

АНГИОГЕННЫЕ КЛЕТКИ КРОВИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

Шутко А.Н., Герасимова О.А., Екимова Л.П., Жеребцов Ф.К.

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»
Минздравсоцразвития РФ, г. Санкт-Петербург

Клетки крови, имеющие отношение к процессу формирования сосудов, исследованы методом проточной цитометрии у реципиентов трансплантата трупной печени. Обнаружены признаки «турбулентного» статуса продукции этих клеток в костном мозге и классифицированы как свидетельства ее истощения. Флуктуации запаса предшественников эндотелиальных клеток и ангиогенных лимфоцитов обсуждены как существенный фактор, влияющий на течение посттрансплантационного периода. Требуется дальнейшие исследования вариабельности индивидуального гемопоэтического статуса пациентов для совершенствования стратегии терапии в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: ангиогенез, клетки-предшественники, кровь, кинетика, трансплантация печени.

ANGIOGENIC BLOOD CELLS AFTER LIVER TRANSPLANTATION

Shutko A.N., Gerasimova O.A., Ekimova L.P., Zherebtsov F.K.

Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg

Blood cells involved in neovascularisation were studied with flow-cytometry in the cadaver liver transplant recipients. The signs of «turbulent» state of bone marrow reproductive activity were found and assessed as features of its progressive exhaustion. The oscillations of regenerative capacity of angiogenic progenitor cells and angiogenic lymphocytes are discussed and considered to be the essential limiting factor influencing liver transplantation results. Further study of temporal variability of personal state of hematopoiesis is required for the improvement of posttransplant therapy.

Key words: angiogenesis, progenitor cell, blood, kinetics, liver transplantation.

ВВЕДЕНИЕ

Проведенный ранее анализ взаимоотношений трансплантированной трупной печени и клеток крови, обычно относимых к основным элементам отторжения, выявил признаки повышенной активности морфогенетического типа по отношению к васкулярным структурам трансплантата. Было отмечено, что случаи смерти реципиентов совпадали с недостатком циркулирующих моноклеаров, относящихся к предшественникам и недифференцированным клеткам лимфоидного типа, в результате сформулирована концепция их участия в поддержании жизнеспособности различных тканей [1]. Обнаружение ангиогенных свойств не только стволовых гемопоэтических клеток с маркерами CD34 и CD133 [6], но и лимфоцитов CD3,31 [10] внесло не-

определенность в понимании механизма отторжения, отражая соотношение в нем элементов прямого уничтожения чужеродных клеток и способности организма реципиента к пластическому обеспечению чужеродной ткани. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что единой базой как предполагаемых иммунных реакций, так и морфогенетического обеспечения всех тканей в организме хозяина является система воспроизводства стволовых клеток костного мозга [2]. Феномен преждевременного истощения их продукции получил название «турбулентного» гемопоэза. Для него типичны периодические колебания концентрации в крови не только прогениторных клеток, но и популяций, находящихся на разных уровнях зрелости [9]. Мы сообщали о признаках «турбулентности» кроветворения у боль-

Статья поступила в редакцию 26.09.12 г.

Контакты: Герасимова Ольга Анатольевна, к. м. н., ведущий научный сотрудник группы трансплантаций и сосудистой хирургии РНЦРХТ

Тел. 8 (812) 596 90 96, e-mail: ren321@mail.ru

ных распространенным раком, начиная с 2003 г. [5]. Позднее наличие «турбулентности» было обнаружено нами и в раннем периоде, в сроки 10–28 дней, у больных после трансплантации печени. При этом менее благоприятное течение наблюдалось у лиц с менее устойчивыми показателями процентного содержания CD34+-клеток в периферической крови. Одновременно было отмечено и ослабление продукции клеток с различной степенью экспрессии маркера CD31, относимого к категории индикаторов ангиогенных лимфоцитов [4]. Позднее, независимо от полученных авторами данных, появилась концепция, отводящая ангиогенезу роль основного механизма регенерации печеночной ткани [12]. Таким образом, можно признать, что обеспечение сосудистого русла трансплантата является процессом динамически непостоянным, в него вовлечены не только стволовые элементы, но и зрелые лимфоциты крови с меняющимися во времени концентрациями. В этих условиях имеющихся знаний для обоснованного практического использования их в трансплантационной гепатологии пока явно недостаточно.

