**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**Республиканский научно-практический центр
трансфузиологии и медицинских биотехнологий**

ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

(по результатам завершения подпрограммы
«Трансплантология и регенеративная медицина»
ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики»,
2011–2015 гг.)

Сборник научных трудов

Выпуск 1

Минск

2016

УДК 616-089.843+616-033.93](082)
ББК 28.03
Т65

Сборник научных трудов

Рекомендовано к изданию Ученым советом РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (протокол заседания от 22.10.2016 № 6)

Под редакцией:
д-ра мед. наук, проф. М.П. Потапнева (гл. редактор)
д-ра мед. наук, проф. А.И. Свирновского (зам. гл. редактора)

Ответственный редактор
канд. мед. наук, доц. Т.Н. Глинская

Технический редактор
канд. мед. наук, доц. С.М. Космачева

Члены редакционной коллегии:
канд. биол. наук Н.Д. Расюк,
канд. биол. наук Т.М. Дорошенко,
канд. мед. наук М.В. Злотникова,
канд. мед. наук Г.В. Семенов,
канд. хим. наук, доц. С.П. Марцев,
канд. биол. наук В.В. Пасюков

Рецензенты:
д-р мед. наук, проф. О.О. Руммо,
канд. мед. наук, доц. И.И. Пикиреня

Т65 **Трансплантология** и регенеративная медицина: достижения и перспективы [Электронный ресурс]: сб. науч. тр. (по результатам завершения подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», 2011–2015 гг.) / М-во здравоохр. Респ. Беларусь, РНПЦ трансфузиологии и мед. биотехнологий; под ред. М.П. Потапнева, А.И. Свирновского. — Минск: РНМБ, 2016. — Вып. 1. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

ISBN 978-985-7044-36-8

В сборнике научных трудов представлены статьи, отражающие результаты завершенных заданий подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики» (2011–2015 гг.). Авторами рассмотрены современные технологии и методы трансплантации органов и тканей, проведения клеточной терапии, вопросы профилактики осложнений и ведения пациентов после трансплантации органов, прикладные аспекты смежных дисциплин, включая подходы к повышению эффективности лечения соматических заболеваний.

Издание предназначено для научных работников, аспирантов и врачей-специалистов, занимающихся теоретическими и прикладными вопросами трансплантологии и регенеративной медицины, смежными вопросами (онкология, онкогематология, гематология, клиническая лабораторная диагностика, трансфузиология, иммунология и др.).

УДК 616-089.843+616-033.93](082)
ББК 28.03

ISBN 978-985-7044-36-8

© Составление. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, 2016.
© Оформление. ГУ «Республиканская научная медицинская библиотека», 2016.

Уважаемые читатели!

Данное издание открывает выпуск сборников научных трудов, посвященных проблемам трансплантологии и регенеративной медицины.

Первый выпуск сборника научных трудов включает представление и анализ результатов выполнения подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» государственной научно-технической программы «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики», 2011–2015 гг.

В нем обобщены новые технологии диагностики и лечения, используемые при трансплантации почек, печени, сердца. Представлены первые клинические результаты применения мезенхимальных стволовых клеток, а также новые аспекты пересадки гемопоэтических стволовых клеток. Широк спектр заболеваний, при которых применяется трансплантация органов, тканей, клеток. Он включает сердечно-сосудистые, онкологические, ортопедические, пульмонологические, нейродегенеративные заболевания, болезни почек, печени и др.

В сборнике представлены оригинальные статьи авторов, что позволяет оценить как методологию, так и практическую ценность полученных результатов научных исследований.

Надеюсь, что сборник будет полезен для широкого круга врачей и научных работников, интересующихся современными подходами в трансплантации органов, тканей, стволовых клеток.

С пожеланиями профессиональных и творческих успехов,

главный редактор доктор медицинских наук,
профессор М.П. Потапнев

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПОДПРОГРАММЫ «ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА» ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ «НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ» (2011–2015)

Космачева С.М., Глинская Т.Н.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Трансплантология — сравнительно молодая, но быстро развивающаяся и весьма перспективная область медицины. Развитие технологий клеточной терапии и органной трансплантации, создание тканеинженерных конструкций и биотрансплантатов позволяют решать проблему восстановления утраченных функций и тканей организма при многих тяжелых заболеваниях и последствиях травм. Не вызывает сомнения, что такое динамично развивающееся направление нуждается в научных изысканиях по разработке и обоснованию используемых технологий с позиций доказательной медицины. Определенный блок исследований реализован в рамках 36 заданий подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» (2011–2015 гг). Основным результатом реализации подпрограммы является внедрение в практику отечественного здравоохранения методов регенеративной медицины, позволяющих существенным образом улучшить результаты лечения многих социально-значимых заболеваний. В статье систематизирована информация об основных результатах выполнения подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина», включая оценку социально-экономической эффективности.

Ключевые слова: научно-техническая программа, медицинская технология, трансплантология, регенеративная медицина, медицинская, социальная, экономическая эффективность.

Введение. Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий (далее — Центр) является ведущим научным учреждением страны, одним из приоритетных направлений научной деятельности которого является разработка клеточных технологий в трансплантационной и регенеративной медицине и создание прикладных биотехнологий медицинского назначения. К фундаментальным достижениям Центра, обусловившим возможность выполнения прикладных исследований, в т. ч. в рамках подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина», можно отнести теоретическое обоснование и разработку методов выделения и культивирования гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга, периферической/пуповинной крови человека, мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга, жировой ткани, пуповины человека и плаценты, получение новых экспериментальных данных о достижении направленной дифференцировки стволовых клеток в различных направлениях, включая миелопоэз и эритропоэз для гемопоэтических стволовых клеток, гепато-, хондро-, нейро-, остеогенное и эндотелиальное направления — для мезенхимальных стволовых клеток человека. В результате исследований подобраны оптимальные условия и адаптированы протоколы выделения стволовых клеток, направленной дифференцировки в различных направлениях и экспансии, что явилось базовой основой для дальнейших прикладных научных исследований и последующего внедрения результатов в практическую деятельность. При проведении фундаментальных исследований специалисты Центра тесно сотрудничают с учеными других научных учреждений страны, что позволяет расширить спектр исследований, ускорить получение результатов, рационально использовать материальные ресурсы. В 2015 г. научно-практическим коллективом Центра и коллективами других научных организаций — исполнителей заданий — завершено выполнение подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» (2011–2015 гг). В рамках 35 оригинальных исследований ученых более десятка научных организаций получены значимые научные и практические результаты, прежде всего направленные на удовлетворение потребностей практического здравоохранения в эффективных технологиях трансплантологии, клеточной и регенеративной медицины. Оценка и анализ полученных результатов с доказательной точки зрения, обоснование медицинской и социально-экономической эффективности от реализации заданий подпрограммы направлены на популяризацию научных достижений и будут способствовать распространению передового опыта.

Цель работы — анализ результативности выполнения подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» за 2011–2015 гг.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили данные отчетов о НИОК(Т)Р исполнителей отдельных заданий, данные об освоении научно-технической продукции, материалы отчета по научно-организационному сопровождению подпрограммы. Использовались методы системного и медико-социологического анализа, расчета и анализа экономической эффективности.

Результаты и их обсуждение. Основными результатами выполнения подпрограммы являются разработанные технологии и методы диагностики и лечения, используемые в трансплантологии, регенеративной медицине и смежных дисциплинах. Итоги выполнения наиболее значимых заданий представлены ниже.

В результате выполнения задания 01.01 «Разработать способ иммунотерапии больных туберкулезом с множественной и широкой лекарственной устойчивостью с использованием аутологичных культур дендритных клеток, выделенных из костного мозга, праймированных антигенами микобактерий» разработан метод иммунотерапии с использованием культур аутологичных дендритных клеток, праймированных антигенами микобактерий, выделенных из костного мозга пациентов с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Метод иммунотерапии позволяет повысить эффективность лечения заболевания, что подтверждается положительной клинико-рентгенологической динамикой, нормализацией основных гематологических, биохимических показателей, показателей клеточного иммунитета и увеличением пула антигенспецифических Т-клеток периферической крови, абациллированием в более ранние сроки (у 83,3% пациентов опытной группы абациллирование было достигнуто в срок до 2 мес). Метод позволяет сократить необходимость пребывания пациентов в стационаре, улучшить клинический прогноз. Разработчиками подготовлены и внедрены инструкции по применению «Метод обеспечения и оценки безопасности иммунотерапии аутологичными дендритными клетками пациентов с онкологическими, хроническими инфекционными и аутоиммунными заболеваниями» и «Метод иммунотерапии пациентов

с туберкулезом с множественной и широкой лекарственной устойчивостью с использованием аутологичных культур дендритных клеток, выделенных из костного мозга, праймированных антигенами микобактерий».

В результате выполнения задания 01.02 «Разработать и внедрить способ ранней диагностики вирусных осложнений у реципиентов после трансплантации почки, изучить их этиологическую структуру» на основе оптимизации современных лабораторных методов разработан способ ранней диагностики вирусных осложнений у реципиентов почки. Разработчиками предложены алгоритм и схема вирусологического обследования доноров почки и реципиентов, основанные на применении технологий серо- и генодиагностики. Внедрение инструкции по применению «Алгоритм лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки» позволяет уменьшить риск возникновения нежелательных посттрансплантационных осложнений и, следовательно, снизить расходы на их лечение, сократить сроки пребывания реципиентов в стационаре и улучшить качество их жизни.

В результате выполнения задания 01.04 «Разработать и внедрить метод оценки иммунологической реконституции у детей и подростков после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» разработан метод диагностики иммунологических нарушений у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток и определены группы риска по развитию посттрансплантационных осложнений. Внедрение инструкции по применению «Метод диагностики иммунологических нарушений у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» позволяет снизить длительность стационарного лечения реципиентов гемопоэтических стволовых клеток, уменьшить число повторных госпитализаций, увеличить показатель выживаемости.

Выполнение задания 01.05 «Разработать технологию *ex vivo* получения трансплантата натуральных киллерных клеток для целей противоопухолевой клеточной иммунотерапии для пациентов с онкологическими заболеваниями» позволило разработать технологию получения трансплантата натуральных киллерных клеток и метод лечения острого миелобластного лейкоза с применением адоптивной иммунотерапии. Показаниями к данному методу лечения являются наличие химиорезистентной формы онкологического заболевания, наличие остаточных опухолевых клеток на момент окончания основной противоопухолевой терапии, отсутствие подходящего донора для проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Медицинский и социально-экономический эффект достигается за счет улучшения показателей выживаемости пациентов с онкологическими заболеваниями.

В результате выполнения задания 01.06 «Разработать и внедрить методику оценки функционального состояния почек и эффективности иммуносупрессивной терапии при трансплантации органа методом спинового зондирования сыворотки» разработан неинвазивный и высокочувствительный метод диагностики патологии трансплантата почки (острое отторжение) и суммарной оценки его функционального состояния на основе измерения функциональной активности сывороточного альбумина методом электронного парамагнитного резонанса спинового зонда 16 доксилстеарата. Метод оценки функционального состояния трансплантата почки на основе показателя функциональной активности сывороточного альбумина изложен в одноименной инструкции и внедрен в практику работы Республиканского научно-практического центра «Трансплантации органов и тканей» на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска. Использование данного метода позволяет расширить возможности диагностики заболеваний почечного трансплантата в раннем и отдаленном периоде после операции и, следовательно, создает условия для ранней целенаправленной коррекции обратимых нарушений. Это, в свою очередь, позволяет удлинить сроки функционирования трансплантата почки и/или уменьшить число пациентов, возвращающихся на диализотерапию из-за потери функции пересаженного органа. Основной результат — увеличение продолжительности жизни пациентов с функционирующим почечным трансплантатом.

Выполнение задания 01.07 «Разработать оптимизированную методику применения продленной заместительной почечной терапии у пациентов в периоперационном периоде трансплантации печени» позволило разработать оптимизированный метод продленной заместительной почечной терапии для лечения пациентов с гепаторенальным синдромом в периоперационном периоде трансплантации почки. Применение методов продленной заместительной почечной терапии в комплексном лечении пациентов с гепаторенальным синдромом в периоперационном периоде увеличивает их выживаемость. Продленная заместительная почечная терапия позволяет компенсировать эндогенную интоксикацию, что способствует улучшению системной и легочной гемодинамики и ведет к сокращению сроков восстановления полноценной функции трансплантата, уменьшению длительности госпитализации реципиентов.

В результате выполнения задания 01.08 «Разработать метод диспансеризации на основе изучения отдаленных последствий и качества жизни после аутологичных и аллогенных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток, проведенных в детском возрасте» разработан и внедрен алгоритм выявления и динамического наблюдения за отдаленными осложнениями у пациентов после противоопухолевого лечения медуллобластомы и острых лейкозов с использованием аутологичной или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, изучены частота и сроки возникновения нарушений со стороны щитовидной железы и репродуктивной системы, определены группы пациентов, у которых отмечается снижение минеральной плотности костной ткани после окончания специального лечения, изложены рекомендации по динамическому наблюдению за состоянием щитовидной железы, репродуктивной системы и костной ткани и врачебной тактике в случае выявления нарушений. Внедрение инструкции по применению «Алгоритм выявления и динамического наблюдения за отдаленными осложнениями у пациентов после противоопухолевого лечения медуллобластомы и острых лейкозов с использованием аутологичной или аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» позволяет своевременно выявлять риск отдаленных осложнений, проводить их профилактику. Это улучшает клинический прогноз, повышает качество жизни излеченных пациентов.

Выполнение задания 01.09. «Разработать и внедрить технологию дифференцированного лечения острой почечной недостаточности в раннем послеоперационном периоде на основе использования маркеров повреждения почек у пациентов после трансплантации сердца и выполнения реконструктивных операций на сердце» позволило разработать и внедрить информативный метод ранней диагностики и дифференцированного лечения острого повреждения почек в раннем послеоперационном периоде у пациентов после трансплантации сердца или выполнения реконструктивных операций на сердце. Метод основан на использовании новых маркеров функции (цистатин сыворотки) и повреждения почек (ней-

трофильный липокалин мочи). Применение разработки позволяет улучшить диагностику острого повреждения почек и повысить эффективность лечения кардиохирургических пациентов при развитии острого повреждения почек в ранний послеоперационный период, снизить летальность и повысить качество их жизни.

Основным результатом выполнения задания 01.10 «Разработать и внедрить метод подбора адекватной терапии рецидивов опухолевых заболеваний кроветворной ткани после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток с целью повышения ее эффективности» явилась разработка метода прогнозирования эффективности терапии рецидивов множественной миеломы и острого лейкоза после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Метод позволяет выявить пациентов с высокой резистентностью к терапии опухолевых клеток и низкой резистентностью к лекарственным средствам гемопоэтических стволовых клеток, что указывает на скорый неблагоприятный исход заболевания, в то время как умеренная резистентность к химиопрепаратам опухолевых клеток и более высокая резистентность к препаратам стволовых клеток свидетельствуют об относительно благоприятном прогнозе заболевания и необходимости адекватной терапии с использованием химиопрепаратов, к которым имеется чувствительность опухолевых клеток. Основным результатом являются увеличение продолжительности жизни пациентов с тяжелым течением заболевания, улучшение качества их жизни, повышение эффективности лечения за счет применения показанных химиотерапевтических средств и отказа от неэффективной химиотерапии.

В результате исследований, проведенных в рамках задания 01.11 «Разработать метод повышения резистентности пересаженной почки к тепловой и холодовой ишемии фармакологическими средствами», подготовлена и утверждена инструкция по применению «Методы диагностики и терапии последствий ишемического повреждения почечного аллографта в ранние сроки после трансплантации», разработан фармакологический метод лечения ишемической нефропатии пересаженной почки. Использование метода позволяет стимулировать функциональное состояние нефронов трансплантата, имеющих обратимые метаболические расстройства, сократить сроки восстановления суммарной азотовыделительной функции почек. При этом снижается потребность в послеоперационном гемодиализе и расходы на лечение осложнений в раннем послеоперационном периоде. Метод позволяет сократить необходимость пребывания в стационаре на 5–7 дней и достичь лучшей медицинской реабилитации в короткие сроки после операции.

Прикладные исследования в рамках задания 01.12 «Разработать и внедрить новый метод применения аутотрансплантации мезенхимальных стволовых клеток для регенеративного восстановления повреждения хряща крупных суставов» позволили разработать метод восстановления полнослойных дефектов суставного хряща аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. Разработка применяется для лечения полнослойных хрящевых дефектов крупных суставов. Трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в полнослойный дефект суставного хряща приводит к его заполнению гиалиноподобной тканью регенерата, что значительно улучшает клинико-функциональное состояние сустава пациента. В ходе исследования подтверждена безопасность, а также эффективность использования метода для лечения пациентов с вышеназванной патологией. Метод позволяет значительно сократить расход бюджетных средств в результате достигаемого регенеративного восстановления поврежденного суставного хряща, что проводит к клинической ремиссии, профилактике прогрессирования остеоартроза поврежденного сустава, улучшению качества жизни пациентов, уменьшению числа дней нетрудоспособности по данному заболеванию. Применение метода ведет к значительному снижению необходимости лечения остеоартроза сустава, в т. ч. путем эндопротезирования, которое сопровождается длительным нахождением пациента в хирургическом стационаре, в т. ч. в отделении реанимации, установкой дорогостоящего эндопротеза, трансфузией компонентов крови, медикаментозным лечением, длительной реабилитацией.

Результатом выполнения задания 01.13 «Разработать и внедрить технологию оценки клеточного репаративного ответа *ex vivo* для принятия индивидуализированных клинических решений при хроническом лимфоцитарном лейкозе» явилось создание алгоритма прогнозирования и оценки эффективности цитостатической терапии хронического лимфоцитарного лейкоза, отраженного в одноименной инструкции по применению. Выбор варианта терапии хронического лимфоцитарного лейкоза путем предварительного определения лекарственной чувствительности лейкозных клеток *in vitro* и использования эффективных химиотерапевтических лекарственных средств улучшает результативность специального лечения на всех его этапах. Данный подход позволяет увеличить продолжительность жизни пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом, сократить время терапии, предупредить развитие множественной лекарственной устойчивости, улучшить качество жизни пациентов.

В ходе выполнения задания 01.14 «На основе иммунорегуляторных свойств мезенхимальных стволовых клеток разработать метод патогенетического лечения больных рассеянным склерозом с применением аутологичной трансплантации клеточных культур» разработан метод патогенетической терапии рассеянного склероза с применением аутологичной трансплантации клеточных культур, что позволило усовершенствовать критерии отбора пациентов, индивидуализировать терапию и повысить уровень клинико-лабораторных и научных исследований в неврологии, иммунологии и трансплантологии. Разработана и внедрена инструкция по применению «Метод клеточной терапии рассеянного склероза на основе предварительной оценки иммунорегуляторных свойств аутологичных мезенхимальных стволовых клеток», что поспособствовало снижению частоты обострений аутоиммунного заболевания и достижению стабилизации неврологического дефицита у пролеченных пациентов, что в свою очередь позволило сократить частоту и продолжительность госпитализаций, уменьшить продолжительность сроков временной нетрудоспособности, предупредить возникновение инвалидности либо снизить тяжесть инвалидности, сократить расходы на реабилитацию и уход за пациентами с рассеянным склерозом.

Реализация задания 01.15 «Разработать и внедрить технологию наращивания *ex vivo* предшественников гемопоэза для аутотрансплантации пациентам с онкогематологическими заболеваниями» привела к созданию технологии экспансии кроветворных клеток *ex vivo*, отличной от имевшихся на вооружении у специалистов по клеточным технологиям. Преимуществом разработки является пропорциональное увеличение в полученной клеточной популяции уни-, би- и олигопотентных миелоидных предшественников. Технология характеризуется использованием адгезивной фракции гемопоэтических клеток, содержащей мегакариоцитарные предшественники, двукратным и более уменьшением времени культивирования, отсутствием необходимости использования реагентов ксеногенного происхождения, уменьшением затрат. Использование

в качестве источника гемопоэтических стволовых клеток периферической крови пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями при применении данной технологии не приводит к появлению клеток с аберрантным кариотипом и опухолевым фенотипом. Это позволило разработать метод котрансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, полученных из периферической крови и экспансией *ex vivo*, изложенный в одноименной инструкции по применению. Метод позволят повысить эффективность лечения онкогематологических заболеваний с применением высокодозной химиотерапии, обеспечивая безопасность и надежность восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии с использованием аутологичных предшественников гемопоэза для экспансии и аутотрансплантации. Такой подход существенно удешевляет повторную мобилизацию стволовых клеток при необходимости, позволяет поддержать уровень качества жизни пациента в случае проведения аллотрансплантации или курсов поддерживающей химиотерапии.

В рамках задания 01.16 «Разработать и внедрить комплексный метод определения химеризма и установить его клиническое значение у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» разработан молекулярно-генетический метод и алгоритм диагностики приживления и отторжения трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, определены группы риска по развитию рецидива гемобластозов в зависимости от уровня химеризма. Разработка направлена на своевременную диагностику риска отторжения трансплантата, рецидива заболевания, что позволяет своевременно обосновать объем лечебных мероприятий и снизить длительность стационарного лечения, уменьшить число повторных госпитализаций, увеличить показатель выживаемости у реципиентов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Выполнение задания 01.18 «Разработать высокочувствительный “сэндвич” — вариант иммуноферментного анализа для определения растворимого рецептора ИЛ-8 CXCR2 человека и изучить его продукцию в комплексе с растворимым рецептором ФНО p55 и другими цитокиновыми маркёрами у пациентов с гемобластозами на различных этапах терапии, включая трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток» привело к выявлению высокочувствительного маркера ранней диагностики развития острой реакции «трансплантат против хозяина» — меняющегося в динамике уровня растворимого рецептора фактора некроза опухолей альфа 1 типа. Данный метод существенно дополнил клинические критерии, традиционно используемые для диагностики острой реакции «трансплантат против хозяина». Метод изложен в утвержденной инструкции по применению «Серологический метод диагностики острой реакции «трансплантат против хозяина» у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток». Внедрение разработки продемонстрировало, что своевременное выявление острой реакции «трансплантат против хозяина» способствует своевременному приятию мер, уменьшает летальность и сокращает сроки госпитализаци пациентов в отделении трансплантации (в среднем на 6 сут), позволяет избежать дорогостоящих схем лечения.

Основными результатами выполнения задания 01.19 «Разработать и внедрить метод трансплантации аллохряща для устранения дефектов среднего уха и наружного носа» являются метод хирургического лечения дефектов наружного носа с утратой хряща и метод реконструктивной мастоидопластики у пациентов, перенесших ранее хирургические вмешательства на ухе с использование аллохряща.

Метод хирургического лечения дефектов наружного носа с утратой хряща используется для восстановления приобретенных дефектов носа различной этиологии. Метод направлен на воссоздание всех слоев утраченной части наружного носа, моделирование его формы и предупреждение грубых изменений в донорской зоне.

Метод мастоидопластики после санирующих операций на ухе у пациентов с хроническим гнойным средним отитом используется у пациентов с хроническим гнойным средним отитом, перенесших санирующие операции на среднем ухе. Метод позволяет смоделировать полость среднего уха, уменьшить объем трепанационной полости, устранить проявления воспалительного процесса, добиться улучшения функции слуха, качества жизни пациентов и предупредить развитие внутричерепных осложнений. Разработанные методы позволяют снизить риск послеоперационных осложнений, улучшить функциональный и косметический результаты вмешательств.

В результате реализации задания 01.21 «Разработать и внедрить алгоритм оценки кардиоваскулярного риска при трансплантации органов и тканей» разработан и внедрен алгоритм комплексной оценки кардиоваскулярного риска при трансплантации органов и тканей, изучены прогностически значимые биохимические маркеры предполагаемых сердечно-сосудистых и тромбоэмболических осложнений, определена взаимосвязь между структурно-функциональными характеристиками сердечно-сосудистой системы, инструментальными показателями и осложнениями, развивающимися в отдаленном послеоперационном периоде.

Разработчиками убедительно показано, что при оценке сердечно-сосудистого риска и обследовании реципиентов необходимо использование дополнительных диагностических методов, позволяющих учитывать негативное влияние независимых факторов риска, изменений показателей коагуляционного гемостаза, водно-электролитного, белкового, углеводного и липидного обмена, эндо- и паракринной секреторной активности на структурно-функциональные характеристики миокарда левого желудочка. Такой подход позволяет своевременно проводить адекватную медикаментозную коррекцию и повлиять на течение отдаленного послеоперационного периода, включая адекватную превентивную медикаментозную терапию артериальной гипертензии, дислипидемии, нарушений углеводного обмена и коагуляции. Разработана инструкция по применению «Неинвазивная диагностика болезней сердца и коронарных артерий методом компьютерно-томографической ангиографии», метод демонстрирует высокую чувствительность и специфичность (более 90,0%).

Выполнение задания 01.22 «Разработать метод пространственно-разделенного насыщения коллаген-гидроксиапатитного матрикса аутологичными стволовыми клетками (клетками-предшественниками остеобластов) для замещения дефектов трубчатых костей» позволило разработать метод повышения эффективности лечения костных дефектов с применением многокомпонентного биотрансплантата на основе гидроксиапатитной матрицы-носителя, растворимых факторов тромбоцитов, аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и фибринового геля. Применение биотрансплантата повышает эффективность лечения переломов костей различных локализаций в стадии замедленной консолидации, сопровождающихся недостатком костной ткани, посттравматического остеомиелита длинных трубчатых костей в стадии ремиссии с краевым костным дефектом.

Медицинский и социально-экономический эффект связан с улучшением результатов лечения обширных дефектов костной ткани, сокращением сроков лечения в целом и сроков пребывания пациентов в стационаре, с уменьшением длительности периода временной нетрудоспособности, с предупреждением и снижением тяжести инвалидности, с восстановлением трудоспособности, с улучшением качества жизни.

Результатом выполнения задания 01.23 «Разработать и внедрить методику трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, индуцированных в нейрогенном направлении, для лечения симптоматической эпилепсии» стала разработка метода лечения пациентов с фармакорезистентными формами симптоматической эпилепсии аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга. Метод предназначен для лечения аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками симптоматической эпилепсии при неэффективности адекватной противоэпилептической лекарственной терапии. Исследование показало, что внутривенное введение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и эндолюмбальное введение нейроиндуцированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток может быть эффективной дополнительной терапией у пациентов с фармакорезистентными формами эпилепсии: полное прекращение приступов отмечалось у 15,8% пациентов, в 63,2% случаев наблюдалось уменьшение их частоты более чем на 50,0%. Полученные данные подтверждают безопасность, а также перспективность использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для терапии пациентов с эпилепсией. Метод позволяет значительно сократить расход бюджетных средств за счет достижения клинической ремиссии, уменьшения числа и дозировок противосудорожных лекарственных средств, назначаемых пациенту, способствует увеличению длительности и стойкости ремиссии, снижению тяжести инвалидности.

Исследования в рамках задания 01.24 «Разработать и внедрить способ повышения эффективности химиотерапии острого миелобластного лейкоза взрослых путем применения дифференцированного терапевтического подхода на основе оценки прогноза, ответа на химиотерапию по динамике апоптоза лейкозных клеток и маркеров минимальной остаточной болезни, эскалации доз антрациклинов в индукции и интенсивной консолидации ремиссии» завершились разработкой метода повышения эффективности терапии острого миелобластного лейкоза. В его основе лежит подбор персонифицированных по объему и интенсивности индукционной и консолидационной терапии на основе учета генетических факторов прогноза, характера ответа на терапию на каждом ее этапе. Это позволяет достичь максимального противоопухолевого эффекта у резистентных пациентов и обеспечить минимальную токсичность лечения высокочувствительных пациентов. Характер ответа на терапию оценивают по результатам контроля минимальной остаточной болезни по маркерам лейкозассоциированного фенотипа, что позволяет определять необходимые и достаточные для элиминации лейкозного клона объем и интенсивность терапии индукции ремиссии и ее консолидации. Метод позволяет добиться более выраженного противолейкемического эффекта у резистентных к терапии пациентов и минимизировать интенсивность и токсичность лечения у высокочувствительных пациентов. В результате применения метода у пациентов с острым миелобластным лейкозом вероятность выхода в полную иммунофенотипическую ремиссию достигает 80%, а вероятность двухлетней общей и безрецидивной выживаемости достигает 75%.

Экономический эффект от применения разработки связан с исключением избыточной интенсификации терапии у высокочувствительных пациентов (на основании контроля минимальной остаточной болезни по маркерам лейкозассоциированного фенотипа), а также исключением этапа поддерживающей терапии.

Задание 01.25 «Разработать технологию получения стандартизованного аллогенного трансплантата мезенхимальных стволовых клеток от доноров при проведении мультиорганного забора для создания банка клеточной терапии в Республике Беларусь» завершилось разработкой метода получения стандартизованного трансплантата мезенхимальных клеток и получением регистрационного удостоверения на этот клеточный продукт. В ходе исследования установлено, что активная добавка концентрата тромбоцитов лизированных может успешно применяться при культивировании мезенхимальных клеток при получении трансплантатов для клинического применения. Внедрение методов лечения пациентов с использованием стандартизованных трансплантатов мезенхимальных клеток неперсонифицированного хранения позволяет повысить эффективность иммунносупрессивной терапии острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина», терапии тяжелой печеночной недостаточности, снизить расходы на лечение данной категории пациентов, сократить сроки их пребывания в стационаре и улучшить качество их жизни.

Задание 01.26 «Разработать и внедрить в клиническую практику методы диагностики и лечения ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией» завершилось разработкой двух алгоритмов: алгоритма дифференциальной диагностики ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией, и алгоритма лечения пациентов с ревматоидным артритом, ассоциированным с хламидийной инфекцией. В ходе исследования определены отличительные клинико-лабораторные и рентгенологические признаки ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией, разработаны критерии его дифференциальной диагностики. Предложена схема комплексной терапии ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией, включающая курс этиотропной противохламидийной терапии с использованием антибактериальных средств трех различных групп и коррекцию противовоспалительной терапии ревматоидного артрита медленнодействующими лекарственными средствами, проведена оценка эффективности разработок. Внедрение последних позволяет своевременно диагностировать указанную патологию, улучшить результаты лечения, в частности, снизить тяжесть заболевания (включая частоту обострений и активность процесса), в два раза снизить частоту госпитализаций.

Интересные результаты получены в ходе выполнения задания 01.27 «Разработать и внедрить методы оценки регенераторной возможности эритрона при различных видах анемий». Исполнителями разработаны алгоритм (инструкция по применению) и компьютерная программа диагностики, предназначенные для использования в амбулаторной практике. Разработки позволяют провести классификацию анемий по морфологическим признакам и дать количественную характеристику выраженности патологического процесса. При помощи метода можно с высокой долей вероятности диагностировать ряд наиболее часто встречающихся анемий и проводить мониторинг эффективности лечения анемий. В более чем в 95% случаев разработка позволяет выявлять пациентов, относящихся к группе риска развития анемий, при этом чувстви-

тельность и специфичность диагностики вырастает на 10–15%. Оптимизация диагностического поиска в ряде случаев позволяет отказаться от выполнения дорогостоящих биохимических и/или иммуноферментных исследований.

Выполнение задания 03.17 «Разработать и внедрить технологию тандемной аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для лечения пациентов с прогностически неблагоприятными (резистентными и рецидивами) формами лимфомы Ходжкина» завершилось разработкой метода тандемной аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, основанного на выполнении двух последовательных трансплантаций с включением в программу лечения второй трансплантации у пациентов с недостаточным клиническим эффектом первого режима высокодозной полихимиотерапии (нет ремиссии, сохранение резидуальных очагов болезни) или при развитии рецидива. Разработанный метод позволяет сократить число необходимых курсов полихимиотерапии и госпитализаций, повысить эффективность терапии за счет увеличения частоты достижение ремиссий и снижения трансплантзависимой летальности и, как следствие, повысить показатели выживаемости, улучшить качество жизни и снизить инвалидизацию пациентов с крайне тяжелой онкологической патологией.

В результате выполнения задания 04.04 «Разработать комплексный метод оценки минимальной остаточной болезни и установить его клиническое значение у детей с острыми лейкозами при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток» разработан метод диагностики и отслеживания минимальной остаточной болезни у пациентов с острыми лейкозами на разных этапах лечения (как до, так и после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток), что позволяет определять оптимальные сроки для проведения трансплантации, оценивать вероятный риск рецидива в посттрансплантационном периоде, своевременно проводить коррекцию терапии с целью профилактики рецидива (в т. ч. с использованием клеточных технологий), что, в свою очередь, приводит к уменьшению длительности стационарного лечения и сокращению числа повторных госпитализаций, увеличению вероятности выживаемости реципиентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Выполнение задания 04.06 «Разработать и внедрить способ дифференциальной генодиагностики полиомавирусной инфекции у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток» позволило на основе современной технологии молекулярной индикации доминирующих возбудителей (ВК-вирус, JC-вирус) полиомавирусной инфекции разработать способ (алгоритм) дифференциальной генодиагностики полиомавирусной инфекции у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток. Применение алгоритма повысило в 1,7 раза результативность и качество генодиагностики, способствовало снижению риска возникновения нежелательных посттрансплантационных осложнений и сокращению сроков пребывания реципиентов в стационаре, улучшению качества жизни пациентов.

В ходе реализации задания 04.08 «Разработать и внедрить организационно-методическую программу отбора доноров для получения гипериммунной противогерпетической плазмы» разработаны анкета, форма учета и алгоритм отбора доноров для получения гипериммунной противогерпетической плазмы, объединенные в инструкцию. Создание базы данных доноров гипериммунной противогерпетической плазмы позволило сократить в 1,5–2 раза сроки заготовки и на 63,7% снизить себестоимость гипериммунной противогерпетической плазмы за счет отказа от поиска доноров, использования сформированной базы и отсутствия необходимости повторного определения титра антител у доноров, включенных в базу.

Организационно-методическое обеспечение порядка отбора доноров с высокими титрами противогерпесных антител способствует созданию сырьевой базы для производства противогерпетического иммуноглобулина с целью повышения эффективности профилактики и лечения осложнений, обусловленных герпетической инфекцией. Потребителями разработки и производителями иммуноглобулинов являются организации службы переливания крови республики, имеющие производственные мощности. Утвержден приказ Министерства здравоохранения республики Беларусь «Об утверждении Инструкции по отбору доноров крови и ее компонентов для получения противогерпетической плазмы».

В рамках выполнения задания 04.09 «Разработать и внедрить метод профилактики инфекций мочевых путей у живых доноров и реципиентов трансплантатов почки» разработан метод профилактики инфекций мочевых путей у живых доноров и реципиентов трансплантата почки на основе коррекции выявленных факторов риска инфекций мочевых путей. Убедительно продемонстрирована эффективность метода. Он позволяет снизить частоту инфекции мочевых путей у реципиентов трансплантата почки на 22,2%, а у живых доноров — на 7,7%, вследствие этого снизить расходы на лечение пациентов, сократить сроки их пребывания в стационаре, обеспечить полноценную реабилитацию и улучшить качество их жизни. Разработка способствует удлинению сроков функционирования трансплантата почки, уменьшению числа пациентов, возвращающихся на диализотерапию из-за потери функции пересаженного органа.

Задание 04.11 «Разработать и внедрить комплекс лечебных технологий для улучшения результатов хирургических вмешательств высокой травматичности на печени, включая трансплантацию печени (ФАСТ-ТРАК технология)» завершилось разработкой метода лечения и раннего восстановления пациентов при трансплантации печени и резекции более 3-х сегментов печени у взрослых. Разработан и применен метод раннего восстановления после операций по трансплантации печени и резекции печени более трех сегментов. Разработан способ мультимодальной аналгезии. Метод включает в себя способ интраоперационной инфузионной терапии у реципиентов печени, представляющий из себя рестриктивную инфузионную терапию, основанную на мониторинге показателей центральной гемодинамики пациентов, методики раннего иммунного энтерального питания и ранней мобилизации в послеоперационном периоде резекций или трансплантации печени. Разработка направлена на снижение количества послеоперационных осложнений, сокращение сроков госпитализации и сроков пребывания в отделении интенсивной терапии пациентов после данного вида операций, что дает совокупный медицинский и экономический эффект.

Комплексный метод оценки риска отторжения и ранней дисфункции трансплантатов печени создан в рамках выполнения задания 04.13 «Разработать и внедрить комплексную методику прогнозирования и диагностики ранней дисфункции и отторжения трансплантатов печени на основе клинических, молекулярно-генетических, серологических и иммуногистохимических факторов». Использование метода оценки риска и своевременное изменение лечебной тактики позволяют снизить послеоперационное пребывание пациентов в отделении интенсивной терапии и реанимации на 5 сут, пребывание в отделении трансплантации — на 6 сут, снизить частоту развития ранней дисфункции на 20%. В результате у паци-

ентов, перенесших трансплантацию печени, существенно улучшается клинический прогноз, уменьшается число осложнений. Экономический эффект связан с уменьшением расходов на лечение.

Выполнение задания 04.18 «Разработать метод иммунотерапии пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и идиопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток» завершилось разработкой метода клеточной терапии, существенно повышающего эффективность лечения, улучшающего качество жизни пациента, включая повышение толерантности к физической нагрузке. Применение разработанного метода лечения позволяет снизить тяжесть инвалидности.

В результате выполнения заданий подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» подготовлены, утверждены и внедрены 36 инструкций по применению на новые методы диагностики, лечения, разработана и внедрена компьютерная программа, зарегистрирован ряд биомедицинских клеточных продуктов, получено 5 патентов, подано 18 заявок на изобретение.

Основным результатом реализации подпрограммы является внедрение в практику отечественного здравоохранения методов регенеративной медицины, позволяющих существенным образом улучшить результаты лечения многих социально-значимых заболеваний. Для расчета экономического эффекта от внедрения научных разработок использовались данные о стоимости койко-дня в профильном стационаре и отделении анестезиологии и реанимации, расчет экономии, включая оценку предотвращенных случаев госпитализации и более раннюю выписку из стационара (длительность и кратность госпитализаций), сэкономленные расходы на социальные выплаты по инвалидности и временной утрате трудоспособности, показатели экономии в результате оптимизации медицинской помощи на амбулаторном этапе (число посещений), повышение эффективности диагностики (рациональная кратность и объем), внутренний валовой продукт на душу населения.

Наибольшая социально-экономическая эффективность от применения биомедицинских клеточных технологий достигнута за счет:

- сокращения затрат на лечение рецидивов онкогематологических заболеваний в связи со снижением риска прогрессирования заболевания;
- повышения эффективности хирургического лечения за счет стимуляции регенерации тканей, замещения поврежденных участков тканей здоровыми тканями;
- снижения инвалидности в результате инвалидизирующих заболеваний и травм и повышение качества жизни пациентов;
- сокращения затрат на длительное симптоматическое лечение пациентов с аутоиммунными заболеваниями;
- сокращения социальных выплат, связанных с оплатой длительных листков нетрудоспособности и выплатой пособий по инвалидности;
- продления активного трудоспособного периода жизни.

Заключение. Исследования позволили решить важные прикладные задачи, обозначенные в концепции и технико-экономическом обосновании подпрограммы, включающие следующие позиции:

- разработка и совершенствование методов трансплантации реципиенту донорских органов и тканей;
- разработка методов профилактики осложнений, повышения эффективности терапии реципиентов после трансплантации органов и тканей;
- разработка методов клеточной терапии человека на основе получения и трансплантации стволовых клеток, киллерных и других типов клеток;
- разработка методов лечения с использованием стволовых клеток;
- разработка мероприятий по усилению регенеративных процессов с целью повышения эффективности лечения пациентов.

Анализ результатов выполнения отдельных заданий и подпрограммы в целом послужил основой для формулировки цели и задач новой подпрограммы «Трансплантация клеток, тканей и органов», логически продолжающей исследования в новых, более перспективных и актуальных направлениях.

Во многом благодаря реализации подпрограммы на базе головной организации по ее выполнению (Центр) создана современная научная школа клеточных технологий, в рамках запланированных тематик лицами, обучающимися в аспирантуре и докторантуре, выполняются диссертационные исследования, успешно функционирует Совет по защите диссертаций (Д 03.11.01).

Подводя итог выполненной подпрограммы, следует отметить, что полученные результаты обладают значимой научной новизной и практической значимостью, остро востребованы профильными научно-практическими центрами и организациями здравоохранения, безусловно, найдут широкое применение в практике.

ЭТИОЛОГИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Амвросьева Т.В.[1], Богуш З.Ф.[1], Поклонская Н.В.[1], Дедюля К.Л.[1], Калачик О.В.[2], Миланович Н.Ф.[3], Минаковская Н.В.[4], Кишкурно Е.П.[5]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь;

[2]Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей, Минск, Республика Беларусь;

[3]Республиканский центр гематологии и пересадки костного мозга, Минск, Республика Беларусь;

[4]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь;

[5]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье представлены данные о частоте встречаемости, этиологии и характеристиках посттрансплантационных осложнений вирусной природы у реципиентов почки и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Изложен алгоритм их диагностики, позволяющий выявлять вирусные осложнения на ранних сроках после трансплантации. Показано, что у реципиентов почечного аллографта в структуре посттрансплантационных осложнений доминировала цитомегаловирусная инфекция, которая регистрировалась как без клинических признаков инфекционной патологии, так и с их наличием (41,9 и 24,4% соответственно). У реципиентов ГСК полиомавирусная инфекция регистрировалась у 53,1% детей и 39,1% взрослых.

Ключевые слова: трансплантация, вирусные инфекции, диагностика, вирусные осложнения, полимеразная цепная реакция.

Введение. Трансплантация органов и клеток в настоящее время является наиболее эффективным методом лечения определенной категории пациентов с соматическими заболеваниями, рефрактерных к традиционной медикаментозной или хирургической коррекции. Данное направление оказания медицинской помощи тяжело больным пациентам в последние годы активно развивается в мире, в т. ч. и в Республике Беларусь. Сегодня отечественное здравоохранение располагает вполне успешным опытом пересадки почки, сердца, легких, печени, поджелудочной железы, костного мозга, имеются реальные перспективы осуществления трансплантации других органов и клеток. Однако и в настоящее время основной проблемой избирательного обращения к трансплантации продолжают оставаться посттрансплантационные осложнения, не ассоциированные с течением основного заболевания, а являющиеся следствием посттрансплантационной иммуносупрессивной терапии. К ним относятся инфекционные осложнения, почти половина из которых по современным представлениям имеют вирусную природу.

Причиной вирусных осложнений у реципиентов органов и клеток чаще является не первичная инфекция, а реактивация присутствующих в организме вирусов, существующих ранее в латентной форме. В их число входят цитомегаловирус (ЦМВ), вирусы простого герпеса 1 и 2 типов (ВПГ 1 и 2 т.), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ), Варицелла Зостер вирус (ВЗВ), вирус герпеса человека 6 типа (ВГЧ 6), парвовирус В19 (ПВ В19), полиомавирусы (ВК-вирус, JC-вирус), аденовирус (АдВ), вирусы гепатитов В и С (ВГВ, ВГС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Одним из наиболее распространенных посттрансплантационных осложнений является ЦМВ-инфекция, создающая высокий риск острого или хронического отторжения и потери трансплантата. Реактивация латентной ВЭБ-инфекции у реципиентов может быть причиной развития посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания, которое регистрируется у 1–3% реципиентов. Клинически реактивация ВК вирусной инфекции у пациентов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток чаще всего проявляется в виде геморрагического цистита (развивается у 10–25% реципиентов в течение 1-го года после операции), а после трансплантации почки — в виде полиомавирус-ассоциированной нефропатии (наблюдается у 1–10% реципиентов почечного аллографта). Прогрессирующая мультифокальная лейкоэнцефалопатия, вызываемая JC-вирусом, встречается достаточно редко, однако оказывается фатальной для 90% заболевших в течение 1 года после появления симптомов.

До начала настоящих исследований практическое здравоохранение Республики Беларусь при осуществлении диагностики оппортунистических вирусных инфекций у реципиентов руководствовалось действующими клиническими протоколами, которые, к сожалению, не соответствовали современному уровню развития медицинской науки и не учитывали необходимый спектр детектируемых возбудителей. В частности, это касается таких актуальных вирусных патогенов, как JK-вирус, ВГЧ 6, ПВ В19. В связи с отсутствием исследовательских работ на эту тему имеющаяся в доступной отечественной литературе информация по диагностике инфекционных осложнений при органной трансплантации, этиологической структуре и частоте их возникновения была весьма ограничена и носила разрозненный характер.

В настоящей работе представлены результаты научно-исследовательских работ по созданию современного отечественного алгоритма диагностики вирусных инфекций при пересадке почки и ГСК, а также полученные данные об их этиологии, частоте, динамике и особенностях развития в раннем и позднем посттрансплантационном периодах.

Материалы и методы. Исследовано 997 образцов клинического материала (моча, сыворотка крови) от 176 реципиентов почки, которые были получены из РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, 367 образцов клинического материала от 32 детей-реципиентов ГСК, полученных из РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, 262 клинических образца от 46 взрослых реципиентов ГСК, полученных из отделения трансплантации костного мозга УЗ «9-я ГКБ» г. Минска и ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии».

Образцы мочи перед выделением нуклеиновых кислот разводили в соотношении 1:1 транспортной средой для проб клинического материала производства ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Образцы цельной крови инкубировали 1 ч при температуре 37°С, затем центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин, после чего отбирали сыворотку.

Для выделения ДНК из проб клинического материала применяли коммерческие наборы «РИБО-преп» и «ДНК-собр-В» («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкциями производителя.

Амплификацию нуклеиновых кислот ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т., ВГЧ 6, ВЗВ, ПВ В19 и АдВ осуществляли с использованием коммерческих тест-систем («АмплиСенс», РФ) в соответствии с инструкциями производителя.

Детекцию ВК/JC-вирусов проводили с помощью ПЦР в реальном времени, используя олигонуклеотиды, Taq-полимеразу, раствор $MgCl_2$ и смесь дезоксинуклеотидов производства PrimeTech (РБ). Реакционная смесь для ПЦР была приготовлена на основе буфера, содержащего 650 мМ Трис-HCl (pH = 8,8), 166 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,2% Tween 20. Смесь дезоксинуклеотидов и Taq-полимеразу использовали в концентрациях 200 мкмоль и 2,5 ед. соответственно, $MgCl_2$ — в концентрации 6 ммоль. Температурный профиль реакции состоял из 45 циклов денатурации при 95°С в течение 15 с и объединенной стадии отжига-элонгации при 60°С в течение 40 с.

Результаты и их обсуждение. Для успешного решения проблемы результативной и качественной дифференциальной диагностики вирусных инфекций при трансплантации органов и клеток и последующего изучения этиологии и характеристик посттрансплантационных вирусных осложнений необходимо было решить ряд задач, касающихся выбора спектра детектируемых вирусных патогенов, оптимальных методов и схем лабораторных исследований в динамике наблюдения за донорами и реципиентами применительно к конкретной инфекции, а также определения диагностически значимых критериев оценки и интерпретации полученных данных. Руководствуясь имеющейся в зарубежной литературе информацией по данной проблеме и нашим собственным опытом по практическому ее решению был разработан алгоритм вирусологического обследования пациентов, базирующийся на использовании самых современных технологий и методов (серологических — иммуноферментный анализ и молекулярно-генетических — ПЦР) лабораторной диагностики вирусных инфекций [1].

Применительно к реципиентам почки данный алгоритм регламентирует исследования по выявлению в клиническом материале (сыворотка крови, моча) 11 эпидемически значимых для почечного аллографта потенциальных возбудителей вирусных инфекций — ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т., ВК-вируса, ВГЧ 6, ВЗВ, АдВ, ПВ В19, ВГВ, ВГС, ВИЧ. Он включает 2 этапа: 1) определение серологического и инфекционного статуса доноров и реципиентов до трансплантации органа; 2) скрининг вирусных инфекций и последующий мониторинг за развитием вирусных осложнений у реципиентов в посттрансплантационном периоде. При этом до трансплантации почки обязательному обследованию подлежат как потенциальные доноры, так и реципиенты. В предтрансплантационном периоде регламентируется определение серологического статуса пациентов в отношении вирусов герпетического ряда (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т.) и выявление активной ВК вирусной инфекции (определение ДНК вируса в моче), а также диагностика хронических вирусных гепатитов В, С и ВИЧ-инфекции. Лабораторные исследования в посттрансплантационном периоде заключаются в мониторинге за ЦМВ, ВК-вирусом и ВЭБ (определение ДНК вирусов в сыворотке крови и моче методом ПЦР) как наиболее вероятными этиологическими агентами вирусных осложнений. В случае выявления ЦМВ и ВК вирусной инфекций проводится изучение вирусной нагрузки (определение количества ДНК вируса (копий/мл) методом количественной ПЦР). Достижение ее пороговых значений является показанием для назначения специфической этиотропной терапии и/или коррекции иммуносупрессивной терапии (для ВК вирусной инфекции). В отношении других инфекций (из перечня подлежащих диагностированию) регламентируется вирусологическое обследование реципиентов при наличии клинических показаний, которое включает установление возбудителя с последующим количественным мониторингом вирусной нагрузки. Ключевым моментом использования предлагаемого алгоритма является адекватная интерпретация лабораторных данных, полученных на каждом этапе обследования, по результатам которого назначается антивирусная терапия или коррекция иммуносупрессивной терапии, а их эффективность контролируется динамическим количественным мониторингом вирусной нагрузки.

Отдельным предметом наших исследований явилась полиомавирусная инфекция (ПВИ) — как наименее изученная, но достаточно значимая для иммунодефицитных пациентов. Следует отметить, что в Республике Беларусь исследовательские работы в отношении ПВИ до недавних пор не проводились вовсе. В связи с этим информация о распространенности данной инфекции в стране, ее этиологической структуре, молекулярно-эпидемиологических характеристиках и вкладе в инфекционную патологию отсутствовала. В практике лабораторной службы эпизодически цитологическим методом осуществлялась диагностика лишь ВК вирусной инфекции. В связи с этим нами были созданы 2 оригинальные технологии генодиагностики ПВИ, базирующиеся на количественной ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в реальном времени. Одна их них позволяет осуществлять дифференциальную генгодиагностику ПВИ и направлена на параллельное выявление ВК и JC полиомавирусов, другая предназначена для выявления наиболее распространенной из известных — ВК вирусной инфекции [2, 3]. Последняя технология легла в основу создания отечественной тест-системы для количественной генодиагностики ВК вирусной инфекции (ТУ BY 100558032.367-2016, рег. удостоверение № ИМ-7.104097 от 12.05.2016).

В рамках научно-методического сопровождения диагностических исследований для своевременного выявления активации ПВИ и профилактики развития полиомавирус-ассоциированных посттрансплантационных осложнений разработано два инструктивно-методических документа с изложением алгоритма обследования различных категорий иммунодефицитных пациентов с учетом особенностей развития у них инфекционного процесса [4, 5].

Руководствуясь разработанными документами, были проведены мониторинговые исследования, направленные на выявление широкого спектра потенциальных возбудителей вирусных инфекций (ЦМВ, ВЭБ, ВПГ 1 и 2 т., ВК-вируса, ВГЧ 6, ВЗВ, АдВ, ПВ В19) и установление частоты их реактивации на группе из 84 реципиентов почечного аллографта без клинических признаков инфекционной патологии [6]. У этих пациентов забор сыворотки крови и мочи до пересадки почки осуществлялся однократно, а в посттрансплантационном периоде по следующей схеме: до 3-х мес. с интервалом в 2 недели (на 4, 14-е сут, через 1; 1,5; 2; 2,5 и 3 мес.), с 3-х мес. до 1 года с интервалом в 3 мес. (6; 9; 12 мес.).

Результаты детекции вирусных ДНК в сыворотке крови и моче реципиентов до трансплантации свидетельствовали о наличии активной вирусной инфекции, вызванной ЦМВ, ВЭБ, АдВ, ВК-вирусом и ВПГ 1 и 2 т., у 5,0; 6,3; 5,6; 1,8 и 3,2% пациентов соответственно. При этом ДНК ВЗВ, ПВ В19 и ВГЧ 6 не обнаруживалась (таблица). В посттрансплантационном периоде генетические маркеры детектируемых возбудителей были выявлены у 50 пациентов из 84 обследован-

ных (виремия/вирурия выявлялась хотя бы однократно за весь период наблюдения), что составило 59,5%. При этом доля реципиентов, у которых была зарегистрирована реактивация ЦМВ-инфекции, составила 41,9%, ВЭБ инфекции — 30,4%, ВК вирусной инфекции — 17,4%, ВГЧ 6 — 5,6%, АдВ — 1,9%, ПВ В19 — 1,7%. Случаи обнаружения ВПГ 1 и 2 т. и ВЗВ в обследуемой группе пациентов отсутствовали.

Таблица — Частота выявления генетического материала возбудителей вирусных инфекций в клиническом материале реципиентов почки

Период	Уровни выявления ДНК, %							
	ЦМВ	ВЭБ	ВПГ 1 и 2 т.	ВК вирус	ВГЧ 6	ВЗВ	АдВ	ПВ В19
До трансплантации	5,0	6,3	3,2	1,8	0	0	5,6	0
После трансплантации	41,9	30,4	0	17,4	5,6	0	1,9	1,7

Сроки первичного обнаружения генетических маркеров возбудителей в посттрансплантационном периоде различались. При ЦМВ-инфекции они впервые появились на 45,4±4,05 сут, при ВЭБ инфекции — на 31,8±5,06 сут, при ВК вирусной инфекции — на 38,1±8,67 сут.

Представленные данные свидетельствуют о том, что из выбранного спектра детектируемых патогенов доминирующими возбудителями вирусных инфекций у реципиентов почки в посттрансплантационном периоде были ЦМВ, ВЭБ и ВК-вирус. Молекулярно-генетические маркеры ВГЧ 6, АдВ и ПВ В19 выявлялись исключительно в сочетании с регистрацией маркеров ЦМВ и ВЭБ.

В исследованиях по установлению этиологической структуры посттрансплантационных вирусных осложнений, наиболее вероятно связанных с реактивацией выбранного спектра инфекций, было задействовано 92 реципиента почки с выраженными клиническими проявлениями инфекции (различные гриппоподобное состояния, миалгия, артралгия, анорексия, астения, лейкопения, тромбоцитопения и др.), а также с признаками дисфункции трансплантата.

Наличие генетических маркеров вирусных инфекций было выявлено у 44 пациентов, что составило 47,8%. Доминирующими возбудителями в этиологической структуре вирусных инфекций при наличии посттрансплантационных осложнений были ЦМВ, ВЭБ и ВК-вирус (рисунок 1). Доля реципиентов с выявленной ВГЧ 6 инфекцией составила 7,9%. Частота регистрации ПВ В19 инфекции составил 6,7%. При этом случаи обнаружения ВПГ 1 и 2 т., ВЗВ и АдВ в обследуемой группе реципиентов отсутствовали (рисунок 1).

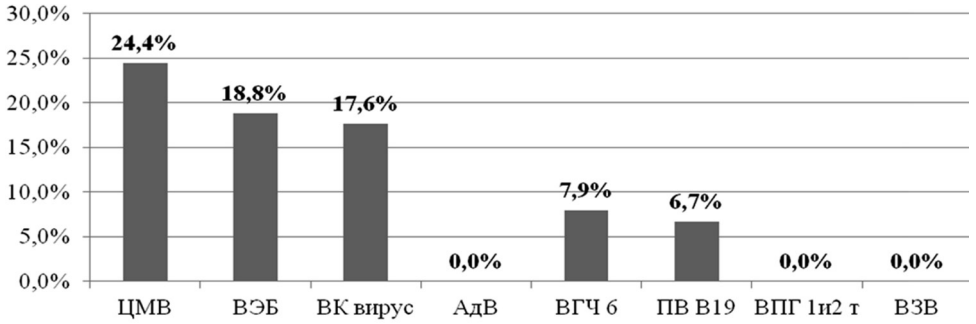


Рисунок 1. — Результаты выявления ДНК возбудителей ряда оппортунистических инфекций у реципиентов почки с клиническими признаками вирусных осложнений

У большинства вирус-позитивных реципиентов (84,1%) была зарегистрирована моноинфекция, вызванная ЦМВ, ВК-вирусом, ПВ В19 и ВГЧ 6 (рисунок 2). У 7 (15,9%) пациентов имело место смешанное инфицирование двумя возбудителями: ЦМВ + ВГЧ 6 (у 3-х пациентов — 6,8%), ЦМВ + ВЭБ (у 2-х пациентов — 4,5%), ВЭБ + ВК-вирус (у 1-го пациента — 2,3%) и еще у 1-го пациента (2,3%) — ВЭБ + ВГЧ 6.

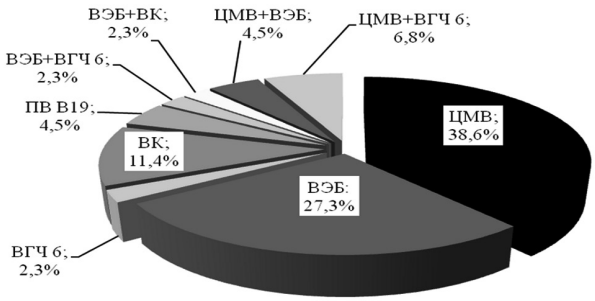


Рисунок 2. — Структура вирусных осложнений у вирус-позитивных реципиентов почки

Дифференциальная диагностика ПВИ при трансплантации ГСК у детей выявила ее маркеры у 53,1% обследованных. При этом у 12 позитивных реципиентов имела место только ВК-вирурия (37,5%; 12/32), у 5 — ВК-вирурия + ВК-виремия (15,6%, 5/32).

Среди взрослых реципиентов ГСК ПВИ регистрировалась в 39,1% случаев. При этом ВК вирусная инфекция отмечалась у 37,0% обследованных, JC вирусной инфекции — у 8,7% (рисунок 3).

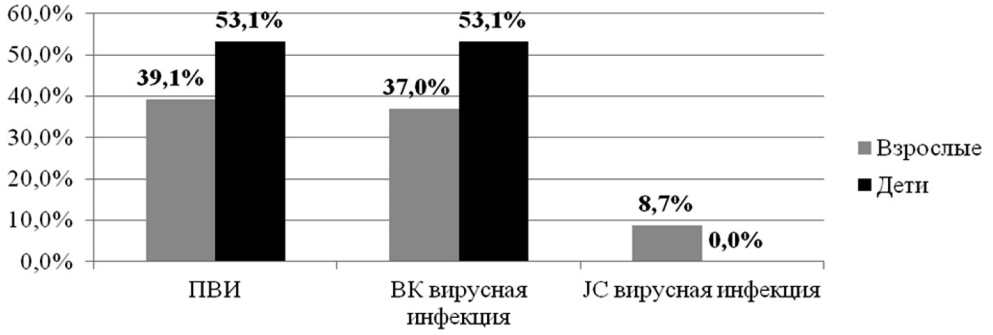


Рисунок 3. — Результаты дифференциальной диагностики ПВИ у взрослых и детей — реципиентов ГСК

Выявленные случаи ПВИ были представлены вариантами: ВК-вирурия — 28,3% (у 13 пациентов), ВК вирурия + JC-вирурия — 4,3% (у 2 обследованных), ВК-вирурия + ВК-виремия — 2,2% (1 пациент), ВК-вирурия + ВК-виремия + JC-вирурия — 2,2% (1 пациент) и JC-вирурия — 2,2% (1 пациент). Таким образом, маркеры ВК вирусной инфекции определялись у большинства всех позитивных взрослых реципиентов, что сопровождалось как ВК-вирурией, так и ВК-виремией, в то время как маркеры JC вирусной инфекции обнаруживались лишь в моче. Они были выявлены у 3-х пациентов в сочетании с маркерами ВК вирусной инфекции. JC моноинфекция была зарегистрирована только у одного пациента.

Пик реактивации ВК вирусной инфекции у реципиентов ГСК приходился на период 14 сут — 1 мес. после пересадки костного мозга. Максимально поздние сроки ее выявления не превышали 1,5 мес. после операции. В среднем первичное обнаружение генетических маркеров ПВИ у взрослых реципиентов ГСК отмечалось на 21,4±10,3 сут после трансплантации, у детей — спустя 18,12±12,65 сут. ВК-виремия регистрировалась через 1,5–3,5 мес. после выявления ВК-вирурии. Случаи выявления генетических маркеров JC вирусной инфекции у взрослых реципиентов ГСК были немногочисленными, отмечались как до трансплантации, так и в поздние (спустя 9 мес.) сроки после операции и носили транзиторный характер.

