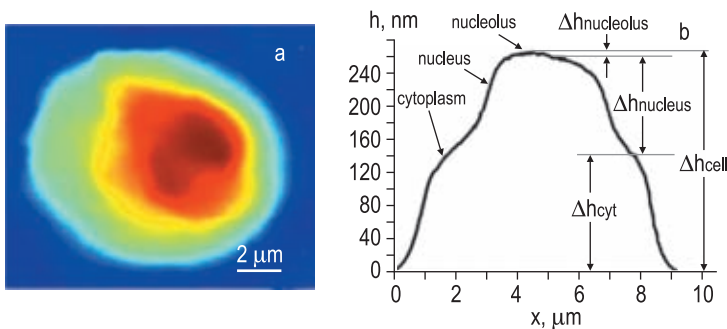


Рис. 1. Топограмма и фазовый профиль интактного Т-лимфоцита периферической крови

Для активации лимфоцитов к взвеси клеток *in vitro* добавляли в качестве индуктора активации ФГА с экспозицией в течение 1 часа при 37 °С.

После инкубации проводили компьютерную морфометрию активированных лимфоцитов (рис. 2).

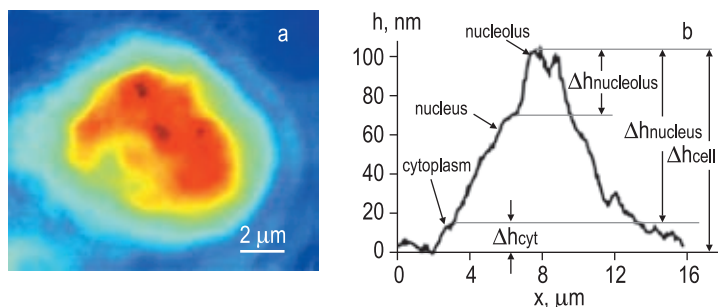


Рис. 2. Топограмма и фазовый профиль активированного Т-лимфоцита периферической крови

Изучение динамики морфометрических показателей в процессе активации показало, что уже в течение одного часа после добавления ФГА фазовая высота клетки и ее ядра достоверно снижаются практически в 1,5 и более раза (с $220,0 \pm 39,0$ нм до $95,0 \pm 24,0$ нм). Снижение фазовой высоты сопровождается существенными изменениями в морфологии лимфоцита: уменьшается фазовая толщина цитоплазмы, на фоне ядра выделяется контрастное ядрышко, в котором перераспределяется хроматин, и появляются множественные фибриллярные центры.

Из полученных результатов следует, что при активации клетки в ядре происходит перераспределение гетерохроматина к периферии, заметное снижение его электронной плотности, а в ядрышке идентифицируются множественные фибриллярные центры, окруженные плотным фибриллярным и гранулярным компонентом.

Оптические параметры живых клеток крови зависят от природы внутриклеточного вещества, его концентрации и конформационного состояния. Количество хроматина в соматической клетке со стандартным (диплоидным) набором хромосом постоянно и не зависит от большинства факторов. Коэффициент преломления для всех компонентов клеточных структур в среднем равен 1,088 и может меняться в небольших пределах при изменении конформационного состояния молекул – чем меньше размер комплекса белков, ДНК и РНК, тем меньше коэффициент преломления.

Таким образом, фазовая высота любой мононуклеарной клетки зависит в первую очередь от степени упаковки хроматина в ядре и активности процессов белкового синтеза. То есть данная величина позволяет косвенно оценить активность лимфоцита. Является очевидным, что морфометрические параметры количественно отражают качественные изменения клеток крови, могут считаться высокочувствительными и объективными

критериями оценки различных нарушений гомеостаза организма человека.

Таким образом, фазовая высота – объективный количественный параметр, отражающий степень активации лимфоцитов и позволяющий регистрировать процесс в самой ранней фазе.

Использованный нами в данной работе метод компьютерной фазометрии позволил осуществить экспресс-диагностику степени изменения витального морфофункционального состояния лимфоцитов периферической крови соматически здоровых лиц и больных. Функциональная активность ядра как критерий активации лимфоцитов характеризует конформационное состояние нуклеолярных белков и степень деконденсации хроматина, что отражается на фазово-интерференционных портретах Т- и В-лимфоцитов периферической крови человека.

Снижение уровня анизотропии ядра лимфоцита может интерпретироваться как показатель, свидетельствующий о переходе гетерохроматина в эухроматин, что указывает на биологическую активацию хроматина и является предпосылкой для появления матричной активности ДНК.

Следовательно, ядерный полиморфизм циркулирующей популяции лимфоцитов может быть охарактеризован с использованием показателя функциональной активности ядра (ФА) как величина, обратно пропорциональная фазовой высоте (РН) каждой клетки в выборке по формуле:

$$FA = (3 \times n_3 + 2 \times n_2 + n_1 + 0 \times n_0)/n,$$

где ФА – функциональная активность ядра; n_3 – количество клеток с $RH \leq 1,5$ мкм; n_2 – с $RH > 1,5$, но ≤ 2 мкм; n_1 – с $RH > 2$, но $\leq 2,5$ мкм; n_0 – с $RH > 2,5$; n – число клеток в выборке.

Фазометрия ядерных структур лимфоцитов здоровых добровольцев и больных ТХПН на стадии заместительной почечной терапии

Установлено, что у практически здоровых лиц значение ФА составило $1,83 \pm 0,1$ для Т- и $1,85 \pm 0,1$ для В-лимфоцитов. Полученные высокие показатели связаны с преобладанием лимфоцитов со средним и низким значениями фазовой высоты, т. е. функционально активных клеток. Значения функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов больных ТХПН и практически здоровых лиц (доноров) представлены в табл. 1.

Таблица 1

ФА Т- и В-лимфоцитов больных ТХПН ($M \pm \sigma$)

Группы	Значение ФА Т-лимфоцитов	Значение ФА В-лимфоцитов
Доноры (n = 30)	$1,83 \pm 0,1$	$1,85 \pm 0,1$
Больные ТХПН (n = 36)	$1,56 \pm 0,15^*$	$1,54 \pm 0,2^*$

Примечание. Достоверность различий $p < 0,05$; * – отличается от контроля.

Как для Т-, так и для В-лимфоцитов больных ТХПН характерно достоверное уменьшение функциональной активности ядер клеток. На основании полученных результатов можно предположить, что в Т- и В-звене иммунитета имеются признаки функциональной недостаточности, связанной, очевидно, с подавлением клеточной активации. В то же время полученные данные не позволяют оценить пролиферативный потенциал лимфоцитов, а лишь характеризуют изменение состояния иммунореактивности пациентов с терминальной стадией ХПН.

Морфометрический анализ ядерных структур лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата с неосложненным послеоперационным течением

Известно, что организм пациента после трансплантации почки подвергается целому комплексу воздействий. К ним относятся: антигенное влияние трансплантата, иммуносупрессия, наличие посттрансплантационных осложнений и т. д. Поэтому исследование изменений состояния клеточного звена иммунитета крайне важно для оценки иммунологического статуса реципиентов почечного трансплантата.

Проанализированы результаты проспективного обследования 18 больных в раннем послеоперационном периоде после аллотрансплантации трупной почки с первичной функцией трансплантата. Данная группа представлена 55,6% женщин ($n = 10$) и 44,5% мужчин ($n = 8$). Средний возраст пациентов составил $41,9 \pm 7,3$ года. Причинами, приведшими к терминальной стадии хронической почечной недостаточности, явились: хронический гломерулонефрит – 67% ($n = 12$), хронический пиелонефрит – 22% ($n = 4$) и подагра – 11% ($n = 2$).

Методом заместительной почечной терапии у реципиентов почечного трансплантата в данной группе был перитонеальный диализ у 33,3% ($n = 6$), гемодиализ у 66,7% ($n = 12$). Средний срок нахождения на диализе до трансплантации почки составил $34,2 \pm 17,2$ мес.

При подборе пары «донор – реципиент» совпадение по системе тканевой гистосовместимости составило по 3 антигенам – 22% ($n = 4$), по 2 – 56% ($n = 10$), по 1 – 22% ($n = 4$). Таким образом, среднее совпадение в данной группе составило по $2 \pm 0,44$ антигена. Время холодовой ишемии донорских органов составило $21,1 \pm 2,6$ часа. Аллотрансплантация почки у всех пациентов выполнена на фоне отсутствия предсуществующих антител.

Срок нормализации диуреза в данной группе составил $1,7 \pm 0,7$ сут, снижение креатинина плазмы до нормальных значений наступало на $7,4 \pm 1,9$ сут.

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови у реципиентов почечного трансплантата с неосложненным течением раннего послеоперационного периода представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата (M ± σ)

ФА	До АТП	Сутки после АТП				
		5-е	8-е	13-е	21-е	28-е
Т-лимфоциты	1,6 ± 0,2	1,2 ± 0,3*	1,3 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*	1,4 ± 0,3*	1,4 ± 0,2*
В-лимфоциты	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,2*	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,11*	1,4 ± 0,3*	1,4 ± 0,1*

Примечание. Достоверность различий $p < 0,05$ по отношению к контролю.

На 4–5-е сутки зарегистрированы наименьшие значения ядерной активности лимфоцитов, что, вероятно, связано с проведением интенсивной иммуносупрессии в эти сроки, а также реакцией организма на оперативное вмешательство. К 8–10-м суткам наблюдается рост и стабилизация показателя ядерной активности в связи с адаптационными процессами перестройки морфофункционального состояния иммунокомпетентных клеток при реализации реакции трансплантационного иммунитета.

Морфометрический анализ ядерных структур лимфоцитов у реципиентов АТП с отсроченной функцией трансплантата

Доминирующей причиной отсутствия начальной функции трансплантата является ишемическое повреждение, возникающее в результате различных нарушений гемодинамики в организме донора, а также времени тепловой и холодовой ишемии. В то же время отсутствие начальной функции трансплантата может быть клинической картиной и других патологических состояний, таких как артериальная окклюзия и венозный тромбоз ПАТ, нефротоксичность лекарственных препаратов, гемолитико-уремический синдром, внутрисосудистое депонирование жидкости, обструкция мочеточника, сверхострое и ускоренное острое отторжение. Как правило, только исключение данных патологических состояний позволяет в дальнейшем считать причиной отсутствия начальной функции ПАТ ишемическое повреждение, морфологическим субстратом которого является острый канальцевый некроз.

