

БИОИМПЕДАНСНЫЙ АНАЛИЗ В ПРАКТИКЕ ПРОГРАММНОГО ГЕМОДИАЛИЗА: КРАТКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И СОБСТВЕННЫЙ ОПЫТ ДИАЛИЗНОГО ЦЕНТРА

Строков А.Г., Поз Я.Л., Гаврилин В.А., Копылова Ю.В., Крышин К.Н., Кутузова А.В., Терехов В.А.

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России, г. Москва

В последнее десятилетие биоимпедансный анализ широко внедряется в практику программного гемодиализа как метод оценки статуса гидратации и состава тела. В течение 2 лет мы использовали устройство для биоимпедансной спектрометрии (БИС) Body Composition Monitor (Fresenius Medical Care, ФРГ). Данные БИС были достоверны у подавляющего большинства пациентов с клинически достоверно отработанным сухим весом. В сравнении со здоровыми субъектами пациенты на гемодиализе отличались экспансией только внеклеточного объема жидкости. Артериальное давление в группах пациентов с относительной гипергидратацией (ОГ – отношение междиализной гипергидратации к объему внеклеточной жидкости) $<15\%$ и $>15\%$ не различалось, однако количество применяемых антигипертензивных препаратов было выше (3,1 против 1,2) в группе $ОГ > 15\%$. Показатель ОГ, по нашим данным, был более достоверным, чем стандартный индекс – соотношение объема гипергидратации и сухого веса пациента. Совместное применение БИС и мониторинга относительного объема крови позволяло в сжатые сроки устранять массивную гипергидратацию при подготовке пациентов к пересадке почки. Для уточнения клинической ценности показателей тощей и жировой массы тела требуются дальнейшие наблюдения.

Ключевые слова: программный гемодиализ, гипергидратация, артериальная гипертензия, биоимпедансный анализ.

BIOIMPEDANCE ANALYSIS IN HAEMODIALYSIS PRACTICE: SHORT REVIEW AND SINGLE CENTER EXPERIENCE

Strokov A.G., Poz Y.L., Gavrilin V.A., Kopylova J.V., Kryshin K.N., Kutuzova A.V., Terehov V.A.

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

Bioimpedance analysis has been widely used to estimate a hydration state, lean and fat mass in haemodialysis patients. The aim of our study was to investigate the validity and usefulness of bioimpedance analysis in routine dialysis practice. Last two years we used the body composition monitoring (BCM, Fresenius Medical Care), method based on whole body multifrequency bioimpedance spectroscopy (BIS), compared with traditional clinical data. For BIS data verification, hydration status of 32 stable HD patients with dialysis vintage more than 3 years and clinically well established dry weight were studied. Only in three cases BIS data seems underestimated in serial measurements. Next step, 28 healthy subjects and 116 dialysis patients were studied. Total body water and extracellular volume (ECV) were significantly higher in dialysis group ($P<0.01$), and there was not any difference in intracellular volume (ICV). Mean AP was similar in patients with moderate ($<15\%$) and massive ($>15\%$) relative overhydration ($RO = \text{overhydration} / \text{ECV}$), at the same time, average number of antihypertensive medications was significantly higher in more overhydrated patients (3.1 vs 1.2). In clinical practice RO is more convenient indicator as compared to standard overhydration volume /dry weight ratio. Mutual application of the BIS and blood volume monitoring allows more rapid and safe dry weight achievement. BIS was useful tool for hydration status monitoring in routine haemodialysis practice, and further work need to be done to clarify BIS validity for nutritional status estimation.

Key words: haemodialysis, overhydration, arterial pressure, bioimpedance analysis.

Статья поступила в редакцию 13.01.11 г.

Контакты: Строков Александр Григорьевич, заведующий отделением гемодиализа ФНЦТНО им. академика В.И. Шумакова.

Тел. 8 (499)158 22 33, **e-mail:** medick@bk.ru

КРАТКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Персистирующая гипергидратация является ключевым звеном в возникновении гипертрофии левого желудочка, артериальной гипертензии и высокой смертности от сердечно-сосудистой патологии у пациентов с терминальной почечной недостаточностью, находящихся на лечении программным гемодиализом [17]. Соответственно, нормализация гидратации секторов организма при помощи ультрафильтрации – одна из основных задач при лечении пациентов диализом. Состояние эвolemии у диализных пациентов определяется понятием «сухой вес» [4]. До настоящего времени сухой вес определялся преимущественно на основе клинических наблюдений, несмотря на субъективность и неточность такого метода. Кроме того, отработка сухого веса методом избыточной ультрафильтрации часто приводит к осложнениям в ходе сеанса гемодиализа [7], а развивающаяся при этом интрадиализная гипотензия может быть причиной прогрессирования сердечной недостаточности [2]. Ранее были предложены разнообразные методы объективизации статуса гидратации у пациентов на диализном лечении. Это и инструментальные методики – измерение диаметра нижней полой вены с помощью ультразвукового исследования [1], определение кардиоторакального индекса, измерение внесосудистой жидкости легких, исследование динамики относительного объема крови [3], – и биохимические маркеры: концентрация предсердного и мозгового натрийуретического пептида, циклической гуаниновой монофосфатазы [12, 15]. Однако все перечисленные показатели не отличаются достаточной достоверностью, в первую очередь по той причине, что зависят они главным образом от внутрисосудистого объема, а его величина непостоянна вследствие разнонаправленного обмена жидкостью с интерстицием. Кроме того, диаметр нижней полой вены и концентрация предсердного натрийуретического пептида зависят не только от гидратации, но и от сердечной деятельности и от взаимодействия с другими гормональными системами [12].

В этой связи чрезвычайно перспективным представляется использование биоимпедансного анализа (БИА), позволяющего оценивать не только объемы внеклеточной и внутриклеточной жидкости организма, но и величины тощей и жировой массы.

Принцип БИА основан на измерении сопротивления тканей организма электрическому току [2]. При этом общее сопротивление – импеданс (Z) – складывается из двух компонентов: активного сопротивления (R), биологическим субстратом которого являются клеточная и внеклеточная жидкости организма, и реактивного сопротивления (X), субстратом которого служат биологические мембраны. Сопротивление определяется резистентностью к по-

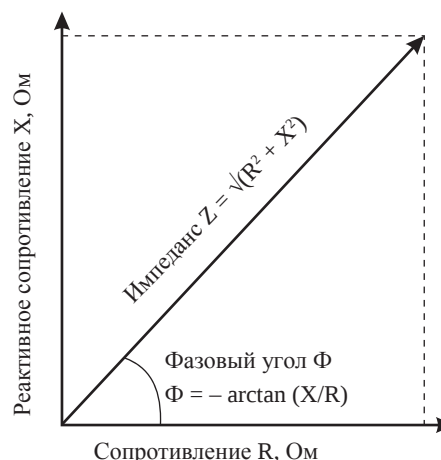


Рис. 1. Основные показатели биоимпедансного анализа

стоянному и переменному току, реактивное сопротивление – к переменному. Оба компонента импеданса зависят от степени гидратации тканей, а их соотношение определяет величину фазового угла (Φ) – основного показателя БИА (рис. 1). Степень гидратации тканей можно оценить по соотношению этих показателей при БИА на стандартной частоте (обычно – 50 кГц) при измерении по всей длине тела или в отдельном сегменте. Сегментарный одночастотный БИА может применяться непосредственно во время процедуры гемодиализа. В этом случае при измерении импеданса тканей, например, голени по динамике показателя можно судить о достижении состояния эвolemии и, соответственно, адекватности ультрафильтрации [9].

В биологических тканях ток низкой частоты проходит практически исключительно по внеклеточному пространству, в то время как для тока высокой частоты становится доступным и внутриклеточное пространство. Соотношение величин R и X в биологических тканях при разной частоте тока описано К. Коулом и в графическом представлении показано на рис. 2. Модель Коула используется для определения объема общей жидкости организма (ОЖ) и расчета соотношения объемов внеклеточной (ВЖ) и внутриклеточной (КЖ) жидкости при многочастотном БИА, который в данном варианте называется биоимпедансной спектрометрией (БИС). БИС также может оценивать параметры как всего тела, так и отдельных его сегментов. При этом с использованием большого количества электродов можно получать суммарные данные практически всех областей организма, что теоретически повышает достоверность измерений.

В практике диализа – программного гемодиализа и амбулаторного перитонеального диализа – объективизация сухого веса является приоритетной, но не единственной задачей БИА. С использованием различных моделей состава тела человека по величинам ОЖ, ВЖ и КЖ возможно рассчитать величину

Таблица

Особенности различных методик биоимпедансного анализа [9]

Методика	Применение	Достоинства	Недостатки
Сегментарное измерение			
Одночастотный биоимпедансный анализ (БИА)	Позволяет оценить ВЖ, КЖ и мышечную массу одного сегмента тела	Относительная точность измерений в сравнении с данными магнито-резонансного исследования	Результаты зависят от эмпирической модели, что ограничивает индивидуальную достоверность
БИА на голени	Измерение на голени позволяет оценить статус гидратации в целом	Может использоваться для постоянного мониторинга, в том числе во время диализа	Необходимость изначального измерения окружности голени
Многочастотная биоимпедансная спектрометрия (БИС)	Позволяет определить ОЖ, ВЖ, КЖ и мышечную массу сегмента тела, а также суммарно в нескольких сегментах	Обеспечивает достаточную точность при определении показателей для сегмента и всего тела (суммы сегментов)	Требуется большое количество электродов, результаты зависят от правильности их расположения
Измерение по всей длине тела			
Векторный БИА	Позволяет оценить степень гидратации и статус питания	Результаты представлены в виде графика R-X, просты и наглядны	Сложность интерпретации в клинических условиях
Одночастотный БИА	Оценка ОЖ, ВЖ, КЖ с использованием регрессионного анализа, состава тела – по специфической модели	Простота, дешевизна аппаратуры	Точность не удовлетворяет клиническим потребностям из-за индивидуальной вариабельности состава тела
Многочастотная БИС	Определение ОЖ, ВЖ, КЖ по модели Коула, определение состава тела по измеренным объемам жидкости	Стабильное и достаточно точное определение ОЖ, ВЖ, КЖ и мышечной массы	На точность измерений может влиять количество подкожно-жировой ткани

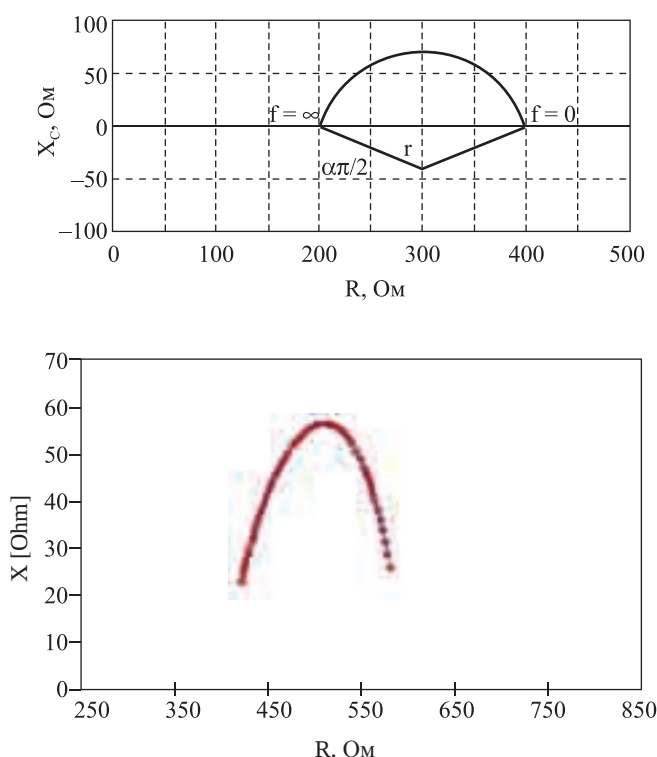


Рис. 2. Модель Коула (сверху) и ее реальное отображение при многочастотном биоимпедансном анализе (внизу). Соотношение величин сопротивления (R) и реактивного сопротивления (X) при измерении на разных частотах электрического тока

ну безжировой массы тела (БЖМ) и, соответственно, жировой массы (ЖМ), а также клеточную массу. Известно, что статус питания оказывает существенное влияние на результаты диализного лечения. При этом доступные методы оценки мышечной и жировой массы чрезвычайно трудоемки, а результаты их ненадежны. БИА может оказаться тем методом, который позволит достоверно оценивать и мониторировать эти показатели у диализных пациентов.

В табл. перечислены основные методики БИА, их преимущества и недостатки.

Современные устройства БИА выдают информацию не в виде абсолютных величин Z, R, X и Φ , которые сложны для интерпретации клиницистами, а в виде расчетных значений, полученных при обработке данных в соответствии с математической моделью, заложенной в программное обеспечение того или иного анализатора. При накоплении массива данных, касающихся той или иной популяции, при сравнении показателей БИА с результатами референсных методик и совершенствовании математического аппарата увеличивается и точность показаний устройств БИА. Очевидно, именно по этой причине БИА, внедренный в клиническую практику практически одновременно с программным гемодиализом [14], лишь в последнее десятилетие получил широкое распространение и в практике диализа.

Качество результатов БИА постоянно растет. В большом исследовании, обобщившем данные литературы за последние годы [16], показано, что данные многочастотной БИС проявляли высокую корреляцию с результатами референсных методик (дильуционных – с бромидом и дейтерием; рентгеноабсорбометрии, воздушной плетизмографии) при обследовании более 1000 здоровых субъектов, а также с высококачественной клинической оценкой у сотен диализных пациентов.

В нескольких недавних исследованиях показано, что рутинное применение БИА позволяет пересмотреть величину сухого веса у большого количества пациентов. Так, при исследовании 370 пациентов в 5 диализных центрах Германии коррекция сухого веса по результатам БИС потребовалась у 98 (26%), при этом у 5% пациентов было выявлено занижение сухого веса [13]. В другом исследовании применение БИС позволило выделить две группы пациентов: с гипергидратацией и с дегидратацией. Коррекция сухого веса позволила достоверно снизить артериальное давление и количество гипотензивных препаратов в первой группе и число эпизодов интрадиализной гипотензии во второй [11].

Немаловажна и возможность достоверной оценки величины ОЖ организма при расчете эффективности процедуры гемодиализа по показателю Kt/V. Показано, что определение объема распределения мочевины по данным БИС является более достоверным в сравнении с расчетом по формуле Watson или по данным кинетического моделирования мочевины [10].

Очевидно, что и такие параметры состава тела, как тощая и жировая масса, определенные БИС, становятся с совершенствованием метода более достоверными. В ряде исследований уже показана достаточная их корреляция с результатами принятых на сегодняшний день в качестве достоверных методик именно у гемодиализных пациентов [6, 8, 16].

Современные стандарты диализной помощи пока не рекомендуют рутинное использование БИА ни для отработки сухой массы, ни для мониторинга параметров состава тела в качестве основной методики [18]. Тем не менее в практике диализа метод получает все большее распространение.

ОПЫТ ЦЕНТРА ДИАЛИЗА ФНЦ ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА

Мы в своей практике в течение 2 лет использовали устройство для биоимпедансного анализа BCM («Body Composition Monitor», Fresenius Medical Care, ФРГ). В данном устройстве используется метод многочастотной БИС с частотой измерения от 5

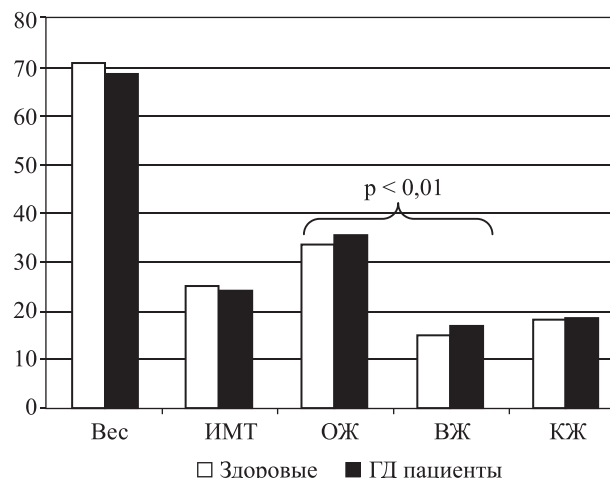


Рис. 3. Показатели гидратации секторов организма у здоровых субъектов и у пациентов на программном гемодиализе

до 1000 кГц и стандартным расположением электродов – на кисти и стопе с одной стороны. Программное обеспечение, которым оснащен прибор, разработано на основе данных, полученных не только в общей популяции, но и у большого количества диализных пациентов. Результаты измерений фиксировались в персональном компьютере при помощи специальной программы.

БИС была проведена у 28 внешне здоровых субъектов с нормальной функцией почек (16 женщин и 12 мужчин в возрасте от 22 до 65 лет) и 116 пациентов, находящихся на программном лечении гемодиализом (60 женщин и 56 мужчин в возрасте 19–72 лет со стажем диализного лечения от 0 до 308 месяцев). При этом в некоторых случаях измерения проводились неоднократно.

При сравнении данных здоровых субъектов и диализных пациентов были отмечены несколько меньшие показатели веса и индекса массы тела у последних (рис. 3). При этом количество ОЖ и ВЖ у пациентов на гемодиализе было достоверно выше ($p < 0,01$), что очевидно служило проявлением преддиализной гипергидратации. Характерно, что количество КЖ у здоровых субъектов и у пациентов на диализе было в среднем одинаковым. Это наблюдение подтверждает общепринятое на сегодняшний день мнение о внеклеточном характере гипергидратации у пациентов на диализном лечении. Соотношение ВЖ/КЖ у здоровых субъектов составляло в среднем $0,80 \pm 0,04$; а у диализных пациентов было достоверно выше: $0,96 \pm 0,13$ ($p < 0,001$) и нередко превышало единицу.

Величина преддиализной гипергидратации в общей группе диализных пациентов колебалась в чрезвычайно широких пределах: от – 2,3 л у пациента с недооцененным сухим весом до 16 л у пациента с выраженной гипергидратацией, соответственно, среднее значение составило $2,77 \pm 2,03$ л.

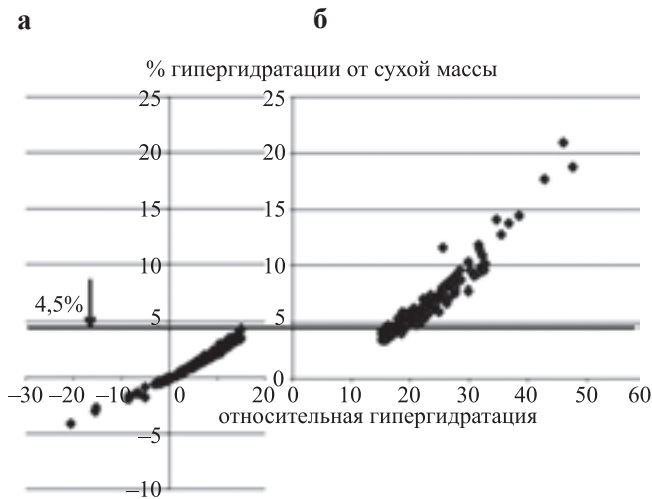


Рис. 4. Зависимость относительной гипергидратации и стандартного показателя – величины гипергидратации в процентах от сухого веса: а – относительная гипергидратация < 15%; б – относительная гипергидратация > 15%

При этом относительная гипергидратация (ОГ), то есть соотношение объема гипергидратации к объему ВЖ, составляла в среднем $14,7 \pm 10,3\%$. Показатель ОГ может оказаться весьма полезным в клинической практике. На сегодняшний день стандарты диализного лечения предполагают соотношение величины преддиализной гипергидратации к массе тела и рекомендуют ограничивать междиализную прибавку 4,5% сухого веса пациента. Вероятно, соотношение междиализной прибавки и объема ВЖ более точно отражает преддиализную перегрузку жидкостью. На рис. 4 представлена зависимость величины междиализной гипергидратации, выраженной в % сухой массы тела и ОГ (% ВЖ). Как видно из графиков, величина ОГ менее 15% (слева) гарантирует попадание пациента в допустимые по стандартной величине – 4,5% сухой массы – рамки междиализной гипергидратации. Напротив, в достаточно большом количестве случаев соблюдение этого стандартного требования не гарантирует, что величина ОГ не превысит 15% (справа). Связано это, очевидно, с тем, что простое выражение величины гипергидратации в процентах от массы тела не учитывает ни особенности состава тела пациента (такие, например, как индекс массы тела), ни даже пол пациента. Гораздо более ценным в этом смысле представляется показатель гипергидратации, оценивающий ее величину в процентах от объема ВЖ, то есть того сектора, экспансия которого и наблюдается у диализных пациентов. Достоверное влияние показателя относительной гипергидратации на результаты лечения продемонстрировано в ряде исследований [9, 17].