Целью данного исследования стала оценка кинетических связей в системе ангиогенных клеток крови у реципиентов после трансплантации трупной печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включили 25 больных с трансплантированной трупной печенью и 14 больных из листа ожидания ФГУ «РНЦРХТ». Мониторировали субпопуляционный состав клеток крови со средней частотой 2 раза в неделю.

Определяли клеточные маркеры мононуклеаров крови CD3, CD31, CD34, CD45, CD133 прямым иммунофлуоресцентным методом с антителами Dako, BD. Фракцию мононуклеаров для всех исследований выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте фиколл-верографин. Измерения производили на проточном цитофлуориметре FACSscan, Becton Dickinson, суммируя показатели трех зон в координатах прямого и бокового рассеивания, а именно лимфоцитов, моноцитов и расположенной над моноцитарной зоны с высоким боковым рассеиванием. Число клеток, имеющих тот или иной маркер (CD) или их сочетание, относили к общему количеству мононуклеаров, концентрацию мононуклеаров (Mn) выражали в $10^6/\text{мл}^3$. Эффективность трансформации прогениторных клеток в общий пул мононуклеаров оценивали с помощью расчетного коэффициента $R = \text{Mn:CD 34}$.

Статистическую обработку данных проводили, используя t-критерий Стьюдента для оценки вероятности различий (p) между средними величинами $M \pm m$. Для формального описания и статисти-

ческих оценок кинетических зависимостей использовали аппроксимации различными монотонными или периодическими функциями в программах Microsoft Excel и Vernier с вычислением коэффициентов корреляции R и их ошибок m_R .

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1 показаны индивидуальные изменения коэффициента преобразования прогениторных CD34+-клеток в мононуклеары крови (Mn) у 25 реципиентов после трансплантации печени в течение 1,5–2 месяцев после трансплантации. На примере больной М. после первой трансплантации (белые значки) величины R исходно располагаются ниже усредненной линии, построенной для всей группы (косая прямая и уравнение для нее на рис. 1). В течение полугода показатель временно смещался в зону выше средней линии, но затем повторно занял зону под ней вплоть до функциональной несостоятельности первого трансплантата (белый квадрат). После повторной трансплантации (крупные черные значки) все значения, включая стартовое (черный ромб), находятся ниже средней линии в течение 2,1 года вплоть до момента смерти, наступившей через неделю после третьей пересадки (черный квадрат). Соседний черный квадрат (слева) показывает положение R за две недели до смерти другой больной, А. Таким образом, уменьшение трансформации клеток в мононуклеары представляется негативным признаком при любых соотношениях флюктуирующих значений Mn и CD34. Показательно, что наклон обсуждаемой зависимости имеет также прогностическое значение, поскольку слегка увеличивается в отдаленном периоде после трансплантации. Так, в среднем через $2,65 \pm 0,85$ года уравнение на рис. 1 изменяется в $R = 0,027 (\text{CD34})^{-0,956}$ ($R = 0,81 \pm 0,31$; $p = 0,02$). Это может указывать на ухудшение состояния реципиента, так как у больных из листа ожидания в терминальной стадии цирроза печени угол наклона аппроксимирующей линии максимален ($R = 0,04 (\text{CD34})^{-1,41}$, ($R = 0,81 \pm 0,31$; $p = 0,02$), а он определяется величиной показателя степени уравнения.

Снижение R может происходить как при увеличении CD34-клеток, так и при уменьшении числа мононуклеаров. Исходя из предполагаемой роли неоангиогенеза в поддержании жизнеспособности трансплантированной печени [1, 12], важнейшим показателем, влияющим на величину отношения R, являются клетки с маркером CD133, входящие в состав знаменателя. Сумма клеток CD34+ в общем случае прямо зависит от количества CD133+-клеток (аппроксимация на рис. 2), хотя в пределах цикла динамические максимумы их концентраций не совпадают (рис. 3).