Высокая частота развития острого отторжения, несомненно, связана с усилением иммуногенности трансплантата при ишемическом и реперфузионном повреждении. Причем частота развития отторжения на фоне отсроченной функции трансплантата достигает 57%, в то время как при немедленной его функции этот показатель значительно ниже. Таким образом, диагностика криза отторжения при отсроченной функции трансплантата является важной, но сложной задачей, что связано с отсутствием возможности ориентироваться на динамику биохимических показателей (креатинина и мочевины) и на количество мочи в связи с анурией или олигоанурией.

Проведено проспективное обследование 12 больных в раннем послеоперационном периоде после аллотрансплантации трупной почки с отсроченной

функцией трансплантата. Данная группа представлена 33,3% женщин ($n = 4$) и 66,7% мужчин ($n = 8$). Средний возраст пациентов составил $43 \pm 8,8$ года.

Причинами, приведшими к терминальной стадии хронической почечной недостаточности, явились: хронический гломерулонефрит – 50% ($n = 6$), хронический пиелонефрит – 33% ($n = 4$) и синдром Альпорта – 17% ($n = 2$).

Методом заместительной почечной терапии у реципиентов почечного трансплантата в данной группе был перитонеальный диализ у 17% ($n = 2$), гемодиализ у 83% ($n = 10$). Средний срок нахождения на диализе до трансплантации почки составил $26,8 \pm 10,1$ мес.

При подборе пары «донор – реципиент» совпадение по системе тканевой гистосовместимости составило по 3 антигенам – 50% ($n = 6$), по 2 – 50% ($n = 6$).

Время холодовой ишемии донорских органов составило в среднем $23,3 \pm 2,4$ часа. Аллотрансплантация почки у всех пациентов выполнена на фоне отсутствия предрасполагающих антител.

Срок нормализации диуреза в данной группе составил $14,7 \pm 3,7$ сут, снижение креатинина плазмы до нормальных значений наступало на $21,8 \pm 5,8$ сут.

Проведенное исследование ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови методом компьютерной фазовой морфометрии у реципиентов почечного трансплантата с отсроченной функцией представлено в табл. 3.

Таблица 3

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата с отсроченной функцией ($M \pm \sigma$)

ФА	До АТП	Сутки после АТП				
		5	8	13	21	28
Т-лимфоциты	$1,6 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,2^*$	$1,2 \pm 0,3^*$	$1,3 \pm 0,1^*$	$1,3 \pm 0,15^*$	$1,2 \pm 0,2^*$
В-лимфоциты	$1,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1^*$	$1,4 \pm 0,12^*$	$1,5 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2^*$

Примечание. Достоверность различий $p < 0,05$.

Таким образом, выявлена функциональная гетерогенность ядер циркулирующих лимфоцитов в послеоперационном периоде у реципиентов с отсроченной функцией трансплантата. При этом уменьшение ядерной активности связано с началом интенсивной иммуносупрессии, что наглядно представлено на рис. 3.

Из представленных данных видно, что у реципиентов почечного трансплантата происходит достоверное уменьшение функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов, что характеризует степень подавления иммунореактивности пациентов в процессе иммуносупрессии. При этом не выявлено достоверно значимых различий снижения иммунореактивности при первичной и при отсроченной функциях трансплантата (без иммунологического конфликта).

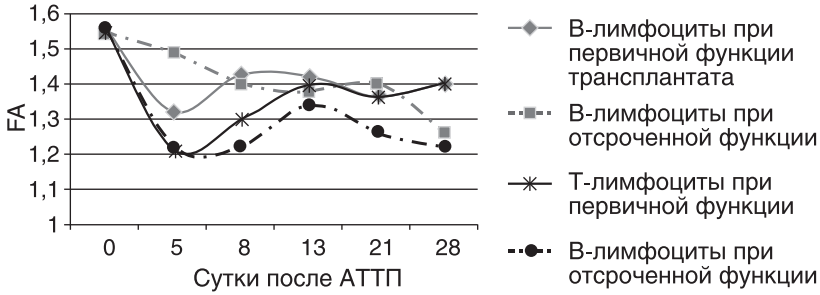


Рис. 3. Ядерная активность Т- и В-лимфоцитов периферической крови с первичной и отсроченной функцией трансплантата

Витальная компьютерная фазометрия в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата

Проанализированы результаты проспективного обследования 6 больных, у которых в раннем послеоперационном периоде выявлен криз отторжения трансплантата. Данная группа представлена 67% женщин (n = 4) и 33% мужчин (n = 2). Средний возраст пациентов составил $34,7 \pm 11,2$ года.

Причинами, приведшими к терминальной стадии хронической почечной недостаточности, явились: хронический гломерулонефрит – 67% (n = 4) и хронический тубуло-интерстициальный нефрит 33% (n = 2). Методом заместительной почечной терапии у всех реципиентов почечного трансплантата в данной группе был перитонеальный диализ. Средний срок нахождения на диализе до трансплантации почки составил 22 ± 7 мес.

При подборе пары «донор – реципиент» совпадение по системе тканевой гистосовместимости происходило по 2 антигенам. Время холодовой ишемии донорских органов составило в среднем $24,1 \pm 3,4$ часа.

Аллотрансплантация почки у всех пациентов выполнена на фоне отсутствия высокого титра предрасполагающих антител.

У всех реципиентов нефротрансплантата использовали следующий протокол иммуносупрессии: Циклоспорин 2,5 мг/кг массы тела, Селлсепт 1,5–2 г/сут, Преднизолон 0,5 мг/кг. Зенапакс 1 мг/кг массы тела вводился в/в перед операцией, на 14-й, 28-й и 42-й дни, метилпреднизолон в/в перед включением почки в кровоток, на 2-е и 4-е сутки.

Для оценки адекватности получаемой дозы ЦсА всем больным после трансплантации почки определялась концентрация ЦсА в цельной крови иммуноферментным методом. Циклоспорин дозировали по его концентрации в пробе крови натошак, уровень препарата поддерживали в пределах от 150 до 200 нг/мл.

Проведен мониторинг ядерной активности Т- и В-лимфоцитов. При ОРО отмечено значительное увеличение функциональной активности ядер Т- и/или В-клеток в зависимости от типа реакции отторжения (рис. 4).

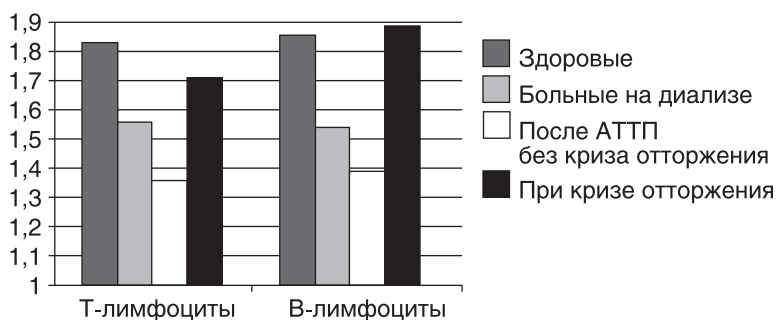


Рис. 4. Мониторинг ядерной активности Т- и В-лимфоцитов

В данной группе у реципиентов почечного трансплантата при наличии острого отторжения по клеточному типу наблюдался подъем ядерной активности Т-лимфоцитов до $1,71 \pm 0,05$, т. е. на 25,7% по сравнению с пациентами с неосложненным течением раннего послеоперационного периода. При кризе отторжения по сосудистому типу показатель ядерной активности составил $1,88 \pm 0,1$, что на 35% выше, чем в группе с течением послеоперационного периода без иммунологического конфликта.

Внедрение и использование в клинической практике показателя функциональной активности ядер лимфоцитов позволило своевременно диагностировать развитие острого отторжения на доклинической стадии и начать соответствующее лечение.

Морфометрическая характеристика ядерных структур лимфоцитов в оценке эффективности антикризовой терапии

В данное исследование включены результаты проспективного обследования 6 больных, у которых в раннем послеоперационном периоде выявлен криз отторжения трансплантата.

Острое отторжение почечного трансплантата купировали «пульсами» метилпреднизолона до общей дозы 3,0 г. При стероидрезистентных кризах применялся антитимоцитарный глобулин – АТГ (Фрезениус). При остром отторжении сосудистого или смешанного типа в комплексное лечение включали плазмаферез.

Проведен мониторинг ядерной активности Т- и В-лимфоцитов на фоне проводимой противокризовой терапии.

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата представлены в табл. 4 и на рис. 5.

Из представленных данных видно, что на фоне проводимой противокризовой терапии как для Т-, так и для В-лимфоцитов характерно достоверное уменьшение функциональной активности ядер клеток. ФА достигает значений, сопоставимых с показателями в группе с неосложненным течением и даже ниже.

Таблица 4

Результаты мониторинга ядерной активности Т- и В-лимфоцитов периферической крови реципиентов ренального трансплантата (M ± σ)

ФА	При неосложненном течении	При кризе отторжения	После проведения противокризисовой терапии
Т-лимфоцитов	1,36 ± 0,1	1,71 ± 0,05	0,97 ± 0,2
В-лимфоцитов	1,39 ± 0,1	1,88 ± 0,1	1,3 ± 0,2

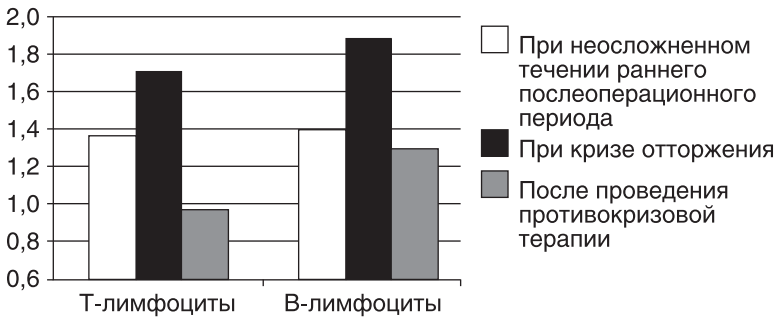


Рис. 5. Ядерная активность Т- и В-лимфоцитов периферической крови у реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде

Таким образом, показатель функциональной активности ядер Т- и В-лимфоцитов характеризует степень подавления иммунореактивности пациентов в процессе иммуносупрессии при лечении острого отторжения почечного трансплантата.

