

**СТВОЛОВЫЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ КРОВИ
В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ**

ШУТКО А. Н.¹, ГЕРАСИМОВА О. А.¹, ЕКИМОВА Л. П.¹, ЖЕРЕБЦОВ Ф. К.¹,
КАРАМУЛЛИН М. А.², академик РАМН ГРАНОВ А. М.¹

¹ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»,

²Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова,

Санкт-Петербург

Шутко А. Н., Герасимова О. А., Екимова Л. П., Жеребцов Ф. К., Карамуллин М. А., Гранов А. М. Стволовые гемопоэтические клетки крови в раннем периоде трансплантации печени // Мед. акад. журн. 2010. Т. 10. № 1. С. 104–111. ФГУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70; Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, ул. Лебедева, 6.

Успех трансплантации трупной печени не определяется совместимостью по HLA. Имеются косвенные указания на зависимость судьбы трансплантата от кроветворных клеток-предшественников. Целью работы авторов статьи явилось изучение динамики стволовых гемопоэтических клеток крови у реципиентов трансплантата печени, полученного от донора со смертью головного мозга, с различным клиническим течением раннего послеоперационного периода. Методом проточной цитометрии и меченых антител изучены изменения субпопуляционного состава циркулирующих мононуклеаров крови у 36 реципиентов и 3 больных после обширных хирургических вмешательств, результаты сопоставлены с состоянием пациентов и сравнены с контрольными величинами показателей у 23 человек без заболевания печени. В течение первого месяца после трансплантации выявлено 4 варианта динамики CD34+ стволовых гемопоэтических клеток (СГК) и показана связь осложненного течения раннего посттрансплантационного периода с недостатком ангиогенных CD3+,31+ лимфоцитов, VEGF+клеток на фоне избытка потенциальных цитотоксических CD8+,11b- лимфоцитов. Удовлетворительное состояние реципиентов в первый месяц после операции зависит от способности их гемопоэтической системы продуцировать СГК и клетки, участвующие в ремоделировании эндотелия.

Ключевые слова: трансплантация печени, субпопуляции циркулирующих мононуклеаров крови, ангиогенные CD3+,31+ лимфоциты, VEGF, CD8+,11- лимфоциты.

Shoutko A. N., Gerasimova O. A., Ekimova L. P., Zherebtsov F. K., Karamullin M. A., Granov A. M. Stem haemopoetic blood cells in the early period after liver transplantation // Med. Acad. Journ. 2010. Vol. 10. № 1. P. 104–111. Russian Research Center of Radiology and Surgery Technologies. St. Petersburg; Military Medical academy, St. Petersburg.

The success of cadaver liver transplantation is not defined by compatibility on HLA. There are indirect instructions on dependence of destiny of a transplant from haemopoetic stem cells. The purpose of work of authors of article was studying of dynamics of stem haemopoetic blood cells at recipients liver transplant received it from the donor with brain death, with a various clinical current of the early postoperative period. The method flowing cytometry and labeled antibodies was studied changes subpopulation structure circulating blood mononuclear cells at 36 recipients and 3 patients after extensive surgical interventions, results was compared with a condition of patients and compared to control data of 23 persons without liver disease. Within the first month after transplantation 4 variants of dynamics CD34 + stem haemopoetic cells are revealed and communication of the complicated current early posttransplant time by a deficiency angiogenesis CD3 +, 31 + lymphocytes, VEGF+ cells against surplus potential cytotoxic CD8 +, 11b - lymphocytes is shown. The satisfactory condition of recipients in the first month after operation depends on ability of their haemopoetic system to produce stem haemopoetic cells and the cells participating in function of endothelia.

Key words: transplantation of a liver, subpopulation circulating blood mononuclear cells, angiogenesis CD3 +, 31 + lymphocytes, VEGF, CD8 +, 11 lymphocytes.

Для корреспонденции: Герасимова Ольга Анатольевна, к. м. н., ведущий научный сотрудник группы клинической трансплантологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий; СПб., п. Песочный, ул. Ленинградская, 70. Тел.: (812) 5969096, e-mail: ren321@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Наилучшие результаты трансплантации печени зарегистрированы при варианте «молодой донор – молодой реципиент», наихудшие – «пожилой донор – пожилой реципиент» [9]. Это не очень согласуется

с общими представлениями о постепенном ослаблении с возрастом защитной функции иммунной системы.