У всех пациентов с выявленной ВК/JC-вирурией и/или виремией были установлены уровни вирусной нагрузки (определение количества ДНК вируса (копий/мл) методом количественной ПЦР). Уровни ВК вирусной нагрузки, имеющие предиктивную ценность (в сыворотке крови — $>10^4$ копий/мл, в моче — $>10^7$ копий/мл), отмечались у 27,5% детей-реципиентов ГСК и у 23,5% взрослых.

Развитие ассоциированной с ПВИ посттрансплантационной патологии мочевыводящей системы в обследуемой группе детей-реципиентов ГСК было установлено у 25% пациентов (8/32), в т. ч. геморрагического цистита — у 15,6% (5/32) [7]. Среди взрослых реципиентов ГСК ассоциированная с ПВИ патология мочевыводящей системы наблюдалась у 8,7% (4/46). При этом у 3 реципиентов с лабораторно подтвержденной ПВИ развился геморрагический цистит (6,5%), у 1 — гематурия (2,2%).

Заключение. Представленные в настоящей работе данные являются результатом впервые проведенных в нашей стране исследований по проблеме вирусных осложнений у двух категорий пациентов с иммуносупрессией — реципиентов почечного аллографта и реципиентов ГСК. Полученные результаты указывают на активное участие ряда вирусных агентов в развитии осложнений после трансплантации почки и ГСК и диктуют необходимость вначале качественного, а затем количественного их мониторинга в посттрансплантационном периоде, что имеет исключительное значение для выработки адекватных схем коррекции терапии с целью профилактики тяжелых последствий вплоть до потери трансплантата.

Литература

1. Алгоритм лабораторной диагностики вирусных инфекций при пересадке почки: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 25.03.2014 № 015-1213. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2014. — 20 с.

2. Тест-система для диагностики ВК вирусной инфекции человека методом полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» / К.Л. Дедюля [и др.] // Биопрепараты. — 2015. — Т. 55, № 3. — С. 57–59.

3. Результаты клинической апробации алгоритма дифференциальной генодиагностики полиомавирусной инфекции у реципиентов гемопоэтических стволовых клеток / З.Ф. Богуш [и др.] // Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. — Минск: ГУ РНМБ, 2015. — Вып. 8. — С. 173–178.

4. Алгоритм лабораторной диагностики ВК вирусной инфекции: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 23.12.2015 № 163-1115. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2015. — 10 с.

5. Алгоритм диагностики полиомавирусной инфекции при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток: инструкция по применению: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 18.03.2016 № 151-1115. — Минск: РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, 2016. — 12 с.

6. Viral infection in renal transplant recipients in Belarus / T.V. Amvrosieva [et al.] // J. Inect. Dis. Ther. — 2015. — Vol. 3, № 2. — P. 212–218.

7. Выявление полиомавирусов у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток / Т.В. Амвросьева [и др.] // Мед. журн. — 2015. — № 4. — С. 45–47.

ETIOLOGY AND CHARACTERISTICS OF THE VIRAL COMPLICATIONS AFTER KIDNEY AND HEMATOPOIETIC STEM CELLS TRANSPLANTATION

Amvrosieva T.V.[1], Bohush Z.F.[1], Paklonskaya N.V.[1], Dziadziulia K.L.[1], Kalachik O.V.[2], Milanovich N.F.[3], Minakovskaya N.V.[4], Kishkurno E.P.[5]

[1]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Epidemiology & Microbiology", Minsk, Republic of Belarus;
[2]The Republican Center of Organ & Tissue Transplantation, Minsk, Republic of Belarus;
[3]The Republican Center of Hematology & Bone Marrow Transplantation, Minsk, Republic of Belarus;
[4]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus;
[5]State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus

The article presents data on the incidence, etiology and characteristics of post-transplant viral complications in kidney and hematopoietic stem cells (HSC) recipients. The algorithm of diagnosis allowing to identify viral complications in the first months after transplantation was represented. It was shown that in kidney recipients cytomegalovirus infection is the most commonly reported post-transplant viral complications among patients with and without clinical signs of infection (41.9 and 24.4% respectively). Poliomaviral infection among the HSC recipients was registed in 53.1% of children and 39.1% of adults.

Keywords: transplantation, viral infection, diagnosis, viral complications, polymerase chain reaction.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК В ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Баровская Ю.А., Вашкевич Е.П., Исайкина Я.И., Шман Т.В., Алейникова О.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В работе представлены основные результаты использования естественных киллерных клеток в терапии 5 детей с *de novo* ОМЛ. Проанализирован клеточный состав трансплантата, описаны нежелательные явления и длительность нейтропении после введения ЕК-клеток. Сделано заключение о выполнимости, безопасности и удовлетворительной переносимости данного вида терапии.

Ключевые слова: ОМЛ, иммунотерапия, естественные киллерные (ЕК) клетки.

Введение. Клеточная иммунотерапия с использованием ЕК-клеток является перспективной терапевтической стратегией для лечения пациентов с различными типами новообразований. В настоящее время в мире зарегистрировано более сотни открытых клинических исследований, в которых используются ЕК-клетки в схемах терапии острых лейкозов (ОЛ), лимфом, хронического миелолейкоза, миеломной болезни, нейробластомы и др. [http://clinicaltrial.gov]. В первых исследованиях была показана безопасность и эффективность использования гаплоидентичных ЕК-клеток на примере пациентов с различными онкологическими заболеваниями, в т. ч. и с острыми миелоидными лейкозами (ОМЛ), были разработаны оптимальные режимы кондиционирования перед ЕК-иммунотерапией [1, 2].

К настоящему времени в мире уже имеется клинический опыт использования ЕК-клеток у детей. Описаны результаты использования донорских ЕК-клеток после гаплоидентичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) у пациентов с ОЛ, предлагаются способы усиления цитотоксической активности ЕК-клеток [3, 4]. Актуальным является использование ЕК-клеток в терапии рецидивов ОЛ, выживаемость при которых не превышает 40%. В работе Rubnitz J.E. [5] показано, что использование гаплоидентичных ЕК-клеток позволяет достичь ремиссии у большинства пациентов, что дает возможность проведения аллогенной ТГСК.

В настоящее время в центрах Германии, Швейцарии и США ведутся различные экспериментальные протоколы терапии с использованием ЕК-клеток в основной линии лечения ОМЛ, в т. ч. и у детей [6].

В рамках выполнения и внедрения результатов проекта «Разработать технологию *ex vivo* получения трансплантата натуральных киллерных клеток для целей противоопухолевой клеточной иммунотерапии для пациентов с онкологическими заболеваниями» (2011–2013 гг., № гос. регистрации 20114489) была проведена иммунотерапия гаплоидентичными ЕК-клетками для 5 пациентов.

В настоящее время в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии для терапии пациентов с первичными ОМЛ используется протокол ОМЛ-ММ 2014, в котором для пациентов промежуточной группы риска в одном из рукавов рандомизации проводится иммунотерапия ЕК-клетками.

Цель работы — анализ предварительных результатов использования гаплоидентичных ЕК-клеток в терапии пациентов с диагнозом острый миелоидный лейкоз.

Материалы и методы. В исследование включены 5 пациентов в возрасте от 2 до 13 лет с *de novo* ОМЛ, получивших программное лечение в Центре детской онкологии, гематологии и иммунологии г. Минска с июля 2012 г. по апрель 2016 г. по оригинальным протоколам ОМЛ-ММ-2006 (n = 1) и ОМЛ-ММ-2014 (n = 4). Результаты лечения пациентов определены на 01.08.2016 г. Медиана наблюдения составила 12,5 мес.

Диагноз ОМЛ устанавливали на основании морфоцитохимического и иммунофенотипического исследований бластных клеток и классифицировали согласно критериям Франко-Американо-Британской (FAB) группы. Цитогенетический анализ проводили общепринятым методом краткосрочного культивирования клеток костного мозга с последующей дифференциальной G-окраской метафазных хромосом, а также методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH).

Определение аллореактивности ЕК-клеток проводили согласно «Missing self» модели: донорские ЕК-клетки считали аллореактивными, если отсутствовали соответствующие лиганды на клетках реципиента при наличии ингибиторо-

ных KIR на донорских ЕК-клетках [7]. Для процедуры выбора донора по критерию ЕК-аллореактивности анализировали результаты типирования HLA по I классу для донора и реципиента, а также определяли экспрессию KIR-рецепторов на ЕК-клетках донора методами полимеразной цепной реакции и проточной цитофлуориметрии (согласно инструкции МЗ РБ «Метод подбора ЕК-аллореактивного донора для проведения гаплоидентичных трансплантаций гемопоэтических стволовых клеток» № 174-1110 от 16.03.2011).

Селекция ЕК-клеток проводилась из клеточного продукта лимфофереза в два этапа. Первый этап — деплеция Т-клеток, второй — селекция ЕК-клеток с помощью наборов фирмы Miltenyi Biotec на аппарате Clinimacs (Miltenyi Biotec, Германия).

Активация ЕК-клеток для 4 пациентов проводилась *in vitro* с помощью интерлейкина-2 (Ронколейкина, «НПК «БИОТЕХ», РФ) в течение 18–72 ч в дозе 1 тыс. Ед./мл. ЕК-клетки для пятого пациента активировались *in vivo* путем подкожного введения Ронколейкина в дозе 1 млн МЕ/м^2 ежедневно, начиная с дня 1 (всего 6 инъекций).

Определение чистоты полученной фракции клеток и определение активации ЕК-клеток проводили с использованием моноклональных антител и техники проточной цитофлуориметрии.

Нежелательные явления оценивали по шкале токсичности CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) версия 4.0.

Протокол ОМЛ-ММ-2014. Согласно данному протоколу проводилась стратификация пациентов на три прогностические группы в зависимости от молекулярно-генетических характеристик бластных клеток: благоприятную, промежуточную и неблагоприятную. К благоприятной прогностической группе относили пациентов с inv(16), t(16;16), t(8;21) без мутации c-kit, нормальный кариотип с биаллельной мутацией CEBPA, нормальный кариотип с мутацией NPM1. Критериями неблагоприятной прогностической группы являлись: нормальный кариотип с внутренней тандемной дупликацией юкстамедуллярного домена гена FLT3 (FLT3-ITD) и без мутации гена NPM1, 11q23 аномалии, inv(3), t(3;3), t(6;9), t(8;21) с c-kit, моносомия 7-й, 5-й хромосом, сложные аномалии (более 5), М7, М6 по FAB-классификации, резистентный ОМЛ. Все остальные пациенты входили в промежуточную группу прогноза. Для пациентов с inv(16)/t(16;16) предполагалось проведение 4 курсов полихимиотерапии (ПХТ). Для остальных пациентов с благоприятным прогнозом — 5 курсов ПХТ. Для детей с неблагоприятным прогнозом планировалось проведение 3 или 4 блоков ПХТ и аллогенной ТГСК. Для пациентов промежуточного прогноза предусмотрено два варианта лечения в режиме рандомизации. Одним из вариантов лечения является проведение 5 курсов ПХТ. Пациенты второй ветви рандомизации получают ПХТ в сочетании с терапией ЕК-клетками от гаплоидентичного донора.

Режим кондиционирования перед инфузией донорских ЕК-клеток включал: циклофосфамид 60 мг/кг в течение 1 ч внутривенно (день — 7); флюдарабин 25 мг/м^2/день 30-минутной внутривенной инфузией (день с -6 по -2). В день 0 осуществлялось введение ЕК-клеток путем внутривенной болюсной инфузии.

Результаты и их обсуждение. Иммунотерапия гаплоидентичными ЕК-клетками была проведена 5 пациентам. Пациент 1 получал лечение по протоколу ОМЛ-ММ-2006, тогда как пациенты 2–5 — по протоколу ОМЛ-ММ-2014. Донорами ЕК-клеток в двух случаях были отцы, в трех — матери. Некоторые характеристики пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Характеристика пациентов, получивших иммунотерапию гаплоидентичными ЕК-клетками

Пациент	Возраст, годы	Пол	Вес, кг	Вариант по FAB	Кариотип	Исход
1	2	Жен.	10	М5	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[6]	Рецидив, умер
2	3	Муж.	17,5	М4	46,XY,del(9)(q11q21)inc[8]; NRASmut	Второй лейкоз, умер
3	4	Муж.	16	М4	46,XY,13,+mar,inc[4]/46,XY [11]	В ремиссии 24 мес.
4	7	Муж.	20,7	М5	46,XY [20]	В ремиссии 11 мес.
5	13	Жен.	40	М2	46,XX [1]	В ремиссии 9 мес.

Согласно критериям стратификации пациент 1 относился к неблагоприятной прогностической группе, что обусловливало показания к аллогенной ТГСК. Из-за отсутствия потенциального донора данная процедура не была проведена, и пациент получил терапию ЕК-клетками от отца. Через 10 мес. у пациента развился костномозговой рецидив. После получения противорецидивного лечения (блоки ПХТ, гаплоидентичная ТГСК от отца) во второй ремиссии наступила смерть от инфекционных осложнений.

Пациенты 2–5 относились к промежуточной группе прогноза. У пациента 2 через 2,5 мес. после окончания программного лечения по поводу ОМЛ, включающего терапию материнскими ЕК-клетками, развился острый лимфобластный лейкоз. Смерть наступила от прогрессирования заболевания.

Пациенты 3–5 находятся в первой продолжительной ремиссии со сроком наблюдения от 9 до 24 мес.

В таблице 2 представлена характеристика клеточного трансплантата.

До процедуры селекции количество ЕК-клеток в среднем составляло 8,2±0,9%, тогда как после селекции — 83,1±7,6%. Жизнеспособность (ЖСП) клеток в анализируемых случаях составляла около 90,3±2,6%. Средний уровень активации (CD69+) для пациентов 1–4 составил 71,8±15,5%. В среднем доза введенных ЕК-клеток составила 12,6±5,3×10^6/кг.

После ЕК-иммунотерапии оценивали длительность нейтропении, отслеживали нежелательные явления, наблюдавшиеся во время иммунотерапии. Полученные результаты представлены в таблице 3. Нейтрофилы считали восстановившимися при достижении их абсолютного числа 500 кл/мкл. В среднем восстановление нейтрофилов происходило на 23±8 день.

Таблица 2. — Характеристика клеточного трансплантата ЕК-клеток

Пациент	Доза ЕК-кл, $\times 10^6$/кг	ЖСП, %	CD69+, %	Аллореактивность ЕК-клеток	Активация ИЛ-2, ч
1	1,58	86	97	Нет	36
2	20,7	90	90,0	Нет	22
3	29	НД	72	Да	72
4	7,5	НД	28,1	Да	22
5	4,2	95	5	Да	*in vivo*

Таблица 3. — Длительность нейтропении и перечень нежелательных явлений, наблюдавшихся во время терапии ЕК-клетками

Пациент	Нейтропения, дни	Нежелательные явления			
		1 степень	2 степень	3 степень	4 степень
1	18	–	–	анемия, тромбоцитопения, фебрильная нейтропения	нейтропения, лейкопения
2	14	–	диарея	анемия, тромбоцитопения, фебрильная нейтропения	нейтропения, лейкопения
3	14	тромбоцитопения	–	анемия	нейтропения, лейкопения
4	17	–	анемия	–	нейтропения, лейкопения
5	56	повышение ГГТ, повышение креатинина	синусит, повышение печеночных ферментов	анемия, фебрильная нейтропения, сиалоденит	тромбоцитопения, нейтропения, лейкопения
Примечание: ГГТ — гамма-глютамилтранспептидаза.					

Заключение. Наш опыт применения донорских ЕК-клеток для лечения детского ОМЛ продемонстрировал выполнимость, безопасность и удовлетворительную переносимость данного вида терапии. Зарегистрированные нежелательные явления по спектру и степени тяжести соответствуют опубликованным данным клинических исследований. Для оценки эффективности терапии ЕК-клетками необходимо продолжать исследование на большей выборке пациентов. Адоптивная иммунотерапия ЕК-клетками может быть перспективным методом улучшения выживаемости детей с ОМЛ за счет снижения риска рецидива и уменьшения токсичности, связанной с лечением.

Литература

1. Successful adoptive transfer and *in vivo* expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer / J.S. Miller [et al.] // Blood. — 2005. — Vol. 105, № 8. — P. 3051–3057.
2. Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation / J.R. Passweg [et al.] // Leukemia. — 2004. — Vol. 18, № 11. — P. 1835–1838.
3. IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation / U. Koehl [et al.] // Blood Cells Mol. Dis. — 2004. — Vol. 33, № 3. — P. 261–266.
4. IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study / C. Brehm [et al.] // PLoS One. — 2011. — Vol. 6, № 11:e27351. — doi: 10.1371/journal.pone.0027351.
5. Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia / J.E. Rubnitz [et al.] // Pediatr. Blood Cancer. — 2015. — Vol. 62, № 8. — P. 1468–1472.
6. NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia / J.E. Rubnitz [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2010. — Vol. 28, № 6. — P. 955–959.
7. Leung, W. Use of NK activity in cure by transplant / W. Leung // Br. J. Haematol. — 2011. — Vol. 155, № 1. — P. 14–29.

THE FIRST EXPERIENCE OF APPLICATION OF NATURAL KILLER CELLS IN THERAPY OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN IN BELARUS

Barovskaya Yu.A., Vashkevich E.P., Isaikina Y.I., Shman T.V., Aleinikova O.V.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus

In the study it was described the main results of natural killer cells applications in the therapy of patients with de novo AML. Cellular product, side effects and duration of neutropenia after immunotherapy were characterized. It was concluded that natural killer immunotherapy is feasible, safe and tolerable.

Keywords: AML, immunotherapy, natural killer cells.

НОВЫЙ МЕТОД ПРИМЕНЕНИЯ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ХРЯЩА КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Букач Д.В.[1], Белецкий А.В.[1], Эйсмонт О.Л.[1], Исайкина Я.И.[2], Алейникова О.В.[2]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр травматологии и ортопедии», Минск, Республика Беларусь;

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) представляется эффективным способом лечения полнослойных повреждений суставного хряща. В основе методики лежит доказанное представление о полипотентности мезенхимальных стволовых клеток, способных дифференцироваться по разным направлениям, в т. ч. образуя хрящевую ткань. Несмотря на большое количество опубликованных результатов, единого подхода к выбору источника клеток, хирургической технике трансплантации, степени дифференцировки клеток трансплантата на сегодня не выработано. Целью исследования было экспериментальное обоснование и клиническая апробация разработанного метода лечения полнослойных повреждений суставного хряща.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки, костный мозг, хондроциты, хрящ.

Введение. Развитие регенеративной медицины в последнее десятилетие привело к разработке ряда биоинженерных технологий, в основе которых лежит использование аутологичных клеток, позволяющих восстанавливать дефекты различных тканей *in vivo,* в т. ч. и хрящевой. Использование МСК в практической медицине стало следующей ступенью после подтверждения способности этих клеток к хондрогенезу *in vitro,* определения основных индукторов такой дифференцировки и маркеров, позволяющих установить тканевую принадлежность полученных клеток. Основной проблемой, несмотря на большие успехи в этом направлении, остается получение на терминальной стадии *in vitro* дифференцировки МСК не гипертрофических хондроцитов, синтезирующих коллаген X, а хондроцитов, экспрессирующих ген коллагена II и аналогичных тем, что составляют структуру гиалинового хряща [1].

В настоящее время не существует оптимального протокола для клинического применения биотрансплантата МСК с целью репарации хрящевой ткани. Основными вопросами использования МСК остаются: оптимальный источник стволовых клеток, степень дифференцировки МСК, применяемых в качестве аутотрансплантата, техника введения материала МСК к месту повреждения хрящевой ткани. Поэтому, несмотря на большое количество экспериментально-клинических попыток, метод применения МСК для репарации хряща находится на стадии изучения и в широкую клиническую практику не внедрен.

Цель работы — обоснование, разработка и внедрение в клиническую практику нового метода применения аутотрансплантации предифференцированных в хондрогенном направлении мезенхимальных стволовых клеток для регенеративного восстановления поврежденного хряща крупных суставов.

Материалы и методы. Экспериментальная часть исследования проводилась на 5 беспородных собаках (10 коленных суставов) обоего пола массой 16,8±0,64 кг согласно разработанной схеме. При исследовании соблюдены все правила работ с использованием экспериментальных животных.

I этап: *забор стволовых клеток из тканей организма* проводился в условиях операционной под общим наркозом. После обработки операционного поля при помощи иглы G14, направленной перпендикулярно гребню крыла подвздошной кости на глубину 1–1,5 см, производилась пункция костного мозга. Выполнялась аспирация около 20 мл костного мозга, который из шприца переливался в пробирки с антикоагулянтом. Пробирки доставлялись в лабораторию в течение 60 мин после забора костного мозга.

II этап: *изоляция и экспансия МСК, хондрогенная предифференцировка*.

Изоляция и экспансия МСК. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из костного мозга, наслаивая на Гистопак плотностью 1,077 г/мл (Sigma, США) с последующим центрифугированием. МНК дважды отмывали в физиологическом растворе и ресуспендировали в среде ДМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС) (Sigma, США). В концентрации 0,5–1,0×10^6/мл клетки переносили во флакон 175 $см^2$ (Sarstedt, Германия) в 30 мл среды. Клетки инкубировали при +37°С и 5% CO_2, со сменой среды через 4 сут. Таким образом, клетки культивировали до получения конфлюэнтного монослоя. МСК дезадгезировали 0,25% трипсином-ЭДТА (Sigma, США) с последующей инактивацией трипсина 50% ЭТС в ДМЕМ. МСК отмывали дважды, подсчитывали, концентровали методом центрифугирования и переводили в 200 мкл носителя (гиалуронат натрия) для введения в дефект суставной поверхности.

Получение хондрогенно-предифференцированных МСК (МСКхпд). К 80–90% конфлюэнтному монослою МСК добавляли дифференциальную среду, содержащую 10 нг/мл TGFβ, 100 нг/мл IGF, 10^{-7}М дексаметазона в ДМЕМ. Культивировали в течение 7 дней, смену среды проводили на 4-й день. МСКхпд дезадгезировали 0,25% трипсином-ЭДТА (Sigma, США) с последующей инактивацией трипсина 50% ЭТС в среде ДМЕМ. МСКхпд отмывали дважды, подсчитывали, концентрировали методом центрифугирования и переводили в носитель (200 мкл гиалуроната натрия) для введения в дефект суставной поверхности.

В среднем из 16,5±2,1 мл костного мозга собаки выделяли 133,7±15,4×10^6 МНК, из которых в среднем за 30±1,5 сут получали методом экспансии 18,8±3,9×10^6 МСК.

Морфологически недифференцированные МСК представляли собой веретенообразные клетки с центрально расположенным ядром, после предифференцировки в хондроциты в течение 6 сут морфология клеток менялась с вытянутой на овальную, со смещением ядер к периферии клетки.

Клеточный препарат готовился и набирался в 2 мл шприцы за 30 мин до трансплантации и в стерильном контейнере при температуре не выше 20°С доставлялся в операционную.

III этап: *трансплантация концентрата мезенхимальных стволовых клеток в созданный хрящевой дефект*. В условиях операционной лабораторное животное вводилось в общий наркоз. После подготовки операционного поля выполнял-

ся медиальный парапателлярный доступ к коленному суставу с рассечением кожи, подкожной клетчатки, капсулы сустава и отведением надколенника кнаружи. Скальпелем и долотом на блоке бедра выполнялся полнослойный дефект хряща размером 5×5х2 мм до появления кровоточащей субхондральной кости.

Непосредственная трансплантация выполнялась согласно предложенному способу, основанному на методике «локальной адгезии» [2]. Конечность располагалась так, чтобы созданный хрящевой дефект был строго горизонтально. Шприцем через иглу в дефект вводилась культура МСК. В таком положении конечность удерживалась в течение 10 мин для наступления адгезии стволовых клеток к поверхности дефекта, после чего ей предавалось свободное положение. Выполнялся послойный шов послеоперационной раны.

С целью изучения фиксации в хрящевом дефекте и дальнейшей дифференцировки стволовых клеток после аутотрансплантации как недифференцированных МСК, так и МСК предифференцированных в хондрогенном направлении, а также с целью оценки эффективности предложенной методики для репарации дефекта хрящевого покрытия, операции на 10 коленных суставах 5 собак были распределены следующим образом: создание дефекта на блоке бедра без имплантации клеточной культуры (контрольная группа) — 3 сустава; аутотрансплантация в созданный дефект культуры непредифференцированных МСК в матрице из гиалуроната натрия — 4 сустава; аутотрансплантация в созданный дефект культуры предифференцированных в хондроциты МСК в матрице из гиалуроната натрия — 3 сустава. Распределение оперированных суставов у собак представлено в таблице 1.

Таблица 1. — Распределение суставов собак по виду трансплантата культуры МСК

Опытное животное	Правый коленный сустав	Левый коленный сустав
Собака 1 (18 кг, m)	Непредифференцированные МСК 11х×10^6 клеток	Непредифференцированные МСК 11×10^6 клеток
Собака 2 (16 кг, f)	Непредифференцированные МСК 16×10^6 клеток	Непредифференцированные МСК 16×10^6 клеток
Собака 3 (17 кг, f)	Предифференцированные МСК 6×10^6 клеток	Контроль
Собака 4 (17 кг, m)	Предифференцированные МСК 9×10^6 клеток	Контроль
Собака 5 (16 кг, m)	Преддифференцированные МСК 10×10^6 клеток	Контроль

Вывод животных из эксперимента осуществлялся через 6 мес. после аутотрансплантации культуры стволовых клеток. Эвтаназию животных проводили путем 3-кратной разовой передозировки 3% тиопентала натрия. Патоморфологическое исследование материала осуществлялось по общепринятой гистологической методике изучения костной ткани. Оценивалась степень заполнения дефекта и давалась макроскопическая характеристика регенерата. После фиксации, декальцинации и заливки из парафиновых блоков изготавливали гистологические срезы толщиной 4 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином.

Для гистологической характеристики полученных препаратов использовали шкалу гистологической оценки восстановления хрящевой поверхности (Histological scoring system for cartilage repair), предложенной Wakitani et al.[3], с максимальным количеством баллов 18.

Для клинических испытаний в исследование было включено 5 пациентов с полнослойными дефектами хряща коленного сустава, полученных в результате травмы — у 2 пациентов, или заболевания (рассекающего остеохондрита) — у 3 пациентов. Все пациенты полностью соответствовали критериям программы клинических испытаний.

На предварительном этапе все пациенты были осмотрены клинически, была выполнена МРТ сустава, где выявлен полнослойный дефект хряща. На основании полученных данных пациентам выполнялась артроскопия коленного сустава, во время которой оценивался дефект хряща, удалялись свободные костно-хрящевые тела, по показаниям санировалась сопутствующая внутрисуставная патология (у 1 пациента выполнялась резекция мениска, у 1 — латеральный релиз надколенника, у 1 — резекция мениска и аутопластика передней крестообразной связки). Перед вторым этапом лечения производилась оценка общего и локального статуса, оценка боли по шкале ВАШ [4], оценка функционального состояния коленного сустава по шкале Lysholm [5]. Исходный показатель шкалы ВАШ (мм) в исследуемой группе составил 45 [30; 50], исходный показатель по шкале Lysholm составил 52,0[49,0; 57,0] из 100 возможных, что может охарактеризовать исходное функциональное состояние суставов пациентов как неудовлетворительное.

Забор костного мозга для последующей культивации МСК производился в 4 случаях амбулаторно в условиях перевязочной под местной анестезией, в 1 случае — в операционной при выполнении I этапа хирургического лечения под спинальной анестезией. Культивация МСК в лаборатории продолжалась около 1 мес. по технологическому регламенту, аналогичному таковому на экспериментальном этапе, в результате чего получали препарат мезенхимальных стволовых клеток для репарации хряща, помещенный в гиалуронат натрия.

Проводили подсчет МСК, морфологическое, иммунофенотипическое, молекулярно-биологическое тестирование клеток как до индукции хондрогенеза в МСК, так и перед введением в дефект хряща пациента. Характеристики трансплантатов МСК для пациентов представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Параметры получения МСК для репарации дефектов хряща крупных суставов у пациентов

№ пациента	Объем КМ, мл	МНК в КМ, $\times 10^6$	Срок экспансии, дни	Число пассажей	Количество МСК на выходе, $\times 10^6$
1	60	250	25	2	60
2	35	100	28	2	23
3	30	50	46	2	28
4	15	30	30	2	7
5	18	80	28	2	25
M±SE	44,0±11,5	102,0±38,9	31±4	2	28,6±8,6

Трансплантация МСК осуществлялась в гиалуронате натрия, объем которого подбирали индивидуально, учитывая размер дефекта хряща у пациента, и который составлял 0,8 (0,15–1,8) мл. Медиана количества МСК в 1 мл гиалуроновой кислоты при введении пациенту в область дефекта составляла 33,3 (25,0–70,0)$\times 10^6$ клеток.

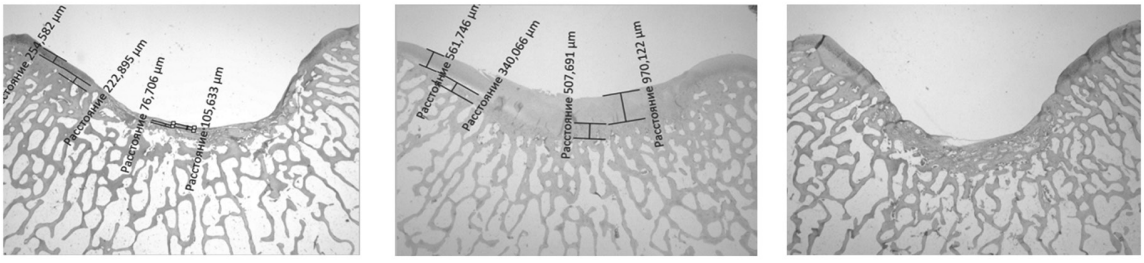
Для трансплантации также использовалась методика «локальной адгезии». В условиях операционной под общей или региональной анестезией выполнялась артротомия. Производилось освежение краев и дна дефекта до слабо кровоточащей поверхности. Конечность устанавливалась так, чтобы хрящевой дефект располагался горизонтально, в него вводилась культура МСК. В таком положении конечность удерживалась в течение 10 мин для наступления адгезии стволовых клеток к поверхности дефекта, после чего ей предавалось свободное положение. Выполнялся послойный шов послеоперационной раны. В послеоперационном периоде по показаниям назначались антибиотики и анальгетики. Пациенту разрешался полный объем движений в оперированном суставе и нагрузка до 20–30% (ходьба с костылями) в течение 6 недель.

Контрольное обследование пациентов проводилось через 6 мес. после трансплантации. Выполнялась оценка общего и локального статуса, оценка боли по шкале ВАШ, оценка функционального состояния коленного сустава по шкале Lysholm. Для объективной оценки заполнения хрящевого дефекта выполнялось МРТ-исследование оперированного сустава с оценкой по шкале MOCART [6].

Статистический анализ был осуществлен при помощи методов описательной статистики. Учитывая, что исследуемые признаки имели распределение, отличное от нормального из-за малого количества наблюдений в исследуемых группах, мы использовали непараметрические методы статистики. Количественные показатели представлены в виде: медиана [25 процентиль; 75 процентиль]. Уровень статистической значимости исследования был определен как $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. При проведении эксперимента применен хирургический способ аутотрансплантации МСК при повреждении хряща, при разработке которого нами учитывались такие основные факторы, как: простота доставки культуры МСК непосредственно в хрящевой дефект; снижение травматичности операции путем исключения использования надкостницы для фиксации культуры клеток; профилактика иммунных реакций путем исключения использования аллогенных мембран и фибринового клея.

При анализе результатов экспериментов учитывались схожесть массо-ростовых показателей лабораторных животных, идентичные размеры и локализация созданных дефектов, методик трансплантации различных культур клеток, одинаковые сроки наблюдения за животными и их вывод из эксперимента. Проводилось сравнение результатов трансплантации в различных суставах как между собой, так и с контрольной группой.



a **b** **c**

Рисунок 1. — Гистологический препарат дефекта суставной поверхности, пролеченного с помощью непредифференцированных МСК (a), предифференцированных МСК (b), контрольная группа (c) — окраска гематоксилином и эозином

В хрящевых дефектах обоих коленных суставов собак №№ 1 и 2, пролеченных с помощью культуры непредифференцированных МСК, восстановление зоны дефекта в суставной поверхности завершалось формированием ткани регенерата (рисунок 1a). Данный регенерат не заполняет полностью зону дефекта хряща, не обеспечивается точное топоанатомическое соотношение суставных поверхностей. Регенерат в основном состоит из фиброзной соединительной ткани с мелкими очагами ткани, напоминающей волокнистую хрящевую. Показатель шкалы гистологической оценки группы — 2,0 [1,0; 2,5]. Схожая морфологическая картина наблюдается в контрольных (левых) коленных суставах собак №№ 3–5, где созданный дефект оставлялся без лечения (рисунок 1c). Регенерат, состоящий преимущественно из фиброзной соединительной ткани, не заполняет кратер дефекта. Показатель шкалы гистологической оценки 2,0 [1,0; 2,0]. В то же время в правых коленных суставах собак №№ 3–5, пролеченных с помощью культуры предифференцированных МСК, наблюдается полное заполнение кратера дефекта (рисунок 1b). Регенерат состоит преимущественно из гиалинового хряща с участками волокни-

стого, имеет гладкую поверхность, выраженную субхондральную пластинку, хорошо интегрирован в окружающий суставной хрящ. Показатель шкалы гистологической оценки группы составил 16,0 [14,0; 17,0]. Различия между исследуемыми группами статистически достоверны (p = 0,0459) (рисунок 2). Результаты лечения группы предифференцированных МСК достоверно лучше как группы непредифференцированных МСК (Mann–Whitney U Test p = 0,032314), так и контрольной группы (Mann–Whitney U Test p = 0,046302). В то же время значимых различий результатов группы непредифференцированных МСК и контрольной группы не наблюдалось (Mann–Whitney U Test p = 0,699467).

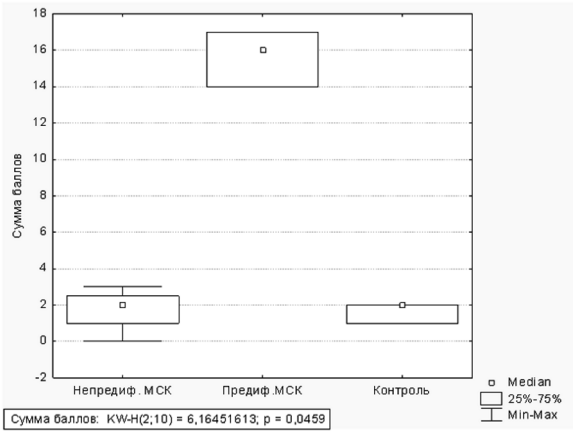


Рисунок 2. — Сравнение показателей шкалы гистологической оценки в исследуемых группах по тесту Kruskal–Wallis (p = 0,0459)

Морфологических изменений в тканях коленных суставов животных (суставной хрящ, связки, жировое тело, синовиальная оболочка) не наблюдалось.

Контрольный осмотр пациентов выполнялся через 6 мес. после операции. Осуществлялась оценка клинического состояния, оценка боли, оценка функционального состояния коленного сустава. Полученные данные приведены в таблице 3. Выполнялось МРТ-исследование коленного сустава с оценкой регенерата хряща по шкале MOCART.

Таблица 3. — Динамика боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ), мм, шкале Lysholm, баллы, исходно и после лечения, показатель шкалы MOCART, баллы

№ пациента	Размеры дефекта, см	ВАШ до лечения	ВАШ 6 мес.	LYSHOLM до лечения	LYSHOLM 6 мес.	MOCART 6 мес.
1	1,5×1,5×0,4	20	10	74	90	65
2	1,8×1,2×0,4	45	1	49	95	65
3	2,0×0,5×0,4	70	1	57	95	80
4	1,5×1,5×0,3	30	5	52	90	70
5	3,0×3,0×0,4	50	10	42	85	65

Таким образом, показатель ВАШ для исследуемой группы уменьшился с 45 [30; 50] исходно до 5 [1; 10] через 6 мес. после лечения (рисунок 3). По данному показателю произведено статистическое сравнение групп по Mann–Whitney U Test. Различия в группах достоверны — p = 0,012186. Таким образом, можно отметить достоверное снижение уровня боли в суставе у пациентов в результате лечения.

Результаты исследуемой группы по шкале Lysholm через 6 мес. после операции можно оценить как хорошие и отличные. Исходный показатель группы увеличился с 52,0 [49,0; 57,0] до 90,0 [90,0; 95,0] (рисунок 4). Различия в группах достоверны — p = 0,012186. Таким образом, отмечается достоверное улучшение функционального состояния поврежденного сустава пациентов в результате лечения.

Всем пациентам проведено МРТ-исследование оперированных суставов (рисунок 5).

Показатель шкалы MOCART в исследуемой группе 65 [65; 70] из 100 возможных, что говорит о высокой степени заполнения хрящевого дефекта гиалиноподобной тканью регенерата.

У исследуемых пациентов за весь период наблюдений не отмечалось нежелательных эффектов, прогрессирования заболевания на фоне лечения, каких-либо осложнений. Общее состояние пациентов при всех контрольных осмотрах оценивалось как удовлетворительное.

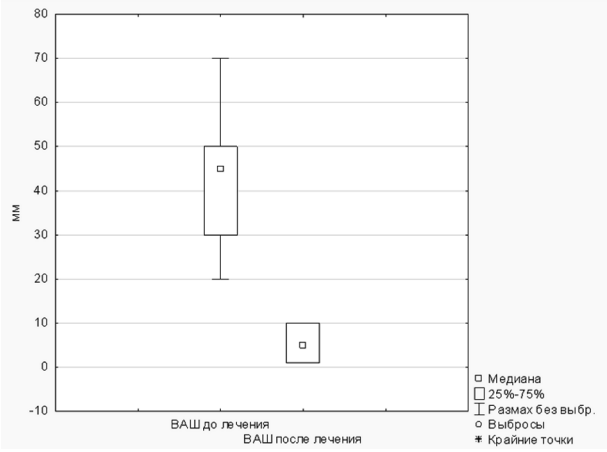


Рисунок 3. — Сравнение показателей шкалы ВАШ пациентов до и после лечения. Mann–Whitney U Test (p = 0,012186)

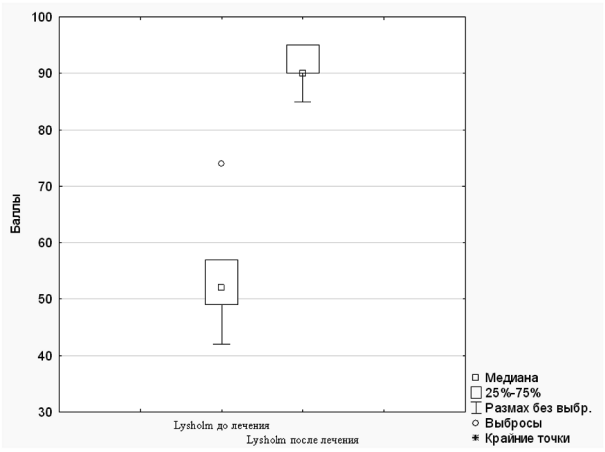
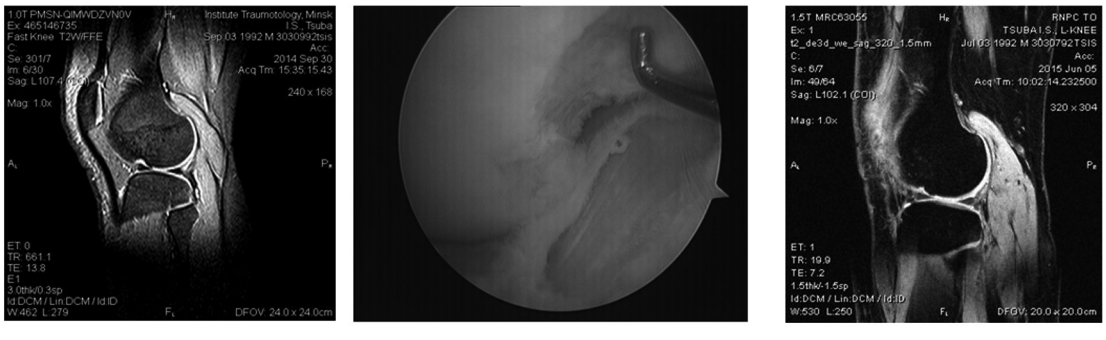


Рисунок 4. — Сравнение показателей шкалы Lysholm пациентов до и после лечения. Mann–Whitney U Test (p = 0,012186)



а б в

Рисунок 5. — (а) МРТ коленного сустава пациента Ц. В наружном мыщелке бедра определяется полнослойный хрящевой дефект; (б) Этот же дефект, визуализированный при артроскопическом исследовании сустава; (в) МРТ коленного сустава через 6 мес. после трансплантации МСК. Дефект полностью заполнен тканью регенерата, по интенсивности сигнала схожей с окружающим хрящом

Заключение. В ходе эксперимента установлена эффективность применения культуры МСК костного мозга в гиалуронате натрия для регенерации поврежденного суставного хряща. При лечении глубокого повреждения суставного хряща с использованием предифференцированных в хондрогенном направлении МСК наблюдается полное заполнение дефекта суставной поверхности гиалиноподобной тканью. Первые результаты клинического применения разработанного метода лечения позволяют говорить о его безопасности, малотравматичности и высокой эффективности. У пациентов отмечается выраженное снижение болевого синдрома, улучшение функции пораженного сустава. Представляется целесообразным изучение отдаленных результатов лечения у большего количества пациентов в длительные сроки после трансплантации.

Литература

1. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopedics / G. Filardo [et al.] // Knee Surg. Sports Traumatol Arthrosc. — 2013. — Vol. 21, № 8. — P. 1717–1729.

2. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect / H. Koga [et al.] // Arthritis Res. Ther. — 2008. — Vol. 10, № 4. — doi: 10.1186/ar2460.

3. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage / S. Wakitani [et al.] // J. Bone Joint Surg Am. — 1994. — Vol. 76, № 4. — P. 579–592.

4. The measurement of clinical pain intensity: a comparison of six methods / M.P. Jensen [et al.] // Pain. — 1986. — Vol. 27, № 1. — P. 117–143.

5. Rating systems in the evaluation of knee ligament injuries / Y. Tegner, J. Lysholm // Clin. Orthoped Relat Res. — 1985. — Vol. 198. — P. 43–52.

6. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous chondrocyte transplantation: determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years / S. Marlovits [et al.] // Eur. J. Radiol. — 2006. — Vol. 57, № 1. — P. 16–23.

A NEW METHOD OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION FOR REGENERATIVE ARTICULAR CARTILAGE RESTORATION

Bukach D.V.[1], Beletsky A.V.[1], Eismont O.L.[1], Isaikina Y.I.[2], Aleinikova O.V.[2]

[1]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Traumatology & Orthopedics", Minsk, Republic of Belarus;
[2]The Republican Research & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology, Minsk, Republic of Belarus

Damage of the joint cartilage can occur due to its injury or disease. Without adequate treatment it leads to degeneration of all joint cartilage and osteoarthritis progression. Transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) seems to be an effective method for cartilage lesion treatment. However there is no common approach for stem cells source selection, surgical method of transplantation, cells graft differentiation degree. The objective of the study was to determine the optimal conditions of developed MSC transplantation method in experiment and to analyze its effectiveness in clinical trial.

Keywords: mesenchymal stem cells, bone marrow, chondrocytes, cartilage.

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСПАНСИИ И АКТИВАЦИИ CYTOKINE-INDUCED KILLER (CIK) КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Вашкевич Е.П., Шман Т.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. ЕК-подобные Т (ЕК Т)/cytokine-induced killer (CIK) клетки обладают противоопухолевым действием и используются в терапии онкологических заболеваний. Различные стимулирующие агенты способны индуцировать их экспансию и повысить цитотоксическую активность. В данной работе показано, что использование антител к CD3 (aCD3) совместно с цитокинами интерфероном (ИФН)-γ, интерлейкином (ИЛ)-2 или их комбинацией способствовало экспансии ЕК Т клеток с приростом за 3 недели культивирования от 342,52±95,89 до 416,93±110,53 раза. Количество активированных ЕК Т/CIK клеток, экспрессирующих маркер CD69, составляло не менее 80%, а цитотоксическая активность против линии К-562 достигала не менее 40% при исходных значениях 7 и 10% соответственно.

Ключевые слова: ЕК Т/CIK клетки, aCD3 антитела, ИФН-γ, ИЛ-2, экспансия, цитотоксичность.

Введение. Среди различных популяций клеток, обладающих противоопухолевыми свойствами, большое внимание исследователей и клиницистов уделяется ЕК-подобным Т (ЕК Т)/cytokine-induced killer (CIK) клеткам. Активно изучается эффективность использования аутологичных и аллогенных CIK клеток у пациентов с солидными опухолями, гематологическими новообразованиями, рецидивами или метастазами, например, при лимфомах, острых лейкозах, меланоме. При этом показано, что использование аллогенных CIK клеток не приводит к развитию реакции «трансплантат против хозяина» [1–4].

Как правило, CIK клетки получают при длительном (около 3–4 недель) культивировании мононуклеарных клеток (МНК) периферической крови в присутствии aCD3 и ИЛ-2, которые добавляют в культуру на следующий день после внесения ИФН-γ [3, 5]. Получаемые в данных условиях CIK клетки обладают большим потенциалом к росту и цитотоксической активностью по сравнению с ЛАК клетками, в т. ч. по отношению к химиорезистентным опухолевым линиям, клеткам лимфом и острого миелоидного лейкоза *in vitro* [1, 3]. Более 90% популяции CIK клеток представлены CD3+ лимфоцитами, среди которых по разным данным от 35 до 65% клеток экспрессируют маркер CD56 [1, 5, 6]. Для осуществления своей противоопухолевой функции CD3+CD56+ клетки не требуют предварительного праймирования, способны к МНС-независимой цитотоксичности и их определяют как ЕК Т клетки [1, 3]. Внесение ИФН-γ в культуру повышает цитотоксическую активность ЕК Т/CIK клеток и способствует экспрессии маркеров Т-хелперов 1 типа [5]. Также для усиления пролиферативного ответа и цитотоксичности рядом исследователей предлагается использовать ИЛ-6, ИЛ-7 и др. [7].

Цель работы — выявление оптимальных условий экспансии ЕК Т/CIK клеток и анализ субпопуляционного состава и уровня активации клеток.

Материалы и методы. В работу были включены образцы периферической крови от 8 здоровых доноров. МНК выделяли на градиенте плотности (плотность 1,077 г/мл) при 400g 30 мин, дважды отмывали в культуральной среде с добавлением 1% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma-Aldrich», США, «LifeTechnologies», США), подсчи-

тывали количество выделенных клеток. Выделенные МНК культивировали при 5% CO_2, 95% влажности и 370°С в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ЭТС, 2 мМ L-глютамина и смеси антибиотиков/антимикотика в начальной концентрации 2 млн/мл в течение 21 сут со сменой среды каждые 3–4 дня с добавлением стимуляторов, представленных в таблице. После первой недели инкубации концентрация клеток поддерживалась на уровне 1 млн/мл. Концентрация ИЛ-2 составила 500 МЕ/мл (препарат «Ронколейкин», «Биотех», РФ), ИФН-γ — 1000 МЕ/мл («Sigma-Aldrich», США), aCD3 (препарат Orthoclone OKT3, ORTHO BIOTECH, США) — 50 нг/мл. При каждой смене среды определяли прирост МНК в культуре с использованием красителя трипанового синего, а на 7, 14 и 21-е сут определяли субпопуляционный состав и цитотоксическую активность клеток с помощью проточной цитофлуориметрии.

Таблица — Используемые комбинации ИЛ-2, ИФН-γ, aCD3 для экспансии ЕК T/CIK клеток

Комбинация aCD3 и цитокинов	День 0	День 1	Каждые 3–4 дня
	Контроль	–	–
	ИЛ-2	–	ИЛ-2
	ИФН-γ	–	
	ИЛ-2 + ИФН-γ	–	
	aCD3	–	
	aCD3 + ИЛ-2	–	
	aCD3 + ИФН-γ	–	
	aCD3 + ИЛ-2 + ИФН-γ	–	
	ИФН-γ	aCD3 +ИЛ-2	

При оценке субпопуляционного состава исследуемые клетки до и после культивирования отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ), затем инкубировали со специфическими моноклональными антителами (мАТ) к CD4-FITC, CD8-PE, CD3-ECD, CD56-PC5, CD69-PC7 и изотипическим контролем («Becton Dickinson», США, «Beckman Coulter», США) в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин, после дважды отмывали в ФСБ. Исследования выполняли на лазерном проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 («Beckman Coulter», США). Обработка полученных результатов проводилась с использованием программы CXP Analysis.

Цитотоксическую активность определяли по прямому лизису опухолевой линии К-562. В день постановки теста клетки-мишени отмывали в культуральной среде, доводили до концентрации 1 млн/мл, окрашивали карбоксифлуоресцеиндиацетат-сукцинилмидил эфиром (КФСЭ), после чего инкубировали при 5% CO_2, 95% влажности и 37°С в течение 20 мин. Затем добавляли равный объем ЭТС, оставляли на 2–3 мин, отмывали, ресуспендировали в полной питательной среде и смешивали с клетками-эффекторами, в качестве которых использовали МНК и полученные в культуре ЕК T/CIK клеток. Соотношения эффектор:мишень составили 10:1, 20:1, 40:1. По окончании реакции (через 4 ч) в клеточную взвесь добавляли пропидиум иодид, результаты оценивали методом проточной цитометрии. Клетки-мишени выделяли по КФСЭ (флуоресценция в зеленой области), а количество погибших клеток определяли по окрашиванию пропидиумом иодидом (флуоресценция в красной области). Специфический лизис вычисляли по следующей формуле:

$$\frac{\%ПИ+\ клеток_{опыт} - \%ПИ+\ клеток_{спонт}}{100\% - \%ПИ+\ клеток_{спонт}} * 100\% ,$$

где %ПИ + $клеток_{опыт}$ — процент лизированных клеток в опытных образцах при совместном культивировании мишеней и МНК;
%ПИ + $клеток_{спонт}$ — спонтанный лизис клеток-мишеней.

Результаты представлены в виде средних арифметических значений ± ошибка средних арифметических значений. Сравнение вариационных рядов проводили с применением непараметрических методов в программе Statistica 6.0. Достоверными считали различия при $P<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Исследования выявили достоверный ($P<0,05$) прирост МНК на 14-е (более 5 раз) и 21-е сут (около 20 раз) при использовании всех комбинаций стимуляторов, содержащих aCD3, по сравнению с образцами, содержащими только ИЛ-2, ИФН-γ или ИЛ-2 совместно с ИФН-γ (рисунок 1).

Также мы проанализировали субпопуляционный состав клеток, пролиферирующих в указанных условиях: количество Т-клеток (CD3+), Т-хелперов (CD3+CD4+), цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+), ЕК Т-клеток (CD3+CD56+) и ЕК-клеток (CD3-CD56+). Выявлено достоверное ($P<0,05$) увеличение количества Т-клеток на 14 и 21-е сут культивирования при использовании всех комбинаций стимуляторов, содержащих aCD3 по сравнению с образцами, содержащими только ИЛ-2, ИФН-γ или ИЛ-2 совместно с ИФН-γ. Прирост Т-клеток на 21-е сут составил от 44,13±14,56 раза (при использовании aCD3 и ИФН-γ на момент начала культивирования с последующим добавлением ИЛ-2 каждые 3–4 дня) до 60,36±22,44 раза (при использовании ИФН-γ на 0-е сут с последующим добавлением aCD3+ИЛ-2 через 1 сут и добавлением ИЛ-2 каждые 3–4 дня) (рисунок 2А). Среди субпопуляций Т-клеток отмечали незначительный прирост CD3+CD4+ популяции (на 21-е сут — от 4,84±2,68 до 7,06±5,22 раза в зависимости от комбинации стимуляторов с aCD3), в то время как прирост CD3+CD8+ клеток составил на 21-е сут от 63,31±11,95 до 72,49±15,15 раза в образцах, содержащих aCD3. В исследуемых условиях наибольшей пролиферацией обладали ЕК Т-клетки, прирост которых на 21-е сут соста-

вил от 342,52±95,89 раза при добавлении в культуру на 0-е сут aCD3 с последующим внесением (каждые 3–4 дня) ИЛ-2 до 416,93±110,53 раз при использовании на 0-й день смеси aCD3 с ИЛ-2 с последующим добавлением ИЛ-2 (рисунок 2Б). При использовании цитокинов без aCD3 индекс пролиферации ЕК Т-клеток не превышал 14,08±8,17 раза на 21-е сут. Прирост ЕК-клеток в исследуемых условиях не превышал 2,22±0,63 раза при использовании любой из комбинаций стимуляторов.

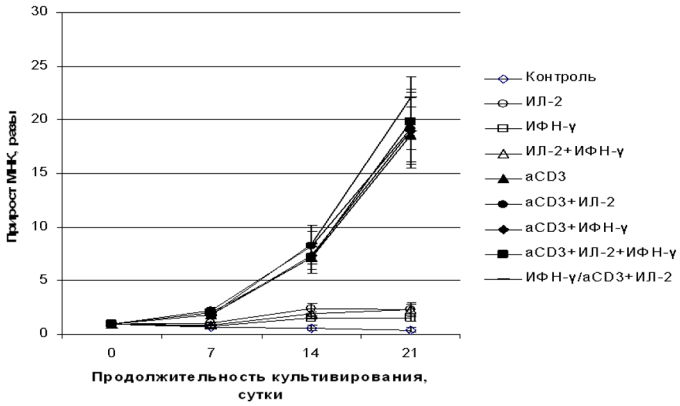


Рисунок 1. — Экспансия МНК в присутствии aCD3 и цитокинов (n = 8)

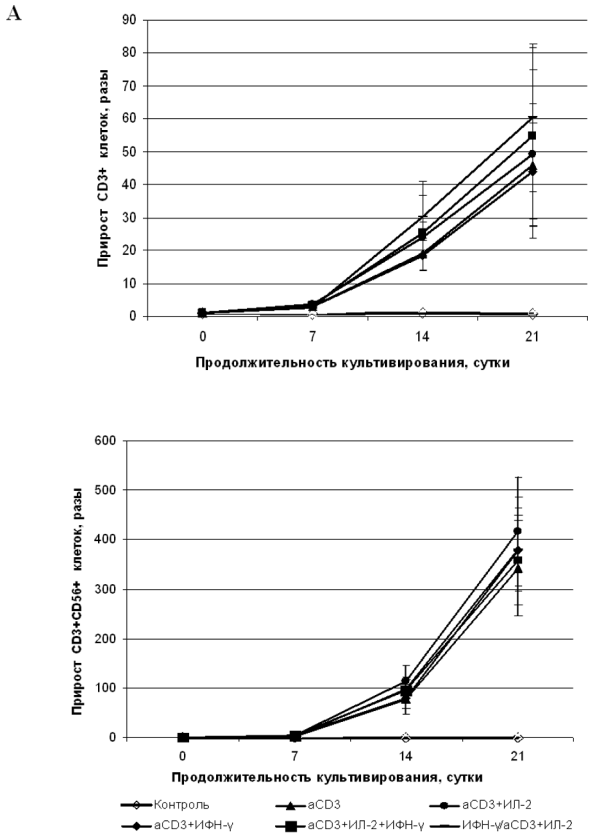


Рисунок 2. — Экспансия CD3+ (А) и CD3+CD56+ (Б) клеток при использовании aCD3 и цитокинов (n = 8)

Далее мы оценили активацию пролиферирующих субпопуляций Т- и ЕК-клеток на основании экспрессии маркера CD69. На 7-е сут активируется более 40% Т--клеток, тогда как к окончанию культивирования на 21-е сут количество активированных Т-клеток достигает от 58,8±4,54 до 78,41±3,17% при использовании любой комбинации стимуляторов по сравнению с контролем (*P<0,05*, рисунок 3А). Среди субпопуляций Т-лимфоцитов ЕК Т-клетки активируются в большей степени по сравнению с CD3+CD4+ и CD3+CD8+. Активация ЕК Т-клеток уже на 7-е сут была выявлена более чем у 70% клеток при использовании всех комбинаций стимуляторов по сравнению с контролем. На 21-е сут в образцах с aCD3 антителами процент активированных ЕК Т-клеток составил от 82,54±5,06 до 93,71±1,35 (рисунок 3Б), в то время как процент активированных CD3+CD4+ и CD3+CD8+ клеток был максимально равным 64,31±2,23 и 83,73±2,56 соответственно. ЕК-клетки, также как и Т-клетки, достоверно (*P<0,05*) активируются в присутствии всех исследуемых комбинаций по сравнению с уровнем активации на контрольных ЕК-клетках.

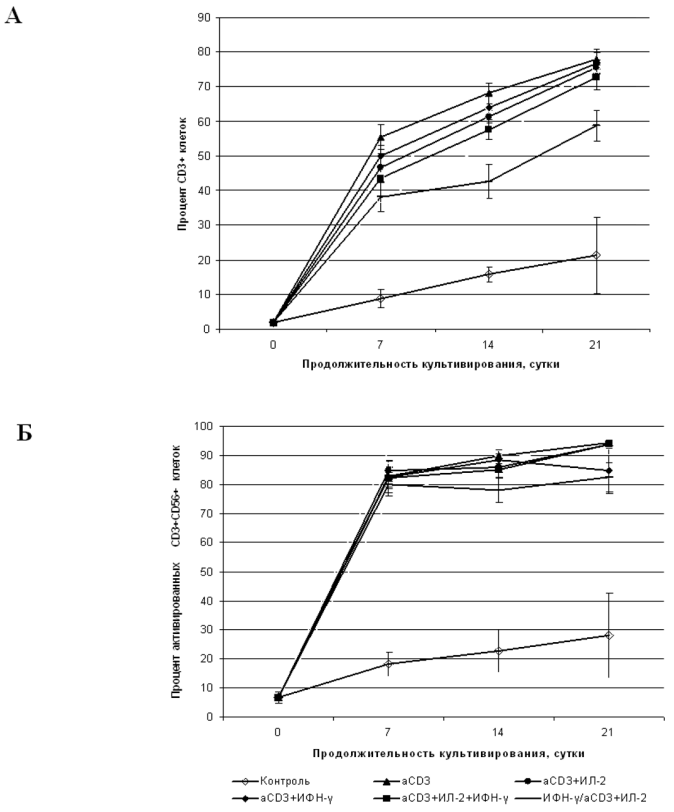


Рисунок 3. — Активация CD3+ (А) и CD3+CD56+ (Б) клеток при использовании aCD3 и цитокинов (n = 8)

Исследование прямой цитотоксической активности также показало повышение лизиса клеток линии К-562 в присутствии ЕК T/CIK клеток, полученных при инкубации МНК в присутствии всех комбинаций aCD3 и цитокинов по сравнению с 0-м днем (P<0,05, рисунок 4).

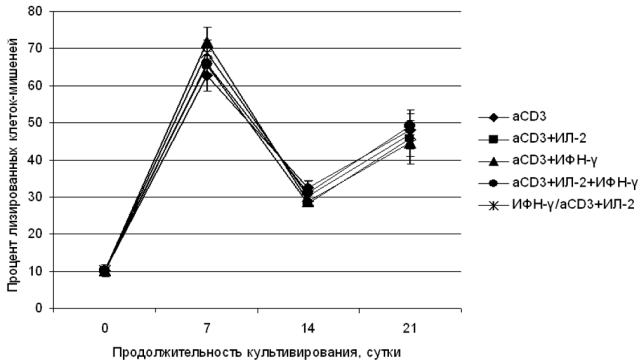


Рисунок 4. — Цитотоксическая активность экспансированных в присутствии aCD3 и цитокинов ЕК T/CIK клеток (n = 7). Соотношение эффектор:мишень — 40:1

Заключение. Исследования показали, что присутствие aCD3 антител с дальнейшим использованием ИЛ-2 позволяет нарастить большое количество функционально активных CIK клеток вне зависимости от использования других активаторов, их различной комбинации и способа введения в культуру. К 21-м сут наибольший прирост наблюдался для CD3+CD56+ ЕК Т-лимфоцитов (до 416,93±110,53 раза). При этом количество активированных ЕК Т-клеток составляло не менее 80% по данным экспрессии маркера CD69 и не менее 40% — по показателям цитотоксической активности ЕК T/CIK клеток на момент окончания культивирования.