Корреляция между величиной среднего артериального давления (САД) и относительной гипергидратацией в общей группе диализных пациентов

была незначительной ($r = 0,34$; $p < 0,05$). В то же время при разделении пациентов по уровню относительной гипергидратации – менее 15% или более 15% – различий в уровне САД выявлено не было: 100 ± 14 и 98 ± 16 мм рт. ст. соответственно. Подобное наблюдение нельзя объяснить влиянием недостаточности кровообращения, которая может извращать корреляцию величины гипергидратации и артериальной гипертензии. Для пациентов, поступающих в наш центр с целью трансплантации почки, подобное осложнение не было универсальным. Скорее влияние оказывала мощная гипотензивная терапия, способная даже при выраженной гипергидратации практически нормализовать артериальное давление. Количество применяемых антигипертензивных препаратов в этих двух группах отличалось значимо: в среднем 1,2 на пациента в группе с ОГ менее 15% и 3,1 на пациента в группе с ОГ свыше 15%. Это свидетельствует в пользу прямой связи объемной перегрузки и артериальной гипертензии. В этой связи нельзя не упомянуть об отдельной категории больных с недостаточностью кровообращения, у которых склонность к артериальной гипотензии может сочетаться со значительной гипергидратацией, а достижение сухого веса приводит к повышению АД. В подобной ситуации возможность инструментальной достоверной оценки уровня гипергидратации представляется особенно ценной [4].

Не менее полезной БИС представляется в случаях выраженной гипергидратации при вводе в диализную программу, когда весь массив избыточной жидкости известен в дебюте лечения. Такая информация существенно облегчает быстрое достижение состояния эуволемии. При этом большую помощь может оказать мониторинг относительного объема крови в ходе сеанса диализа, алгоритм применения которого был нами описан ранее [3]. Применение мониторинга относительного объема крови позволяет не только избежать интрадиализной гипотензии в ситуации, когда скорость ультрафильтрации превышает обычные значения, но и исключить отрицательное влияние внутрисосудистой гиповолемии на функции миокарда.

В качестве примера использования БИС при отработке сухого веса можно привести график динамики уровня гипергидратации при подготовке пациента М. к трансплантации почки (рис. 5).

Для верификации данных БИС в начале ее применения была обследована подгруппа стабильных пациентов со стажем диализного лечения в нашем центре от 3 до 25 лет и клинически достоверно отработанным сухим весом (17 женщин и 15 мужчин в возрасте от 26 до 74 лет). Средняя преддиализная гипергидратация составляла $1,26 \pm 0,23$ л по сравнению с состоянием эуволемии по данным БИС.

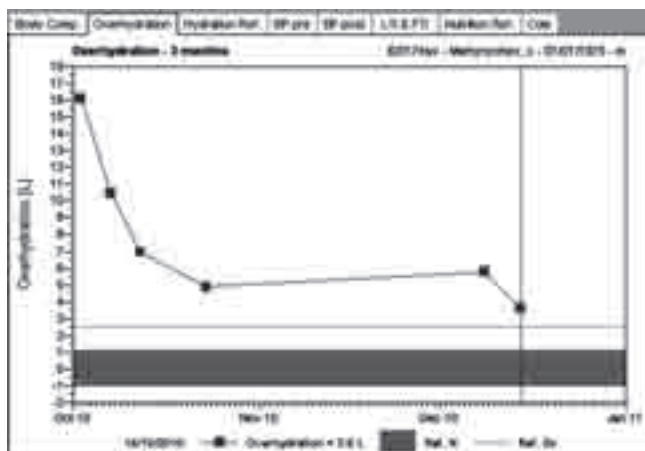


Рис. 5. Динамика уровня преддиализной гипергидратации при подготовке пациента к трансплантации почки

Дегидратация после процедуры в сравнении с этими данными в среднем равнялась $0,77 \pm 0,21$ л, что соответствовало средней ультрафильтрации $2,65 \pm 0,14$ л. В этой подгруппе данные БИС вполне соответствовали клиническим показателям. Данные БИС относительно гипергидратации представлялись заниженными ($0,3\text{--}0,7$ в сравнении с $2,5\text{--}3$ л по клинической оценке) у трех пациенток средних лет со стандартными показателями индекса массы тела. В данной ситуации мы не можем полностью исключить возможности ошибочной клинической оценки сухого веса, однако стоит упомянуть об отсутствии каких-либо симптомов избыточной дегидратации в ходе сеансов гемодиализа. Очевидно, такое наблюдение можно объяснить индивидуальными отклонениями от стандартной модели, которая используется в программном обеспечении анализатора БИС. В этой связи некоторые авторы рекомендуют не использовать стандартную модель состава тела, а ориентироваться на первичные результаты БИА, прежде всего – величину фазового угла. Однако в рутинной клинической практике такой подход представляется малоупотребимым и неудобным для длительного мониторинга.

Достоверность показателей состава тела зависит от качества применяемой модели еще в большей степени. Если параметры гидратации секторов организма рассчитываются по первичным данным БИА – R, X и Ф, то оценка тощей массы основывается на величине внутриклеточной гидратации, то есть является производной от производного значения. Жировая же масса определяется как простая арифметическая разница массы тела и тощей массы. На рис. 6 представлена динамика параметров состава тела пациента М., данные гипергидратации которого были показаны на рис. 5. Пациент с поликистозом почек поступил для подготовки к трансплантации почки, гипергидратация по данным БИС при поступлении составляла более 16 литров. Пациенту

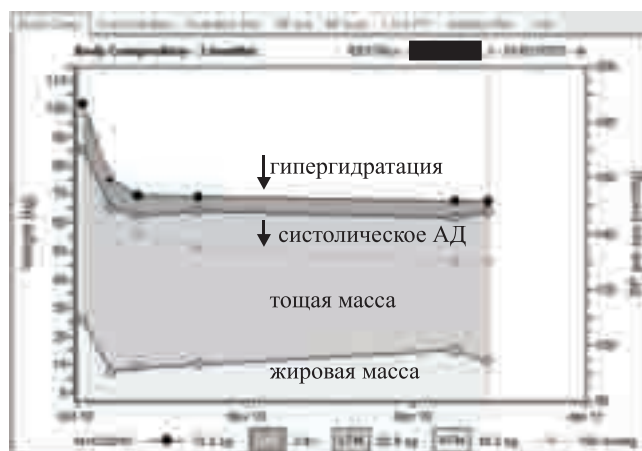


Рис. 6. Динамика параметров состава тела при подготовке пациента к трансплантации почки

была проведена билатеральная нефрэктомия. Масса удаленной почечной ткани при БИС проявилась как потеря жировой ткани, что вполне закономерно, так как внутренние органы, даже огромные поликистозные почки, оказывают на показатели БИА незначительное влияние. В последующем отмечалось закономерное увеличение массы жировой ткани, так как сухой вес пациента прирастал на фоне устранения очага инфекции и адекватного диализного лечения. Изменения соотношения тощей и жировой массы при отдельных измерениях не всегда бывали объяснимы, однако при серийных измерениях общая тенденция изменения параметров состава тела оказывалась вполне закономерной.

Возможность мониторировать параметры состава тела в значительной степени способна облегчить оценку белково-энергетической адекватности питания. В настоящее время для оценки мышечной и жировой массы у диализных пациентов традиционно применяются антропометрические измерения и калиперометрия – методы чрезвычайно трудоемкие и не отличающиеся точностью результатов. Для их замены простым и недорогим методом БИС требуются дальнейшие исследования с накоплением достаточного массива доказательств валидности метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, БИА представляется достоверной методикой объективизации статуса гидратации у пациентов, находящихся на программном лечении гемодиализом. Учитывая простоту проведения и незначительные трудозатраты измерений, дешевизну методики, можно предполагать, что БИА займет главенствующее место среди инструментальных методов оценки степени гидратации и станет стандартным методом в рутинной практике программного гемодиализа. Многочастотная БИС, отличающаяся более точными результатами при оценке рас-

пределения жидкости по секторам организма, может стать полезным инструментом изучения и мониторинга параметров состава тела – тощей и жировой массы. Эти показатели позволят объективизировать статус питания, являющийся в диализной популяции одним из основных факторов, определяющих результаты лечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилин В.А., Строков А.Г. Диаметр нижней полой вены у пациентов на гемодиализе как критерий оценки степени гидратации // Нефрология и диализ. 2001. № 1. С. 67–69.
2. Николаев Д.В., Смирнов А.В., Бобринская И.Г., Руднев С.Г. Биоимпедансный анализ состава тела человека. М., 2009. 392 с.
3. Строков А.Г., Терехов В.А. Показатель относительного объема крови у пациентов на программном гемодиализе // Нефрология и диализ. 2010. Т. 12. № 2. С. 101–105.
4. Agarwal R., Weir M.R. Dry-weight: a concept revisited in an effort to avoid medication-directed approaches for blood pressure control in hemodialysis patients // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2010. Vol. 5. P. 1255–1260.
5. Burton J.O., Jefferies H.J., Selby N.M., McIntyre C.W. Hemodialysis-induced cardiac injury: determinants and associated outcomes // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2009. Vol. 4. P. 914–920.
6. Carter M., Zhu F., Kotanko P. et al. Assessment of body composition in dialysis patients by arm bioimpedance compared to MRI and 40K measurements // Blood Purif. 2009. Vol. 27. P. 330 – 336.
7. Charra B. Fluid balance, dry weight, and blood pressure in dialysis // Hemodial Int. 2007. Vol. 11. P. 21–31.
8. Kaysen G.A., Zhu F., Sarkar S. et al. Estimation of total-body and limb muscle mass in hemodialysis patients by using multifrequency bioimpedance spectroscopy // Am. J. Clin. Nutr. 2005. Vol. 82. P. 988–995.
9. Kotanko P., Levin N.W., Zhu F. Current state of bioimpedance technologies in dialysis // Nephrol. Dial. Transplant. 2008. Vol. 23. P. 808–812.
10. Lindley E.J., Chamney P.W., Wuepper A. et al. A comparison of methods for determining urea distribution volume for routine use in on-line monitoring of haemodialysis adequacy // Nephrol. Dial. Transplant. 2009. Vol. 24. P. 211–216.
11. Machek P., Jirka T., Moissl U. et al. Guided optimization of fluid status in haemodialysis patients // Nephrol. Dial. Transplant. 2010. Vol. 25. P. 538–544.
12. Osajima A., Okazaki M., Kato H. et al. Clinical significance of natriuretic peptides and cyclic GMP in hemodialysis patients with coronary artery disease // Am. J. Nephrol. 2001. Vol. 21. P. 112–119.
13. Passauer J., Petrov H., Schleser A. et al. Evaluation of clinical dry weight assessment in haemodialysis patients using bioimpedance spectroscopy: a cross-sectional study // Nephrol. Dial. Transplant. 2010. Vol. 25. P. 545–551.
14. Thomasset A. Bio-electrical properties of tissue impedance measurements // Lion Med. 1962. Vol. 207. P. 107–118.
15. Tripepi G., Mattace-Raso F., Mallamaci F. et al. Biomarkers of left atrial volume: a longitudinal study in patients with end stage renal disease // Hypertension. 2009. Vol. 54. P. 818–824.
16. Wabela P., Chamney P., Moissla U., Jirka T. Importance of whole-body bioimpedance spectroscopy for the management of fluid balance // Blood Purif. 2009. Vol. 27. P. 75–80.
17. Wizemann V., Wabel P., Chamney P. et al. The mortality risk of overhydration in haemodialysis patients // Nephrol. Dial. Transplant. 2009. Vol. 24. P. 1574–1579.
18. EBPG guideline on haemodynamic instability // Nephrol. Dial. Transplant. 2007. Vol. 22. Suppl. 2.

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ АНТИКОАГУЛЯНТА НА РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЕМОСОВМЕСТИМЫХ СВОЙСТВ МЕДИЦИНСКИХ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Немец Е.А.¹, Севастьянов В.И.¹, Уваров С.П.^{1, 2}, Романов О.В.²

¹ ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

² ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора, г. Москва

Был проведен сравнительный анализ влияния выбора антикоагулянта на результаты тестирования материалов медицинского назначения. Показано, что замена цитрата натрия на гепарин сопровождается значительными изменениями параметров адгезии и активации тромбоцитов. Полученные результаты позволяют прийти к заключению о целесообразности применения гепарина при тестировании гемосовместимых свойств медицинских материалов *in vitro*.

Ключевые слова: тромбоциты, антикоагулянт, биоматериалы, гемосовместимость.

SPECIFIC ASPECTS OF INTERACTION OF PLATELETS WITH THE HEPARINIZED MATERIALS

Nemets E.A.^{1, 2}, Sevastianov V.I.^{1, 2}, Uvarov S.P.¹, Romanov O.V.²

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

² Allrussian Research and Testing Institute of Medical Technique, Moscow

Comparative analysis of anticoagulant nature on medical materials testing was done. It was found that change of citrate by heparin is accompanied by significant changes in platelet adhesion and activation. This results allowed us to arrive at a conclusion about reasonability of heparin usage as anticoagulant in *in vitro* testing.

Key words: platelets, anticoagulant, biomaterials, blood compatibility.

ВВЕДЕНИЕ

Материалы, используемые для изготовления искусственных органов и изделий медицинского назначения, контактирующих с кровью человека, не должны оказывать отрицательного воздействия на кровь и ее компоненты, т. е. должны быть гемосовместимыми [1].

Определяющую роль в механизме взаимодействия чужеродной поверхности с кровью, и тем самым в ее гемосовместимости, играют процессы адгезии и активации тромбоцитов [2]. В экспериментальных исследованиях *in vivo* в качестве антикоагулянта применяют гепарин, а при оценке гемосовместимых свойств образцов медицинских изделий

в условиях *in vitro* используют кровь, стабилизированную цитратом натрия [3].

Механизм действия этих антикоагулянтов различен. Гепарин катализирует инактивацию тромбина антитромбином III, воздействуя на процесс свертывания крови на конечных стадиях, непосредственно предшествующих образованию фибрина [4]. Цитрат натрия предотвращает свертывание крови за счет выведения кальция из системы гемостаза посредством его комплексообразования [5]. В то же время ионы кальция являются не только критическим компонентом внутреннего пути свертывания крови, но и участвуют в процессах адгезии и активации тромбоцитов [6].

Статья поступила в редакцию 13.01.12 г.

Контакты: Немец Евгений Абрамович, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова».

Тел. 8 (499) 193 86 62, e-mail: evgnemets@yandex.ru

Вполне вероятно, что часто дискутируемая в научной литературе причина расхождений результатов, полученных в условиях *in vitro* и *in vivo* при оценке гемосовместимых свойств медицинских изделий, обусловлена в ряде случаев различной природой используемых антикоагулянтов [7].

Для экспериментального обоснования данного предположения целью данной работы было изучение влияния природы антикоагулянта на взаимодействие поверхности биоматериалов с тромбоцитами в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материалов для изучения количества и морфологии адгезированных тромбоцитов использовали синтетические полимеры медицинского назначения в виде пленок:

- полиэтилен медицинский низкой плотности (ПЭ), ГОСТ 10354-82, партия 65, толщина 60 мкм, ЗАО «Синпласт», Россия;
- поливинилхлорид медицинский (ПВХ), толщина 180 мкм, марки ПМ-1/42, ТУ 64-2-286-79;
- полиуретан (ПУ) в виде пленок толщиной 200 мкм марки Т-0533-90;
- политетрафторэтилен (ПТФЭ) в виде пленок, толщиной 80 мкм, ГОСТ 5-1078-71, Россия.

Источником тромбоцитов служила кровь человека, полученная от здоровых доноров мужского пола (22–47 лет). В качестве антикоагулянта использовали 3,8% водный раствор цитрата натрия и раствор гепарина на физиологическом растворе (ФР) с концентрациями 4, 8, 12 ед/мл. Венозную кровь отбирали в пробирки объемом 10 мл, содержащие 1 мл антикоагулянта. Для получения плазмы, обогащенной тромбоцитами (ПОТ), стабилизированную кровь центрифугировали при 200 g в течение 20 минут.

Аликвоты ПОТ объемом 100 мкл наносили на поверхность исследуемого образца с помощью микропипетки. Образцы помещали внутрь чашки Петри во влажную атмосферу для предотвращения высыхания капли. Время инкубации составляло 15 минут при комнатной температуре.

После инкубации исследуемые образцы тщательно промывали в ФР для удаления слабосвязанных с поверхностью тромбоцитов и фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида в течение не менее 2 часов.

В качестве основного метода исследования была выбрана сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) [8].

Образцы обезжизивали последовательной инкубацией в растворах этилового спирта с возрастающей концентрацией по схеме: 50% спирт – 3 мин, 50% спирт – 3 мин, 70% спирт – 3 мин, 90% спирт – 6 мин, 96% спирт – 6 мин. Готовые образцы суши-

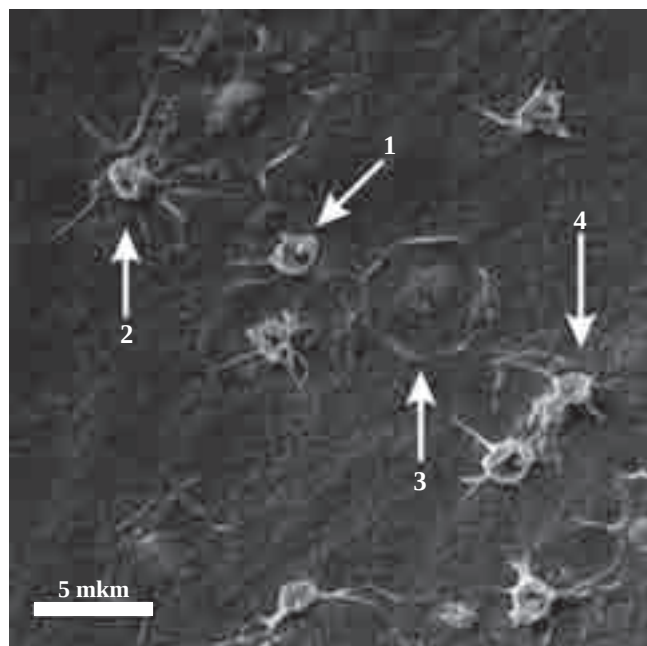


Рис. 1. Разделение адгезированных тромбоцитов по морфологическим признакам

ли на воздухе и наклеивали на предметный столик для электронной микроскопии. Необходимое для электронно-микроскопических исследований токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления платины в течение 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА на установке JFC-1600 (JEOL, Япония).

Регистрацию количества и морфологии адгезированных тромбоцитов проводили с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6360 LA (JEOL, Япония) при увеличении $\times 1500$. На поверхности каждого из образцов произвольным образом выбирали 25 полей. В каждом поле производили подсчет общего числа адгезированных тромбоцитов, а также отдельных морфологических форм (рис. 1).

Для количественной оценки процесса адгезии тромбоцитов на поверхности биоматериалов использовали относительный показатель адгезии тромбоцитов (ОПАТ), определяемый по формуле:

$$\text{ОПАТ} = \frac{N_{\text{обр}}}{N_{\text{контр}}}$$

где $N_{\text{обр}}$ и $N_{\text{контр}}$ – общее количество клеток, адгезированных на поверхности образца и контроля соответственно. В качестве контроля использовали поверхность того же материала с тромбоцитами, адгезированными в результате инкубации с цитратной плазмой.

Для оценки степени активации адгезированных тромбоцитов было выбрано три морфологических класса:

- 1) слабо активированные (сферические и с псевдоподиями, подклассы 1 и 2 на рис. 1);

- 2) сильно активированные (полностью распластаные, подкласс 3 на рис. 1);
- 3) агрегаты (подкласс 4 на рис. 1).

Для оценки влияния антикоагулянта не только на количество адгезированных на поверхности биоматериалов тромбоцитов, но и на степень активации клеток был введен относительный показатель степени активации тромбоцитов ОСАТ:

$$\text{ОСАТ} = \frac{N_A^{\Gamma}}{N_A^{\Pi}} \cdot \frac{N_{\Sigma}^{\Pi}}{N_{\Sigma}^{\Gamma}}$$

где N_A^{Γ} и N_A^{Π} – количество активированных форм клеток, адгезированных на поверхности материала из тромбоцитарной плазмы, стабилизированной гепарином и цитратом соответственно. А N_{Σ}^{Γ} и N_{Σ}^{Π} – общее количество клеток, адгезированных на поверхности материала из тромбоцитарной плазмы, стабилизированной цитратом и гепарином соответственно.

Различия в значениях ОПАТ и ОСАТ будут свидетельствовать о наличии влияния природы антикоагулянта на характер взаимодействия поверхности исследуемых материалов с тромбоцитами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен сравнительный анализ адгезии и активации тромбоцитов человека на поверхности различных полимерных материалов в зависимости от природы и концентрации антикоагулянта.

Рис. 2 иллюстрирует влияние природы и концентрации антикоагулянта на количество тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов. В качестве контроля использовали количество клеток, адгезированных из цитратной плазмы на поверхности исследуемого материала.