Определение ядерной активности циркулирующих лимфоцитов позволило провести оценку эффективности противокризисовой терапии. При выявлении стероидрезистентного криза отторжения своевременно проводилось лечение препаратами поликлональных антител. Благодаря ранней диагностике острого отторжения и адекватно проведенной терапии потерь трансплантатов не наблюдалось.

ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in vitro* установлены дозо- и времязависимые эффекты изменения денситометрических показателей ядер лимфоцитов человека, активированных митогеном фитогемагглютинином. Фазовая высота живой клетки отражает особенности ядерного полиморфизма, предшествует динамике других ее морфометрических показателей и может рассматриваться в качестве раннего критерия пролиферативной активности лимфоцита.

2. Среднепопуляционные показатели функциональной активности ядер (ФА) Т- и В-лимфоцитов больных с терминальной стадией ХПН отражают снижение пролиферативного потенциала циркулирующих клеток и составляют 1,56 и 1,54 против 1,83 и 1,85, установленных у здоровых лиц.
3. В посттрансплантационном периоде у пациентов без криза отторжения отмечается подавление функциональной активности циркулирующих лимфоцитов: величина ФА Т- и В-клеток снижается до 1,21 и 1,35 соответственно как при первичной, так и при отсроченной функции трансплантата
4. При развитии острой реакции отторжения трансплантата на фоне базовой иммуносупрессии наблюдается прогрессирующее увеличение функциональной активности лимфоцитов: величина ФА составляет $\geq 1,8 \pm 0,1$.
5. Эффективность противокризовой терапии может быть количественно оценена по динамике значений показателя функциональной активности ядер лимфоцитов: снижение ФА до 1,4 свидетельствует об эффективности проводимого лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки иммунологического статуса реципиентов почечного трансплантата целесообразно применять компьютерную фазовую морфометрию как малоинвазивный, оперативный и информативный скрининговый метод экспресс-оценки морфофункционального состояния ядерных структур лимфоцитов периферической крови.
2. Для контроля за иммунореактивностью реципиентов почечного трансплантата целесообразно определять показатель ядерной активности лимфоцитов в раннем послеоперационном периоде каждые 3–4 дня.
3. Повышение показателя ядерной активности является показанием для проведения тщательного лабораторно-инструментального обследования, направленного на подтверждение острой реакции отторжения трансплантата.
4. Во время проведения противокризовой терапии следует определять показатель ядерной активности лимфоцитов каждые 2 дня для контроля эффективности проводимого лечения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Ватазин А.В., Василенко И.А., Валов А.Л., Астахов П.В., Метелин В.Б., Герращенко М.А., Степанов В.А., Цалман А.Я.* Морфометрические параметры иммунокомпетентных клеток как критерии ранней диагностики отторжения

- ренального трансплантата // *Материалы научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной клинической медицины»*. – Пенза. – 2006. – С. 58.
2. **Цалман А.Я., Метелин В.Б., Игнатьев П.С., Тычинский В.П., Вышенская Т.В., Валов А.Л.** Когерентная фазовая микроскопия для оценки активации лимфоцитов реципиентов почечного трансплантата (клинико-экспериментальное исследование) // *Материалы IV Всероссийского съезда трансплантологов*. – Москва. – 2008. – С. 172–173.
 3. **Валов А.Л., Василенко И.А., Ватазин А.В., Троянский И.В., Метелин В.Б., Цалман А.Я., Вышенская Т.В.** Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов как неинвазивный метод диагностики острого отторжения почечного аллотрансплантата // *Альманах клинической медицины*. – 2009. – № 20. – С. 77–82.
 4. **Степанов В.А., Василенко И.А., Ватазин А.В., Крстич М.Д., Валов А.Л., Цалман А.Я.** Использование индекса активации иммунокомпетентных клеток в доклинической диагностике острого отторжения почечного трансплантата // *Тезисы докладов научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа»*. – М., 2009. – С. 74.
 5. **Цалман А.Я., Метелин В.Б., Валов А.Л., Ватазин А.В., Василенко И.А.** Функциональное состояние хроматина лимфоцитов как критерий диагностики острого отторжения ренального аллотрансплантата // *Тезисы докладов научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Актуальные вопросы гемафереза, хирургической гемокоррекции и диализа»*. – М., – 2009. – С. 87.
 6. **Ватазин А.В., Василенко И.А., Валов А.Л., Метелин В.Б., Круглов Е.Е., Цалман А.Я.** Витальная компьютерная морфометрия лимфоцитов в диагностике острого отторжения почечного аллотрансплантата // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2009. – № 4. – С. 18–25.
 7. **Цалман А.Я., Метелин В.Б., Василенко И.А., Ватазин А.В., Валов А.Л.** Функциональная активность ядер лимфоцитов как критерий диагностики острого отторжения ренального аллотрансплантата // *Материалы II Московской региональной научно-практической конференции (с международным участием) «Цитоморфометрия в медицине и биологии: фундаментальные и прикладные аспекты»*. – М., 2009. – С. 92–94.
 8. **Валов А.Л., Метелин В.Б., Василенко И.А., Цалман А.Я.** Компьютерная цитодиагностика криза отторжения ренального трансплантата // *Вестник Российской военно-медицинской академии*. – 2009. – Т. 25, № 1, прил. (часть II). – С. 749.

Шадрин Кирилл Борисович

ОПТИМИЗАЦИЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО МОНИТОРИНГА ПОСЛЕ ОРТОТОПИЧЕСКОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

14.01.24 Трансплантология и искусственные органы

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Москва, 2010

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы

Научный руководитель:

заслуженный врач РФ,

доктор медицинских наук, профессор

Хубутия Могели Шалвович

Ведущее учреждение: Федеральное государственное учреждение «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Актуальность исследования

Ортоотопическая трансплантация печени (ОТП) позволяет существенно увеличить продолжительность жизни более 80% пациентов с терминальными стадиями заболеваний этого органа до 5 и более лет [Готье С.В., 2004; Константинов Б.А., 2005] и значительно улучшить качество жизни этих пациентов [Maluf D.G., 2005]. В то же время осложнения послеоперационного периода определяют достаточно высокий уровень летальности у пациентов этой группы [Хубутия М.Ш., 2008; Ghobrial R., 2000, Shiffman M.L., 2002].

Тяжесть исходного статуса реципиента, продолжительность и травматичность хирургического вмешательства, зачастую поврежденная на ранних этапах функция донорской печени, а также обязательная иммуносупрессивная терапия становятся объективными предпосылками для развития многочисленных осложнений [Журавель С.В., 2007; Deschenes M., 1998;

Evans J., 2007]. У большинства реципиентов донорской печени в послеоперационном периоде развивается как минимум одно осложнение, при этом их виды и этиология весьма разнообразны [Вабишевич А.В., 2006].

Несмотря на адекватную иммуносупрессивную терапию, у 20–80% больных в интервале 5–11 суток после ОТП развивается острый криз отторжения трансплантата [Павлов Ч.С., 2003; Готье С.В., 2008; Хубутя М.Ш., 2008; Deschenes M., 1998; Kiuchi T., 1999; Vitalone M., 2006]. Применение ингибиторов кальцинейрина у пациентов, имевших почечную недостаточность перед ОТП, считают одним из факторов усугубления острой почечной недостаточности (ОПН) после операции [Nair S., 2002].

Несмотря на то что проблеме ОТП посвящено большое количество сообщений, сведения об особенностях послеоперационного лабораторного мониторинга таких пациентов единичны и не систематизированы [Feltracco P., 2008]. На сегодняшний день неполно изучена динамика параметров, характеризующих состояние различных органов и систем, отсутствуют *систематизированные* представления о взаимосвязи характера осложнений у реципиентов печеночного трансплантата с показателями клинико-лабораторных и инструментальных исследований. Недостаточно проанализированы статистические корреляционные связи, отражающие вероятность развития осложнений у больных в послеоперационном периоде, что в свою очередь не позволяет своевременно прогнозировать их возникновение. Не разработан алгоритм лабораторных исследований для пациентов, перенесших пересадку печени.

Цель работы: оптимизация клинико-лабораторного мониторинга в ближайшем послеоперационном периоде после ортотопической трансплантации печени.

Задачи исследования:

1. Определить связь летальности, частоты и характера осложнений с этиологией цирроза печени, клиническим статусом реципиентов до трансплантации, продолжительностью беспеченочного периода, длительностью холодовой ишемии и морфофункциональными изменениями в ткани печеночного трансплантата.
2. Выделить значимые лабораторные показатели для прогноза осложнений и летальности после трансплантации печени.
3. Оценить роль ингибиторов кальцинейрина в развитии острой почечной недостаточности у больных с гепаторенальным синдромом в анамнезе.
4. Разработать алгоритм мониторинга параметров гомеостаза и иммуносупрессии в целях своевременной диагностики и профилактики осложнений после трансплантации печени.

Научная новизна

Изучена связь развития осложнений, их частоты и структуры в раннем послеоперационном периоде (30 сут) после ОТП с рядом анамнестических

данных, степенью ишемического повреждения печени в периоперационном периоде.

Впервые проведена комплексная оценка параметров, характеризующих состояние печени и почек, свертывающей системы крови, баланса субпулпаций лимфоцитов и исследована их динамика у реципиентов печеночного трансплантата в раннем послеоперационном периоде и их взаимосвязь с характером осложнений.

Определены пороговые значения лабораторных параметров, имеющих диагностическую значимость, что позволяет прогнозировать неблагоприятный исход и характер осложнений в раннем посттрансплантационном периоде.

Установлено более выраженное нефротоксическое действие ингибиторов кальцинейрина у пациентов с явлениями ОПН в периоперационном периоде.

Практическая значимость

Показано, что при прогнозировании результатов ОТП в течение первых 30 сут после трансплантации необходимо учитывать этиологию заболевания, продолжительность беспеченочного периода и холодовой ишемии трансплантата, динамику концентраций билирубина, активности трансаминаз, уровней мочевины и креатинина, числа тромбоцитов, показателей свертывающей системы и величины иммунорегуляторного индекса. Для прогноза ранних осложнений уточнено оптимальное время проведения исследований ряда прогностически значимых параметров.

Разработан патогенетически обоснованный алгоритм мониторинга показателей гомеостаза и иммуносупрессии у больных после трансплантации печени, что позволило существенно сократить объем проводимых исследований без снижения их диагностической значимости.