Исследование проводилось в рамках выполнения проекта «Разработать технологию *ex vivo* получения трансплантата натуральных киллерных клеток для целей противоопухолевой клеточной иммунотерапии для пациентов с онкологическими заболеваниями» (2011–2013 гг., № гос. регистрации 20114489).

Литература

1. Characterization of the recognition and functional heterogeneity exhibited by cytokine-induced killer cell subsets against acute myeloid leukaemia target cell / Y.C. Linn [et al.] // Immunology. — 2009. — Vol. 126, № 3. — P. 423–435.

2. Repeated infusions of donor-derived cytokine-induced killer cells in patients relapsing after allogeneic stem cell transplantation: a phase I study / M. Introna [et al.] // Haematologica. — 2007. — Vol. 92, № 7. — P. 952–959.

3. Adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer cells for patients with relapsed hematologic malignancies after allogeneic hematopoietic cell transplantation / G.G. Laport [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2011.— Vol. 17, № 11. — P. 1679–1687.

4. Effective Activity of Cytokine-Induced Killer Cells against Autologous Metastatic Melanoma Including Cells with Stemness Features / L. Gammaitoni [et al.] // Clin. Cancer Res. — 2013. — Vol. 19, № 16. — P. 4347–4358.

5. Non-MHC-restricted cytotoxic cells: their roles in the control and treatment of leukaemias / M.W. Lowdell [et al.]// Br. J. of Haematol. — 2001. — Vol. 114, № 1. — P. 11–24.

6. Linn, Y.C. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with *in vitro* cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts / Y.C. Linn, L.C. Lau, K.M. Hui // Br. J. Haematol. — 2002. — Vol. 116, № 1. — P. 78–86.

7. Adoptive immunotherapy strategies with cytokine-induced killer (CIK) cells in the treatment of hematological malignancies / F.C. Schmeel [et al.] // Int. J. Mol. Sci. — 2014. — Vol. 15, № 8. — P. 14632–14648.

ANALYSIS OF EXPANSION AND ACTIVATION OF CYTOKINE-INDUCED KILLER (CIK) CELLS *IN VITRO*

Vashkevich K.P., Shman T.V.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus

NK T/CIK cells exhibit antitumor activity and are used in cancer therapy. Different stimulating agents are able to induce expansion and increase the effectiveness of their action. The present work demonstrates that regardless of the combination of stimulating agents in the presence of antibodies to CD3 and constant use of IL-2 allowed to expand a large number of functionally active CIK cells. The highest increase is observed for CD3+CD56+ NK T (up to 416.93±110.53 times). The number of activated NK T cells is at least 80% according to expression of CD69 marker and at least 40% — in terms of the cytotoxic activity of NK T/CIK cells at the end of culturing.

Keywords: CIK/EK T cells, aCD3 antibodies, expansion, INF-γ, IL-2, cytotoxicity.

БЕЗОПАСНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА

Докукина Т.В.[1], Хлебоказов Ф.П.[1], Игнатенко С.И.[2], Космачева С.М.[2], Гончарова Н.В.[2], Потапнев М.П.[2], Махров М.В.[1], Королевич П.П.[1], Шамрук И.В.[1], Мисюк Н.Н.[1]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр психического здоровья», Минск, Республика Беларусь;

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Беларусь

Реферат. В статье представлены данные о применении аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для лечения 10 пациентов с медикаментозно-резистентной симптоматической эпилепсией. Показано, что внутривенное введение 40,0–101,0 млн (в среднем 68,2±8,48 млн) ММСК и через 5–7 дней эндолюмбальное введение 2,7–8 млн (в среднем 6,34±0,72 млн) нейроиндуцированных ММСК не вызвало у пациентов неблагоприятных реакций и осложнений. Более того, при сроках наблюдения 12–21 мес. у 8 из 10 пациентов отмечено снижение или исчезновение приступов, уменьшение их тяжести. Сделан вывод о перспективности использования предложенной технологии клеточной терапии для лечения фармакорезистентных форм симптоматической эпилепсии.

Ключевые слова: симптоматическая эпилепсия, резистентные приступы, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, трансплантация, электроэнцефалограмма.

Введение. Эпилепсия является одним из наиболее распространенных нервно-психических заболеваний. В мире насчитывается более 50 млн пациентов с эпилепсией [5]. Эпилепсия — это сложное, полиморфное по своим проявлениям заболевание, в патогенезе которого ведущую роль играет первичное локальное повреждение межнейрональных связей головного мозга или генетически обусловленное гипервозбуждение с последующей гибелью нейронов, т. е. нейродегенерация. В последние годы установлено, что продолжительные судорожные приступы вызывают повреждение головного мозга, и даже однократный припадок может привести к «апоптозоподобной» гибели нейронов [4]. С другой стороны, при экспериментальной височной эпилепсии у животных было показано, что судороги не только повреждают гиппокампальную формацию, но и стимулируют нейрогенез [10].

Клеточная терапия рассматривается как перспективный подход для лечения эпилепсии из-за ограниченности терапевтической эффективности противоэпилептических препаратов в 20–40% случаев у пациентов, страдающих этой болезнью. В настоящее время технологии лечения стволовыми клетками оценены в доклинических исследованиях, продемонстрировавших их благотворное влияние на припадки у экспериментальных животных. Локальное действие стволовых клеток на звенья патогенеза эпилепсии связывают с секрецией нейротрофических факторов и противовоспалительным действием [6, 7].

При наличии повреждения в организме пациентов ММСК мигрируют в область деструкции и под влиянием микроокружения дифференцируются в тканеспецифичные стромальные и специализированные клетки [7]. Нейрогенно-дифференцируемые ММСК человека выделяют нейротрофический фактор головного мозга, который оказывает нейропротективное действие на нервные клетки, что способствует уменьшению частоты и тяжести эпилептических приступов [9]. Экспериментальные исследования Holmes G.L. et al. (1991) показали, что введенные ММСК регулируют постсинаптиче-

ские потенциалы возбуждения за счет влияния на концентрацию гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) [8]. На сегодняшний день широко обсуждается высокий потенциал ММСК и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для лечения различных неврологических заболеваний. Тем не менее сохраняются некоторые препятствия для клинического применения клеточной терапии, поэтому широкомасштабные клинические испытания не проводились [7].

Цель работы — предварительная оценка безопасности и эффективности применения наращенных *in vitro* аутологичных ММСК у пациентов с резистентной симптоматической эпилепсией.

Материалы и методы. *Характеристика пациентов.* Клинические исследования проводили в стационаре ГУ «РНПЦ психического здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь в течение 2011–2015 гг.

Исследование было одобрено Этическим комитетом центра. Все пациенты подписывали информированное согласие для участия в исследовании. Критериями включения являлись: мужчины и женщины в возрасте старше 20 лет; частые приступы; наличие резистентной формы эпилепсии, когда любые комбинации 2–3 противоэпилептических средств, включая новейшие, не оказывали заметного влияния на частоту и тяжесть приступов (карбамазепин, вальпроевая кислота, топирамат, ламотриджин, фенобарбитал — в виде монотерапии и в различных комбинациях). Критериями исключения являлись: воспалительные процессы головного мозга; хронически протекающие психозы с частыми декомпенсациями, слабоумием и выраженной социальной дезадаптацией; наличие хронических соматических и неврологических заболеваний в стадии обострения, требующих активной терапии; новообразования.

Под наблюдением находились 22 пациента (13 мужчин и 9 женщин) с фармакорезистентными формами эпилепсии, распределенные в 2 исследовательские группы с применением рандомизации. Возраст пациентов составил от 20 до 56 лет, длительность болезни — от 7 до 29 лет. У всех пациентов отмечалась симптоматическая форма эпилепсии. Наиболее частым этиологическим фактором являлись нейроинфекция, перинатальная патология и черепно-мозговая травма.

По результатам исходного клинического исследования установлено, что у всех пациентов отмечалась высокая частота эпилептических приступов — более 3-х в мес. Характер приступов представлен в таблице 1.

Таблица 1. — Характеристика пациентов, включенных в исследование

Критерии	Группа сравнения (стандартный протокол лечения)	Основная группа (терапия с использованием ММСК)
Количество пациентов	12	10
Женщины/мужчины	5/7	**4/6**
Возраст, Me (M±m), годы	32,5 (20–56)	31,5 (20–44)
Возраст появления приступов, Me (M±m), годы	9,3 (1–33)	14,3 (2–38)
Когнитивные нарушения	12/12	10/10
Личностные расстройства	3/12	1/10
Тип приступов: генерализованные тонико-клонические комплексные парциальные простые парциальные несколько видов приступов	 7 10 3 8/12	 8 7 2 7/10

При первоначальной оценке психического состояния пациентов, согласно Международной классификации болезней 10-го пересмотра, когнитивные расстройства выявлены у всех пациентов, органическое расстройство личности — в 4-х случаях (таблица 1).

Общее клиническое исследование проводилось согласно протоколам обследования психических и неврологических пациентов. Проводился объективный осмотр, тщательное клинико-лабораторное и функциональное обследование. Пациенты консультировались врачом-неврологом, врачом-терапевтом, врачом-психиатром, врачом-окулистом, врачом-отоларингологом, психологом, женщины были осмотрены врачом-гинекологом. Всем пациентам проводилось структурированное психиатрическое интервью. Заболевание характеризовалось симптомами диффузного поражения головного мозга, частыми эпилептическими приступами, тяжелыми постприступными состояниями, сопутствующими психическими расстройствами. Комбинированная трансплантация аутологичных ММСК проводилась на фоне противоэпилептической терапии. Для исследования функционального состояния головного мозга, определения типа эпилептического приступа, а также путей и зон распространения эпилептогенных импульсов, оценки эффективности лечения пациентам в динамике проводилась электроэнцефалография (ЭЭГ) и видеомониторирование ЭЭГ. Для оценки когнитивных функций использовался тест MMSE. Процессы произвольного внимания и работоспособность изучались при помощи «таблиц Шульте» и «счета по Крепелину» [2]. Исследование кратковременной памяти проводилось при помощи методики запоминания 10 слов Лурия А.Р. [1]. Исследование тревожности проводилось при помощи теста «Шкала реактивной и личностной тревожности» (опросник Спилбергера Ч.Д. в модификации Ханина Ю.Л.), позволяющего дифференцированно измерять тревожность и как личностное свойство, и как состояние [3]. Для оценки тревоги и депрессии использовалась «Госпитальная шкала тревоги и депрессии».

Ожидаемый положительный клинический эффект базировался на представлениях о трофическом и иммуносупрессорном действии ММСК на нейродегенеративные и воспалительные процессы при эпилепсии [6, 7].

ММСК. Для получения аутологичных ММСК у пациентов осуществляли забор 40 мл костного мозга под местной анестезией из гребня подвздошной кости. Костномозговой пунктат транспортировали в специализированную лабо-

раторию для выделения ММСК из фракции мононуклеаров методом адгезии на пластике и последующего культивирования в течение 3–5 недель (2–3 пассажа) в питательной среде альфа-МЕМ с рибонуклеозидами и глютамаксом (Sigma, Invitrogen), 5% сыворотки АВ (IV), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. В процессе культивирования контролировали стерильность, оценивали морфологию и пролиферативную активность клеток.

Нейрогенную дифференцировку части выросших *in vitro* ММСК проводили путем дополнительного культивирования в среде Neurocult-XF proliferation medium (StemcellTech.) в течение 7 дней. Контроль качества ММСК перед введением включал стерильность, фенотипический контроль клеток, для нейродифференцированных ММСК — наличие генетических маркеров нейродифференцировки (нестин, NSE).

Этапы терапии с использованием аутологичных ММСК. Введение аутологичных ММСК осуществляли в условиях стационара на фоне стандартной противоэпилептической терапии с определением концентрации препаратов в крови. С целью уменьшения риска побочных эффектов трансплантацию ММСК пациентам проводили в 2 этапа. На первом этапе проводилась трансплантация аутологичных недифференцированных ММСК: однократное медленное внутривенное введение 40,0–101,0 млн (в среднем 68,2±8,48 млн) клеток в 20 мл раствора натрия хлорида 0,9% для инфузий, содержащего 5% аутологичной сыворотки. Жизнеспособность клеток в трансплантате составляла 98,1±0,26%. Более 95% ММСК экспрессировали маркеры CD105, CD90, и менее 5% — CD45, CD34. За время наращивания клеточной массы количество клеток увеличилось в среднем в $1{,}04\times10^5$ раза. На втором этапе через 5–7 дней после первой трансплантации пациенту вводили в спинномозговой канал 2,7–8 млн (в среднем 6,34±0,72 млн) нейроиндуцированных ММСК в 5 мл раствора натрия хлорида 0,9% для инфузий, содержащего 5% аутологичной сыворотки. Жизнеспособность клеток составляла 98,8%. Процедуру проводили при укладывании пациента на кушетку на бок, на уровне промежутка позвонков L3–L4 под местной анестезией 0,5% раствора новокаина.

Оценку безопасности цикла клеточной терапии с использованием аутологичных ММСК проводили путем оценки лабораторной и клинико-нейрофизиологической реакции пациентов на процедуру введения клеточного материала.

Результаты трансплантации аутологичных ММСК оценены в сроки наблюдения от 3 до 17 мес. после их введения. Тяжесть состояния пациентов оценивали в соответствии с клиническими, нейрофизиологическими и патопсихологическими критериями.

Результаты и их обсуждение. Безопасность процедур, связанных с клеточной терапией, была оценена у всех пациентов с эпилепсией. Все они хорошо перенесли процедуру забора костного мозга и трансплантацию ММСК: побочных эффектов или аллергических реакций зафиксировано не было.

Средний возраст пациентов обеих групп составил около 32 лет. Соотношение числа женщин и мужчин было сопоставимо в обеих группах. Возраст появления приступов варьировал в широких пределах, в то время как средние значения также были сопоставимы. У всех обследованных пациентов отмечались когнитивные расстройства. По характеру приступов пациенты обеих групп также не различались (таблица 2).

Таблица 2. — Частота приступов у пациентов в исследуемых группах

Показатель	Группа сравнения (стандартный протокол лечения), n = 12		Основная группа (терапия с использованием ММСК), n = 10	
Частота приступов, раз в мес.	через 3 мес.	через 12–15 мес.	через 3 мес.	через 12–21 мес.
Ремиссия	0/12	0/12	1/10	3/10
Снижение частоты более чем на 50%	4/12	2/12	1/10	5/10
Снижение частоты менее, чем на 50%	1/12	1/12	5/10	1/10
Без эффекта	7/12	9/12	3/10	1/10

Основанием для клеточной терапии пациентам с эпилепсией являлись неэффективность проводимой ранее фармакотерапии и согласие пациентов на осуществление клеточной терапии, включая процедуры забора костного мозга, а также внутривенное и эндолюмбальное введение наращенных *in vitro* аутологичных ММСК.

Мы оценивали изменения в состоянии пациентов обеих групп более 1 года после терапии. Как показано в таблице 2, в течение 12–15 мес. после начала исследования у 10 из 12 пациентов группы сравнения отсутствовал эффект (значимое изменение частоты приступов, результатов анкетирования, ЭЭГ записи). Пациенты основной группы, получившие комплексное лечение с использованием ММСК, достигли значимо лучших результатов: у 30% пациентов достигнута длительная ремиссия в период 12–21 мес. после терапии (отсутствие приступов в течение более чем 6 мес.), у 80% пациентов отмечался значимый клинический ответ. У большинства пациентов основной группы отмечалась трансформация генерализованных тонико-клонических приступов в комплексные парциальные (психомоторные) и даже простые парциальные приступы. Следует отметить, что эффект влияния ММСК на состояние пациента был более очевидным в долговременной перспективе (12 мес. и более) по сравнению с эффектом через 3 мес. после применения клеточной терапии.

Достижение стойкой клинической ремиссии у 3 пациентов основной группы через 12 мес. после лечения сопровождалось положительными изменениями на ЭЭГ в виде снижения пароксизмальной активности, уменьшения числа вспышек вследствие положительного влияния трансплантации МСК на метаболизм головного мозга. Анализ ЭЭГ свидетельствует о нормализации пиковой частоты у 4 из 10 пациентов исследуемой группы и у 1 из 12 пациентов группы сравнения. Таким образом, результаты ЭЭГ-исследования как визуальные, так и компьютерные, коррелировали с положительной динамикой клинических показателей.

Заключение. В исследовании мы представили первые результаты клинического применения ММСК для терапии пациентов с резистентной эпилепсией. Вопрос безопасности клеточной терапии широко обсуждаем. Во-первых, мы используем аутологичные стволовые клетки во избежание иммунной сенсибилизации трансплантированных клеток. Во-вторых, для клинического применения мы используем генетически неизмененные стволовые клетки, чтобы избежать перепрограммирования стволовых клеток или использования экзогенной ДНК, которые несут риск нестабильности генома и генетических мутаций с неизвестными последствиями в долгосрочной перспективе. В-третьих, мы использовали два метода доставки ММСК в организм пациента с эпилепсией (внутривенный, эндолюмбальный).

Наше исследование продолжается, но уже полученные первые данные наглядно продемонстрировали безопасность применения трансплантации ММСК для лечения резистентной эпилепсии. Мы не выявили никаких неблагоприятных реакций и осложнений, изменений лабораторных или клинических показателей после применения клеточной терапии. Кроме того, в основной группе пациентов отмечались положительные эффекты терапии (в т. ч. ремиссия более 6 мес.) в отличие от пациентов из группы сравнения.

Первый опыт проведения клеточной терапии пациентам с эпилепсией в Республике Беларусь показал, что внутривенное введение аутологичных ММСК и эндолюмбальное введение нейроиндуцированных аутологичных ММСК может быть эффективной дополнительной терапией выбора у пациентов с фармакорезистентной формой заболевания. Полученные предварительные данные подтверждают безопасность, а также перспективность использования стволовых клеток человека для терапии пациентов с эпилепсией.

Дополнительные исследования необходимы для определения более четких показаний (формы эпилепсии, степени тяжести заболевания, сопутствующих нарушений) к проведению трансплантации аутологичных ММСК и определения целесообразности повторных курсов клеточной терапии.

Литература

1. Бизюк, А.П. Компендиум методов нейропсихологического исследования / А.П. Бизюк. — СПб.: Речь, 2005. — 400 с.

2. Блейхер, В.М. Клиническая патопсихология: рук. для врачей и клинических психологов / В.М. Блейхер, И.В. Крук, С.Н. Боков. — М.: Изд-во Моск. псих.-соц. ин-та; Воронеж: «МОДЕК», 2006. — 624 с.

3. Дерманова, И.Б. Диагностика эмоционально-нравственного развития. Исследование тревожности (Ч.Д.Спилбергер, адаптация Ю.Л.Ханин) / И.Б. Дерманова. — СПб., 2002. — С. 124–126.

4. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures / J. Bengzon [et al.] // Prog. Brain Res. — 2002. — Vol. 135. — P. 111–119.

5. de Boer, H.M. The global burden and stigma of epilepsy / H.M. de Boer, M. Mula, J.W. Sander // Epilep. Behav. — 2008. — Vol. 12, № 4. — P. 540–546.

6. Finding a better drug for epilepsy: anti-inflammatory targets / S. Dedeurwaerdere [et al.] // Epilepsia. — 2012. — Vol. 53, № 7. — P. 1113–1118.

7. Ess, K.C. Patient heal thyself: modeling and treating neurological disorders using patient-derived stem cells / K.C. Ess // Exp. Biol. Med. — 2013. — Vol. 238, № 3. — P. 308–314.

8. Holmes, G.L. Effect of neural transplants on seizure frequency and kindling in immature rats following kainic acid / G.L. Holmes // Dev. Brain Res. — 1991. — Vol. 64, № 1–2. — P. 47–56.

9. Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets / K. Kobow [et al.] // Epilepsia. — 2012. — Vol. 53, № 11. — P. 1868–1876.

10. Parent, J.M. Mechanisms and functional significance of aberrant seizure-induced hippocampal neurogenesis / J.M. Parent, G.G. Murphy // Epilepsia. — 2008. — Vol. 49, suppl. 5. — P. 19–25.

THE USE OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS FOR THERAPY OF PATIENTS WITH SYMPTOMATIC EPILEPSY

Dakukina T.V.[1], Hlebokazov F.P.[1], Ighnatenko S.I.[2], Kosmacheva S.M.[2], Goncharova N.V.[2], Potapnev M.P.[2], Makhrov M.V.[1], Korolevich P.P.[1], Misyuk N.N.[1]

[1]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Mental Health", Minsk, Republic of Belarus;
[2]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus;

An article presented the data on application of autologous mesenchymal stem cells (MMSCs) for therapy of 10 patients suffering from drug-resistant symptomatic epilepsy. Intravenous injection of $40.0–101.0\times10^6$ (mean $68.2\pm8,48\times10^6$) MMSCs endolumbal injection of $2.7–8.0\times10^6$ (mean $6.34\pm0.72\times10^6$) neuroinduced MMSCs did non induced in patients unfovarable reactions and complications. During 3–11 months of monitoring 5 of 10 patients demonstrated decrease the frequency or disappearance of seizures. We concluded that application of MMSC-base cellular therapy is safe and enable to facilitate seizure status in patients with drug-resistant symptomatic epilepsy.

Keywords: symptomatic epilepsy, drug-resistant seizures, mesenchymal stem cells, transplantation, electroencephalogram.

РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ И ИНТЕРЛЕЙКИН-8 В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Дорошенко Т.М.[1], Акалович С.Т.[1], Бакерова В.А.[1], Шман Т.В.[2], Марейко Ю.Е.[2], Белевцев М.В.[2], Алейникова О.В.[2], Войтенок Н.Н.[3]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь;

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь;

[3]Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, Москва, Российская Федерация

Реферат. Актуальной проблемой трансплантологии является поиск надежных серологических маркеров острой реакции «трансплантат против хозяина» (оРТПХ), т. к. использование для диагностики оРТПХ инвазивной биопсии органов-мишеней оРТПХ не всегда информативно, особенно в ранний пост-трансплантационный период. Изучена диагностическая ценность определения растворимого рецептора фактора некроза опухолей первого типа (рФНОР1) и интерлейкина-8 (ИЛ-8) у детей после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для диагностики оРТПХ. Показано, что в случае развития у пациентов оРТПХ концентрация рФНОР1 в плазме крови увеличивается более чем в 2 раза по сравнению с аналогичным показателем до кондиционирования (p = 0,001). Определение рФНОР1 можно предложить в качестве дополнительного метода диагностики оРТПХ в раннем периоде после терапии ТГСК у пациентов без инфекционных осложнений. Установлено, что ИЛ-8 не обладает достаточной диагностической ценностью в качестве маркера оРТПХ.

Ключевые слова: трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, острая реакция «трансплантат против хозяина», растворимый рецептор фактора некроза опухолей первого типа, интерлейкин-8.

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время — один из наиболее актуальных и перспективных методов лечения множества гематологических и онкологических заболеваний (апластическая анемия, острый миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелолейкоз и др.). Ежегодно в мире выполняется около 50 тыс. трансплантаций костного мозга (ТКМ) и трансплантаций периферических стволовых клеток, причем количество операций постоянно увеличивается [1]. Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является наиболее тяжелыми жизнеугрожающим осложнением аллогенной ТГСК. Острая РТПХ развивается примерно у половины пациентов, получающих терапию аллогенной ТГСК. Учитывая, что в ближайшей перспективе прогнозируют удвоение количества ежегодных трансплантаций от неродственных доноров, количество пациентов с оРТПХ значительно увеличится [1]. Диагностика оРТПХ базируется на клинических критериях, которые могут подтверждаться биопсией одного из трех органов-мишеней РТПХ (кожа, желудочно-кишечный тракт и печень). Выделяют 4 стадии оРТПХ — от I до IV, причем летальность коррелирует со степенью выраженности данного осложнения (25% выживаемость для III ст. и 5% — для IV) [1].

Использование для диагностики оРТПХ биопсии не всегда информативно, особенно в ранний пост-трансплантационный период, когда изменения в коже и слизистых связаны с токсическим эффектом химиотерапии.

Известно, что в развитии и поддержании РТПХ участвует каскад цитокинов, включая фактор некроза опухолей альфа (ФНО-α), интерлейкин-10, интерлейкин-2, интерферон-γ [1]. Провоспалительный цитокин ФНО-α, основной медиатор апоптоза, воспаления и иммунного ответа, вовлекается на трех стадиях развития оРТПХ, начиная с повышения уровня экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости и минорных антигенов клетками реципиента, что усиливает их распознавание зрелыми Т-клетками донора, и заканчивая индукцией синтеза хемокинов, которые привлекают лейкоциты в органы-мишени РТПХ [2]. Сам выделяющийся фактор быстро сорбируется на клетках и тканях. Вместе с тем участие ФНО-α в патологии легко можно определить благодаря тому, что его связывание со специфическими рецепторами, в основном рецептором ФНО-α первого типа (ФНОР1, р55), приводит к их отщеплению с поверхности клеток и переходу в растворимую форму. Растворимый ФНОР1 (рФНОР1) циркулирует в крови не менее 1 сут и является стабильным маркером системных и локальных реакций, опосредованных ФНО-α. У пациентов после аллогенной ТГСК уровень ФНО-α повышается после повреждения тканей, вызванного кондиционированием, и при отсутствии осложнений его уровень падает в течение недели. У пациентов с развившейся оРТПХ повышенный уровень ФНО-α сохраняется вплоть до клинического проявления осложнения. Результаты клинических испытаний показали эффективность ингибирования ФНО-α как в качестве начальной, так и в качестве основной терапии оРТПХ [2]. Также показано, что у пациентов с оРТПХ уровень рФНОР1 в плазме значительно повышается и коррелирует с содержанием ФНО-α.

Интерлейкин-8 (ИЛ-8), белок с молекулярной массой 8,3 кДа, является основным хемотактическим фактором, вызывающим миграцию нейтрофильных лейкоцитов в ткани при воспалении. Предполагают, что ИЛ-8, будучи мощным хемоаттрактантом, направляет эффекторные клетки в органы-мишени оРТПХ и таким образом его повышенный уровень в крови связан с риском развития РТПХ [1].

На сегодняшний день в трансплантологии нет общепринятых серологических маркеров, позволяющих не только диагностировать, но и прогнозировать развитие у реципиентов иммунопатологических осложнений, поэтому разработка новых подходов к ранней диагностике развития РТПХ с целью своевременной и эффективной терапии данного осложнения остается актуальной.

Цель работы — определение значимости уровней рФНОР1 и ИЛ-8 в плазме крови пациентов детского возраста после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для диагностики острой реакции «трансплантат против хозяина».

Материалы и методы. В работе исследована плазма крови 33 пациентов (первичный диагноз: 15 — ОЛЛ, 3 — ОМЛ, 5 — апластическая анемия, 3 — лимфома, 1 — врожденная нейтропения тяжелой степени, 1 — хроническая гра-

нулематозная болезнь, 1 — первичный иммунодефицит, возраст от 1,8 до 18 лет), госпитализированных в РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии с 2011 по 2014 гг. Анализировали образцы плазмы до начала режима кондиционирования (0 день, К0) и в нескольких контрольных точках после ТГСК (7/14, 21 или 30 день). Среди проанализированных пациентов было выделено две группы: группа без развития оРТПХ («ТГСК без оРТПХ», n = 17) и группа с развитием оРТПХ 1–3 стадии («ТГСК, осложненная оРТПХ», n = 11). Группа сравнения включала 24 здоровых ребенка (возраст от 8 мес. до 16 лет).

Концентрации рФНОР1 и ИЛ-8 определяли с помощью «сендвич»-ИФА на основе моноклональных антител по методикам, разработанным ранее [3, 4]. В качестве стандартов ИФА использовали рекомбинантные рФНОР1 (Invitrogen) и ИЛ-8 (Peprotech). Чувствительность определения рФНОР1 — 50 пкг/мл, ИЛ-8 — 2 пкг/мл.

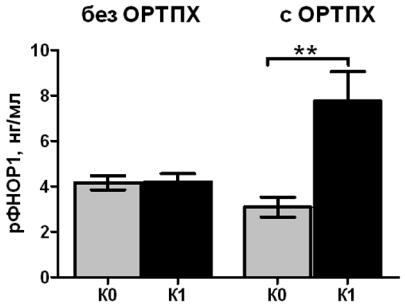
Материалом для исследования служила плазма крови, забранной на гепарине, и замороженная для дальнейшего анализа в ИФА.

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 с помощью U-теста Манна–Уитни для непараметрических данных.

Результаты и их обсуждение. Известно, что в развитии и поддержании реакции «трансплантат против хозяина» участвует каскад цитокинов [1]. Провоспалительный цитокин ФНО вовлекается на 3-х стадиях развития оРТПХ, начиная с повышения уровня экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости и минорных антигенов клетками реципиента и заканчивая индукцией синтеза хемокинов, которые привлекают лейкоциты в ткани мишени РТПХ [2]. Определение ФНО в образцах плазмы является низко-информативным, в то же время показано, что рФНОР1 в отличие от самого ФНО циркулирует в крови не менее 1 сут и является стабильным маркером системных и локальных реакций, опосредованных ФНО.

Проведенное нами определение уровня рФНОР1 показало, что его концентрация в плазме пациентов группы «ТГСК без оРТПХ» до начала кондиционирования составила 4,2±1,3 нг/мл, что выше (p = 0,002) уровня группы сравнения (2,5±0,8 нг/мл). У пациентов группы «ТГСК, осложненная оРТПХ» содержание рФНОР1 составило 3,1±1,5 нг/мл.

В ходе лечения при развитии оРТПХ на 9–30-е сут после ТГСК было выявлено значительное увеличение концентрации рФНОР1 в плазме в ближайшей к началу оРТПХ контрольной точке забора крови (К1) по сравнению с К0 у каждого пациента. В группе пациентов, у которых не развилась оРТПХ в ходе терапии ТГСК, концентрация рФНОР1 существенно не изменялась (рисунок).



К0 — точка забора крови до начала кондиционирования; К1 — ближайшая к началу оРТПХ контрольная точка забора крови

Рисунок — Содержание рФНОР1 в плазме пациентов, проходивших терапию ТКМ, в динамике лечения

Статистический анализ данных показал, что в группе пациентов с оРТПХ уровень рФНОР1 вырос более чем в 2 раза (среднее значение — 2,7; диапазон — 1,3–4,9; p = 0,001), тогда как в группе пациентов без оРТПХ концентрация рФНОР1 в ближайшей контрольной точке изменилась в 0,5–2,0 раза (среднее значение — 1,1; p = 0,13).

Choi S. и соавт. показали, что повышение концентрации рФНОР1 в 2,5 раза и более на 7-е сут терапии коррелирует с высокой частотой развития оРТПХ [5], что согласуется с полученные нами данными. рФНОР1 входит также в состав панелей серологических маркеров РТПХ, предложенными несколькими группами исследователей [6, 7].

Нами установлено, что у пациентов с инфекционными осложнениями концентрация рФНОР1 может увеличиваться в десятки раз при отсутствии оРТПХ (таблица), поэтому наличие инфекции является ограничением по использованию маркера для диагностики оРТПХ.

Анализ содержания ИЛ-8 показал, что в плазме пациентов обеих групп после терапии ТГСК концентрация хемокина значительно не изменялась. Так, в плазме пациентов первой группы концентрация хемокина составила в среднем 19,4±6,7 пкг/мл до терапии ТГСК и 18,4±5,7 пкг/мл после нее (p = 0,8). В группе пациентов с развившейся оРТПХ показатель составил 40,45±24,2 пкг/мл в точке К0 и 27,8±8,2 пкг/мл в точке К1 (p = 0,16). В группе здоровых детей показатель был довольно стабилен и составил 9,2±3,7 пкг/мл. У пациентов с инфекционными осложнениями ТГСК концентрация ИЛ-8 значительно увеличивалась — от 12,5 до 15060,2 раза (p = 0,04) .

По литературным данным, концентрация ИЛ-8 может являться предиктором развития оРТПХ в составе панели маркеров [6, 7] и позволяет оценить риск развития хронической РТПХ у пациентов после ТГСК. Однако в качестве основного маркера для оценки развития оРТПХ ИЛ-8 не обладает достаточной диагностической ценностью, что согласуется с результатами нашего исследования.

Таблица — Концентрация рФНОР1 и ИЛ-8 в плазме крови пациентов группы «ТГСК, осложненная инфекцией»

Пациент	оРТПХ (день)	Инфекционные осложнения	День начала инфекционных осложнений	Концентрация рФНОР1 в контрольных точках, нг/мл			Концентрация ИЛ-8 в контрольных точках, нг/мл		
				0	7/14	28	0	7/14	28
1	Нет	Грам-отрицательный сепсис	6	2,9	113	–	0,0083	125	–
2	1 ст. (13)	*St.epidermidis*	3	3,3	3,9	2,8	0,075	0,06	0,09
3	Нет	Вирус ЭБ	2	5,6	11,9	–	0,021	0,26	–
4	Нет	Грам-отрицательный сепсис	6	2,8	14,5	–	0,002	0,11	–

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РБ (договор 01.18 ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения» подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина»).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение концентрации рФНОР1 более чем в 2 раза в плазме крови детей при отсутствии инфекционных осложнений указывает на развитие оРТПХ. Определение рФНОР1 можно предложить в качестве дополнительного метода диагностики оРТПХ в раннем периоде после терапии ТГСК.

Литература

1. Cellular and molecular mechanisms in graft-versus-host disease / L. Zhang [et al.] // J. Leukoc. Biol. — 2016. — Vol. 99, № 2. — P. 279–287.

2. Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD / D. Couriel [et al.] // Blood. — 2004. — Vol. 104, № 3. — P. 649–654.

3. Содержание растворимого рецептора TNF-p55, альфа-дефензинов и изоформ интерлейкина-8, IL-877 и IL-872 в крови детей / С.Т. Акалович [и др.] // Мед. иммунология. — 2005. — Т. 7, № 5–6. — С. 575–578.

4. TNF receptor p55 and IL-8(72) and IL-8(77) isoforms: blood and urine levels in breast cancer patients / V.P. Shichkin [et al.] // J. Immunotoxicol. — 2009. — Vol. 6, № 4. — P. 235–242.

5. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival / S. Choi [et al.] // Blood. — 2008. — Vol. 112, № 4. — P. 1539–1542.

6. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease / S. Paczesny [et al.] // Blood. — 2009. — Vol. 113, № 2. — P. 273–278.

7. Monitoring of TNFR1, IL-2Ra, HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients / M. Berger [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2013. — Vol. 48, № 9. — P. 1–7.

SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-1 AND INTERLEUKINE-8 IN DIAGNOSTICS OF ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE IN CHILDREN AFTER HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Dorosenko T. M.[1], Akalovich S.T.[1], Bakerava V.A.[1], Shman T.V.[2], Mareika Y.E.[2], Belevtsev M.V.[2], Aleinikova O.V.[2], Voitenok N.N.[3]

[1]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus;

[2]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus;

[3]Fund for Molecular Hematology & Immunology, Moscow, Russian Federation

We have investigated a diagnostic value of plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor-1 (sTNFR1) and interleukin-8 (IL-8) in children after hematopoietic stem cell transplantation as biomarkers for acute graft-versus-host disease (GVHD). We have identified, that the plasma level of sTNFR1 in patients with acute GVHD increased more than two-fold compared to level before conditioning ($p = 0.0001$), while in patients without GVHD the level of sTNFR1 was not changed significantly ($p = 0.83$). Determination of sTNFR1 can be used for the clinical management of patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation without infections to confirm the diagnosis of acute GVHD. The results showed that IL-8 level has no diagnostic value for acute GVHD.

Keywords: hematopoietic stem cell transplantation, acute graft-versus-host disease, soluble tumor necrosis factor receptor-1, interleukin-8.

ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ: ПРЕДИКТОРЫ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ

Калачик О.В., Нарбин А.В., Вершинин П.Ю., Козлова М.В., Губерская М.П.

Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей, Минск, Республика Беларусь

Реферат. В связи с высокой распространенностью инфекции мочеполовых путей (ИМП) и отсутствием полноценных данных о ее эффективной профилактике необходим обязательный поиск, учет и оценка факторов риска этого осло-

жения с целью формирования индивидуального подхода к выбору антибактериального профилактического лекарственного средства и определения длительности его назначения. В исследовании установлено, что общая заболеваемость ИМП (активная ИМП и бессимптомная бактериурия) за 3 года наблюдения у пациентов после трансплантации почки составила 36,7% (99/270). Число пациентов с аИМП составило 29,3% (79/270), а распространенность ББ — 7,4% (20/270).

Установлена клиническая и статистическая значимость таких факторов риска, как женский пол пациентов, диагноз ВАМП как основная причина хронической почечной недостаточности, длительность дотрансплантационной диализотерапии более 24 мес., наличие нижнеполярной добавочной почечной артерии в трансплантате почки, а также длительность операции по трансплантации почки более 3,5 ч. На их основании разработан «Excel-калькулятор ИМП», дающий прогноз ИМП с учетом совокупности вышеперечисленных признаков.

Ключевые слова: инфекция мочевых путей, бессимптомная бактериурия, факторы риска, живые доноры, реципиенты трансплантата почки, многофакторный анализ, показатель отношения шансов.

Введение. Трансплантация почки является основным методом почечно-заместительной терапии терминальной стадии хронической почечной недостаточности. За последние годы отмечается устойчивая тенденция по увеличению числа пересадок почки. Несмотря на достижения современной диализотерапии, более высокая выживаемость и качество жизни пациентов после трансплантации почки обусловливают преимущества этого вида почечно-заместительной терапии. Однако поскольку пациенты после трансплантации почки нуждаются в пожизненной иммуносупрессивной терапии, они подвержены высокому риску инфекционных осложнений, которые являются одной из главных причин заболеваемости и летальности [1]. Иммуносупрессивные препараты создают постоянный негативный фон для развития инфекций у реципиентов солидных органов. В настоящее время в течение первых двух лет после трансплантации инфекции как причина госпитализаций опережают острое отторжение. Наиболее часто в этой популяции пациентов встречаются ИМП и инфекции дыхательных путей [2–4].

В исследовании Lee J.R. (2013), которое включало данные обследования 177 пациентов, получивших трансплантат почки с 2000 по 2005 гг., установлено, что 75% реципиентов имели как минимум 1 эпизод ИМП за период наблюдения [4]. По данным других авторов, частота ИМП в зависимости от сроков наблюдения за пациентами достигала 86% [5].

Бессимптомная бактериурия, неосложненная и осложненная ИМП составляют 44; 32 и 24% соответственно [3, 4, 6].

В ходе многих исследований было установлено, что к факторам риска ИМП относятся: женский пол [3, 4], старший возраст пациентов [6], гломерулонефриты и поликистоз почек в анамнезе [5, 6], цитомегаловирусная болезнь [6], длительная катетеризация мочевых путей, установка мочевых стентов [3], сахарный диабет, рецидивирующая ИМП до трансплантации, пузырно-мочеточниковый рефлюкс и отсроченная функция трансплантата почки [4].

ИМП может маскировать наличие острого пиелонефрита трансплантата, последствия которого являются дополнительным фактором, влияющим на функцию и выживаемость аллографта почки [7].

Спустя 4 года после трансплантации почки средний уровень скорости клубочковой фильтрации у реципиентов, перенесших острый пиелонефрит, был приблизительно на 50% меньше, чем у пациентов без ИМП или перенесших неосложненную ИМП [7]. Трудность, связанная с этим осложнением, заключается в том, что заподозрить острый пиелонефрит на основании только клинических данных очень непросто. Это подтверждается сообщениями об эпизодах пиелонефрита трансплантата, диагностированными на основании протокольных нефробиопсий. В большинстве таких случаев заболевание не было заподозрено клинически, при этом много эпизодов пиелонефрита было связано с предыдущей неосложненной и пролеченной в соответствии с рекомендациями ИМП [7], поэтому воздействие инфекции трансплантата на исход трансплантации почки может быть недооценено.

В связи с высокой распространенностью ИМП и отсутствием полноценных данных об эффективной профилактике необходим обязательный поиск, учет и стратификация факторов риска этого осложнения, а также изучение спектра возбудителей, характерных для реципиентов почки в Республике Беларусь с целью формирования индивидуального подхода к выбору антибактериального профилактического лекарственного средства и определения длительности его назначения. В случае высокого риска развития ИМП обоснованным может считаться длительное (до 1 года) применение лекарственных средств, в противном случае можно обойтись более короткими курсами профилактической терапии.

Однако в настоящее время отсутствует четкая методика анализа риска ИМП с целью разработки метода профилактики и скрининга [4].

Цель работы — разработка математической модели, позволяющей предугадать развитие ИМП после трансплантации почки на основе анализа всего множества факторов риска этого осложнения.

Материалы и методы. Исследование классифицируется как клиническое, ретроспективное, обсервационное, с дизайном «случай-контроль».

Критерии включения: реципиенты трансплантатов почки, пригодные для трансплантации в соответствии с требованиями Клинического протокола лечения пациентов после трансплантации почки, утвержденного приказом Минздрава Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6 «Об утверждении некоторых клинических протоколов трансплантации органов и тканей человека», доноры почек, удовлетворяющие критериям отбора, утвержденным инструкцией по применению Минздрава Республики Беларусь от 13.12.2002 № 140-1201 «Основные принципы отбора и ведения больных, являющихся потенциальными донорами почек для трансплантации».

Критерии исключения: пациенты после трансплантации почки в сочетании с другими органами, пациенты после повторной трансплантации почки, возраст реципиентов младше 18 лет.

Проанализированы данные учетных форм № 4-пп/у-07 «Карта динамического наблюдения больного после пересадки почки», утвержденных приказом Минздрава Республики Беларусь от 19.11.2007 № 883 «Об утверждении форм первичной медицинской документации по почечно-заместительной терапии».

В исследование включены 270 пациентов, получивших почечный трансплантат от живого или умершего донора с января 2011 г. по декабрь 2013 г. Срок наблюдения за пациентами составил от 3 мес. до 3 лет и 3 мес. Включены 138 мужчин и 132 женщины. Средний возраст реципиентов почки составил 41,6±12,2 года. 224/270 (82,9%) пациентов до

трансплантации почки получали лечение ХБП 5-й стадии с помощью программного гемодиализа, а остальные 46/270 (17,1%) — с помощью перитонеального диализа. Продолжительность диализотерапии до трансплантации составила (Me (LQ-UQ) 27 (11–58) мес., а значение медианы длительности нахождения в республиканском листе ожидания почечного трансплантата равнялась 16 (6–32) мес. Основными причинами терминальной уремии у пациентов были: хронический гломерулонефрит — 142/270 (52,6%), сахарный диабет — 25/270 (9,3%), наследственные заболевания почек (поликистоз почек, болезнь Альпорта) — 25/270 (9,3%) и ВАМП — 21/270 (7,8%).

Изучена ассоциация различных факторов риска в группе реципиентов почки с развитием ИМП после трансплантации. В частности, проанализированы возраст доноров, тип донора (живой или умерший), причина смерти мозга донора (ЧМТ или ОНМК), вариант забора почек (изолированный или мультиорганный), пол донора, его вес и рост, индекс массы тела, артериальное давление, число лекарственных средств, применяемых для кардиотонической поддержки на фоне смерти мозга.

Среди дотрансплантационных факторов реципиента, проанализирована ассоциация возникновения ИМП с полом, возрастом, типом диализотерапии (гемодиализ и перитонеальный диализ), временем нахождения на диализотерапии и в листе ожидания.

С помощью разработанного нами способа забора крови, оттекающей из почки по почечной вене, у умерших доноров исследованы уровни основных цитокинов и интерлейкинов (IL1b, IL4, IL6, IL8, TNF-alfa, IL10, IL13, Interferon-gamma) в венозной почечной крови.

Кроме этого, определены в плазме крови и моче концентрации биомолекул (pNGAL и uNGAL), основные биохимические показатели сыворотки крови донора (мочевина, креатинин, АЛТ, АСТ), время холодовой ишемии и изучена анатомия почечных сосудов с целью выявления аномалий количества артерий в группах сравнения.

Изучено также влияние таких перитрансплантационных факторов, как вариант реконструкции сосудов, установка мочевого стента, степень гистосовместимости в паре донор–реципиент, использование индукции иммуносупрессии (базиликсимаб, АТГ или без индукции), тип ингибиторов кальциневрина (циклоспорин или такролимус), начальная функция трансплантата, послеоперационные хирургические осложнения (мочевой свищ, гематомы, кровотечения, лимфоррея, раневая инфекция), длительность трансплантации почки, наличие эпизодов отторжения трансплантата, цитомегаловирусной инфекции и повторных операций.

Выбор этих переменных был сделан на основе предварительной обработки начальной информации — исключения факторов, которые варьировали слишком сильно или слишком слабо, а также факторов, заведомо не влияющих на результат, с последующим применением методов корреляционного анализа.

При анализе воспалительных заболеваний мочевых путей изучалось два основных патологических состояния — активная ИМП (аИМП) и бессимптомная бактериурия (ББ). Активная ИМП характеризовалась патологией осадка мочи (лейкоцитурия, пиурия, протеинурия, эритроцитурия) в сочетании или без бактериурии в общем анализе мочи. Бессимптомная бактериурия характеризовалась качественно и количественно положительными данными бактериурии при микроскопии осадка или бактериологическом исследовании мочи при условии отсутствия другой патологии при микроскопии осадка.

Общий анализ мочи проводился в клинико-диагностической лаборатории УЗ «9-я ГКБ» г. Минска на аппарате «Mediscreen ReaderII» (пр-во компании «Orgenics», Израиль).

Математически создание модели представляло собой задачу классификации бинарного признака. В качестве классификатора использовалась логистическая регрессия, которая применяется для прогнозирования ИМП и принимает лишь два значения (1 — ИМП, 0 — нет ИМП). Суть метода заключается в аппроксимации статистических данных логистической кривой, построенной с определенными числовыми коэффициентами, полученными в результате процесса валидации донор- и реципиентзависимых факторов риска.

Результаты и их обсуждение. В исследовании установлено, что общая заболеваемость ИМП (аИМП и ББ) за 3 года наблюдения у пациентов после трансплантации почки составила 36,7% (99/270). Число пациентов с аИМП составило 29,3% (79/270), а распространенность ББ — 7,4 % (20/270).

Проведен сравнительный анализ факторов риска развития у реципиентов аИМП, ассоциированной с клинико-демографическими данными доноров почек (пол, возраст, тип донора, причина смерти доноров, вес, рост, ИМТ), лабораторными показателями доноров (уровень сывороточного Na, АСТ, АЛТ, креатинина и мочевины), анатомическими особенностями почечного трансплантата (наличие добавочной верхнеполярной артерии, нижнеполярной артерии, потребности в выполнение реконструкции почечных сосудов).

Среди этой группы факторов донора установлена статистическая значимость ассоциации развития аИМП с уровнем АЛТ в венозной крови донора: 41,0 (22–97) против 60 (34–103) ммоль/л в группе сравнения; $p = 0,037$, а также с наличием нижнеполярной почечной артерии трансплантата — 20/79 (25%) против 16/171 (9,5%) в группе сравнения; $p = 0,008$. Показатель отношения шансов (OR) развития аИМП при условии наличия в трансплантате почки нижнеполярной почечной артерии составляет 3,284 (95% ДИ 1,594–6,764). Высокий уровень АЛТ у умерших доноров почек очевидно был фактором — противопоказанием для забора печени у доноров почек для реципиентов в группе сравнения, что может выдвинуть гипотезу о том, что сочетаный забор почек и печени может быть ассоциирован с риском аИМП у реципиентов почки в связи с удлинением времени операции или длительной тепловой ишемией почек, поскольку в случае сочетанного забора органов почки удаляются в последнюю очередь. Данное предположение носит предположительный характер и требует отдельного исследования.

Среди перитрансплантационных факторов установлена статистически достоверная ассоциация длительности операции по трансплантации почки с развитием аИМП (в среднем 3,2±0,74 ч в группе аИМП против 2,86±0,61 ч в группе сравнения; $p = 0,01$), а также степени гистосовместимости по HLA (в среднем 1,71±0,58 несовпадения в группе аИМП против 1,54±0,67 несовпадений в группе сравнения; $p = 0,045$).

Сравнительный анализ показал достоверное снижение уровня IL-13 в почечной венозной крови доноров (медиана 12,29 (6,2–28,7) против 20,49 (12,3–26,7) пг/мл в группе сравнения; $p = 0,041$), трансплантат которых был подвержен инфекционно-воспалительному процессу после имплантации реципиенту. Снижение уровня IL-13 в почечной венозной

крови ассоциированное с развитием ИМП после трансплантации почки можно объяснить тем, что имело место снижение активности пролиферации В-клеток и секреции уротелием защитных IgE и IgG4, возникающее на фоне дефицита IL-13.

Очевидно, что длительная тепловая ишемия, неизбежно присутствующая после извлечения почки изо льда, в случае увеличения времени операции по трансплантации почки снижает резистентность аллографта к инфекционным агентам. Кроме этого, недостаточная гистосовместимость тканей донора и реципиента также ассоциирована с ростом инфекционных рисков, поскольку обычно требует усиления иммуносупрессивного режима с целью подавления или профилактики развития острой или хронической реакции отторжения.

Среди реципиент-зависимых факторов установлена статистически достоверная ассоциация развития аИМП с женским полом, длительностью диализотерапии и диагнозом ВАМП как причиной терминальной уремии. Показано, что 59,5% (47/79) пациентов с аИМП имели женский пол, в то время как в группе сравнения только 40,4% (69/171) реципиентов почки были женского пола; p = 0,005. Показатель отношения шансов (OR) развития аИМП для женского пола по сравнению с мужским составляет 2,171 (95% ДИ 1,261–3,738), стандартная ошибка отношения шансов (S) равна 0,277.

Продолжительность дотрансплантационной диализотерапии у пациентов в группе с аИМП превысила в среднем на 14,5 мес. этот показатель в группе сравнения. Медиана длительности при аИМП составила 38,5 (13–63) против 24 (10–53) мес. в группе сравнения; p = 0,048.

В группе с аИМП 25,3% (20/79) реципиентов почки имели первичный диагноз ВАМП против 12,9% (22/171) в группе сравнения; p = 0,01. Показатель отношения шансов (OR) развития аИМП при основном клиническом диагнозе ВАМП составляет 2,296 (95%ДИ 1,167–4,516), стандартная ошибка отношения шансов (S) равна 0,345.

Среди всех вышеперечисленных донор-, реципиент-зависимых и перитрансплантационных факторов риска установлено, что статистически достоверную ассоциацию с развитием ББ имеет только женский пол реципиентов почки. Установлено, что 80% (16/20) реципиентов почки с ББ имели женский пол, в то время как в группе сравнения только 40,4% (69/171) реципиентов почки были женского пола; p = 0,0007. Показатель отношения шансов (OR) развития ББ для женского пола по сравнению с мужским составил 7,391 (95%ДИ 2,421–22,566), стандартная ошибка отношения шансов (S) 0,569.

Полученные в ходе однофакторного анализа аИМП и ББ данные позволили выделить ряд клинически и статистически важных факторов риска развития ИМП у реципиентов трансплантатов почки.

С использованием логистической регрессии проведен многофакторный анализ, который выявил влияния основных значимых факторов риска на развитие ИМП у реципиентов почечного аллографта. Установлены отношения шансов (OR) развития ИМП у реципиентов почки при наличии следующих факторов: женский пол реципиента (OR = 0,1974; 95% ДИ 1,2–3,1); диагноз ВАМП как основная причина хронической почечной недостаточности (OR = 2,081; 95% ДИ 1,2–3,1); длительность дотрансплантационной диализотерапии более 24 мес. (OR = 2,125; 95% ДИ 1,4–5,4); наличие нижнеполярной добавочной почечной артерии в трансплантате почки (OR = 3,424; 95% ДИ 1,4–5,4); а также длительность операции по трансплантации почки более 3,5 ч (OR = 4,452,2–14,0).

Вышеуказанные факторы являются входными переменными для ожидания аИМП, которая является аппроксимацией зависимости, скрытой в статистических данных, содержащих уже известные соотношения типа «набор входных параметров — ИМП после трансплантации».

Прогнозирование инфекции осуществляется на основании числового значения вероятности ее развития после трансплантации почки. Математическая зависимость имеет следующий вид:

$$X = \frac{\left(0{,}074 * 1{,}974^{a} * 2{,}081^{b} * 2{,}125^{c} * 3{,}424^{d} * 4{,}542^{e}\right)}{\left(1 + 0{,}074 * 1{,}974^{a} * 2{,}081^{b} * 2{,}125^{c} * 3{,}424^{d} * 4{,}542^{e}\right)},$$

где X — числовое значение вероятности ИМП после трансплантации почки;

a, b, c, d, e — равны «1» при наличие соответствующего признака и равны «0» при его отсутствии: a — женский пол реципиента почки; b — врожденная аномалия мочеполовой системы у реципиента почки; c — длительность диализотерапии до трансплантации почки свыше 24 мес.; d — наличие нижнеполюсной артерии в трансплантате почки; e —— длительность операции по трансплантации почки свыше 210 мин.

Способ обеспечивает возможность прогнозировать ИМП после трансплантации почки и тем самым позволяет повысить эффективность антибактериальной профилактики у реципиентов с высоким риском инфекции и, наоборот, уменьшить необходимость в назначении антибиотикопрофилактики пациентам с низким риском ИМП, что в значительной степени способствует профилактике развития множественной антибиотикорезистентности микроорганизмов, а также избавляет пациентов от применения антибактериальных препаратов, имеющих опасное межлекарственное взаимодействие с базовыми иммуносупрессивными лекарственными средствами, применяющимися реципиентами почки ежедневно для профилактики отторжения трансплантата.

Способ осуществляют следующим образом: выясняют дихотомические и числовые значения следующих показателей реципиента: пол, наличие диагноза ВАМП как причины терминальной стадии хронической почечной недостаточности, длительность диализотерапии до трансплантации почки, наличие нижнеполюсной почечной артерии и длительность операции по трансплантации почки.

Многофакторный анализ проводится на основании вычисленной вероятности ИМП после трансплантации почки и ее принадлежности к одному из двух числовых промежутков, соответствующих высокому и низкому риску ИМП. Если результат составляет 0,5 и более, делают вывод о высоком риске ИМП, а если результат составляет менее 0,5, то делают вывод о низком риске ИМП.

На основании анализа факторов риска с использованием программы Microsoft Excel разработан «Excel-калькулятор ИМП» у потенциального реципиента почки. Для большей наглядности и соответствия варианту представления прогноза

в программе «Калькулятор функции трансплантата почки» в данном калькуляторе инфекции прогноз также представляется не как часть от целого, а в процентном выражении (рисунок).

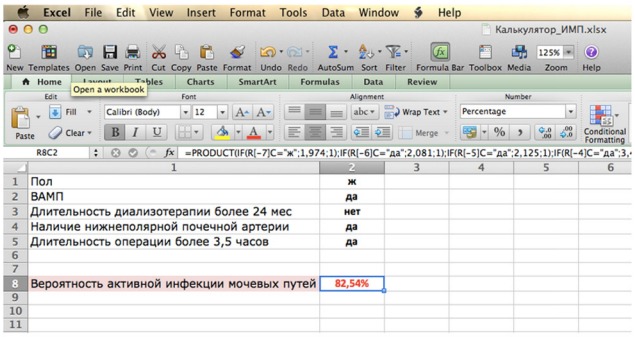


Рисунок — Скриншот калькулятора ИМП у реципиентов трансплантата почки

Заключение. В исследовании выявлены основные клинически и статистически значимые факторы риска, ассоциированные с развитием ИМП у реципиентов трансплантата почки. К ним относится женский пол пациентов, диагноз ВАМП как основная причина хронической почечной недостаточности, длительность дотрансплантационной диализотерапии более 2 лет, наличие нижнеполярной добавочной почечной артерии в трансплантате почки, а также длительность операции по трансплантации почки более 3,5 ч. С использованием многофакторного анализа, показателя отношения шансов развития ИМП создана математическая модель, на основании которой разработан «Excel-калькулятор ИМП», позволяющий оценить риск осложнений и выбрать индивидуальную тактику профилактики ИМП после трансплантации почки каждому реципиенту трансплантата почки.

Литература

1. Patel, R. Infections in solid-organ transplant recipients / R. Patel, C. Paya // Clin. Microbiol. Rev. — 1997. — Vol. 10, № 7. — P. 86–124.

2. Dharnidharka, V.R. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS / V.R. Dharnidharka, D.M. Stablein, W.E. Harmon // Am. J. Transplant. — 2004. — Vol. 4, № 3. — P. 384–389.

3. Urinary tract infections in kidney transplant recipients: role of gender, urologic abnormalities, and antimicrobial prophylaxis / E.J. Ariza-Heredia [et al.] // Ann. Transplant. — 2013. — № 18. — P. 195–204.

4. Independent risk factors for urinary tract infection and for subsequent bacteremia or acute cellular rejection: a single-center report of 1166 kidney allograft recipients / J.R. Lee [et al.] // Transplantation. — 2013. — Vol. 96, № 8. — P. 732–738.

5. Säemann, M. Urinary tract infection in renal transplant recipients / M. Säemann, W. H. Hörl // Eur. J. Clin. Invest. — 2008. — Vol. 38, № 4, suppl. 2. — P. 58–65.

6. Chuang, P. Urinary tract infections after renal transplantation: a retrospective review at two US transplant centers / P. Chuang, C.R. Parikh, A. Langone // Clin. Transplant. — 2005. — Vol. 19, № 2. — P. 230–235.

7. Urinary tract infections following renal transplantation: a single-center experience / K.O. Memikoglu [et al.] // Transplant. Proc. — 2007. — Vol. 39, № 10. — P. 3131–3134.

URINARY TRACT INFECTION IN KIDNEY TRANSPLANT RECIPIENT: PREDICTORS AND MATHEMATICAL PROGNOSIS

Kalachik O.V., Narbin A.V., Vershinin P.Yu., Kozlova M.V., Guberskaja M.P.

The Republican Center of Organ & Tissue Transplantation, Minsk, Republic of Belarus

The study showed that prevalence of UTI (active UTI and asymptomatic bacteriuria) rated as 36.7% (99/270). The prevalence of aUTI and AB were found as 29.3% (79/270), and 7.4 (20/270). We found the substantial clinical and statistical significance of female gender, primary diagnosis of CACUT, time on dialysis before transplantation longer than 24 month, presence of lower pole renal artery in allograft, duration of transplant surgery more than 3.5 hours. Based on these we created the Excel UTI calculator that can give us the prognosis of UTI. Mathematical relation based on analysis of risk factors of UTI at renal transplant recipients can give us the prognosis and stratification of risks of this complication and help us to choose the prophylactic strategy to prevent UTI.

Keywords: urinary tract infection (UTI), asymptomatic bacteriuria, the risk factors, kidney transplant recipients, multivariate analysis.

ПОЛУЧЕНИЕ АПИРОГЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО N-МОГ1-125 ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Кожух Г.В., Власов А.П., Русанович Д.А., Скриган Т.Н., Марцев С.П.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Объектом исследования является рекомбинантный белок — N-терминальный домен (125 а.к. остатков) миелин-олигодендроцитарного гликопротеина человека (МОГ) — один из ключевых антигенов в патогенезе рассеянно-

го склероза (РС). Перспективы применения МОГ в качестве модулирующего агента в новых схемах клеточной терапии РС активно исследуются. Это делает актуальной разработку доступных методов получения препаратов МОГ, отвечающих требованиям современных био- и медицинских технологий. Одной из практически важных задач остается поиск эффективных решений в очистке N-терминального домена рекомбинантного МОГ человека от бактериальных эндотоксинов. Удаление эндотоксинов остается технически сложной задачей даже в условиях развития хроматографических методов ввиду особой структуры эндотоксинов и их способности имитировать хроматографическую динамику белков на многих сорбентах.