Как видно из рис. 2, при переходе от цитрата натрия к гепарину количество адгезированных тромбоцитов, как правило, снижается. Однако зависимость ОПАТ от концентрации гепарина носит экстремальный характер с ярко выраженным минимумом адгезии тромбоцитов при концентрации гепарина до 8,0 ЕД/мл.

На рис. 3–5 представлены графики распределения тромбоцитов, адгезированных на поверхности исследованных материалов, по степени их активации.

В случае поверхности ПУ (рис. 3) морфологическая картина активации тромбоцитов при переходе от цитрата к гепарину практически не меняется вплоть до концентрации последнего, равной 8,0 ЕД/мл. С ростом концентрации гепарина до 12 ЕД/мл количество распластных форм тромбоцитов заметно увеличивается, а количество агрегатов, напротив, снижается.

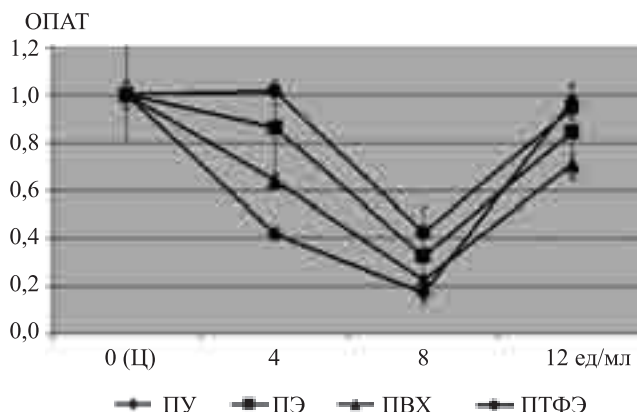


Рис. 2. Влияние природы антикоагулянта на количество тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов

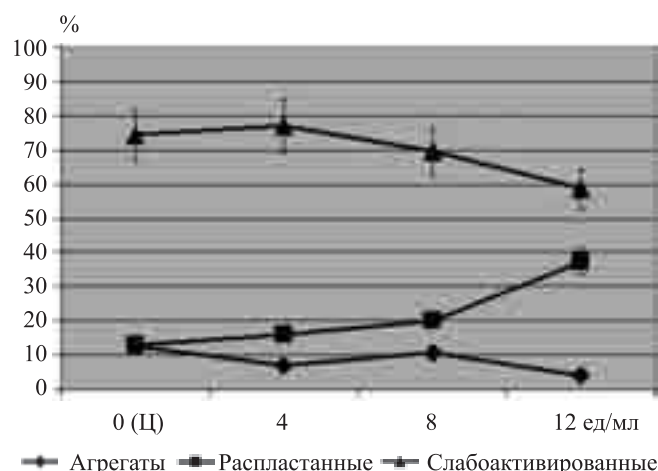


Рис. 3. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПУ

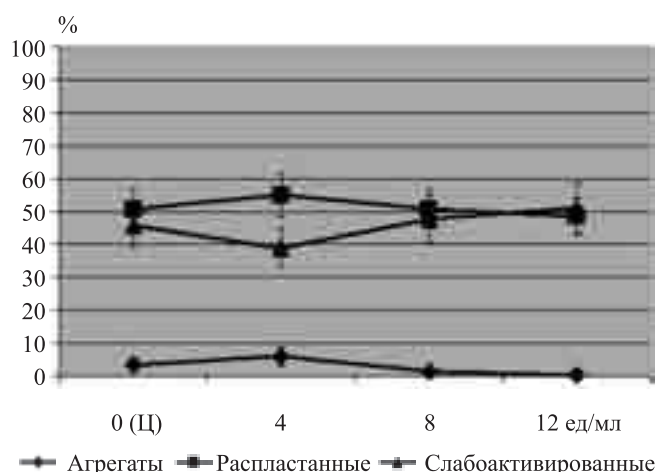


Рис. 4. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПЭ

Для поверхности ПЭ (рис. 4) переход от цитратной плазмы к гепаринсодержащей существенным образом не влияет на характер активации тромбо-

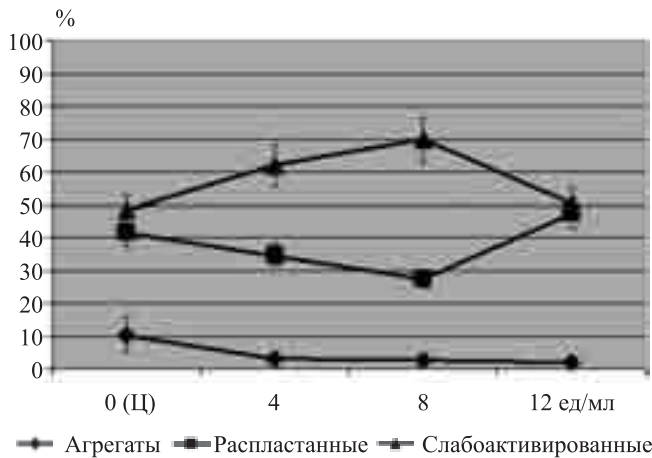


Рис. 5. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПВХ

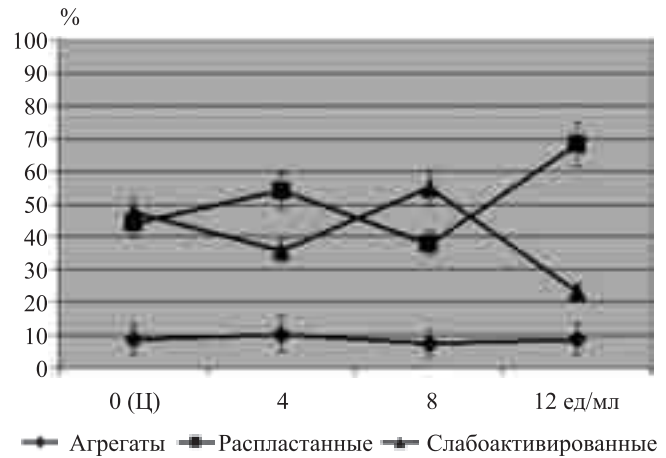


Рис. 6. Распределение тромбоцитов по классам на поверхности ПТФЭ

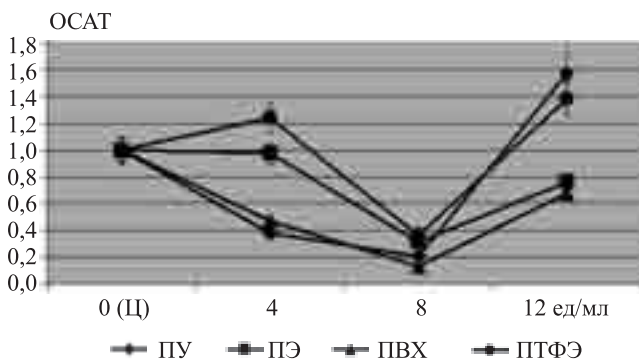


Рис. 7. Влияние природы антикоагулянта на степень активации тромбоцитов, адгезированных на поверхности медицинских материалов

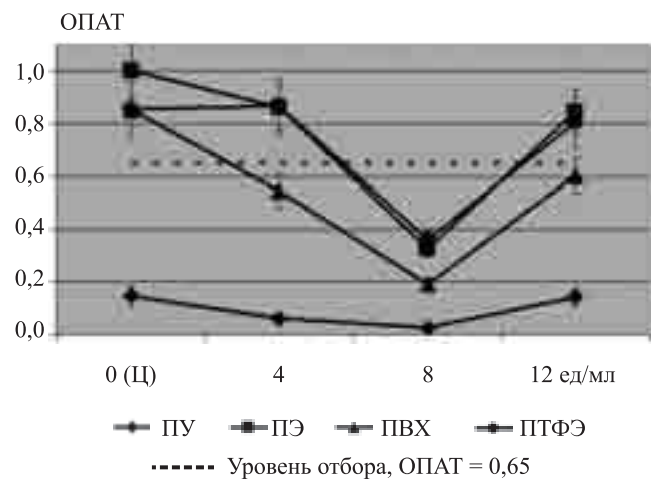


Рис. 8. Значения ОПАТ в соответствии с ГОСТ Р ИСО 10993

цитов. Можно лишь отметить некоторое снижение числа агрегатов среди активированных форм тромбоцитов при концентрации гепарина, превышающей 8,0 ед/мл.

На рис. 5 представлены распределения тромбоцитов по классам на поверхности ПВХ в зависимости от природы антикоагулянта, аналогичные поверхности ПУ (рис. 3). При переходе от цитрата к гепарину наблюдается снижение активации тромбоцитов с минимумом при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл. При увеличении концентрации гепарина до 12 ед/мл количество агрегатов продолжает снижаться, а количество распластанных клеток повышается, что, как и в случае с ПУ (рис. 3), свидетельствует о повышении активации тромбоцитов при высоких концентрациях гепарина.

В случае ПТФЭ при малой и средней концентрациях гепарина (4,0 и 8,0 ед/мл) не наблюдается существенных изменений в характере активации адгезированных тромбоцитов по сравнению с цитратной плазмой. С повышением концентрации гепарина до 12 ед/мл происходит заметное увеличение количества распластанных клеток на фоне снижения слабоактивированных форм. Количество адгезиро-

ванных агрегатов для данного материала не зависит от концентрации гепарина.

Следует отметить, что для большинства изученных полимерных материалов замена цитрата на гепарин не сопровождается существенными изменениями в количестве сильно активированных форм адгезированных тромбоцитов. Однако увеличение концентрации гепарина до 12 ед/мл сопровождается заметным повышением сильноактивированных форм адгезированных тромбоцитов за счет полностью распластанных клеток. При этом число адгезированных агрегатов с ростом концентрации гепарина имеет тенденцию к снижению.

На рис. 7 приведена зависимость относительной степени активации тромбоцитов (ОСАТ) от природы и концентрации антикоагулянта. Этот параметр является интегральным и учитывает как количество адгезированных клеток, так и степень их активации. Как видно из рис. 7, замена цитрата на гепарин в относительно низкой концентрации (4,0 ед/мл) может сопровождаться как повышением (ПТФЭ), так

и снижением (ПВХ и ПУ) степени активации адгезированных тромбоцитов, тогда как в случае ПЭ замена цитрата на гепарин не сопровождается изменением параметра ОСАТ. Минимальная активация адгезированных тромбоцитов для всех изученных образцов медицинских материалов наблюдается при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл. Увеличение концентрации гепарина до 12 ед/мл сопровождается значительным повышением критерия ОСАТ (рис. 7). При этом степень активации адгезированных тромбоцитов может быть как выше (ПУ и ПТФЭ), так и ниже (ПЭ и ПВХ) по сравнению с цитратной плазмой.

Из полученных результатов изучения влияния природы и концентрации антикоагулянта на процессы адгезии (рис. 2) и активации (рис. 7) тромбоцитов на поверхности различных материалов можно сделать вывод, что эти два процесса идут параллельно: рост общего количества адгезированных тромбоцитов сопровождается увеличением вклада активированных форм в распределение клеток по классам.

Вероятно, при низкой концентрации гепарина (4 ед/мл) количества активного гепарина не хватает для эффективного подавления адгезии и активации тромбоцитов в случае поверхности, демонстрирующей высокую адгезию и степень активации тромбоцитов, например ПТФЭ. Возможно, причиной этого служит инактивация существенной части гепарина агентами, присутствующими в плазме крови и выделяющимися в процессе адгезии и активации тромбоцитов, например тромбоцитарным фактором 4, который ингибирует каталитические свойства гепарина в отношении к инактивации тромбина антитромбином III [9]. При концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл, адгезия и активация тромбоцитов для всех изученных материалов минимальна и резко возрастает с повышением концентрации антикоагулянта до 12 ед/мл. Механизм этого пока остается неясным и требует дальнейшего изучения.

Испытания гемосовместимых свойств медицинских материалов согласно ГОСТ Р ИСО 10993 «Изделия медицинские, оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 4, исследование изделий, взаимодействующих с кровью», действующему на территории РФ, предполагают применение ПЭ в качестве единого контроля при регистрации адгезии и активации тромбоцитов в условиях *in vitro*. При этом критерием отбора является соответствие условию $ОПАТ_0 \leq 65 \pm 0,05$.

На рис. 8 представлены результаты исследования гемосовместимых свойств медицинских материалов согласно ГОСТ Р ИСО 10993. Общий вид кривых незначительно отличается от таковых, представленных на рис. 2, иллюстрирующем влия-

ние природы и концентрации антикоагулянта на характер адгезии тромбоцитов при выборе в качестве контроля количества тромбоцитов, адгезированных из цитратной плазмы на поверхности соответствующего исследуемого материала. Вместе с тем применение единого контроля (поверхность ПЭ, цитратная плазма) позволяет выявить области применимости конкретного материала в зависимости от специфики его функционирования. Так, полиуретан и поливинилхлорид во всем диапазоне изученных концентраций гепарина удовлетворяет критерию гемосовместимости согласно показателю ОПАТ. В то же время полиэтилен и тефлон демонстрируют значения $ОПАТ \leq 0,65 \pm 0,05$ лишь при концентрации гепарина, равной 8,0 ед/мл.

Поскольку концентрация гепарина в зависимости от специфики функционирования медицинских изделий может различаться значительно, исследование гемосовместимых свойств медицинских материалов и изделий следует проводить в широком диапазоне концентраций гепарина. Это позволит оценить степень пригодности того или иного материала с точки зрения применения их в составе конкретного изделия медицинского назначения, предназначенного для функционирования в условиях контакта с кровью при определенной концентрации антикоагулянта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что адгезия и активация тромбоцитов на поверхности биоматериала зависят от природы антикоагулянта. Как количество, так и степень активации тромбоцитов, адгезированных в условиях *in vitro* при контакте поверхности медицинских материалов различной природы с тромбоцитарной плазмой, стабилизированной гепарином, могут быть выше или ниже по сравнению с цитратной плазмой.

Поскольку при оценке *in vivo* биологической безопасности медицинских изделий, предназначенных для контакта с кровью, в качестве антикоагулянта используется гепарин, то для снижения риска возможных расхождений результатов экспериментов в условиях *in vitro* и *in vivo* целесообразнее в экспериментах *in vitro* использовать гепаринизированную, а не цитратную кровь. Учитывая, что зависимость адгезии и активации тромбоцитов от концентрации гепарина носит нелинейный характер, эксперименты в условиях *in vitro* следует проводить при различных концентрациях гепарина.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-02-12185).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ремеева А.А., Немец Е.А., Севастьянов В.И. Методические особенности оценки адгезии тромбоцитов человека и кролика на поверхность полимерных материалов методами оптической и сканирующей электронной микроскопии // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2008. № 2. С. 38–45.
2. Севастьянов В.И. Общие представления о процессах взаимодействия чужеродной поверхности с биологическими средами // Биосовместимые материалы / Под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. С. 25–30.
3. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / Под ред. Н.У. Тица. – М.: Лабинформ, 1997. С. 7–10.
4. Жозефович М., Жозефович Ж. Гепаринсодержащие и гепариноподобные полимеры // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. – 1985. № 30. С. 410–418.
5. Папаян Л.П. Плазменно-коагуляционное звено гемостаза // Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний; под ред. Н.Н. Петрищева, Л.П. Папаян, Санкт-Петербург, 1999. С. 10–19.
6. Маркосян А.А. Кальций. Физиология свертывания крови. М.: Медицина, 1966. С. 76–81.
7. Севастьянов В.И. Взаимодействие чужеродной поверхности с белковыми и клеточными компонентами биологических сред // Биосовместимые материалы; под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. С. 100–108.
8. Доброва Н.Б., Носкова Т.И., Новикова С.П., Севастьянов В.И. Сборник методических рекомендаций по оценке биосовместимых свойств искусственных материалов, контактирующих с кровью. М., 1991. 70 с.
9. Jacobs H., Okano T., Lin J.Y., Kim S.W. PGE-heparin conjugate releasing polymers // J. Controlled. Release. 1985. Vol. 2. P. 313–319.

ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ ЛИНИИ NIH/3T3 НА ПЛЕНКАХ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СОПОЛИМЕРА ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ-СО-3-ГИДРОКСИВАЛЕРАТА) С РАЗЛИЧНОЙ ШЕРОХОВАТОСТЬЮ ПОВЕРХНОСТИ

Сургученко В.А.¹, Пономарева А.С.², Ефимов А.Е.¹, Немец Е.А.¹, Агапов И.И.¹,
Севастьянов В.И.¹

¹ ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России, г. Москва

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», г. Москва

Проведен анализ адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности пленок из бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) с разной величиной шероховатости поверхности. Методом атомно-силовой микроскопии показано, что все образцы пленок обладали значительно большей шероховатостью ($92,0 \pm 7,0$; $290,8 \pm 7,0$; $588,8 \pm 16,0$ нм), чем культуральный пластик, использовавшийся в качестве контроля ($9,5 \pm 0,6$ нм). Обнаружено, что при увеличении шероховатости наблюдается существенное снижение адгезии и метаболической активности клеток. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 слабо удерживаются на поверхности исследуемых пленок и легко смываются с субстрата в процессе отмывки и окраски.

Ключевые слова: фибробласты, пролиферация, метаболическая активность, бактериальный сополимер, шероховатость.

CHARACTERISTICS OF ADHESION AND PROLIFERATION OF MOUSE NIH/3T3 FIBROBLASTS ON THE POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) FILMS WITH DIFFERENT SURFACE ROUGHNESS VALUES

Surguchenko V.A.¹, Ponomareva A.S.², Efimov A.E.¹, Nemets E.A.¹, Agapov I.I.¹,
Sevastianov V.I.¹

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

² ANO «Institute of Biomedical Research and Technology», Moscow

Adhesion and proliferation of NIH/3T3 mouse fibroblasts on the surfaces of bacterial copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) films with different roughness was investigated. Atomic force microscopic analysis showed that surface roughness values of all films were significantly greater (92.0 ± 7.0 ; 290.8 ± 7.0 ; 588.8 ± 16.0 nm) than that of the cultural plastic control (9.5 ± 0.6 nm). It was revealed that adhesion and metabolic activity of the cells decreases with the increase of surface roughness values. NIH/3T3 mouse fibroblasts attached weakly to the surface of copolymer films and washed away the substrate during rinsing and staining.

Key words: fibroblasts, proliferation, metabolic activity, bacterial copolymer, roughness.

Статья поступила в редакцию 17.11.11 г.

Контакты: Сургученко Валентина Александровна, старший научный сотрудник.

Тел. 8 (499)193 86 62, e-mail: valent.egorova@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Регенеративная (восстановительная) медицина – это обобщенный термин для обозначения различных терапевтических и хирургических клеточных технологий, направленных на частичную или полную компенсацию функций поврежденных или утраченных органов (тканей) [2]. В регенеративной медицине выделяют два основных направления. Одно из них связано со стимулированием клеточной/тканевой регенерации с помощью трансплантации стволовых клеток или их ассоциатов с соматическими клетками. Второе направление заключается в восстановлении целостности, структуры и функций тканей и органов с помощью так называемых тканеинженерных конструкций и биоискусственных органов, которые включают в себя следующие компоненты:

- клетки, способные формировать функционирующий внеклеточный матрикс;
- подходящий биodeградируемый носитель (матрикс) для трансплантации клеток;
- биоактивные молекулы (цитокины, факторы роста), которые оказывают биостимулирующее действие на клетки поврежденной ткани.

Тканеинженерные носители создаются для обеспечения двух- или трехмерного окружения клеток, способствующего улучшению их пролиферативных и функциональных свойств. Физико-химические и биологические свойства матриксов являются определяющими в обеспечении жизнедеятельности клеток [8].

Шероховатость и топография поверхности, как известно, влияют на адгезию и распластывание клеток различных типов на субстрате, пролиферацию как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, определяют их двигательную активность, морфологию, ориентацию, а также влияют на синтез специфических белков и внутриклеточную сигнализацию [5, 11]. Даже небольшие изменения профиля поверхности субстрата могут приводить к изменению клеточного ответа в большом диапазоне – от слабого усиления клеточной активности до значительно ее угнетения. Различные типы клеток отличаются по своей чувствительности к вариациям шероховатости и топографии поверхности. Так, например, исследование поведения нейрональных клеток на поверхностях с разбросом величин шероховатости от 6 нм до 200 мкм показали, что при шероховатости 6–49 нм происходило увеличение длины аксона клеток, а нейриты становились более разветвленными. В случае шероховатости в диапазоне 87–200 нм нейроны были менее развиты, тело нейрона имело округлую морфологию, процессы разветвления замедлялись [4]. Для клеток пупочной вены человека (HUVEC) увеличение шероховатости в диапазо-

не от 10 до 102 нм способствует адгезии и пролиферации данного типа клеток [6].