Успех трансплантации трупной печени не зависит полностью от степени совместимости по HLA (лейкоцитарному комплексу антигенов человека)

[12, 25]. При трансплантации от живых доноров по показателям 5-летней выживаемости влияния «совместимости/несовместимости» по HLA не установлено, хотя отмечено, что риск несостоятельности трансплантата тем выше, чем совместимость меньше [12]. В частности, специальное исследование при первичном билиарном циррозе, как возможном факторе риска ранних и поздних отторжений, показало, что низкие уровни HLA-несовместимости усиливают риск рецидива первичного билиарного цирроза, но в целом влияние несовместимости столь мало, что может быть нивелировано увеличением доз препаратов [17, 22]. К выводу об отсутствии влияния «совместимости/несовместимости» по HLA-A, HLA-B и HLA-DR на 5-летнюю выживаемость приходят авторы при изучении разных объемов статистических данных [20]. Необходимость учета совместимости может быть оправдана больше теоретическими соображениями, чем практическими, и рутинное определение совместимости делать не следует [8]. Отсутствие связи с выживаемостью трансплантата отмечено при трансплантации на фоне хронического гепатита С, хотя риски отторжения повышались при увеличении числа несовпадений. Однако при полном совпадении развитие фиброза происходило медленнее, чем при частичном несоответствии, т. е. при числе несовпадений до пяти [16]. Об увеличении рисков отторжения по мере увеличения числа несовпадений сообщали и ранее, вне связи с гепатитом С, но статистически это впечатление осталось не подтвержденным до недавнего времени [18].

Особый интерес представляют сведения о трансплантации печени от гомозиготных доноров. Сообщалось об экстремально высоком риске возникновения долгосрочной реакции по типу «трансплантат против хозяина» (РТПХ), ведущей к лейкопении, пневмонии и смерти в условиях полного совпадения HLA [25]. Эта особенность при гомозиготных трансплантациях подтверждена более поздними исследованиями. Среди 900 реципиентов печени гомозиготных доноров, имеющих минимум совпадений (всего лишь по одному локусу), не было зарегистрировано случаев такой реакции. В то же время при совпадениях по 3 локусам все 100% реципиентов имели РТПХ [14]. Надо заметить, что при трупных трансплантациях РТПХ не развивается [21]. Перечисленные сведения указывают на высокую вероятность влияния иных, не защитного свойства факторов организма реципиента на отдаленный результат.

Тем не менее, острое отторжение определенно может зависеть от совместимости. Наибольший его риск имеет место в течение первого месяца после операции трансплантации [9]. Риск острого отторжения в течение первых шести недель оценен ранее в 21% при наличии полного совпадения по HLA-A

и в 47% – при неполном соответствии [26]. В более позднем исследовании аналогичная тенденция, не подтвержденная, однако, статистически ($p=0,12$), отмечена и для совпадений по HLA-C. При полном совпадении ($n=0$) и не полных совпадениях ($n=1$ и $n=2$) доля острых отторжений была оценена в 17, 33 и 46% соответственно [9]. Таким образом, вопрос о совместимости при пересадке печени считать центральным, решающим затруднительно. Скорее, конкретные условия пересадки доминируют в принятии решения о необходимости выполнения HLA-типирования реципиента и донора.

Определение неспецифических предсуществующих антител, возникающих после повторных гемотрансфузий, беременностей, признано прогностически значимым при трансплантации почки, сердца, легких [19,27], вопрос же о его информативности при трансплантации печени оставлен пока открытым, хотя некоторая определенность появилась в одной публикации [8]. В противовес HLA-типированию, в публикации обсуждается возможность скрининга реципиентов с предсуществующими антителами против HLA донора, поскольку эти антитела блокируют мелкие сосуды и капилляры трансплантата. По ретроспективной оценке авторов публикации, результаты пересадки печени у 896 пациентов указывают на информационную перспективность метода. Даже при оценке уровня предсуществующих антител получается весьма скромный эффект: использование метода позволяет улучшить процент выживших трансплантатов в пятилетнем периоде с 61–75 до 71–83%, т. е. всего в 1,16 раза.

Представляется, что есть необходимость искать другие, вероятно, не менее существенные и конкретные механизмы влияния организма реципиента на функциональную состоятельность трансплантата печени, не ограничиваясь иммунологической несовместимостью, которой научным сообществом было отдано достаточно времени, интеллектуальных усилий и материальных средств.