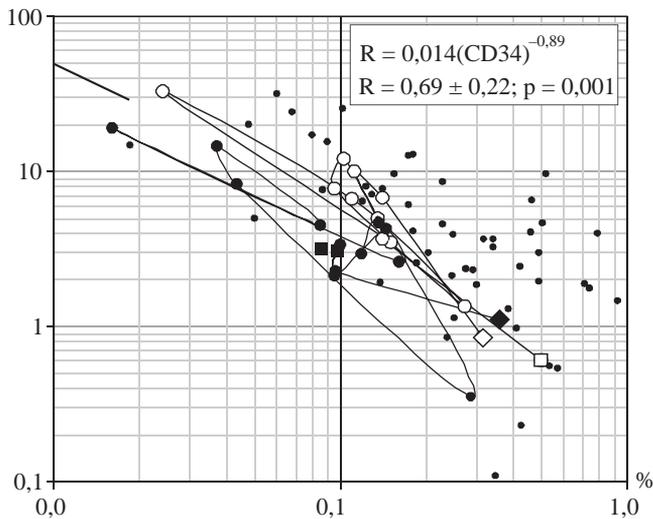


Рис. 1. Изменения эффективности образования мононуклеаров из прогениторных клеток в крови больных после трансплантации трупной печени (ось абсцисс: концентрация CD34+-прогениторных клеток крови, ось ординат: коэффициент трансформации прогениторных клеток в мононуклеары крови R, относительные единицы)

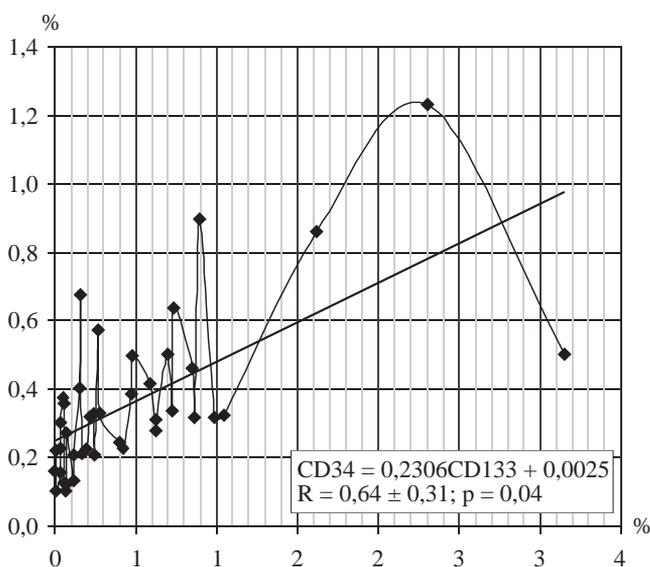


Рис. 3. Количественная связь между общими пулами CD133+-клеток и CD34+-клеток крови больных после трансплантации трупной печени (ось абсцисс: CD34+ прогениторные клетки, ось ординат: CD133+ прогениторные клетки)

Другая важная составляющая величины R представлена CD3+, 31+-лимфоцитами (числитель). На рис. 4 показаны количественные связи между четырьмя основными ангиогенными субпопуляциями крови реципиентов в раннем периоде после трансплантации трупной печени. Из рисунка следует, что в условиях «турбулентного» кроветворения циклические изменения концентраций в системе клеток «CD133+, 34- / CD133+, 34+ и CD3+, 31+ происходят однонаправленно. Обратная направленность установлена в системе CD133-, 34+ и CD3+, 31+.