Цель данной работы – изучение влияния шероховатости поверхности пленок из бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) на адгезию и пролиферацию фибробластов мыши линии NIH/3T3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление пленок

Образцы исследуемых материалов в виде пленок изготавливали методом полива из 1%-го раствора бактериального сополимера поли(3-гидроксibuтирата-со-3-гидроксивалерата) (п(3-ГБ-со-3-ГВ), с содержанием гидроксивалерата 12%, Fluka, США, и 26%, Институт биофизики СО РАН, г. Красноярск, Россия) в метиленхлориде. С целью изменения шероховатости поверхности пленок полиэтиленгликоль (ПЭГ, Merck, Германия) в количестве 20% от веса п(3-ГБ-со-3-ГВ) вносили в рецептуру на стадии растворения сополимера. После полного испарения растворителя на дне чашек Петри образовывалась пленка из сополимера толщиной 40–50 мкм. Полученные пленки сушили при 50 °C в течение 2 ч и инкубировали в дистиллированной воде в течение суток при комнатной температуре и постоянном перемешивании с целью удаления водорастворимых примесей. Затем пленки высушивали при 50 °C и вакуумировали в течение 20 ч при комнатной температуре.

Образцы полученных пленок были промаркированы следующим образом: 1 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ; 2 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ; 3 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ+20% ПЭГ. В качестве контроля использовали поверхность культурального пластика (КП) (Corning-Costar, США).

Метод атомно-силовой микроскопии

Анализ топографии и величины шероховатости поверхности пленок проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) с помощью сканирующего зондового микроскопа NST Certus («Нано Скан Технология», Россия) в полуконтактном режиме с использованием зондовых датчиков NSC15 (MikroMasch Co., Эстония) с резонансной частотой ~320 кГц и радиусом острия ~10 нм. Данные по шероховатости поверхности были получены с помощью вычисления среднеквадратичного отклонения (RMS). В работе использована статистика по 5 АСМ-изображениям в разных точках для каждого образца.

Адгезия и пролиферация фибробластов линии NIH/3T3

Фибробласты мыши линии NIH/3T3, полученные из коллекции перевиваемых соматических клеток позвоночных ГУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН» (НИИВ РАМН), перед посевом на образцы пленок и контроль культивировали в стандартных культуральных флаконах площадью 25 см² (Corning-Costar, США), в ростовой среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Perbio-NuClone, США), 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ФГУП «НПО «Микроген», Россия), 1 mM NEPER (ПанЭко, Россия) в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях: 37 °C, во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO₂. Исходное количество клеток в суспензии определяли с использованием гемоцитометра (камеры Горяева).

Исследуемые стерильные образцы пленок, предварительно помещенные в культуральные плоскостонные 6-луночные планшеты, в асептических условиях засеивали фибробластами мыши линии NIH/3T3. Исходная плотность посева на исследуемые образцы и контроль КП составляла 2×10^3 кл./см². После посева 6-луночные планшеты с образцами культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях в течение 24, 48, 72 и 96 ч, после чего проводили соответствующие исследования. Визуально прикрепившиеся и распластанные клетки оценивали с помощью бинокулярного инвертированного микроскопа «Биолам П-1» (Россия) при увеличении $\times 300$.

Метаболическую активность фибробластов, культивируемых на поверхности исследуемых пленок, оценивали через 24, 48, 72 и 96 ч с помощью витального реагента alamarBlue® (Invitrogen, Великобритания) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. В лунки, содержащие исследуемые образцы, добавляли 10% витального реагента alamarBlue®, после чего образцы инкубировали с alamarBlue® в течение 4 ч при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO₂. alamarBlue® – витальный краситель, в состав которого входит индикатор окислительно-восстановительных процессов. Пролиферирующие клетки восстанавливают alamarBlue®, вследствие чего происходит изменение его цвета с индиго на розовый. Изменение поглощения среды регистрировали с помощью комбинированного ридера для микропланшет Synergy™2, модель SLFPA (Bio Tec Instruments Inc., США) на длинах волн 570 и 600 нм. В качестве контроля использовали среду без клеток с добавлением alamarBlue®. Процент восстановленного alamarBlue® характеризует метаболическую активность клеток.

Жизнеспособность фибробластов на поверхности пленок исследовали с помощью набора Live/

dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, Великобритания) согласно протоколу, рекомендуемому производителем для фибробластов мыши линии NIH/3T3. Метод заключается в двойном флуоресцентном окрашивании, с одновременным определением живых и мертвых клеток посредством связывания красителей: бромистого этидия (ethidium bromide homodimer, EthD-1) и ацетоксиметил кальцеина (calcein acetoxymethyl, calcein AM). EthD-1 является маркером мертвых клеток, проникая через поврежденную плазматическую мембрану и связываясь с нуклеиновыми кислотами, дает яркое красное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~635 нм). Calcein AM, проникая в жизнеспособные клетки, подвергается воздействию внутриклеточных эстераз, превращаясь в кальцеин, дающий ярко-зеленое однородное флуоресцентное свечение (возб./эмиссия ~495 нм/~515 нм). Исследуемые пленки инкубировали в растворе фосфатного буфера Дюльбекко, содержащем 2 мкМ calcein AM и 4 мкМ EthD-1, в течение 30 мин, после чего результаты окрашивания визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Люмам Р1 (Ломо, Россия) и фотографировали с помощью цифровой камеры Nikon Coolpix 990 (Япония).

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программ Microplate data collection & Analysis software Gen5™, а также Microsoft Excel. Все результаты представлены в виде среднего значения ± среднеквадратичное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование образцов методом АСМ показало, что все образцы пленок обладают значительно большей шероховатостью, чем КП, использовавшийся в качестве контроля (табл.). Из трех серий биополимерных пленок минимальной шероховатостью обладает образец 1 ($92,0 \pm 7,0$ нм).

Таблица

Значения шероховатости для исследуемых образцов

Образец	Шероховатость поверхности (RMS), нм (n = 5)
КП	$9,5 \pm 0,6$
1 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ	$92,0 \pm 7,0$
2 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ	$290,8 \pm 7,0$
3 – сополимер п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ	$588,8 \pm 16,0$

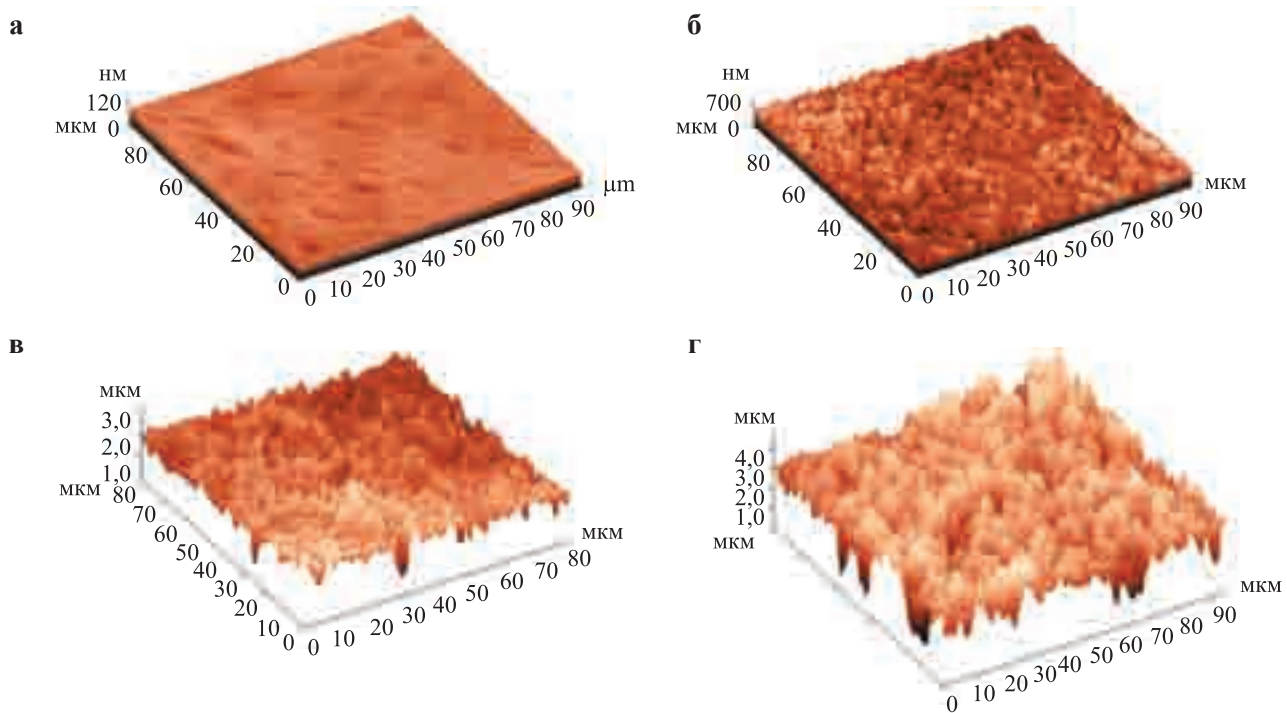


Рис. 1 АСМ-изображения поверхности: а – культурального пластика (КП); б – образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); в – образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); г – образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ). Площадь сканирования 100 × 100 мкм

Образцы 2 и 3 имеют существенно отличающуюся морфологию: поверхность более рыхлая, содержит ярко выраженные поры и волокнистые структуры, а также более высокую шероховатость, чем образец 1. Показано, что добавление ПЭГ в значительной степени влияет как на значение шероховатости поверхности ($588,8 \pm 16,0$ нм, что в 2 раза превосходит шероховатость поверхности образца 2 и в 6 раз образца 1), так и на морфологию – поверхность содержит более крупные поры и волокнистые структуры большего размера (рис. 1).

Результаты исследования метаболической активности мышинных фибробластов представлены на рис. 2. На протяжении всего времени исследования метаболическая активность фибробластов NIH/3T3 на поверхности контроля – КП с шероховатостью порядка 10 нм была существенно выше, чем на поверхности всех исследуемых образцов, клетки лучше адгезировали и интенсивнее пролиферировали, достигая плотного монослоя через 96 ч.

На образце 3 с наибольшей шероховатостью $588,8 \pm 16,0$ нм метаболическая активность фибробластов на протяжении всего периода исследования была значительно ниже по сравнению с контролем и образцами 1 и 2, имеющими шероховатость $92,0 \pm 7,0$ и $290,8 \pm 7,0$ нм соответственно. Через 24 ч метаболическая активность фибробластов на образцах 1 и 2 одинакова, примерно в 3 раза ниже, чем в контроле, большинство клеток имеют округлую форму, наблюдаются единичные распластанные клет-

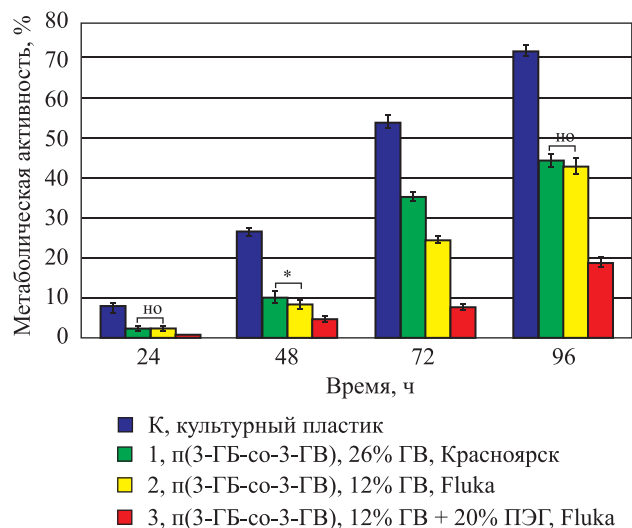


Рис. 2. Метаболическая активность фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности: К – контроля (КП); 1 – образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); 2 – образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); 3 – образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ). (но – различия статистически не значимы, * – достоверные различия, $p < 0,05$)

ки. Через 48 ч между образцами 1 и 2 обнаружено значимое различие метаболической активности, для образца 1 несколько выше, через 72 ч различие растет, а через 96 ч становится снова статистически не различимым. К 96 ч на образцах 1 и 2 образуется монослой, как и в контроле, но в отличие от контроля не все клетки распластанные, фибробла-

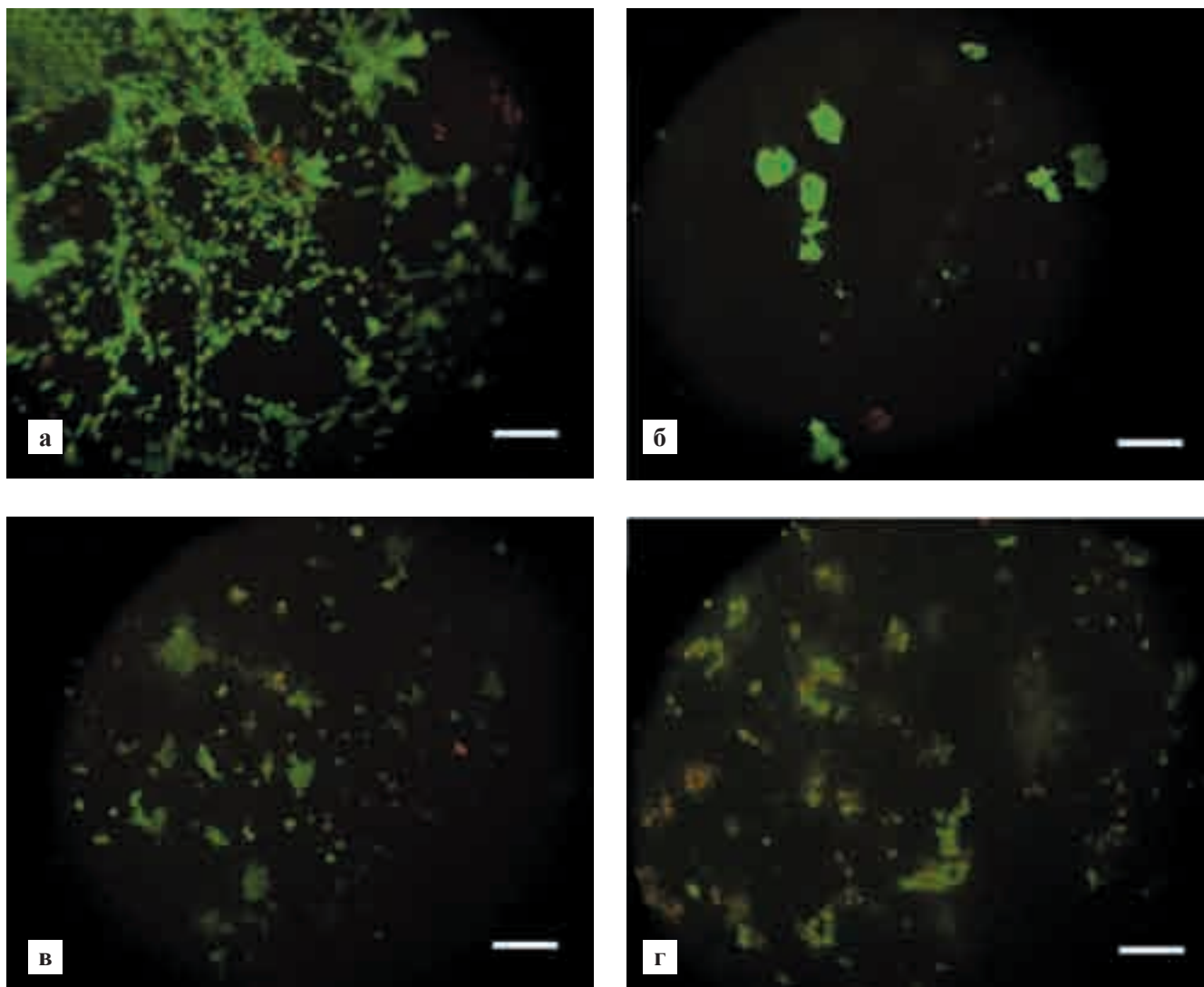


Рис. 3. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 на поверхности: а – культурального пластика (КП); б – образца 1 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 26% ГВ); в – образца 2 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ); г – образца 3 (п(3-ГБ-со-3-ГВ), 12% ГВ + 20% ПЭГ). Время культивирования – 72 ч. Окрашивание Live/dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, Великобритания). Бар 100 мкм

сты на образце 3 монослая не достигали. Данные по исследованию жизнеспособности фибробластов на поверхности исследуемых пленок (рис. 3) показали, что через 72 ч на всех исследуемых поверхностях клетки жизнеспособны. Наибольшее количество распластанных фибробластов наблюдается в контроле, в то время как на остальных образцах клетки имеют преимущественно округлую морфологию и собраны в конгломераты. Наибольшее количество мертвых клеток обнаружено на образце 3.

Было показано, что микрошероховатость поверхности (100 нм – 100 мкм) стимулирует дифференцировку клеток в остеогенном направлении [5]. Например, первичные остеобласты крысы на поверхности с шероховатостью порядка 0,81 мкм активнее пролиферируют и имеют повышенный уровень активности щелочной фосфатазы и экспрессии остеокальцина по сравнению с гладкой поверхностью (меньше 1 мкм). Аналогичный эффект на-

блюдали с эмбриональными остеобластами человека (hFOB 1.19) [10]. Обнаружено, что при культивировании на поверхности с шероховатостью порядка 13 нм фибробласты человека показывают высокую адгезионную и пролиферативную активность, повышение уровня экспрессии белков и активности цитоскелета. При шероховатости субстрата порядка 95 нм существенно снижается даже первоначальная адгезия фибробластов [7, 9].

Другие авторы продемонстрировали увеличение адгезии фибробластов человека и усиление ранних межклеточных взаимодействий на поверхностях с шероховатостью 20 и 50 нм [12].

Таким образом, на поверхности культурального пластика с шероховатостью порядка 10 нм фибробласты мыши линии NIH/3T3 прочно прикреплялись, распластывались, пролиферировали и демонстрировали интенсивную метаболическую активность. В ряду исследованных образцов бактериаль-

ного сополимера при увеличении шероховатости поверхности с $92,0 \pm 7,0$ до $588,8 \pm 16,0$ нм наблюдается существенное снижение адгезии и метаболической активности клеток. Фибробласты мыши линии NIH/3T3 слабо удерживаются на поверхности исследуемых пленок и легко смываются с поверхности субстрата в процессе отмывки и окраски.

Известно, что сополимеры п(3-ГБ-со-3-ГВ) в зависимости от содержания гидроксивалерата отличаются по своим физико-химическим свойствам [1]. Ранее нами было показано, что введение 20% ПЭГ в объем сополимера п(3-ГБ-со-3-ГВ) с содержанием 26% ГВ повышало гидрофильность, приводило к снижению шероховатости на воздухе до $57,9 \pm 2,0$ нм, что способствовало адгезии, расплыванию и пролиферации фибробластов мыши линий L929 и NIH/3T3 и мезенхимальных стромальных фибробластоподобных клеток крысы [1, 3]. В данной работе добавление ПЭГ драматически повысило шероховатость сополимера п(3-ГБ-со-3-ГВ) с содержанием 12% ГВ, что привело к существенному снижению процессов адгезии и пролиферации фибробластов мыши линии NIH/3T3 на поверхности исследуемых образцов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление ПЭГ в состав бактериальных сополимеров одного состава, но отличающихся соотношением мономерных составляющих, по-разному влияет как на физико-химические свойства поверхности (морфология, шероховатость), так и характер ее взаимодействия с клеточными культурами.

Найденный эффект необходимо учитывать при выборе области применения имплантатов на основе бактериальных сополимеров. Так, введение ПЭГ в бактериальный сополимер с 26% ГВ приводит к снижению шероховатости и способствует адгезии, расплыванию и пролиферации фибробластов мыши, что является необходимым функциональным свойством матрикса тканеинженерной конструкции. При концентрации 12% ГВ присутствие ПЭГ в сополимере, напротив, существенно увеличивает шероховатость поверхности и снижает процессы адгезии и пролиферации фибробластов. Такие материалы целесообразно использовать для профилактики образования спаечных процессов, например, в виде биodeградируемого искусственного перикарда при операциях на открытом сердце или при герниопластике грыж передней брюшной стенки в качестве покрытий сетчатых полимерных имплантатов. Естественно, что характер взаимодействия имплантата с клетками будет зависеть не только от физико-химических свойств поверхности материала, но и от вида клеточной культуры. В связи с этим для каждого вида клеток необ-

ходимо проведение дополнительных исследований по выяснению влияния физико-химических свойств поверхности на процессы адгезии и пролиферации клеточных культур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волова Т.Г., Севастьянов В.И., Шишацкая Е.И. Полиоксидантаты – биоразрушаемые полимеры для медицины: Монография. 2-е изд., дополн. и переработ. Красноярск, 2006. 288 с.
2. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Немец Е.А. и др. Примеры экспериментально-клинического применения биосовместимых материалов в регенеративной медицине // Биосовместимые материалы (учебное пособие); под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. Часть II. Глава 3. М.: МИА, 2011. С. 237–252.
3. Сургученко В.А. Матрицы для тканевой инженерии и гибридных органов // Биосовместимые материалы (учебное пособие); под ред. В.И. Севастьянова, М.П. Кирпичникова. Часть II. Глава 1. М.: МИА, 2011. С. 199–228.
4. Bartolo L.D., Rende M., Morelli S. et al. Influence of membrane surface properties on the growth of neuronal cells isolated from hippocampus // Journal of Membrane Science. 2008. Vol. 325. P. 139–149.
5. Chang H.-I., Wang Y. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds in Regenerative medicine and tissue engineering – Cells and Biomaterials ed. By Daniel Eberli. 2011. P. 569–588.
6. Chung T.-W., Liu D.-Z., Wang S.-Y. et al. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale // Biomaterials. 2003. Vol. 24. P. 4655–4661.
7. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S. et al. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography // European Cells and Materials. 2005. Vol. 9. P. 1–8.
8. Kikuchi M., Kanama D. Current status of biomaterial research focused on regenerative medicine // Quarterly Review. 2007. 24. P. 51–67.
9. Kumbar S.G., Kofron M.D., Nair L.S. et al. Cell behavior toward nanostructured surfaces in Biomedical Nanostructures / Edited by Kenneth E. Gonsalves, Craig R. Halberstadt, Cato T. Laurencin, Lakshmi S. Nair. 2008. P. 261–287.
10. Lim J.Y., Hansen J.C., Siedlecki C.A. et al. Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces // Journal of Royal Society Interface. 2005. Vol. 2. P. 97–108.
11. Singhvi R., Stephanopoulos G., Wang D.I.C. Effects of substratum morphology on cell physiology // Biotechnol. and Bioeng. 1994. Vol. 43 (8). P. 764–771.
12. Xu H., Bhavsar Z.A., Nguyen K.T. Nanoparticles-incorporated scaffolds for tissue engineering applications in Nanotechnology in tissue engineering and regenerative medicine / Edited by Ketul Popat. 2011. Part 14. P. 14-1 – 14-17.