Цель работы — разработка эффективного метода очистки рекомбинантного N-концевого фрагмента МОГ (N-МОГ$_{1–125}$) от эндотоксинов и в получении белка в препаративных количествах от десятков до сотен миллиграмм. В результате получен апирогенный рекомбинантный N-МОГ$_{1–125}$, высокой степени очистки с содержанием эндотоксинов менее 2 EU/мг. Полученный препарат N- МОГ$_{1–125}$ соответствует критериям, предъявляемым ведущими фармакопеями к фармацевтическим субстанциям, что позволяет использовать препарат в цитологических, иммуноморфологических и биохимических исследованиях для изучения процессов патогенеза рассеянного склероза, а также применять N-МОГ в качестве модулирующего агента при терапии рассеянного склероза.

Ключевые слова: миелин-олигодендроцитарный гликопротеин, рекомбинантные белки, экспрессия, рефолдинг, эндотоксины, рассеянный склероз.

Введение. Миелин-олигодендроцитарный гликопротеин человека — специфический антиген миелина центральной нервной системы, принадлежащий к суперсемейству иммуноглобулинов. Высокая энцефалитогенная активность МОГ указывает на его ведущую роль как аутоантигена при демиелинизирующих заболеваниях, таких как рассеянный склероз (РС) [1]. В последние годы активно исследуются перспективы применение МОГ в качестве модулирующего агента в новых схемах терапии рассеянного склероза, основанных на иммуносупрессорных и иммунорегуляторных свойствах мезенхимальных стволовых клеток при совместном культивировании с Т-лимфоцитами в условиях миелин-специфической стимуляции *in vitro* с участием МОГ.

Актуальность проблемы РС служит мощным инициирующим фактором для поиска антигенов-мишеней в иммунном ответе при данном заболевании. Традиционно занимавший лидирующие позиции в таких исследованиях основной белок миелина (BMP) все чаще уступает место МОГ в качестве ведущего миелинового антигена, вовлеченного в развитие и поддержание демиелинизирующего процесса при РС [2, 3].

Выделение МОГ представляется сложной задачей, учитывая то, что его содержание в центральной нервной системе (ЦНС) не превышает 0,1% и велика вероятность загрязнения препарата примесями, представленными другими антигенами миелина, прежде всего протеолипидным белком (PLP) и MBP. Проблема получения чистого белка нашла свое решение в создании рекомбинантного МОГ, а также его функционально разделенных фрагментов, прежде всего энцефалитогенных детерминант [4], поэтому одним из эффективных путей изучения процессов патогенеза РС является получение рекомбинантного функционально активного внеклеточного N-концевого домена МОГ (N-МОГ), включающего первые 125 аминокислотных остатков, методами генетической инженерии.

Экспрессия рекомбинантного МОГ в бактериях делает актуальной разработку эффективных методов удаления липополисахаридов, называемых также бактериальными эндотоксинами ввиду их токсичности для организма человека. Активные фармацевтические ингредиенты (фармсубстанции), применяемые для создания инъекционных лекарственных форм, должны быть максимально свободны от подобных примесей. Фармакопеи всего мира рекомендуют лимитировать содержание эндотоксинов в лекарственных средствах для внутривенного назначения до 5 единиц (EU, или endotoxin unit) на 1 кг веса тела за 1 ч [6].

Несмотря на успехи в развитии хроматографических методов и непрерывное расширение спектра носителей для хроматографии, отжеление эндотоксинов остается технически сложной задачей ввиду особых свойств липополисахаридов, в частности, их способности имитировать хроматографическую динамику белков на большинстве наиболее часто применяемых носителей.

Цель работы — разработать эффективный метод очистки от эндотоксинов рекомбинантного N-концевого фрагмента МОГ (1–125 а.к.) и получить его в препаративных количествах для использования в качестве иммуномодулирующего агента в новых методах клеточной терапии рассеянного склероза.

Материалы и методы. Рекомбинантный МОГ получали экспрессией в штамме-продуценте *E.coli* BL21, несущим сконструированную нами плазмиду pET-22b-MOG$_{1–125}$, кодирующую N-концевой домен белка. Чистоту экспрессированного белка оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН), используя 5% формирующий и 15% разделяющий гели с буферной системой согласно [7]. Образцы белков перед нанесением на гель прогревали в течение 5 мин при 100°С в 2% меркаптоэтаноле в присутствии 5% ДСН. Гели окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Молекулярную массу N-МОГ оценивали при помощи гель-проникающей хроматографии на носителе Zorbax GF-250 (колонка 9,4×250 мм). Для разделения использовали две буферные системы с разной ионной силой — 10 мМ Трис-HCl, pH = 7,5; 50 мМ NaCl и 10 мМ Трис-HCl, pH = 7,5; 200 мМ NaCl при комнатной температуре со скоростью элюции 1 мл/мин. Оптическую плотность элюата регистрировали при длине волны 280 нм.

Иммунохимическое определение N-МОГ проводили набором реагентов для иммуноферментного определения N-МОГ компании «MyBioSource» (США).

Определение содержания бактериальных эндотоксинов с помощью LAL-реагента проводили полуколичественным «гель-тромб» методом согласно инструкции производителя «Cambrex» (США).

Результаты и их обсуждение. Выращенный посевной материал штамма *E. coli* — N-МОГ в объеме 0,5 л в богатой среде LB в течение 16 ч при 37°С асептически вносили в ферментер, содержащий 5 л стерильной среды М9, содержащей 1% кислотного гидролизата казеина, 1% глюкозы, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 mM $CaCl_2$, 100 мг/мл ампициллина. Культивирование в ферментере проводили при температуре 37°С, поддерживая pH = 7±0,15 путем автоматической подтитровки 12,5%

раствором аммиака. Концентрацию растворенного кислорода в диапазоне 50±10% от насыщения поддерживали путем изменения скорости оборотов мешалки от 100 до 800 об./мин и подачи воздуха от 1 до 15 л/мин. Концентрацию субстратов, в частности глюкозы, поддерживают путем изменения скорости подачи концентрированных растворов через перистальтические насосы.

Ферментацию останавливали по достижении максимальной оптической плотности (35–50 о.е.) и появлении зрелых «телец включений». По окончании ферментации культуральную жидкость отделяли центрифугированием при скорости вращения 5000–10000 об./мин. Биомассу фасовали в полиэтиленовую тару и замораживали при температуре -80°С.

Замороженную биомассу штамма *E. coli* pET-22b-N-MOG$_{1–125}$ в количестве 100 г суспедировали в 0,8 л буфера 1 (20 мМ Tris-HCI, pH = 8,0, 10 мМ ЭДТА, 0,1% Triton X-100). Суспензию троекратно пропускали через проточный дезинтегратор, поддерживая давление 10000 бар и центрифугировали при 13000 об./мин. Полученный осадок промывали в аналогичных условиях последовательно буферами 2 (20 мМ Tris-HCI, pH = 8,0, 1 мМ ЭДТА, 2М мочевины), буфером 3 (20 мМ Tris-HCI pH = 8,0, 1 мМ ЭДТА, 3М мочевины) и буфером 4 (20 мМ Tris-HCI pH = 8,0, 1 мМ ЭДТА, 0,1% Тритон Х-100) и окончательно осадок N-МОГ ресуспендировали в 150 мл буфера 5 (20 мМ Tris-HCI pH = 8,0, 1 мМ ЭДТА, 0,001 М фенилметилсульфонилфторида).

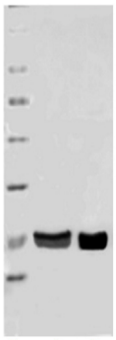
К полученной на предыдущем этапе суспензии нерастворимой формы N-МОГ добавляли сухой гуанидин гидрохлорид до концентрации 6М или сухую мочевину до концентрации 8М, добавляли раствор дитиотреитола до концентрации 50 мМ и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Нерастворившийся материал отделяли центрифугированием. Ренатурацию N-МОГ проводили путем медленного разбавления полученного раствора в 100 раз буфером 20 мМ Tris-HCI pH = 8,0, 20 мМ NaCI, 0,1 мМ ЭДТА, 1М мочевина, 0,1% CHAPS, 0,5 мМ глутатиона окисленного и 0,5 мМ глутатиона восстановленного. После чего ренатурационную смесь инкубировалии при постоянном перемешивании в течение 12–15 ч при температуре 4–8°С. Далее агрегированный материал удаляли центрифугированием.

Хроматографическую очистку N-MOG$_{1–125}$ осуществляли в три стадии.

Наличие в структуре целевого белка С-концевого полипептида («тэга»), состоящего из 6 остатков гистидина, позволяет использовать эффективную металл-хелатную аффинную хроматографию на Ni-NTA Sepharose (Qiagen).

N-МОГ солюбилизировали в денатуранте и наносили на аффинную колонку с металл-хелатным сорбентом Ni-NTA Sepharose. Целевой белок специфически связывался с хелатирующим сорбентом. После промывки и смены денатуранта на 8М мочевину белок элюировали в денатурирующих условиях в буфере, содержащем денатурант и 0,2М имидазола, затем ренатурировали удалением денатуранта. Альтернативно белок фолдировали непосредственно на колонке путем создания понижающего линейного градиента мочевины с последующей элюцией буфером без денатуранта, содержащим 0,2М имидазол. Чистота полученного препарата N-MOG$_{1–125}$ составляла не менее 95% по данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН (рисунок 1). Выход целевого белка составлял более 20 мг на 1 л культуральной среды. Измеренное LAL-тестом содержание бактериальных эндотоксинов в полученном препарате составляло не менее 150 EU/мг.

Несмотря на очевидно высокую степень очистки целевого белка от примесных белков, содержание эндотоксинов было значительно выше необходимых стандартов и требовало очистки от бактериальных липополисазаридов.



1 — стандартные белки (14,4; 18,4; 25; 35; 45; 66,2; 116 кДа);
2 — белок после очистки в нативных условиях в присутствии 2-меркаптоэтанола;
3 — белок после очистки в нативных условиях в отсутствии 2-меркаптоэтанола

Рисунок 1. — Очистка N-MOG$_{1–125}$ при помощи металл-хелатной хроматографии (Ni-NTA Sepharose) в нативных и денатурирующих условиях

Для очистки от эндотоксинов были применены хроматографические методы, включая гель-проникающую на Sephadex G-50 и катионообменную хроматографию на CM Sepharose Fast Flow, аффинную на Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel, анионообменную на Q Sepharose Fast Flow, обращено-фазовую хроматографию на С8 (Serva HPLC Octyl Si 100 Polyol).

Исходя из полученных данных, наиболее эффективными методами удаления бактериальных эндотоксинов являются высокоэффективная жидкостная обращено-фазовая (ВЭЖХ ОФ) и анионообменная хроматографии, позволяющие уменьшить содержание эндотоксинов более чем в 30 раз (таблица).

Процесс высокоэффективной очистки белков от ЛПС на обращено-фазовых хроматографических носителях основан на том, что гидрофобные липидные группы эндотоксинов удерживаются стационарной фазой ВЭЖХ (сорбентом С8)

значительно сильнее большинства белков. Десорбция эндотоксинов происходит при значительных концентрациях органического модификатора в подвижной фазе (70–90 % ацетонитрила).

Таблица — Содержание эндотоксинов в препаратах N-MOG$_{1–125}$

Метод удаления бактериальных эндотоксинов	Содержание эндотоксинов, EU/мг
Катионообменная хроматография — CM Sepharose Fast Flow	>150
Гель-фильтрация Sephadex G-50	>100
Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel	>150
Анионообменная хроматография Q Sepharose Fast Flow	<5
Обращено-фазовая хроматография — Serva HPLC Octyl Si 100 Polyol 22×250 мм (C8)	<5
Q Sepharose/C8	<2

Препараты N-МОГ хроматографировали на колонке с ОФ С8 в подвижной фазе, содержащей 20% ацетонитрила. При этих условиях нанесения N-МОГ был не способен удерживаться стационарной фазой колонки С8 и элюировался (рисунок 2). Эндотоксины, напротив, удерживались неподвижной фазой и элюировались лишь при повышении концентрации ацетонитрила до 70%.

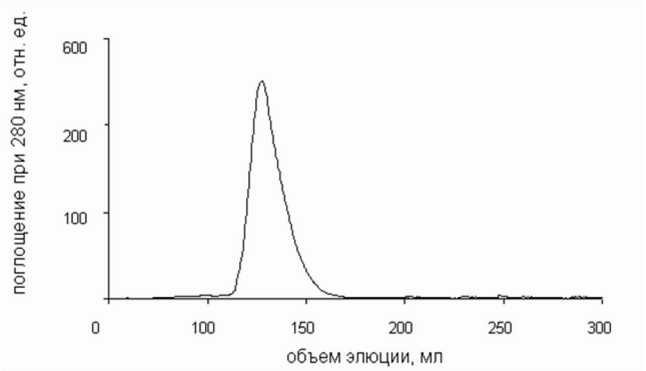


Рисунок 2. — Профиль элюции N-MOG$_{1–125}$ при обращенно-фазовой хроматографии на колонке Serva HPLC Octyl Si 100 Polyol 22×250 мм (C8)

Свою эффективность показала также ионообменная хроматография с использованием анионообменной матрицы Q Sepharose Fast Flow. Использование анионообменника основано на различии физико-химических свойств липополисахаридов и N-МОГ. Изоэлектрическая точка эндотоксинов за счет полисахаридной заряженной «головы» лежит в «кислой» области (pI <3), а pI N-MOG$_{1–125}$ имеет значение выше 6. При использовании в качестве жидкой фазы буферного раствора с pH в диапазоне между pI эндотоксина и белка последний будет заряжен положительно, а липополисахариды — отрицательно. Для отделения эндотоксинов от белка мы использовали сильный анионообменник Q Sepharose Fast Flow. Отрицательно заряженные липополисахариды адсорбировались на нем, в то время как N-MOG$_{1–125}$ свободно проходил через колонку. Степень очистки оказалась более чем 20-кратной.

Используя последовательно эти две высокоэффективные стадии очистки N-MOG$_{1–125}$, была достигнута высокая степень очистки препарата N-MOG$_{1–125}$ от эндотоксинов — содержание их было менее 5 МЕ/мг.

Применение разработанного протокола выделения и очистки N-MOG$_{1–125}$ позволило получить препаративные количества (~50 мг) высокоочищенного апирогенного (>95%) белка для его использования как иммуномодулятора клеточных трансплантатов при разработке новых протоколов терапии РС.

Для верификации полученных терапевтических препаратов N-MOG$_{1–125}$ использован иммуноферментный анализ. Иммунохимическое определение N-MOG$_{1–125}$ проводили набором реагентов для иммуноферментного анализа фирмы «MyBioSource» (США). Результаты анализа (данные не представлены) показали, что полученный высокоочищенный N-MOG$_{1–125}$ имеет иммунореактивность, сравнимую с биологически активным препаратом (стандартом).

Таким образом, нами разработан метод, позволяющий получать препаративные количества высокоочищенного N-МОГ$_{1–125}$ с низким удельным содержанием эндотоксинов. Полученный N-МОГ$_{1–125}$ соответствует фармакопейным требованиям и условиям применения в разрабатываемых клеточных технологиях терапии РС.

Заключение. Разработан высокоэффективный метод очистки рекомбинантного N-терминального домена миелин-олигодендроцитарного гликопротеина человека от бактериальных эндотоксинов. Метод на основе металл-хелатной, анионообменной и обращено-фазовой хроматографий позволяет получать высокоочищенные гомогенные препараты N-MOG$_{1–125}$ с низким уровнем содержания эндотоксинов — менее 2 МЕ/мг.

Полученные согласно разработанному протоколу выделения и очистки терапевтические препараты N-МОГ были верифицированы при помощи иммуно-ферментного анализа.

Терапевтические препараты N-MOG$_{1–125}$ соответствуют критериям, предъявляемым ведущими фармакопеями к фармацевтическим субстанциям, что позволяет их использовать в дальнейших масштабных исследованиях, направлен-

ных на изучение процессов патогенеза рассеянного склероза, а также применять полученный N-МОГ в качестве модулирующего агента при получении клеточных трансплантатов для терапии рассеянного склероза.

Литература

1. Deber, C. Central nervous system myelin: structure, function and pathology / C. Deber, S. Reynolds // Clin. Biochem. — 1991. — Vol. 24, № 2. — P. 113–134.
2. Kirschner, D. Organization, phylogenetic variations and dynamic transitions of myelin / D. Kirschner, A. Blaurock // In: Myelin: Biology and Chemistry / Ed by R.E. Martenson. — Florida: CRC Press, 1991. — P. 413–448.
3. Cuzner, M. Biochemistry of demyelination / M. Cuzner, W. Norton // Brain Pathol. — 1996. — Vol. 6, № 3. — P. 231–242.
4. Demyelination induced in aggregating brain cell cultures by monoclonal antibody against myelin/oligodendrocyte glycoprotein / N. Kerlero de Rosbo [et al.] // J. Neurochem. — 1990. — Vol. 55, № 2. — P. 583–587.
5. Purification and partial structural and functional characterization of mouse myelin/oligodendrocyte glycoprotein / P. Amiguet [et al.] // J. Neurochem. — 1992. — Vol. 58, № 5. — P. 1676–1682.
6. Preparation of highly purified human myelin oligodendrocyte glycoprotein in quantities sufficient for encephalitogenicity and immunogenicity studies / S. Abo [et al.] // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1993. — Vol. 30, № 5. — P. 945958.
7. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227, № 5259. — P. 680–685.

PREPARATION OF HIGHLY PURIFIED APYROGENIC RECOMBINANT HUMAN N-MOG$_{1–125}$ FOR CELL TECHNOLOGY APPLICATIONS

Kozhukh G.V., Vlasov A.P., Rusanovich Dz.A., Skryhan T.N., Martsev S.P.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus

The target of this study is the N-terminal domain (1–125 aa residues) of recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) that is the key antigen in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and belongs to the immunoglobulin protein family. Production of the sufficient amounts of apyrogenic human N-terminal MOG is one of the crucial step in designing scheme of diagnostics and immunotherapy of multiple sclerosis. Despite the development of novel highly effective chromatographic methods for removing bacterial endotoxins, their elimination remains a technically complicated and time-consuming task that needs carefully designing and optimizing procedures.

It this study, we developed the effective procedure to produce, in tens to hundred mg amounts, apyrogenic recombinant N-terminal fragment of MOG (aa 1–125), N-MOG$_{1–125}$. As a result, we produced ~50 mg of highly purified recombinant apyrogenic MOG$_{1–125}$. The level of lipopolysaccharides in a homogenic probe was less than 2 EU/mg.

The apyrogenic N-MOG$_{1–125}$ obtained meets the internationally recognized criteria required for approval of pharmaceutical substances. Therefore, N-MOG$_{1–125}$ is suitable for application in large-scale cytological, immunological and biochemical studies of pathogenesis of multiple sclerosis. Furthermore, apyrogenic N-MOG$_{1–125}$ might be applied as an immune modulating agent to generate of cell transplants for developing novel cell technologies targeted at therapy of multiple sclerosis.

Keywords: myelin oligodendrocyte glycoprotein, recombinant proteins, expression, refolding, endotoxins, multiple sclerosis.

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ И ИДИОПАТИЧЕСКИМ ФИБРОЗИРУЮЩИМ АЛЬВЕОЛИТОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Лицкевич Л.В.[1], Гуревич Г.Л.[1], Шпаковская Н.С.[1], Скрягин А.Г.[1], Скрягина Е.М.[1], Солодовникова В.В.[1], Исайкина Я.И.[2], Новикова М.А.[2], Коваленко Д.Г.[1]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Республика Беларусь

[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В настоящее время хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и идиопатический фиброзирующий альвеолит (ИФА) являются неуклонно прогрессирующими заболеваниями, приводящими к инвалидизации и смертности лиц трудоспособного возраста [1–3]. При прогрессировании ХОБЛ развиваются хроническая дыхательная и сердечная недостаточность; глубокие изменения клеточного и гуморального звеньев иммунитета, дисбаланс цитокинов. У пациентов с крайне тяжелым течением ХОБЛ в стадии обострения наблюдается достоверное изменение показателей: снижение в сыворотке крови ИЛ-8, увеличение ИЛ-6, значительное снижение Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и Т-хелперов ($CD4^+$), уровней иммуноглобулинов класса G, коррелирующих с нарастанием тяжести процесса ($r = 0,58$) [4]. Общеизвестно, что ухудшение состояния и случаи смерти у людей, страдающих ХОБЛ и ИФА, чаще связаны с их обострениями, которые следуют с частотой более 3 раз в год [5]. Актуальным является поиск новых методов лечения, приводящих к достоверному улучшению качества жизни, снижения частоты обострений воспалительного процесса и выживаемости данных категорий пациентов.

В работе представлены отдаленные результаты лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и идиопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных мультипотентных мезенхимальных

клеток. Положительный эффект иммунотерапии аутологичными мультипотентными мезенхимальными клетками (ММК) наиболее выражен у 50% пациентов с ХОБЛ в первые 4–5 мес. после трансплантации и проявляется снижением степени выраженности инвалидизирующих нарушений, в т. ч. дыхательной недостаточности (уменьшение степени выраженности одышки, снижение степени выраженности обструктивных нарушений (при ХОБЛ) и рестриктивных (при ИФА) от резких до умеренных; повышение толерантности к физической нагрузке). В периферической крови наблюдалась некоторое увеличение $CD3^+$ клеток, нормализация количества Т-хелперов, снижение или стабилизация уровней γ-ИФН и ИЛ-6. У 4-х пациентов с ХОБЛ (40%) в этот период отмечалась стабилизация процесса. У 2-х пациентов с ИФА (50%) — наблюдалось улучшение. В отдаленные периоды (10–15 мес. и более) отмечалось прогрессирование заболевания у 1-го пациента с ХОБЛ (10,0%) и у 2-х — с ИФА (50,0%).

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, идиопатический фиброзирующий альвеолит, мультипотентные мезенхимальные клетки, посттрансплантационный мониторинг.

Введение. В настоящее время хроническая обструктивная болезнь легких является мировой эпидемией, затрагивающей 200 млн человек, причиной 3 млн смертей ежегодно и представляет собой неуклонно прогрессирующее заболевание, приводящее к инвалидизации и смертности лиц трудоспособного возраста [1–3]. Особенностью «респираторной» составляющей ХОБЛ является неуклонное прогрессирование хронического воспаления и частично обратимой обструкции дыхательных путей. К сожалению, в настоящее время не существует вмешательств, благодаря применению которых было бы достоверно доказано продление выживаемости пациентов с ХОБЛ. Замедление темпов прогрессирования легочной деструкции, ремоделирование или восстановление разрушенных структур легких является перспективной стратегией лечения ХОБЛ.

Идиопатический фиброзирующий альвеолит (ИФА) представляет собой хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся развитием воспаления, интерстициального фиброза и нарастающей дыхательной недостаточностью. Для воспалительного процесса при ИФА характерны гипертрофия гладкой мускулатуры и увеличение альвеолярных пространств за счет разрывов стенок альвеол, выстланных атипичными (кубическими) клетками. В терминальной стадии фиброзная ткань полностью замещает нормальные легочные структуры и приобретает характерный вид «пчелиных сот». Прогноз при ИФА крайне неблагоприятный, смерть наступает в период от 6 мес. до 2-х лет от хронической дыхательной недостаточности.

В последние годы пристальное внимание уделяется способности гемопоэтических и мультипотентных мезенхимальных клеток (ММК) участвовать в процессах регенерации ткани легкого. Трансплантация ММК приводит к снижению выраженности фибротических процессов, способствует увеличению числа клеток альвеолярного эпителия. Данные, накопленные в ходе недавних клинических испытаний на животных и человеке, поддерживают гипотезу о терапевтических эффектах аутологичных ММСК при различных заболеваниях. Анализ иммуномодулирующих эффектов ММСК, связанный с их молекулярными возможностями (создание специфических терапевтических пузырьков в окружающей среде или образование цитокинов (химокинов) по типу «отпечатков пальцев»), позволяет использовать ММСК в качестве дополнительной терапии при легочных расстройствах [6, 7].

Цель работы — улучшение результатов лечения пациентов с ХОБЛ и ИФА с применением ММСК в комплексной терапии заболеваний.

Материалы и методы. Исследование проводилось по протоколу открытого рандомизированного исследования в параллельных группах пациентов с двойным контролем (стандартная базисная терапия с проведением метода иммунотерапии с использованием аутологичных ММСК и стандартная базисная терапия без метода иммунотерапии с использованием аутологичных ММСК) при добровольном информированном письменном их согласии. В исследование включено 60 пациентов, в т. ч. 40 человек с ХОБЛ и 20 — с ИФА. Основную группу сформировали 14 пациентов (10 человек с ХОБЛ и 4 человека с ИФА), которым была проведена пункция костного мозга и культивация ММСК. Было получено 65 (45; 85) мл аспирата КМ. Аутологичные ММСК вводились пациентам однократно в среднем количестве $0{,}9\times10^6$ клеток/кг веса. Проведен посттрансплантационный мониторинг в ранний и отдаленный период после введения ММСК (через 1–2; 4–5; 7–10 мес., 1–1,5 года и более).

Комплексная оценка качества жизни пациентов с ХОБЛ и ИФА включала: определение интегральных показателей психического и физического здоровья (опросник SF-36), анкетирование степени выраженности одышки по шкалам ВАШ, MRC, оценку толерантности к физической нагрузке (тест с 6-минутной ходьбой) и пикфлоуметрию.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между двумя независимыми выборками определяли методами параметрической статистики с помощью t-критерия Стьюдента или непараметрической статистики (U-критерий Манна–Уитни). Различия считали достоверными при $p<0{,}05$. Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывалось абсолютное число и относительная величина в процентах.

Результаты и их обсуждение. Результаты иммунофенотипирования культивированных аутологичных клеток пациентов с ХОБЛ и ИФА свидетельствовали об экспрессии маркеров CD105, CD90, CD7 на поверхности ММСК и о наличии поверхностных CD-кластеров, характерных для ММСК, уровень которых составил более 90%. Экспрессии маркеров характерных для гемопоэтических стволовых клеток не наблюдалось.

Краткая характеристика пациентов, данные о заборе костного мозга, введении ММСК у 10 пациентов с ХОБЛ и 4 пациентов с ИФА представлены в таблице.

Таблица — Данные о заборе костного мозга и реинфузии ММСК пациентов основной группы

№	Год рождения	Диагноз	Дата забора КМ /реинфузии
1К	1959	ХОБЛ, ДН II ст.	29.05.2014 / 16.06.2014
2Е	1962	ИФА, ДН I	30.05.2014 / 23.06.2014
3Н	1970	ХОБЛ, ДН II ст.	19.08.2014 / 04.09.2014
4Д	1961	ХОБЛ, ДН II ст.	12.11.2014 / 09.12.2014
5М	1947	ИФА, ДН II	17.11.2014 / 16.12.2014
6Ч	1961	ХОБЛ, ДН II ст.	09.12.2014 / 23.12.2014
7Лу	1952	ХОБЛ, ДН II ст.	21.05.2015 / 23.06.2015
8Ко	1949	ХОБЛ, ДН II ст.	26.05.2015 / 09.07.2015
9Ле	1951	ХОБЛ, ДН II ст.	28.05.2015 / 29.06.2015
10Ку	1950	ИФА, ДН II-III ст.	28.05.2015 / 25.06.2015
11П	1943	ХОБЛ, БА, ДН II ст.	23.09.2015 / 15.10.2015
12Па	1960	ИФА, ДН II ст.	16.09.2015 / 21.10.2015
13Х	1951	ХОБЛ, ДН II ст.	23.09.2015 / 28.10.2015
14Г.	1950	ХОБЛ, ДН I-II ст.	10.11.2015 / 15.12.2015

В результате клинико-функционального обследования у пациентов с ХОБЛ установлены: резкие обструктивные нарушения функции внешнего дыхания; явления необратимой бронхиальной обструкции, хроническая дыхательная недостаточность II стадии; по данным эхокардиографии умеренная легочная гипертензия и функциональные нарушения сердечной мышцы; по данным компьютерной томографии высокого разрешения наличие выраженных морфофункциональных изменений легочной ткани, сопровождающихся выраженной эмфиземой и фиброзом. У пациентов группы сравнения и основной группы с ИФА наблюдается более резкое, чем у пациентов с ХОБЛ, более чем в 2 раза уменьшение диффузионной способности легких (ДЛСО) до 37,6±9,1 и 36,7±14,9% соответственно и соотношения ДЛСО/АО до 59,9±1,2% и до 61,9±3,3% у пациентов группы сравнения и основной группы (ИФА) соответственно, что обусловлено наличием в легких низкого числа функционирующих альвеол и уменьшением поверхности функционирующей легочной ткани (вследствие наличия интерстициального фиброза легких). Для ИФА более характерным является интерстициальный фиброз в виде утолщения межальвеолярных перегородок, симптом «матового стекла», очагово-тяжистые элементы на фоне сгущенного легочного рисунка, фиброзирование корней.

У пациентов с ХОБЛ отмечалось изменение показателей Т-клеточного иммунитета: общего количества Т-клеток ($CD3^+$) до 66,5±2,0% ($p<0,05$), Т-супрессоров ($CD8^+$) до 22,3±3,7% ($p<0,01$) в сравнении с группой практически здоровых лиц. Количество В-лимфоцитов (CD19+) значимо не отличалось у пациентов с ХОБЛ по сравнению с группой здоровых лиц (16,0±6,4 и 10,7±0,4% соответственно, $p>0,05$).

У пациентов с ИФА отмечались выраженные изменения показателей клеточного иммунитета: снижение общего количества Т-клеток ($CD3^+$) до 52,4±2,1% ($p<0,05$), Т-хелперов ($CD4^+$) до 24,9±1,9 ($p<0,001$) по сравнению с основной группой ХОБЛ и группой сравнения здоровых лиц. Количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) было ниже на 54,2% у пациентов основной группы с ИФА по сравнению с группой здоровых лиц (4,7±0,9 и 10,7±0,4% соответственно, $p<0,01$). Иммунорегуляторный индекс у пациентов основной группы с ИФА был снижен до 1,2±0,1 по сравнению с группой ХОБЛ ($p<0,01$). При ХОБЛ в стадии обострения и ИФА в фазе прогрессирования наблюдался высокий уровень γ-ИФН.

Мониторинг клинико-функционального и лабораторного состояния пациентов с ХОБЛ после введения ММСК показал, что в течение 4–5 мес. улучшение отмечалось у 6 пациентов (60,0%), у 4-х — стабилизация процесса; при ИФА — у 2-х пациентов в этот период отмечалось некоторое улучшение (50,0%), у 2-х — без динамики заболевания. В отдаленные периоды (10–15 мес. и более) у пациентов с ИФА отмечалось ухудшение состояния у 50,0% пациентов. При ХОБЛ ухудшение состояния наблюдалось у 10,0% пациентов.

Клинический пример 1

Результаты посттрансплантационного мониторинга пациента 1К. с ХОБЛ свидетельствует о снижении активности воспалительного процесса, объемных показателей функции внешнего дыхания и толерантности к физической нагрузке. В динамике через 5 мес. после реинфузии ММСК отмечена нормализация общеклинических и биохимических показателей крови, снижение (нормализация) $CD3^+38^+$-лимфоцитов с 29 до 18% (в группе практически здоровых лиц среднее значение показателя составило 21,6±1,5%), гемопоэтических прогениторных клеток, отвечающих за высвобождение ИФН и участвующих в адгезии между лимфоцитами и эндотелием, что является признаком ранней активации Т-лимфоцитов; нормализация количества CD4-клеток по сравнению с исходными данными (с 53 до 44%). В отдаленный посттрансплантационный период (через 21,5 мес.) иммунофенотипические показатели клеток крови характеризовались значениями в пределах нормы, а иммунорегуляторный индекс составил 1,96.

Клинический пример 2

У пациента 6Ч. с ХОБЛ по данным спирограммы: значительные обструктивные нарушения вентиляции; умеренно снижена ЖЕЛ (вероятно за счет гиперинфляции). Через 3 мес. после введения ММСК показатели оставались без изменения. Данные пульсоксиметрии от 22.12.2014 установили нормальные уровни SpO_2 и транзиторное снижение сатурации SpO_2 до 92% после пробы с задержкой дыхания. Показатели бодиплетизмографии в начале стационарного лечения свидетельствовали об обструктивном варианте изменений механики дыхания, без ухудшения легочного газообмена

в покое. Рентгенологически за период с 14.04.2014 по 05.11.2014 выявлена избыточность, деформация легочного рисунка в обоих легких, сгущение его, перибронхиальные уплотнения в нижних долях. По состоянию на 24.02.2015 данные те же. В биохимических показателях изначально отмечалось снижение общего белка (56 г/л), повышенные значения холестерина (7,1 ммоль/л), щелочной фосфатазы (108 Ед/л), лактатдегидрогеназы (577 Ед/л), С-реактивного белка (82 мг/л). Через 85 дней после введения ММСК эти показатели нормализовались, за исключением уровня холестерина (8,0 ммоль/л). В иммунограмме пациента 6Ч. (на 85 и 168-й дни) отмечались незначительные изменения некоторых показателей, в т. ч. увеличение количества $CD4^+$ клеток с 25 до 30%, снижение $CD8^+$ клеток с 63 до 56%, увеличение ЕК $CD16^+56^+$ с 4 до 9%; увеличение количества HLA-DR+ клеток до 22% с последующим снижением до 4,4 % к 186-му дню. Отмечалось снижение уровня γ-ИФН с 220 до 140 пг/мл и уровня ИЛ-6 с 15 до 7 пг/мл. Количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) снижалось с 8 до 4–5%. В целом состояние пациента 6Ч. оценено как стабильное.

У пациента 6Ч. с ХОБЛ в стадии обострения наблюдаются высокий уровнь гамма-интерферона, который снижается с 220 до 138 пг/мл через 3 мес. после трансплантации ММСК и в дальнейшем стабилизируется, оставаясь на уровне 140 пг/мл), колебания интерлейкина-6 — с 15 до 7 пг/мл, что свидетельствует о снижении степени выраженности обострения и последующей стабилизации ХОБЛ.

Клинический пример 3

У пациента 2Е. с ИФА через 2 и 4,5 мес. после введения ММСК данные теста с 6-минутной ходьбой показали положительную динамику на 2,3% (с 352,8 м — 29.05.2014 до 366,8 м — 20.11.2014) В иммунограмме пациента отмечалось значительное увеличение количества клеток: CD3+ (с 38 до 77%), CD4+ клеток (с 11 до 28%), CD8+ (с 10 до 35%), $CD3^+38^+$ (с 17 до 55%). Увеличилось содержание HLA-DR+ клеток до 22%, которые являются основным, поздним маркером активации клеток (в группе сравнения здоровых лиц содержание их составило 2,25±0,2%). Отмечалось некоторое увеличение количества клеток с фенотипом $CD3^+16^+56^+$ (с 17 до 55%) по сравнению со значениями нормы (3,75±0,4%). Количество В-лимфоцитов ($CD19^+$) оставалось резко сниженным, что подчеркивает активацию показателей клеточного иммунитета у пациента с ИФА после реинфузии ММСК. Уровень γ-ИФН в период наблюдении был высоким и составил 620 пг/мл. Известно, что ИФН-γ обладает противовирусной и тумороцидной активностью; активирует моноциты и макрофаги (продукция цитокинов, кислородный метаболизм, экспрессия молекул адгезии), NK-клетки (цитотоксичность), пролиферацию и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов; стимулирует созревание костномозговых клеток — предшественников моноцитов; подавляет опухолевый рост, размножение вирусов в клетках. Содержание ИЛ-6 составило 16,5 пг/ мл, что можно расценивать как положительный эффект введения ММСК. ИЛ-6 является плейотропным цитокином с широким диапазоном биологической активности, регулирует иммунный ответ, воспаление, онкогенез и гемопоэз.

Мониторинг состояния пациента через 8; 15 и 22,5 мес. после введения аутологичных ММСК: состояние удовлетворительное, общий, биохимический и иммунологические анализы крови в пределах нормальных величин, снизились уровни цитокинов (хотя и оставались еще несколько повышенными — содержание γ-ИФН составило 83 пг/ мл (референтная группа здоровых лиц 12,21±2,84 пг/мл), ИЛ-6 — 15 пг/мл (референтная группа здоровых лиц по данным фирмы-производителя — 0–10 пг/мл), рентгенологически без видимой динамики, пульсоксиметрия в норме (SpO_2= 97%), спирографически тахипноэ без гипервентиляции, уменьшен диафрагмальный компонент выдоха.

Наблюдались высокие уровни гамма-интерферона в фазе прогрессирования ИФА пациента 2Е., что характеризовалось высоким уровнем гамма-интерферона 620 пг/мл, который снижался до 35–0 пг/мл через 5 мес. после реинфузии ММСК и незначительной тенденции к снижению интерлейкина-6 с 16,5 до 15,0 пг/мл после реинфузии ММСК (через 7,7 мес.), что свидетельствовало о стабилизации процесса. Иммунофенотип клеток крови практически не изменился через 22,5 мес.

Заключение. Результаты клинико-функционального и лабораторного обследования пациентов с ХОБЛ и ИФА через 4–5 мес. после введения ММСК свидетельствовали об улучшении состояния у 8 человек (57,1%), у 6 пациентов (42,9%) отмечалась стабилизация процесса или состояние без динамики. Через 10–15 мес. наблюдения после трансплантации ММСК ухудшение состояния отмечено у 1 пациента с ХОБЛ (10,0%) и у 2-х пациентов с ИФА (50%) наблюдалось обострение заболевания.

Межгрупповой анализ иммунофенотипа клеток крови пациентов основных групп выявил при ИФА достоверные более значимые изменения в концентрации Т-лимфоцитов, снижение количества В-лимфоцитов более чем в 3 раза по сравнению с основной группой ХОБЛ ($p<0,01$).

При ХОБЛ в стадии обострения наблюдаются высокий уровнь гамма-интерферона, который снижается после трансплантации ММСК и в дальнейшем стабилизируется через 3–5 мес., что свидетельствует о снижении степени выраженности обострения и последующей стабилизации ХОБЛ. Повторное повышение уровней гамма-интерферона совпадало с клинической картиной обострения воспалительного процесса. Следовательно, определение в динамике содержания гамма-интерферона может являться прогностическим критерием характера течения заболевания.

Фаза прогрессирования ИФА характеризовалась высоким уровнем гамма-интерферона в крови, который при стабилизации процесса через 3–5 мес. после реинфузии ММСК снижался до следовых концентраций; также отмечалась незначительная тенденция к снижению интерлейкина-6 к этому периоду наблюдения. Увеличение концентрации гамма-интерферона к 9–10-му мес. наблюдения связано с клиническим ухудшением состояния пациентов.

Положительный эффект иммунотерапии аутологичными ММСК наиболее выражен у 50% пациентов с ХОБЛ и ИФА в первые 4–5 мес. после трансплантации.

Положительный эффект лечения пациентов с хронической обструктивной болезнью легких с применением ММСК характеризуется: снижением степени выраженности инвалидизирующих нарушений (дыхательной недостаточности, уменьшением степени выраженности одышки по данным MRC шкалы в среднем на 2 балла), снижением степени выраженности обструктивных нарушений от резких до умеренных; повышением толерантности к физической нагрузке (до 40% по данным теста с 6-минутной ходьбой), нормализацией иммунологических параметров (увеличением $CD3^+$клеток, CD4+, снижением или стабилизацией уровней γ-ИФН и ИЛ-6), что способствует улучшению качества жизни пациентов и уменьшает количество обострений на 25%.

Положительный эффект лечения пациентов с идеопатическим фиброзирующим альвеолитом с использованием аутологичных ММСК характеризуется: снижением степени выраженности рестриктивных нарушений от резких до умеренных; значительным улучшением качества жизни; увеличением (нормализацией) количества $CD3^+$ и $CD4^+$ лимфоцитов.

В отдаленные периоды (10–15 мес. и более) после применения аутологичных ММК отмечалось ухудшение состояния у 1 пациента с ХОБЛ (10,0%), у 2 пациентов с ИФА (50,0%), что, возможно, является обоснованием для повторного курса клеточной терапии ММСК.

Литература

1. Чучалин, А.Г. Хроническая обструктивная болезнь легких / А.Г. Чучалин. — М.: Атмосфера, 2008. — 541 с.
2. Шмелев, Е.И. Хроническая обструктивная болезнь легких и сопутствующие заболевания / Е.И. Шмелев // Пульмонология. — 2007. — № 2. — С. 5–9.
3. Глобальная стратегия диагностики, лечения и профилактики ХОБЛ (пересмотр 2011 г.) / Под ред. А.С. Белевского. — М.ю: Рос. респиратор. о-во, 2012. — 80 с.
4. Особенности медицинской экспертизы и реабилитации пациентов с хронической обструктивной болезнью легких: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.11/ Л.В. Лицкевич. — Минск, 2013. — 50 с.
5. Sethi, S. Infectiouse ethiology of acute exacerbations COPD / S. Sethi // Chest. — 2000. — Vol. 117, suppl. 2. — P. 380–385.
6. Specific subsets of mesenchymal stroma cells to treat lung disorders — finding the Holy Grai / S. Rolandsson [et al.] // Pulm. Pharmacol. Ther. — 2014. — Vol. 29, № 2. — P. 93–95.
7. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в клеточной терапии / Е.Б. Владимирская // Онкология и гематология. — 2007. — № 1. — С. 4–16.

LONG-TERM RESULTS OF TREATMENT OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE AND IDIOPATHIC FIBROSING ALVEOLITIS WITH AUTOLOGOUS MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Litskevich L.V.[1], Gurevich G.L.[1], Shpakovskaya N.S.[1], Skryagin A.G.[1], Skryagin E.M.[1], Solodovnikova V.V.[1], Isaykina Y.I.[2], Novikova M.A.[2], Kovalenko D.G.[1]

[1]State Institution "Republican Scientific-Practical Center of Pulmonology & Tuberculosis", Minsk, Republic of Belarus; [2]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus

The positive effect of immunotherapy with autologous MMSC most pronounced in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the first 4–5 months after transplantation, which is manifested decrease severity disabling disorders, including respiratory failure that objectify a decrease in the degree of severity of dyspnea (MRC scale according to an average of 2 points), reducing the severity of obstructive disorder (COPD) and restrictive idiopathic fibrosing alveolitis (IFA) from sharp to moderate; increase exercise tolerance test, according to the 6-minute walk of up to 40%; a slight increase in $CD3^+$ cells, increasing (normalization) of T-helper cells ($CD4^+$), decrease or stabilization levels of IFN-gamma and IL-6. 4 patients with COPD, was observed during this period the stabilization process; 2 patients with IFA - some improvement (50.0%), in 2 — no dynamics. In long periods (10–15 months or more), deterioration noted in 1 patient with COPD (10.0%), in 2 patients with IFA (50.0%).

Keywords: Chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic fibrosing alveolitis, mesenchymal stem cells, post-transplant monitoring.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМЕРИЗМА И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ У ПАЦИЕНОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А., Савицкая Т.В., Волочник Е.В., Акинфеева Э.Л., Минаковская Н.В., Кирсанова Н.П., Алексейчик А.В., Прудников Д.В., Алейникова О.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Исследование химеризма является инструментом наблюдения за приживлением после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Оно может использоваться как индикатор отторжения трансплантата и рецидива заболевания. Однако до сих пор дискутируются варианты методов контроля: эритроцитарного фенотипа, метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), методы полимеразной цепной реакции с фрагментным анализом мишеней STR (short tandem DNA repeats) и количественной реакции в реальном времени с применением InDel мишеней (insertion/deletion polymorphism). Данные по количественной оценке и подходам к анализу химеризма противоречивы. В нашей работе мы сконцентрировались на выборе методологических подходов, которые должны быть информативными, чувствительными и количественно точными факторами для выделения пациентов с риском отторжения трансплантата и рецидива. Такой подход необходим не только для назначения терапии, но и для определении ответа на лечение.

Ключевые слова: химеризм, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Введение. В течение последних трех десятилетий аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) стала стандартной процедурой лечения многих онкологических (острые и хронические лейкозы, неходжкинская лимфома и др.) и неонкологических (апластическая анемия, гемоглобинопатии, иммунодефицитны и др.) заболеваний у детей и взрослых. После трансплантации центральным вопросом остается, чья гемопоэтическая система вос-

станавливается — донора или реципиента. Исследование принадлежности клеток крови донору или реципиенту и доли каждого из них после аллоТГСК называется исследованием химеризма [1]. В медицине впервые понятие химеризма ввел Anderson D. et al. для характеристики организма, содержащего клеточные популяции другого индивидуума того же или другого вида. В области трансплантологии термин «химера» впервые использовал Ford C. et al. в 1956 г.

Первоначально считалось, что полный донорский химеризм (ПДХ) крайне важен для поддержания приживления трансплантата после аллоТГСК. Однако в последнее время доказана возможность сосуществования гемопоэза донора и реципиента. Это положение было названо смешанным химеризмом (СХ). Если все клетки после трансплантации донорские, то пациент называется «полной химерой», демонстрирующей ПДХ. Эволюция посттрансплантационного химеризма — динамический процесс, поскольку пациенты с ПДХ в последующем могут развить СХ и наоборот. Кроме того, у пациентов может наблюдаться ПДХ в одних линиях гемопоэза (например, в натуральных киллерах) и СХ в других (например, в гранулоцитах). Такой феномен называется «расщепленный химеризм» (РХ). На значение уровня химеризма также влияет чувствительность используемых методов исследования, которая определяется как минимальное количество клеток, которое может быть детектировано данным методом.

Цель работы — определение уровня химеризма различными методами у пациентов после аллоТГСК и выбор наиболее оптимального; разработка подходов для выделения группы высокого риска отторжения трансплантата, рецидива заболевания для своевременной терапии и оценки ее эффективности.

Материалы и методы. В исследование включены 100 пациентов, которым с июня 2011 г. по октябрь 2015 г. в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии» было выполнено 108 аллоТГСК (4 пациента получили повторную трансплантацию вследствие рецидива заболевания, 2 детей в связи с недостаточностью трансплантата, 1 ребенку проведено 2 повторных аллоТГСК из-за отторжения трансплантата). Характеристика пациентов и доноров приведена в таблице.

Таблица — Характеристика пациентов и доноров

Характеристики	Всего
Число трансплантаций (n =)	108
Возраст пациентов, медиана (годы)	8,6 (0–29)
Пол реципиентов: мальчики девочки	 66 42
Диагноз: АА МДС НХЛ ОМЛ ОЛЛ Бифенотипический ОЛ ХМЛ ЮММЛ ПИД Аутоиммунная тромбоцитопения Талассемия	 19 6 4 29 31 3 1 3 10 1 1
Пол доноров: мужской женский	 62 46
Половая совместимость донор/реципиент: женский/мужской мужской/мужской мужской/женский женский/женский	 27 39 23 19
HLA-совместимость: HLA-совместимый сиблинг неродственный донор HLA 10/10 неродственный донор HLA 9/10 родственный донор HLA-несовместимый	 31 46 18 13
Режим кондиционирования: МАК РИК	 74 34
ТОТ: да нет	 31 77

Окончание таблицы

Характеристики	Всего
Источник гемопоэтических стволовых клеток:	
костный мозг	66
периферические стволовые клетки	36
пуповинная кровь	6
Несовместимость реципиент/донор:	
группа крови	66
пол	50
HLA	31

Примечания: АА — апластическая анемия; МДС — миелодиспластический синдром; НХЛ — неходжкинская лимфома; ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; ОЛЛ — острый лимфобластный лейкоз; ОЛ — острый лейкоз; ХМЛ — хронический миелоидный лейкоз; ЮММЛ — ювенильный миело-моноцитарный лейкоз; ПИД — первичный иммунодефицит; HLA — human leukocyte antigen; МАК — миелоаблативный режим кондиционирования; РИК — редуцированной интенсивности режим кондиционирования; ТОТ — тотальное облучение тела.

Исследования химеризма проводилось в дни +14, +21, +30, +45, +60, +80, +100, +140, +180, +245, +365 после аллоТГСК. [2]

Исследование эритроцитарного химеризма (ЭХ) периферической крови (ПК) проводилось путем определения фенотипа эритроцитов методами реакции агглютинации у пациентов, несовместимых с донором по группе крови по АВ0-системе и/или резус фактору. Для определения химеризма по половой хромосоме в мононуклеарах ПК и костного мозга (КМ) использовался метод флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) у реципиентов, несовместимых с донором по полу (половой химеризм). Вне зависимости от сочетания пары донор/реципиент диагностика лейкоцитарного химеризма осуществлялась стандартными методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом с использованием мишеней STR (short tandem DNA repeats) (STR-ПЦР) и/или методом количественной ПЦР в реальном времени с применением InDel мишеней (insertion/deletion polymorphism) (InDel-ПЦР) [2].

У пациентов с онкологической патологией при наличии мишеней мониторировалась минимальная остаточная болезнь (МОБ) по клональным реаранжировкам генов Ig/TCR; по мутациям в генах RUNX1 и NRAS; по экспрессии химерных онкогенов *TEL-AML1, SIL-TAL, E2A-PBX1 и NPM1-ALK*.

Для математической обработки и статистического анализа данных использовались программы Microsoft Excel, Statistica 6.0 и MedCalc.

Результаты и их обсуждение. Из 108 трансплантаций 66 были выполнены мальчикам (61,1%) и 42 девочкам (38,9%); 46,3% (50) трансплантаций проведены от несовместимого по полу донора; 31 аллоТГСК (28,7%) — HLA-несовместимая; 61,1% (66) трансплантаций от донора, несовместимого по группе крови (по АВ0 системе и/или резус-фактору).

В случае 21 аллоТГСК (19,4%) невозможно контролировать химеризм ни по эритроцитам, ни по половой хромосоме, ни по HLA-системе ввиду полной совместимости донора и реципиента. ЭХ в 24 (22,2%) случаях являлся единственным маркером наблюдения за приживлением и функционированием трансплантата.

При анализе динамики лейкоцитарного и ЭХ выявлено значительное запаздывание становления ЭХ после аллоТГСК. Адекватная оценка по агглютиногенам АВО-системы возможна с дня +60 (при отсутствии трансфузий эритроцитов), а по агглютининам с +180 дня после аллоТГСК. Особенности определения ЭХ: линейная специфичность, возможность использования только в случае несовместимости пары донор/реципиент по АВ0 системе/резус-фактору, индивидуальная особенность интенсивности синтеза агглютининов, зависимость от трансфузионной активности, низкая чувствительность метода (около 10%), субъективизм при оценке результатов, особенно динамики. Данный маркер неэффективен в случае рецидива онкогематологических заболеваний с изолированным ростом патологического клона.

Исследование химеризма по HLA-генам возможно при несовместимости пары донор/реципиент по HLA-системе и является качественной реакцией, что информативно в случае отторжения трансплантата, достижения 100% химеризма и при рецидиве заболевания.

Цитогенетический метод определения лейкоцитарного химеризма по половой хромосоме — высокочувствительный (0,1–0,001%) метод, позволяющий количественно оценить клетки и донора и реципиента на любом этапе после операции, однако доступен лишь для 46,3% пациентов, имеющих несовместимого по полу донора.

На современном этапе развития трансплантологии необходимы высокочувствительные количественные методы отслеживания лейкоцитарного химеризма у всех пациентов после аллоТГСК независимо от сочетания пары донор-реципиент. В 1990-х гг. такую возможность предоставили молекулярно-генетические методы исследования ДНК, где мишенями служат ее специфические последовательности.

Мы использовали два подхода: мультплексная ПЦР на основе STR с последующим фрагментным анализом и количественная ПЦР в реальном времени по InDel мишеням.

Для диагностики СХ методом STR-ПЦР достаточно, чтобы реципиент и донор различались хотя бы одним аллелем из исследуемых локусов (10 STR тетрануклеотидных маркеров плюс амелогенин (маркер половых хромосом)), который называется информативным. На рисунке 1 представлены электрофореграммы образцов ДНК из периферической крови донора и реципиента до трансплантации и реципиента после трансплантации.

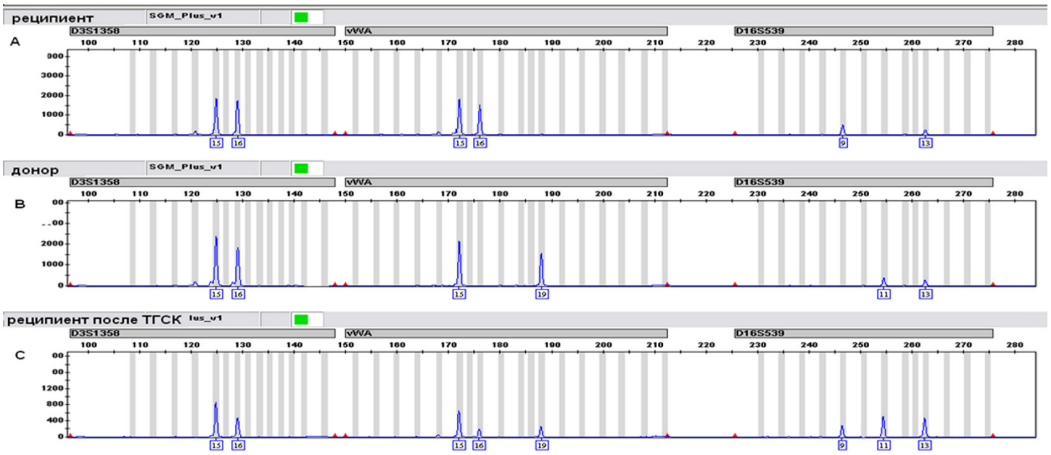


Рисунок 1. — Электрофореграммы образцов ДНК из периферической крови реципиента (A), донора (B), реципиента после ТГСК (C) после амплификации STR локусов. На (C) представлен образец со смешанным химеризмом по локусам vWA и D16S539

Используя серийные разведения клеток донора в клетках реципиента определили чувствительность метода, которая составила 1–5% для разных локусов. При использовании количества ДНК более 8 нг (эквивалентно 1000–1200 клеткам) на реакцию наблюдалась неспецифическая амплификация и появление «предшествующих» пиков.

Для определения возможности клинического использования метода STR локусов сравнили его с результатами химеризма полученными методом FISH, которым определяли клетки, несущие половую хромосому при трансплантации в паре донор/реципиент, различающихся по полу. Использовали 41 посттрансплантационный образец. Коэффициент корреляции двух методов составил r = 0,9796, p<0,0001. Высокое значение корреляции свидетельствовало о тесной линейной связи между двумя методами, что было подтверждено методом Блэнда–Алтмана.

При использовании метода InDel-ПЦР первоначально необходимо определить информационные аллели. Мы генотипировали донора и реципиента по 22 аллель-специфическим маркерам. Аллель считали информативным, если он был позитивным для реципиента и негативным для донора или наоборот. Чувствительность метода составила 0,01–0,001%. Недостатком данного метода является большая разбежка значений при СХ, поэтому, как правило, выбирали два информативных аллеля (один аллель отсутствовал у донора и был у реципиента и наоборот) и использовали у реципиентов с химеризмом более 95%, что соответствует данным международной литературы [3].

Таким образом, для мониторирования химеризма у пациентов с высоким уровнем клеток реципиента (выше 5%) подходит STR-ПЦР как более точный, а при меньшем количестве — InDel-ПЦР как более чувствительный. Большинство опубликованных в литературе результатов выполнены на основе метода STR-ПЦР. Однако его низкая чувствительность не позволяет диагностировать ранние изменения трансплантата и предвидеть рецидив болезни у пациентов с онкогематологической патологией. У пациентов, для которых необходимо достижение полного донорского химеризма, рекомендуется использовать количественный метод InDel-ПЦР.

Нами исследовано клиническое значение динамики химеризма после аллоТГСК.

На установление донорского химеризма не влияют HLA-совместимость пары донор/реципиент, пол, возраст пациента и донора, тип донора (родственный, неродственный), наличие тотального облучения тела в режиме кондиционирования и таких осложнений, как острая/хроническая реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ), p>0,05.

При анализе химеризма в ПК и КМ в зависимости от интенсивности режима кондиционирования выявлен достоверно чаще полный ДХ (ПДХ) у пациентов, получивших миелоаблативный режим кондиционирования (МАК) и СХ после режима кондиционирования редуцированной интенсивности (РИК), p<0,05.

Для определения влияния нозологии заболевания на химеризм пациенты были разделены на 2 группы: первая — пациенты с онкогематологическими (ОМЛ, ОЛЛ, бифенотипический ОЛ, НХЛ, МДС, ЮММЛ, ХМЛ); вторая — пациенты с гематологическими заболеваниями (апластические анемии, талассемия, ПИД). При анализе выявлен более высокий уровень донорских клеток в 1-й группе как по эритроцитарным маркерам p<0,05, так и молекулярным в ПК и КМ в ранние сроки после ТГСК, p<0,05. В более поздних сроках с +180 дня достоверной разницы в ЭХ не получено. Однако сохраняется более высокий донорский химеризм в ПК пациентов 1-й группы, определяемый методами ПЦР.

В группе гемабластозов принципиальным является контроль ремиссии. После 14 (18,2%) из 77 аллоТГСК развились рецидивы, из них 8 (57%) до +200 дня и 6 (43%) — в более поздние периоды (медиана — 138 дней).

Только в 51 случае (66%) из 77 аллоТГСК по поводу онкогематологических заболеваний имелись маркеры для контроля МОБ, поэтому проанализирована возможность использования контроля уровня химеризма для прогнозирования развития рецидивов у всех пациентов с гемобластозами. Изучив возможности различных методов, мы выбрали метод InDel-ПЦР как самый информативный, чувствительный и количественно точный.

Повышение СХ в КМ и ПК наблюдалось в 10 из 14 (71,4%) случаев до рецидива. Медиана времени между увеличением количества клеток реципиента и рецидивом составила 28 дней, что соответствует международным данным [2, 4]. Не было выявлено никаких признаков повышения СХ до гематологического рецидива у троих пациентов вследствие длительного временного интервала между последней точкой контроля и рецидивом (более 68 дней) и у одного пациента, развившего экстрамедуллярный рецидив.

Изучив уровень химеризма после 52 аллоТГСК, определен уровень «нормального» колебания. Он составил 99,0–100% на +30 день и 99,5–100% в последующие дни (90-й процентиль). Значение химеризма 99,5% после +30 дня было принято за пороговый уровень для определения риска развития рецидива. Определен уровень химеризма после ТГСК:

1. Высокий уровень ДХ (на +30 день >99% и в последующие дни 99,5–100%), n = 36, 3 рецидива (группа А).
2. Конверсия высокого ДХ в низкий (на +30 день >99% и в последующие дни 99,5–100% с эпизодами падения <99,5%), n = 9, 6 рецидивов (группа В).
3. Уменьшающийся СХ (на +30 день <99% и уменьшающийся СХ в последующие дни, достигший >99,5% на +45–+100 дни), n = 3, без рецидивов (группа А).
4. СХ (на +30 день <99% и уменьшающийся СХ в последующие дни, но не достигший 99,5% и затем нарастающий процент клеток реципиента), n = 1, рецидив (группа В).
5. Увеличивающийся СХ (на +30 день <99%, дальнейшее увеличение СХ и отторжение трансплантата), n = 1, без рецидива (группа В).
6. Нет приживления, n = 2,1 рецидив (группа В).

В зависимости от динамики химеризма мы выделили 2 группы пациентов: группа А — пациенты с химеризм >99,5%, с уменьшающимся СХ, достигшие донорского химеризма >99,5%, и группа В — пациенты с химеризмом <99,5%, с уменьшающимся СХ, но не достигшие >99,5%.

В группу А вошло 39 аллоТГСК, после 6 (15,4%) из которых развились рецидивы. В группу В вошло 13 аллоТГСК, в 8 (61,5%) случаях развился рецидив. В группе В вероятность развития рецидива значительно выше, чем в группе А (p = 0,0001), а 2-летняя безрецидивная выживаемость значительно хуже 16,9 и 93,6% соответственно (p = 0,00001) (рисунок 2).