Подтверждена необходимость сокращения сроков консервации трансплантата за счет сокращения времени холодовой ишемии, что способствует снижению вероятности развития осложнений в раннем посттрансплантационном периоде.

Показана необходимость индивидуального подбора схем и доз иммуносупрессивной терапии у реципиентов донорской печени с явлениями почечной недостаточности.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены: на заседании Московского общества анестезиологов-реаниматологов, январь 2000 г.; на 8 Международной специализированной выставке «Аптека 001» в рамках Третьей международной ассамблеи «Новые медицинские технологии», Москва, декабрь 2001 г.; на заседании Московского хирургического общества 18 октября 2001 г.; на 1-й научной конференции общества трансплантологов, Москва, апрель 2009 г., на 2-й научной конференции общества трансплантологов, Москва, апрель 2010 г.

Внедрение

Разработанный алгоритм комплексного обследования применяется в рамках послеоперационного мониторинга больных после ОТП в отделении трансплантации печени НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 7 работ, в том числе 1 в журнале, рекомендованном ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация имеет традиционную структуру, состоит из введения, 3 глав, в том числе обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Диссертация изложена на 163 стр., содержит 18 рисунков, 26 таблиц, список цитированной литературы включает 47 отечественных и 200 зарубежных источников.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Для прогнозирования исхода и вероятности развития осложнений у пациентов после ОТП в первые 30 суток после вмешательства необходимо учитывать этиологию заболевания, продолжительность времени холдовой ишемии трансплантата, результаты морфологических исследований биоптатов печени после реперфузии и данные лабораторных показателей, характеризующих проявления синдрома цитолиза, холестаза, нарушений в системе гемостаза, азотного обмена и иммунного дисбаланса.
2. Нефротоксическое действие ингибиторов кальцинейрина в ранние сроки после операции наиболее выражено у пациентов с гепаторенальным синдромом в дооперационном периоде.
3. Оптимизированный алгоритм лабораторного мониторинга для раннего прогнозирования развития осложнений и оценки эффективности проводимой терапии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – 112 пациентов, которым с 2000 по 2009 годы выполнена ортотопическая трансплантация печени (ОТП), в том числе 51 женщина и 61 мужчина в возрасте от 16 до 56 лет. Причиной развития печеночной недостаточности были: циррозы печени вирусной этиологии (у 36 больных – HCV, в том числе у одного – в сочетании с HBV и HDV, у 14 больных – в сочетании с ГЦР; у 18 больных – HBV, в том числе сочетание HBV с HDV – у 10 и у 3 – с ГЦР); у 16 был первичный билиарный цирроз, у 10 – криптогенный, у 6 – болезнь Вильсона–Коновалова, у 4 – аутоиммунный гепатит с исходом в цирроз, у 4 – алкогольный цирроз, у 4 – ГЦР, у 4 –

первичный склерозирующий гепатит и у 4 – фульминантная печеночная недостаточность после приема лекарственных средств. У 31 пациента (24,7%) перед трансплантацией имелся гепаторенальный синдром. Троиим пациентам одновременно выполнена трансплантация печени и почки. Четверым проведена ретрансплантация в связи с формированием вторичного билиарного цирроза; одному пациенту осуществлена трансплантация доли печени.

Для решения поставленных задач были сформированы следующие группы сравнения:

А. 13 пациентов, умерших в ранние сроки после операции.

Б. 27 пациентов без осложнений в течение 30 суток после ОТП;

В. 85 пациентов с развившимися осложнениями в первые 30 дней:

Группа **В-1**: 16 больных с осложнениями инфекционного характера (бактериальные: холангит, пневмония, сепсис, нагноение послеоперационных ран; вирусные: герпес, CMV-инфекция; грибковые: кандидоз);

Группа **В-2**: 20 больных, у которых в течение первых 20 дней развился криз острого клеточного отторжения;

Группа **В-3**: 31 больной с гепаторенальным синдромом перед операцией. В том числе: **6** больных, у которых после трансплантации не было проявлений почечной недостаточности; **11** больных, у которых единственным осложнением была почечная недостаточность; **14** больных с развившимися после операции инфекционными осложнениями на фоне ОПН;

Группа **Г** – 11 больных с первичным нефункционированием трансплантата (в том числе 2 больных с плохо функционирующим трансплантатом, умерших на 39-е и 47-е сутки после операции на фоне ПОН).

Для оценки влияния продолжительности времени холодовой ишемии на функцию трансплантата печени были сформированы 4 группы больных:

1 – с временем холодовой ишемии до 360 мин; **2** – от 360 до 480 мин; **3** – от 480 до 600 мин и **4** – более 600 мин.

Для оценки влияния ингибиторов кальцинейрина на течение ОПН сравнивали динамику лабораторных параметров у больных, получавших в качестве базовой иммуносупрессивной терапии циклоспорин А (70 больных) и програф (40 больных). Иммуносупрессия проводилась по многокомпонентному протоколу и включала также преднизолон, производные микофеноловой кислоты, азатиоприн или моноклональные антитела.

Методы исследования

Клинический статус пациентов перед операцией оценивали в баллах по критериям Child-Pugh: функциональный класс А соответствует компенсированной стадии цирроза (сумма баллов 5–6), класс В – субкомпенсированной стадии цирроза (сумма баллов 7–9), класс С – декомпенсированной стадии (сумма баллов более 10–15).

Состояние трансплантата оценивали по результатам 103 морфологических исследований биопсийного материала донорской печени после реперфузии. Верификация криза отторжения с помощью тонкоигольной

биопсии выполнена у 15 пациентов с кризом отторжения, развившимся в первые 30 суток после трансплантации.

Лабораторное обследование включало: клинический анализ крови на гематологическом анализаторе Advia 120 (Bayer, Германия), определение билирубина и его фракций, активности АлАТ и АсАТ, ЩФ, ГГТП, уровня холестерина, исследование белковых фракций сыворотки крови, креатинина и мочевины на автоматическом анализаторе OLYMPUS AU-640 (Япония), исследование параметров свертывающей системы (количество тромбоцитов, протеин С, антитромбин III, АЧТВ, фибриноген) с помощью коагулометра СА 1500 (Sysmex, Япония); определение в крови основных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4+ и CD8+) и иммунорегуляторного индекса с помощью моноклональных антител на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), а также базовой концентрации ингибиторов кальцинейрина в сыворотке крови на приборе TDx (Abbott, США).

Исследования выполняли ежедневно в течение первых 15 дней после трансплантации и далее с интервалом 2–3 дня в зависимости от состояния реципиентов.

Для статистической обработки результатов лабораторных исследований применяли параметрические и непараметрические критерии. Обработку проводили на персональном компьютере в программе Statistica 6,0 (Statsoft, Inc). Вычисляли среднее значение анализируемого показателя, среднее квадратическое отклонение, ошибку среднего. Достоверность различий лабораторных параметров оценивали по критерию Манна–Уитни. Сравнивали величины показателей в группах больных с осложнениями разного характера с показателями больных без осложнений в одни и те же сроки послеоперационного периода. Различия считались достоверными при величине $p < 0,05$.

Для определения наличия и количественной характеристики выраженности связи между отдельными показателями гомеостаза и характером осложнений использовали метод корреляционного анализа с использованием коэффициента корреляции Спирмена (r). Для данного вида статистического анализа использованы абсолютные значения клинико-лабораторных параметров (количественных показателей). Для оценки качественных показателей, характеризующих клинические признаки, проведенной по системе 1 – есть, 0 – нет, использовали критерий χ^2 .

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характер осложнений у реципиентов печени в раннем послеоперационном периоде и влияние до- и интраоперационных факторов на их развитие

Из 112 пациентов после аллотрансплантации трупной печени, выполненной в период с 2000 по 2009, умерли 19 (16,9%), в том числе 13 пациентов (11,6%) – в течение первых 30 суток после операции. Причиной

смерти умерших в первый месяц после операции в 9 случаях была острая печеночная недостаточность вследствие ПНТ, в 4 – печеночно-почечная недостаточность, в 1 – тромбоз печеночной артерии и ПНТ.

Установлено, что на летальный исход ОТП влияет степень тяжести цирроза по шкале Child-Pugh. Из пяти пациентов с циррозом стадии А умерла одна пациентка вследствие ПНТ. Из 49 пациентов с циррозом стадии В умерли трое (6,1%), из 53 пациентов с циррозом стадии С по шкале Child-Pugh умерли 5 человек (9,4%). В течение первой недели после операции умерли также все четверо пациентов, оперированных по поводу фульминантной печеночной недостаточности.

Установлено, что развитие ОКО трансплантата связано с длительностью периода холодовой ишемии. Его продолжительность у больных с отторжением составила $515,1 \pm 18,6$ мин, тогда как у больных без осложнений – $440,4 \pm 20,7$ ($p < 0,05$). На развитие осложнений другого характера время холодовой ишемии не влияло.

В структуре осложнений лидирующее место принадлежало ОПН, которая имела у 44 реципиентов. Количество других осложнений представлено в порядке убывания: инфекционные осложнения развились у 37 реципиентов (бактериальной природы – у 27, вирусной – у 7 и грибковой – у 3 пациентов), ОКО – у 19, ПНТ – у 11, стриктура и несостоятельность желчных анастомозов – у 10, желудочно-кишечные и внутрибрюшинные кровотечения – у 9, ПОН – у 5, нарушения мозгового кровообращения – у 4, тромбозы воротной вены и печеночной артерии – у 4, нарушения психики – у 4, острая сердечная недостаточность – у 2, ДВС-синдром – у 2 пациентов.

Общее число осложнений у больных циррозом вирусной и невирусной этиологии не различалось (75,9% в обеих сравниваемых группах), однако у больных с вирусными циррозами чаще развивалась ОПН и осложнения инфекционного характера: 27 против 14 – в группе больных с невирусными циррозами ($p < 0,01$).

Выявлена зависимость вероятности развития осложнений в раннем послеоперационном периоде от стадии цирроза печени. Из 5 больных с циррозом стадии А по Child-Pugh имелось 2 осложнения, не связанных с исходным состоянием (кровотечение из сосудов сальника с последующей релапаротомией и ПНТ у пациента, умершего на 13-е сутки). Осложнения развились у 27 пациентов из 49 человек с циррозом стадии В (55,1%) и у 40 человек из 53 больных с циррозом стадии С (74,1%), что достоверно выше ($p < 0,05$). Все больные с фульминантной печеночной недостаточностью умерли в течение первых семи суток после операции.