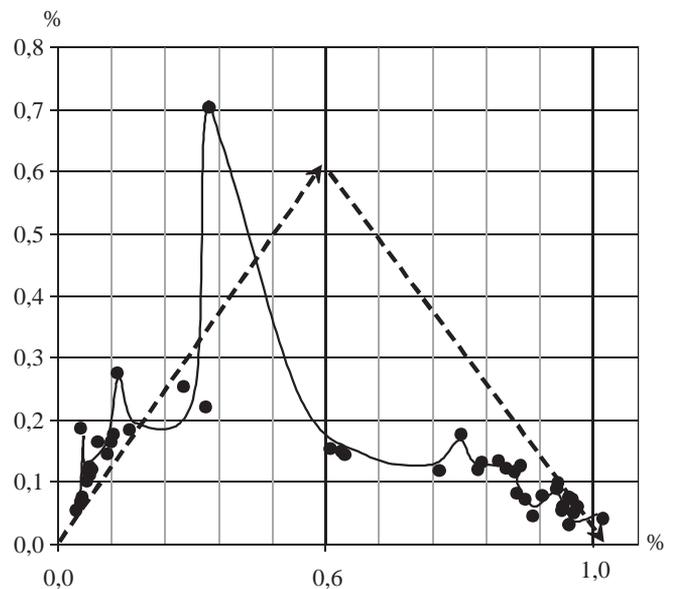


Рис. 2. Смещение максимальных концентраций прогениторных клеток в цикле «подъем / спад» по данным измерений у больных из листа ожидания трансплантации печени (ось абсцисс: CD133+ прогениторные клетки, ось ординат: CD34+ прогениторные клетки; стрелки пунктирных линий указывают зоны увеличения и снижения по оси абсцисс)

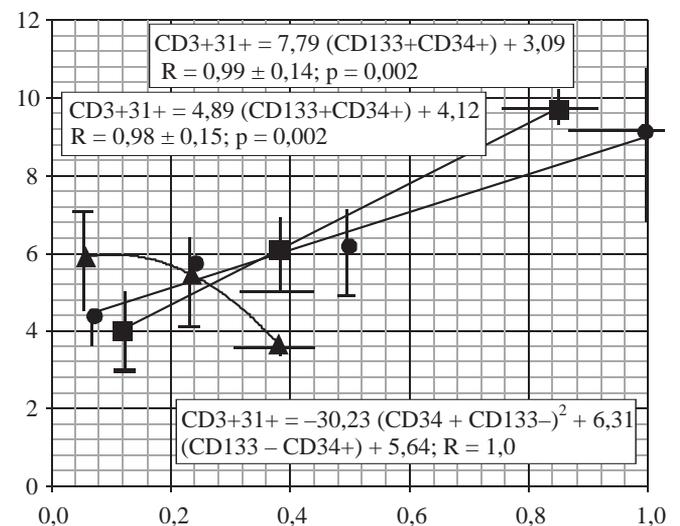


Рис. 4. Количественные связи между общими пулами ангиогенных лимфоцитов CD3+31+ и трех субпопуляций прогениторных клеток у реципиентов трупной печени в срок до 2 мес. после трансплантации (ось абсцисс: концентрация прогениторных клеток CD133+, 34- (квадраты), CD133+34+(кружки), CDCD133-34+ (треугольники), %; ось ординат: концентрация CD3+31+ клеток, %)

ОБСУЖДЕНИЕ

Стойкое снижение величины R до значений, меньших среднестатистического предела, типичного для изучаемой группы больных, означает ослабление способности прогениторных клеток производить более дифференцированные формы, в том числе и с маркерами CD3,31. Они классифициру-