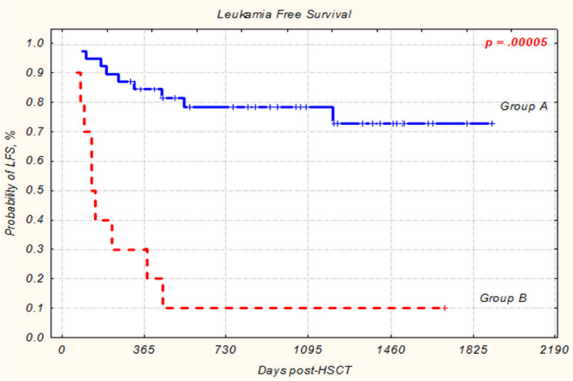


Рисунок 2. — Безрецидивная выживаемость пациентов с гемобластозами в зависимости от уровня химеризма после аллоТГСК

Однако нарастание смешанного химеризма не является безусловным признаком рецидива. Мы наблюдаем пациентку с ОМЛ (+1245 день после ТГСК), которая несмотря на отторжение трансплантата на +75 день находится в полной ремиссии.

Для определения значения уровня химеризма на +30 день и корреляции МОБ и химеризма мы выбрали группу пациентов с ОМЛ (в возрасте 1–19 лет, медиана — 11 лет) после 29 аллоТГСК. Медиана наблюдения — 0,7 (0,1–4,9) года. Общая выживаемость — 72%, CI рецидивов — 25%. Рецидивы развились на 84–265-й дни (медиана — 147 день). После аллоТГСК наличие эпизодов положительной МОБ (n = 6) в отличие от отрицательной МОБ (n = 9) в течение всего периода увеличивало вероятность рецидива: CI рецидивов 50% vs 0% (p = 0,026) и LFS 17% vs 89%, (p = 0,008); 3 из 4 пациентов со СХ (95,9–99,1%) на +30 день и 3 из 25 с ПДХ развили рецидив: CI рецидивов 75% vs 18% (p<0,001) и LFS 0% vs 69% (p<0,001). У 5 из 7 пациентов с возрастающим/стабильным СХ и 2 из 23 с постоянным ПДХ (n = 23) развился рецидив: CI рецидивов 71% vs 10% (p<0,001), LFS составила 0% vs 76% (p<0,001). Конкордатные результаты между МОБ и химеризмом наблюдались в 9 случаях из 12 (75%). Дисконкордатные результаты были у пациентов с очень низким уровнем МОБ<10^{-4}.

Таким образом, у пациентов с острыми лейкозами большинство рецидивов развивается в первые 200 дней после аллоТГСК. Наличие МОБ после аллоТГСК, СХ (<99,5%) на +30 день, а также возрастающего СХ — факторы неблагоприятного прогноза для развития рецидивов и безрецидивной выживаемости, однако мало эффективны для диагностики экстрамедуллярных рецидивов. У пациентов со СХ и нарастающим СХ необходим более частый мониторинг уровня химеризма методом InDel- ПЦР для назначения своевременной терапии и контроля ее эффективности.

Остается дискутабельным вопрос о значении уровня химеризма после аллоТГСК у пациентов с неонкологическими заболеваниями. В нашем исследовании, как и у других авторов, достаточно эффективным явился метод STR-ПЦР [1, 2]. При анализе 20 аллоТГСК пациентам с гематологическими заболеваниями, обусловленными недостаточным гемопоэзом, ПДХ >99,0% развился после 6 (30%) аллоТГСК, персистирующий СХ — после 12 (60%), неприживление — после 2 (10%). Для данной группы характерны колебания ДХ до 25% от предыдущей точки, особенно в первые полгода. На +30 день химеризм >99% выявлялся после 10 аллоТГСК, 99–95% — после 2, 94–70% — после 4, 30–25% — после 2, 0% — после 2. У пациентов химеризм >99% на +30 день был ассоциирован с более ранним восстановлением лейкоцитов >10^9/л (p = 0.04), нейтрофилов >0,5×10^9/л (p = 0,04), тромбоцитов >20×10^9/л (p = 0,004) и более ранней независимостью от трансфузий тромбоцитарной массы (p = 0,008).

У пациентов с неонкологическими заболеваниями целью аллоТГСК является обеспечение восстановления достаточного уровня нарушенных функций и не требуется достижение ПДХ, однако имеется повышенный риск отторжения трансплантата, поэтому необходимо регулярное определение химеризма для своевременной диагностики и лечения. Также для оценки функционирования трансплантата необходимо исследование химеризма в отдельных клеточных линиях. У 5 пациентов со СХ был диагностирован РХ. У 3 детей с ПИД выявлен высокий ДХ (77,7–97,7%) в проблемных для данных заболеваний ростках кроветворения (Т($CD3^+$), В($CD19^+$) -лимфоциты), а гранулоцитарный росток остался собственным (пациентка с ТКИН) или произошло его отторжение с аутовосстановлением (2 ребенка с синдром Вискотта–Олдрича). Поскольку иммунная система была состоятельна, у этих пациентов выбрана тактика наблюдения без трансфузий донорских лимфоцитов, которые могли спровоцировать развитие тяжелой РТПХ.

У 1 пациента с ПАА при отсутствии признаков заболевания наблюдается РХ — полный или низкий СХ гранулоцитарного ростка и В-лимфоцитов и высокий СХ Т-лимфоцитов. Учитывая патогенез заболевания, исследован химеризм родоначальных стволовых ($CD34^+$) клеток. Выявлен донорский химеризм — 96,5%. Дополнительная терапия не проводится.

Однако наличие СХ после аллоТГСК у пациентов с острыми лейкозами требует особого внимания. У 1 пациента с ОМЛ на фоне нарастающего СХ выявлен РХ — Т- и В-лимфоциты донорские, а в $CD34^+$ и $CD15^+$ — нарастание клеток реципиента. Несмотря на лечение, диагностирован рецидив заболевания.

Таким образом, динамика химеризма имеет различное значение для пациентов разных нозологических групп.

Заключение. Динамическое исследование химеризма является важным инструментом посттрансплантационного наблюдения приживления и функционирования трансплантата. Оно позволяет диагностировать его отторжение и может использоваться как индикатор рецидива при онкогематологических и неонкологических заболеваниях. Полученные результаты могут служить основанием для проведения мер по профилактике отторжения трансплантата и рецидива заболевания у всех пациентов с учетом диагноза, вида трансплантации, режима кондиционирования, а также назначению своевременной обоснованной терапии, контролю ее эффективности на всех этапах после операции, что улучшит исход заболевания у реципиентов после аллоТГСК.

Литература

1. Murphy, K. Chimerism analysis following hematopoietic stem cell transplantation / K. Murphu // Methods Mol. Biol. — 2013. — Vol. 999. — P. 137–149.

2. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? / P. Bader [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2005. — Vol. 35, № 2. — P. 107–119.

3. Sequence polymorphism systems for quantitative real-time polymerase chain reaction to characterize hematopoietic chimerism-high informativity and sensitivity as well as excellent reproducibility and precision of measurement / A. Willasch [et al.] // Lab. Hematol. — 2007. — Vol. 35, № 2. — P. 73–84.

4. Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients / D.P. Chen [et al.] // Clin Chim Acta. — 2011. — Vol. 412, № 7–8. — P. 625–630.

CHIMERISM ANALYSIS AND CLINICAL SIGNIFICANCE IN PATIENTS AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Mareika Y.E., Lavrinenko V.A., Savickaya T.V., Volochnik V.E., Akinfeeva E.L., Minakovskaya N.V., Kirsanova N.P., Prudnikov D.V., Aleinikova O.V.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus

Chimerism analysis is a tool for the surveillance of engraftment after hematopoietic stem cell transplantation. It can serve as an indicator for graft rejection, the recurrence of the disease. Until now discusses various techniques: erythrocyte phenotyping, fluorescent in situ hybridization, polymerase chain reaction fluorescent-based (short tandem repeats) and real-time quantitative (insertion/deletion polymorphism). Data of quantify and approaches to chimerism analysis are contradictory. In our study, we have focused on the approach, which needs to be informative, sensitive and quantitatively accurate factor to highlight patients at risk for graft rejection and relapse. Such an approach is needed for treat and ascertaining responses.

Keywords: chimerism, allogenic hematopoietic stem cells transplantation.

СПОСОБ ОЦЕНКИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЭРИТРОНА

Надыров Э.А.[1], Прокопович А.С.[1], Никонович С.Н.[1], Прокопович Д.А.[2]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь;

[2]Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Республика Беларусь

Реферат. Клинический интерес представляет выявление регенераторных возможностей эритрона, которые предшествуют развитию анемического синдрома, а также комплексное использование количественных и качественных показателей ретикулоцитов и эритроцитарных индексов в оценке эффективности лечения анемий. Для оценки регенераторных возможностей эритрона при анемиях были использованы показатели процента ретикулоцитов (pRET), индекса созревания ретикулоцитов (IRF) и эртроцитарные индексы (MCH, MCV, MCHC, RDW-CV). Был разработан метод количественной оценки регенераторных возможностей эритрона. Предложена математическая оценка степени выраженности нарушений в количестве и степени созревании ретикулоцитов и дисбалансе в индексах зрелых эритроцитов.

Ключевые слова: анемии, регенерация, эритрон, диагностика.

Введение. Эффективность регенераторных возможностей эритрона обеспечивает нормальный эритропоэз, результаты которого отражают показатели общего анализа крови [1, 2]. Снижение регенераторных возможностей эритрона приводит к нарушению эритропоэза и возникновению анемического синдрома [3]. Клинический интерес представляет выявление напряжения регенераторных возможностей эритрона, которые предшествуют развитию анемического синдрома. У таких пациентов имеет место снижение эффективности эритропоэза, при этом показатели уровней гемоглобина, эритроцитов и гематокрита могут находятся в пределах нормы. Нарушение эффективности эритропоэза проявляет себя в изменении количества ретикулоцитов, увеличением выхода в кровоток незрелых форм ретикулоцитов с высокой степенью содержания в них РНК, которое выражается индексом созревания ретикулоцитов (IRF), и нарушением баланса эритроцитарных индексов [4, 5]. При этом значения эритроцитарных индексов могут находиться в «серой» зоне перехода от нормы к патологии или оказаться в области патологических значений.

Подобные изменения могут иметь место и в процессе выздоровления, когда на фоне напряженного эритропоэза происходит количественная нормализация основных показателей циркулирующего пула эритрона (гемоглобин, эритроциты, гематокрит). Однако сохраняются изменения в качественных параметрах эритроцитов, в созревании ретикулоцитов и содержании в них РНК. Динамическое наблюдение за пациентами в таких состояниях чрезвычайно важно, т. к. позволяет вести контроль эффективности лечения и обеспечить необратимость положительной динамики. В этой связи разработка метода количественной оценки регенераторных возможностей эритрона является актуальной задачей клинической гематологии.

Цель работы — разработка способа оценки регенераторных возможностей эритрона при различных видах анемий с использованием количественных и качественных показателей ретикулоцитов и эритроцитарных индексов.

Материалы и методы. Для оценки распределения анемий по характеру регенерации была создана база из 1093 пациентов, в т. ч. с железодефицитной анемией (ЖДА) — 437, с макроцитарной анемией — 116 и с анемией хронических заболеваний (АХЗ) — 540 пациентов. Анемии были разделены в соответствии с классификацией следующим образом (в зависимости от процентного содержания ретикулоцитов в периферической крови): регенераторные — 1–5%, гиперрегенераторные — >5%, гипорегенераторные — <1%.

Для оценки регенераторных возможностей эритрона были выбраны показатели процента ретикулоцитов (pRET) и индекса созревания эритроцитов (IRF). Данные показатели характеризуют активность костного мозга по продукции эритроцитов, при этом их количество может характеризовать состояние костного мозга как регенераторное, гипо-, гипер- и арегенератрное. Качественную сторону продукции эритроцитов отображает содержание в них РНК, отражающее степень зрелости эритроцита, которая характеризуется показателем IRF. Кроме того, для оценки регенераторных возможностей эритрона были выбраны индексы эритроцитов циркулирующей крови (MCV, MCHC, MCH, RDW), показывающие конечный результат эффективности эритропоэза, так они зависят от значений гемоглобина, эритроцитов, гематокрита и сбалансированности их уровней. Таким образом, комплекс вышеперечисленных показателей позволяет охарактеризовать регенераторные возможности эритрона с точки зрения формирования полноценного пула эритроцитов. Для исследований использовался гематологический анализатор Celldin Sapfir.

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием программы Statistica 6.0. Сравнительный анализ частот выявления различных форм анемий проводился с использованием критерия χ^2. Различия между группами считались статистически значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Распределений пациентов по характеру регенерации при анемиях представлено в таблице.

Таблица — Распределение анемий по характеру регенерации

Характер анемии	ЖДА (1)		Макроцитарная (2)		АХЗ (3)		P (χ^2)
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Регенераторная	337	77,11	57	49,13	412	76,35	$p_{1,2}<0,001$ **$p_{1,3}=0,76$** $p_{2,3}=0,01$
Гиперрегенераторная	22	5,05	55	47,42	59	10,18	$p_{1,2}<0,001$ $p_{1,3}<0,001$ $p_{2,3}<0,001$
Гипорегенераторная	78	17,84	4	3,45	69	12,78	$p_{1,2}<0,001$ $p_{1,3}=0,003$ $p_{2,3}<0,001$
Итого	437	100	116	100	540	100	1093

Как видно из таблицы, регенераторная анемия чаще выявлялась при ЖДА и АХЗ (77,11 и 76,35% соответственно). В сравнении с макроцитарной анемией (49,13%) различия были статистически значимыми ($p<0,05$). Статистически значимых различий между АХЗ и ЖДА установлено не было.

Гиперрегенераторные анемии чаще определялись при макроцитарных анемиях (47,47%), в меньшем проценте при АХЗ (10,18) и ЖДА (5,05%). При этом сравнении с ЖДА и АХЗ различия были статистически значимыми ($p<0,05$). Частота встречаемости гиперрегенераторных анемий при АХЗ была значимо выше аналогичного показателя при ЖДА ($p<0,05$).

Гипорегенераторные анемии наиболее часто определялись при ЖДА (17,84%), наиболее редко — при макроцитарных анемиях (3,45%). Статистически значимые различия при сравнении ЖДА (17,84%) и АХЗ (12,78%) отсутствовали

(p>0,05). При ЖДА доля гипорегенераторных анемий была значимо выше в сравнении с макроцитарной анемией (p<0,05) и АХЗ (p<0,05).

Оценка регенераторных возможностей эритрона при различных видах анемий с использованием количественных и качественных показателей ретикулоцитов и эритроцитарных индексов проводилась следующим образом.

1 этап. Определение степени принадлежности процентного содержания ретикулоцитов (pRET) норме

Процент содержания ретикулоцитов в кровотоке традиционно является показателем, характеризующим интенсивность эритропоэза. При наличии анемического синдрома процент содержания ретикулоцитов должен увеличиваться, причем, чем ниже содержание гемоглобина и величина гематокрита, тем выше должен быть процент содержания ретикулоцитов при эффективном эритропоэзе. Исходя из вышеизложенного процент содержания ретикулоцитов в условиях наличия анемического синдрома соответствующий нормальным значениям должен трактоваться как гипорегенераторная реакция, а содержание ретикулоцитов ниже нормальных значений — как арегенераторная.

5,0% — минимальное содержание ретикулоцитов при регенераторной форме анемии (соответствие норме 1,0 при 5,0% и более), в интервалах от 0 до 5,0 принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{pRETC} = \frac{5{,}0 - X_{пациента}}{5{,}0}, \quad (1)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

2 этап. Определение степени принадлежности индекса созревания ретикулоцитов (IRF) норме

Нормальное созревание ретикулоцитов, «гарантирующее» эффективный эритропоэз при оптимальном соотношении ретикулоцитов различной степени зрелости, характеризуется индексом созревания ретикулоцитов определяется для мужчин и женщин уровнем ≤0,155 (соответствие норме — 1,0). Патологические изменения возможны при увеличении значения IRF более 0,155, которые при значениях 0,338 и более представляют собой нарушение созревания ретикулоцитов и в увеличение в циркулирующем пуле эритрона ретикулоцитов с высоким содержанием РНК (соответствие норме — 0), в интервалах от 0,155 до 0,338 принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{IRF} = \frac{0{,}338 - X_{пациента}}{0{,}338 - 0{,}155}, \quad (2)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

3 этап. Определение степени принадлежности эритроцитарных индексов норме

Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH)

В качестве нормального интервала определена зона 27–34 pg (соответствие норме — 1). При уменьшении MCH менее 27 pg снижается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях MCH 18,5 pg и менее; в интервале от 27 до 18,5 pg принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCH} = \frac{X_{пациента} - 18{,}5}{27 - 18{,}5}, \quad (3)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

При увеличении MCH выше 34 pg снижается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях MCH 36,4 pg и более; в интервале от 34 до 36,4 pg принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCH} = \frac{36{,}4 - X_{пациента}}{36{,}4 - 34}, \quad (4)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

Средний объем эритроцита (MCV)

В качестве нормального интервала определена зона 80–95 fl (соответствие норме — 1). При уменьшении MCV менее 80 fl степень принадлежности к норме снижается и достигает 0 при значениях MCV 64 fl и менее; в интервале от 80 до 64 fl принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCV} = \frac{X_{пациента} - 64{,}0}{80{,}0 - 64{,}0}, \quad (5)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

При увеличении MCV более 95 fl снижается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях MCV 129 fl и более; в интервале от 95 до 129 fl принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCV} = \frac{129{,}0 - X_{пациента}}{129{,}0 - 95{,}0}, \quad (6)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC)

В качестве нормального интервала определена зона 32–36 g/dl (соответствие норме — 1). При снижении MCHC ниже 32 g/dl уменьшается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях MCHC 28 g/dl; в интервале от 32 до 28 g/dl принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCHC} = \frac{X_{пациента} - 28{,}0}{32{,}0 - 28{,}0}, \quad (7)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

При увеличении MCHC выше 36 g/dl уменьшается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях MCHC 38 g/dl; в интервале от 36 до 38 g/dl принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{MCHC} = \frac{38{,}0 - X_{пациента}}{38{,}0 - 36{,}0}, \quad (8)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

Показатель вариации эритроцитов по объему (RDW-CV)

В качестве нормальной вариации принята вариация, не превышающая 12–14% (соответствие норме — 1). При вариации 14% и более уменьшается степень принадлежности к норме, которая достигает 0 при значениях RDW-CV 16% и более; в интервале от 14 до 16% принадлежность к норме оценивается по формуле:

$$m_{RDW\text{-}CV} = \frac{16{,}0 - X_{пациента}}{16{,}0 - 14{,}0}, \quad (9)$$

где $X_{пациента}$ — результат пробы пациента.

4 этап. Итоговая оценка регенераторных возможностей эритрона

1. Оценка эффективности ретикулоцитарного звена (Мрет):

$$M_{рет} = mp_{RETC} / 2 + m_{IRF} / 2, \quad (10)$$

где mp_{RETC} — критерий оптимальности содержания ретикулоцитов в кровотоке;
m_{IRF} — критерий оптимальности индекса созревания ретикулоцитов.

2. Оценка результатов эффективности эритропоэза по качественным индексам зрелых эритроцитов ($M_{эрит}$):

$$M_{эрит} = m_{MCH} / 4 + m_{MCV} / 4 + m_{MCHC} / 4 + m_{RDW\text{-}CV} / 4, \quad (11)$$

где m_{MCH}, m_{MCV}, m_{MCHC}, $m_{RDW\text{-}CV}$ — критерий соответствия референсным интервалам.

3. Оценка регенераторных возможностей эритрона:

$$M_{эритрона} = M_{рет}/2 + M_{эрит}/2. \quad (12)$$

Регенераторные возможности эритрона можно считать эффективными при значениях Мэритрона 0,8 и более. Значения 0,5 и более, но менее 0,8 свидетельствуют о напряжении эритропоэза, пациент нуждается в динамическом наблюдении, а при терапии в ее продолжении с возможной коррекцией. При значениях менее 0,5 регенераторные возможности эритрона не эффективны, и пациент нуждается в адекватном лечении.

Заключение. Таким образом, алгоритм расчета регенераторных возможностей эритрона, учитывающий показатели процента ретикулоцитов (pRET), индекса созревания эритроцитов (IRF) в комплексе с индексами эритроцитов циркулирующей крови (MCV, MCHC, MCH, RDW), позволяет охарактеризовать регенераторные возможности эритрона.

Разработанный алгоритм позволяет оценить регенераторные возможности эритрона при развитий патологических изменений, предшествующих развитию анемического синдрома, когда содержание гемоглобина может находиться в пре-

делах нижней границы нормы. Кроме того, интегральный показатель Мэрит можно использовать при оценке эффективности лечения при различных видах анемий.

Результаты данного исследования легли в основу инструкции по применению «Алгоритм диагностики анемий» (рег. № 247-1213 от 06.06.2014), приложение компьютерная программа (свидетельство о регистрации в Национальном центре интеллектуальной собственности № 652 от 06.02.2014) и патента на изобретение «Способ оценки эффективности лечения железодефицитной анемии» (положительное решение результата предварительной экспертизы № a 20131415, приоритет по дате: 02.12.2013).

Литература

1. Основы клинической гематологии: справ. пособие / С.Ю. Ермолова [и др.]. — СПб.: Изд-во «Диалект», 2003. — 304 с.
2. Смирнова, Л.А. Анемии: дифференциально-диагностические аспекты / Л.А. Смирнова // Мед. новости. — 2013. — № 2. — С. 15–19.
3. Волкова, С.А. Основы клинической гематологии: учеб. пособие / С.А. Волкова, Н.Н. Боровков. — Н.Новгород: Изд-во Нижегород. гос. мед. акад., 2013. — 400 с.
4. Энциклопедия клинических лабораторных тестов/ Под ред. Н.У. Тица. — М.: Изд-во «Лабинформ», 1997. — 942 с.
5. Tietz Clinical guide to laboratory tests / Ed. A. Wu. — 4th ed. — USA,W.B Sounders Company, 2006. — 1798 p.

THE METHOD OF EVALUATING THE REGENERATIVE CAPACITY OF ERYTHRONE

Nadyrov E.A.[1], Prokopovich A.S.[1], Nikonovich S.N.[1], Prokopovich D.A.[2]

[1]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Radiation Medicine & Human Ecology", Gomel, Republic of Belarus;
[2]Educational Establishment "Gomel State Medical University", Gomel, Republic of Belarus

1093 patients with different types of anemia were included into the study. Anemia were divided into groups depending on the percentage of reticulocytes in the peripheral blood (regenerative, hyperregenerative, hyporegenerative). The objective of the study is to develop a method for evaluation of regenerative capacity of erythrone for various types of anemia using quantitative and qualitative indicators of reticulocyte and erythrocyte indices. The percentage of reticulocytes (pRET), index of reticulocyte formation (IRF) and erythrocyte indices (MCH, MCV, MCHS, RDW-CV) were used for evaluation of regenerative capacity of erythrone with anemia. The mathematical evaluation of the degree of the manifestation of abnormality in the amount and degree of formation of reticulocytes and imbalance in the indices of erythrocytes was developed.

Keywords: anemia, regeneration, erythron, diagnostics.

ЭКСПАНСИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДЛЯ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПАЦИЕТАМ С ЛИМФОПРОЛИФЕРАТАВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Петёвка Н.В.[1], Васина Е.В.[1], Костюнина В.С.[1], Гончарова Н.В.[1], Оводок А.Е.[2], Змачинский В.А.[2], Смольникова В.А.[2], Бакун А.В.[2], Власенкова С.В.[2], Кривенко С.И.[2]

[1]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь;
[2]Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Более 60% трансплантаций кроветворных клеток в мире происходит с использованием аутологичных стволовых клеток периферической крови пациентов. В ряде случаев заготовить достаточное количество клеток проблематично. Одним из подходов увеличения количества кроветворных клеток в трансплантате является их экспансия (наращивание) *ex vivo*. Однако во время культивирования происходит не только увеличение количества клеток, но и их частичное созревание, приводящее к потере способности репопулировать костный мозг. Для создания оптимальных условий культивирование гемопоэтических предшественников можно проводить в присутствии одного из компонентов костномозговой ниши — мезенхимных стромальных клеток. Нами разработана технология кратковременной экспансии гемопоэтических стволовых клеток периферической крови *ex vivo*, которая позволяет в условиях клиники за 5–6 сут увеличить общее количество ядросодержащих клеток в 9,0±6,4 раза, $CD34^+$-клеток — в 3,5±2,1 и колониеобразующих единиц — в 8,5±4,8 (n = 7), что не приводит к смещению субпопуляционного состава предшественников миелоидного ряда. При получении трансплантата *ex vivo* не использовались реагенты ксеногенного происхождения. Трансплантат соответствует лабораторным критериям качества и биобезопасности и апробирован при высокодозной химиотерапии пациентов с множественной миеломой.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) периферической крови (ПК), экспансия *ex vivo*, трансплантация ГСК.

Введение. У 20–46% пациентов с лимфогранулематозом (ЛГМ), неходжкинской лимфомой (НХЛ) или множественной миеломой (ММ) при планировании аутологичной трансплантации в ходе стандартной процедуры мобилизации не удается получить необходимое для лечения количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) [1]. Плохой ответ или отсутствие ответа на мобилизацию требует ремобилизации и дополнительных процедур афереза, увеличения экономических затрат и повышает риск возникновения осложнений [2]. Низкое количество клеток-предшественников в трансплантате коррелирует с отсроченным приживлением, увеличением времени восстановления тромбоцитов и нейтрофилов, затратами на заместительную терапию (трансфузии тромбоконцентрата, эритроцитной массы), развитием инфекционных осложнений [2].

Цель работы — разработка технологии наращивания *ex vivo* CD34-положительных клеток периферической крови, пригодных для аутологичной трансплантации пациентам с лимфопролиферативными заболеваниями.

Материалы и методы. Для выделения культур мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК КМ) были использованы 40 образцов аспиратов КМ (16 образцов КМ пациентов с ЛГМ, 8 — с НХЛ, 12 — с ММ и 3 образца КМ здоровых доноров). Для получения CD34-обогощенной фракции использованы 27 образцов лейкоконцентрата периферической крови (13 образцов лейкоконцентрата пациентов с ЛГМ, 7 — с НХЛ и 7 — с ММ).

МСК получали культивированием мононуклеарной фракции аспирата костного мозга в питательной среде α-MEM (Hyclone, США) с добавлением 5% сыворотки AB(IV) крови человека. Обогащенную $CD34^+$-клетками фракцию лейкоконцентрата периферической крови пациента получали с помощью набора EasySep для положительной иммуномагнитной сепарации (StemCell Technologies, Канада) согласно инструкции производителя (вместо эмбриональной телячьей сыворотки использовали человеческий альбумин). Чистоту CD34-обогащенной фракции анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

$CD34^+$ клетки периферической крови высевали в концентрации $5–10\times10^3/см^2$ на монослой аутологичных МСК КМ либо МСК КМ здорового донора. Культивировали в бессывороточной среде StemSpan (Stem Cell Tech.) с добавлением ростовых факторов SCF (100 нг/мл), Flt-3 Ligand (100 нг/мл), TPO (25 нг/мл) в течение 5–7 дней при +37ºС во влажной атмосфере воздуха с 5% CO_2. Анализировали прирост ядросодержащих клеток (ЯСК), $CD34^+$-клеток с помощью иммуноцитофлуориметрии, а также количественное изменение олигопотентных и унипотентных колониеобразующих единиц эритроцитов, гранулоцитов и макрофагов (КОЕ) и их видового состава с помощью колониеобразующих тестов в полужидкой среде на основе метилцеллюлозы (MethoCult, Stem Cell Tech.).

Исследование стерильности культур клеток проводили на гемокультиваторе Bact/AleRT. Жизнеспособность гемопоэтических клеток и МСК КМ определяли окрашиванием аннексином V (Ann) и 7-аминоактиномицином D (AAD). Для кариотипирования готовили препараты, которые подвергали дифокрашиванию, либо окраске рутинным методом. Хромосомный анализ проводили под иммерсионным объективом (увеличение 12,5×100).

В клинические испытания метода котрансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток, полученных экспансией *ex vivo*, были включены 4 пациента с ММ.

Результаты и их обсуждение. Для выявления факторов, влияющих на эффективность сбора ГСК, пациенты, которым проводилась процедура мобилизации стволовых клеток на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска, были разделены на 2 группы: 1-я группа — пациенты с успешной мобилизацией ГСК (набрано $>2,0\times10^6$/кг веса $CD34^+$-клеток на одну трансплантацию, $>5,0\times10^6$/кг веса $CD34^+$-клеток на две трансплантации для пациентов с множественной миеломой); 2-я группа — пациенты с неэффективной мобилизацией ГСК (набрано $<2,0\times10^6$/кг веса $CD34^+$-клеток на одну трансплантацию, $<5,0\times10^6$/кг веса $CD34^+$-клеток на две трансплантации для пациентов с множественной миеломой). При сравнении данных групп было выявлено, что пациенты 2-й группы имели в среднем больший возраст (47,8 (23–59) против 38,5 (23–58) года для пациентов 1-й группы, $p = 0,01$), меньшее количество лейкоцитов в крови на момент сбора ($4,6\pm0,9\times10^3$/мкл против $6,1\pm1,9\times10^3$/мкл, $p = 0,02$) и меньшее количество нейтрофилов ($2,5\pm1,8\times10^3$/мкл против $3,8\pm1,6\times10^3$/мкл, $p = 0,02$). Статистически значимых различий по количеству курсов стандартной полихимиотерапии у сравниваемых групп не было: 6,2±2,4 в 1-й группе против 5,5±2,1 во 2-й группе. Однако в случаях предварительного проведения пациентам курсов высокодозного мелфалана сбор достаточной для трансплантации дозы $CD34^+$-клеток был невозможен. Влияние диагноза и пола пациента на эффективность сбора ГСК выявлено не было.

Таким образом, у пациентов в группе с низкой эффективностью сбора ГСК средний возраст был старше 45 лет, средний уровень лейкоцитов периферической крови на момент начала режима мобилизации был менее 5000/мкл, нейтрофилов — менее 3000/мкл.

Для разработки экономически целесообразного и эффективного метода остановились на экспансии клеток в условиях сокультивирования со вспомогательными клетками костномозговой ниши. Использование в качестве таковых монослоя МСК КМ позволяет уменьшить количество добавляемых в культуру дорогостоящих ростовых факторов и сохранить высокую жизнеспособность ГСК за счет секретируемых в среду или экспрессируемых на поверхности МСК КМ биомолекул. Получение культур МСК КМ проводилось с использованием производимой на базе РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий сыворотки AB(IV) крови человека, что позволило отказаться от ксеногенной телячьей эмбриональной сыворотки.

В лабораторных условиях краткосрочная (5–7 сут) экспансия предварительно сепарированных по CD34-маркеру и криоконсервированных клеток лейкоконцентрата в присутствии монослоя аутологичных МСК КМ пациента приводила к увеличению общего количества ядросодержащих клеток (ЯСК) в 12,8±5,6 раза, $CD34^+$-клеток — в 8,7±4,0 и колониеобразующих единиц (КОЕ) — в 9,9±6,5. Так как метод культивирования разрабатывался для клинических целей, использовалась бессывороточная среда, а вместо ксеногенного бычьего сывороточного альбумина — сывороточный альбумин человека. На начальном и конечном этапах культивирования осуществляли контроль безопасности клеточного продукта (контроль стерильности и отсутствия остаточных опухолевых клонов). В случае сохранения целостности монослоя на протяжении всего периода сокультивирования доля апоптотических и некротических гемопоэтических клеток не превышала 1%. Цитогенетический анализ показал, что во всех образцах (нативный лейкоконцентрат, клетки после CD34-сепарации, гемопоэтические клетки после экспансии) наблюдается нестабильность генома, выражающаяся в гипоплоидии клеток. После культивирования клеток *in vitro* грубых структурных изменений хромосом, а также одиночных и парных фрагментов выявлено не было. Также не обнаружено статистически значимых различий в количестве клеток с аберрантным кариотипом до и после экспансии. Клональные плазматические клетки ($CD45\text{-}CD138^+CD56^+$ фенотип) ни в образцах исходного лейкоконцентрата периферической крови, ни в подвергнутых экспансии $CD34^+$-селектированных клетках не обнаруживались.

По изменению фенотипа клеток можно судить о процессах дифференцировки в культуре *in vitro*. Полученная иммуномагнитной сепарацией фракция клеток исходно содержала в среднем 85,8±16% $CD34^+$-клеток. Пяти-шестидневная

экспансия в условиях сокультивирования приводила к снижению содержания $CD34^+$-клеток до 51,5±8,8%. Популяция исследуемых нами исходных $CD34^+$-клеток во всех образцах была положительна по CD33, CD38 и CD45. В процессе экспансии часть $CD34^+CD33^+CD38^+$-клеток дифференцировалась в миелоидном направлении с утратой CD34-антигена. В то же время появлялась новая популяция $CD34^+$-клеток с более ранним фенотипом $CD34^+CD38$ (рисунок 1).

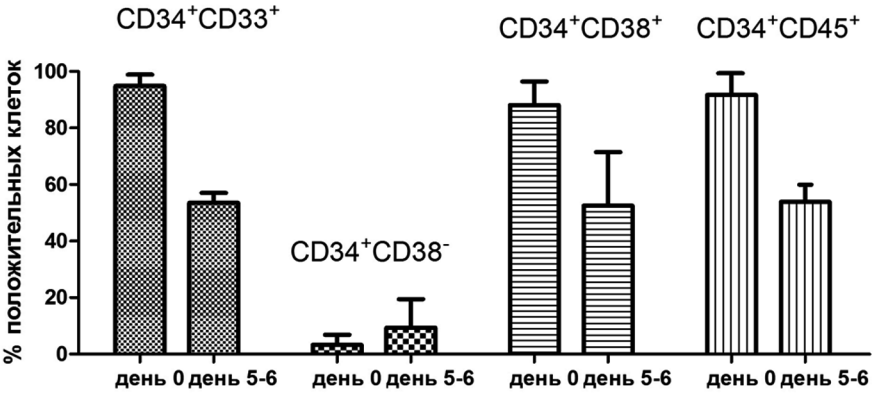


Рисунок 1. — Фенотип гемопоэтических клеток до экспансии (день 0) и после (день 5–6)

По завершении экспансии наблюдалось распределение культуры гемопоэтических клеток между двумя фракциями: 63,7±0,6% $CD45^+$-клеток оставались свободными в среде (суспензионная фракция) и 36,3±0,6% откреплялись только вместе с МСК (адгезионная фракция). Отмечены различия в фенотипе и субпопуляционном составе предшественников миелопоэза в зависимости от фракции. Прикрепленные к МСК клетки теряли CD34-маркер в меньшей степени по сравнению с гемопоэтическими клетками в суспензии. После сокультивирования в адгезионной фракции клеток в отличие от суспензионной присутствовало меньшее количество миелоидных предшественников с фенотипом $CD34^+CD38^+$. Содержание ранних $CD34^+CD90^+$-клеток в адгезионной фракции преобладало над суспензионной — 2,47 и 0,45% соответственно.

В ходе сокультивирования наблюдали увеличение количества $CD34^+CD41^+$-клеток. Антиген CD41 экспрессируется на тромбоцитах и их предшественниках мегакариоцитах. Популяция $CD34^+CD41^+$-клеток возрастала за время экспансии с 1,6±1,2 до 10,8±7,0%. Исследования показали, что клетки с фенотипом $CD34^+CD41^+$ в основном прикреплены к монослою МСК КМ. Дифференцировочный потенциал тромбоцитарного ростка кроветворения до и после экспансии дополнительно исследовали КОЕ-тестом в среде MegaCult, предназначенной для детекции колоний мегакариоцитов (КОЕ-Мег). За время экспансии количество КОЕ-Мег возрастало в 12,9±11,0 раз с учетом общего прироста ЯСК в 12,8±5,6 раза. Таким образом, адгезионная фракция культивированных ГСК содержит значительное количество гемопоэтических клеток менее зрелого фенотипа и преимущественное количество предшественников тромбоцитарного ростка.

Оценивали эффективность *in vitro* экспансии $CD34^+$-клеток пациентов с плохим (менее 5×10^6/кг веса, n = 3) и хорошим (более 5×10^6/кг веса, n = 5) ответом на мобилизацию. Экспансия кроветворных клеток пациентов с недостаточной дозой $CD34^+$-клеток при заборе приводила к увеличению ЯСК в 11,7±1,3 раза, $CD34^+$-клеток — в 7,4±1,9 и суммы колониеобразующих единиц миелоидного ряда (КОЕ) — в 6,5±0,6 раза. У пациентов с успешной мобилизацией увеличение по ЯСК, $CD34^+$-клеткам и КОЕ составило 13,9±5,9; 8,16±4,9, и 8,3±4,6 раза соответственно. Статистически достоверных различий между эффективностью экспансии в обеих группах не выявлено. $CD34^+$-клетки пациентов с плохим и хорошим ответом на мобилизацию обладают схожим пролиферативным и дифференцировочным потенциалами *in vitro*. Соотношение олигопотентных предшественников и КОЕ эритроидного и гранулоцитарно-моноцитарного рядов не претерпевало значительных изменений в ходе экспансии в этих группах (рисунок 2).

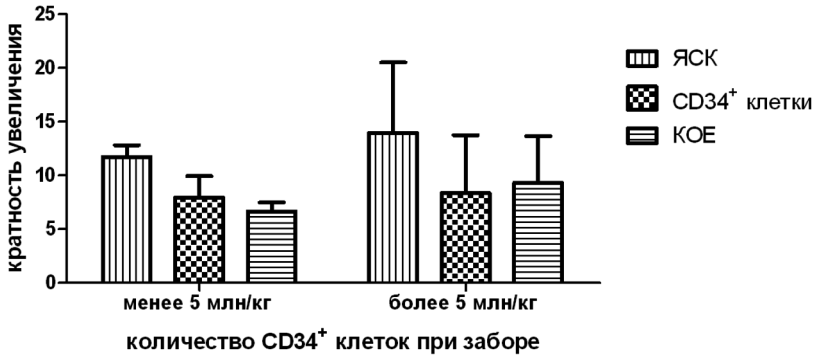


Рисунок 2. — Кратность увеличения ЯСК, $CD34^+$-клеток и КОЕ при экспансии $CD34^+$-клеток пациентов с плохим (менее 5 млн $CD34^+$-клеток/кг веса пациента) и хорошим (более 5 млн $CD34^+$-клеток/кг веса) ответом на мобилизацию

Средние параметры экспансии не имели статистически достоверных различий в зависимости от диагноза (ЛГМ, НХЛ, ММ), курсов химиотерапии и эффективности мобилизации $CD34^+$-клеток у пациентов. МСК КМ пациентов способны поддерживать экспансию $CD34^+$-клеток с той же эффективностью, что и МСК здорового донора (рисунок 3).

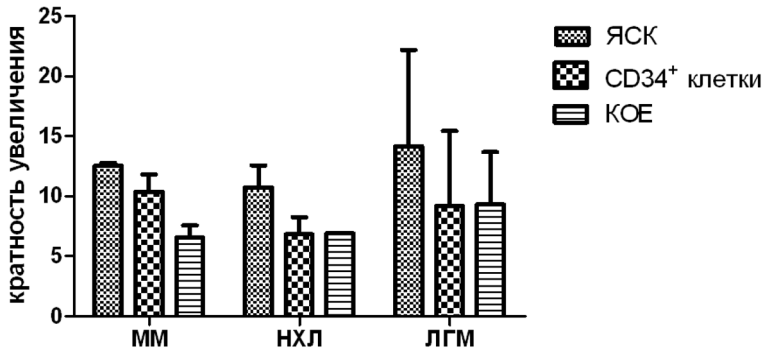


Рисунок 3. — Кратность увеличения ЯСК, $CD34^+$-клеток и КОЕ при экспансии $CD34^+$-клеток у пациентов с множественной миеломой (ММ), неходжкинской лимфомой (НХЛ) и лимфогранулематозом (ЛГМ)

Проводили исследование возможности использования ручного метода сепарации для получения достаточного количества $CD34^+$-клеток в клинических условиях. При увеличении объемов исходного лейкоконцентрата относительное содержание $CD34^+$-клеток на выходе достоверно снижалось в среднем в 1,4 раза ($p = 0,006$). При иммуномагнитной сепарации 5 мл лейкоконцентрата в лабораторных условиях относительное содержание CD34-положительных клеток в среднем составило 89,8±7,5% ($n = 17$), в то время как при подобных манипуляциях с 15–20 мл лейкоконцентрата — 72,1±6,8 ($n = 4$), что, соответственно, увеличивало примесь клеток гранулоцитарного ряда, которые плохо переносят криоконсервирование. По разработанной технологии предполагается заморозка сепарированных $CD34^+$-клеток до момента аспирации КМ и последующей экспансии. Полученную после сепарации лейкоконцентрата обогащенную $CD34^+$-клетками фракцию криоконсервировали в концентрации $3,0±0,6×10^6$ кл/мл в растворе AB(IV) сыворотки крови человека либо аутологичной сыворотки пациента с 10% диметилсульфоксида. За 6 сут до трансплантации криоконсервированные $CD34^+$-клетки размораживали. При разморозке ЖСП $CD34^+$-клеток, заготовленных макро- и микрометодом, были сопоставимы (87,6±4,5 и 90,7±4,5% соответственно). Эффективность разморозки не зависела от содержания CD34-положительных клеток в размораживаемой клеточной суспензии ($r = 0,02$; $p = 0,96$; $n = 7$).

Масштабирование метода предполагало увеличение начальных объемов культивирования с 2,5–5 мл (лабораторные условия) до 360 мл (клинические условия). Использование больших культуральных флаконов приводило к изменениям некоторых физических факторов культивирования (увеличение pH в первые часы после манипуляций с флаконом, ухудшение вентиляции CO_2), что сказывалось на эффективности экспансии целевых клеток. При сокультивировании CD34-обогащенной фракции клеток в больших объемах кратность увеличения ЯСК была в среднем в 1,8 раза ниже по сравнению с микрометодом. В то же время кратность увеличения $CD34^+$-клеток и КОЕ после экспансии были сопоставимы (таблица).

Таблица — Сравнительный анализ экспансии ГСК ПК в лабораторных и клинических условиях

Параметры	Лабораторные условия, n = 17	Клинические условия, n = 7
Кратность увеличения ЯСК	12,8±5,6	9,0±6,4
Кратность увеличения $CD34^+$-клеток	8,7±4,0	3,5±2,1
Кратность увеличения КОЕ	9,9±6,5	8,5±4,8

Жизнеспособность гемопоэтических клеток по окраске трипановым синим составляла в среднем 98,7±1,7% после экспансии в лабораторных условиях и 98,2±1% после масштабирования технологии. Можно предположить, что в условиях больших объемов культивирования происходило некоторое снижение скорости пролиферации культуры без потери жизнеспособности и функции (способности к колониеобразованию) предшественников миелоидного ряда.

На базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска проводилась клиническая апробация разработанного метода экспансии ГСК *ex vivo* и котрансплантации их вместе с лейкоконцентратом, заготовленным стандартным способом. На первом этапе исследовали параметры безопасности введения полученного биомедицинского клеточного продукта. Отличие разработанного метода от известных по литературе состояло в том, что впервые использовалась для введения пациенту не только суспензионная фракция культивированных ГСК, но и адгезионная, которая открепилась от поверхности флакона вместе с аутологичными МСК. На первом этапе котрансплантацию проводили 2 пациентам с множественной миеломой, у которых в результате мобилизации и афереза было заготовлено достаточное количество $CD34^+$-клеток ($16,0×10^6$ и $9,3×10^6$ клеток/кг). Вклад $CD34^+$-клеток, полученных экспансией *ex vivo*, составил 1,8 и 1,3% соответственно. После котрансплантаций не выявлено неблагоприятных реакций и осложнений при мониторинге витальных параметров организма. Токсичность в раннем посттрансплантационном периоде оценивали по шкале NCIC-CTC. Для сравнения использовали историческую группу сравнения (10 пациентов с ММ, перенесших трансплантацию ГСК). Токсичность в группе пациентов, получивших трансплан-

тацию ГСК, культивированных в условиях *ex vivo*, не превышала токсичность в группе сравнения. В последней отмечалась более выраженная гастроинтестинальная токсичность и количество инфекционных осложнений (параметр инфекция/фебрильная лихорадка). Так как количество трансплантируемых клеток, полученных *ex vivo* на данном этапе исследований, было значительно ниже предполагаемой эффективной дозы, а количество $CD34^+$ клеток/кг веса пациента в основном трансплантате периферической крови превышало 4×10^6, сроки восстановления гемопоэза не имели различий от средних значений в группе сравнения.

На втором этапе проводили котрансплантацию 2 пациентам с дозой $CD34^+$ в основном трансплантате $4,6\times10^6$ и $3,3\times10^6$ клеток/кг. В результате экспансии было получено дополнительное количество $CD34^+$-клеток: $0,5\times10^6$ клеток/кг для первого пациента и $0,15\times10^6$ клеток/кг для второго, что составило 11 и 4,5% от всего пула $CD34^+$-клеток соответственно. Для обоих пациентов были сформированы группы исторического контроля, в которые вошли все пациенты УЗ «9-я ГКБ» г. Минска с множественной миеломой, которым была проведена трансплантация ГСК в течение последних 3-х лет с равным или близким количеством $CD34^+$-клеток в расчете на килограмм веса. Для первого пациента группа исторического контроля включала 7 пациентов, среднее количество трансплантируемых CD34-клеток в группе составило $4,35\pm0,21\times10^6$ клеток/кг. Период абсолютной (<500 кл/мкл) нейтропении у пациента составил 5 дней против 5,9±0,7 дней в группе сравнения. Для второго пациента группа исторического контроля была сформирована из 8 пациентов, среднее количество трансплантируемых $CD34^+$-клеток в группе составило $3,47\pm0,19\times10^6$/кг. Период абсолютной нейтропении у пациента составил 4 дня против 6,4±0,9 дней в группе сравнения. Как и в предыдущих случаях, у пациентов, получивших трансплантацию ГСК, культивированных *ex vivo*, не наблюдалось никаких инфекционных осложнений.

Таким образом, нами разработана клинически безопасная технология экспансии *ex vivo* $CD34^+$-клеток периферической крови для аутотрансплантации. Экспансия *ex vivo* $CD34^+$-клеток пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями в присутствии одного из компонентов костномозговой ниши — аутологичных МСК КМ — позволяет увеличить количество ЯСК, $CD34^+$-клеток и КОЕ с сохранением всех ростков миелопоэза независимо от индивидуального ответа на процедуру мобилизации ГСК. Поставленная задача увеличения *ex vivo* количества CD34-положительных клеток миелоидного ряда выполнена полностью. Известно, что увеличение количества трансплантируемых $CD34^+$-клеток свыше 2–3 млн кл/кг веса пациента уже не влияет на период нейтропении у пациента после высокодозной химиотерапии. Более того, предполагается, что на длительность периода нейтропении оказывают влияние не стволовые CD34-положительные клетки, а более зрелые предшественники, сопутствующие данной популяции клеток. Обнаруженное нами некоторое уменьшение периода нейтропении у пациентов после котрансплантации размноженных клеток относительно группы сравнения может быть случайным и требует дальнейшего подтверждения.

Сокультивирование *in vitro* $CD34^+$-клеток ПК с аутологичными МСК КМ моделирует условия костномозговой ниши: клетки с незрелым фенотипом преимущественно адгезированы с МСК КМ и дольше сохраняют CD34-маркер. Большинство предшественников мегакариоцитов также прикреплены к монослою МСК. Таким образом, адгезивная фракция гемопоэтических клеток после кратковременной экспансии является важным источником кроветворных элементов и может иметь большое значение при трансплантации для восстановления тромбоцитарного ростка кроветворения. Культивирование ГСК в присутствии МСК КМ позволяет за короткий период получить значительное увеличение ранних гемопоэтических предшественников без уменьшения их жизнеспособности. Небольшой срок культивирования позволяет снизить риск инфекционной контаминации и трансформации культуры. Использование для экспансии фракции $CD34^+$-клеток, а также узконаправленных гемопоэтических цитокинов позволяет избежать размножения клеток лимфоидного ростка и не приводит к появлению в трансплантате клональных клеток.

Высокая жизнеспособность культур, исключение реагентов и клеток ксеногенного происхождения, а также отсутствие в культуре резидуальных опухолевых клеток позволяет использовать способ в клинической практике не только в случае недостаточной их мобилизации. Известно, что увеличение количества трансплантируемых аутологичных клеток наряду с сокращением периода постхимиотерапевтической нейтропении одновременно увеличивает риск контаминации опухолевыми клональными клетками. Мы предполагаем, что использование котрансплантации ГСК, полученных экспансией *ex vivo*, может сократить количество трансплантируемого лейкоконцентрата и увеличить таким образом период безрецидивного выживания пациента. Наличие в арсенале способов лечения данного метода может способствовать принятию положительного решения при назначении высокодозной химиотерапии в тех случаях, когда существуют факторы повышенного риска ее применения.

Заключение. Разработана технология кратковременной экспансии гемопоэтических стволовых клеток периферической крови *ex vivo*, которая позволяет в клинических объемах за 5–6 сут увеличить общее количество ядросодержащих клеток в 9,0±6,4 раза, $CD34^+$-клеток — в 3,5±2,1 и колониеобразующих единиц в 8,5±4,8 (n = 7). Это не приводит к смещению субпопуляционного состава предшественников миелоидного ряда. При получении трансплантата *ex vivo* не используются реагенты ксеногенного происхождения, трансплантат соответствует лабораторным критериям качества. Клиническая апробация технологии при высокодозной химиотерапии пациентов с множественной миеломой подтвердила ее биобезопасность.

Литература

1. The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization / M. Koenigsmann [et al.] // Transfusion. — 2004. — Vol. 44, № 5. — P. 777–784.

2. Takeyama, K. PBSC mobilization / K. Takeyama, H. Ohto // Transfus. Apher Sci. — 2004. — Vol. 31, № 3. — P. 233–243.

PERIPHERAL BLOOD HEMATOPOIETIC CELLS EXPANSION FOR AUTOTRANSPLANTATION IN PATIENTS WITH LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

Petyovka N.V.[1], Vasina E.V.[1], Kostjunina V.S.[1], Goncharova N.V.[1], Ovodok A.E.[2], Zmachinskyj V.A.[2], Smolnikova V.V.[2], Bakun A.V.[2], Vlasenkova S.V.[2], Krivenko S.I.[2]

[1]State Institution "Republican Science & Practice Centre for Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus;
[2]Institution of Health "9th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

Method of short term ex vivo expansion of peripheral blood $CD34^+$ cells developed and clinically tested. The fold-increase obtained for the number of nucleated cells, $CD34^+$ cell numbers and CFC was, respectively, 9.0±6.4; 3.5±2.1 and 8.5±4.8 under xenogen-free and stroma-supported conditions. Both hematopoietic and stromal cells demonstrate low apoptotic rate (1–3%) after co-culturing. Transplantation of MSC-associated together with non-adherent hematopoietic cells is safe.

Keywords: peripheral blood (PB) hematopoietic stem cells (HSC), *ex vivo* expansion, HSC transplantation.

РАЗРАБОТКА ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ОТБОРА ДОНОРОВ ГИПЕРИММУННОЙ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМЫ

Пешняк Ж.В., Дашкевич Э.В., Сошко С.В., Маевская О.Л., Коржель Т.С.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Герпесвирусная инфекция является одной из социально значимых проблем в мире. Разработка методических подходов к получению донорской гипериммунной противогерпетической плазмы в качестве сырья для производства противогерпетического иммуноглобулина является весьма актуальной задачей для Республики Беларусь, которая позволит решить вопросы профилактики и терапии герпесвирусных осложнений при иммуносупрессивных состояниях, обусловленных различной патологией.

Ключевые слова: герпесвирусная инфекция, доноры крови и компонентов крови, титры противогерпесных антител, гипериммунная противогерпетическая плазма.

Введение. По данным ВОЗ, герпесвирусная инфекция относится к социально значимым и трудно контролируемым заболеваниям ввиду пожизненной персистенции вирусов герпеса в организме инфицированных, значительного полиморфизма клинических проявлений, торпидностью к существующим методам лечения [1, 2]. Считается, что около 90–95% человеческой популяции инфицировано одним или несколькими типами вируса герпеса, а рецидивирующие герпесвирусные инфекции наблюдаются у 9–12% жителей разных стран [1–4]. В настоящее время с помощью биологических и иммунохимических методов при гибридизации ДНК описано более 100 представителей семейства *Herpesviridae*, из которых 9 патогенны для людей, а наибольшее клиническое, эпидемиологическое и медико-социальное значение имеют герпесвирусы человека первых пяти типов (HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV) [1, 5].

Цель работы — разработка и внедрение организационно-методического обеспечения по отбору доноров для создания базы данных доноров крови и ее компонентов Республики Беларусь с высокими титрами противогерпесных антител.

Материалы и методы. У 1067 доноров крови и ее компонентов ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» проведены исследования по выявлению противогерпесных антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов, к цитомегаловирусу, к раннему и капсидному антигенам вируса Эпштейна–Барр, к вирусу ветряной оспы — опоясывающего герпеса. Группу обследованных доноров составили мужчины в возрасте 18–50 лет, являющиеся потенциально активными донорами крови и ее компонентов. Для получения сыворотки забор кровь проводили в полистирольные пробирки без консерванта («Sarstedt», Германия). Исследование проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) по инструкциям к наборам, зарегистрированным для клинико-диагностического применения в Республике Беларусь и определяющим антитела класса IgG: к вирусу простого герпеса 1 типа набор реагентов «ИФА-ВПГ-1-IgG» (ЗАО «ЭКОлаб», РФ), к вирусу простого герпеса 2 типа — «ДС-ИФА-Анти-ВПГ-2-G» (НПО «Диагностические системы», РФ), к цитомегаловирусу — «ЦМВ-IgG-ИФА-БЕСТ)» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ), а также «ИФА-ЦМВ-IgG» (ЗАО «ЭКОлаб», РФ), к раннему антигену (ЕА) вируса Эпштейна–Барр — «ВектоВЭБ-ЕА-IgG» (ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ», РФ), к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр (VCA) — «ДС-ИФА-АНТИ-ВЭБ-VCA-G» (НПО «Диагностические системы», РФ), к вирусу ветряной оспы — опоясывающего герпеса *Varicella zoster* согласно инструкции по применению «ИФА для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу *Varicella zoster* в сыворотке и плазме человека» (IBL INTERNATIONAL GMBH, Германия). Высокими считали значения в 5 раз и более, превышающие определяемого используемой тест-системой критического (порогового) уровня чувствительности.

На наличие вирусов простого герпеса, цитомегаловируса и вируса Эпштейна–Барр сыворотку (плазму) крови проверяли методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Выявление вирусов простого герпеса и цитомегаловируса проводили с помощью набора реагентов «АмплиСенс HSV/CMV-МУЛЬТИПРАЙМ-FL» (РФ), а вируса Эпштейна–Барр — с помощью набора реагентов «АмплиСенс EBV-скрин/монитор-FL» (РФ). Для экстракции ДНК из образцов (сыворотка/плазма крови) использовали комплекты реагентов, рекомендованные ФБУН (Федеральное бюджетное учреждение науки) ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора «ДНК-сорб-В» (РФ). Одновременную амплификацию участков ДНК вируса простого герпеса и цитомегаловируса проводили с помощью комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT (РФ). Амплификацию участка ДНК вируса Эпштейна–Барр проводили с использованием комплекта реагентов «ПЦР-комплект» вариант FRT-100 F (РФ). Детекция флуоресцентного сигнала осуществлялась непо-

средственно в ходе ПЦР с помощью амплификатора «ДТ-96» («ДНК-Технология», РФ) в режиме «реального времени» путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения прибора «ДТ-96» («ДНК-Технология», РФ). Результаты интерпретировались на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. В Республике Беларусь доноры обследуются серодиагностическими лабораториями службы крови на наличие антител к вирусу гепатита С, HBs-антигену, на ВИЧ 1 и 2, сифилису [6]. Если антитела и антигены к данным инфекциям отсутствуют, то доноры допускаются к донации. Ввиду практически 90% инфицирования населения вирусами герпеса и сохранении его в организме человека пожизненно, герпесвирусная инфекция не относится к числу противопоказаний для донорства в латентной фазе инфекции.

Данные об уровне противогерпесных антител у доноров крови и компонентов крови Республики Беларусь до недавнего времени отсутствовали, поэтому впервые в трансфузиологической практике Республики Беларусь разработаны методические подходы для выявления доноров гипериммунной противогерпетической плазмы, необходимой для профилактики и терапии герпесвирусных осложнений при различных иммуносупрессивных состояниях.

В результате исследований в образцах сыворотки 1067 доноров установлено наличие противогерпесных антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1 типа у 84,2% доноров, из них у 54,4% доноров выявлен высокий уровнь антител (при титре более 1:1280); антитела класса IgG к вирусу простого герпеса 2 типа выявлены у 51,9% доноров, из них у 33,1% доноров определялся высокий уровень данных антител (при титре более 1:320) (таблица). Следовательно, процент встречаемости антител класса IgG к вирусу простого герпеса 2 типа у обследованных доноров был ниже на 32,3% по сравнению с уровнем антител класса IgG к вирусу простого герпеса 1 типа. Антитела класса IgG к цитомегаловирусу выявлены у 81,1% доноров, из них у 50,9% доноров отмечен высокий уровень антител (содержание более 2 Е/мл сыворотки). У 14,1–48,1% из числа обследуемых доноров при выявлении антител класса IgG к исследуемым серотипам вируса герпеса отмечен отрицательный результат.

У доноров установлен высокий процент встречаемости антител класса IgG к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр (выявлены у 96,0% из 900 обследованных доноров), из них у 70,3% доноров выявлен высокий уровень данных антител (более 2,0 опт. ед.). При этом необходимо отметить практически полное отсутствие у доноров антител класса IgG к раннему антигену вируса Эпштейна–Барр (выявлены у 7 (4,2%) из 167 обследованных доноров), что позволяет предположить отсутствие недавнего инфицирования данным серотипом вируса герпеса обследуемых доноров. Антитела класса IgG к вирусу ветряной оспы (опоясывающего герпеса) были выявлены у 83,3% доноров, из них у 48,9% доноров определялся высокий уровень данных антител (более 2,0 опт. ед.).

Таблица — Уровень противогерпесных антител класса IgG у доноров крови и ее компонентов

Противогерпесные антитела класса IgG	Количество положительных результатов	Количество отрицательных результатов
К вирусу простого герпеса 1 типа	84,2% (749/890), из них 54,4% (484/890) доноров с высоким уровнем антител	14,1% (126/890); у 1,7% (15/890) — сомнительный результат
К вирусу простого герпеса 2 типа	51,9% (467/900), из них 33,1% (298/900) доноров с высоким уровнем антител	48,1% (433/900)
К цитомегаловирусу	81,1% (854/1053), из них 50,9% (536/1053) доноров с высоким уровнем антител	18,9% (199/1053)
К раннему антигену вируса Эпштейна–Барр	4,2% (7/167)	95,8% (160/167)
К капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр	96,0% (864/900), из них 70,3% (633/900) доноров с высоким уровнем антител	4,0% (36/900)
К вирусу ветряной оспы (опоясывающего герпеса)	83,3% (75/90), из них 48,9% (44/90) доноров с высоким уровнем антител	16,7% (15/90)

Таким образом, исследования позволили установить у каждого из обследованных доноров неоднородность распределения противогерпесных антител класса IgG по качественному (к различным серотипам вируса герпеса) и количественному (наличие высоких и низких титров) составу.

Методом ИФА дополнительно исследована длительность поддержания высокого уровня противогерпесных антител класса IgG в образцах сыворотки крови доноров (n = 90), взятых повторно через 9–12 мес. после первого исследования. Установлено, что практически у всех обследованных доноров уровень противогерпесных антител класса IgG соответствовал ранее выявленным высоким значениям: к вирусу простого герпеса 1 типа определены титры 1540±40 (0 мес.) и 1569±42 (на 9–12 мес.), к вирусу простого герпеса 2 типа — титры 511±33 (0 мес.) и 410±39 (на 9–12 мес.), к цитомегаловирусу — 3,7±0,2 Е/мл (0 мес.) и 3,3±0,1 Е/мл (на 9–12 мес.), к капсидному антигену вируса Эпштейна–Барр — 3,0±0,07 опт. ед. (0 мес.) и 3,1±0,08 опт. ед. (на 9–12 мес.). Полученные данные подтверждают пожизненное поддержание данных антител у здоровых людей после перенесенного первичного инфицирования.