ПРИМЕНЕНИЕ ГОМОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ДОНОРСКИХ РОГОВИЦ ПРИ ХРАНЕНИИ В НОРМОТЕРМИЧЕСКОМ И ГИПОТЕРМИЧЕСКОМ РЕЖИМАХ

Борзенко С.А.¹, Ролик О.И.¹, Онищенко Н.А.², Комах Ю.А.¹, Делекторская В.В.³

¹ ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий, г. Москва

² ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

³ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, г. Москва

Исследовано защитное действие тканеспецифических регуляторных пептидов на эндотелиальные клетки (ЭК) изолированных донорских роговиц при хранении в нормотермическом (до 24 суток) и гипотермическом (до 9 суток) режимах. Проанализирована динамика ультраструктурных изменений в эндотелиальных клетках в процессе хранения, изменения их плотности, показателя гексагональности и средней площади клеток, проведена электронная микроскопия. Установлено, что тканеспецифические регуляторные пептиды оказывают защитное действие на ультраструктурную архитектуру ЭК донорских роговиц, повышают плотность межклеточных контактов, увеличивая допустимые сроки органного культивирования до 16 суток и гипотермической консервации до 9 суток.

Ключевые слова: эндотелий роговицы, трансплантат роговицы, цитоплазматические пептиды, регуляторные пептиды, консервация роговицы.

THE USE OF HOMOLOGOUS CELLULAR PEPTIDES DURING MEDIUM-TERM CORNEAL ORGAN CULTURE AND CORNEAL COLD STORAGE

Borzenok S.A.¹, Rolik O.I.¹, Onischenko N.A.², Komakh Y.A.¹, Delektorskaya V.V.³

¹ The Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow

² Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

³ N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

There was studied of protective effects of homologous cellular peptides on corneal graft endothelium cells during the corneal organ culture (24 days) and corneal cold storage (9 days). The dynamic of endothelial cells (EC) ultrastructural changes during the storage, decrease of endothelial cells density, percentage of hexagonal-shape cells, average area and electronic microscopy were analysed. Tissue-specific regulatory corneal peptides exhibited clear protective effect on ultra structure of grafts' endothelial cells during the preservation, increase density cell-cell contact, prolong term of organ culture (till 16 days) and cold storage (till 9 days).

Key words: cornea endothelium cells, corneal graft, cytoplasm peptides, regulatory peptides, cornea preservation.

Статья поступила в редакцию 09.01.12 г.

Контакты: Ролик Ольга Ивановна, аспирант Центра фундаментальных и прикладных медико-биологических проблем ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологии.

Тел. 8 926 677 58 05, e-mail: oktarin@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Проблема трупного тканевого донорства и трансплантации жизнеспособной роговицы является одним из наиболее сложных и актуальных разделов офтальмологии [1, 3, 5, 14, 15].

Для прозрачного приживления сквозного трансплантата роговицы необходима максимальная сохранность морфофункционального состояния его эндотелиальных клеток (ЭК), обеспечивающих нормальную гидратацию и прозрачность посредством осуществления ими энергозависимой транспортной и насосной функций [14]. ЭК роговицы являются высокодифференцированными клетками и имеют нейроглиальное происхождение [2, 7, 8, 13]. Так как биологически ЭК не способны к митотической регенерации, то при их значительной потере в посттрансплантационном периоде возникает сначала функциональная декомпенсация, а затем необратимое помутнение трансплантата [14].

В изолированных трупных роговицах уже на этапе консервации в нормотермическом и гипотермическом режимах происходит дисрегуляция энергетического метаболизма, в результате чего в ЭК возникает ряд морфофункциональных перестроек, сопровождающихся ослаблением межклеточных взаимодействий, десквамацией ЭК и снижением их жизнеспособности [12, 14].

Выкраивание и фиксация роговичного трансплантата при сквозной и задней послойной кератопластиках также сопровождаются потерей ЭК, в связи с чем исходная плотность эндотелиальных клеток (ПЭК) является определяющей для сохранения функции роговицы после трансплантации и по данным должна быть не менее 2800–3000 кл/мм² [15].

В этой связи пролонгирование адекватного метаболизма и повышение жизнеспособности ЭК трупных донорских роговиц на этапе их консервации является крайне важной и актуальной задачей [1].

Анализ публикаций по проблеме культивирования и консервации изолированных донорских роговиц позволяет прийти к заключению, что пролонгирование адекватного метаболизма в трансплантатах роговицы, повышающего морфофункциональную резистентность ее ЭК к воздействию ишемического и гипотермического стрессов [10], может быть достигнуто путем усовершенствования составов консервационных сред.

Наибольшие возможности в плане совершенствования противоишемической защиты и защиты от гипотермического повреждения создает включение в культуральные среды и консервирующие растворы различных биологически активных веществ, которые, пролонгируя энергетические и пластические процессы, повышают эффективность межкле-

точных взаимодействий и формируют плотность межклеточных контактов [16–18].

В целях восстановления и поддержания структуры и функции ЭК трупных донорских роговиц в процессе их хранения значительный интерес представляют фармакологические препараты на основе регуляторных клеточных пептидов, полученных из тканей глаза. К таким препаратам нового поколения относятся цитамины отечественного производства [4, 9] и тканевая панель препаратов NeyDIL импортного производства [6, 11]. К сожалению, отечественная фармакологическая промышленность не производит препаратов регуляторных пептидов с адресным действием к эндотелиальным клеткам роговицы. До настоящего времени единственным органотропным препаратом, полученным из регуляторных пептидов клеточной цитоплазмы эмбриональных роговых оболочек промышленных животных, является препарат NeyDIL Nr.37 «Cornea», который выпускается немецкой фирмой «VitOrgan», имеющий Государственную регистрацию в Российской Федерации.

Между тем данных о возможности повышения качества защиты изолированных трупных донорских роговиц от повреждения с помощью гомологичных регуляторных пептидов на этапе нормотермического культивирования и гипотермической консервации в литературе нет. Прямая зависимость результата трансплантации роговицы от исходной жизнеспособности и плотности сцепления ЭК между собой послужила основанием для изучения эффективности применения органотропных регуляторных пептидов роговиц – препарата NeyDIL Nr.37 для улучшения морфофункциональной сохранности ЭК и повышения резистентности трупной донорской роговицы к действию неблагоприятных факторов нормотермического органного культивирования и гипотермической консервации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были отобраны 40 трупных роговиц от доноров зрелого возраста (средний возраст составил 32 ± 4 года). Срок ишемии роговиц (от смерти до консервации) составлял не более 12 часов.

В качестве биологически активной добавки использовали моноорганный препарат NeyDIL Nr.37, полученный из фетальных и ювенильных роговиц крупного рогатого скота и содержащий гомологичные клеточные пептиды роговицы в концентрации 100 мкг/мл.

Проведенные исследования включали две серии наблюдений. Первая серия – изучение возможности повышения качества донорских роговиц, культивированных в нормотермических условиях при +35 °C

в CO₂-инкубаторе с концентрацией CO₂ – 5%. При этом на 20 парных роговицах от 10 доноров применялись стандартные культуральные среды с добавлением 5% декстранов, но без добавления фетальной бычьей сыворотки, чтобы исключить влияние содержащихся в ней факторов роста на эндотелий, культивированных донорских роговиц.

В первой серии наблюдались две группы: опытная (n = 10) и контрольная (n = 10). В опытной группе среда дополнительно содержала пептидный препарат NeyDIL Nr.37, в концентрации 1 мкг/мл среды. Сроки культивирования в опытной и контрольной группах составляли 8, 16 и 24 дня, в те же сроки проводился анализ морфометрических и ультраструктурных характеристик эндотелиальных клеток.

Вторая серия экспериментов была выполнена на донорских роговицах, консервированных в гипотермических условиях при +6 °С в среде Борзенка–Мороз (n = 20 пар роговиц от 10 трупных доноров) и также включала опытную (n = 10) и контрольную (n = 10) группы.

В опытной группе в среду Борзенка–Мороз добавляли пептидный препарат NeyDIL Nr.37 в дозе 1 мкг/мл среды. Сроки консервации составили 3, 6, 9 суток, в эти же сроки проводился анализ морфометрических и ультраструктурных характеристик эндотелиальных клеток с помощью электронной сканирующей и трансмиссионной микроскопии.

Электронная сканирующая микроскопия проводилась на растровом ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (Голландия) с возможностью проведения исследований объектов в режиме естественной среды без применения глубокого вакуума, напыления и жесткой фиксации с помощью альдегидов, что не нарушало архитектоники и морфометрии клеток.

Для трансмиссионного электронно-микроскопического исследования материал фиксировали в 2,5% растворе глutarового альдегида по стандартной методике с последующей заливкой в эпоксидную смолу ЭПОН-812. Ультратонкие и полутонкие срезы готовили на ультрамикротоме LKB-III (Швеция). Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным раствором уранилацетата и цитратом свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1200 EX II (Япония).

Исследования плотности ЭК (ПЭК), площади и показателя гексагональности ЭК донорских роговиц проводились неинвазивным способом с помощью компьютерного кератоанализатора для глазных банков Копап (Япония). Для подсчета ПЭК, а также для более полной оценки состояния эндотелиального пласта применялся инвертированный световой микроскоп 307 – 143.003 Leitz Wetzlar

GmbH (Германия) с цифровой камерой-окуляром DCM510 (Китай).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Известно, что в норме эндотелий роговицы характеризуется цитоплазмой, богатой органеллами, содержащей большое количество митохондрий. Обильное содержание органелл в цитоплазме обеспечивает выполнение эндотелием важнейших энергозатратных трансмембранных насосных функций, при нарушении которых роговица быстро набухает и мутнеет. Кроме того, гексагональная форма ЭК обеспечивает наибольшую прочность межклеточных контактов, и ее нарушение ведет к ослаблению межклеточного взаимодействия и снижению их функций. Поэтому при оценке результатов сохранения изолированных роговиц в нормотермическом и гипотермическом режимах мы в первую очередь обращали внимание на ультраструктурную сохранность митохондриального аппарата эндотелиальных клеток, а также на особенности их морфометрических характеристик.

Культивирование роговиц в нормотермических условиях

На 8-е сутки культивирования роговиц трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) не выявила ультраструктурных отличий между опытной и контрольной группой. Ультраструктура митохондриальных крист и мембран эндотелия обеих групп соответствовала норме (рис. 1, а, б). На 16-е сутки культивирования в контрольной группе отмечалась отечность митохондриальных мембран, выявлялись равномерно вымытый митохондриальный матрикс и небольшая сглаженность митохондриальных крист (рис. 1, г). В опытной группе на 16-е сутки изменений в митохондриальных мембранах и кристах не было обнаружено (рис. 1, в). Наибольшая разница между опытной и контрольной группами проявилась на 24-е сутки инкубирования. В опыте отмечалось незначительное сглаживание митохондриальных крист, в контроле митохондрии приобретали округлую форму, в набухших митохондриях выявлялось частичное, а иногда и полное разрушение крист; кроме этого, появилась картина паренхиматозной дегенерации и необратимости нарушения клеточных процессов, что проявлялось осаждением клеточных белков в матриксе цитоплазмы эндотелиальных клеток (рис. 1, д, е).

При сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в контрольной группе к 24-му дню были выявлены значительный полиморфизм, то есть наличие клеток с различными диагональными размерами и различной площадью, единичные клетки ги-

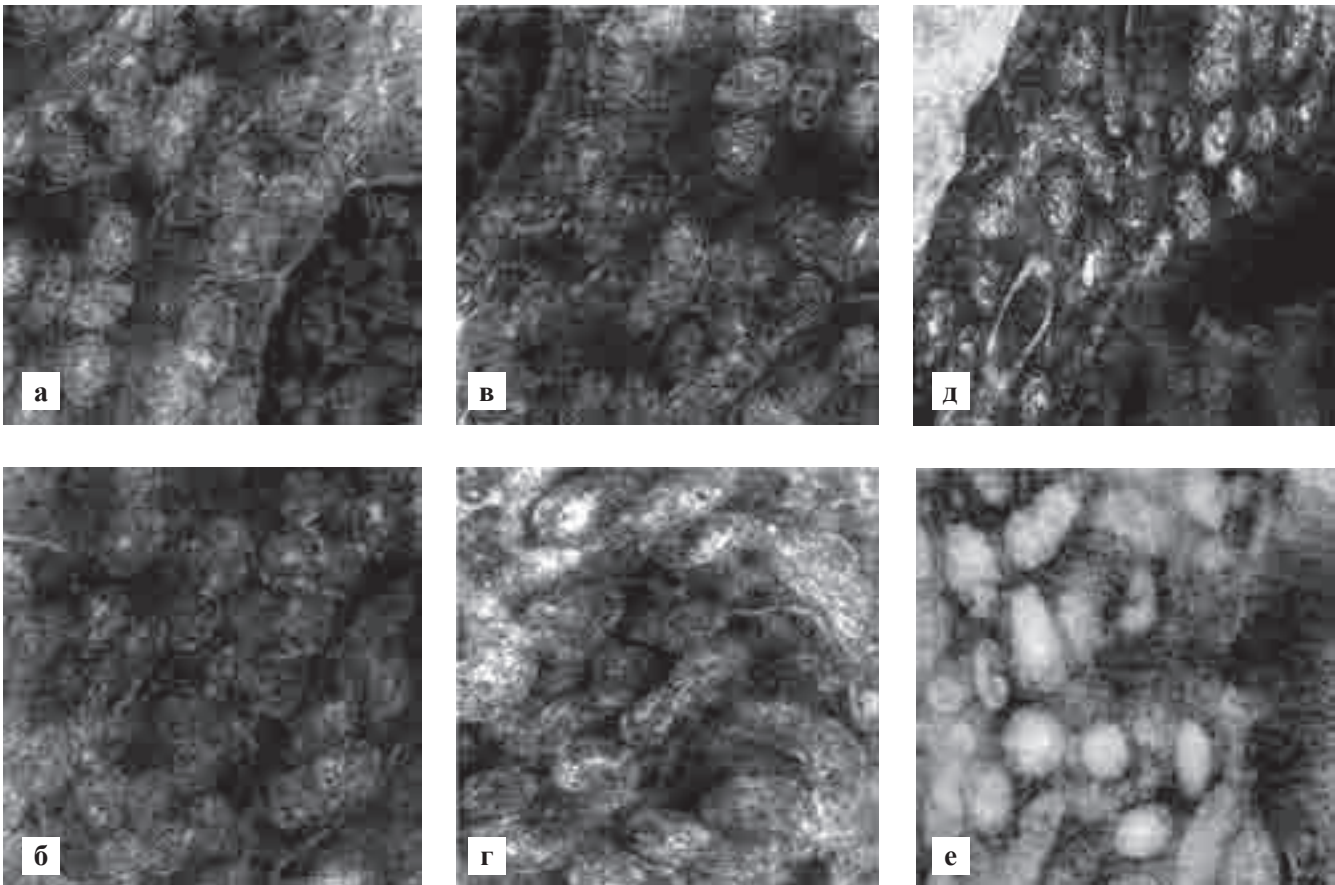


Рис. 1. ТЭМ митохондрий в эндотелиальных клетках донорских роговиц из опытной (а, в, д) и контрольной (б, г, е) групп, культивированных в нормотермических условиях ($t = +35^{\circ}\text{C}$) в течение различных сроков, $\times 20\,000$: а, б – 8-е сутки культивирования, ультраструктурных отличий между опытной и контрольной группой не выявлено; в, г – 16-е сутки, в опыте изменений не выявлено, в контроле отчетность митохондриальных мембран, вымытый митохондриальный матрикс, сглаженность митохондриальных крист; д, е – 24-е сутки, в опыте сглаживание митохондриальных крист, в контроле в набухших митохондриях выявляется частичное, а иногда и полное разрушение крист, картина паренхиматозной дегенерации

гантского размера (рис. 2, в). В опытной группе эндотелиальные клетки сохранили мноморфизм и гексагональность, даже в области складок роговицы (рис. 2, а). При максимально эффективном увеличении в контрольной группе отмечено уменьшение электронно-оптической плотности внутри клеток, обусловленное деструкцией билипидного слоя мембран (рис. 2, г), что не наблюдалось в опытной группе (рис. 2, б).

Анализ изменений плотности эндотелиальных клеток (ПЭК) показал, что достоверная разница между контрольной и опытной группами появляется на 16-е сутки культивирования: в опытной группе снижение ПЭК достигает 4,8%, тогда как в контрольной группе – 6,3% при максимальных допустимых значениях до 5%. Через 24 дня органного культивирования анализ ПЭК показал, что потеря ЭК в опытной группе составила 6,1%, в контрольной – 9,7%, то есть и в опытной, и в контрольной группах превысила допустимые значения.

Площадь ЭК через 16 суток культивирования в опытной группе увеличилась на 0,92%, а в кон-

троле – на 2,57%; а к 24-м суткам культивирования площадь эндотелиальных клеток в опыте увеличилась на 3,3%, в контроле – на 4,6%. Процент гексагональных клеток на 16-е сутки культивирования в опыте уменьшился на 5,54%, а в контроле – на 22,27%. К 24-м суткам культивирования этот показатель составил 12, 68 и 33,03% соответственно, т. е. в опыте уменьшился всего на 12%, в контроле – почти в 3 раза, то есть на 33%. Оценка результатов изменения ПЭК и анатомического строения ЭК в процессе культивирования позволяет прийти к заключению, что гомологичные клеточные пептиды роговицы увеличивают сроки культивирования до 16 суток.