Продолжительность беспеченочного периода у реципиентов не оказала существенного влияния на развитие осложнений и летальный исход в послеоперационном периоде. Средняя продолжительность беспеченочного периода у выживших больных составила $76,3 \pm 7,4$ мин у больных с осложнениями – $83,2 \pm 6,3$ мин, при летальном исходе – $92,8 \pm 6,9$ мин ($p > 0,1$).

Степень тяжести морфологических изменений в пересаженной печени влияла на исход трансплантации. Среди умерших обширные очаги некроза гепатоцитов имелись в трансплантатах печени 6 пациентов, повреждения гепатоцитов средней степени тяжести – у 4 и только у одного – легкой степени. Все они умерли с явлениями нефункционирования трансплантата, ОПН, ПОН.

Анализ изменений лабораторных параметров в зависимости от характера развившихся осложнений

Установлено, что в течение первых 5 дней после операции активность ферментов цитолиза была высокой у всех больных. На фоне проводимой в послеоперационном периоде интенсивной терапии активность АлАТ и АсАТ к 5-м суткам снижалась как у больных без осложнений, так и у больных с развившимися осложнениями разного характера до подпорогового уровня (рис. 1, 2). Однако при отсутствии осложнений она не превышала 700 Ед/л, что определило эту величину как диагностический пороговый уровень для АлАТ и АсАТ. При ПНТ и у больных с ОКО активность АлАТ многократно превышала пороговый уровень, что позволило рекомендовать обязательное исследование этих ферментов на 2-е, 3-и и 5-е сутки после операции для прогноза развития осложнений и их характера.

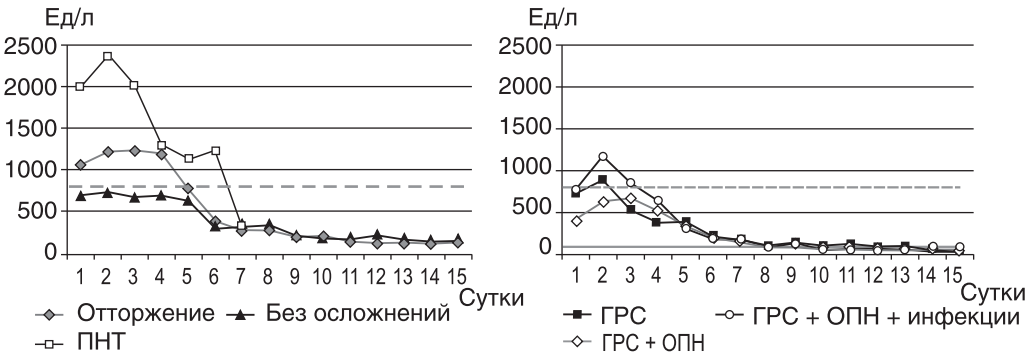


Рис. 1. Динамика АлАТ в первые 15 суток после ОТП при развитии осложнений разного характера: слева – ПНТ и ОКО; справа – ОПН и инфекционные осложнения в сочетании с ОПН у больных с ГРС до операции. Обозначения здесь и далее: сплошная линия – верхняя граница нормы, пунктирная – прогностически значимое пороговое значение

Разнонаправленность динамики концентрации билирубина и показателей активности АлАТ и АсАТ в течение первых пяти суток после операции указывает на первичное нефункционирование трансплантата (рис. 3). При развитии криза острого отторжения повышение уровня билирубина было незначительным и кратковременным и не выходило за пределы установленных нами пороговых значений (170 ммоль/л), так же, как у пациентов

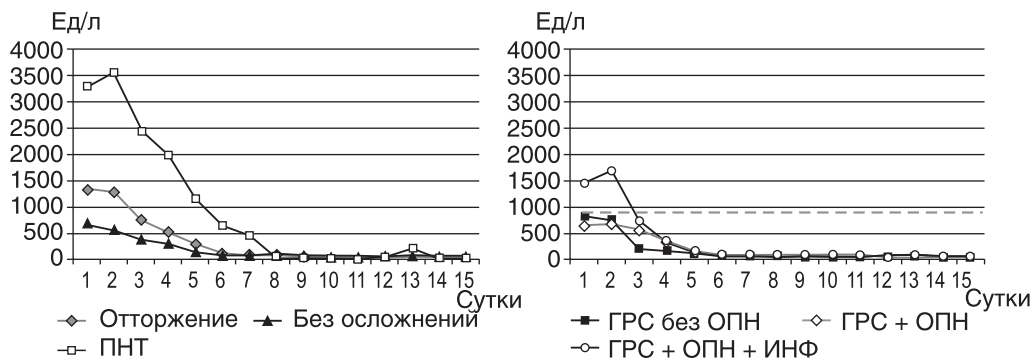


Рис. 2. Динамика АсАТ в первые 15 суток после ОТП при развитии осложнений разного характера: слева – первичное нефункционирование трансплантата и ОКО; справа – ОПН и инфекционные осложнения в сочетании с ОПН у больных с ГРС до операции

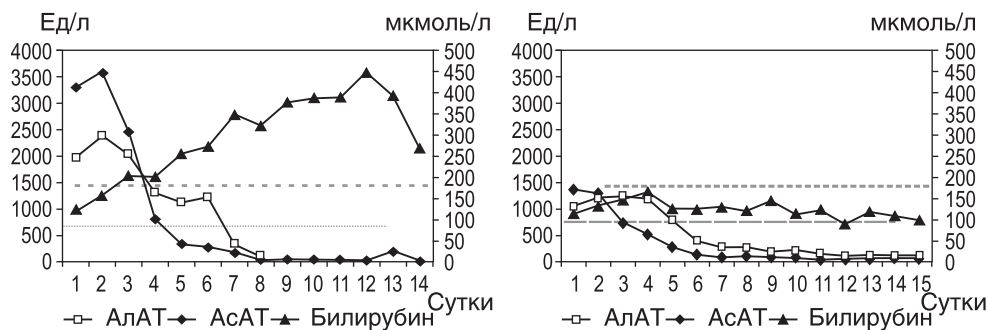


Рис. 3. Динамика трансаминаз и билирубина у пациентов с первичным нефункционированием трансплантата (1), при развитии острого криза отторжения (3). Пунктирной линией обозначена пороговая прогностически значимая концентрация для билирубина, точечной линией – для АсАТ и АлАТ

без осложнений. Это обусловило необходимость рекомендовать исследование билирубина и ферментов цитолиза одновременно в одни и те же сроки.

Повышение активности ЩФ в течение первых трех суток после операции выше установленного нами прогностически значимого порогового уровня – 320 Ед/л – отражает развитие холестаза и может считаться прогностическим маркером ухудшения функции трансплантата. При ПНТ на 3-и сутки активность ЩФ была максимальной – 504 ± 51 Ед/л, а при развитии ОКО и инфекционных осложнений $397 \pm 48,5$ Ед/л и $386 \pm 51,8$ Ед/л соответственно, что достоверно ($p < 0,01$) отличается от средних показателей больных без осложнений в соответствующие сроки – $151 \pm 17,9$ Ед/л.

При определении прогностической значимости ГГТП для развития осложнений были установлены две пороговые концентрации. Одна – 300 Ед/л

на основании того, что при ПНТ, развитии ОКО и осложнений инфекционного характера активность ГТП не превышала этот уровень в течение двух недель после операции. Вторая пороговая концентрация установлена на уровне 500 Ед/л, так как превышение этого уровня с прогрессивным увеличением показателя (коэффициент аппроксимации $R^2 = 0,6483$) после 7 суток зарегистрировано только у больных с ОПН, что позволило считать такие изменения значимыми для прогноза развития этого осложнения.

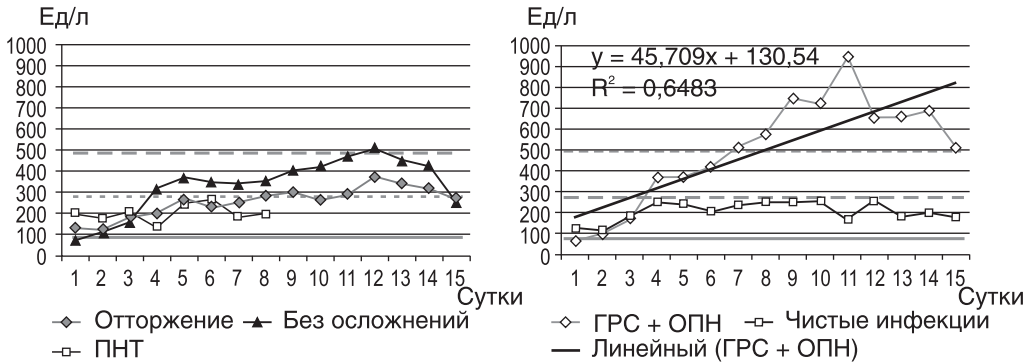


Рис. 4. Динамика ГТП в первые 15 суток после ОТП при развитии осложнений разного характера: 1 – ПНТ и ОКО; 2 – инфекционные осложнения и ОПН у больных с ГРС до операции. Пунктирной линией обозначена первая пороговая прогностически значимая концентрация, точной линией – вторая пороговая концентрация

Исследование динамики концентрации **фибриногена** в зависимости от характера осложнений показало значимые различия только между пациентами, не имевшими осложнений в раннем послеоперационном периоде, и умершими на фоне клинических проявлений ПНТ и печеночно-почечной недостаточности, у которых концентрация фибриногена с 1-х суток была ниже показателей больных других групп и ниже порогового уровня, соответствующего концентрации 1,3 г/л.

Снижение концентрации фибриногена ниже порогового уровня в течение первых 3 суток после трансплантации является прогностическим признаком дисфункции трансплантата и возможного летального исхода.

Активность **антитромбина III** в течение первых 5–7 суток после операции была низкой у пациентов всех групп.

Развитие острой почечной недостаточности в послеоперационном периоде у больных с наличием ГРС до трансплантации сочеталось с более низким уровнем АТ-III в первые и третьи сутки после операции ($50,8 \pm 6,4\%$ и $50,3 \pm 6,2\%$) по сравнению с пациентами, у которых развился криз отторжения ($87,2 \pm 6,7\%$ и $77,4 \pm 4,6\%$) или инфекционным осложнениям ($66,3 \pm 7,9\%$ и $76,7 \pm 5,3\%$). В группе больных без осложнений величина АТ III прогрессивно повышалась с $61,2 \pm 4,9\%$ до уровня нормы ($92,4 \pm 4,7\%$) к 7-м суткам. Низкие показатели АТ III в течение первой недели

после операции без тенденции к увеличению после пятых суток являются признаком дисфункции печени и развития ОПН. Существенное повышение активности Ат III до 120% отмечено у больной с желудочно-кишечным кровотечением на фоне ДВС, а значительное снижение активности до 28% зарегистрировано при развитии тромбоза печеночной артерии у пациентки, погибшей на 7-е сутки после операции.