Проведена оценка инфекционной опасности донаций плазмы по передаче герпесвирусной инфекции у доноров с выявленными высоким уровнем противогерпесных антител к вирусу простого герпеса, цитомегаловирусу и к вирусу Эпштейна–Барр. Выявление ДНК данных вирусов проводилось методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». В результате обследования 180 образцов сыворотки (плазмы) от 90 доноров с высоким уровнем антител класса IgG к вирусам простого герпеса, цитомегаловирусу и к вирусу Эпштейна–Барр данные вирусы в сыворотке (плазме) крови обнаружены не были, что позволяет прогнозировать инфекционную безопасность сырья (гипериммунной противогерпетической плазмы) в плане передачи герпесвирусной инфекции.

В рамках разработки организационно-методических подходов к отбору донорской гипериммунной противогерпетической плазмы в Республике Беларусь были разработаны «Анкета донора крови и ее компонентов для комплектования групп доноров гипериммунной противогерпетической плазмы», «Форма учета доноров гипериммунной противогерпетической плазмы» с учетом действующего постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 19.05.2011 № 37 [6]. Данная форма включает анкету донора, оценку клинико-лабораторных показателей, серологическое обследование доноров на наличие противогерпесных антител класса IgG методом ИФА, перечень показателей, необходимых для отбора доноров гипериммунной противогерпетической плазмы, протестированных на наличие противогерпесных антител, компьютерную базу данных. Разработан «Алгоритм отбора доноров гипериммунной противогерпетической плазмы» (рисунок). Данный алгоритм включает следующие этапы: анкетирование донора; обследование сыворотки донора на противогерпесные антитела класса IgG методом ИФА при отсутствии отвода по несоответствию при анкетировании донора; учет результатов ИФА; отбор доноров с высоким уровнем противогерпесных антител при «положительном» результате ИФА (в 5 раз и более определяемого тест-системой критического (порогового) уровня чувствительности) для включения их в базу данных гипериммунной противогерпетической плазмы.

Из числа обследованных отобрано 36,3% (387/1067) доноров крови и ее компонентов РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий с высокими титрами противогерпесных антител класса IgG для включения в действующую компьютерную базу данных «Автоматизированная информационная система (АИС) "ДОНОР"» с целью комплектования группы доноров гипериммунной противогерпетической плазмы.

Для этого в электронную «КАРТУ ДОНОРА» данной системы в графу «иммунные антитела» внесена информация о специфичности плазмы: «гипериммунная к герпесу». Данные исследования уровня противогерпесных антител также занесены в «Медицинскую карту активного донора» (форма № 402/у-07).

Рисунок — Алгоритм отбора доноров гипериммунной противогерпетической плазмы

На основании исследований был разработан необходимый для организаций службы крови Республики Беларусь инструктивно-методический документ — «Инструкция по отбору доноров крови и ее компонентов для получения гипериммунной противогерпетической плазмы», утвержденная приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 210 от 18.03.2016. Инструкция предусматривает создание базы данных доноров крови и компонентов крови Республики Беларусь с высокими титрами противогерпесных антител, что будет способствовать получению гипериммунной противогерпетической плазмы в качестве сырья для производства специфического противогерпетического иммуноглобулина с целью повышения эффективности профилактики и лечения герпесвирусных осложнений как в трансплантологии, так и в других областях медицины. Данная инструкция внедрена в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (акт внедрения от 16.06.2016).

Работа выполнена в рамках задания «Разработать и внедрить организационно-методическую программу отбора доноров для получения гипериммунной противогерпетической плазмы» ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики» подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина».

Заключение. Методом ИФА у 1067 доноров РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий установлена неоднородность по качественному (к различным серотипам вируса герпеса) и количественному (наличие высоких и низких титров) составу при определении противогерпесных антител к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов, к цитомегаловирусу, к раннему и капсидному антигенам вируса Эпштейна–Барр, к вирусу ветряной оспы (опоясывающего герпеса). Установлено длительное поддержание высоких титров противогерпесных антител класса IgG у обследованных доноров.

У доноров с высокими титрами антител класса IgG к вирусам простого герпеса, цитомегаловирусу и к вирусу Эпштейна–Барр данные вирусы в сыворотке (плазме) крови не были обнаружены методом ПЦР в режиме «реального времени», что позволяет прогнозировать инфекционную безопасность сырья (гипериммунной противогерпетической плазмы) в плане передачи герпесвирусной инфекции.

Разработана и утверждена приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 210 от 18.03.2016 «Инструкция по отбору доноров крови и ее компонентов для получения гипериммунной противогерпетической плазмы».

В РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий создана база данных доноров крови и ее компонентов с высокими титрами противогерпесных антител, в которую на данный момент вошли 36,3% (387) из 1067 обследованных доноров с высокими титрами противогерпесных антител класса IgG.

Литература

1. Викулов, Г.Х. Герпесвирусные инфекции человека в новом тысячелетии: классификация, эпидемиология и медико-социальное значение / Г.Х. Викулов // Эпидемиология и инфекц. болезни. — 2014. — № 3. — С. 35-40.
2. Герпес [Электронный ресурс]. — 2000. — Режим доступа: http://www.mariamm.ru/docprint.htm?id=104. — Дата доступа: 26.08.2014.
3. Whitley, R.J. Herpes simplex virus infections / R.J. Whitley, B. Roizman // Lancet. — 2001. — Vol. 357, № 9267. — P. 1513–1518.
4. Гранитов, Р.М. Герпесвирусная инфекция / Р.М. Гранитов. — Н. Новгород, 2001. — 92 с.
5. Покровская, М.С. Герпесвирусные инфекции: краткий обзор литературы [Электронный ресурс] / М.С. Покровская. — 2014. — Режим доступа: http://lages-lab.ru/article_4.htm. — Дата доступа: 16.04.2014.
6. Об установлении перечня заболеваний и состояний, при которых сдача крови и ее компонентов противопоказана, и утверждении Инструкции о порядке медицинского осмотра доноров крови и ее компонентов, Инструкции о порядке учета доноров крови и ее компонентов: постановление М-ва здравоохр. Респ. Беларусь от 19.05.2011 № 37 // Нац. реестр прав. актов Респ. Беларусь. — 2011. — № 69. — 8/23751.

DEVELOPMENT OF ORGANIZATIONAL AND METHODICAL ACTIVITIES FOR THE SELECTION OF HYPERIMMUNE ANTIHERPES PLASMA DONORS

Peshnyak J.V., Dashkevich E.V., Soshko S.V., Maevskaya O.L., Korzhel T.S.

State Institution "Republican Science & Practice Centre for Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus

Methodical approaches for donor hyperimmune antiherpes plasma have been developed for the first time in transfusion practice of the Republic Belarus. Serum of 1067 donors was examined by ELISA for the presence of IgG antibodies to clinically significant types of herpes virus. According to this 36.3% of the surveyed donors with high antiherpes antibody titers have been included in the database of donors of hyperimmune antiherpes plasma.

Keywords: herpesvirus infection, blood and its component donors, antiherpes antibody titers, hyperimmune antiherpes plasma.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ТЕРАПИИ ОСТРОГО ПОЧЕЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Пилотович В.С.[1], Зафранская М.М.[1], Комиссаров К.С.[1], Юркевич М.Ю.[1], Нижегородова Д.Б.[1], Иванчик Г.И.[1], Дмитриева М.В.[2], Юрага Т.М.[1]

[1]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

[2]Учреждение здравоохранения «Городское клиническое патологоанатомическое бюро», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Создана экспериментальная модель ишемически-реперфузионного повреждения почечной ткани, соответствующая клинико-лабораторной и морфологической картине острого почечного повреждения у человека. Внутривенное введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) или мононуклеаров (МоКМ) костного мозга лабораторным крысам через 24 ч после моделирования острого почечного повреждения способствует быстрому (к 4–8-м сут) снижению степени выраженности постишемических функциональных нарушений почек: повышается суточный диурез, стабилизируется концентрация сывороточного креатинина и уровень его экскреции с мочой, нормализуются значения скорости клубочковой фильтрации. Согласно данным экспериментального исследования, системное введение как МСК, так и МоКМ предотвращает развитие тяжелых нарушений гомеостаза, возникающих в результате ишемического повреждения почек, и препятствует переходу острого состояния в хроническую почечную недостаточность, требующую применения высокозатратной заместительной почечной терапии.

Ключевые слова: острое почечное повреждение, экспериментальная модель, мезенхимальные стволовые клетки, мононуклеары костного мозга.

Введение. Несмотря на совершенствование методов интенсивного лечения, а также применение современных диализных технологий, острое почечное повреждение (ОПП) все еще сопровождается высоким уровнем летальности, достигающим 50–70% и выше [1]. В связи с этим большое значение в клинической нефрологии занимает проблема разработки новых высокоэффективных подходов к терапии, направленных на повышение возможностей регенерации поврежденных почечных структур и поддержание гомеостаза организма в период резкого снижения функции почек.

Одним из наиболее активно изучаемых направлений в лечении ОПП является применением культур мезенхимальных стволовых костного мозга, которые, согласно данным ряда исследований, способны участвовать в регенерации тубулярных эпителиальных клеток, способствовать неоваскуляризации и восстановлению эндотелиальных клеток, а также проявлять выраженные противовоспалительные свойства [2]. Иммуномодулирующий эффект МСК реализуется посредством межклеточного взаимодействия с клетками врожденного и адаптивного иммунитета и/или посредством продукции

различных факторов. МСК обладают способностью ингибировать продукцию провоспалительных цитокинов, стимулировать синтез противовоспалительных цитокинов и индуцировать изменения хемотаксических свойств лимфоцитов за счет влияния на экспрессию их хемокиновых рецепторов [3].

Однако лимитирующим фактором, ограничивающим возможности использования МСК при состояниях с выраженным воспалительным компонентом, к которым относится не только ОПП, является длительное (до нескольких недель) время культивирования клеток для получения аутологичного трансплантата. Это, в свою очередь, не позволяет использовать клеточные культуры МСК в период, когда имеется «окно» терапевтической эффективности. Кроме того, некоторыми авторами показано, что в процессе культивирования изменяется экспрессия генов МСК, снижается дифференцировочный потенциал и уровень экспрессия ряда хемокиновых рецепторов, в частности CXCR4, который ответственен за хоуминг клеток *in vivo* [4].

В связи с этим в качестве перспективной альтернативы может выступать использование нефракционированных мононуклеаров костного мозга (МоКМ) — гетерогенной клеточной фракции, включающей как МСК, так и другие типы клеток. МоКМ характеризуются меньшими размерами по сравнению с МСК, выделение фракции МоКМ и подготовка клеток к трансплантации занимает от 1,5 до 6 ч и не требует предварительного культивирования, что позволяет осуществлять своевременное введение пациенту в острой фазе заболевания и тем самым предотвратить развитие отдаленных последствий ишемического поражения органов. Известно, что трансплантированные МоКМ мигрируют в очаг воспаления, секретируют цитокины и трофические факторы, такие как VEGF (эндотелиальный фактор роста сосудов), FGF (фактор роста фибробластов), играющие основную роль в процессе неоваскуляризации ткани [5, 6].

Однако до сих пор не установлены наиболее оптимальный тип клеток, технология их подготовки, доза и место введения, кроме того имеются лишь единичные исследования, посвященные комплексному клинико-лабораторному и морфологическому анализу эффективности клеточной терапии при развитии острого почечного повреждения.

Цель работы — оценка клинико-лабораторной и морфологической эффективности системного введения МоКМ или МСК лабораторным животным с экспериментальным ОПП.

Материалы и методы. Исследования проводили с учетом положений Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в научных целях (Страсбург, 02.01.1991).

Лабораторные животные были разделены на четыре группы: интактные (здоровые) животные (n = 15) и крысы с экспериментальной моделью ОПП, которым внутривенно вводили физиологический раствор (плацебо, n = 13), МСК костного мозга (n = 15) или нефракционированные МоКМ (n = 15). Введение клеток в хвостовую вену осуществляли на первые сут после моделирования в концентрациях 1×10^6 МСК 2–3 пассажей или 1×10^7 МоКМ на кг веса. По истечении 4; 8 и 15 сут после моделирования ОПП животных выводили из эксперимента путем декапитации на фоне тиопенталового наркоза (1 г на 1 кг массы тела).

Экспериментальное моделирование ОПП. Моделирование ишемически-реперфузионного повреждения почечной ткани включало анестезирование лабораторных животных раствором тиопентала натрия (1 г/кг) с последующей срединной лапаратомией, выделением сосудистых ножек обоих почек и их механическим пережатием в течение 50 мин. По истечении периода формирования тотальной ишемии зажимы снимались и и рана послойно ушивалась.

Биохимические методы. Концентрации креатинина и мочевины определяли с использованием, соответственно, цветной реакции Яффе и уреазного колориметрического метода (тест-системы производства НТПК «Анализ Х», РБ). Значение скорости клубочковой фильтрации (СКФ) рассчитывали с учетом сывороточной концентрации креатинина по формуле Реберга–Тареева. Общие свойства мочи (наличие эритроцитов, лейкоцитов, относительная плотность, pH, обнаружение глюкозы, кетоновых тел и т. д.) определяли полуколичественно с помощью диагностических тест-полосок «ФАН» («Плива-Лахема», Чехия).

Морфологические методы. Парафиновые срезы почечной ткани толщиной 3 мкм изготавливали по общепринятой методике на ротационном микротоме MicromHM 340E с последующей окраской гематоксилином-эозином и оценкой гистологической картины на световом микроскопе Olympus BX 51 (Япония).

Выделение МоКМ. Суспензию костного мозга получали из больших берцовых костей лабораторных животных. В стерильных условиях удаляли эпифизы костей, а диафизы промывали фосфатно-буферным раствором («Sigma», Германия). Полученную костномозговую суспензию наслаивали на градиент плотности фиколл-верографина (ρ = 1,088 г/см^3, «Sigma», Германия) и центрифугировали в течение 30 мин при 1500 об./мин. Образовавшееся интерфазное кольцо отмывали центрифугированием (10 мин, 1500 об./мин) в фосфатно-буферном растворе.

Культивирование МСК. Для получения МСК полученную клеточную суспензию мононуклеаров высевали на адгезивный пластик в среду DMEM («Lonza», Бельгия), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 100 Ед/мл бензилпенициллин натрия, 100 Ед/мл стрептомицин сульфата, 100 Ед/мл неомицин сульфата («Gibco», Великобритания). Культивирование осуществляли при 37°С в условиях 5% CO_2. По достижении состояния конфлюэнтности для диссоциации адгезивных клеток проводили инкубацию культур с 0,25% раствором трипсин-этилендиаминтетрауксусной кислоты. Мониторинг клеточных культур и визуализацию роста *in vitro* осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Axiovert 200 («Carl Zeiss», Германия). Жизнеспособность клеточных культур варьировала от 94 до 99%.

Метод витального окрашивания клеточных культур PKH26. Перед введением лабораторным животным МСК и МоСКМ окрашивали витальным липофильным красителем PKH26 («Sigma», Германия) по протоколу фирмы-изготовителя.

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ данных проводили с использованием стандартного пакета прикладной программы Statistica 8.0. Результаты представляли в виде медианы, нижнего и верхнего квартиля (25÷75-й процентили). Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при значении $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. *Распределение МСК и МоКМ при их системном введении лабораторным животным с ОПП.* При системном введении PKH26-окрашенных МСК или МоКМ интактным (здоровым) лабораторным крысам

в незначительном количестве клетки выявлялись в легких, печени, селезенке, при отсутствии в почечной ткани. При введении клеток животным с экспериментальной моделью ОПП значительно повышалось количество как МСК, так и МоКМ, локализованных в селезенке, при этом в поврежденной почечной ткани клетки также не обнаруживались.

Данные о том, что в условиях развития экспериментального ОПП экзогенные МСК и МоКМ обнаруживаются в почках в единичных количествах, дали основание предполагать, что базальная мембрана почечных клубочков может быть основным препятствием между введенными клетками и поврежденной тканью. Кроме того, согласно данным литературы, не более 0,1% МСК способны мигрировать в почки и дифференцироваться *in vivo* в тубулярные эпителиальные клетки [3]. Значительное увеличение количества МСК и МоКМ в селезенке экспериментальных животных с ОПП и, соответственно, их непосредственный контакт с иммунокомпетентными клетками данного лимфоидного органа обусловливает влияние МСК/МоКМ на развитие иммуновоспалительной реакции. Установлено, что как МСК, так и МоКМ обладают выраженной иммуносупрессивной активностью в отношении митоген-активированных спленоцитов интактных животных и животных с ОПП [5].

Влияние системного введения МСК и МоКМ на биохимические показатели лабораторных животных с ОПП. На 1 -е сут после моделирования ОПП в моче обнаруживались эритроциты (0–10 клеток/мкл) и лейкоциты (от 15 до 125 клеток/мкл), что свидетельствует о развитии воспалительной реакции на гибель клеток почечных клубочков. Однако во всех исследуемых группах данные изменения полностью исчезали к 4-м суткам наблюдения. Слабо выраженная ренальная протеинурия на 4-е сут наблюдения выявлялась только в группе, получавшей плацебо (300 (200÷350) мг/сут), тогда как введение МСК или МоКМ полностью нивелировало потери белка с мочой (таблица).

Таблица — Изменение биохимических показателей крови и мочи крыс с ОПП после введения МСК или МоКМ

Показатель, ед. изм.	1	2	3	Уровень значимости
	ОПП + плацебо	ОПП + МСК	ОПП + МоКМ	
4-е сут после моделирования				
Мочевина крови, ммоль/л	6,0 (4,7÷7,6)	9,3 (4,5÷14,1)	9,5 (8,0÷17,7)	-
Креатинин крови, мкмоль/л	65,2 (48,9÷81,2)	64,8 (56,3÷73,3)	71,7 (60,9÷84,5)	-
Суточный диурез, мл	5,5 (4,5÷8,0)	9,5 (9,2÷10,0)	30,0 (21,5÷35,0)	$p_{1-3} = 0,02$ $p_{1-2} = 0,04$
СКФ, мл/мин	0,48 (0,44÷0,59)	0,69 (0,62÷0,76)	0,85 (0,71÷0,97)	$p_{1-2} = 0,01$ $p_{1-3}<0,01$
Мочевина, ммоль/сут	3,8 (3,2÷8,8)	9,1 (4,4÷13,8)	13,9 (9,4÷30,6)	$p_{1-2} = 0,01$ $p_{1-3} = 0,01$
Креатинин, мкмоль/сут	50,2 (40,0÷60,0)	63,0 (61,3÷70,5)	80,0 (71,6÷100,0)	$p_{1-2} = 0,04$ $p_{1-3}<0,01$
8-е сут после моделирования				
Мочевина крови, ммоль/л	8,2 (7,2÷10,7)	6,8 (5,1÷7,2)	7,2 (6,3÷8,7)	–
Креатинин крови, мкмоль/л	58,9 (50,9÷66,1)	44,8 (39,0÷46,1)	49,8 (45,4÷51,9)	$p_{1-3} = 0,03$ $p_{1-2} = 0,02$
Суточный диурез, мл	8,5 (7,5÷9,0)	8,0 (8,0÷10,0)	8,4 (7,1÷13,5)	–
СКФ, мл/мин	0,73 (0,55÷0,82)	0,99 (0,91÷1,28)	1,01 (0,96÷1,29)	$p_{1-2} = 0,01$ $p_{1-3} = 0,01$
Мочевина, ммоль/сут	5,19 (4,46÷6,27)	6,22 (4,07÷7,19)	7,01 (4,22÷10,84)	–
Креатинин, мкмоль/сут	62,4 (54,3÷65,0)	64,0 (61,3÷71,3)	81,2(56,5÷100,2)	–
15-е сут после моделирования				
Мочевина крови, ммоль/л	7,3 (3,9÷8,7)	7,0 (5,9÷7,6)	6,2 (5,8÷6,6)	-
Креатинин крови, мкмоль/л	46,6 (36,9÷55,4)	34,2 (32,5÷37,8)	35,3 (32,7÷38,6)	$p_{1-2} = 0,02$ $p_{1-3} = 0,03$
Суточный диурез, мл	9,0 (6,0÷10,0)	9,0 (6,0÷12,0)	6,0 (4,0÷7,0)	–
СКФ, мл/мин	1,25 (0,80÷2,13)	1,21 (1,06÷1,36)	1,05 (0,72÷1,38)	–
Мочевина, ммоль/сут	6,66 (6,07÷10,79)	5,83 (5,77÷5,89)	4,61 (3,92÷5,29)	$p_{1-2} = 0,01$ $p_{1-3} = 0,01$
Креатинин, мкмоль/сут	80,2 (61,7÷110,0)	75,4 (60,0÷80,5)	67,5 (59,3÷81,4)	–

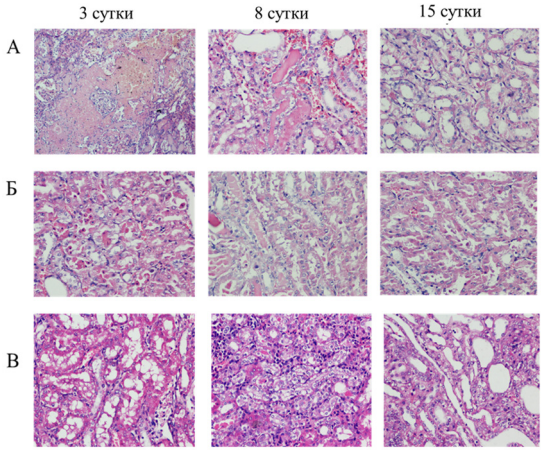
Согласно полученным данным, на 4-е сут послеоперационного периода в случае применения плацебо обнаруживалась олигоурическая стадия ОПП, сопровождающаяся серьезными нарушениями гемостаза. Пик уремической инток-

сикации в данной экспериментальной группе приходился на 4–8-е сут. Так, по сравнению с показателями, характерными для интактных животных (46,5 (38,0÷49,5) мкмоль/л), у крыс с ОПП, получавших плацебо, наблюдалось статистически значимое увеличение креатинина крови на 4 (65,2 (48,9÷81,2) мкмоль/л) и 8-е (58,9 (50,9÷66,1) мкмоль/л) сут послеоперационного периода. В данной группе животных также отмечалось снижение уровня экскреции креатинина с мочой на 4-е сут (50,2 (40,0÷60,0) мкмоль/сут vs. 72,4 (54,3÷85,0) мкмоль/сут у интактных крыс). Статистически значимое снижение СКФ в группе, получавшей плацебо, наблюдалось как на 4-е сут (0,48 (0,44÷0,59) мл/мин), так и на 8-е сут (0,73 (0,55÷0,82) мл/ мин. vs. 0,94 (0,88÷1,10) мл/мин. у интактных крыс). Развитие в группе животных с ОПП, получавших плацебо, на 4–8-е сут наблюдения олигоурии, гиперкреатининемии на фоне гипокреатининурии и низких значений СКФ отражает тяжесть течение ОПП и свидетельствует о наличии выраженных нарушений почечных функций.

Внутривенное введение животным с экспериментальной ОПП МСК значительно ускоряло репаративные и регенеративные процессы в почечной ткани (таблица), что проявлялось выявлением на 4-е сут полиурической (восстановительной) стадии, сопровождающейся по сравнению с интактными животными статистически значимым повышением суточного диуреза и увеличением суточной экскреции креатинина. Кроме того, на 4-е сут послеоперационного периода в отличие от группы животных, получавших плацебо, введение МСК способствовало значимому росту СКФ, достигающему значений нормы к 8-м сут. Статистически значимое снижение уровня креатининемии в животных с ОПН, получавших терапию, также отмечалось на 8-е сут наблюдения.

Системное введении МоКМ лабораторным животным с экспериментальным ОПП аналогично МСК способствовало восстановлению нормального функционирования почечной ткани. Уже на 4-е сут после моделирования в случае введения мононуклеаров костного мозга наблюдалось значительное повышение суточного диуреза до 30,0 (21,5÷35,0) мл и увеличение экскреции креатинина. Снижение уровня сывороточного креатинина в данной группе животных отмечалось на 8-е сут послеоперационного периода. В отличие от животных с ОПП, которым осуществлялось введение МСК, терапия МоКМ приводило к более быстрому восстановлению значений СКФ, достигающих нормы уже на 4-е сут наблюдения.

Влияние системного введения МСК и МоКМ на морфологические показатели лабораторных животных с ОПП. У интактных животных наблюдалась нормальная гистологическая картина строения коркового вещества почек, тогда как после пережатия сосудистых ножек обоих почек развивалась типичная картина острого тубулярного некроза, характеризующаяся дистрофическими (некротическими) изменениями эпителиальных клеток тубулярных канальцев (рисунок А).



А — дистрофические и некротические изменения эпителия канальцев у животных, получавших плацебо. К 15-м сут наблюдения появились признаки регенерации отдельных канальцев на фоне общей тубулярной дистрофии; Б — дистрофические диффузные изменения тубулярного эпителия на 4-е сут и признаки восстановления структуры канальцев на 8 и 15-е сут у животных с ОПП после введения МСК; В — восстановление структуры клеток тубулярного эпителия на 4-е сут после ишемии у животных с ОПП после введения МоКМ

Рисунок — Патоморфологические изменения почечной ткани лабораторных животных с ОПП после введения плацебо (А), МСК (Б) или МоКМ (В) (окраска гематоксилин-эозином, ув. 200)

Системное введение клеток в первые сутки после моделирования ОПП статистически значимо снижало степень выраженности лейкоцитарной инфильтрации почечной ткани и способствовало восстановлению разрушенных эпителиальных клеток за счет камбиальных элементов (рисунки Б и В). Суммарный показатель, рассчитанный по модифицированной шкале Mc Whinie [7] и отражающий степень морфологической деструкции почек, на 4-е сут после моделирования ОПП составлял 100,0 (52,0÷119,0) усл. ед. в группе, получавшей плацебо, и статистически значимо снижался при введении МСК (55,0 (37,0÷60,0) усл. ед.) или МоКМ (40,0 (17,0÷47,0) усл. ед.).

Заключение. Экспериментальная модель ишемически-реперфузионного повреждения почечной ткани, заключающаяся в механическом пережатии сосудистых ножек обеих почек в течение 50 мин, соответствует клинико-лабораторной и морфологической картине ОПП у человека и характеризуется изменением суточного диуреза (олигоурией), повышением концентрации сывороточного креатинина, снижением уровня креатинина мочи, низкими значениями скорости клубочковой фильтрации и признаками острого тубулярного некроза.

Системное введение МСК или МоКМ лабораторным крысам в течение суток после моделирования ОПП способствует быстрому (к 4–8-м сут) снижению степени выраженности постишемических функциональных нарушений почек:

повышается суточный диурез, стабилизируется концентрация сывороточного креатинина и уровень его экскреции с мочой, нормализуются значения скорости клубочковой фильтрации. Кроме того, под влиянием клеточной терапии наблюдается снижение степени дистрофических и некробиотических изменений клеток канальцев, наряду с активацией структурной регенерации ищемизированной почечной ткани.

Таким образом, системное введение как МСК, так и МоКМ оказывает выраженное нефропротективное и регенеративное действия, что обеспечивает нормальное функционирование почечного аппарата и поддерживает стабильный гомеостаз после перенесенного ишемического повреждения почек. При этом использование МоКМ в терапии острых состояний, к которым относится и ОПП, имеет ряд преимуществ, связанных прежде всего с возможностью раннего начала аутологичной клеточной терапии. Учитывая высокий уровень летальность ОПП, достигающий 50–70% и выше, а также необходимость в ряде случае применения дорогостоящей заместительной терапии, представленный способ является новым высокоэффективным подходом к терапии данной патологии.

Литература

1 Non-special management of acute renal failure / P.E. Steven [et al.] // QJM. — 2011. — Vol. 94, № 10. — P. 533–540.

2. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure / M. Morigi [et al.] // J. Am. Soc. Nephrol. — 2004. — Vol. 15, № 7. — P. 1794–1804.

3 Mesenchymal stem cells attenuate ischemic acute kidney injury by inducing regulatory T cells through splenocyte interactions / J. Hu [et al.] // Kidney Int. — 2013. — Vol. 84, № 3. — P. 521–531.

4 Шахпазян, Н.К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н.К. Шахпазян, Т.А. Астрелина, М.В. Яковлева // Клеточная транспланталогия и тканевая инженерия. — 2012. — Т. VII, № 1. — С. 23–32.

5 Влияние мононуклеаров костного мозга на пролиферацию спленоцитов крыс с острой ишемической нефропатией / М.М. Зафранская [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. — 2015. — № 4. — С. 27–32.

6 Bone marrow mononuclear cells attenuate interstitial fibrosis and stimulate the repair of tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstrucrion / A.L. Borreira [et al.] // Cell Physiol. Bichem. — 2009. — Vol. 24, № 5–6. — P. 585–594.

7 McWhinnie, D.L. Morphometric analysis of cellular infiltration assessed by monoclonal antibody labeling in sequential human renal allograft biopsies / D.L. McWhinnie // Transplantation. — 1986. — Vol. 42, № 4. — P. 352–358.

STEM-CELL TECHNOLOGY FOR TREATMENY OF ACUTE RENAL FAILURE (EXPERIMENTAL STUDY)

Pilotovich V.S.[1], Zafranskaya M.M.[1], Komissarov K.S.[1], Yurkevich M.Yu.[1], Nizhegorodova D.B.[1], Ivanchik G.I.[1], Dmitrieva M.V.[2], Yuraga T.M.[1]

[1]State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus;
[2]Institution of Health "City Clinical Pathologoanatomic Bureau", Minsk, Republic of Belarus

Renal ischemia-reperfusion leads to acute kidney injury, a major kidney disease associated with an increasing prevalence and high mortality rates. An experimental model of ischemia-reperfusion injury of the kidneys consists in bilateral renal pedicle clamping for 50 minutes and correspond to clinical laboratory and morphological picture of acute kidney damage in humans. Systemic administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells or mononuclear cells improve renal functional and contribute to epithelial cells regeneration after acute kidney damage modeling. Stem cells treatment enhance daily urine as well as stabilize serum creatinine concentration, level of creatinine excretion and values of glomerular filtration rate.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РИСКА НА ЧАСТОТУ РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВОВ В ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Прудников Д.В., Исайкина Я.И., Минаковская Н.В., Алейникова О.В.

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Рецидив основного заболевания наблюдается у 20–25% пациентов с острыми лекозами после аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток (ТГСК) от HLA — идентичного сиблинга или от неродственного донора. Было изучено влияние следующих факторов: диагноз; наличие молекулярно-генетических маркеров у реципиентов; количество предшествующих рецидивов; включение в режим кондиционирования тотального облучения тела; наличие или отсутствие острой реакции «трансплантат против хозяина» (острой РТПХ); параметры трансплантата; источник стволовых клеток; HLA совместимость донора и реципиента; родство донора и реципиента; пол и возраст донора и реципиента на момент трансплантации; наличие KIR-аллореактивности NK-клеток донора.

Установлено, что содержание в аллогенном трансплантате Т-лимфоцитов $<2{,}0\times10^8$/кг для пациентов с ОЛЛ и $<1{,}6\times10^8$/кг для пациентов с ОМЛ, отсутствие у пациентов острой РТПХ 1–4 степени, возраст донора стволовых клеток менее 27 лет и реципиента менее 6 лет являются факторами, ассоциированными с риском развития рецидива после алло-ТГСК.

Ключевые слова: острые лейкозы, факторы риска, рецидивы, $CD3^+$-клетки, острая РТПХ.

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) стала стандартным видом терапии для детей с различными злокачественными и незлокачественными заболеваниями [1]. Рецидивы после ТГСК и сейчас остаются наиболее частой причиной неудачного лечения и смертности, несмотря на успехи, достигнутые в лечении острых лейкозов (ОЛ). Согласно литературным данным, около 20–25% пациентов с ОЛ рецидивируют после трансплантации от HLA-идентичного сиблинга или от неродственного донора [2].

Цель работы — оценка влияния различных факторов на частоту возникновения рецидивов в посттрансплантационном периоде у пациентов с острым лейкозом.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись 102 пациента с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) и острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) с медианой возраста 13,0 (1,2–29,7) лет, 60 (59,0%) из которых были мальчики и 42 (41,0%) — девочки. Всем пациентам в соответствии с протоколом после основного этапа лечения была выполнена аллогенная ТГСК с июня 1998 г. по декабрь 2014 г. Обязательным условием являлось наличие письменного информированного согласия родителей или самих пациентов на проведение трансплантации ГСК. Режимы кондиционирования, примененные при алло-ТГСК для пациентов с ОЛЛ и ОМЛ, отражены в таблице.

Таблица — Группы пациентов: диагноз и режим кондиционирования

Диагноз	Количество пациентов	Режим кондиционирования
ОЛЛ	66	**До 2006 г.** Bu16/ARA-C18/Mel140/±ATG TBI12Cy/ARA-C18/Mel140 Bu16/Thio10/Cyclo150/±ATG Bu16/Cyclo120/ Mel140/±ATG Bu16/Cyclo/±Vp/±ATG **С 2006 г.** **MSD** TBI12Cy/Vp60(>24m) Bu16/Vp40/Cyclo120 (<24m) **MUD** Bu16/Vp40/Cyclo120/ATG60 (<24m) TBI12Cy/Vp60/ATG60(>24m) **Для пациентов с t(4;11)** **MSD** Bu16/Cyclo120/Mel140(<24m) **MUD** Bu16/Cyclo120/Mel140(>24m)
ОМЛ	36	**MSD** TBI12Cy(Bu16)/Cyclo200/±ATG **MUD** TBI12Cy(Bu16)/ Cyclo120/±Thio10/±ATG Treo 36/Cyclo120/±Thio10/ATG60 Treo 42/Cyclo120/Mel140/±ATG

Примечания:
1 — TBI — Total Body Irradiation.
2 — Vp — Vepesid (Etoposide).
3 — Bu — Busulfan.
4 — Cyclo — Cyclophosphamide.
5 — FLU — Fludarabine.
6 — ATG — Anti-Thymocyte Globulin.
7 — Tio — Thiotepa.
8 — Mel — Melphalan.
9 — MSD — match sibling donor.
10 — MUD — match unrelated donor.
11 — MMD — mismatch donor.

Было проанализировано влияние следующих факторов на развитие рецидива после алло-ТГСК: диагноз; наличие молекулярно-генетических маркеров у реципиентов (BCR/ABL, MLL, FLT3/ITD, другие (AML1/ETO, SIL/TAL, E2A/PBX1,DEK/CAN, PML/RARa)); состояние на момент ТГСК (количество предшествующих рецидивов); включение в режим кондиционирования тотального облучения тела (ТОТ); наличие или отсутствие острой РТПХ; параметры трансплантата (число ядросодержащих клеток (ЯСК), $CD34^+$ и $CD3^+$-клеток на 1 кг веса пациента); источник стволовых клеток (костный мозг (КМ), периферические стволовые клетки (ПСК)); HLA-совместимость донора и реципиента; тип трансплантата; пол и возраст как донора, так и реципиента на момент трансплантации; наличие ко-трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК); наличие KIR-аллореактивности NK-клеток донора.

Оценка факторов проводилась путем унивариантного анализа кумулятивной частоты рецидивов (CIR) с использованием программного обеспечения R-statistica. Статистическая значимость для CIR определялась с помощью Grey теста. Статистически значимыми приняты различия при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. Сорока трем пациентам с ОЛ, что составляло 42,0%, была проведена родственная аллогенная ТГСК и 59 (58,0%) неродственная.

Трансплантат ГСК был получен от совместимого или частично несовместимого по системе HLA (Human Leukocyte Antigens) донора. Число пациентов полностью совместимых с донором (10/10 аллель-совместимые) было 81 (79,0%),

частично несовместимых (9/10) — 21 пациент (21,0%): несовместимость по А-локусу была у 7 человек, по В — у 2, по С — у 9, по DQB1 — у 3. Молекулярно-генетические маркеры были найдены у 39 пациентов (38,0%).

Среди 102 включенных в исследование пациентов у 19 (18,6%) развились рецидивы. Частота возникновения рецидивов среди пациентов с ОЛЛ и ОМЛ статистически не отличалась. Так, у пациентов с диагнозом ОЛЛ рецидив развился у 13 человек из 66, что составляло 20%, а с диагнозом ОМЛ — у 6 пациентов из 36, что составляло 17% случаев. Медиана времени возникновения рецидива после алло-ТГСК составляла 241 день (61–1826).

Кумулятивная частота рецидива после проведения алло-ТГСК среди всех пациентов с острым лейкозом составила 19,4±4,1%, кумулятивная частота трансплантационной летальности (TRM) — 23,6±4,2% (рисунок 1).

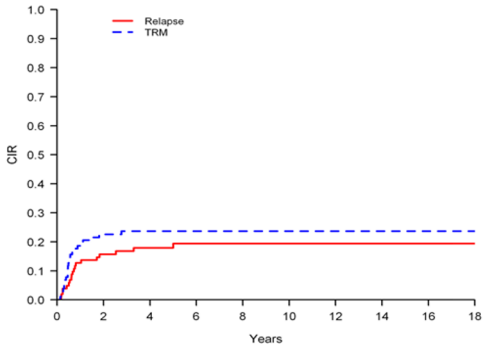


Рисунок 1. — Кумулятивная частота рецидива и TRM для пациентов после алло-ТГСК

С помощью унивариантного анализа показателей, ассоциированных с риском развития рецидива после алло-ТГСК, установлено, что у пациентов с ОЛЛ и ОМЛ статистически достоверно повышают вероятность рецидива такие факторы, как низкое число Т-клеток ($CD3^+$) в трансплантате, отсутствие острой РТПХ 1–4 степени, возраст донора <27 лет и реципиента <6 лет (рисунок 2).

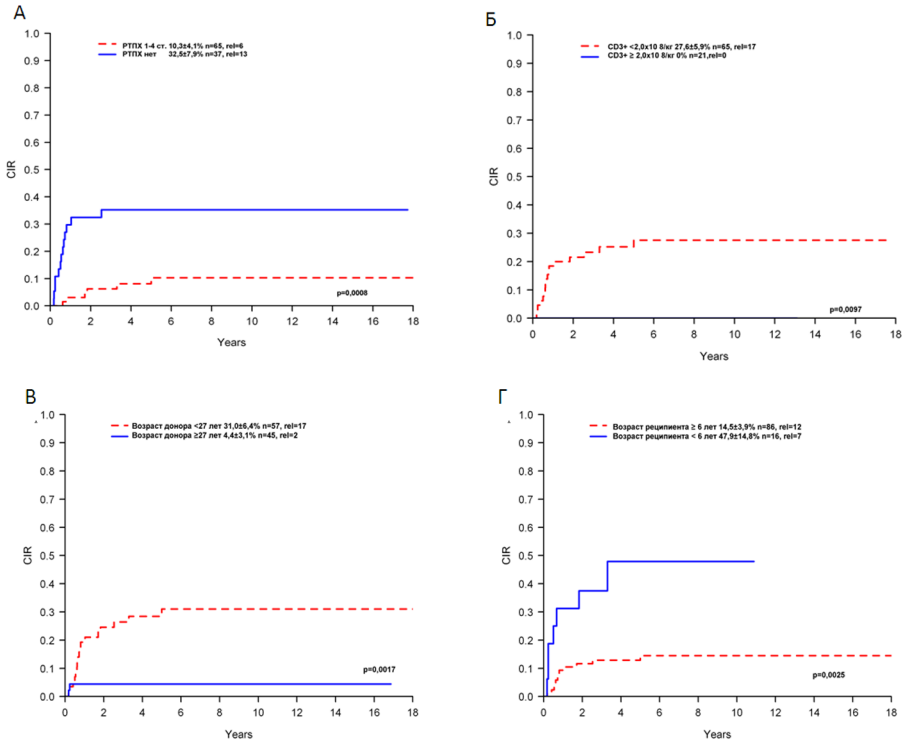


Рисунок 2. — Кумулятивная частота рецидивов после алло ТГСК в зависимости от: А — наличия или отсутствия острой РТПХ, Б — количества $CD3^+$-клеток в трансплантате, В — возраста донора, Г — возраста реципиента

Так, CIR в группе пациентов с ОЛ, имевших острую РТПХ 1–4 степени, составляла 10,3±4,1%, а в группе без РТПХ — 35,3±8,0% (p = 0,0008). У пациентов с содержанием Т-лимфоцитов в трансплантате $\geq 2{,}0\times10^8$/кг рецидивов не наблюдалось, тогда как при количестве Т-лимфоцитов $<2{,}0\times10^8$/кг CIR составила 27,6±5,9%, (p = 0,0097). В группе пациентов, получивших трансплантат от донора ГСК в возрасте 27 лет или старше, CIR составляла 4,4±3,1%, а от донора ГСК

в возрасте младше 27 лет — 31,0±6,4%, (p = 0,0017). У реципиентов в возрасте ≥6 лет рецидивы после алло-ТГСК возникали реже (14,5±3,9%), чем у пациентов в возрасте <6 лет (47,9±14,8%) (p = 0,0025).

Мы провели анализ влияния тех же факторов на частоту развитие рецидива как в группе пациентов с ОЛЛ, так и в группе пациентов с ОМЛ. Достоверной разницы в CIR между группами пациентов с ОЛЛ (20,1±5,0%) и ОМЛ (17,5±6,6%) не выявлено.

Унивариантный анализ факторов в группе пациентов с ОЛЛ показал, что на возникновение рецидива влияет отсутствие у пациента РТПХ, низкое содержание Т-лимфоцитов в трансплантате, возраст пациента <6 лет и донора ГСК < 27 лет. Так, CIR в группе пациентов, развивших острую РТПХ 1–4 степени, составляла 12,2±5,2%, а в группе без РТПХ — 36,4±10,6% (p = 0,0131). У пациентов с содержанием Т-лимфоцитов в трансплантате $\geq 2{,}0\times10^8$/кг рецидивов не наблюдалось, тогда как при количестве Т-лимфоцитов $<2{,}0\times10^8$/кг CIR составила 26,8±7,1%, (p = 0,0463). В группе пациентов с возрастом донора ГСК ≥27 лет CIR была 3,8±3,8%, а при возрасте <27 лет — 30,4±7,5%, (p = 0,0126). У пациентов в возрасте старше 6 лет рецидивы возникали реже (14,1±4,7%), чем у детей младше 6 лет (63,0±22,0%) (p = 0,0030).

Анализ показателей, связанных с риском развития рецидивов после алло-ТГСК у пациентов с ОМЛ, выявил два статистически значимых фактора риска. Мы установили, что чаще рецидивируют пациенты, не развившие острую РТПХ и получившие трансплантат с низким содержанием Т-лимфоцитов. Так, CIR была 5,1±5,1% у пациентов с острой РТПХ 1–4 степени, тогда как у пациентов без РТПХ — 34,0±13,0% (p = 0,0182). Рецидивы отсутствовали у реципиентов, которые получили $\geq 1{,}6\times10^8$/кг Т-лимфоцитов в составе трансплантата, а при количестве Т-лимфоцитов $<1{,}6\times10^8$/кг CIR составила 32,5±11,6% (p = 0,0409).

В нашей работе мы установили, что содержание Т-лимфоцитов в трансплантате $<2{,}0\times10^8$/кг для пациентов с ОЛЛ и $<1{,}6\times10^8$/кг для пациентов с ОМЛ , возраст пациентов младше 6 лет и доноров младше 27 лет должны быть настораживающими факторами, подразумевающими раннее вмешательство в процесс по предупреждению рецидива у пациентов с ОЛ.

Определение порогового значения Т-лимфоцитов в трансплантате, которое ассоциировано с развитием рецидива, особенно важно, т. к. данные по влиянию количества $CD3^+$-клеток при трансплантации от родственного/неродственного донора на частоту рецидивов, общую и безрецидивную выживаемость, острую и/или хроническую РТПХ немногочисленны для взрослых [3, 4] и фактически отсутствуют для детей [5, 6]. Также известно, что присутствующие в трансплантате донорские Т-лимфоциты являются одной из основных причин развития РТПХ после аллогенной ТГСК [7]. Возможность варьировать содержанием в трансплантате Т-лимфоцитов, устанавливая дозу клеток $\geq 2{,}0\times10^8$/кг для пациентов с ОЛЛ и $\geq 1{,}6\times10^8$/кг для пациентов с ОМЛ, может способствовать снижению количества рецидивов после алло-ТГСК через развитие РТПЛ/РТПХ.

Наше исследование с применением унивариантного анализа не выявило достоверного влияния других факторов, а именно, количества предшествующих рецидивов; ТОТ в кондиционировании; источника ГСК; родства, пола и HLA совместимости между донором и реципиентом; содержания в трансплантате ЯСК/кг и $CD34^+$-клеток/кг и наличия KIR-аллореактивности NK-клеток донора на частоту развития рецидивов после алло-ТГСК ни в общей группе пациентов с острыми лейкозами, ни в группе пациентов с ОМЛ или с ОЛЛ.

Заключение. Установлено, что содержание в аллогенном трансплантате Т лимфоцитов $<2{,}0\times10^8$/кг для пациентов с ОЛЛ и $<1{,}6\times10^8$/кг для пациентов с ОМЛ, отсутствие у пациента острой РТПХ 1–4 степени, возраст донора стволовых клеток менее 27 лет и реципиента менее 6 лет являются факторами, ассоциированными с риском развития рецидива после алло-ТГСК.

Литература

1. Haematopoietic stem cell transplantation trends in children over the last three decades: a survey by the paediatric diseases working party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation / M. Miano [et al.] // Bone Marrow Transplant. — 2007. — Vol. 39, № 2. — P. 89–99.

2. Stem-cell transplantation in children with acute lymphoblastic leukemia: a prospective international multicenter trial comparing sibling donors with matched unrelated donors —The ALL-SCT-BFM-2003 Trial / C. Peters [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2003. — Vol. 33, № 11. — P. 1265–1273.

3. Impact of graft cell dose on transplant outcomes following unrelated donor allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Higher $CD34^+$ cell doses are associated with decreased relapse rates / R. Nakamura [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2008. — Vol. 14, № 4. — P. 449–457.

4. Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher $CD34^+$ cell dose / M.A. Pulsipher [et al.] // Blood. — 2009. — Vol. 114, № 3. — P. 2606–2616.

5. Graft versus host disease prophylaxis with low-dose cyclosporine-A reduces the risk of relapse in children with acute leukemia given HLA-identical sibling bone marrow transplantation: results of a randomized trial / F. Locatelli [et al.] // Blood. — 2000. — Vol. 95, № 5. — P. 1572–1579.

6. T-cell depletion in pediatric stem cell transplantation / C. Booth [et al.] // Clin. Exp. Immunol. — 2013. — Vol. 172, № 2. — P. 139–147.

7. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes / H. Nancy [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. — 2010. — Vol. 16, № 2. — P. 253–262.

IMPACT OF RISK FACTORS ON CUMULATIVE INCIDENCE OF RELAPSE AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH ACUTE LEUKEMIA

Prudnikau D.V., Isaikina Ya.I., Minakovskaya N.V., Aleinikova O.V.

State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus

More then 20–25% of patients with acute leukemia underwent with transplantation of HSC from HLA-identical sibling or unrelated donor had relapse. Therefore the purpose of this study was to evaluate the influence of different factors on risk of post-

transplantation relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloblastic leukemia (AML). Diagnosis, molecular-genetic markers of recipients, the number of relapses before transplantation, inclusion of total body irradiation in transplant conditioning regimen, acute graft versus host disease (acute GVHD) or it absence, parameters of graft, the source of stem cells, HLA compatibility of donor and recipient, donor and recipient relationship, gender and age of donor and recipient at the time of transplantation, KIR-alloreactivity of donor NK cells were estimated as risk factors for relapse of disease in our study. We established, that the level of T lymphocytes in the graft less $2{,}0x10^8$/kg for patients with ALL and less $1{,}6x10^8$/kg for patients with AML, absence of acute GVHD, donor age less 27 years old, recipient's age less 6 years old have been important factors for disease relapse of patients after allogeneic HSCT.

Keywords: acute leukemia, risk factors, relapse, $CD3^+$ cells, acute GVHD.

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В ПЛАЗМЕ КРОВИ И УЛЬТРАФИЛЬТРАТЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОРЕНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ В ПРОЦЕССЕ ПРОДЛЕННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТЕРАПИИ

Рябцева Т.В., Бычко Г.Н., Седёлкина Е.Л., Кирковский В.В., Старостин А.В., Сантоцкий Е.О., Колесникова И.Г.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Применение продленной заместительной почечной терапии (ПЗПТ) у пациентов с гепаторенальный синдром является эффективным, современным и высокотехнологичным методом лечения эндогенной интоксикации. Однако при длительной ПЗПТ в процессе замены больших объемов водно-электролитной части плазмы крови следует учитывать существенные колебания концентрации гормонов, цитокинов, витаминов, аминокислот и введенных лекарственных средств. В результате исследования было показано, что в процессе ПЗПТ потери белка составляют в среднем 10,20–30,18 г/сут, степень «просеивания» антибиотиков с молекулярным весом менее 2000 Да и степенью связывания с белками плазмы 50% составляет 60,3±8,4%. Просеивания лекарств с иммуносупрессивным действием (циклоспорин, такролимус) при ПЗПТ не происходит.

Ключевые слова: цитокины, средние молекулы, допамин, кортизол, ванкомицин, гепаторенальный синдром, продленная заместительная терапия, трансплантация печени.

Введение. Частым осложнением, угрожающим жизни пациента, после трансплантации печени является развитие гепаторенального синдрома (ГРС). При ГРС развивается полиорганная патология, характеризующаяся острым нарушением функций сердечно-сосудистой системы, почек, печени, надпочечников, головного мозга и т. д. Устранение или ослабление действия токсического фактора уменьшает проявления синдрома эндогенной интоксикации при ГРС [1, 2]. В процессе продленной заместительной почечной терапии используются аппараты для гемодиафильтрации с мембранами с коэффициентом просеивания до 30000 Да. С помощью этой манипуляции удается снизить уровень эндогенной интоксикации у пациентов после пересадки печени и уменьшить нагрузку на трансплантат. Однако при многочасовом ее осуществлении в процессе замены больших объемов водно-электролитной части плазмы крови с растворенными в ней гормонами, цитокинами, витаминами, аминокислотами возникает опасность нарушений гомеостаза, с одной стороны, и снижение эффективности введенных лекарственных средств, с другой. Особенности их фармакодинамики и фармакокинетики при ПЗПТ требуют тщательного контроля и при необходимости корректировки вводимых доз. Данное исследование посвящено уточнению объемов и характера удаления во внешнюю среду белков и их производных, а также лекарственных средств, наиболее часто применяемых в интенсивной терапии.

Цель работы — оценка динамики концентрации лекарственных средств в плазме крови, объемы и количество белка и их производных в ультрафильтрате плазмы крови (далее — ультрафильтрат) у пациентов с ГРС после трансплантации печени при ПЗПТ.

Материалы и методы. В группу исследования включали пациентов с гепаторенальным синдромом, у которых отмечали: повышенное содержание мочевины и креатинина; гиперкалиемию; отсутствие выраженной гипопротеинемии; отсутствие выраженной коагулопатии и снижение почасового диуреза (менее 600 мл/сут). У всех пациентов этой группы в комплексную терапию включали ПЗПТ. Для этой манипуляции сосудистый доступ обеспечивали с помощью двухпросветного катетера. Использовали системы multiFiltrate в режиме гемодиафильтрации с использованием фильтров типа AV600S (Fresenius Polysulfone). Область эффективной поверхности — 1,4 $м^2$, коэффициент просеивания по альбумину — 0,001. Скорость потока крови устанавливали в диапазоне 100–200 мл/мин. Средняя продолжительность манипуляции составляла 24±3 ч. В качестве материала для исследований использовали плазму пациентов и ультрафильтрат из магистрали.

Определение концентрации антибиотиков и цитостатиков проводили методом хемилюминисцентного иммуноанализа *in vitro* на микрочастицах для количественного определения в сыворотке и плазме крови человека на системе ARCHITECT I с опцией протокола STAT в соответствии с инструкцией производителя.

Изучение молекулярно-массового распределения белка в ультрафильтрате проводили хроматографическим методом на колонке размером 14×700 мм в которую упаковывали сефадекс G-50 Fine, пределы эксклюзии которого оптимально соответствуют для цели данной работы. Сефадекс подготавливали к работе согласно рекомендациям [3, 4], упаковывали в колонку и уравновешивали элюирующим буфером — 0,14 М NaCI или 0,13 М NaCI и 0,01 М трис HCI, pH = 7,8. Образец ультрафильтрата перед нанесением на колонку в объеме 3,0 мл уплотнялся сахарозой до конечной концентрации 2% для увеличения вязкости, что улучшает разделение, препятствуя «размыванию» пиков. Фракции собирали в объеме 3,0 мл и спектрофотометрировали при длине волны 230 нм (против контроля — элюирующего буфера), затем строилась диаграмма элюирования, для чего на оси ординат откладывали полученные величины оптической плотности (ОП230), а по оси

абсцисс — относительную величину Ve/V0 (отношение объема выхода исследуемого вещества к свободному объему) для сопоставления результатов, полученных в различных экспериментах. Это соотношение не зависит от геометрии колонки. В случае гель-хроматографического разделения образцов на одной колонке на оси абсцисс откладывали номера фракций.

Количественное определение содержания пептидов группы средних молекул (СМ) проводили по формуле:

$$\text{СМ, г/л} = \frac{\Sigma \text{ ОП} \times 10}{3},$$

где Σ ОП — сумма оптических плотностей точек, составляющих пик выхода СМ;

3 — коэффициент перерасчета в г/л, рассчитанный по выходу ангиотензина.

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программах Microsoft Excel 2000, а также Statistica 8.0. Все данные представлены медианой (25–75 квартили). Корреляционный анализ проводили, используя статистику Спирмена, R.

Результаты и обсуждение. Известно, что стандартная трехкомпонентная иммуносупрессивная терапия при пересадке органов состоит из комбинации циклоспорина А, глюкокортикостероида и цитостатика. Как показали результаты наших исследований, потери кортизола через ультрафильтрат при ПЗПТ составляют 16,94% (10,71; 31,36). Полученные данные свидетельствуют о слабой диффузии кортизола через мембрану, несмотря на его невысокую молекулярную массу (402,50 Да). Этот факт объясняется наличием в плазме крови специального гликопротеина, связывающего кортикостероидные гормоны — транскортин, молекулярная масса которого составляет 53,8 кДа (383 аминокислоты). Молекула содержит пять участков гликозилирования и содержит один высокоэффективный участок связывания стероидов. Транскортин имеет сходство в последовательности аминокислот с α_1 — антитрипсином и α_1 — антихимотрипсином. При нормальных физиологических условиях 90–95% кортизола в крови связано с транскортином, при концентрациях более 500 нмоль/л, кортизол связывается альбумином, но с меньшей аффинностью. Корреляционный анализ в наших исследованиях показал, что существует прямая зависимость между концентрацией кортизола в ультрафильтрате от концентрации кортизола в плазме, R = 0,82 (p = 0,000).

Допамин является основным препаратом в лечении ГРС, который назначают для улучшения периферического кровообращения, избирательного расширения почечных артерий. Он стимулирует почечный кровоток и ведет к повышению фильтрации в почках. Как показано, в плазме концентрация допамина составила 49,48 (44,67; 54,90) ед./л, а в ультрафильтрате — 41,16 (33,29; 47,92) ед./л (p = 0,009). Корреляционный анализ не обнаружил наличия зависимости между концентрацией допамина в ультрафильтрате от концентрации его в плазме. Однако была обнаружена обратная достоверная корреляция между концентрацией допамина в плазме и процентом его элиминации (R = -0,64, p≤0,05). Процент элиминации составил 83,1%.

Степень элиминации антибиотиков при продленной заместительной почечной терапии зависит от многих факторов: размер молекулы, соединение с белком, объем распределения, липофильность, элиминация почками. В этой связи каждый препарат должен рассматриваться в отдельности независимо от его молекулярной массы.

В данном исследовании проводили изучение концентрации в плазме крови и объема удаления из организма в ультрафильтрат ванкомицина. Согласно инструкции по применению ванкомицина, в течение первых 24 ч после внутривенного вливания около 90% его выводится почками в неизменном виде. Средний период полувыведения у пациентов с нормальной функцией почек составляет около 6 ч. Приблизительно 55% ванкомицина находится в связанном с белками плазмы крови состоянии. Терапевтический и токсический эффекты ванкомицина напрямую зависят от уровня концентрации этого препарата в сыворотке крови. Терапевтические пиковые уровни концентрации в сыворотке от 20 до 40 мкг/мл и транзиторные от 5 до 10 мкг/мл эффективны в отношении большинства штаммов стафилоккоков и стрептококков. Риск токсичных последствий значительно возрастает при увеличении концентрации или продолжительной терапии у пациентов с почечной недостаточностью. Такие токсические последствия, как ото- и нефротоксичнотсь появляются, когда концентрация ванкомицина в сыворотке крови достигает уровня от 80 до 100 мкг/мл. Они редко наблюдаются, когда концентрация в сыворотке держится на уровне менее 30 мкг/мл.

Наши исследования показали, что 60,35% (39,05; 43,99) ванкомицина элиминируется из организма человека при ПЗПТ. Это вполне ожидаемый результат, учитывая низкую молекулярную массу ванкомицина (около 1500 Да). Таким образом, можно заключить, что весь несвязанный с белками плазмы препарат проходит через поры мембраны при ПЗПТ в ультрафильтрат. Таким образом, при ПЗПТ необходимо строго контролировать концентрацию лекарственных средств в крови пациента, и в случае если она становится ниже терапевтической, то необходима срочная корректировка их дозы.

Эффективность ПЗПТ оценивали методом гель-хроматографии, позволяющий изучать характер молекулярно-массового распределения компонентов плазмы крови и их концентрацию в ультрафильтрате. Использование этого метода позволяет судить не только о количественном, но и о качественном содержании исследуемых компонентов в биологических жидкостях благодаря разделению высокомолекулярных соединений от средне- и низкомолекулярных компонентов, к которым следует отнести средние молекулы (СМ) и аминокислоты [3]. Характерный хроматографический профиль элюции плазмы доноров на сефадексе G50 представляет собой три четко выраженных, симметричных пика: 1 — высокомолекулярный, >20000 Да, 2 — среднемолекулярный, от 5000 до 300 Да и 3 – низкомолекулярный, <500 Да. В процентном отношении площади пиков составляют 99,2; 0,5 и 0,3% соответственно. В качестве примера приводим молекулярно-массовое распределение белково-пептидного комплекса в ультрафильтрате пациента Б. (д/з: Хроническая печеночная недостаточность, цирроз печени, стадия С по Чайлд-Пью, внутрипеченочная форма портальной гипертензии, спленомегалия, паренхиматозная желтуха, энцефалопатия). Показанием к ПЗПТ явилось развитие ГРС на фоне основного заболевания. Ультрафильтрат для анализа был отобран для гель-хроматографического разделения спустя 12 ч от начала ПЗПТ.

Хроматограмма ультрафильтрата пациента (рисунок) в отличие от молекулярно-массового распределения донорской плазмы крови характеризовалась присутствием только двух пиков, расположенных в области выхода среднемолекулярных пептидных компонентов и аминокислот. Пик выхода высокомолекулярных белков, в частности альбумина, отсутствует. Учитывая, что ПЗПТ пролонгирована во времени (максимально — 72 ч), наличие в ультрафильтрате белка свидетельствовало бы о крайне высокой степени удаления его из организма пациента и развития состояния гипопротеинемии, однако отсутствие в ультрафильтрате высокомолекулярных компонентов свидетельствует, что мембраны Fresenius filter AV600S с пределом пропускания белковых молекул выше Mr 30000 Да эффективно удерживают белки и препятствуют их поступлению в ультрафильтрат при проведении ПЗПТ.