ются как ангиогенные Т-клетки, способствующие пролиферации эндотелиальных предшественников [10]. Собственно циркулирующие предшественники эндотелия (CD133+, 34+) являются лишь частью общего пула CD133+-клеток, в котором отдельно представлена группа наименее дифференцированных CD133+, 34-, рассматриваемых как примитивные плюрипотентные клетки, наиболее перспективные в области регенеративной медицины [11]. Более дифференцированные прогениторные клетки, способные формировать колонии различного типа, сохраняют маркер CD34, но утрачивают CD133. Существенное истощение всей системы названных предшественников, и особенно циркулирующих эндотелиальных предшественников CD133+, 34+, сопряжено со старением организма [13], что закономерно отражается и на результатах выживаемости трансплантатов печени [8]. Обнаруженные признаки «турбулентного» воспроизводства клеток у больных из листа ожидания трансплантации печени, равно как и после нее (рис. 1–3) требуют рассмотрения в свете существующей концепции, что при небольших уровнях повреждения печеночной ткани ее восстановление происходит за счет внутренних ресурсов органа (овальные клетки), и только при тяжелых дисфункциях включается механизм пластического поддержания и восстановления печеночной ткани клетками, мигрирующими из костного мозга [7]. В то же время истощение репродуктивных потенциалов костного мозга на этапе до трансплантации может в существенной мере снижать возможности такого механизма поддержки функции трансплантата. Исходя из этого знание текущего состояния процесса (рис. 1, 4), а именно фазы снижения или повышения содержания пула ангиогенных клеток в крови у конкретного больного представляется важным. Проведенное ранее изучение циклических изменений крови у тяжелых онкологических больных показало, что в фазу подъема уровня стволовых клеток в крови краткосрочный риск смертности снижается, а в фазу снижения – повышается [3]. Пример флуктуаций системы воспроизводства клеток у конкретной больной М., приведенный на рис. 1, иллюстрирует прогрессирование неустойчивости этой системы на протяжении более двух лет вплоть до летального исхода. Смены фаз продукции стволовых клеток костного мозга у онкологических больных в последние полгода жизни происходят ежемесячно [14]. Согласно данным настоящего исследования, весьма вероятны такие колебания и у больных с дисфункцией трансплантата печени. Логично предположить, что текущие индивидуальные возможности кроветворения реципиента могут определять и индивидуальный подход к иммуноподавляющему лечению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гранов А.М., Шутко А.Н. Парадоксы злокачественного роста и тканевой несовместимости. СПб.: Гиппократ, 2002. 221 с.
2. Шумаков В.И., Онищенко Н.А. (редакторы). Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций. М.: Лавр, 2009. 307 с.
3. Шутко А.Н. Гемопоэтический ресурс и продолжительность жизни при старении, раке и хроническом облучении // Тезисы докладов VI Петербургской встречи лауреатов Нобелевской премии «Физиология и медицина XXI века». 19–23 сентября 2011 г. С. 10–12.
4. Шутко А.Н., Герасимова О.А., Екимова Л.П. и др. Стволовые гемопоэтические клетки крови в раннем периоде трансплантации печени // Медицинский академический журнал. 2010. № 10 (1). С. 104–111.
5. Шутко А.Н., Екимова Л.П., Юркова Л.Е. и др. Устойчивый периодизм кооперативных изменений субпопуляционного состава лимфоцитов крови при развитии злокачественного процесса у человека // Медицинская иммунология. 2003. Т. 5 (3–4). С. 370–371.
6. Asahara T., Masuda H., Takahashi et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularisation // Circ. Res. 1999. Vol. 85 (2). P. 221–238.
7. Eckersley-Maslin M.A., Warner F.J., Grzelak C.A. et al. Bone marrow stem cells and the liver: are they relevant? // Gastroenterology and Hepatology. 2009. Vol. 24 (4). P. 1608–1616.
8. Ekka-Zohar A., Zitser-Gurevich Y., Mandel M. et al. Graft survival and its determinants: a 3 year national experience with liver transplantation in Israel // IMAJ. 2006. Vol. 8 (6). P. 400–405.
9. Fliedner Th.M., Graessle D.M. Hematopoietic cell renewal system: mechanism of coping and failing after chronic exposure to ionizing radiation // Radiat. Environ. Biophys. 2008. Vol. 47 (1). P. 63–69.
10. Jin Hur, Yang H.-M., Yoon Ch.H. et al. Identification of a novel role of T-cells in postnatal vasculogenesis // Circulation. 2007. Vol. 116 (5). P. 1671–1682.
11. Liras A. Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory and bioethical aspects // Journal of Translational Medicine. 2010. Vol. 8 (1). P. 131–115.
12. Riehle K.J., Dan Y.Y., Campbell J.S., Fausto N.J. New concepts in liver transplantation // Gastroenterology and Hepatology. 2011. Vol. 26 (Suppl. 1). P. 203–212.
13. Scheubel R.J., Zom H., Zuberet R.-E. et al. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting // J. American College of Cardiology. 2003. Vol. 42 (12). P. 2081–1093.
14. Shoutko A.N., Ekimova L.P., Sokurenko V.P. et al. Alternative changes of lymphocytopoiesis of cancer patients are retained during radiation therapy // Book of Abstracts of 14 International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland. 2011. 28.08–01.09. P. 163.