Исследование динамики альбумина, АЧТВ, протеина С в зависимости от исходов не выявило значимых различий у умерших в ранние сроки и выживших пациентов. Достоверно значимые изменения параметров коагулограммы отмечены только при развитии тромбозов и кровотечений.

Исследование **динамики числа тромбоцитов** после ОТП у пациентов с гладким и осложненным течением послеоперационного периода позволило установить пороговый уровень для тромбоцитов, соответствующий 75 кл/мкл. Тромбоцитопения ниже порогового уровня в течение пяти первых суток отмечена только у пациентов, умерших на фоне ПНТ, и при развитии ОПН у больных с ГРС. При отсутствии осложнений тромбоцитопения была менее выраженной и к 10–12 суткам число тромбоцитов достигало уровня нормы. При развитии ОПН количество тромбоцитов остается на более низком уровне, чем у больных без осложнений до 10 суток, а при развитии ОКО, несмотря на наличие тенденции к увеличению, не достигает нормальных величин и в более поздние сроки.

Проведенный анализ показал, что 3–5-кратное снижение числа тромбоцитов в 1–3-и сутки и отсутствие положительной тенденции после пятых суток является неблагоприятным прогностическим признаком, указывающим на ПНТ или возможность развития ОПН или ОКО.

Исследование **показателей азотного обмена** показало, что у пациентов с ПНТ и ОКО динамика концентрации креатинина была схожей и колебалась в течение первых 7 суток в пределах 100–120 мкмоль/л. При развитии инфекционных осложнений уровень креатинина и его динамика не отличались от показателей больных без осложнений и не превышали 120 мкмоль/л. У больных с ОПН на 2–3-и сутки после операции концентрация креатинина составила в среднем $248 \pm 9,0$ и $211 \pm 9,3$ мкмоль/л соответственно (рис. 5). На основании полученных результатов установлены два пороговых уровня для креатинина: 120 и 200 мкмоль/л. Превышение пороговой концентрации 200 мкмоль/л однозначно указывает на развитие ОПН.

Различия показателей у больных этих групп по сравнению с больными без осложнений в период с 3-х по 10-е сутки достоверны ($p < 0,01$).

Исследование динамики мочевины в крови больных после трансплантации выявило повышение ее концентрации в 4–6,5 раза по сравнению с нормальным уровнем в первые семь суток после операции во всех сравниваемых группах. У всех пациентов, умерших вследствие ПНТ, несмотря на проведение активных методов детоксикации, концентрация мочевины прогрессивно увеличивалась.

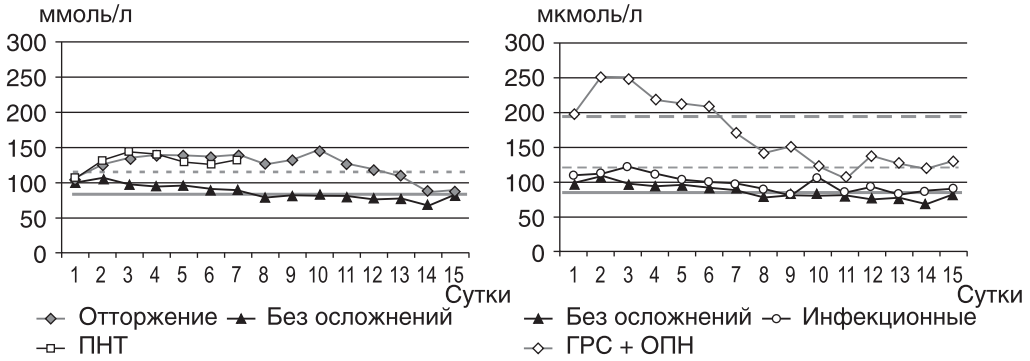


Рис. 5. Динамика креатинина в крови больных после ОТП в зависимости от характера осложнений: 1 – первичное нефункционирование трансплантата, криз острого отторжения; 2 – инфекционные осложнения и ОПН у больных с ГРС до операции по сравнению с пациентами без осложнений. Сплошная линия – среднее значение нормы, пунктирные – пороговые значения

Установлен прогностически значимый пороговый уровень для мочевины, соответствующий 21 ммоль/л, превышение которого после 3 суток без тенденции к снижению к 8-м суткам свидетельствует о ПНТ, развитии ОКО или осложнений инфекционного характера (рис. 6). Концентрация мочевины более 30 ммоль/л зарегистрирована у пациентов с ОПН, что позволило установить второй пороговый уровень, превышение которого после третьих суток является признаком развития этого осложнения.

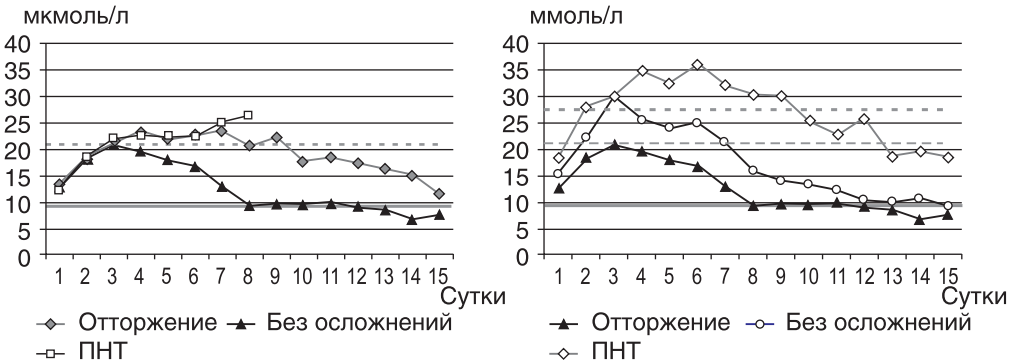


Рис. 6. Динамика мочевины в крови больных после ОТП в зависимости от характера осложнений: 1 – первичное нефункционирование трансплантата, криз острого отторжения; 2 – инфекционные осложнения и ОПН у больных с ГРС до операции по сравнению с пациентами без осложнений. Сплошная линия – среднее значение нормы, пунктирные – пороговые значения

Исследование динамики **иммунорегуляторного индекса (ИРИ)**, отражающего состояние лимфоцитарного звена иммунной системы, выявило существенные различия у пациентов с разными исходами после ОТП во все сроки наблюдения. В первые сутки после операции величина ИРИ у больных без осложнений ($1,6 \pm 0,1$) была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем у пациентов с летальным исходом – $1,2 \pm 0,2$

Начиная с третьих суток после ОТП у пациентов без осложнений значения ИРИ увеличивались, достигая уровня нормы к 4–5-м суткам. У пациентов с ПНТ отмечена противоположная тенденция – прогрессивное снижение величины ИРИ до $0,8 \pm 0,2$ к 5-м суткам без тенденции к нормализации. При развитии ОПН или инфекционных осложнений снижение ИРИ было кратковременным и после 5-х суток приближалось к норме. Снижение ИРИ в период с 5-х по 10-е сутки отмечен при развитии криза отторжения. На 9-е сутки у больных с ОКО средняя величина ИРИ составляла $1,5 \pm 0,1$, а у больных без осложнений – $2,6 \pm 0,2$, что достоверно выше ($p < 0,01$).

Влияние ингибиторов кальцинейрина на развитие острой почечной недостаточности после трансплантации печени

Базовая концентрация **циклоsporина** в первые 15 дней после операции у пациентов, не имевших осложнений в раннем послеоперационном периоде, менялась в пределах $72,7 \div 305,6$ нг/мл, а у больных с развившейся ОПН – в пределах $86,9 \div 374,5$ нг/мл, средние концентрации составили, соответственно, $193,6 \pm 17,3$ нг/мл и $174,8 \pm 12,8$ нг/мл. При этом среднесуточные дозы ЦсА у больных без осложнений были достоверно ($p < 0,01$) выше, чем у больных с ОПН и составили, соответственно, $288,8 \pm 17,8$ и $218,1 \pm 9,8$ нг/мл (табл. 1).

Базовая концентрация **прографа** в первые 15 дней после операции у пациентов без осложнений менялась в пределах $2,4 \div 9,9$ нг/мл, а у больных с развившейся ОПН – в более широком диапазоне: $0,8 \div 14,0$ нг/мл, средние концентрации составили, соответственно, $7,2 \pm 0,71$ нг/мл и $7,9 \pm 1,76$ нг/мл (табл. 1). При этом среднесуточные дозы прографа, получаемые пациентами сравниваемых групп, не различались ($3,1 \pm 0,53$ нг/мл у больных с ОПН и $3,2 \pm 0,46$ нг/мл у больных без осложнений).

Результаты исследования динамики мочевины и креатинина показали, что, несмотря на сопоставимые или даже более высокие суточные дозы иммуносупрессивных препаратов, получаемые пациентами с гладким течением послеоперационного периода, повышение значений этих показателей у них было незначительным, кратковременным и не превышало пороговый уровень (рис. 7).

На фоне проводимой интенсивной дезинтоксикационной и заместительной почечной терапии концентрации продуктов азотного обмена уменьшались, однако средние значения мочевины оставались на уровне, превышающем пороговые значения, более 14 дней.