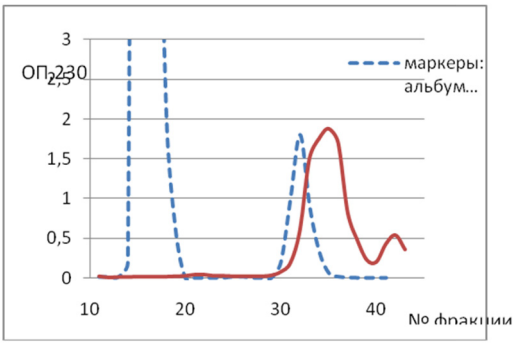


Рисунок — Гель-хроматограммы фракционирования на сефадексе G-50 Fine маркеров молекулярной массы и ультрафильтрата после 12 ч проведения пациенту продленной заместительной почечной терапии

Расположение пиков выходящих в зоне фракций 31–39 и 40–43 могут идентифицироваться как зона выхода пептидов группы СМ и аминокислот. Концентрация СМ, рассчитанная по ангиотензину, составляет 3,12 г/л. Пик пептидов СМ характеризуется асимметричным расположением правого плеча за счет расширения его основания, возможно, за счет сочетанного выхода в одном объеме СМ и дипептидов. Молекулярная масса его компонентов несколько меньше чем у маркера — витамина В12 (Mr 1,355 Да), но совпадает с зоной выхода ангиотензина (Mr 1034 Да). Эта асимметрия пика справа может быть вызвана активацией ферментов группы экзопептидаз, утилизирующих олигопептидные фрагменты СМ вначале до дипептидов (зона выхода Gly-Phe, Mr 222), а в последующем — до аминокислот (зона выхода Trp. Mr 204). Следовательно, в процессе ПЗПТ происходит эффективное удаление из кровеносного русла пациента экзогенных маркеров интоксикации — продуктов ограниченного протеолиза белка — пептидных фракций, относящихся к группе СМ.

Таким образом, результаты исследования показали, что потери протеинов в виде «средних молекул» через ультрафильтрат при ПЗПТ варьируют в широком диапазоне и составляют в среднем 10,20–30,18 г/сут, поэтому заместительная терапия белковыми препаратами должна учитывать исходную концентрацию белка в плазме пациента, а также объем потерь протеина с ультрафильтратом.

Заключение. В процессе ПЗПТ регистрируется улучшение показателей гемодинамики: нормализация ударного объема крови, пульсового давления, частоты сердечных сокращений и индекса сердечной функции, рост системного периферического сосудистого сопротивления и среднего артериального давления до нормальных значений, что приводит к снижению потребности в вазопрессорной поддержке. Электролитные изменения в процессе ПЗПТ успешно корректируются применением стандартной инфузионной терапии, а также в процессе самой манипуляции за счет пассивного взаимодействия плазмы и инфузионных растворов электролитов и сахаров. Отмечается относительное постоянство осмолярности плазмы крови при ПЗПТ.

Таким образом, в процессе ПЗПТ необходим контроль уровня общего белка в плазме крови пациента до начала ПЗПТ и через каждые 24 ч терапии, т. к. потери белка составляют в среднем 10,20–30,18 г/сут. При ПЗПТ степень «просеивания» антибиотиков с молекулярным весом менее 2000 Да и степенью связывания с белками плазмы 50% составляет 60,3±8,4%, поэтому в случае когда концентрация антибиотика в плазме крови пациента становится ниже терапевтической, то необходима корректировка его дозы. Просеивания лекарств с иммуносупрессивным действием (циклоспорин, такролимус) при ПЗПТ не происходит, корректировка дозы не требуется.

Более подробное описание методики ПЗПТ у пациентов с гепаторенальным синдромом после трансплантации печени изложено в инструкции по применению «Оптимизированного метода продленной заместительной почечной терапии у пациентов с гепаторенальным синдромом в периоперационном периоде трансплантации печени», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь (№ 149-1214 от 18.06.2015).

Литература

1. Пиманов, С.И. Гепаторенальный синдром / С.И. Пиманов // Гастроэнтерология. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 21–25.
2. Gines, P. Hepatorenal syndrome / P. Gines, K. Arroyo // J. Am. Soc. Nephrol. — 1999. — Vol. 10, № 8. — P. 1833–1839.
3. Детерман, Г. Гель-хроматография / Г. Детерман. — М.: Мир, 1970. — 252 с.
4. Девени, Т. Аминокислоты, пептиды, белки / Т. Девени, А. Гергей. — М.: Мир, 1976. — 364 с.

CONCENTRATION OF MEDICINALS AND PROTEIN DISTRIBUTION OF PROTEIN IN PLASMA AND ULTRAFILTRATE PATIENTS' PLASMA WITH HEPATORENAL SYNDROME AFTER CONTINUOUS VENO-VENOUS HEMOFILTRATION

Ryabzeva T.V., Bichko G.N., Sedyelkina E.L., Kirkovsky V.V., Starostin A.V., Santocky E.O, Kolesnikova I.G.

Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

The use of continuous veno-venous hemofiltration (CVVH) in patients with hepatorenal syndrome is an efficient, modern and high-tech treatment. However, during prolonged implementation of the method there is a replacement of large volumes of water and electrolyte part of the blood plasma with dissolved hormones, cytokines, vitamins, amino acids and drugs introduced. Therefore, the aim of this work was to study the dynamics of the plasma concentrations of drugs and the molecular weight distribution of the protein in the ultrafiltrate in patients with hepatorenal syndrome during prolonged renal replacement therapy. It is showed during CVVH the protein losses are averages 10.20–30.18 g/d, the antibiotic bolting is average 60.3±8.4%. Sieving action of immunosuppressive drugs (cyclosporine, tacrolimus) during CVVH occurs.

Keywords: cytokines, middle size molecules, dopamine, cortisol, vancomycin, hepatorenal syndrome, prolonged replacement therapy.

ВЛИЯНИЕ ПРОДЛЕННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ДИНАМИКУ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И УЛЬТРАФИЛЬТРАТЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОРЕНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ ПЕЧЕНИ

Рябцева Т.В., Кирковский В.В., Седёлкина Е.Л., Старостин А.В., Колесникова И.Г.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Продленная заместительная почечная терапия (ПЗПТ) у пациентов с гепаторенальный синдром относится к современным, высокотехнологичным и эффективным методам лечения. За счет использования мембран со 100% коэффициентом просеивания для субстанций с молекулярным весом ниже 30 кДа данная методика обеспечивает интенсивное удаление из организма части плазмы с растворенными в ней патогенетически значимыми субстанциями, в т. ч. и цитокинов — важных медиаторов различных иммунологических реакций. Учитывая регуляторную роль цитокинов, многообразие их функций и невысокую молекулярную массу (в среднем около 20кДа), целью данного исследования являлось изучение особенностей элиминации про- и противовоспалительных цитокинов при ПЗПТ. Анализ результатов показал, что продленная заместительная почечная терапия является эффективным средством для удаления цитокинов из циркуляции. По результатам наших исследований элиминация ИЛ-4 и ИФН-гамма при ПЗПТ составила более 50%. Самый низкий процент «просеивания» через мембрану регистрировался для ИЛ-6 и ИЛ-10 — менее 15%. Для ФНО-альфа, ИЛ-8, ИЛ-13 и ИЛ-1β мембрана имеет средний процент «просеивания» от 20 до 40%.

Ключевые слова: цитокины, интерлейкины, гепаторенальный синдром, продленная заместительная терапия, трансплантация печени.

Введение. Гепаторенальный синдром (ГРС) является частым осложнением у пациентов с хроническими воспалительно-дистрофическими заболеваниями печени [1, 2]. Продленная заместительная почечная терапия у таких пациентов относится к современным, высокотехнологичным и эффективным методам лечения. В ходе научно-исследовательской работы в рамках ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики» подпрограммы «Трансплантология и регенеративная медицина» были получены результаты ретроспективного анализа, которые свидетельствуют о том, что 27 из 120 пациентов после пересадки донорской печени нуждаются в проведении ПЗПТ в связи с развитием ГРС. Применяемые мембраны имеют 100% коэффициент просеивания для субстанций с молекулярным весом ниже 30 кДа, поэтому данная методика, обеспечивает интенсивное удаление из организма части плазмы с растворенными в ней патогенетически значимыми субстанциями, в т. ч. и цитокинов — важных медиаторов различных иммунологических реакций, которые имеют невысокую молекулярную массу (в среднем около 20кДа).

Цель работы — изучение изменения концентрации цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, 6, 8, ИЛ-4, 10, 13, ИНФ-γ) в плазме крови и ультрафильтрате плазмы крови (далее — ультрафильтрате) у пациентов с гепаторенальным синдромом после трансплантации печени при продленной заместительной почечной терапии.

Материалы и методы. В группу исследования включали пациентов с гепаторенальным синдромом, у которых отмечали: повышенное содержание мочевины и креатинина; гиперкалиемию; отсутствие выраженной гипопротеинемии; отсутствие выраженной коагулопатии и снижение почасового диуреза (менее 600 мл/сут). У всех пациентов этой группы в комплексную терапию включали методы ПЗПТ на системе multiFiltrate в режиме гемодиафильтрации. Для этой манипуляции сосудистый доступ обеспечивали с помощью двухпросветного катетера. Использовали фильтр типа AV600S (Fresenius Polysulfone). Область эффективной поверхности — 1,4 м^2, коэффициент просеивания по альбумину — 0,001. Скорость потока крови устанавливали в диапазоне 100–200 мл/мин. Средняя продолжительность манипуляции составляла 24±3 ч. В качестве материала для исследований использовали плазму пациентов и ультрафильтрат из магистрали.

Определение концентрации цитокинов в плазме крови и ультрафильтрате проводили методом иммуноферментного анализа.

Коэффициент «просеивания» рассчитывали по формуле:

$$К_{пр} = С_{уф} \times 100 / (С_{пл} + С_{уф}),$$

где $К_{пр}$ — коэффициент «просеивания»;
$С_{уф}$ — концентрация цитокина в ультрафильтрате (пг/мл);
$С_{пл}$ — концентрация цитокина в плазме (пг/мл).

Статистическую обработку результатов исследования проводили в программах Microsoft Excel 2000, а также Statistica 8.0. Все данные представлены медианой (25–75 квартили). Корреляционный анализ проводили, используя статистику Спирмена, R.

Результаты и их обсуждение. Результаты изучения динамики концентрации цитокинов в плазме крови пациентов при ПЗПТ представлены в таблице 1, концентрация цитокинов в ультрафильтрате — в таблице 2. Рассчитанные коэффициенты «просеивания» исследуемых цитокинов — в таблице 3.

Как показали наши исследования, ПЗПТ обеспечивает эффективный конвекционный массоперенос через мембрану как про-, так и противовоспалительных цитокинов. При этом прямая корреляционная зависимость концентрации цитокинов в ультрафильтрате от концентрации в плазме отмечалась только для провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, 6, 8) и ИНФ-γ. Для противовоспалительных цитокинов корреляции между концентрацией цитокинов в плазме крови и ультрафильтрате не наблюдалось. Данные корреляции в связи с отсутствием их статистической достоверности не приводятся.

Анализ динамики концентрации провоспалительных цитокинов показал отсутствие уменьшения концентрации цитокинов в плазме через 24 ч ПЗПТ по сравнению с пробой через 12 ч ПЗПТ. В некоторых случаях через 24 ч ПЗПТ наблюдалось даже увеличение данного показателя. Как видно из таблицы 1, медиана концентрации ИЛ-8 через 12 ч составила 78,35 нг/мл, а через 24 ч — 114,88 нг/мл ($p \leq 0,05$). Аналогичную ситуацию наблюдали и с динамикой концентрации ФНО-α в плазме крови. Факт увеличения концентрации цитокинов в плазме при ПЗПТ может являться следствием выхода данного цитокина из внутри- и внеклеточных секторов и стимуляцией эндотелия к синтезу данных провоспалительных цитокинов.

Таблица 1. — Динамика концентрации цитокинов в плазме крови пациентов с гепаторенальным синдромом при продленной заместительной почечной терапии, пг/мл

Цитокин (диапазон нормальных значений, пг/мл)	Время проведения ПЗПТ		
	до начала ПЗПТ	через 12 ч	через 24 ч
ИЛ-1β (0–78)	4,21 (2,45; 4,32)	3,62 (1,85; 4,53)	2,68 (1,52; 12,14)
ИЛ-6 (0–70)	119,18 (35,78; 327,08)	118,28 (26,09; 527,18)	116,99 (9,10; 285,74)
ИЛ-8 (0–34)	69,23 (9,01; 274,32)	78,35 (7,63; 317,22)	114,88 (12,27; 192,81)
ФНО-α (0-12)	11,42 (9,44; 18,20)	13,48 (6,24; 20,25)	20,09 (2,40; 35,70)
ИЛ-10 (4-10)	39,82 (14,24; 76,29)	41,76 (24,26; 91,26)	99,60 (22,77; 214,24)
ИЛ-13	53,88 (23,73; 113,94)	46,87 (33,83; 93,24)	26,64 (24,59; 43,03)
ИЛ-4	10,31 (2,74; 13,55)	8,70 (5,80; 10,15)	5,80 (4,35; 8,70)
ИФН-γ	9,59 (4,05; 33,84)	8,90 (5,85; 53,09)	8,54 (7,07; 21,46)

Выявленный высокий процент «просеивания» ИЛ-8 и ФНО-α свидетельствует об эффективности ПЗПТ для их удаления. Данные цитокины являются важными с точки зрения риска развития синдрома системного воспалительного ответа. Ранее проведенные исследования показали, что существует прямая зависимость между концентрацией этих цитокинов и смертностью пациентов с гепаторенальным синдромом в посттрансплантационном периоде [4, 5].

Увеличение концентрации в плазме при ПЗПТ отмечалось также и для ИЛ-10. Традиционно ИЛ-10 относится к числу противовоспалительных цитокинов (17–21 кДа). Он подавляет синтез цитокинов Т-клетками, снижает активность макрофагов, уменьшает продукцию воспалительных цитокинов. Данный цитокин ингибирует образование интерферонов, фактора некроза опухоли и ИЛ-6, ИЛ-1. Тем не менее в последнее время появляются публикации, посвященные провоспалительным эффектам ИЛ-10. Этот цитокин стимулирует синтез IgE. ИЛ-10 участвует в гуморальном компоненте иммунного ответа, отвечая за аллергизацию организма и антипаразитарную защиту. ИЛ-10 стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных В-клеток человека [6]. Изучение коэффициента «просеивания» для ИЛ-10 через мембрану аппарата типа «Fresenius» в ультрафильтрат составил 10,00% (5,91; 16,04) через 12 ч и 12,56% (5,27; 33,24) через 24 ч ПЗПТ. Удаление ИЛ-10 из плазмы крови при ПЗПТ у пациентов с высоким риском развития инфекционных осложнений в периоперационном периоде является позитивным фактором, т. к. избыток IL-10 в организме ведет к снижению противоинфекционной защиты и развитию хронических инфекций [7].

Как видно из данных таблицы 1, изменений концентрации ИЛ-1β, ИЛ-6 и ИФН-γ в плазме крови в процессе ПЗПТ не наблюдалось. Следует при этом отметить, достаточно высокие концентрации ИФН-γ в ультрафильтрате.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что процент потерь цитокинов при ПЗПТ не зависит от молекулярной массы. По результатам наших исследований элиминация ИЛ-4 и ИФН-γ при ПЗПТ характеризуется высоким процентом «просеивания» — более 50% (таблица 3). Множественный дисперсионный анализ методом Краскела–Уоллиса

показал достоверную разницу в коэффициенте просеивания для разных цитокинов ($p \leq 0,05$). Самый низкий процент «просеивания» через мембрану регистрировался для ИЛ-6 и ИЛ-10 — менее 15%. Для ФНО-альфа, ИЛ-8, ИЛ-13 и ИЛ-1γ мембрана имеет средний процент «просеивания» от 20 до 40%.

Очевидно, что существуют определенные закономерности в элиминации цитокинов при продленной заместительной почечной терапии, которые требуют более детального изучения. Вероятнее всего, на массоперенос через мембрану цитокинов влияет третичная и четвертичная структура молекулы, а также процент гликозилирования и присутствие заряженных аминокислот на поверхности молекулы.

Таблица 2. — Динамика концентрации цитокинов в ультрафильтрате плазмы крови пациентов с гепаторенальным синдромом при продленной заместительной почечной терапии, пг/мл

Цитокин (диапазон нормальных значений, пг/мл)	Время проведения ПЗПТ	
	через 12 ч	через 24 ч
ИЛ-1β (0–78)	1,63 (1,37; 2,10)	1,59 (1,01; 1,80)
ИЛ-6 (0–70)	3,87 (2,79; 38,18)	4,81 (2,38; 18,67)
ИЛ-8 (0–34)	12,24 (7,14; 95,95)	11,77 (5,49; 51,78)
ФНО-α (0–12)	5,14 (2,35; 7,72)	8,00 (1,54; 16,70)
ИЛ-10 (4–10)	5,00 (4,21; 11,05)	9,04 (5,00; 14,81)
ИЛ-13	11,62 (7,26; 20,35)	5,81 (1,45; 20,35)
ИЛ-4	105,41 (92,38; 114,61)	83,19 (53,29; 113,08)
ИФН-γ	10,61 (9,39; 12,68)	11,71 (9,75; 13,66)

Таблица 3. — Коэффициент «просеивания» и молекулярная масса исследуемых цитокинов

Цитокин	Молекулярная масса, Да	Время проведения ПЗПТ	
		через 12 ч	через 24 ч
ФНО-α	26000	34,28 (21,41; 48,24)	33,31 (29,38; 39,35)
IL-1β	18000	34,66 (27,31; 43,84)	19,52 (12,54; 50,00)
IL-6	24000	7,22 (3,69;21,09)	14,29 (3,97; 29,40)
IL-8	8800	40,28 (14,13; 52,54)	30,91 (24,34; 31,23)
IL-10	21000	10,00 (5,71; 16,04)	12,56 (5,27; 33,24)
IL-13	20000	20,48 (11,25; 29,04)	20,07 (5,16; 38,74)
IL-4	19000	92,72 (89,12; 95,17)	93,48 (80,05; 95,57)
ИФН-γ	25000	56,53 (11,90; 64,01)	57,86 (35,30; 60,80)

Заключение. Цитокины являются важными медиаторами межклеточных коммуникаций при иммунном ответе, гемопоэзе и развитии воспаления. Они взаимосвязаны и образуют целую систему взаимодействующих элементов — цитокиновую сеть. При чрезмерной продукции цитокинов наблюдается развитие ряда патологических синдромов, таких как токсический шок, геморрагический некроз и синдром системного воспалительного ответа. Анализ полученных в ходе исследования результатов позволяет сделать следующие выводы: продленная заместительная почечная терапия является эффективным средством для удаления цитокинов из циркуляции, а элиминация части цитокинов из кровеносного русла приводит к перераспределению молекул в тканях и снижению концентрации цитокинов в местах локального воспаления. Таким образом, проведение продленной заместительной почечной терапии у пациентов с гепаторенальным синдромом свидетельствуют о высокой эффективности данного метода для лечения пациентов в периоперационном периоде, а также для профилактики септических осложнений, в т. ч. и за счет удаления части цитокинов, опосредующих развитие повреждений за счет чрезмерной активации воспалительной реакции организма в ответ на повреждение.

Литература

1. Пиманов, С.И. Гепаторенальный синдром / С.И. Пиманов // Гастроэнтерология. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 21–25.

2. Gines, P. Hepatorenal syndrome / P. Gines, K. Arroyo // J. Am. Soc. Nephrol. — 1999. — Vol. 10, № 8. — P. 1833–1839.

3. Характер изменений белкового гомеостаза при проведении продленной заместительной почечной терапии у пациентов с гепаторенальным синдромом в периоперационном периоде трансплантации печени / В.В. Кирковский [и др.] // Мед. журн. — 2014. — № 3. — С. 80–81.

4. *In vitro* interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats / Z. Sun [et al] // Gastroenterology. — 2003. — Vol. 125, № 1. — P. 202–215.

5. Седёлкина, Е.Л. Связь концентрации ФНО-α в плазме крови с выживаемостью пациентов в посттрансплантационном периоде / Е.Л. Седёлкина, А.В. Старостин, В.В. Кирковский // 9-я Междунар. конф. «Актуальные аспекты экстракорпорального очищения крови в интенсивной терапии»: сб. материалов. — М., 2014. — С. 26.

6. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia / F.N. Lauw [et al.] // J. Immunol. — 2000. — Vol. 165, № 5. — P. 2783–2789.

7. Галактионов, В.Г. Иммунология: практ. руководство / В.Г. Галактионов.— М.: Академия, 2004. — 520 с.

EFFECT OF THE CONTINUOUS VENO-VENOUS HEMOFILTRATION ON THE CYTOKINE CONCENTRATIONS IN PLASMA AND PLASMA ULTRAFILTRATE OF PATIENTS WITH HEPATORENAL SYNDROME AFTER LIVER TRANSPLANTATION

Ryabzeva T.V., Kirkovsky V.V., Cedyelkina E.L., Starostin A.V., Kolesnikova I.G.

Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Continuous veno-venous hemofiltration therapy (CVVH) in patients with hepatorenal syndrome refers to a modern, high-tech and effective treatments. By used apparatus for hemodiafiltration with membranes with a sieving coefficient of 100% for substances having a molecular weight below 30 kDa. This technique provides intense removal from the body part of the plasma with dissolved pathogenetically important substances, including cytokines and — important mediators of various immunological reactions. Given the regulatory role of cytokines, the diversity of their functions and the low molecular weight (an average of about 20kDa), the aim of this study was to investigate the characteristics of the elimination of the pro- and anti-inflammatory cytokines in CVVH. Analysis of the results showed that the prolonged renal replacement therapy is an effective means for removing cytokines from circulation. According to the results of our studies, elimination of IL-4 and IFN-gamma during CVVH was more than 50%. The lowest percentage of "sifting" through the membrane was recorded for IL-6 and IL-10 — less than 15%. For TNF-alpha, IL-8, IL-13 and IL-1β membrane has an average percentage of "screening" — 20–40%.

Keywords: cytokines, interleukins, hepatorenal syndrome, continuous veno-venous hemofiltration, liver transplantation.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОДХОДА НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК И КАЧЕСТВА РАННЕГО ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ

Смирнова Л.А.[1], Свирновский А.И.[3], Цвирко Д.Г.[1], Колбаско Л.В.[2], Пасюков В.В.[3], Свирновская Э.Л.[3], Тарас И.Б.[3], Сергиевич О.В.[3], Федуро Н.А.[3], Бакун А.В.[2]

[1]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь;

[2]Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь;

[3]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучена эффективность терапии, подобранной по результатам химиочувствительности опухолевых клеток *in vitro*, у 115 пациентов с хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Полученные данные сопоставлены с результатами терапии пациентов группы сравнения (n = 30), которым назначали химиотерапию без предварительного подбора по лекарственной чувствительности клеток. Установлено повышение эффективности терапии в основной группе. Показана возможность прогнозирования долгосрочного ответа пациентов с ХЛЛ на адекватную химиотерапию на раннем этапе лечения (2 недели — 3 мес.) с учетом динамики содержания абсолютного количества лимфоцитов в периферической крови. Обоснованным следует считать принятие решения о смене терапии по факту резистентности к лечению на 3 мес. терапии.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, химиочувствительность, прогнозирование.

Введение. Хронический лимфолейкоз (далее — ХЛЛ) является одним из наиболее частых заболеваний крови у взрослого населения. Показателями эффективности его лечения являются вероятность достижения полного ответа (полной клинико-гематологической ремиссии) и его длительность, уменьшение вероятности рецидива, увеличение общей и свободной от болезни продолжительности жизни пациентов. Максимальная эффективность лечения может быть достигнута путем персонификации — подбором химиопрепаратов и выбором протоколов в соответствии с химиочувствительностью опухолевых клеток пациента *in vitro* и ответом его на лечение.

Существующая система оценки эффективности применяемого протокола химиотерапии путем контроля рутинных клинико-гематологических параметров заболевания (абсолютное содержание лимфоцитов в крови, размеры селезенки и лимфоузлов) после полного курса лечения (в течение 3–6 мес.) не позволяет своевременно выявить исходную или индуцированную терапией химиорезистентность. Такой подход не обеспечивает подбор эффективных протоколов химиотерапии и своевременной замены их в случае возникновения резистентности, что помимо ухудшения результатов лечения приводит к существенным экономическим издержкам. Это связано с тем, что эффективность современных протоко-

лов химиотерапии ХЛЛ, оцениваемая по вероятности достижения полного ответа, даже у ранее не леченных пациентов не превышает 70%, а молекулярно-генетическая ремиссия достигается менее чем у половины пациентов с полным клинико-гематологическим ответом [1, 2]. У ранее леченных пациентов вероятность резистентности к различным протоколам химиотерапии значительно выше. Из этого следует, что для повышения эффективности химиотерапии (увеличения частоты полных клинико-гематологических ответов, длительности безрецидивной и общей выживаемости), а также для уменьшения стоимости лечения путем исключения применения заведомо неэффективных протоколов лечения, необходим индивидуальный подбор терапии на основе прогнозирования и постоянного мониторинга ее противоопухолевой эффективности. Для прогнозирования ответа на химиотерапию нами использована оценка химиочувствительности лейкозных лимфоцитов *in vitro* в МТТ-тесте до начала лечения. Такой подход основан на результатах целенаправленного выбора химиопрепаратов и схем их применения [3]. Мониторинг противоопухолевого действия терапии может быть начат путем контроля динамики абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови (ПК) пациентов как одного из маркеров величины опухолевой массы при ХЛЛ [4–7].

Материалы и методы. Проанализирована эффективность подобранной *in vitro* по результатам оценки химиочувствительности опухолевых клеток в МТТ-тесте терапии у 115 пациентов с ХЛЛ в сравнении с группой сравнения (30 пациентов с ХЛЛ, получавших химиотерапию без предварительного подбора). На момент включения в исследование у 14 (46,7%) пациентов группы сравнения диагностирована стадия В заболевания, а у остальных 16 (53,3%) — стадия С. В основной группе аналогичное распределение выглядело следующим образом: 85 (73,9%) пациентов со стадией В и 30 (26,1%) пациентов со стадией С.

Чувствительность лейкозных клеток к лекарственным средствам определяют с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ) теста. МТТ-тест позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клетки. Проводят МТТ тест следующим образом. Выделенные заранее по стандартной методике мононуклеары пациента разводят в полной питательной среде для культивирования клеток (RPMI 1640 с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) до концентрации 2×10^6/мл.

Аликвоты клеточной суспензии (95 мкл) добавляют в 96-луночные плоскодонные планшеты, содержащие по 5 мкл разведений лекарственных средств (терапевтическая доза). Раскапывание суспензии клеток производят в лунки трех дублирующих друг друга вертикальных дорожек планшета (триплетах) для каждого исследуемого лекарственного средства. В первый триплет вносят только суспензию клеток без добавления раствора лекарственного средства (контроль для лекарственных средств, жизнеспособность клеток которого принимается за 100%). В лунки первой вертикальной дорожки планшета добавляют полную питательную среду без лейкозных клеток, которая служит в качестве контроля оптической плотности раствора, принимаемого за нулевое значение.

Планшет с суспензией клеток и исследуемыми лекарственными средствами помещают в стандартные условия (увлажненная атмосфера с 5% содержанием CO_2 при температуре 37°С) и инкубируют в течение 44 ч.

По истечении времени культивирования в каждую лунку планшета с клетками (в т. ч. и в лунки, которые используются для контроля оптической плотности раствора) добавляют по 20 мкл раствора МТТ (Sigma, США) (5 мг/мл в PBS). Для конверсии тетразолиевой соли в нерастворимый формазан планшет с клетками инкубируют в темноте в тех же условиях в течение 4 ч.

Затем для растворения (солюбилизации) образовавшихся гранул формазана в каждую лунку добавляют по 100 мкл подкисленного изопропанола и энергично пипетируют (20–30 толчков на лунку) до полного растворения гранул.

Переносят планшет в планшетный спектрофотометр и измеряют оптическую плотность при длине волны $\lambda = 540$ нм.

Переводят полученные результаты в проценты, используя формулу:

$$ЖК = \frac{ОП_1 - ОП_{фон}}{ОП_2 - ОП_{фон}} \cdot 100\ \%,$$

где ЖК — жизнеспособность клеток;

$ОП_1$ — средняя оптическая плотность триплета лунок с клетками, которые подвергались воздействию лекарственных средств, ОЕ;

$ОП_2$ — средняя оптическая плотность триплета лунок с контролем для лекарственных средств, ОЕ;

$ОП_{фон}$ — средняя оптическая плотность лунок, содержащих только полную среду для культивирования (фоновый контроль оптической плотности раствора), ОЕ.

Результаты считают адекватными, если ($ОП_1$ — $ОП_{фон}$) >0,05.

Определяют выраженность чувствительности опухолевых клеток к анализируемым лекарственным средствам по относительной выживаемости клеток *in vitro*: менее 15% выживших клеток — очень высокая чувствительность; 15–39% выживших клеток — высокая чувствительность; 40–59% выживших клеток — умеренная чувствительность; 60–89% выживших клеток — низкая чувствительность; 90% и более выживших клеток — резистентность.

Составляют индивидуальный профиль лекарственной чувствительности клеток. При использовании выпускаемого ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» набора реагентов для определения лекарственной чувствительности лимфоидных клеток человека «МТТ-ЛЕК-ОТВЕТ» постановка теста значительно упрощается.

Пациенты группы сравнения получали химиотерапию по протоколам COP (циклофосфамид, винкристин, преднизолон) — 10 (33,6%), FC (флударабин, циклофосфамид) — 5 (16,6%), CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон) — 5 (16,6%), ритуксимаб-содержащие протоколы — 5 (16,6%) и монотерапию хлорамбуцилом — 5 (16,6%).

Пациенты основной группы получали химиотерапию по протоколам COP — 34 (29,6%), FC — 39 (33,9%), CHOP — 30 (26,1%), ритуксимаб-содержащие протоколы — 5 (4,3%), монотерапию хлорамбуцилом — 7 (6,1%). Различия между долями пациентов основной и группы сравнения, получавших различные протоколы химиотерапии, статистически недостоверны.

На первом этапе работы ответ на терапию оценивали по динамике изменения абсолютного содержания лимфоцитов в ПК. При оценке качества ответа на химитотерапию оценивали: количество лимфоцитов ПК, относительное содержание лимфоцитов в миелограмме, размеры селезенки и лимфоузлов в соответствии с критериями NCI-WG [8], т. е. критерии полного ответа, частичного ответа, прогрессии заболевания на 2-й неделе, на 3 и 12-м мес. лечения. Для удобства количественной оценки терапевтического эффекта и сравнения групп по стандартным градациям оцениваемых параметров нами была использована условная цена в баллах: достижение параметром уровня, соответствующего критерию полного ответа, оценивали в 3 балла, достижение уровня частичного ответа — в 2 балла, отсутствие положительной динамики — 1 балл, отрицательная динамика – 0 баллов. Сумма баллов характеризовала качество ответа.

Результаты и их обсуждение. Выявлены статистически достоверные различия между сравниваемыми группами в динамике абсолютного содержания лимфоцитов в ПК (таблица 1). Так, на 2-й неделе лечения у 91% пациентов основной группы этот параметр соответствовал уровню частичного либо полного ответа, в то время как в группе сравнения положительная динамика отмечена лишь у 41,6%. На 3-й мес. терапии критерии полного и частичного ответа по данному параметру достигнуты у 88% пациентов основной группы против 32% группы сравнения. На 12-й мес. терапии данное соотношение составило 93 и 28%.

Нормализация уровня лимфоцитов в костном мозге на 12-й мес. терапии достигнута у 25% пациентов основной группы против 4% пациентов группы сравнения ($p = 0,03$).

Таблица 1. — Динамика абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови пациентов

Группы пациентов	Снижение уровня лимфоцитов периферической крови на 50% и более либо нормализация, % пациентов		
	2 недели	3 мес.	12 мес.
Группа сравнения, n = 30	41,6	44,4	28
Основная группа, n = 115	91,8*	88,5*	93*
Примечание — * — показатель статистически значимо отличается от аналогичного в группе сравнения.			

Таблица 2. — Динамика качества ответа в процессе лечения в группе сравнения и основной группе пациентов

Группа пациентов	Показатель качества ответа в баллах			
	2 недели	3 мес.	12 мес.	весь период наблюдения
Группа сравнения, n = 30	0,69±0,48	2,17±0,76	4,52±1,29	7,04±1,78
Основная группа, n = 115	2,0±1,0*	3,5±0,9*	8±1*	13,12±2,41*
Примечание — * — показатель статистически значимо отличается от аналогичного в группе сравнения.				

Уменьшение размеров лимфоузлов у пациентов основной группы к 12-му мес. достигло уровня частичного либо полного ответа в 99% случаев против 28% в группе сравнения ($p<0,001$). Аналогичная динамика размеров селезенки отмечена у 68% пациентов основной группы и не выявлена у пациентов группы сравнения ($p<0,001$).

Сравнение динамики основных параметров, отражающих опухолевую массу, в основной группе и группе сравнения на фоне терапии объективизировано применением балльной оценки. Так, выявлены статистически достоверные различия в величине ответа на терапию между основной группой и группой сравнения на 2-й неделе (2,0±1,0 балл против 0,69±0,48 балла соответственно), на 3-й мес. (3,5±0,9 против 2,17±0,76 соответственно), на 12-й мес. (8,0±1,0 против 4,52±1,29 балла соответственно) и за весь период наблюдения в целом (13,12±2,41 против 7,04±1,78 балла соответственно).

С целью исключения влияния на результаты лечения пациентов обеих групп различий в подборе протоколов терапии проанализирована эффективность терапии у пациентов основной группы и группы сравнения, получавших протокол COP. Исследована эффективность этого протокола как наиболее часто применимого в клинической практике страны. Выявлены статистически достоверные различия в величине ответа на терапию между основной группой и группой сравнения на 12-й мес. (7,76±1,78 против 4,5±0,75 балла соответственно) ($p<0,01$) и за весь период наблюдения в целом (12,9±3,44 против 8±1,31 балла соответственно) ($p<0,01$).

С целью исключения влияния на результаты лечения пациентов обеих групп различий в стадии заболевания проанализирована эффективность терапии у пациентов основной группы и группы сравнения в стадии С на момент включения в исследование.

Выявлены статистически достоверные различия в величине ответа на терапию между основной группой и группой сравнения на 12-й мес. (7,7±1,34 против 4,3±1,44 балла соответственно) и за весь период наблюдения в целом (12,6±2,01 против 7,1±2,79 балла соответственно) ($p<0,01$). Более того, у пациентов основной группы в стадии С заболевания достигнут статистически достоверно более выраженный ответ на терапию, чем у всех пациентов группы сравнения вне зависимости от стадии процесса на момент включения в исследование: 7,7±1,34 против 4,5±1,29 балла соответственно на 12 мес. и 12,6±2,01 против 7,05±1,78 балла соответственно за весь период наблюдения в целом.

Приведенные данные свидетельствуют о повышении эффективности терапии в основной группе в результате подбора *in vitro* по результатам оценки химиочувствительности опухолевых клеток в МТТ-тесте. Данная закономерность проявляется во всех стадиях заболевания.

Проанализирована возможность прогнозирования долгосрочного ответа на терапию на раннем этапе (2 недели, 3 мес.) по динамике абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови. Обнаружены статистически достоверные различия в динамике данного показателя у пациентов основной группы на 2-й неделе лечения и на 3-м мес. лечения в группах пациентов с полным ответом (нормализация абсолютного содержания лимфоцитов в периферической крови) на 12-м мес. терапии (n = 62) и с резистентностью к лечению (n = 25) (таблица 3). Для анализа использованы данные пациентов с исходным уровнем лимфоцитов не менее 10×10^9/л.

Таблица 3. — Процент пациентов с различным ответом на терапию через 12 мес.

Характер ответа	Снижение уровня лимфоцитов ПК на 50% и более либо нормализация их числа		Отсутствие динамики либо повышение уровня лимфоцитов ПК	
	2 недели	3 мес.	2 нед.	3 мес.
Нормализация числа лимфоцитов ПК, n = 62	61,3*	96,8*	38,7**	3,2
Резистентность — отсутствие динамики либо повышение лимфоцитов ПК, n = 25	4,0**	4,0	96%	96
Ответ на терапию по уровню лимфоцитов костного мозга — нормализация уровня лимфоцитов костного мозга, n = 29	72*	96,5**	28*	3,5**

Примечания:
1 — * — p<0,01 — достоверность различия от показателей в резистентной групп.
2 — ** — (p<0,001) —достоверность различия от показателей на 3-м мес. терапии.

В группе пациентов с полным ответом на 12-й мес. терапии вероятность отсутствия ответа на 2-й недели лечения составила 38,7%, а на 3-й мес. — 3,2% (p<0,001). Различия между вероятностью отсутствия ответа (38,7%) и вероятностью полного либо частичного ответа (61,3%) на 2-й неделе, а также аналогичными показателями на 3-й мес. лечения (3,2 и 96,8% соответственно) в группе пациентов с полным ответом на 12-й мес. терапии статистически достоверны. Также статистически достоверны различия между вероятностью отсутствия ответа на 2-й неделе и 3-м мес. (96%) и вероятностью полного либо частичного ответа на этих же этапах (4%) в группе резистентных к лечению пациентов.

В группе пациентов с достигнутой к 12-му мес. нормализацией уровня лимфоцитов в костном мозге (критерий полного ответа) вероятность достижения частичного или полного ответа по содержанию лимфоцитов в периферической крови на 2-й неделе лечения составила 72%, а вероятность резистентности — 28%, на 3-й мес. лечения — соответственно 96,5 и 3,5% (p<0,01).

Таким образом, возможно прогнозирование сохранения частичного либо полного ответа на терапию до 12 мес. при достижении частичного либо полного ответа по содержанию лимфоцитов в ПК на 2-й неделе лечения (с вероятностью ошибки 1,7%) с подтверждением (с вероятностью ошибки 1%) на 3-й мес. лечения.

Отсутствие частичного либо полного ответа по содержанию лимфоцитов в периферической крови на 2-й неделе лечения позволяет прогнозировать резистентность к терапии с вероятностью 32%; аналогичная ситуация на 3-й мес. лечения позволяет прогнозировать резистентность к терапии с вероятностью 72,7%, при этом вероятность достижения полного ответа составляет лишь 6,1%. Статистическая достоверность различий между вероятностью резистентности к терапии пациентов без ответа на 2-й неделе и 3-м мес. лечения (32 и 72,7% соответственно), а также между вероятностью полного ответа на 12-й мес. у пациентов, не ответивших на 2-й неделе и 3-м мес. (32 и 6,1% соответственно), указывает на обоснованность принятия решения о смене терапии по факту резистентности на 3-й мес., но не на 2-й неделе лечения.

Заключение. Выбор терапии хронического лимфолейкоза по результатам оценки химиочувствительности опухолевых клеток *in vitro* в МТТ-тесте позволяет улучшить клинический ответ на нее на всех этапах лечения. Данная закономерность проявляется независимо от стадии заболевания и применяемого протокола лечения.

Возможно прогнозирование отдаленных результатов лечения ХЛЛ по качеству ответа на начальном этапе терапии. Обоснованным следует считать принятие решения о смене терапии по качеству ответа (резистентности) на 3-м мес. лечения.

Литература

1. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia / M.J. Keating [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 18. — P. 4079–4088.

2. Chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab for relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia / W. Wierda [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 18. — P. 4070–4078.

3. Лекарственная чувствительность лейкозных клеток *ex vivo* и прогнозирование ответа пациентов с ХЛЛ на терапию / А.И. Свирновский [и др.] // Здравоохранение. — 2010. — № 3. — С. 57–60.

4. O'Gorman, D.M. Molecular signals in anti-apoptotic survival pathways / D.M. O'Gorman, T.G. Cotter // Leukemia. — 2001. — Vol. 15, № 1. — P. 21–34.

5. Early prediction of outcome and response to alemtuzumab therapy in chronic lymphocytic leukemia / A.C. Rawstron [et al.] // Blood. —2004. — Vol. 103, № 6. — P. 2027–2031.

6. Eradication of minimal residual disease in B-cell chronic lymphocytic leukemia after alemtuzumab therapy is associated with prolonged survival / P. Moreton [et al.] // J. Clin. Oncol. — 2005. — Vol. 23, № 13. — P. 2971–2979.

7. Прогнозирование и мониторинг эффективности химио- и иммунотерапии хронического лимфолейкоза / А.Л. Усс [и др.] // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. — 2011. — № 4. — С. 47–53.

8. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment / B.D. Cheson [et al.] // Blood. — 1996. — Vol. 87, № 12. — P. 4990–4997.

PERSONALIZED THERAPEUTIC APPROACH TO CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA THAT MAY BE BASED ON THE EVALUATION OF CHEMOSENSITIVITY OF LEUKEMIA CELLS FOR EARLY RESPONSE TO THERAPY AND IMPROVING THE EFFICIENCY OF TREATMENT

Smirnova L.A.[1], Svirnovsri A.I.[3], Tsvirko D.G.[1], Kolbasko L.V.[2], Pasyukov V.V.[3], Svirnouskaya E.L.[3], Taras I.B.[3], Sergievich O.V.[3], Feduro N.A.[3], Bakun A.V.[2]

[1]State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus;
[2]Institution of Health "9th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus;
[3]State Institution "Republican Science & Practice Centre for Transfusiology & Medical Biotechnologies", Minsk, Republic of Belarus

It was analyzed the efficiency of the selected therapy based on the results of chemosensitivity of tumor cells detected in vitro by the MTT assay in 115 CLL patients in comparison with the control group (30 CLL patients treated without chemotherapy selection *in vitro*). The obtained data showed the efficiency of therapy in the group under study because of selected drugs. This pattern may be used regardless of the disease stage and adequate treatment protocol. The possibility of prediction of long-term response in CLL patients to chemotherapy at the early disease stage (2 weeks — 3 months) in connection with the dynamic of absolute peripheral blood lymphocyte count is of significance for the clinical decision to review therapy on the 3-rd month.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, chemosensitivity, prediction.

ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА, АССОЦИИРОВАННОГО С ИНФЕКЦИЕЙ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

Талако Т.М.[1], Буторина И.И.[2], Варонько И.А.[1], Сорока Н.Ф.[1]

[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;
[2]Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В настоящее время особое внимание врачей и исследователей занимает хроническая хламидийная инфекция (*Chlamydia trachomatis*) у пациентов с ревматоидным артритом (РА). Присутствие *C. trachomatis* у пациентов с РА играет существенную роль, придавая артриту своеобразную клиническую симптоматику, оказывая влияние на эффективность традиционно применяемых лекарственных средств. Работа посвящена изучению содержания отдельных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в периферической крови на разных стадиях РА, ассоциированного с хламидийной инфекцией, их взаимосвязи с активностью РА. Показана ведущая роль Т-регуляторных клеток, НКТ-клеток и В-лимфоцитов.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, Т-регуляторные клетки, НКТ-клетки, В-лимфоциты, DAS28.

Введение. Среди системных заболеваний соединительной ткани особое место принадлежит РА. Он характеризуется медленным, но неуклонным прогрессированием, сопровождающимся повреждением суставов, жизненно важных органов и систем [1]. Распространенность хламидийной инфекции значительно увеличилась во всем мире. Установлено, что РА протекает на фоне сопутствующей хламидийной инфекции не реже чем в 15% случаев [2]. Проблема хламидийной инфекции у пациентов с РА требует дальнейшего изучения для разработки эффективного метода лечения.

Вовлечение иммунной системы в патогенез РА не ограничивается лишь воспалением. Имеются сообщения о роли В-лимфоцитов в возникновении локального синовита, об изменениях уровня отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови (ПК) при РА [3]. Среди Т-лимфоцитов особое внимание уделяют Т-регуляторным клеткам (Трег), которые контролируют иммунный гомеостаз посредством супрессии пролиферации и продукции цитокинов иными Т-клетками, подавляя (ауто)иммунный ответ. Изменение количества и функциональной активности Трег в ПК пациентов обнаружены при таких аутоиммунных заболеваниях как рассеянный склероз, РА, сахарный диабет 1 типа [4]. Однако их взаимосвязь с клиническими проявлениями РА изучена мало.

Цель работы — изучение содержания отдельных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов в периферической крови пациентов на разных стадиях РА, ассоциированного с хламидийной инфекцией, оценка взаимосвязи с активностью заболевания.

Материалы и методы. В исследование были включены 43 пациента с РА, ассоциированным с хламидийной инфекцией, в возрасте от 24 до 60 лет (6 мужчин и 37 женщин), которые поступили для стационарного лечения в отделение ревматологии УЗ «9-я городская клиническая больница» г. Минска. Пациенты были разделены на группы согласно рентгенологическим стадиям РА (по Штейнброкеру): со II стадией — 16 пациентов, с III стадией — 17 пациентов, с IV стадией — 10 пациентов. Длительность РА составила от 2 до 20 лет. Наличие *C. trachomatis* было подтверждено при исследовании соскоба из цервикального канала и/или уретры методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или исследованием синовиальной жидкости (СЖ): культуральным методом или методом ПЦР. Противовоспалительная терапия пациентов включала назначение сульфасалазина в качестве медленно действующего лекарственного средства в дозе 2,0 г/сут, метилпреднизолона — 6–12 мг/сут, мелоксикама — 15 мг/сут. Активность РА оценивалась с использованием индекса 28 суставов — Disease Activity Index 28 (DAS28). В нем учитываются следующие параметры: число болезненных и припухших суставов из 28, скорость оседания эритроцитов и общее состояние здоровья пациента.

В ПК пациентов на разных рентгенологических стадиях РА определяли уровень В-лимфоцитов (CD19+), В-клеток с маркерами поздней активации (CD19+CD21+CD72+), а также отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов: Т-хелперов (CD4+), Т-супрессоров (CD8+), Трег (CD4+CD25+CD127-), Т-клеток с фенотипом натуральных киллерных клеток (НКТ-клеток) (CD3+CD16+CD56+). Указанные клеточные популяции были выбраны для анализа согласно данным литературных источников как имеющие значение и подвергающиеся значимым колебаниям при хронической хламидийной инфекции и обострении РА. Фенопирование клеточных субпопуляций проводили с использованием моноклональных антител к поверхностным рецепторам лимфоцитов человека, меченные флуоресцентными метками: CD3, CD4, CD8, CD16, CD19,

CD21, CD25, CD45, CD56 (ExBio, Чехия), CD72, CD127 (Beckton Dickinson, США) согласно рекомендациям производителя. После добавления буфера, лизирующего эритроциты, пробы дважды отмывали в холодном фосфатном буфере и немедленно анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan (Beckton Dickinson, США). Содержание указанных клеточных субпопуляций определяли также в периферической крови 30 доноров крови Республики Беларусь в возрасте от 25 до 55 лет для определения физиологических границ исследуемых показателей у практически здоровых лиц, а также использовали рекомендованные границы согласно литературным источникам [5]. В частности, абсолютное содержание CD19+CD21+CD72+-клеток в периферической крови практически здоровых лиц составило 1,33 (0,89–1,79)×10^9/л, относительное — 87,8 (72,5–88,5)%; абсолютное содержание CD3+CD16+CD56+-клеток — 0,11 (0,06–0,23)×10^9/л, относительное — 6,15 (3,7–11,25)%. Содержание остальных изучаемых клеточных субпопуляций отражено в литературных источниках и согласуется с собственными данными.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 10.0. Результаты количественных параметров обрабатывались непараметрическими методами статистики, т. к. их распределение не подчинялось закону нормального распределения. Различия между тремя независимыми группами оценивали методом ANOVA по Краскеллу–Уоллису, различия между двумя независимыми группами оценивали с использованием теста Манна–Уитни. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента корреляции Спирмена (Р). Данные представлены в виде медиан (Me) и межквартильного интервала: 25–75 (Q1–Q3). Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты и их обсуждение. В ПК пациентов определяли относительное и абсолютное количество вышеуказанных клеточных популяций. Различия оценивались среди абсолютных значений (таблица 1).

Таблица 1. — Содержание лимфоцитов и их субпопуляций в периферической крови пациентов с разными стадиями ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией

Анализируемый параметр	Содержание лимфоцитов и их субпопуляций в зависимости от стадии ревматоидного артрита		
	Стадия II	Стадия III	Стадия IV
CD4+, 10^9/л (%)	0,91 (0,65–1,08) (47,6 (37,0–53,2))	0,88 (0,59–1,08) (46,0 (40,7–52,2))	0,94 (0,64–1,17) (45,8 (41,4–56,9))
CD8+, 10^9/л (%)	0,44 (0,31–0,60) (23,5 (17,8–28,9))	0,43 (0,32–0,58) (23,4 (21,6–26,6))	0,57 (0,32–0,74) (26,1 (21,4–31,0))
CD4+CD25+CD127-, 10^9/л (%)	0,02 (0,01–0,02) (0,9 (0,5-1,2))	0,01 (0,01–0,02) (0,9 (0,3–1,1))	0,01 (0,01–0,02) (0,6 (0,3–0,9))
CD19+, 10^9/л (%)	0,16 (0,10–0,25)* (9,1 (5,32–13,47))	0,11 (0,08–0,17) (6,6 (4,9–9,4))	0,14 (0,06–0,21) (5,5 (3,6–9,3))
CD19+CD21+CD72+, 10^9/л (%)	0,15 (0,05–1,51) (77,3 (72,0–82,0))	1,00 (0,09–1,41) (79,9 (60,2–86,9))	0,16 (0,07–1,82) (77,6 (51,0–87,4))
CD3+CD16+CD56+, 10^9/л (%)	0,13(0,07–0,20)*, ** (6,3 (4,9–9,0))	0,08 (0,05–0,10) (6,9 (3,7–9,1))	0,04 (0,01–0,10) (6,2 (3,4–7,5))

Примечания:
1 — * — $p<0,05$ между II и III стадиями.
2 — ** — $p<0,05$ между II и IV стадиями.

Относительное содержание CD4+, CD8+, CD19+CD21+CD72+ и CD3+CD16+CD56+–клеток в ПК пациентов с РА, ассоциированным с хламидийной инфекцией, находилось в пределах физиологической нормы согласно литературным и собственным данным. Количество CD19+-клеток и Трег было в несколько раз ниже физиологической нормы, особенно на III и IV стадиях заболевания. Значимых различий между разными стадиями РА по относительному уровню исследованных клеток в ПК выявлено не было.

Абсолютное количество CD4+ и CD8+-клеток в ПК пациентов находилось в допустимых пределах. Количество CD19+-клеток, CD19+CD21+CD72+-клеток и Трег на всех стадиях РА, а также содержание CD3+CD16+CD56+-клеток на IV стадии заболевания было в несколько раз ниже физиологической нормы. По современным представлениям, развитие аутоиммунных заболеваний, в т. ч. и РА, связано нарушением супрессорных механизмов, контролирующих толерантность Т- и В-лимфоцитов к аутоантигенам. Активированные аутореактивные клетки индуцируют воспаление и повреждение собственных тканей организма.

Выявлены следующие значимые различие между исследуемыми параметрами на разных стадиях РА, ассоциированного с хламидийной инфекцией:

- абсолютное количество CD19+-клеток было выше в ПК пациентов со II стадией заболевания по сравнению с III стадией ($p = 0,028$);
- абсолютное количество CD3+CD16+CD56+-клеток было выше в ПК пациентов со II стадией заболевания по сравнению с III стадией ($p = 0,001$);
- абсолютное количество CD3+CD16+CD56+-клеток было выше в ПК пациентов со II заболевания по сравнению с IV стадией ($p = 0,006$).

Практически все виды иммунных клеток и медиаторов воспаления в разное время вовлечены в развитие РА. Как было показано в исследованиях ранее, В-лимфоциты участвуют в активации CCD4+-клеток по типу Т-хелперов 1, выполняя функции специфических антиген-презентирующих клеток. Обсуждают эффекторную роль В-клеток в развитии су-

ставной деструкции. Этот процесс реализуется за счет синтеза провоспалительных цитокинов, а также интерлейкина-6 и интерлейкина-10, оказывающих дополнительной стимулирующее действие на В-лимфоциты [6].

НКТ-клетки, экспрессирующие поверхностные маркеры, характерные и для Т-клеток, и для натуральных киллерных клеток, в настоящее время рассматриваются в качестве связующего звена между врожденным и приобретенным иммунным ответом. Такие НКТ-клетки могут быть активированы по антиген-зависимому и антиген-независимому механизму, продуцируя в большом количестве разнонаправленные цитокины (γ-интерферон, α-фактор некроза опухоли, β-трансформирующий фактор роста, интерлейкины-2, 4, 5, 6, 10, 13, 17, 21 и др.) [7].

Таким образом, они проявляют и провоспалительные, и иммунорегуляторные свойства, что позволяет НКТ-клеткам играть важную роль при инфекционных заболеваниях, аллергии, опухолевых процессах и аутоиммунных заболеваниях. Согласно литературным источникам содержание НКТ-клеток значительно снижается при наличии инфекционной патологии [7]. Снижение абсолютного уровня НКТ-клеток на III и IV стадиях РА, ассоциированного с хламидийной инфекцией, по сравнению со II стадией заболевания может выступать косвенным свидетельством сохранения инфекционного агента в организме и поддержанию или даже усилению аутоиммунного воспаления.

При корреляционном анализе выявлена связь между содержанием CD19+ В-лимфоцитов в ПК и индексом активности РА DAS28, а также отдельных клеточных субпопуляций в ПК между собой на III стадии заболевания (таблица 2).

Таблица 2. — Корреляционные взаимосвязи между клеточными субпопуляциями периферической крови и индексом DAS28 на разных стадиях ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией

Стадия РА	Параметры сравнения		Коэффициент корреляции Спирмена (R)	Значимость, p
II	CD19+, 10^9/л	DAS28	0,50	0,010
III	CD4+CD25+CD127-, 10^9/л	CD19+, 10^9/л	0,53	0,009
	CD4+CD25+CD127-, 10^9/л	CD3+CD16+CD56+, 10^9/л	0,56	0,009
IV	CD19+, 10^9/л	DAS28	-0,63	0,009
Примечание — показаны корреляционные связи средней силы с высокой степенью значимости.				

Выявлена разнонаправленная взаимосвязь между CD19+-клетками и индексом активности DAS28 на разных стадиях РА, ассоциированного с хламидийной инфекцией. Можно предполагать, что на раннем этапе заболевания преобладает активация В-лимфоцитов и особенно значимо воздействие инфекционного агента, а на этапе сформировавшегося иммунопатологического процесса роль хламидийной инфекции может уменьшаться, а артрит продолжает развиваться по законам самоподдерживающегося аутоиммунного процесса.

Заключение. Содержание В-лимфоцитов выше в периферической крови пациентов со II стадией по сравнению с III стадией, а содержание НКТ-клеток выше на II стадии по сравнению с III и IV стадиями ревматоидного артрита, ассоциированного с хламидийной инфекцией. Выявлена статистически значимая средней силы взаимосвязь содержания В-лимфоцитов с индексом активности DAS28: прямая — на II стадии, обратная — на III стадии заболевания.

Литература

1. Насонов, Е.Л. Современные проблемы иммунопатологии ревматических заболеваний / Е.Л. Насонов // Рос. мед. вести. — 2001. — № 2. — С. 67–69.

2. Сорока, Н.Ф. Ревматоидный артрит, ассоциированный с хламидийной инфекцией / Н.Ф. Сорока // Здравоохранение. — 2009. — № 1. — С. 15–19.

3. Smoleńska, Ż. Disease activity in patients with long-lasting rheumatoid arthritis is associated with changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations / Ż. Smoleńska, J. Pawłowska, A. Daca // Pol. Arch. Med. Wewn. — 2012. — Vol. 122, № 12. — P. 591–598.

4. Fontenot, J.D. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor FoxP3 / J.D. Fontenot, A.Y. Rudensky // Nat. Immunol. — 2005. — Vol. 4, № 6. — P. 331–337.

5. Хайдуков, С.В. Цитометрический анализ в клинической иммунологии / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка, В.А. Черешнев. — Екатеринбург: УрО РАН, 2011. — 220 с.

6. Ревматология: нац. рук. / Под редакцией Е.Л. Насонова, В.А. Насоновой. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. — С. 290–331.

7. Invariant NKT Cells: Regulation and Function during Viral Infection [Electronic resource] // PLoS Pathog. — Mode of access: http://www.plospathogens.org. — Date of access: 12.11.2015.

LYMPHOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD AND ACTIVITY OF RHEUMATIOD ARTHRITIS ASSOCIATED WITH CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTION

Talako T.M.[1], Butorina I.I.[2], Varonko I.A.[1], Soroka N.F.[1]

[1]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;
[2]Institution of Health "9th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

Nowadays clinicians and researchers dedicate great attention to chronic Chlamydia trachomatis infection in patients with rheumatoid arthritis (RA). The presence of C. trachomatis has influence on clinical findings and the effectivity of traditionally used therapy. The paper analyzes the level of some subpopulations of T- and B-lymphocytes in peripheral blood and their correlation disease activity index DAS28 at different R-stages of RA associated with C. trachomatis infection. We demonstrate the leading hand of T regulatory cells, NKT cells and B cells.

Keywords: rheumatoid arthritis, T regulatory cells, NKT cells, B lymphocytes, DAS28.

ЭФФЕКТ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Федулов А.С.[1], Зафранская М.М.[2], Борисов А.В.[1], Нижегородова Д.Б.[2], Кривенко С.И.[3], Качан Т.В.[1]

[1]Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;
[2]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь;
[3]Учреждение здравоохранения «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Одним из перспективных направлений терапии рассеянного склероза (РС) является использование аутологичной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Клинические испытания уже продемонстрировали безопасность и эффективность применения МСК без использования пациентами специального режима образа жизни. Однако действие МСК в организме ограничено, в связи с чем возникает необходимость в повторном введении МСК для поддержания эффекта клеточной терапии. В данной статье представлены результаты мониторинга клинико-неврологических и иммунологических показателей у пациентов с РС после однократной и двукратной трансплантации аутологичных МСК, которые впоследствии могут являться основой для разработки критериев терапевтической эффективности клеточной терапии.

Ключевые слова: рассеянный склероз, аутологичная трансплантация, мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия.

Введение. Рассеянный склероз (РС) является тяжелым хроническим воспалительно-дегенеративным аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы, которое характеризуется разрушением миелина и олигодендроцитов CD4+Т-клетками, CD8+Т-клетками и макрофагами, что приводит к воспалительной реакции, рубцеванию белого вещества и, как следствие, неврологическим нарушениям и тяжелой инвалидизации [1].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) открывают новые перспективы терапии неврологических заболеваний. Анализ литературных данных показывает, что терапевтический потенциал МСК при РС заключается в эффектах иммуномодуляции (ингибирование энцефалитогенных Т- и В-лимфоцитов, активация регуляторных клеток), репарации или ремиелинизации (активация процессов олигодендрогенеза и образование новой миелиновой оболочки) и нейропротекции (защита нейронов и олигодендроцитов от клеточной гибели за счет трофических факторов, а также трансдифференцировки и активации эндогенных нервных стволовых клеток) [2].

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению иммуномодулирующих, регенеративных и трансдиференцировочных свойств МСК *in vitro*, до сих пор дискутируется их взаимосвязь с эффектами *in vivo*, т. к. эффективность клеточной терапии МСК определяется не только источником и качеством МСК, но и ответом организма реципиента на клеточную терапию. Предварительные результаты стартовавших клинических исследований по применению МСК у пациентов с РС указывают на безопасность данного метода лечения, однако до сих пор не определены клинические стандарты использования клеточной терапии, регулируемые на государственном уровне [3]. В связи с этим остаются открытыми вопросы, касающиеся оптимальной терапевтической концентрации МСК, способах введения, путей миграции клеток после инфузии, а также временного интервала действия МСК в организме. Кроме того, изменения функциональной активности лимфоцитов после клеточной терапии оцениваются по узкому спектру параметров с преимущественным анализом экспрессии активационных маркеров на Т-лимфоцитах и дендритных клетках в ранние сроки посттрансплантационного периода.