Гипотермическая консервация роговицы

При трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) на 3-и сутки гипотермической консервации не было выявлено существенной разницы в ультраструктурной архитектонике эндотелиальных клеток опытной и контрольной групп (рис. 3, а, б). Но

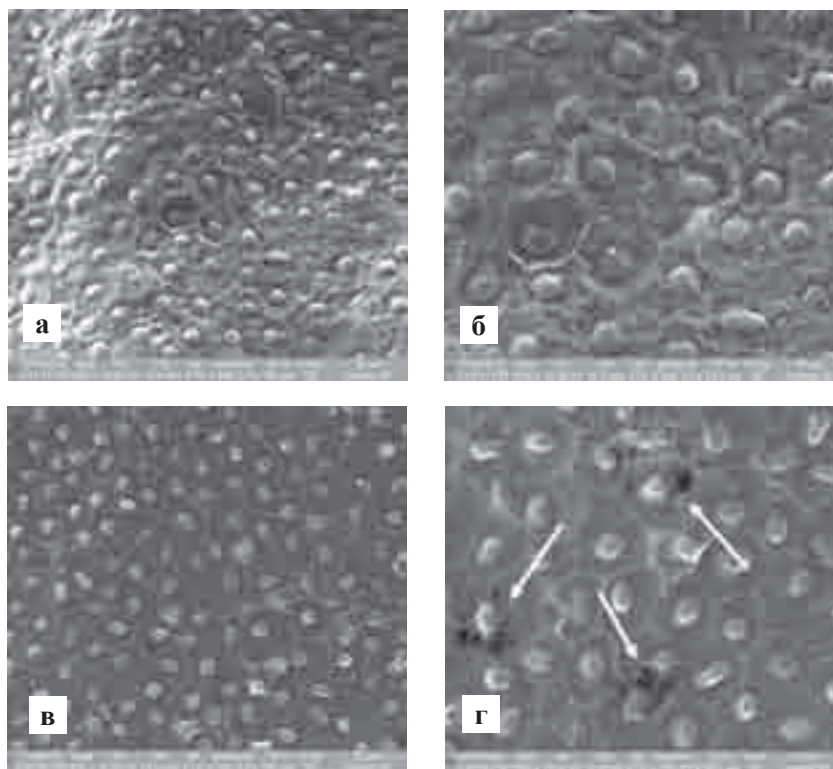


Рис. 2. СЭМ эндотелиального пласта роговиц в опытной (а, б) и в контрольной (в, г) группах, культивированных в нормотермических условиях при $t = +35^{\circ}\text{C}$ в течение 24 суток: а, б – $\times 800$, в контроле – значительный полиморфизм и полимегетизм, в опыте эндотелиальные клетки сохранили мономорфизм и гексагональность; б, г – $\times 1600$, в опыте клетки без изменений электронно-оптической плотности, в контроле – уменьшение электронно-оптической плотности внутри клеток, выраженная деструкция липидного бислоя мембран

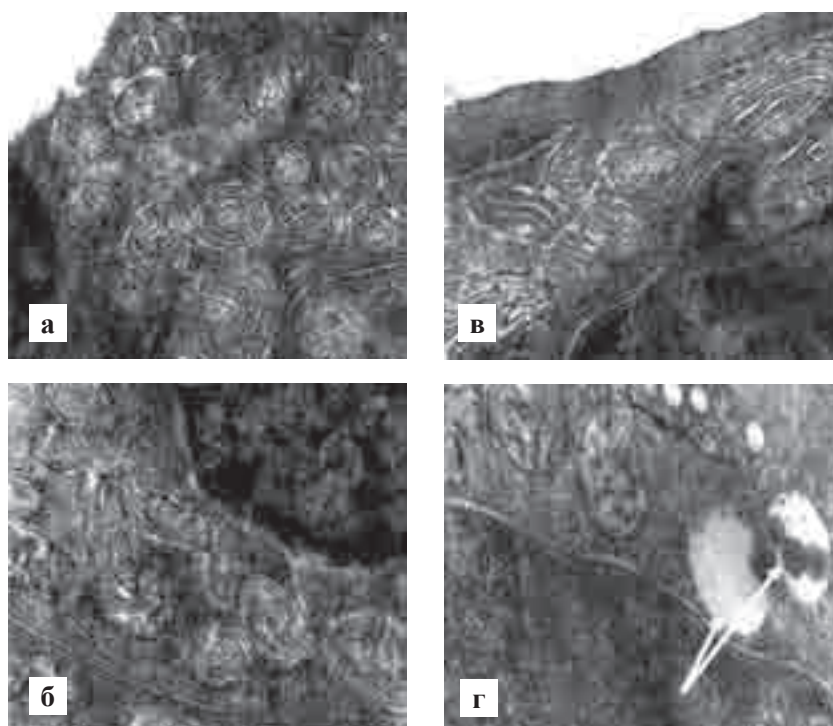


Рис. 3. ТЭМ митохондрий в эндотелиальных клетках донорских роговиц опытной (а, в) и контрольной (б, г) групп после гипотермической консервации ($t = +6^{\circ}\text{C}$) на разных сроках, $\times 20\,000$: а, б – 3-и сутки консервации, ультраструктурных отличий между опытом и контролем не выявлено; в, г – 6-е сутки консервации, в опыте без изменения, в контроле в эндотелиальных клетках наряду с ультраструктурно сохраненными органеллами присутствуют митохондрии с прозрачным матриксом, кристы которых либо отсутствуют, либо фрагментированы

на 6-е сутки консервации в эндотелиальных клетках контрольной группы наряду с ультраструктурно сохранными органеллами обнаруживается присутствие митохондрий с совершенно прозрачным матриксом, кристы которых либо отсутствовали либо были фрагментированы (рис. 3, г). На 9-е сутки консервации в эндотелиальных клетках роговиц опытной группы митохондрии приобретали округлую форму, отмечался начинающийся отек митохондриальных мембран, кристы митохондрий были сохранены (рис. 4, а, б), в то время как в контроле выявлены грубые ультраструктурные изменения клеток – цитоплазма фрагментирована, цитоплазматический матрикс просветлен, в нем видны многочисленные пузырьки различного размера и практически полное отсутствие сохранных органелл, что является явным признаком их аутолиза (рис. 4, в, г).

При сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на 9-е сутки в опыте отмечалось появление гигантских клеток, но клетки сохранили гекса- и пентагональность (рис. 5, а, б). В контроле выявлено выраженное разрушение межклеточных контактов и уменьшение электронно-оптической плотности внутри клеток, свидетельствующих о деструкции цитоскелета и липидного бислоя мембран, чего не наблюдалось в опытной группе (рис. 5, в, г).

Было проведено дополнительное электронно-микроскопическое исследование роговиц опытной

и контрольной групп на 12-е сутки консервации. И в опытной, и в контрольной группах были выявлены грубые ультраструктурные повреждения пласта эндотелия.

За 9-е сутки гипотермической консервации потеря ЭК в опытной группе составила 4,1%, в контрольной – 7,2%, то есть снижение ПЭК в опытной группе не превышало предельно допустимых значений.

Площадь клеток в опыте увеличилась на 1,8%, в контроле на 2,9%, процент гексагональных клеток к 9-м суткам в опыте снизился всего на 6,86%, а в контроле – на 28%, свидетельствуя о значительно лучшей сохранности клеток в опытной группе к 9-м суткам консервации роговицы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование показало, что включение регуляторных клеточных пептидов в среды для органного нормотермического культивирования и гипотермической консервации донорских роговиц повышает протективные свойства сред, используемых для пролонгированного сохранения изолированных роговиц, повышает их жизнеспособность и увеличивает допустимые сроки их хранения. Об этом свидетельствуют более длительное сохранение ультраструктуры ми-

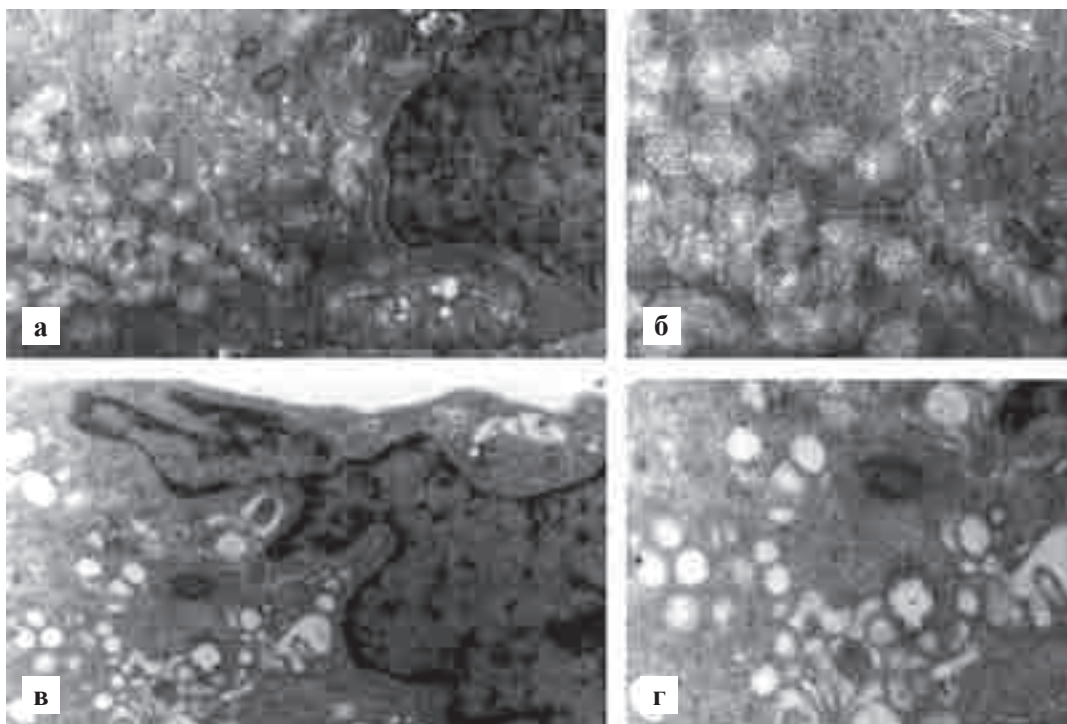


Рис. 4. ТЭМ митохондрий в эндотелиальных клетках донорских роговиц в опытной (а, б) и контрольной (в, г) группах после гипотермической консервации ($t = +6\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 9 суток: а, б – начальный отек митохондриальных мембран, митохондрии округлой формы, кристы митохондрий сохранены, а – $\times 10\,000$, б – $\times 20\,000$; в, г – грубые ультраструктурные изменения, цитоплазма фрагментирована, цитоплазматический матрикс просветлен, в нем видны многочисленные пузырьки различного размера, практически полное отсутствие сохранных органелл, в – $\times 10\,000$, г – $\times 20\,000$

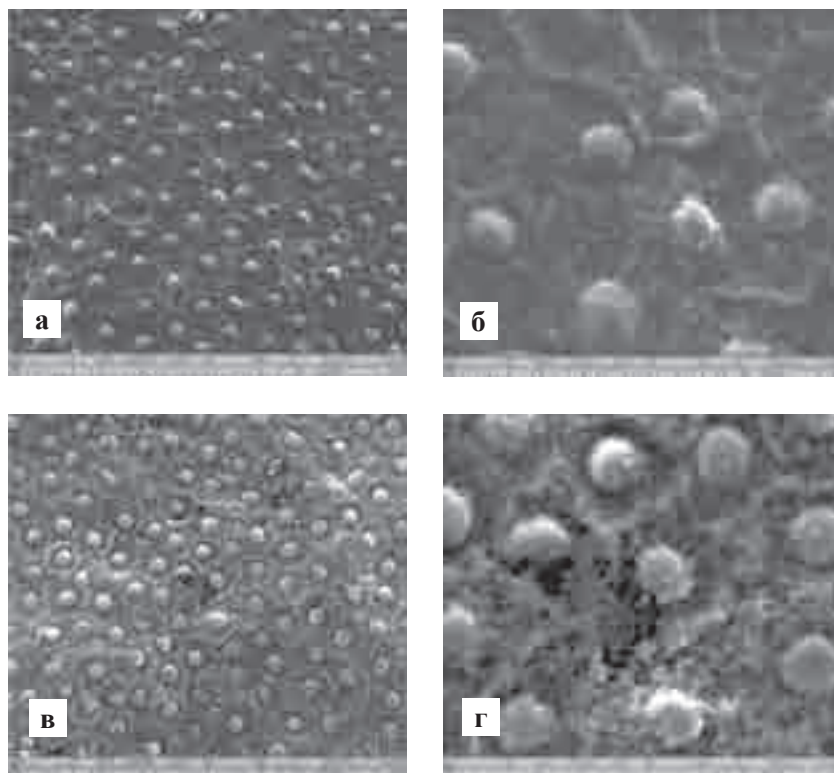


Рис. 5. СЭМ эндотелия донорских роговиц в опытной (а, б) и контрольной (в, г) группах после гипотермической консервации ($t = +6\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 9 суток: а, б – выражен полимегитизм, но клетки сохранили гекса- и пентагональность а – $\times 800$, б – $\times 3000$; в, г – выраженное разрушение межклеточных контактов, уменьшение электронно-оптической плотности внутри клеток, деструкция цитоскелета и липидного бислоя мембран, в – $\times 800$, г – $\times 3000$.

тохондрий ЭК, снижение темпа потери ЭК и более высокий процент сохранения гексагональных клеток в эндотелиальном монослое, что по данным ТЭМ и СЭМ обусловлено протективным действием на липопротеидный бислой клеточных мембран.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борзенко С.А. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2008. С. 309.
2. Вит В.В. Строение зрительной системы человека. Одесса: АстроПринт, 2003. 655 с.
3. Каспаров А.А., Ермаков Н.В., Раннопорт Ю.М. Эндотелий трансплантата донора после сквозной кератопластики // Вестн. офтальмол. 1990. Т. 106. № 5. С. 12–16.
4. Максимов И.Б. Применение препарата ретиналамин в офтальмологии: Пособие для врачей. СПб., 2005. 20 с.
5. Мороз З.И., Тахчиди Х.П., Калинин Ю.Ю. и др. Современные аспекты кератопластики // Федоровские чтения – 2004. «Новые технологии в лечении заболеваний роговицы». М., 2004. С. 280–288.
6. Ролик И.С. Пептидотерапия: клиническое применение. М.: РегБиоМед, 2010. 448 с.
7. Ронкина Т.И. Закономерности возрастных изменений эндотелия роговицы человека в норме и патологии, возможности активации пролиферации эндотелия и их назначение в офтальмологии: Дис. ... д-ра мед. наук в форме науч. доклада. М., 1994. 48 с.
8. Федоров С.Н., Ронкина Т.И., Явишева Т.М. Эндотелий роговицы человека. М.: МНТК «Микрохирургия глаза», 1993. 126 с.
9. Хавинсон В.Х., Трофимова С.В. Пептидные биорегуляторы в офтальмологии // СПб., 2003. 44 с.
10. Шумаков В.И., Онищенко Н.А., Курпатовский В.И. Фармакологическая защита трансплантата. М.: Медицина, 1983. 232 с.
11. Heine H. Wissenschaftliche Grundlagen der Organtherapie // Tierärztliche Umschau. 1996.51. P. 71–73.
12. Hsu J.K.W., Cavanagh H.D., Jester J.V. et al. Changes in corneal endothelial apical functional protein organization after corneal cold storage // Cornea. 1999. Vol. 18. № 6. P. 712–720.
13. Hwang D.G. Proliferative Capacity of the Corneal Endothelium // V World Cornea Congress. Washington, DC, 2005. P. 16.
14. Krachmer J.H., Mannis M.J., Holland E.J. Cornea. Fundamentals, Diagnosis and Management: 2nd Edition. Elsevier-Mosby, 2005. Vol. 1. 1409 p.
15. Melles G.R., Eggink F., Lander F. A surgical technique for posterior lamellar keratoplasty // Cornea. 1998. № 17. P. 618–626.

16. *Tripathi B.J., Kwait P.S., Tripathi R.C.* Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals // *Cornea*. 1992. Vol. 9. P. 2–9.
17. *Vincent P. T. Hoppenreijds, Elisabeth Pels, Gijs F.J. M. Vrensen and W. Frits Treffers.* Basic fibroblast growth factor stimulates corneal endothelial cell growth and endothelial wound healing of human corneas // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994. Vol. 35. № 3. P. 931–944.
18. *Xin Gu, EunDuck P. Kay.* Distribution and Putative Roles of Fibroblast Growth Factor-2 Isoforms in Corneal Endothelial Modulation // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998. Vol. 39. № 12. P. 2252–2258.

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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

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



Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	80248 (индекс издания)																									
		КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																									
на 2012 год по месяцам																											
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																
Куда _____ (почтовый индекс) (адрес)																											
Кому _____ (фамилия, имя, отчество)																											

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		80248 (индекс издания)																								
ДОСТАВочная КАРТОЧКА на журнал																											
ПИ _____ (почтовый индекс)		КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																									
на 2012 год по месяцам																											
<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td> </tr> </table>				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																
Куда _____ (почтовый индекс) (адрес)																											
Кому _____ (фамилия, имя, отчество)																											

ТЕХНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОСУДИСТОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕВОГО ЛАТЕРАЛЬНОГО СЕКТОРА ПЕЧЕНИ ВЗРОСЛОГО ДОНОРА В ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Готье С.В., Ахаладзе Д.Г.

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздравсоцразвития России, г. Москва

Ключом к успешной трансплантации левого латерального сектора печени является адекватное восстановление афферентного и эфферентного кровотоков трансплантата. В мире накоплен богатый опыт выполнения подобных оперативных вмешательств. Известно множество разнообразных вариантов выполнения гепатико-кавальной, портальной и артериальной реконструкций. Разнообразие практикуемых в мире вариантов хирургического исполнения сосудистых анастомозов представлено в настоящей публикации.

Ключевые слова: трансплантация печени, левый латеральный сектор печени, гепатико-кавальная, портальная, артериальная реконструкции.

TECHNICAL ASPECTS OF VASKULAR RECONSTRUCTION IN PEDIATRIC LEFT LATERAL SEGMENT TRANSPLANTATION

Gautier S.V., Akhaladze D.G.

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

The most important factor in the successful liver left lateral segment transplantation is the graft adequate afferent and efferent blood flow restoration. Modern experience of similar surgical operations includes different variants of hepatico-caval and portal venous and arterial reconstructions. Wide spectrum of surgical versions of the vascular anastomoses is presented in the resent revue.

Key words: liver transplantation, liver left lateral segment, hepatico-caval, portal, arterial reconstructions.

Хирургическая техника трансплантации печени (ТП) прогрессировала в ногу с совершенствованием анестезиологического пособия и развитием фармакологического обеспечения, что позволило расширить критерии отбора реципиентов. Однако при постоянно нарастающем числе пациентов, ожидающих трансплантации, общество столкнулось с проблемой дефицита трупных органов, особенно в педиатрической практике, поскольку посмертное детское донорство в большинстве стран ограничено.

Развиваясь наиболее бурно в последнее десятилетие XX столетия, родственная трансплантация печени стойко зарекомендовала себя как метод

борьбы с дефицитом трупных органов и, дав шанс на спасение преимущественно детского контингента пациентов, получила распространение во множестве стран мира.

Трансплантация левого латерального сектора (ЛЛС) взрослого донора детям подразумевает ряд технических сложностей при восстановлении как эфферентного, так и афферентного кровотоков. Единый подход в формировании сосудистых анастомозов при трансплантации ЛЛС печени, полученного как от живого родственного донора, так и при сплит-трансплантации печени, отсутствует, что связано с множеством анатомических вариантов реципиента.

Статья поступила в редакцию 16.12.11 г.

Контакты: Ахаладзе Дмитрий Гурамович, врач отделения абдоминальной хирургии и трансплантации.

Тел. 8 905 587 89 92, **e-mail:** blissoutsurg@yahoo.com

Считаем целесообразным отдельно остановиться на наиболее распространенных технических вариантах исполнения гепатико-кавального, порто-портального и артериального анастомозов.

ГЕПАТИКО-КАВАЛЬНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ

Пионерами в разработке техники имплантации фрагмента печени явились Э.И. Гальперин и В.И. Шумаков, впервые в России выполнившие трансплантацию левой доли печени в гетеротопическую позицию. Тогда они столкнулись с необходимостью анастомозировать печеночную вену трансплантата с правой подвздошной веной реципиента [1].

Гепатико-кавальная реконструкция является первым этапом имплантации ЛЛС печени ребенку [20]. При этом перед хирургами встает задача в выборе подходящей техники при тех или иных вариантах строения венозного оттока от трансплантата. Некоторые зарубежные авторы путем решения последней проблемы считают использование венозных вставок и кондуитов, что, по мнению М. Malago, способно привести к затруднению венозного оттока от трансплантата [29]. Существенно разнятся и предпочитаемые методики наложения сосудистого шва, оставляя единым только прецизионный подход и необходимость использования увеличительной техники.

Ниже сформулированы основные факторы, усложняющие восстановление венозного оттока от трансплантата левого латерального сектора:

- разница в диаметре анастомозируемых сосудов (а также особенности развития нижней полой вены (НПВ) ребенка);
- количество требующих реваскуляризации печеночных вен, дренирующих ЛЛС, зависящее от конкретной ангиоархитектоники печени донора;
- отсутствие единого подхода в использовании техники сосудистого шва.

Решением первой задачи большинство авторов считают различные варианты увеличения диаметра устья левой печеночной вены трансплантата, а также комбинации использования от одного до трех устьев печеночных вен реципиента. В начале трансплантационной эры практиковался метод анастомозирования культи левой печеночной вены реципиента с левой печеночной веной трансплантата «конеч в конец» [52]. Однако в связи с высокой частотой дислокации трансплантата от этой методики вскоре отказались.

Большого внимания заслуживает количество требующих реваскуляризации печеночных вен. Для решения этой проблемы целесообразно остановиться на наиболее часто встречающихся вариантах стро-

ения венозного дренажа ЛЛС печени. На протяжении многих лет анатомические варианты формирования и впадения ЛПВ и СПВ в НПВ вызывали множество дебатов среди хирургов-гепатологов и трансплантологов и явились предпосылкой к появлению различных методик формирования гепатико-кавального анастомоза. В такой ситуации, S. Orguc и M. Tercan в 2004 г. модифицировали классификацию впадения печеночных вен в НПВ P. Soyer et al. (1995), создав наиболее популярную и простую классификацию (табл.) [40].

Таблица

**Классификация анатомии
левой печеночной вены**

Схема анатомического варианта	Описание анатомического варианта	Частота, %
1 	Одиночный ствол левой печеночной вены	16
2 	Раздельное впадение в НПВ передней и задней ветвей левой печеночной вены	5
3 	Слияние передней и задней ветвей левой печеночной вены с образованием общего ствола	54
4 	Слияние передней и задней ветвей левой печеночной вены с образованием общего ствола + латеральная ветвь от IV сегмента	25

Выбор методики гепатико-кавальной реконструкции зависит от варианта венозного дренажа, приведенного в таблице.