Таблица 1

Изменение суточных и базовых концентраций прографа и циклоспорина в зависимости от развития острой почечной недостаточности

Препараты	Группы больных	Кол-во проб	Суточная доза	Кол-во проб		Базовая концентрация	
			разброс	М ± m		разброс	М ± m
Програф (нг/мл)	ОПН	87	1,4 ÷ 5,8	3,1 ± 0,53	29	0,8 ÷ 14,0	7,9 ± 1,7
	Без осложн.	130	1,4 ÷ 6,3	3,2 ± 0,46	44	2,4 ÷ 9,9	7,2 ± 0,7
Циклоспорин (нг/мл)	ОПН	225	114,3 ÷ 335,0	218,1 ± 9,8	129	86,9 ÷ 374,5	174,8 ± 12,8
	Без осложн.	169	100,0 ÷ 376,7	288,8 ± 17,8	92	72,7 ÷ 305,6	193,6 ± 17,3

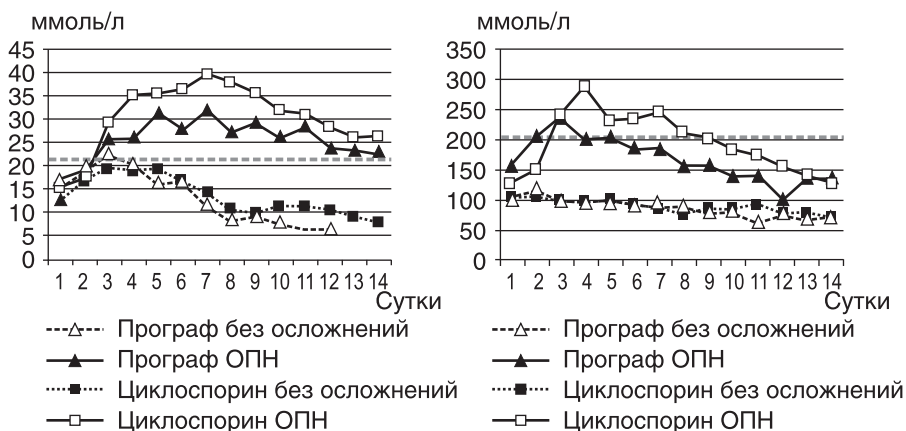


Рис. 7. Динамика мочевины (1) и креатинина (2) после трансплантации у больных с ОПН и больных без осложнений на фоне иммуносупрессивной терапии. Пунктирная линия – пороговое значение соответствующего параметра, сплошная линия – уровень нормы

Средние значения креатинина у больных, получавших Пф, снизились до подпорогового уровня на 10-е сутки, а у больных, получавших ЦсА, только на 13–14-е сутки. Индивидуальный анализ динамики мочевины и креатинина показал, что негативное влияние ЦсА и Пф на функцию почек в раннем послеоперационном периоде было отмечено только у пациентов с уже имеющейся почечной недостаточностью, что проявилось повышением величин этих показателей начиная со 2-х суток после трансплантации на фоне приема ингибиторов кальциневрина. На фоне приема ЦсА повышение мочевины и креатинина начиная с 3-х суток было более выраженным

и длительным, чем на фоне приема Пф. Это отражает более выраженное негативное влияние на функцию почек ЦсА по сравнению с Пф. Различия между средними значениями концентрации мочевины были достоверными на 4-е, с 6-х по 8-е ($p < 0,01$) и на 9-е ($p < 0,05$) сутки, а между средними значениями концентрации креатинина – на 4-е и с 6-х по 12-е ($p < 0,01$) сутки.

Значимые для прогноза развития осложнений лабораторные параметры и сроки их изменения представлены в табл. 2.

Для прогноза развития осложнений после трансплантации целесообразно анализировать динамику параметров клеточного цитолиза, ферментов холестаза, число тромбоцитов, фибриноген, АТ III, ИРИ и концентрацию продуктов азотного обмена в 1-е, 3-и, 5-е и 7-е сутки после операции. При осложненном тяжелом течении послеоперационного периода спектр и частота выполняемых исследований могут быть расширены с учетом клинической картины.

ВЫВОДЫ

1. Основной причиной смерти реципиентов печени в раннем послеоперационном периоде было первичное нефункционирование трансплантата. В структуре ранних послеоперационных осложнений доминировали острая почечная недостаточность (39,3%), инфекционные (33%), острый криз отторжения (16,9%), первичное нефункционирование трансплантата (9,8%).
2. Значимыми лабораторными показателями для прогноза осложнений и летальности после трансплантации печени являются: активность ферментов цитолиза, холестаза, параметры свертывающей системы крови, концентрация продуктов азотного обмена, уровень тромбоцитов и величина иммунорегуляторного индекса. Определены их диагностически и прогностически значимые пороговые уровни, динамика изменений в ранние сроки после трансплантации при развитии таких осложнений, как первичное нефункционирование трансплантата, острое клеточное отторжение, острая почечная недостаточность.
3. Определены факторы риска развития осложнений в раннем посттрансплантационном периоде. На развитие ОКО, ОПН, осложнений инфекционного характера достоверно влияют: вирусная этиология цирроза печени, продолжительность беспеченочного периода (более $515 \pm 18,6$ мин) и времени холодовой ишемии (более $97,2 \pm 6,6$ мин), тяжесть состояния реципиента перед трансплантацией (класс В и С по Child-Pugh), морфологические признаки повреждения трансплантата средней и тяжелой степени.
4. Циклоспорин и програф оказывают значительное нефротоксическое действие начиная с 3-х суток после трансплантации только у пациентов с уже имеющейся почечной недостаточностью, что проявлялось повышением концентрации креатинина и мочевины выше установленных

Таблица 2

Значимые изменения лабораторных параметров для прогноза развития осложнений после трансплантации печени

Осложнения	Лабораторные параметры и сроки их изменений										
	АЛТ	АсАТ	Билирубин	ЩФ	ГГТП	Фибриноген	АгШ	Тромбоциты	Креатинин	Мочевина	ИРИ
ПНТ	>1500 Ед/л более 3 сут	>2500 Ед/л в 1-3-и сут	>150 ммоль/л со 2-х сут	>320 Ед/л в 1-7-е сут	Меньше 300 Ед/л в 1-7-е сут	<1,3 г/л с 1-х сут	<55% с 5-х по 7-е сут	<75 кл/мкл с 1-х сут	100÷150 МКМоль/л в 1-10-е сут	>20 ммоль/л с 3-х по 9-е сут	<1,5 с 1-х сут
Острое отторжение	1000÷1500 Ед/л в 1-4-е сут	>1000 Ед/л в 1-3-и сут	>100 ммоль/л с 1-х сут	>320 Ед/л на 2-5-е сут	Меньше 300 Ед/л в 1-7-е сут				100÷150 МКМоль/л в 1-10-е сут	> 20 ммоль/л с 3-х по 9-е сут	<1,5 с 3-х сут
Инфекционные			>100 ммоль/л с 1-х сут	>220 Ед/л с 1-х сут						20÷30 ммоль/л со 2-х по 9-е сут	>2,0 после 5-х сут
ОПН					>300 Ед/л после 4-х сут		<50% с 1-х по 7-е сут	<75 кл/мкл с 1-х по 6-е сут	>150 МКМоль/л с 1-х сут	>30 ммоль/л с 3-х сут	

пороговых уровней 200 и 21 ммоль/л соответственно. Более выраженное негативное влияние на функцию почек оказывал циклоспорин по сравнению с прографом.

5. С учетом сроков максимальных изменений диагностически значимых лабораторных параметров, их динамики и степени выраженности отклонений от уровня пороговых значений разработан оптимальный алгоритм лабораторного мониторинга после трансплантации печени.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование количества тромбоцитов, уровней трансаминаз, билирубина, креатинина, мочевины, щелочной фосфатазы необходимо проводить до операции, в 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14-е сутки после операции, активированного частичного тромбинового времени – до операции, на 2-е, 3-и, 5-е сутки, антитромбина III – в 1, 3, 5, 7-е сутки, иммунорегуляторного индекса – в 1, 3, 5, 7, 10-е сутки после операции.
2. Повышение активности АЛАТ до 1500 Ед/л и более после 3 суток, АсАТ – до 2500 Ед/л с 1 по 3 сутки, щелочной фосфатазы до 320 Ед/л с 1-х по 7-е сутки, снижение активности ГГТП до 300 Ед/л и ниже с 1-х по 7-е сутки, увеличение концентрации билирубина до 150 мкмоль/л и выше со 2-х суток, изменение креатинина в пределах 100÷150 мкмоль/л с 1-х по 10-е сутки, мочевины до 20–30 ммоль/л с 3-х по 9-е сутки, снижение фибриногена до 1,3 г/л и менее с 1-х суток, антитромбина III до 55% с 5-х по 7-е сутки, тромбоцитов о 75 кл/мкл и менее с 1-х суток, иммунорегуляторного индекса менее 1,5 с 1-х суток являются достоверными признаками первичного нефункционирования трансплантата.
3. Признаками развития острого криза отторжения являются: активность АЛАТ в пределах 1000÷1500 Ед/л с 1-х по 4-е сут, АсАТ >1000 Ед/л с 1-х по 3-и сут, билирубина >100 ммоль/л с 1-х суток, щелочной фосфатазы >320 Ед/л со 2-х по 5-е сутки, активность гаммаглутамилтранспептидазы <300 Ед/л с 1-х по 7-е сутки, изменение креатинина в пределах 100÷150 мкмоль/л с 1-х по 10-е сутки, мочевины >20 ммоль/л с 3-х по 9-е сутки, снижение иммунорегуляторного индекса <1,5 с 3-х суток.
4. Превышение с 1-х суток концентрации билирубина значения 100 ммоль/л, активности щелочной фосфатазы – 220 Ед/л, изменение мочевины в пределах 20÷30 ммоль/л со 2-х по 9-е сутки, повышение ИРИ боле 2,0 с 5-х суток свидетельствуют в пользу развития осложненный инфекционного характера.
5. Достоверным признаком развития острой почечной недостаточности являются: концентрация креатинина более 200 мкмоль/л с 1-х суток, концентрация мочевины более 30 ммоль/л с 1-х суток, высокая активность ГГТП (более 300 Ед/л) на 4-е сутки с прогрессивным повышением в последующие сроки, снижение антитромбина III < 50% с 1-х по 7-е сутки и тромбоцитов <75 кл/мл с 1-х по 6-е сутки.