Цель работы — оценка иммуномодулирующего эффекта аутологичных МСК и динамики клинико-неврологических показателей у пациентов с рецидивно-ремиттирующей формой РС в отдаленный период после одно- и двукратной клеточной терапии.

Материалы и методы. Обследовано 27 пациентов с рецидивно-ремиттирующей формой РС, находившихся на лечении в неврологических отделениях УЗ «9-я ГКБ» г. Минска: 14 пациентам выполнена однократная инфузия аутологичных МСК в количестве 1,75 [1,11÷2,57] млн клеток на 1 кг веса (группа № 1); 7 пациентам выполнена повторная инфузия аутологичных МСК в количестве 1,39 [1,09÷1,94] млн клеток на 1 кг веса с интервалом введения — 9 мес. (группа № 2); группу сравнения составили 13 пациентов, которые получали симптоматическую терапию (группа № 3). Клинико-демографическая характеристика исследуемых групп пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1. — Клинико-демографическая характеристика пациентов с РС (n = 27), *M*±*tm*

Параметр	Группа № 1	Группа № 2	Группа № 3
Клеточная терапия	Однократная инфузия МСК	Двукратная инфузия МСК	–
Количество пациентов	14	7	13
Пол, ж/м	8/5	4/3	5/8
Возраст, годы	30,1±6,8	34,3±4,8	32,8±5,0
Длительность заболевания, годы	3,2±3,1	5,1±4,8	3,1±1,5
EDSS на этапе скрининга, баллы	2,7±1,2	3,1±0,7	2,7±1,2
Количество обострений за год до клеточной терапии	1	2	1

Клинико-инструментальные методы исследования. Неврологический статус пациентов с РС оценивался по расширенной шкале инвалидизации по Куртцке — шкале EDSS (англ. Expanded Disability Status Scale), которая позволяет определить степень неврологического дефицита по 7 функциональным системам: состояние зрительной функции, ствола мозга, пирамидной системы, мозжечка, чувствительности, функции органов малого таза, когнитивных функций.

Нейровизуализационное исследование пациентов осуществляли методом магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга («Philips Intera», Голландия) с индукцией магнитного поля — 1 Тс, толщина срезов — 5 мм. Использовали стандартизованные последовательности МРТ. Для внутривенного усиления вводился парамагнетик омнискан («Amersham Health», Ирландия) в дозе 20–40 мл в зависимости от массы тела. В качестве положительной динамики расценивали исчезновение или уменьшение количества активных очагов демиелинизации при повторных МРТ-исследованиях после клеточной терапии; отсутствие динамики – у пациента не отмечалось новых очагов демиелинизации; отрицательная динамика — возникновение активных очагов после клеточной терапии.

Для оптической когерентной томографии (ОКТ) заднего отрезка глазного яблока использовали оптический когерентный томограф Stratus OCT модель 3000 («CarlZeisMeditec», Германия) с источником света суперлюминесцентным диодом длиной волны 820 нм и следующие протоколы: 1) OpticDisc (сосочек диска зрительного нерва), 2) RNFL Thickness (толщина слоя нервных волокон сетчатки, СНВС). Фотографии глазного дна сделаны при помощи фундус-камеры («CarlZeisMeditec», Германия), системы VISUPAC (два режима съемки: 30 и 45; зона интереса — диск зрительного нерва).

Иммунологические методы исследования. Культуры МСК ранних пассажей выделяли стандартным протоколом, включающим центрифугирование на градиенте плотности и последующее культивирование мононуклеарных клеток костного мозга в культуральной среде DMEM-LG («Gibco», Германия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Gibco», Германия), 1% антибиотика («Gibco», Германия) и 1% L-глютамина («Sigma», Германия). Фенотип культур МСК ранних пассажей определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител CD90-FITC, CD105-PE, CD44-FITC, CD45-PC7, CD34-APC, CD31-PE, CD14-PE и 5-канального проточного цитофлуориметра FC500 («Beckman Coulter», США). Для совместного культивирования и трансплантации использовали МСК ранних пассажей, экспрессирующие стойкий фенотип CD90+/CD105+/CD44+/CD119+/CD45-/CD34-/CD31-/CD14-.

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли путем центрифугирования на градиенте плотности образцов цельной венозной крови, полученных от пациентов с РС на этапе сининга и через 10 дней и 1; 3; 6; 9; 12 мес. после аутологичной трансплантации МСК. Окрашенные флуоресцентным внутриклеточным красителем CFSE («Fluka», Германия) МПК, полученные до клеточной терапии, культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета в культуральной среде RPMI-1640, содержащей 10 мкг/мл рекомбинантного миелин-олигодендроцитарного гликопротеина (рМОГ$_{1–125}$, ГУ РНПЦ ТиМБ), в отсутствии и присутствии МСК ранних пассажей (соотношение МПК:МСК — 10:1) в течение 10 дней в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37°С. Окрашенные CFSE МПК, полученные после клеточной терапии, культивировали в концентрации 2×10^5 клеток/лунку 96-луночного планшета в среде RPMI-1640, содержащей 10 мкг/мл рМОГ$_{1–125}$, в течение 10 дней в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 при 37°С. Клеточную пролиферацию после совместного культивирования регистрировали методом проточной цитофлуориметрии.

Для цитофлуориметрической оценки фенотипа и пролиферации Т-клеток памяти использовали моноклональные антитела CD3-PC7, CD4-PC5, CD8-PC5, CD45RO-ECD («Beckman Coulter», США). Для оценки пролиферативного ответа в соответствии с распределением флуоресценции были установлены границы популяции CD3+Т-клеток среди жизнеспособных лимфоцитов, в пределах которой выделяли субпопуляцию CD3+CD45RO+Т-клеток. Пролиферацию Т-клеток памяти оценивали как процент непролиферирующих ($CFSE^{high}$) и пролиферирующих ($CFSE^{low}$) CD3+CD45RO+Т-клеток после 10 дней культивирования. Результат регистрировали на 50000 событий в пробе.

Степень выраженности ингибирующего влияния МСК на миелин-специфическую пролиферацию Т-клеток памяти *in vitro* оценивали, используя коэффициент супрессии МСК $\boldsymbol{k}_{pMOГ\ in\ vitro}$ (%), который определяли по формуле (1):

$$k = 100 - \frac{П_{Тп+МСК} \times 100}{П_{Тп}}, \quad (1)$$

где $П_{Тп}$+МСК — пролиферация CD3+CD45RO+Т-клеток памяти в ко-культуре МСК и МПК, стимулированной рМОГ$_{1–125}$, %;

$П_{Тп}$ — пролиферация CD3+CD45RO+Т-клеток памяти в культуре МПК, стимулированной рМОГ$_{1–125}$, %.

Для оценки иммуносупрессивного эффекта МСК на миелин-специфическую пролиферацию Т-клеток памяти *in vivo* использовали коэффициент супрессии МСК $\boldsymbol{k}_{pMOГ\ in\ vivo}$ (%), который определяли по формуле (2):

$$k_{pMOГ\ in\ vivo} = 100 - \frac{П_2 \times 100}{П_1}, \quad (2)$$

где $П_1$ — количество пролиферирующих Т-клеток памяти в культуре МПК, полученной до клеточной терапии МСК, в условиях миелиновой стимуляции $p_{МОГ1–125}$, %;

$П_2$ — количество пролиферирующих Т-клеток памяти в культуре МПК, полученной после клеточной терапии МСК, в условиях миелиновой стимуляции $p_{МОГ1–125}$, %;

Статистический метод исследования. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Для характеристики исследуемых групп использовались показатели медианы и интерквартильного интер-

вала *Me (25÷75)*. Сравнение 2 групп и определение статистически значимых различий осуществляли непараметрическим критерием Вилкоксона. Различия признавались значимыми при p<0,05.

Результаты и их обсуждение.

Иммунологические критерии обоснования проведения повторной трансплантации МСК у пациентов с РС

На основании разработанных ранее критериев оценки эффективности клеточной терапии МСК [4] у 14 пациентов с РС предварительно *in vitro* проведено совместное культивирование МПК с аутологичными МСК для определения коэффициентов МСК-опосредованной супрессии миелин-специфической пролиферации Т-клеток памяти ($k_{pMOГ\ in\ vitro}$). Медиана $k_{pMOГ\ in\ vitro}$ у пациентов с РС составила 50,5% (46,8%÷56,9%). При этом полученные величины $k_{pMOГ\ in\ vitro}$ превышали референтное значение ($k_{pMOГ\ in\ vitro}$ ≥41,3%), что позволило использовать аутологичные культуры МСК пациентов с РС в количестве 1,75 [1,11÷2,57] млн клеток на кг веса для клеточной терапии [5].

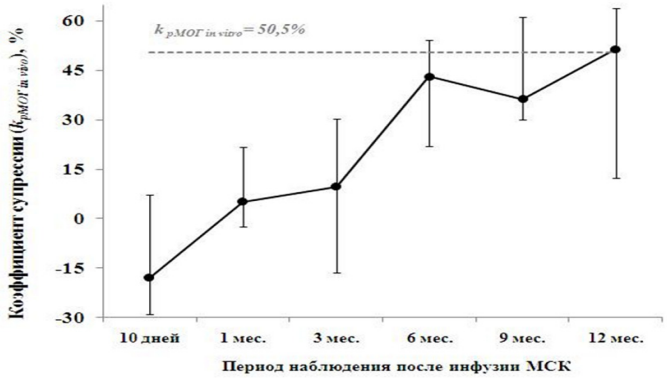
В период наблюдения у пациентов с РС проводился мониторинг количества и миелин-специфической пролиферации субпопуляций Т-клеток памяти с последующим расчетом коэффициента супрессии пролиферации МСК *in vivo* ($k_{pMOГ\ in\ vivo}$) через 10 дней и 1; 3; 6; 9; 12 мес. после инфузии МСК. Динамика количества Т-клеток памяти у пациентов с РС после клеточной терапии аутологичными МСК представлена в таблице 2. Через 10 дней после клеточной терапии установлено статистически значимое снижение CD3+45RO+Т лимфоцитов, в основном, за счет субпопуляции CD4+45RO+ Т-клеток. Выявленная тенденция сохранялась на протяжении 9–12 мес. периода наблюдения.

Таблица 2. — Динамика количества циркулирующих Т клеток-памяти (%) в периферической крови пациентов с РС (n = 14) после клеточной теарпии аутологичными МСК, *Me (25÷75)*

Фенотип лимфоцитов	До лечения	Период наблюдения после инфузии МСК					
		10 дней	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.	12 мес.
CD3+45RO+	28,1 22,6÷37,6	24,0* 18,6÷36,9	27,0 20,5÷39,6	27,0 16,5÷32,4	25,7 20,6÷34,8	23,1* 19,2÷31,6	23,3** 15,1÷35,4
CD4+45RO+	32,9 27,0÷45,1	29,1* 22,8÷41,5	30,3** 23,5÷45,1	31,8* 19,5÷40,0	31,1* 22,7÷43,3	27,8 22,9÷42,4	30,7* 19,0÷45,0
CD8+45RO+	15,5 12,8÷22,9	15,1 10,2÷24,0	15,4 13,5÷24,5	15,5 8,8÷24,3	15,5 13,6÷21,7	13,2* 10,0÷18,4	12,9* 9,3÷19,1

Примечания:
1 — * — статистически значимые различия с уровнем достоверности *p<0,05.*
2 — ** — *p<0,01* указаны по отношению к количеству Т-клеток памяти до клеточной терапии.

На рисунке представлена динамика коэффициентов супрессии миелин-стимулированной пролиферации Т-клеток памяти у пациентов с РС после однократной инфузии аутологичных МСК в посттрансплантационном периоде.



Пунктирной линией указан коэффициент супрессии антиген-специфической пролиферации Т-лимфоцитов МСК у пациентов с РС при *in vitro* исследовании до проведения клеточной терапии

Рисунок — Динамика коэффициентов супрессии МСК антиген-специфической пролиферации Т-клеток памяти ($k_{pMOГ\ in\ vivo}$) после аутологичной трансплантации МСК у пациентов с РС (n = 14)

У пациентов с РС к 6–9 мес. периода наблюдения установлено статистически значимое увеличение коэффициента супрессии МСК $k_{pMOГ\ in\ vivo}$, соответственно, до 43,1% (22,1±54,3%) и 36,4% (30,2±61,2%) (p<0,01) и достижение величины $k_{pMOГ\ in\ vivo}$ уровня значения $k_{pMOГ\ in\ vitro}$ к году после трансплантации ($k_{pMOГ}$ 12 мес. = 51,5%, $k_{pMOГ\ in\ vitro}$ = 50,5%), что позволяет предположить определенное *in vivo* селективное действие МСК на миелин-стимулированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Таким образом, для подержания эффекта клеточной терапии у пациентов с РС целесообразна повторная трансплантация аутологичных МСК в период 9–12 мес. после первичной инфузии клеточных культур при условии получения значений коэффициентов супрессии МСК миелин-специфической пролиферации Т-клеток памяти в диапазоне 36,4% (30,2±61,2%).

Клинико-неврологическая характеристика пациентов с РС после однократной и повторной трансплантации МСК

В результате анализа неврологического статуса пациентов с РС, которым выполнена однократная (группа № 1) или двукратная (группа № 2) клеточная терапия, в обеих исследуемых группах выявлена стабилизация степени выраженности неврологического дефицита по шкале EDSS в период 9–12 мес. после первой инфузии МСК. У пациентов с РС, проходивших нейрометаболическую и симптоматическую терапию (группа № 3), регистрировалось увеличение неврологического дефицита на 0,5 баллов и количества экзацербаций как по сравнению с данными исходного скрининга ($p<0,01$), так и относительно пациентов группы № 1 ($p<0,05$). Сравнительная характеристика выраженности инвалидизации между пациентами, прошедших однократную и повторную инфузию МСК, не показала статистически значимых отличий через 12 мес. наблюдения (таблица 3).

Таблица 3. — Динамика клинико-неврологических показателей пациентов с РС

Пациенты с РС	EDSS, баллы		Количество острых очагов демиелинизации (МРТ)			Толщина СНВС, мкм	
	до лечения	12 мес.	до лечения	6 мес.	12 мес.	до лечения	12 мес.
Группа № 1	2,25±0,5	2,25±0,7	7 (50,0%)	6 (42,8%)	4 (28,5%)	86,5±12,7	88,6±13,9
Группа № 2	3,0±0,8	3,0±0,6	8 (71,4%)	3 (42,8%)	1 (14,3%)	82,4±13,2	90,5±15,1
Группа № 3	2,5±0,7	3,0±0,6**	12 (53,8%)	14 (84,6%)	19 (92,3%)	87,3±14,1	81,8±16,7
Примечание — ** — статистически значимые различия с уровнем достоверности $p<0,01$.							

По данным МРТ головного мозга у пациентов с РС, которым выполнена трансплантация МСК (группы №№ 1 и 2), установлено статистически значимое снижение числа активных очагов демиелинизации: на этапе скрининга регистрировалось 15 очагов, через 6 мес. — 9, спустя 1 год — 5, относительно группы сравнения ($p<0,05$). Сравнительная характеристика динамики снижения очагов демиелинизации у пациентов с одно- и двукратной клеточной терапией МСК показала, что после повторной инфузии клеток отмечалась более выраженная положительная динамика. В то же время у пациентов группы № 3, напротив, количество острых очагов демиелинизации увеличивалось: 12 очагов — на этапе скрининга, 14 — через 6 мес. наблюдения, 19 — через 1 год.

На основании полученных данных рассчитан относительный риск возникновения активных очагов после проведения клеточной терапии по сравнению с применением лечения по традиционным протоколам, который составил 0,250 (95% ДИ 0,064–0,974). Следовательно, относительный риск появления активных очагов после инфузии МСК в 4,0 раза (95% ДИ 1,027–15,625) ниже, чем при использовании симптоматической терапии. Относительный шанс появления активных очагов после аутологичной трансплантации МСК составил 0,63 (95% ДИ 0,006–0,644) от шансов возникновения таких очагов при применении симптоматической терапии. Абсолютное увеличение пользы у трансплантируемых пациентов составило 60,0% (95% ДИ 22,7–97,3%) по сравнению с пациентами группы № 3.

По данным ОКТ отмечалась положительная динамика восстановления СНВС как среди пациентов, которые проходили однократную клеточную терапию, так и после повторной трансплантации (таблица 2). Однако после повторной трансплантации пациенты с РС имели более выраженную тенденцию к положительной динамики утолщения СНВС (82,4±13,2 до 90,5±15,1 мкм), чем после однократной инфузии МСК (с 86,5±12,7 до 88,6±13,9 мкм).

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о длительной положительной динамике клинико-неврологических показателей у пациентов с РС после однократной и двукратной клеточной терапии. Среди пациентов, которым трансплантация МСК проводилась повторно имели место более выраженные положительные изменения параметров нейровизуализациии ОКТ. Следовательно, повторная аутологичная трансплантация МСК у пациентов с РС позволяла получить лучший клинический эффект по сравнению с однократной инфузией МСК.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о клинической эффективности трансплантации аутологичных МСК у пациентов с рецидивно-ремиттирующей формой РС и обоснованности использования у пациентов с данной патологией повторной клеточной терапии МСК. Среди пациентов, прошедших трансплантацию аутологичных МСК, отмечалась стабилизация неврологической симптоматики, которая выражалась в более низких показателях выраженности инвалидизации по шкале EDSS по сравнению с группой пациентов, которым осуществлялась симптоматическая терапия, за период наблюдения 1 год. Результаты исследования МРТ головного мозга отражают положительную динамику в отношении снижения активности процесса демиелинизации у пациентов после аутологичной трансплантации МСК. Среди пациентов, прошедших повторную клеточную терапию МСК, отмечалось более выраженное снижение количества активных очагов демиелинизации, чем у пациентов, которым трансплантация выполнялась однократно.

На основании полученных данных предложен методологический подход к оценке иммуномодулирующего действия клеточной терапии у пациентов с РС, основанный на предварительной *in vitro* оценке иммуносупрессивного потенциала МСК и определении после аутологичной трансплантации МСК фенотипических маркеров и миелин-стимулированной пролиферации Т-клеток памяти в динамике. Установлено, что повторная трансплантация аутологичных МСК целесообразна для подержания эффекта клеточной терапии у пациентов с РС в период 9–12 мес. после первичной инфузии клеточных культур МСК при условии получения значений коэффициентов супрессии МСК миелин-специфической пролиферации Т-клеток памяти в диапазоне 36,4% (30,2÷61,2%).

Литература

1. Dendrou, C. Immunopathology of multiple sclerosis / C. Dendrou, L. Fugger and M. Friese // Nat. Rev. Immunol. — 2015. — Vol. 15, № 9. — P. 545–558.

2. Saeed, S. The use of mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis: an overview of open labels and ongoing studies / S. Saeed, A. Sepehry, O. Joe // J. Neurol. Neurophysiol. — 2014. — Vol. 5, iss. 4. — P. 1–8.

3. The role of stem cell therapy in multiple sclerosis: an overview of the current status of the clinical studies / R. Meamar [et al.] // Adv. Biomed. Res. — 2016. — Vol. 16, № 5. — P. 46–61.

4. *In vitro* assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients / M. Zafranskaya [et al.] // Immunol. Letters. — 2013. — Vol. 149, iss. 1–2. — P. 9–18.

5. Метод клеточной терапии рассеянного склероза на основе предварительной оценки иммунорегуляторных свойств аутологичных мезенхимальных стволовых клеток инструкуия по применению № 147-1113: утв. М-вом здравоохр. Респ. Беларусь 27.12.2013 / Сост. А.С. Федулов [и др.]. — Минск, 2013. — 11 с.

THE EFFECT OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS IN CELL THERAPY OF MULTIPLE SCLEROSIS

Fedulov A.S.[1], Zafranskaya M.M.[2], Borisov A.V.[1], Nizheharodava D.B.[2], Krivenko S.I.[3], Kachan T.V.[1]

[1]Educational Establishment "The Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus;
[2]State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus;
[3]Institution of Health "9th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

One of perspective directions of multiple sclerosis (MS) treatment is the use of autologous mesenchymal stem cells (MSC). Clinical trials have demonstrated the safety and efficacy of MSC-based therapy without a special regime of patients' lifestyle. However, the action of MSC in the organism is limited, thus a repeated administration of MSC are needed to maintain the effect of cell therapy. In this article the results of clinical, neurological and immunological parameters of monitoring in MS patients after a single and a repeated infusion of autologous MSC are presented, what may be used as a basis for the development of criteria for stem cell therapeutic efficacy.

Objective — to estimate the immunomodulatory effect of autologous MSC, and the dynamics of clinical and neurological parameters in patients with relapsing-remitting form of MS in the remote period after single and repeated cell therapy.

Keywords: multiple sclerosis, autologous transplantation, mesenchymal stem cells, cell therapy.

ПСИХОСОЦИАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ, ПЕРЕНЕСШИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Шалькевич Л.В.[1], Алейникова О.В.[2], Исайкина Я.И.[2], Яковлев А.Н.[3], Дрогайцева Д.В.[4], Тришина Ю.В.[3]

[1]Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь;
[2]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», Минск, Республика Беларусь;
[3]Учреждение здравоохранения «Минский городской центр медицинской реабилитации детей с психоневрологическими заболеваниями», Минск, Республика Беларусь;
[4]Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр "Мать и дитя"», Минск, Республика Беларусь

Реферат. Детский церебральный паралич (ДЦП) приводит к инвалидизации ребенка, создает трудности в профессиональной деятельности лиц, осуществляющих уход за ребенком-инвалидом, накладывает дополнительные финансовые нагрузки на государство, что обусловливает необходимость поиска новых методов реабилитации. Одним из них является трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Эффективность реабилитации определяется не только изменением физического состояния ребенка, но и динамикой его психосоциальных возможностей. Объектом исследования стали 6 пациентов с установленным диагнозом ДЦП спастической и атактической формой 1–2 степени тяжести в возрасте 4–12 лет. Группу сравнения составили 7 пациентов с равнозначными неврологическими нарушениями такого же возраста, прошедшие аналогичный курс реабилитации, но без применения трансплантации МСК. В качестве основных были определены пять критериев: социальная ориентация, зрительно-моторная координация, уровень развития предметно-действенных операций, уровень развития наглядно-образных операций и уровень развития абстрактно-логических операций. Как показал анализ полученных результатов, у пациентов основной группы, прошедших трансплантацию МСК, показатели улучшились на 3–20% от исходного уровня, в то время как в группе сравнения динамика составила 0,35–2,26%.

Ключевые слова: детский церебральный паралич, мезенхимальные стволовые клетки, психосоциальная адаптация.

Введение. Детский церебральный паралич представляет собой симптомокомплекс двигательных расстройств, сочетающийся с умственной недостаточностью, нарушением речи, а также трудностями в психосоциальной адаптации пациентов с данным заболеванием. Проблема реабилитации детей, страдающих ДЦП, является одной из наиболее актуальных в детской неврологии, поскольку данное заболевание приводит к инвалидизации ребенка, создает трудности в профессиональной деятельности лиц, осуществляющих уход за ребенком-инвалидом, накладывает дополнительные финансовые нагрузки на государство. Распространенность ДЦП в Российской Федерации по разным регионам за последние несколько лет составляет от 200 до 900 на 100 тыс населения. В Республике Беларусь в конце 2014 г. общая заболеваемость ДЦП среди детей от 0 до 17 лет составила 231 случай на 100 тыс населения. Многочисленные методики направлены

на корректировку не только двигательных нарушений, но и повышения качества жизни пациентов с данным заболеванием, улучшение их социальной активности и интеграции. Традиционные способы лечения ДЦП не приводят к выздоровлению, а только способствуют улучшению состояние ребенка-инвалида, поскольку не воздействуют на причину развития недуга — поврежденные нейроны и олигодендроциты. В настоящее время в неврологической клинической практике начинается внедрение новых методов лечения, которые связаны с применением стволовых технологий, показавшие положительные результаты в терапии болезни Альцгеймера, инсультов, повреждениях спинного мозга, паркинсонизме, а также аутизме [1–4]. Кроме этого, эффективность применения стволовых клеток была доказана в преклинических испытаниях на животных с моторными отклонениями [5, 6], что послужило стимулом для возможности применения клеточных технологий у пациентов с ДЦП. В современной клинической практике в качестве субстрата стволовой терапии применяются нейрональные, мезенхимальные, гемопоэтические и др. клеточные линии. Наибольший интерес для лечения неврологических заболеваний в детском возрасте вызывают мезенхимальные стволовые клетки, поскольку они демонстрируют высокий пролиферативный потенциал, позволяющий впоследствии получить высококлеточный продукт, отсутствие иммунных реакций у реципиента при применении аллогенных МСК, что доказано их широким применением в лечении аутоиммунных заболеваний и лейкозов у детей. В ЦНС их действие направлено на усиление роста ткани и уменьшение области повреждения и воспаления, активацию ангиогенеза, стимулированию роста аксонов. Несмотря на то, что нервные клетки имеют эктодермальное происхождение, имеются положительные результаты получения их из МСК *in vitro*, что связано с экспрессией в МСК, полученных из костного мозга человека, пронейронального гена Ngn1, ответственного за синтез нейрогенина 1, который индуцирует развитие МСК по нейрогенному пути. Предварительная нейральная дифференцировка МСК *in vitro* комплексом ростовых факторов способствует значительному повышению экспрессии данного гена.

Цель работы — оценка результатов эффективности психосоциальной адаптации пациентов со спастическими и атактическими формами ДЦП, прошедших двухэтапную трансплантацию МСК.

Материалы и методы. Сотрудниками ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии» и УЗ «Минский городской центр медицинской реабилитации детей с психоневрологическими заболеваниями» совместно была разработана методика комплексного лечения пациентов с ДЦП, включающая двухэтапную аллогенную трансплантацию МСК с проведением курсов реабилитации. Трансплантат МСК как для внутривенного, так и для интратекального введения получили из фракции мононуклеарных клеток костного мозга здорового донора. Для интратекального введения дополнительно был использован метод индукции нейродиференцировки МСК: к полученные методом экспансии *in vitro* МСК добавляли EGF и FGF, а затем ретиноевую кислоту.

Объектом исследования стали пациенты с установленным диагнозом ДЦП спастической и атактической формой 1–2 степени тяжести в возрасте 4–12 лет на момент отбора в исследование, с отсутствием судорожных припадков не менее 1 года (или вообще) до момента включения их в исследование, отсутствием сопутствующей ортопедической патологии, требующей хирургического лечения. Группу сравнения составили пациенты с равнозначными неврологическими нарушениями такого же возраста, прошедшие аналогичный курс реабилитации, но без применения трансплантации МСК. Перед и после трансплантации МСК все пациенты основной группы и пациенты группы сравнения проходили предварительное обследование, состоящее из соматического и неврологического осмотров, а также параклинического метода диагностики — стабилометрии и компьютерного видеоанализа походки. Для оценки эффективности психосоциальной адаптации все пациенты основной группы и группы сравнения до и после реабилитационного курса проходили осмотр у психолога. Критерии наблюдения проводимого психологического осмотра представлены в таблице 1.

Таблица 1. — Критерии психологического осмотра

Критерий наблюдения	Балльная оценка
Социальная ориентация	Отношение к людям не отличается от отношения к предметам — 3, слабо реагирует на социальный контакт, не реагирует на посторонних — 2, реагирует на социальный контакт и посторонних с интересом — 1, ориентирован на присутствующих людей — 0
Контактность	Избегает и уходит — 3, нарушена субординация и критичность к себе — 2, постепенное вхождение в контакт — 1, продуктивный — 0
Общительность	Сопротивляется всем предложениям и просьбам — 3, не сопротивляется, но пассивен во взаимодействии — 2,общается, вступает во взаимодействие — 1, инициативен во взаимодействии — 0
Общий эмоциональный фон	Неустойчив (эмоциональная лабильность) — 3, снижен — 2, повышен — 1, стабилен, эмоции адекватные — 0
Активность	Не совершает движений по собственной инициативе — 3, гиперактивные тенденции в поведении — 2, очень активен, но при обследовании может быть спокойным — 1, в ситуации, требующей активности проявляет себя адекватно — 0
Уровень познавательной активности	Низкий — 2, средний — 1, высокий — 0
Работоспособность	Легко устает, раздражается — 3, быстро устает, отказывается — 2, утомление нарастает со временем — 1, долго удерживает работоспособность — 0
Конструктивный праксис	Нарушен зрительно-пространственный операции (тест Кооса): не соответствует возрастной норме — 1, соответствует возрастной норме — 0
Зрительно-моторная координация	Не нарушена — 0, нарушена — 1

Окончание таблицы 1

Критерий наблюдения	Балльная оценка
Внимание	Устойчивое, продуктивное — 0, неустойчиво, рассеянно — 1, низкая произвольность внимания — 2
Аналитический уровень внимания	Соответствует возрасту — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Память	Объем знаний норма — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Объѣм кратковременной оперативной памяти	Норма — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Мышление	Динамика мыслительных операций не нарушена — 0, нарушена — 1
Уровень развития предметно-действенных операций	Норма — 0, снижение — 1, ниже нормы — 2
Уровень развития наглядно-образных операций	Норма — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Уровень развития словесно-логических операций	Норма — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Уровень развития абстрактно-логических операций	Норма — 0, снижен — 1, ниже нормы — 2
Темп психической активности	Норма — 0, нестабилен — 1, низкий — 2

Результаты и их обсуждение. В качестве основных были определены пять критериев: социальная ориентация, зрительно-моторная координация, уровень развития предметно-действенных операций, уровень развития наглядно-образных операций и уровень развития абстрактно-логических операций. Анализ полученных результатов осуществлялся с применением программы Statistica 6.1. У пациентов основной группы прошедших двухэтапную трансплантацию МСК показатели улучшились на 3–20% от исходного уровня, в то время как в группе сравнения такой динамики отмечено не было. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2. — Сравнительная оценка результатов психологического осмотра пациентов основной группы и группы сравнения

Показатель	Основная группа (6 человек)			Группа сравнения (7 человек)		
	до курса реабилитации	после реабилитации	изменение показателя, %	до курса реабилитации	после реабилитации	изменение показателя, %
Социальная ориентация, баллы	1,167	1,237	5,7	0,285	0,286	0,35
Зрительно-моторная координация, баллы	0,333	0,267	20	0,142	0,144	1,4
Уровень развития предметно-действенных операций, баллы	0,333	0,267	20	0,23	0,227	1,3
Уровень развития предметно-действенных операций, баллы	0,333	0,267	20	0,442	0,432	2,26
Уровень развития наглядно-образных операций, баллы	0,833	0,767	8	0,143	0,133	2
Уровень развития абстрактно-логических операций, баллы	1,75	1,688	3,57	0,60	0,591	1,66

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют, что включение в комплексное лечение детей с ДЦП метода двухэтапной трансплантации МСК, заключающейся во внутривенном и интратекальном введении стволовых клеток, является эффективным и улучшает показатели психосоциальной адаптации пациентов, что подтверждается наличием их положительной динамики у пациентов, получивших дополнительно трансплантацию МСК, по сравнению с пациентами, прошедшими только стандартный реабилитационный курс.

Литература

1. Autologous bone marrow stem cell therapy shows functional improvement in hemorrhagic stroke: a case study / A. Sharma [et al.] // Ind. J. Clin. Pract. — 2012. — Vol. 23, № 2. — P. 100–105.

2. Detailed analysis of the clinical effects of cell therapy for thoracolumbar spinal cord injury: an original study / A. Sharma [et al.] // J. Neurorestoratol. — 2013. — Vol. 1. — P. 13–22.

3. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for autism: an open label proof of concept study / A. Sharma [et al.] // Stem Cells International. — 2013. — Vol. 2013. — P. 1–13.

4. Positron emission tomography-computer tomography scan used as a monitoring tool following cellular therapy in cerebral palsy and mental retardation — a case report / A. Sharma [et al.] // J. Clin. Case Rep.— 2013. — Vol. 2013. — P. 1–6.

5. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats / K. Rosenkranz [et al.] // Cell Tissue Res. — 2012. — Vol. 348, № 3. — P. 429–438.

6. Study on functional recovery of hypoxic-ischemic brain injury by Rg1-induced NSCs / Y. Li [et al.] // China J. Chin. Materia Med. — 2012. — Vol. 37, № 4. — P. 509–514.

PSYCHOSOCIAL ADAPTATION OF PATIENTS WITH CEREBRAL PALSY AFTER APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Shalkevich L.V.[1], Aleynikova O.V.[2], Isaykina YA.I.[2], Yakovlev A.N.[3], Drahaitsava D.V.[4], Trishina Y.V.[3]

[1]State Educational Institution "The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education", Minsk, Republic of Belarus;
[2]State Institution "Republican Scientific & Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology & Immunology", Minsk, Republic of Belarus;
[3]Institution of Health "Minsk City Center of Medical Rehabilitation of Children with Psychoneurological Diseases", Minsk, Republic of Belarus;
[4]State Institution "Republican Science & Practice Centre "Mother and Child", Minsk, Republic of Belarus

There has currently been developed a set of rehabilitation techniques for patients with cerebral palsy (CP). One of them is transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs). The purpose of the research is the assessment of efficiency of psychosocial adaptation of patients with CP after transplantation MSCs. 6 patients with spastic and atactic forms of CP of severity 1–2 at the age of 4–12 years after rehabilitation course and transplantation of MSCs became object of the research. The control group was made by 7 patients with equivalent neurologic disturbances and age parameters that completed a similar rehabilitation course. Five main criteria were defined as follows: social orientation, visual motor coordination, level of development in detail–effective operations, level of development visually figurative operations and level of development of abstract and logical operations. In patients of main group indicators improved by 3–20% of initial level, while in control group dynamics had made 0.35–2.26%.

Keywords: Cerebral palsy, mesenchymal stem cells, psychosocial adaptation.

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ

Щерба А.Е.[1], Коротков С.В.[1], Ефимов Д.Ю.[1], Лебедь О.А.[1], Коритко А.А.[1], Киреева А.И.[2], Руммо О.О.[1]

[1]Республиканский научно-практический центр трансплантации органов и тканей, Минск, Республика Беларусь;
[2]Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Реферат. Ранняя дисфункция трансплантата (РДТ) является основным и определяющим ближайший и 6-месячный прогноз осложнением трансплантации печени с частотой встречаемости 21–25% и 6-месячный летальностью от 10 до 40% [5]. Поиск новых способов прогнозирования и диагностики РДТ актуален и имеет большое научное и клиническое значение. Нами разработан метод оценки риска развития ранней дисфункции трансплантата печени, основанный на определении: а) полиморфизма rs913930 в гене TLR4 донора печени; б) содержания гепатоцитарного фактора роста (ГФР) в крови из воротной вены через 2 ч после реперфузии и в) степени экспрессии High-mobility group protein B1 (HMGB1) и кластера дифференцировки CD68+ в биоптатах печени доноров и постреперфузионных биоптатах методом иммуногистохимии.

Ключевые слова: ранняя дисфункция трансплантата печени, уровень гепатоцитарного фактора роста, экспрессия HMGB-1, экспрессия CD68-клеток, полиморфизм гена TLR-4.

Введение. Использование доноров как со стандартными, так и с расширенными критериями сопряжено с развитием ранней дисфункции трансплантата, в основе которого лежит ишемически-реперфузионное повреждение [1]. На данный момент не существует надежного объективного метода оценки донорского печеночного трансплантата, по которому можно было бы судить о риске возникновения дисфункции трансплантата, заболеваемости и смертности после трансплантации печени. Среди факторов риска дисфункции трансплантата со стороны донора выделяют возраст донора, уровень Na донора, жировой гепатоз, гипотензию, длительный период холодовой ишемии (более 10 ч), тепловую ишемию более 40 мин, длительность ИВЛ у донора более 5 сут, донор с небьющимся сердцем и расщепленный или редуцированный трансплантат [3]. Со стороны реципиента известны такие факторы риска, как значение балла MELD и ургентность трансплантации [13]. Однако определенная часть ранних дисфункций трансплантата возникает вопреки известных факторов риска.

Известно, что риск дисфункции трансплантата ассоциирован с определенным профилем воспалительных цитокинов как у доноров, так и реципиентов [7]. Бактериальная транслокация, возникающая у донора со смертью мозга, может обусловливать циркуляцию липополисахарида и наряду со смертью мозга вести к повреждению дистантных органов в результате синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) [14].

Известно, что одну из ключевых ролей в возникновении и акселерации системного воспалительного ответа в целом и ишемически-реперфузионного повреждения в частности играет ген Toll-like рецепторов 4го класса (TLR-4) [15]. Было показано, что минорные алели последовательностей rs11536865, rs913930 и rs5030717 гена TLR-4 ассоциированы с развитием дисфункции и потерей трансплантата [9].

В качестве направления исследования работы мы выдвигаем гипотезу, что ранняя дисфункция трансплантата может быть обусловлена повреждением печени в результате ССВО в ответ на смерть мозга и бактериальную транслокацию у умершего донора. Кроме того помимо фенотипических (возраст, уровень Na, жировой гепатоз, гипотензия и др.) ранняя дисфункция трансплантата имеет и генетические предпосылки, обусловленные геном TLR-4, которые реализуются в ре-

зультате специфических патологических процессов, характерных для трансплантации, таких как бактериальная транслокация у умершего донора и ишемически-реперфузионное повреждение у реципиента. Таким образом поиск новых способов прогнозирования и диагностики РДТ актуален и имеет большое научное и клиническое значение.

Цель работы — разработка метода оценки риска развития ранней дисфункции трансплантата печени на основании серологических, иммуногистохимических и генетических маркеров.

Материалы и методы. Объектом исследования научно-исследовательской работы послужили данные 71 ортотопической трансплантаций печени, выполненных с ноября 2013 г. по февраль 2015 г. (из исследования были исключены ретрансплантации, трансплантации реципиентам детского возраста, родственые трансплантации, трансплантации, выполненные по поводу фульминантной печеночной недостаточности).

Объектом исследования научно-исследовательской работы послужили:

1. Доноры с умершим головным мозгом и бьющимся сердцем после диагностики смерти головного мозга на основании «Инструкции о порядке констатации биологической смерти и прекращении применения мер по искусственному поддержанию жизни пациента».

2. Биоптаты донорской печени, полученные бригадой забора, до флашинга в которых определяли уровень жирового гепатоза, балонной дистрофии, плотность ИГХ окраски на HMGB1, CD68 и HIF1-α.

3. Плазма крови из воротной вены во время операции, полученной путем пункции через 2 ч после портальной реперфузии.

4. Плазма крови из периферической вены реципиента печеночного трансплантата в первые 7 дней после операции, в которой были определены уровни билирубина, МНО, АСТ и АЛТ.

5. Биоптаты печени постреперфузионные, полученные через 2 ч после портальной реперфузии. В данных биоптатах определяли степень ишемически реперфузионного повреждения, плотность иммуногистохимической окраски на HMGB1, CD68 и HIF 1-α.

Сразу после оценки качества печени и подтверждения трансплантации в пробирку с красной крышкой выполнялся забор пробы периферической крови умершего донора.

Для определения эффективности серологических, иммуногистохимических и генетических маркеров для прогнозирования и диагностики ранней дисфункции трансплантатов печени было проведено обзервационное исследование случай-контроль у 71 пациента после ТП, дихотомически разделенных на группы по признаку развития ранней дисфункции трансплантата печени.

В качестве морфологических факторов, возможно ассоциированных с выбранным клиническим исходом (РДТ), были тестированы следующие признаки:

- плотность ядерной ИГХ окраски на HMGB1 (%) в донорском и постреперфузионном биоптате трансплантата печени;
- плотность ИГХ окраски на CD68 (клеток/мм^2) в донорском и постреперфузионном биоптате;
- наличие цитоплазматического окрашивания на HMGB1 (есть/нет) донорском и постреперфузионом биоптате;
- разница (Δ-HMGB1= HMGB1пострепфузионная – HMGB1донорская) между плотностью ИГХ окрашивания на HMGB1 (%) в постреперфузионном и донорском и биоптате, по нашему мнению, должна характеризовать нарастание активации Купферовых клеток в периоперационном периоде;
- разница (Δ-CD68 = CD68пострепфузионная – CD68донорская) между плотностью ИГХ окрашивания на CD68 (клеток/мм^2) в постреперфузионном и донорском и биоптате;
- плотность окраски гепатоцитов на HIF-1α (от 0 до ++++) в постреперфузионном и донорском и биоптате;
- уровень жирового гепатоза, балонной дистрофии и воспалительно-дегенеративные изменения (гепатит, фиброз центральных вен, центролобулярный некроз).

В качестве серологических факторов, возможно ассоциированных с выбранным клиническим исходом (РДТ), были тестированы следующие признаки:

- уровень гепатоцитарного фактора роста в воротной вене через 2 ч после реперфузии.

В качестве генетических факторов были тестированы клинически значимые полиморфизмы гена TLR-4 донора на основании анализа образцов периферической крови 71 доноров. Протокол исследование указан в таблице.

Таблица — Протокол исследования

Биопсия печени и проба крови во время мультиорганного забора (донорский биоптат)	Образцы крови во время трансплантации печени из воротной вены 2 ч после реперфузии	Биопсия печени через 2 ч после портальной реперфузии
ИГХ окраска на CD68, HMGB1, HIF-1α Определение генотипа TLR-4	Гепатоцитарный фактор роста	ИГХ окраска на CD68, HMGB1, HIF-1α

Примечания:
1 — ИГХ — иммуногистохимия.
2 — ЛПСБ — липополисаххарид-связывающий белок.
3 — НПВ — нижняя полая вена.

Все пациенты получали стандартную трехкомпонентную схему иммуносупрессии. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Средние величины показаны как медиана (25; 75%). Оценка причинно-следственных связей между выбранным клиническим исходом (РДТ) и изучаемыми морфологическими и серологическими признаками была выполнена с помощью теста Mann–Whitney (для количественного признака), ANOVA-теста (для рангового категориального признака), корреляционного анализа Спирмена (для двух количественных признаков), регрессионного анализа (для двух номинальных категориальных признаков).

Результаты и их обсуждение. Общая частота развития ранней дисфункции трансплантата (РДТ) в исследуемой группе пациентов составила 19,7% (14 из 71), общая частота острого отторжения трансплантата — 16,9% (12 из 71). Тяжелая степень ишемически-реперфузионного повреждения (ИРП) была выявлена у 9 (12,7%) пациентов, при этом у всех пациентов с тяжелой степенью ИРП развилась ранняя дисфункция трансплантата (рисунок 1).

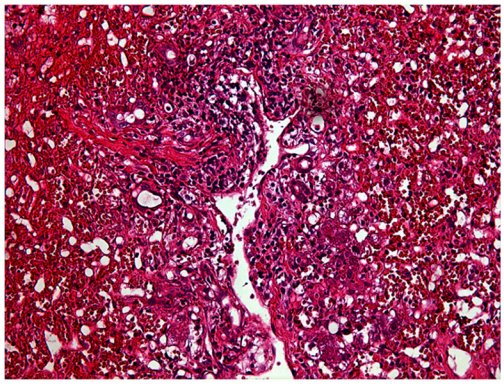


Рисунок 1. — Гистологическая картина тяжелого ИРП в постреперфузионном биоптате печени

Анализ серологических предикторов развития РДТ показал, что уровень HGF в интраоперационной пробе (взятой через 2 ч после реперфузии из воротной вены) более 7934 нг/мл (чувствительность — 62%; специфичность — 74%, AUC = 0,73; p = 0,01) достоверно прогнозировал риск развития ранней дисфункции трансплантата (рисунок 2).

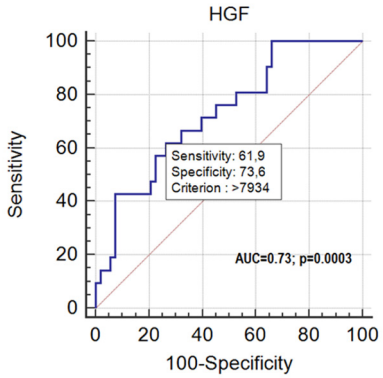


Рисунок 2. — Характеристическая кривая HGF как предиктора развития ранней дисфункции трансплантата печени (ROC-анализ)

Анализ иммуногистохимических предикторов развития ранней дисфункции трансплантата печени показал, что более выраженное ИРП было ассоциировано с большим приростом экспрессии ядерного HMGB-1, а также с большей постреперфузионной инфильтрацией графта CD68+-клетками. При ROC-анализе установлено, что прирост экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии) более 13% (чувствительность — 54%; специфичность — 92%, AUC = 0,73; p = 0,01) был ассоциирован с тяжелой степенью ишемечески-реперфузионного повреждения и предшествовал клиническому развитию ранней дисфункции трансплантата печени. Уровень экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата более 48 клеток/мм^2 (чувствительность — 85%; специфичность — 64%; AUC = 0,77; p = 0,0002) также был ассоциирован с тяжелой степенью ишемечески-реперфузионного повреждения и предшествовал клиническому развитию ранней дисфункции трансплантата (рисунки 3, 4).

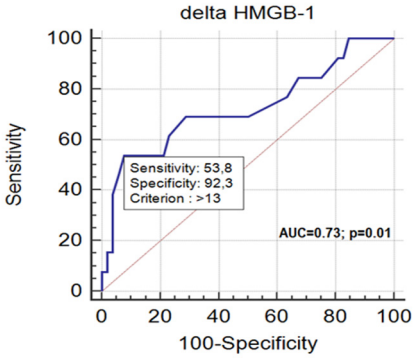


Рисунок 3. — Характеристическая кривая динамики экспрессии ядерного HMGB-1 как предиктора развития ИРП тяжелой степени (ROC-анализ)

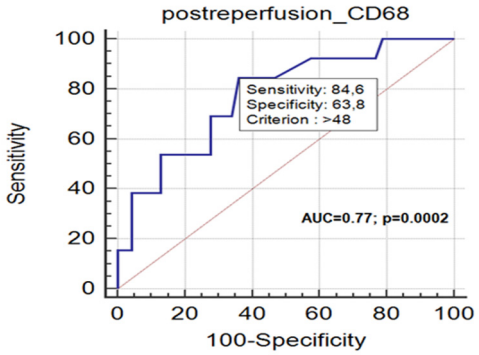


Рисунок 4. — Характеристическая кривая степени инфильтрации трансплантата печени CD68+-клетками после реперфузии как предиктора развития ИРП тяжелой степени (ROC-анализ)

Изучении ассоциации полиморфизма единичных нуклеотидных последовательности рецептора TLR-4 с развитием осложнений после трансплантации печени было выявлено, что частота умеренно тяжелой и тяжелой РДТ была значимо и значительно больше у пациентов с TLR-4 генотипом донорской печени C/T (23,8%) в последовательности rs913930 по сравнению с гомозиготными генотипами CC+TT (6%); частота умеренно тяжелой и тяжелой РДТ была значимо и значительно больше у пациентов с генотипами донорской печени CC+C/T (20,6%) в последовательности rs913930 по сравнению с гомозиготными генотипами TT (4,7%; Fisher exact test, p = 0,04). Регрессионный анализ показал, что генотип C/T гена TLR-4 в последовательности SNP rs 913930 имел сильную связь с развитием ранней дисфункции трансплантата (отношение шансов 4,8 к 1; p = 0,047; 95% ДИ 1–23,4). Более того, пациенты с генотипом донорской печени C/T имели достоверно большую пропорцию HMGB1 (%) положительных гепатоцитов в донорском биоптате, 21% (17–29), по сравнению с генотипами CC+TT, 16% (10–19) (Mann–Whitney p = 0,01). Пациенты с генотипом донорской печени CC+C/T имели достоверно большую пропорцию HMGB1 (%) положительных гепатоцитов в донорском биоптате, 19,5% (14–29) по сравнению с генотипами TT, 16% (10–19) (Mann–Whitney p = 0,02). Пациенты с генотипом донорской печени CC+C/T SNP rs913930 имели достоверно большую экспрессию CD68+ клеток в биоптате печени доноров (Mann–Whitney test, p = 0,03) по сравнению с TT генотипом.

Таким образом, мы предлагаем метод оценки риска развития ранней дисфункции трансплантата печени, основанный на определении: а) полиморфизма rs913930 в гене TLR4 и генотип донора печени; б) содержания гепатоцитарного фактора роста (ГФР) в крови из воротной вены через 2 ч после реперфузии и в) степени экспрессии High-mobility group protein B1 (HMGB1) и кластера дифференцировки CD68+ в биоптатах печени доноров и постреперфузионных биоптатах методом иммуногистохимии. Так, генотип CC и/или C/T rs913930 в гене TLR4 свидетельствует о высоком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени и не требует дальнейшего определения содержания ГФР в крови из воротной вены и степени экспрессии HMGB1 и CD68+ в биоптатах печени. Генотип TT в последовательности rs913930 в гене TLR4 требует определения содержания ГФР в воротной вене через 2 ч после реперфузии, при этом значение ГФР более 7934 нг/мл свидетельствует о высоком риске ранней дисфункции трансплантата и не требует дальнейшего определения степени экспрессии HMGB1 и CD68+ в биоптатах печени. Содержание ГФР в воротной вене менее 7934 нг/мл требует выполнения иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантата печени с выявлением степени экспрессии HMGB1 и CD68+, при этом, прирост экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии) более 13% и уровень экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата более 48 клеток/мм^2 свидетельствует о высоком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени.

Наличие и генотипа TT в последовательности rs913930 в гене TLR4, и содержания ГФР в воротной вене через 2 ч после реперфузии менее 7934 нг/мл, и прироста экспрессии ядерного HMGB-1 в трансплантате (до и после реперфузии)

менее 13%, и уровня экспрессии CD68+ в постреперфузионной биопсии трансплантата менее 48 клеток/мм^2 свидетельствуют о низком риске развития ранней дисфункции трансплантата печени.

Заключение. Разработан метод, позволяющий объективизировать оценку донорского графта, в особенности при наличии у донора критериев маргинальности. Применение данного метода позволяет в течение первых 2-х сут после операции прогнозировать развитие ранней дисфункции трансплантата печени, что обеспечивает более раннее применение соответствующей схемы профилактики данного осложнения, а также способствует снижению пребывания в стационаре реципиента после операции и отсутствию госпитальной летальности, ассоциированной с ранней дисфункцией и первичного нефункционирования трансплантата. Благоприятный эффект применяемого метода выражен при оценке донорского органа перед трансплантацией, особенно при наличии критериев маргинальности у донора и тяжелом состоянии реципиента.

Литература

1. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury / E.E. Montalvo-Jave [et al.] // J. Surg. Res. — 2008. — Vol. 147, № 1. — P. 153–159.

2. Busuttil. R.W. The Utility of Marginal Donors in Liver Transplantation / R.W. Busuttil, K. Tanaka // Liver Transplant. — 2003. — Vol. 9, № 7. — P. 651–663.

3. Influence of cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients / H. Pokorny [et al.] // Clin. Transplant. — 2005. — Vol. 19, № 4. — P. 532–536.

4.Characteristics Associated with Liver Graft Failure: The Concept of a Donor Risk Index / S. Feng [et al.] // Am. J. Transplant. — 2006. — Vol. 6, iss. 4. — P. 783–790.

5. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors / K.M. Olthoff [et al.] // Liver Transplant. — 2010. — Vol. 16, № 8. — P. 943–949.

6.Early allograft dysfunction and liver transplant outcomes: a single center retrospective study / P.R. Salvalaggio [et al.] // Transplant. Proc. — 2012. — Vol. 44, № 8. — P. 2449–2451.

7. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation / B.H. Friedman [et al.] // Liver Transplant. — 2012. — Vol. 18. — P. 166–176.

EARLY LIVER ALLOGRAFT DYSFUNCTION PREDICTION

Shcherba A.E.[1], Korotkov S.V.[1], Efimov D.Y.[1], Lebedz O.A.[1], Karytka A.A.[1], Kireeva A.I.[2], Rummo O.O.[1]

[1]The Republican Center of Organ & Tissue Transplantation, Minsk, Republic of Belarus;
[2]Institute of Genetics & Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

The new method was developed to objectify the evaluation of the donor graft , to predict EAD development and to reduce the recipient's stay in the hospital after the operation and the lack of in-hospital mortality associated with EAD and PNF.

Keywords: early liver allograft dysfunction, level of hepatocyte growth factor, HMGB-1 expression, CD68-cells expression, TLR-4 gene polymorphism.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РЕАЛИЗАЦИИ ПОДПРОГРАММЫ
«ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА»
ГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ПРОГРАММЫ
«НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ» (2011–2015)
Космачева С.М., Глинская Т.Н. 4

ЭТИОЛОГИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ВИРУСНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Амвросьева Т.В., Богуш З.Ф., Поклонская Н.В., Дедюля К.Л.,
Калачик О.В., Миланович Н.Ф., Минаковская Н.В., Кишкурно Е.П. 11

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК
В ТЕРАПИИ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА У ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ
Баровская Ю.А., Вашкевич Е.П., Исайкина Я.И., Шман Т.В., Алейникова О.В. 15

НОВЫЙ МЕТОД ПРИМЕНЕНИЯ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ХРЯЩА КРУПНЫХ СУСТАВОВ
Букач Д.В., Белецкий А.В., Эйсмонт О.Л., Исайкина Я.И., Алейникова О.В. 18

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСПАНСИИ И АКТИВАЦИИ
CYTOKINE-INDUCED KILLER (CIK) КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*
Вашкевич Е.П., Шман Т.В. 23

БЕЗОПАСНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ СИМПТОМАТИЧЕСКОЙ ЭПИЛЕПСИИ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
Докукина Т.В., Хлебоказов Ф.П., Игнатенко С.И., Космачева С.М.,
Гончарова Н.В., Потапнев М.П., Махров М.В., Королевич П.П., Шамрук И.В., Мисюк Н.Н. 27

РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ И ИНТЕРЛЕЙКИН-8
В ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ДЕТЕЙ
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Дорошенко Т.М., Акалович С.Т., Бакерова В.А., Шман Т.В.,
Марейко Ю.Е., Белевцев М.В., Алейникова О.В., Войтенок Н.Н. 31

ИНФЕКЦИИ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ У РЕЦИПИЕНТОВ ТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ:
ПРЕДИКТОРЫ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ
Калачик О.В., Нарбин А.В., Вершинин П.Ю., Козлова М.В., Губерская М.П. 33

ПОЛУЧЕНИЕ АПИРОГЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО N-МОГ1-125 ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
Кожух Г.В., Власов А.П., Русанович Д.А., Скриган Т.Н., Марцев С.П. 37

ОТДАЛЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ
БОЛЕЗНЬЮ ЛЕГКИХ И ИДИОПАТИЧЕСКИМ ФИБРОЗИРУЮЩИМ АЛЬВЕОЛИТОМ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК
Лицкевич Л.В., Гуревич Г.Л., Шпаковская Н.С., Скрягин А.Г., Скрягина Е.М.,
Солодовникова В.В., Исайкина Я.И., Новикова М.А., Коваленко Д.Г. 41

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМЕРИЗМА И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ У ПАЦИЕНОВ
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Марейко Ю.Е., Лавриненко В.А., Савицкая Т.В., Волочник Е.В., Акинфеева Э.Л.,
Минаковская Н.В., Кирсанова Н.П., Алексейчик А.В., Прудников Д.В., Алейникова О.В. 45

СПОСОБ ОЦЕНКИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ ЭРИТРОНА
Надыров Э.А., Прокопович А.С., Никонович С.Н., Прокопович Д.А. 50

ЭКСПАНСИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ
ДЛЯ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ ПАЦИЕТАМ С ЛИМФОПРОЛИФЕРАТАВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
Петёвка Н.В., Васина Е.В., Костюнина В.С., Гончарова Н.В., Оводок А.Е.,
Змачинский В.А., Смольникова В.А., Бакун А.В., Власенкова С.В., Кривенко С.И. 54

РАЗРАБОТКА ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ОТБОРА
ДОНОРОВ ГИПЕРИММУННОЙ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКОЙ ПЛАЗМЫ
Пешняк Ж.В., Дашкевич Э.В., Сошко С.В., Маевская О.Л., Коржель Т.С. 59

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ТЕРАПИИ ОСТРОГО ПОЧЕЧНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)
Пилотович В.С., Зафранская М.М., Комиссаров К.С., Юркевич М.Ю.,
Нижегородова Д.Б., Иванчик Г.И., Дмитриева М.В., Юрага Т.М. 62

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РИСКА НА ЧАСТОТУ РАЗВИТИЯ РЕЦИДИВОВ В ПЕРИОДЕ
ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ У ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ С ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ
Прудников Д.В., Исайкина Я.И., Минаковская Н.В., Алейникова О.В. 66

ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В ПЛАЗМЕ
КРОВИ И УЛЬТРАФИЛЬТРАТЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОРЕНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ
В ПРОЦЕССЕ ПРОДЛЕННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТЕРАПИИ
Рябцева Т.В., Бычко Г.Н., Седёлкина Е.Л., Кирковский В.В., Старостин А.В., Сантоцкий Е.О., Колесникова И.Г. 70

ВЛИЯНИЕ ПРОДЛЕННОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ПОЧЕЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ДИНАМИКУ
КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ И УЛЬТРАФИЛЬТРАТЕ ПЛАЗМЫ КРОВИ
ПАЦИЕНТОВ С ГЕПАТОРЕНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ ПЕЧЕНИ
Рябцева Т.В., Кирковский В.В., Седёлкина Е.Л., Старостин А.В., Колесникова И.Г. 73

ПРИМЕНЕНИЕ ПЕРСОНИФИЦИРОВАННОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОДХОДА
НА ОСНОВЕ ОЦЕНКИ ХИМИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК
И КАЧЕСТВА РАННЕГО ОТВЕТА НА ТЕРАПИЮ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЦИТАРНОМ ЛЕЙКОЗЕ
Смирнова Л.А., Свирновский А.И., Цвирко Д.Г., Колбаско Л.В., Пасюков В.В.,
Свирновская Э.Л., Тарас И.Б., Сергиевич О.В., Федуро Н.А., Бакун А.В. 76

ЛИМФОЦИТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И АКТИВНОСТЬ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА,
АССОЦИИРОВАННОГО С ИНФЕКЦИЕЙ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*
Талако Т.М., Буторина И.И., Варонько И.А., Сорока Н.Ф. 80

ЭФФЕКТ АУТОЛОГИЧНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ПРИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА
Федулов А.С., Зафранская М.М., Борисов А.В., Нижегородова Д.Б., Кривенко С.И., Качан Т.В. 83

ПСИХОСОЦИАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ ПАЦИЕНТОВ С ДЕТСКИМ ЦЕРЕБРАЛЬНЫМ ПАРАЛИЧОМ,
ПЕРЕНЕСШИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
Шалькевич Л.В., Алейникова О.В., Исайкина Я.И., Яковлев А.Н., Дрогайцева Д.В., Тришина Ю.В. 87

ОЦЕНКА РИСКА РАЗВИТИЯ РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ
Щерба А.Е., Коротков С.В., Ефимов Д.Ю., Лебедь О.А., Коритко А.А., Киреева А.И., Руммо О.О. 90

ДЛЯ ЗАМЕТОК

Научное издание

ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

(по результатам завершения подпрограммы
«Трансплантология и регенеративная медицина»
ГНТП «Новые технологии диагностики, лечения и профилактики»,
2011–2015 гг.)

Сборник научных трудов

Выпуск 1

Гл. редактор: д-р мед. наук, проф. М.П. Потапнев
Зам. гл. редактора: д-р мед. наук, проф. А.И. Свирновский
Ответственный редактор: канд. мед. наук, доц. Т.Н. Глинская
Технический редактор: канд. мед. наук, доц. С.М. Космачева

Ответственный за выпуск О.С. Капранова

Редактор О.С. Капранова

Корректор О.С. Капранова

Компьютерная верстка С.Л. Абрамович, О.С. Капранова, Д.В. Сивуров

Обработка иллюстраций С.Л. Абрамович, Д.В. Сивуров

Подписано в печать 19.12.2016.
Уч.-изд. л. 11,76.
Тираж 30 экз.

Выпущено по заказу РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий

Государственное учреждение «Республиканская научная медицинская библиотека».
Свидетельства о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий
№1/340 от 02.06.2014, № 2/186 от 12.07.2016.
Ул. Фабрициуса, 28, 220007, г. Минск.
Тел./факс: 216-23-33.
E-mail: med@med.by
www.med.by