В случае если сегментарные вены ЛЛС сливаются в единый ствол (вариант 1, 3), метод реконструкции не вызывает сомнений и един для всех трансплантационных клиник. При венозных дренажах, иллюстрированных схемами 2 и 4, после изъятия ЛЛС у родственного донора велика вероятность получения двух окружностей сегментарных печеночных вен (рис. 1), каждая из которых может быть самостоятельно дренирована в НПВ реципиента.

Отечественная же школа в лице С.В. Готье придерживается иного подхода, стараясь сократить количество накладываемых анастомозов, тем самым снижая риск хирургических осложнений, следуя по пути упрощения хирургической задачи. Однако в большинстве случаев целесообразно объединение в единое устье окружностей сегментарных вен на «back table» для создания одного гепатико-кавального анастомоза (рис. 2) [2].

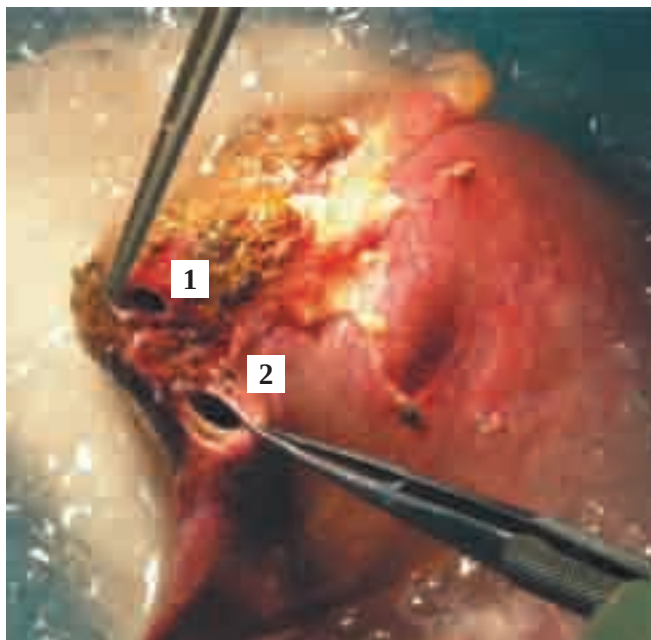


Рис. 1. Отдельные устья печеночных вен II (1) и III (2) сегментов печени донора

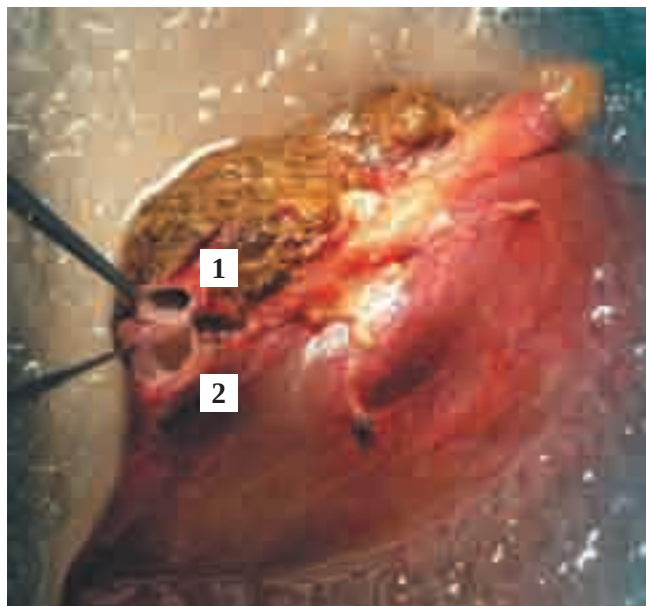


Рис. 2. Объединенные устья вен II (1) и III (2) сегментов

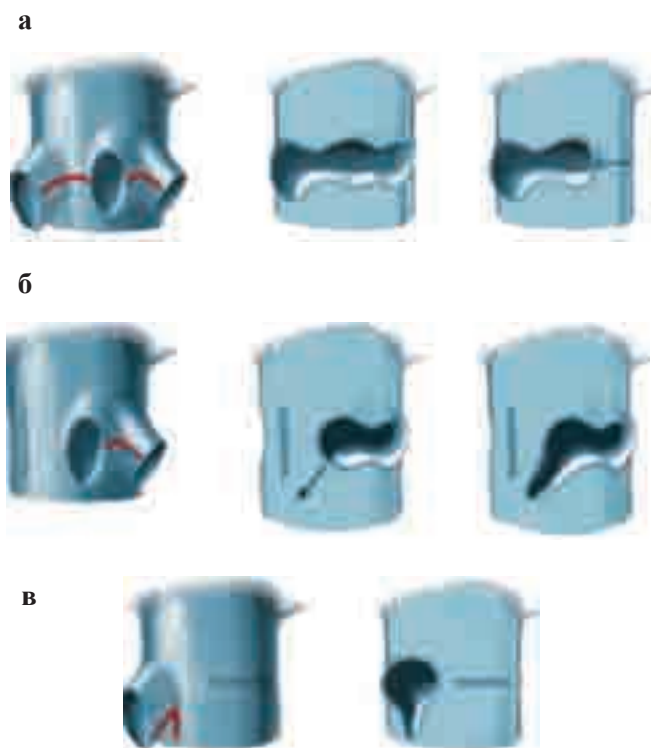


Рис. 3. Создание окна в НПВ реципиента

Для преодоления разницы диаметров анастомозируемых окружностей и создания надежного и адекватного венозного оттока от трансплантата К. Tanaka и Н. Egawa для имплантации ЛЛС в арсенале имеют 3 стандартные техники выполнения гепатико-кавального анастомоза [21].

1. Формируется единое отверстие в НПВ из трех печеночных вен реципиента (рис. 3, а).
2. Окружность из объединенных срединной печеночной вены (СПВ) и левой печеночной вены (ЛПВ) дополняется рассечением нижней полой вены (рис. 3, б).
3. Для реконструкции используется устье правой печеночной вены (ППВ), дополненное рассечением НПВ (рис. 3, в).

У. Tannuri и соавторы использовали 2 техники, практически аналогичные предыдущим. Первый вариант заключался в формировании анастомоза между окружностью донорской левой или левой и срединной печеночных вен и объединенным устьем левой и срединной печеночных вен реципиента. Второй вариант подразумевал создание широкого треугольного окна в НПВ реципиента из конfluence всех трех печеночных вен и дополнительного рассечения НПВ в нисходящем направлении. Анализируя опыт 54 трансплантаций ЛЛС печени детям с использованием двух описанных методик, авторы рекомендуют всегда придерживаться последней, аргументируя свое предпочтение отсутствием осложнений в группе пациентов из 28 детей, где использовались устья трех печеночных вен [52].

ПОРТАЛЬНАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ

Выполнение порто-портального анастомоза при совпадении диаметров и достаточной длине портальных культей донора и реципиента обычно не представляет трудностей [27, 28, 51, 57], а осложнения в виде портального тромбоза наблюдаются только в 1,0–1,8% случаев [3, 26]. Трудности при вос-

становлении портального кровотока трансплантата возникают при врожденных или приобретенных в процессе болезни окклюзиях или недоразвитии воротной вены (ВВ) реципиента. По данным J. Lerut и соавт., значительные предсуществующие изменения ВВ наблюдались в 16,3% случаев, в основном у детей, и требовали предварительной тромбэктомии, или различных вариантов венозной реконструкции с использованием донорских венозных вставок, или селезеночной вены реципиента, а разница диаметров воротных вен реципиента и трансплантата левого латерального сектора присуща всему детскому контингенту пациентов [3, 10, 26].

Ниже перечислены основные препятствия, которые приходится преодолевать при выполнении портальной реконструкции при имплантации левого латерального сектора печени детям:

- несовпадение диаметров анастомозируемых культей ВВ реципиента и трансплантата;
- предсуществующий тромбоз ВВ реципиента;
- гипоплазия ВВ реципиента;
- кавернозная трансформация ВВ реципиента.

По мнению S. Saad и K. Tanaka, при ТП детям использование классического анастомоза «конец в конец» зачастую затруднительно из-за существенной разницы диаметров ВВ реципиента и фрагментарного печеночного трансплантата [43]. Подчеркивая необходимость использования альтернативной методики анастомозирования, авторы на примере 110 родственных трансплантаций ЛЛС пациентам в возрасте от 3 месяцев до 17 лет демонстрируют 4 типа порто-портальной реконструкции. ВВ печеночного трансплантата анастомозировалась:

- конец в конец с ВВ реципиента (тип I – 32%);
- с площадкой, созданной из бифуркации ВВ реципиента на левую и правую долеветы (тип II – 24%);
- с областью слияния верхней брыжеечной и селезеночной вен реципиента (тип III – 14%);
- конец в конец с венозной вставкой, имплантированной между ВВ трансплантата и конfluenceм верхней брыжеечной и селезеночной вен реципиента (тип IV – 29%).

Подводя итоги, авторы заключают, что наиболее эффективной и безопасной методикой нивелирования разницы диаметров воротных вен является использование конfluenceа верхней брыжеечной и селезеночной вен реципиента с использованием или без использования венозной вставки (типы III и IV). Худшие результаты, на основе анализа с помощью доплерофлоуметрии скорости кровотока по ВВ трансплантата, получены при II типе. Также авторы констатируют наибольшую частоту стенозов порто-портальных анастомозов при подобной технике [16].

I.K. Marwan и соавторы, выполнив 314 РТП, разделили все портальные реконструкции на 2 груп-

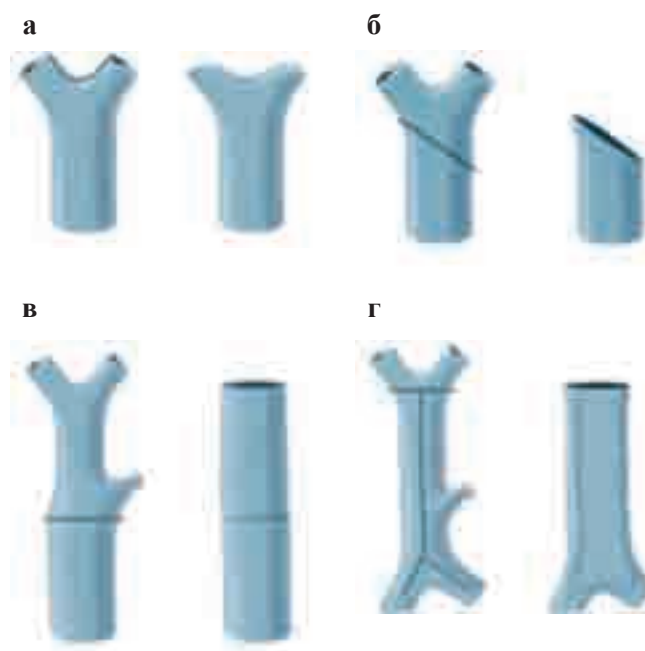


Рис. 4. Техники наложения порто-портального анастомоза

пы – с использованием и без использования венозных вставок. В качестве последних использовались левая гонадная или нижняя брыжеечная вены родственного донора. Методики не отличались от описанных предыдущими авторами. Лучшие результаты получены в группе, где использовался конfluence селезеночной и верхней брыжеечной вен реципиента [32].

По данным литературы, подходы к решению первой задачи схожи у многих хирургических школ. Отличаются лишь показания к использованию той или иной методики. P. Clavien для наложения порто-портального анастомоза в арсенале имеет 4 следующие техники:

- 1) использование площадки из бифуркации ВВ реципиента на долеветы (рис. 4, а);
- 2) косой срез ВВ реципиента (допустим при достаточной длине ВВ трансплантата) (рис. 4, б);
- 3) интерпозиция венозной вставки (рис. 4, в);
- 4) использование patch graft (рис. 4, г).

Два первых варианта наиболее просты и используются для нивелирования разницы диаметров воротных вен реципиента и трансплантата. В случае если стенка ВВ реципиента повреждена или просвет ее сужен, автор рекомендует «заменять» ее венозной вставкой. Если последняя слишком мала для интерпозиции, рекомендуется продольно рассекать имеющуюся вставку для увеличения ее диаметра [22].

Если несоответствие диаметров окружностей ВВ никогда не препятствовало трансплантации, то вторая проблема – тромбоз ВВ реципиента, встречающийся, по данным P. Seu и C. Shackleton, в 3,2–13,8% трансплантаций печени [44], – долгое время в некоторых клиниках являлась противопоказа-

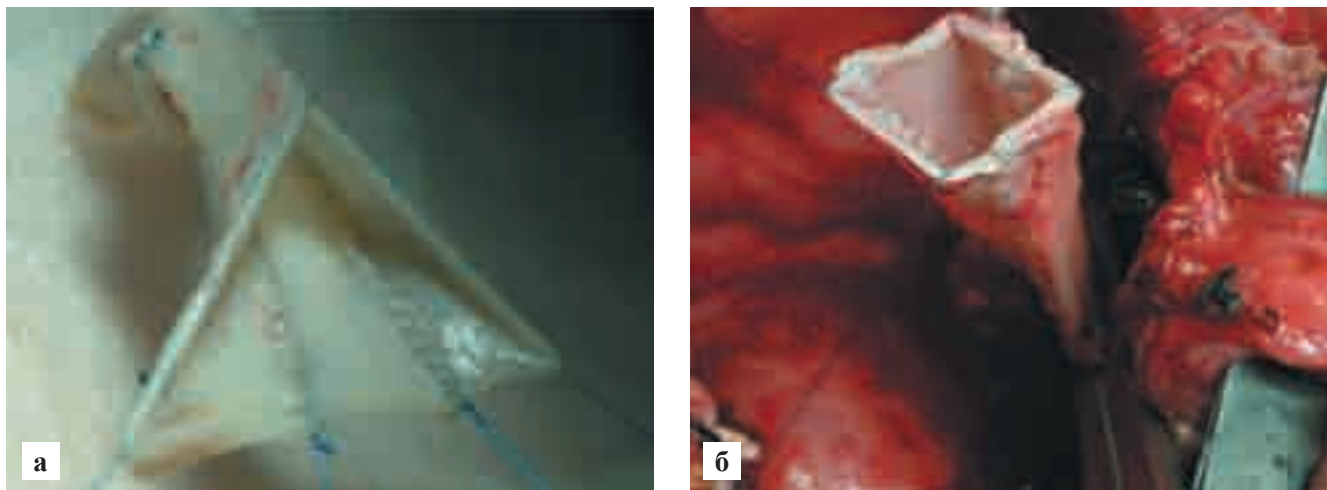


Рис. 5. Техника создания сосудистого протеза путем сшивания трех венозных лоскутов

нием к трансплантации. G. Manzanet и соавт., демонстрируя опыт 415 ТП, наглядно утверждают, что тромбоз ВВ преодолим и не является противопоказанием к ТП [30]. По мнению авторов, оперативный прием в таких случаях заключается в выполнении тромбэктомии из ВВ с помощью катетера Fogarty с оценкой проходимости верхней брыжеечной и селезеночной вен реципиента. При недостаточности этой процедуры допускается выполнение продольной портотомии до уровня сплено-портomesентериального соустья и выполнение тромбэктомии острым путем. G. Могено в подобных случаях рекомендует иссекать частично и полностью тромбированную ВВ реципиента с последующей пластикой венозной вставкой [13].

Отдельного внимания заслуживает тромбоз ВВ, распространяющийся на верхнюю брыжеечную и селезеночную вены реципиента, что делает невозможным перфузию трансплантата портальной кровью. Выходом из положения у таких пациентов является мультивисцеральная трансплантация, или использование для перфузии печеночного трансплантата НПВ реципиента (кава-портальная транспозиция) [55]. N. Kumar и соавторы описывают успешный случай родственной трансплантации ЛЛС печени ребенку, страдающему циррозом печени в исходе атрезии желчевыводящих путей, с тромбозом воротной, верхней брыжеечной и селезеночной вен. Авторы описывают формирование кава-портального анастомоза «конец в конец» между ВВ трансплантата и супраренальным отделом НПВ реципиента с удовлетворительным результатом [24].

Резюмируя вышесказанное на основе анализа литературы, можно констатировать, что исходный тромбоз ВВ реципиента не является противопоказанием к родственной трансплантации, а хирургическая тактика в подобной ситуации исчерпыва-

ется тромбэктомией, или протезированием венозной вставкой. В случае распространенного тромбоза портального русла возможна кава-портальная транспозиция.

Различные методики были предложены для борьбы с еще одним вызовом хирургам – гипоплазией ВВ. В зарубежной литературе описывается протезирование гипоплазированной ВВ (диаметр <5 мм) внутренней подвздошной аутовеной реципиента на примере 14 успешных наблюдений [37]. В мировой практике методология борьбы с гипоплазией ВВ сводится к ее протезированию. Различается лишь природа протезов. Как было сказано выше, возможно использование левой гонадной или нижней брыжеечной вен донора. Также могут быть использованы замороженные крио-трансплантаты [50]. Однако сообщается об их частых окклюзиях в практике РТП [23, 36] или эндогенных повреждениях, ввиду высокой объемной скорости кровотока по ВВ в условиях наличия портальной гипертензии и изменения характеристик портального кровотока в послеоперационном периоде [18].

Представители китайской трансплантологической школы на примере родственной трансплантации правой доли печени описывают оригинальную методику создания сосудистого протеза путем продольного сшивания трех лоскутов, полученных из большой подкожной вены реципиента (рис. 5) [8].

Преимуществом данной методики является возможность создания подходящего диаметра, а также длины протеза путем уменьшения ширины сосудистых полосок. По мнению авторов, наличие дополнительных сосудистых швов не представляет дополнительного риска тромбообразования из-за их продольной направленности.

Методика использована только при родственной трансплантации правой доли печени, хотя описывается ее универсальность и возможность примене-

ния при других видах трансплантаций, в том числе в педиатрической практике.

Схожие приемы используются и при выполнении порто-портального анастомоза при трансплантации фрагмента печени детям, страдающим кавернозной трансформацией воротной вены. Основная проблема заключается в преодолении нехватки длины анастомозируемых венозных стволов, что диктует необходимость использования венозных вставок или протезов.

АРТЕРИАЛЬНАЯ РЕВАСКУЛЯРИЗАЦИЯ

Артериальный анастомоз традиционно считается наиболее трудоемким, технически сложным и требует максимальной тщательности выполнения и использования соответствующего шовного материала, особенно если речь идет о трансплантации в педиатрической практике [45].

Правильный выбор *варианта артериальной реконструкции* (1) с учетом анатомических особенностей и *количества подлежащих реваскуляризации ветвей* (2), а также *преодоление разницы диаметров* (3) и *мелкого калибра анастомозируемых артериальных стволов* (4) являются решающими факторами в достижении успеха операции [4].

Фактором, который, с точки зрения Т. Soliman, может стать причиной тромбоза артериального анастомоза, является «комплексная артериальная реконструкция», то есть наличие дополнительных артериальных ветвей трансплантата, требующих реваскуляризации [49]. Наиболее распространенным анатомическим вариантом, встречающимся при трансплантации ЛЛС, является наличие дополнительной артериальной ветви из бассейна левой желудочной артерии (ЛЖА). В подобных ситуациях, когда необходимо восстанавливать афферентный артериальный кровоток и по левой доле печеночной артерии, и по ветви от ЛЖА, большинство авторов стараются создать на препаровочном столике 1 устье, объединив 2 ветви трансплантата воедино, и анастомозировать его с печеночной артерией (ПА) реципиента [15, 17, 23, 46]. Так, М. Haberal приводит опыт 25 случаев наличия двух артерий трансплантата, из которых только 8 пациентам были наложены отдельные артериальные анастомозы с каждым артериальным стволом. В остальных же 17 случаях медиальные стенки 2 артерий сшивались между собой для получения одной окружности и наложения одного артериального анастомоза [14].

В случае если создание единой окружности из двух артериальных ветвей трансплантата не представляется возможным, а ветви собственной печеночной артерии реципиента позволяют реваскуляризовать только одну артерию трансплантата, ав-

стрийские хирурги предлагают использовать вставку из верхней брыжеечной вены реципиента между дополнительной артерией трансплантата и гастродуоденальной артерией реципиента [31]. Существует мнение о возможности анастомозирования дополнительной артерии трансплантата с брюшной аортой путем создания кондуита (над чревным стволом, или ниже устьев почечных артерий) [34].

Однако остается открытым вопрос, необходимо ли идти по пути усложнения сосудистой реконструкции и восстанавливать кровоток по каждой из имеющихся артерий трансплантата. Т. Ikegami и соавт. придерживаются мнения, что далеко не каждая артериальная ветвь трансплантата требует реваскуляризации [16].

Основываясь на многолетнем опыте педиатрической ТП, авторы предлагают перед принятием решения о наложении анастомоза со второй артериальной ветвью определить ее гемодинамическую значимость. Если после реваскуляризации левой долевой артерии по дополнительной ветви появляется ретроградный кровоток, то последнюю можно не реваскуляризовать и тем самым не усложнять сосудистую реконструкцию.