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Журавель С.В., Кузнецова Н.К., **Шадрин К.Б.**, Луцык К.Н. Интенсивная терапия при трансплантации печени // В материалах 8 Международной специализированной выставки «Аптека 2001» / Третья международная ассамблея «Новые медицинские технологии». – М., 2001. – С. 63–64.
2. Кузнецова Н.К., Журавель С.В., Луцык К.Н., **Шадрин К.Б.**, Чжао А.В. Демонстрация клинического случая проведения анестезиологического пособия у больного с трансплантированной печенью // Альманах анестезиологии и реаниматологии (Материалы 2-й сессии Московского научного общества анестезиологов и реаниматологов). – Январь 2000 г. – 2001. – № 1. – С. 18.
3. Чжао А.В., Александрова И.В., Андрейцева О.И., Журавель С.В., Джагравев К.Р., Гуляев В.А., Погребниченко И.В., Чугунов А.О., Долова Л.В., Луцык К.Н., Новрузбеков М.С., Кузнецова Н.К., Киселев В.В., Козлова А.В., **Шадрин К.Б.**, Рябов Е.Б., Галкина Г.С., Первакова Э.И., Артамонов В.В., Родионова Ю.В. Опыт трансплантации печени в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение № 29. Материалы 12-й Российской конференции «Гепатология сегодня», 19–21 марта 2007. – № 1. – Т. 17. – 2007. – С. 5.
4. Хубутия М.Ш., Чжао А.В., **Шадрин К.Б.** Послеоперационные осложнения у реципиентов при трансплантации печени: современные представления о патогенезе и основных направлениях профилактики и лечения. Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 2. – С. 60–66.
5. Чжао А.В., Журавель С.В., Андрейцева О.И., Никулина В.П., **Шадрин К.Б.** Опыт ранней отмены стероидов у пациентов после трансплантации печени. Материалы конференции «Клиническая трансплантация органов (актуальные вопросы)». – Москва, 26–27 сентября 2007. – С. 96–97.
6. **Шадрин К.Б.**, Журавель С.В. Диагностическая ценность лабораторного мониторинга после трансплантации печени // Материалы I конференции Межрегиональной общественной организации «Общество трансплантологов». – Москва, 18 апреля 2009. – С. 6.
7. **Шадрин К.Б.**, Хубутия М.Ш. Лабораторный мониторинг при трансплантации печени // Трансплантология. – 2010. – № 1. – С. 106–108.

**VI. УКАЗАТЕЛЬ РАБОТ
ОТЕЧЕСТВЕННЫХ АВТОРОВ
В ОБЛАСТИ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ
В ЗАРУБЕЖНЫХ ИЗДАНИЯХ
В 2010 г.**

1. **Agapov I.I., Bogush V.G., Moisenovich M., Sevastianov V., Debabov V., Kirpichnikov M.** Artificial analogues of spider silk proteins for regenerative medicine. The ninth international conference «High medical technologies in XXI century» October 24–31, 2010, Spain Benidorm, materials of conference. P. 51.
2. **Antonenko Y.N., Perevoshchikova I.V., Davydova L.I., Agapov I.I., Bogush V.G.** Interaction of recombinant analogs of spider silk proteins 1F9 and 2E12 with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1798(6): 1172–8.
3. **Gautier S.V., Tsiurlikova O.M., Ammosov A.A., Gichkun O.E., Pitshulina M.E., Kuncovich N.V., Shevchenko O.P.** Pediatric living donors liver transplantation: soluble CD40 ligand as an early predictor of graft dysfunction. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
4. **Iljinsky I.M., Kurenkova L., Schkalova L., Minina M., Ammosov A.A., Moisiuk J.G., Tsiurlikova O.M., Gautier S.V.** Liver morphology of potential live donors of segments of liver. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
5. **Kupriyanova A.G., Beletskaya L., Golts A., Saitgareev R.** Visualization of the altered cytoskeletal protein localization in cardiomyocytes of cardiomyopathy patients. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
6. **Lazebnik L., Onishchenko N.A., Lyundup A.V., Trubitsyna I.E., Knyazev O.V., Deev R.V., Krasheninnikov M.E., Shagidulin M.Y.** Regeneration of toxic damaged liver in rats after introduction of mesenchymal stromal bone marrow cells // 6th Central European gastroenterology meeting. Book of Abstracts. 2010. P 6.
7. **Lyundup A.V., Krasheninnikov M.E., Shagidulin M.Y., Onishchenko N.A.** Application of bone marrow MSC to liver regenerative medicine // Mesenchymal stem cells in Solid Organ Transplantation 2nd Expert Meeting, January 17th–18th, 2010.
8. **Moisenovich M., Ol'shevskaya V., Rokitskaya T., Ramonova A., Nikitina R., Savchenko A., Tatarskiy V., Kaplan M., Kalinin V., Kotova E., Uvarov O., Agapov I., Antonenko Y., Shtil A.** Novel Photosensitizers trigger rapid death of malignant human cells and rodent tumor transplants via lipid photodamage and membrane permeabilization. *PLoSone*, September 2010, volume 5.
9. **Moisenovich M., Pustovalova O., Arhipova A., Vasiljeva T., Sokolova O., Bogush V., Debabov V., Sevastianov V., Kirpichnikov M., Agapov I.** In vitro and in vivo biocompatibility studies of a recombinant analogue of spider silk scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research, Part 2*, volume 96A, pages 125–131.
10. **Morozova V., Abramov V., Baranova F.S., Moisiuk J.G., Gautier S.V.** Contradictory impact of donor type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) gene promoter polymorphism on renal allograft survival. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
11. **Orlova O.V., Shevchenko A.O., Kazakov E.N., Kormer A.J., Shevchenko O.P.** Homocystein, anti-cardiolipin antibodies and soluble CD40 ligand in heart transplant recipients. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.

12. **Pashkovskaya A., Kotova E., Zorlu Y., Dumoulin F., Ashen V., Agapov I., Antonenko Y.** Light-triggered liposomal release: membrane permeabilization by photodynamic action. *Langmuir*. 2010; 26 (8): 5726–33.
13. **Perova N., Sevastianov V.** Main principles of the pre-clinical assessment of tissue engineered implants. The ninth international conference «High medical technologies in XXI century» October 24–31, 2010, Spain Benidorm, materials of conference. P. 52.
14. **Reznik O., Ananyev A., Loginov I., Skvortcov A., Bagnenko S., Moisiuk J.G.** Extracorporeal normothermic abdominal perfusion «in situ» by leucocytes-free oxygenated blood as resuscitation practice for kidneys from uncontrolled donors with one hour warm ischemic time. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
15. **Sevastianov V., Perova N., Nemets E.** Pre-clinical and clinical study of Russian biopolymer implants for replacement and regenerative surgery of soft tissues. The ninth international conference «High medical technologies in XXI century» October 24–31, 2010, Spain Benidorm, materials of conference. P. 52.
16. **Shagidulin M., Krasheninnikov M., Lyundup A., Iljinsky I., Mogeinko N., Petrova N., Sevastjanov V., Onishchenko N., Gautier S.** «Transplantation of multipotent MSC seeded on biodegradable heterogenous carrier for stimulation of reparative processes in damaged organs» // Mesenchymal stem cells in Solid Organ Transplantation 2nd Expert Meeting, January 17th–18th, 2010.
17. **Shagidulin M., Onishchenko N., Krasheninnikov M., Iljinsky I., Mogeiko N., Lyundup A., Nemets E., Sevastjanov V., Gautier S.** Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure // ESSR. – 2010. – P. 149–150.
18. **Shagidulin M., Onishchenko N., Krasheninnikov M., Iljinsky I., Mogeiko N., Lyundup A., Shmerko N., Andriyanova A., Nemets E., Sevastjanov V., Gautier S.** Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure // Medimond. International Proceedings. – 2010. – P. 83–86.
19. **Sharshatkin A.V., Azarenkova O.V., Pulkova N., Myloserdov I., Solomina Y., Moisiuk J.G.** The influence of immunosuppressive therapy based on calcineurin inhibitors on living kidney transplantation outcomes. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
20. **Shevchenko O.P., Orlova O.V., Kazakov E.N., Kormer A.J., Shevchenko A.O.** Placenta growth factor is associated with cardiac allograft vasculopathy. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
21. **Shevchenko O.P., Pitshulina M.E., Gichkun O.E., Kuncevich N.V., Ammosov A.A., Tsurulnikova O.M., Gautier S.V.** Plasma levels of soluble CD30 and neopterin in pediatric living donors liver transplantation. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.
22. **Stolyarevich E.S.** Switching from Cyclosporine to Tacrolimus: beneficial effect in patients with late acute rejection. XXIII International Congress of The Transplantation Society, August 15–19, 2010, Vancouver, Canada.

- 23. Tihobaeva A.A., Basok Y.B., Alekseeva O.S., Salomatina L.A., Sevastianov V.I.** Development And Preclinical Trials Of Matrix Transdermal Acetylsalicylic Acid Delivery System. 1st Russian – Hellenic Symposium on Polymeric Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Advances Safety and Toxicology Issues. (3–9 May, 2010, Heraklion, Crete-Greece). Abstract book, 2010, P. 47.
- 24. Vasilets V., Egorova V., Sevastianov V.** Evaluation of biological safety for plasma-polymer treatment. Abstracts of XII-th international Conference on Plasma Surface Engineering (Garmisch-Partenkirchen, Germany, September 13–17, 2010), 2010, P. 293.

**VII. ВСЕРОССИЙСКИЕ
КОНФЕРЕНЦИИ
ПО ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫМ ОРГАНАМ,
СОСТОЯВШИЕСЯ В 2010 г.**

ВСЕРОССИЙКИЕ КОНФЕРЕНЦИИ ПО ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫМ ОРГАНАМ, СОСТОЯВШИЕСЯ В 2010 г.

№ п/п	Дата	Название	Место проведения
1	14 февраля 2010 г.	Всероссийская конференция «Трансплантация печени в России: 20 лет спустя»	ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1
2	10–11 сентября 2010 г.	Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы трансплантологической помощи»	ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», г. Саратов, ул. Университетская, д. 59. ГУЗ «Саратовская областная клиническая больница», г. Саратов, Смирновское ущелье, д. 1
3	8–10 октября 2010 г.	V Всероссийский съезд трансплантологов	ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1
4	24–27 ноября 2010 г.	Всероссийский форум «Пироговская хирургическая неделя». Конференция «Трансплантация органов в России, современное состояние проблемы»	Гостиница Park Inn «Прибалтийская», г. Санкт-Петербург, ул. Кораблестроителей, д. 14

5	3 декабря 2010 г.	Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы трансплантологической помощи»	ГУЗ «Воронежская областная клиническая больница», г. Воронеж, Московский проспект, д. 151
---	----------------------	---	---

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

Подписано к печати 17.05.2011. Формат бумаги 72×104 1/16. Усл. печ. л. 29.
Тираж 1000 экз.

Заказ №

Отпечатано в филиале ОАО «ТОТ» Ржевская типография
(172390, Тверская область, г. Ржев, ул. Урицкого, д. 91).