Другой немаловажной проблемой является выбор подходящей для анастомозирования артерии реципиента. Классическим методом артериальной реконструкции при трансплантации ЛЛС печени детям является создание анастомоза «конец в конец» между левой долевой печеночной артерией донора и левой или правой долевой печеночной артерией реципиента. Большинство хирургов-трансплантологов такой анастомоз накладывается с использованием оптического увеличения, вплоть до использования микрохирургической техники [56]. Существует множество хирургических тактик, используемых, если ПА реципиента признается неподходящей для реконструкции [53]. В литературе описаны случаи использования для артериальной реваскуляризации селезеночной артерии [7, 19]. Но такая тактика включает в себя перевязку дистальной части селезеночной артерии, в результате чего может развиваться инфаркт селезенки [25]. U. Tannir, ссылаясь на успешный клинический опыт, предложил использовать для реваскуляризации трансплантата правую желудочносальниковую артерию (рис. 6), полагая, что ее выделение достаточно технически просто и не компрометирует кровоснабжение желудка. Автор рекомендует использовать для реваскуляризации трансплантата ЛЛС правую желудочносальниковую артерию в каждом случае, когда классическая артериальная реконструкция невыполнима [53].

Общепринятой альтернативой анастомозу «конец в конец» является использование так называемого артериального трансплантата, то есть удлинение сосу-

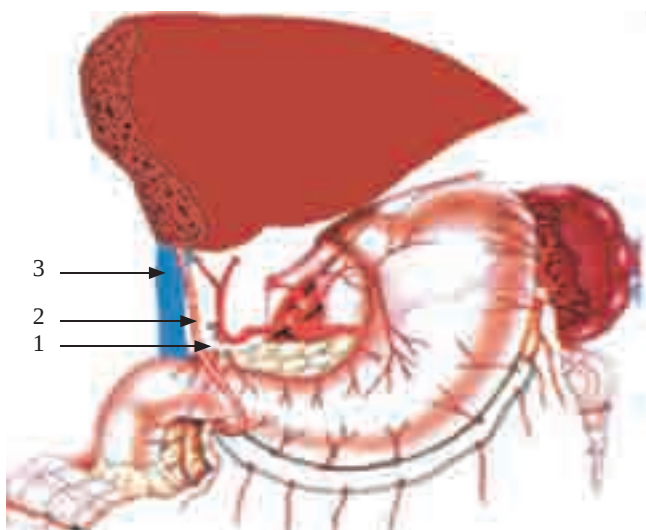


Рис. 6. Реваскуляризация трансплантата правой желу-
дочносальниковой артерией: 1 – лигированная *a. gastro-*
duodenalis; 2 – *a. gastroepiploica*, анастомозированная с
левой долевой печеночной артерией трансплантата; 3 –
анастомоз воротной вены

да донорской печени с помощью донорского аортального кондуита с широким аорто-аорто-анастомозом «конец в бок». Такая методика актуальна только в случае использования трупного трансплантата в детской трансплантации, а также при отсутствии подходящих по диаметру ПА донора и реципиента [5, 7, 11, 48, 54, 58]. Так, американские хирурги во главе с К. Мекеел при диаметре общей печеночной артерии реципиента < 2 мм создают конduit между артерией трансплантата и аортой реципиента [34]. Группа ученых во главе с Р. Муисан считает показаниями к созданию кондуита между артерией трансплантата и инфраренальным отделом абдоминальной аорты малый (< 3 мм) диаметр собственной печеночной артерии реципиента (особенно у детей младше 2 лет), наличие дополнительных артерий трансплантата, вариантной анатомии артериального дерева реципиента и ретрансплантацию. Авторы предлагают использовать в качестве кондуита большую подкожную вену родственного донора и анастомозировать ее с инфраренальным отделом аорты [38]. Анастомоз с супрацелиакальным отделом аорты допустим, и имеются положительные результаты, но такой вариант допустим при наличии короткого кондуита [42, 45].

Для нивелирования значительной разницы диаметров анастомозируемых артерий Р. Clavien предлагает следующие хирургические техники [41]:

- 1) косой срез окружности артерии реципиента (рис. 7, а);
- 2) объединение бифуркации собственной печеночной артерии реципиента в единую окружность (рис. 7, б);
- 3) рассечение передней стенки артерии реципиента (рис. 7, в);

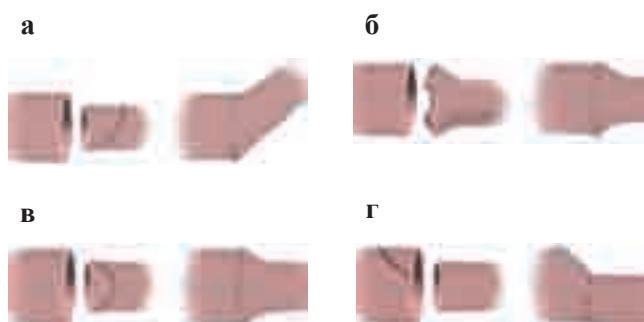


Рис. 7. Техники преодоления разницы диаметров анастомозируемых артериальных стволов

- 4) уменьшение диаметра артерии трансплантата (рис. 7, г).

Поскольку в связи с малыми диаметрами сшиваемых сосудов наиболее частыми осложнениями этих операций являются артериальные и венозные тромбозы (7–10%) [6, 12], выполнение вышеуказанных этапов предполагает прецизионность и оптическое увеличение вплоть до использования микрохирургической техники [33, 39]. Однако большинство авторов склонны использовать оптическое увеличение при анастомозировании именно артерий трансплантата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировав опыт реваскуляризации трансплантата левого латерального сектора печени в педиатрической практике, можно заключить, что, несмотря на обилие практикуемых в мире методик сосудистой реконструкции, вопрос о выборе технического подхода к реваскуляризации остается строго индивидуальным, исходя из конкретных анатомических предпосылок. Это обусловлено большой вариабельностью сочетаний анатомических вариантов строения венозного оттока, портального и артериального кровоснабжений печени донора и особенностями развития НПВ и ВВ ребенка. Эти обстоятельства открывают возможности и обуславливают необходимость дальнейших исследований в этой области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шумаков В.И., Гальперин Э.И., Неклюдова Е.А. Трансплантация печени. 1981. С. 205–207.
2. Готье С.В., Константинов Б.А., Цирульников О.М. Трансплантация печени. 2008. С. 132–133.
3. Blumhardt G., Ringe B., Lauchart W. et al. Vascular problems in liver transplantation // Transpl. Proc. 1987. Vol. 69. № 1. P. 2412.
4. Brems J.J., Millis J.M., Hiatt J.R. et al. Hepatic artery reconstruction during liver transplantation // Transplantation. 1989. Vol. 47. № 9. P. 403–406.

5. *Broelsch C.E., Emond J.C., Thistlethwaite J. et al.* Liver transplantation reduced size donor organs // *Transplantation*. 1988. Vol. 45. № 3. P. 519–523.
6. *Broelsch C.E., Emond J.C., Whittington P.F. et al.* Application of reduced-size liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts and living related segmental transplants // *Ann. Surg.* 1990. Vol. 212. № 3. P. 368–377.
7. *Broelsch C.E., Whittington P.F., Emond J.C. et al.* Liver transplantation in children from living related donors // *Ann. Surg.* 1991. Vol. 214. № 4. P. 428–438.
8. *Chen C., Concejero A.M., Wang C. et al.* Remodeled Saphenous Vein as Interposition Graft for Portal Vein Reconstruction in Living Donor Liver Transplantation // *Liver Transplantation*. 2007. Vol. 13. P. 1472–1475.
9. *Cherqui D., Riff Y., Rotman N. et al.* The recipient splenic artery for arterialization in orthotopic liver transplantation // *Am. J. Surg.* 1994. Vol. 167. P. 327–330.
10. *Davidson R., Gibson M., Dick R. et al.* Incidence, risk factors, management and outcome of portal vein abnormalities at orthotopic liver transplantation // *Transplantation*. 1994. Vol. 57. № 8. P. 1174–1177.
11. *Emond J.C., Heffron T.* Short term results of living related liver transplantation // *Jap. J. Ped. Surg.* 1993. Vol. 29. № 1. P. 53–57.
12. *Emond J.C.* Clinical application of living-related liver transplantation. *Gastroent // Clinics of North America*. 1993. Vol. 22. № 2. P. 301–314.
13. *Figueras J., Torras J., Rafecas A. et al.* Extra-anatomic venous graft for portal vein thrombosis in liver transplantation // *Transpl. Int.* 1997. Vol. 10. P. 407–408.
14. *Haberal M.* Outcome of pediatric liver transplant in grafts with multiple arteries // *Pediatr Transplant - 01-JUN-2008*. 12 (4). P. 407–411.
15. *Hiatt J.R., Gabbay J., Busuttil R.W.* Surgical anatomy of the hepatic artery in 1000 cases // *Ann. Surg.* 1994. Vol. 220. P. 50–52.
16. *Ikegami T., Kawasaki S., Matsunami H. et al.* Should all hepatic arterial branches be reconstructed in living-related liver transplantation? // *Surgery*. 1996. Vol. 119. P. 431–436.
17. *Inomoto T., Nishizawa F., Sasaki H. et al.* Experiences of 120 microsurgical reconstructions of hepatic artery in living related liver transplantation // *Surgery*. 1996. Vol. 119. P. 20–26.
18. *Ito T., Kiuchi T., Yamamoto H. et al.* Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications // *Transplantation*. 2003. Vol. 75. P. 1313–1317.
19. *Katz E., Fukusawa K., Schwartz M., Mor E., Miller C.* The splenic artery as the inflow in arterial revascularization of the liver graft in clinical liver transplantation // *Transplantation*. 1992. Vol. 53. P. 1373–1374.
20. *Kilic M., Aydinli B., Aydin U., Alper M., Zeytinlu M.* A new surgical technique for hepatic vein reconstruction in pediatric live donor liver transplantation // *Pediatr. Transplant*. 2008 Sep. 12 (6). P. 677–681.
21. *Koichi Tanaka, Hiroto Egawa.* Living Donor Transplantation: Left Hemiliver Donor Procedure and Implantation. Open Donor Procedure for Left Living Donor Liver Grafts. *Atlas of Upper Gastrointestinal and Hepato-Pancreato-Biliary Surgery*. 2007. P. 507–508.
22. *Koichi Tanaka, Hiroto Egawa.* Living Donor Transplantation: Left Hemiliver Donor Procedure and Implantation. Open Donor Procedure for Left Living Donor Liver Grafts. *Atlas of Upper Gastrointestinal and Hepato-Pancreato-Biliary Surgery*. 2007. P. 509.
23. *Kuang A.A., Renz J.F., Ferrell L.D. et al.* Failure patterns of cryopreserved vein grafts in liver transplantation // *Transplantation*. 1996. Vol. 62. P. 742–747.
24. *Kumar N., Atkison P., Fortier M.V. et al.* Cavoportal Transposition for Portal Vein Thrombosis in a Pediatric Living-Related Liver Transplantation // *Liver Transpl.* 2003. Vol. 9. P. 874–876.
25. *Lehar S.C., Zajko A.B., Koneru B. et al.* Splenic infarction complicating pediatric liver transplantation: incidence and CT appearance // *J. Comput. Assist. Tomogr.* 1990. Vol. 14. P. 362–365.
26. *Lerut J., Tzakis A.J., Bron K. et al.* Complications of venous reconstruction in human orthotopic liver transplantation // *Ann. Surg.* 1987. Vol. 205. № 4. P. 404–414.
27. *Maddrey W.C., Elsevier E.* Transplantation of the liver. New York. 1988. P. 342.
28. *Makowka L., Stieber A.C., Sher L. et al.* Surgical technique of orthotopic liver transplantation // *Gastroenterology Clinics of North America*. 1988. Vol. 17. № 1. P. 33–52.
29. *Malago M., Ernesto P., Molmenti D. et al.* Hepatic venous outflow reconstruction in right live donor liver transplantation // *Liver Transplantation* Feb 2005. Vol. 11. № 3. P. 364–365.
30. *Manzanet G., Sanjua'n F., Orbis P. et al.* Liver Transplantation in Patients With Portal Vein Thrombosis // *Liver Transplantation*. 2001. Vol. 7. P. 125–131.
31. *Margreiter C., Aigner F., Orozco H. et al.* Hepatic artery reconstruction with inferior mesenteric vein graft in pediatric living donor liver transplantation // *Pediatr. Transplant*. 2008 May. 12 (3). P. 324–328.
32. *Marwan I.K., Fawzy A.T., Egawa H. et al.* Innovative techniques for and results of portal vein reconstruction in living-related liver transplantation // *Surgery*. 1999 Mar. 125 (3). P. 265–270.
33. *Matsunami H., Makuuchi M., Kawasaki S. et al.* Living-related liver transplantation despite major arterial and venous abnormalities // *Transplantation*. 1993. Vol. 56. № 3. P. 753–755.
34. *Mekeel K.L., Langham M.R., Gonzalez-Peralta R.P. et al.* Liver transplantation in very small infants // *Pediatr. Transplantation*. 2007. Vol. 11. P. 66–72.
35. *Merion R.M., Burtch G.D., Ham J.M. et al.* The hepatic artery in liver transplantation // *Transplantation*. 1989. Vol. 48. P. 438–443.
36. *Millis J.M., Cronin D.C., Brady L.M. et al.* Primary living-donor liver transplantation at the University of Chicago: technical aspects of the first 104 recipients // *Ann. Surg.* 2000. Vol. 232. P. 104–111.
37. *Mitchell A., John P.R., Mayer D.A. et al.* Improved technique of portal vein reconstruction in pediatric liver transplant recipients with portal vein hypoplasia // *Transplantation*. 2002. Vol. 73 (8). P. 1244–1247.

38. *Muiesan P., Rela M., Nodari F. et al.* Use of Infrarenal Conduits for Arterial Revascularization in Orthotopic Liver Transplantation // *Liver Transplantation and Surgery*. Vol. 4. № 3. 1998. P. 232–235.
39. *Neuberger J.* Liver transplantation: indications and timing // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1987. Vol. 3. P. 402–407.
40. *Ortale J.R., Bonet C. et al.* Anatomy of the intrahepatic ramification of the intermediate and left hepatic veins in humans // *Braz. J. Morphol. Sci.* 2003. Vol. 20. № 1. P. 47–54.
41. *Clavien P.A., Sarr M.G., Fong Y.* Atlas of Upper Gastrointestinal and Hepato-Pancreato-Biliary Surgery. 2007. P. 51.
42. *Roy A., McAlister V., Grant D.R. et al.* Technique to minimize the incidence of hepatic artery thrombosis in pediatric liver transplantation in French // *Ann. Chir.* 1993. Vol. 4. P. 816–820.
43. *Saad S., Tanaka K., Inomata Y. et al.* Portal vein reconstruction in pediatric liver transplantation from living donors // *Ann. Surg.* 1998 Feb. 227 (2). P. 275–281.
44. *Seu P., Shackleton C.R., Shaked A. et al.* Improved results of liver transplantation in patients with portal vein thrombosis // *Arch. Surg.* 1996. P. 131.
45. *Shaked A.A., Takiff H., Bussutil R.W.* The use of the supraceliac aorta for hepatic arterial revascularization in transplantation of the liver // *Surg Gynecol Obstet.* 1991. Vol. 173. P. 198–202.
46. *Shaw B.W., Wood R.P., Stratta R.J. et al.* Management of arterial anomalies encountered in split-liver transplantation // *Transplant. Proc.* 1990. 2. P. 420–422.
47. *Shaw B.W., Iwatsuki S., Starzl T.E.* Alternative methods of arterialisation of the hepatic grafts // *Surg., Gynecol., Obstet.* 1984. Vol. 159. P. 490–493.
48. *Shaw B.W., Wood R.P., Stratta R.J. et al.* Transplantation of the liver // *Surgical Treatment of Digestive Disease*; ed. by F.J. Moody. Yearbook Medical Publishers, Chicago, 2nd edition, 1989. P. 423–454.
49. *Soliman T., Bodingbauer M., Langer F. et al.* The role of complex hepatic artery reconstruction in orthotopic liver transplantation // *Liver Transplantation*. 2003. Vol 9. № 9 (September). P. 970–975.
50. *Sugawara Y., Makuuchi M., Tamura S. et al.* Portal vein reconstruction in adult living donor liver transplantation using cryopreserved vein grafts // *Liver Transpl.* 2006. Vol. 12. P. 1233–1236.
51. *Starzl T.E., Demetris A.J.* Liver Transplantation: A 31-Year Retrospective. Part I. Current Problems in Surgery, 1990. Vol. 27. № 2. P. 51–116.
52. *Tannuri U., Mello E.S., Carnevale F.C. et al.* Hepatic venous reconstruction in pediatric living-related donor liver transplantation – experience of a single center // *Pediatr Transplantation*. 2005. P. 293–298.
53. *Tannuri U., Maksoud-Filho J.G., Silva M.M. et al.* An alternative method of arterial reconstruction in pediatric living donor liver transplantation with the recipient right gastroepiploic artery // *Pediatr Transplantation*. 2006. Vol. 10. P. 101–104.
54. *Todo S., Makowka L., Tzakis A.G. et al.* Hepatic artery in liver transplantation // *Transpl. Proc.* 1987. Vol. 19. № 1. P. 2406–2411.
55. *Tzakis A.G., Kirkegaard P., Pinna A.D. et al.* Liver transplantation with cavoportal hemitransposition in the presence of diffuse portal vein thrombosis // *Transplantation*. 1998. Vol. 65. P. 619–624.
56. *Wei W.I., Lam L.K., Ng R.W. et al.* Microvascular reconstruction of the hepatic artery in live donor liver transplantation: experience across a decade // *Arch. Surg.* 2004. Vol. 139. P. 304–307.
57. *Williams J.W.* Hepatic transplantation. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1990. P. 245.
58. *Wood R.P.* Complex vascular reconstruction in liver transplantation // *Surg. Clin. North. Am.* 1990. Vol. 70. P. 449–452.

СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА МОРФОЛОГИЮ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПЕЧЕНИ

Шкалова Л.В.¹, Ильинский И.М.², Цирульникова О.М.²

¹ ФГУ «ПОМЦ ФМБА России», г. Нижний Новгород

² ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, г. Москва

В статье представлен анализ данных литературы последних 20 лет о морфологических признаках и критериях тяжести острого отторжения аллотрансплантированной печени. Дано современное представление об иммунных механизмах развития реакции острого отторжения в аллотрансплантированной печени. Рассмотрена роль различных типов клеток в деструктивном иммунном ответе при остром отторжении аллотрансплантата печени. Обсуждаются сильные и слабые стороны Banff-классификации 1995, 1997 гг., необходимость градации острого отторжения на раннее и позднее. Приводятся клинико-морфологические корреляции при остром отторжении аллотрансплантированной печени.

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

CURRENT VIEW ON MORPHOLOGY OF ACUTE REJECTION IN LIVER TRANSPLANTATION

Shkalova L.V.¹, Iljinsky I.M.², Tsiurulnikova O.M.²

¹ Federal State Institution Volga Regional Medical Center of Federal Bio-Medical Agency, Nizhny Novgorod

² Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

We present a scientific literature data analysis of morphological features and severity criteria of the liver allograft acute rejection during last 20 years. Modern conception was given about the role of immunological mechanisms in the development of liver graft acute rejection. We describe roles of different cell types in the destructive immune response during liver allograft acute rejection. Advantages and disadvantages of Banff-classifications 1995, 1997 are discussed as well as the necessity of grading the acute rejection as early and late. We propose clinico-morphological correlations in liver allograft acute rejection.

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

Ортотопическая трансплантация печени (ОТП) за последние 10 лет стала одной из самых передовых медицинских технологий, позволяющих продлить жизнь больных хронической печеночной недостаточностью, улучшить качество их жизни, обеспечить социальную реабилитацию [6, 13]. На сегодняшний день более чем у 80% пациентов после трансплантации печени продолжительность жизни составляет свыше пяти лет, и многие из них социально реабилитированы [14]. Однако до настоящего времени остается актуальной проблема после-

операционных осложнений [7, 22, 43, 69, 73, 76, 98]. Принято считать, что большинство осложнений наблюдается в ранние и ближайшие сроки после ОТП [16], практически у каждого реципиента донорской печени в послеоперационном периоде возникает как минимум одно осложнение [1, 3, 8, 12, 23].

Послеоперационные осложнения в аллотрансплантированной печени можно разделить на четыре группы: обусловленные состоянием пациента перед трансплантацией [4, 18, 39], качеством донорской печени [17, 20], хирургическими осложнени-

Статья поступила в редакцию 21.10.11 г.

Контакты: Ильинский Игорь Михайлович, д. м. н., профессор, руководитель отделения клинической патологии ФНЦТИО.
Тел. 8 926 811 84 55, e-mail: iljinsky@mail.ru