Ранее было отмечено благотворное влияние трансплантации аутологичного костного мозга на функциональную активность почки при гломерулонефрите [4], недавно положительные результаты такой же процедуры зарегистрированы при циррозе печени [5]. В процессе иммунодепрессивной терапии чрезмерное понижение уровня циркулирующих в крови реципиентов незрелых мононуклеарных клеток сопровождалось увеличением риска ранней смертности, было высказано предположение о возможном участии клеток-предшественников костномозгового происхождения в поддержании жизнеспособности трансплантата печени [1]. Позднее авторы обнаружили существенные флуктуации содержания стволовых гемопоэтических клеток (СГК) и клеток-предшест-

венников лимфоцитопоза во фракции мононуклеаров периферической крови реципиентов печени в различные периоды времени после трансплантации, что является признаком «турбулентного» кроветворения [6]. Согласно ряду исследований СГК способны мигрировать в различные ткани и органы, в печень, легкие, желудочно-кишечный тракт, сосуды и сердце, поддерживая в них пролиферативные процессы [11, 15]. С учетом рассмотрения капиллярной сети печени в качестве вероятной повреждаемой мишени в картине патогенеза отторжения [19] интерес представляют сведения о том, что определенная часть циркулирующих СГК несет также маркеры предшественников эндотелиальных клеток [23], кроме того, ангиогенными свойствами обладают и определенные субпопуляции Т-лимфоцитов [1, 13].

Целью настоящего исследования явилось выяснение возможной патогенетической роли циркулирующих стволовых гемопоэтических клеток и клеток, поддерживающих функцию эндотелиально-эпителиальной системы, в раннем посттрансплантационном периоде (≈ 30 сут) у реципиентов трупной печени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование было включено 36 больных после трансплантации печени (22 женщины, 14 мужчин), выполненной в РНЦРХТ, 4 из них – в отдаленном периоде после трансплантации; 26 больных (3 – после обширного хирургического вмешательства на сердце и почке, 23 – условно здоровых человека без заболеваний печени, обследованных в Военно-медицинской академии) составили контрольную группу. Все реципиенты трансплантата трупной печени получали 3-компонентную иммуносупрессивную терапию, включающую ингибиторы кальциневрина (циклоспорин или такролимус), преднизолон и азатиоприн.

Каждый из 32 пациентов основной группы и 3 пациента после обширного оперативного вмешательства из контрольной группы были обследованы в течение 30–40 дней после операции со средней частотой обследования 2 раза в неделю. Каждое обследование включало определение следующих клеточных маркеров мононуклеаров крови: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD19, CD25, CD31, CD34, CD45, CD56, CD62, CD133 (прямым иммунофлуоресцентным методом с антителами производства «Dako», «BD») и CD154, HLA-DR, терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза – TdT, васкулярно-эндотелиальный фактор роста – VEGF (непрямым методом с антителами «Dako», «BD», «Сорбент»). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACScan, Becton Dickinson в режиме двойной метки (CD3/31, CD8/11b, CD 4/62, CD34/133, CD19/56) и одиночной (HLA-DR, CD154, VEGF, TdT).

Фракцию мононуклеаров для всех исследований выделяли из гепаринизированной крови центрифугированием на градиенте фиколл-верографин (1,077 г/мл). В каждом опыте ставили положительный (по общему лейкоцитарному антигену) контроль. Число клеток, имеющих тот или иной маркер, оценивали в процентах к общему количеству мононуклеаров. Число мононуклеаров подсчитывалось в зависимости от условий анализа либо во фракции собственно лимфоцитов (G1), либо моноцитов (G2), либо мононуклеаров с повышенным боковым рассеиванием (G3) в координатах бокового и прямого рассеяния, полученного в программе Cell Quest.

Оценку пролиферативной активности во фракции мононуклеаров крови проводили по реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) – включения меченного тритием тимидина (3H-TdR) в клетки после 72 ч инкубации их в бескислородной (CO₂), питательной среде с добавлением аутологичной сыворотки. За 16–18 ч до окончания инкубирования в пробы добавляли по 40 кБк (1 мкКи) 3H-TdR. Контрольные пробы (культивированные без митогена фитогемагглютинина (ФГА) и опытные (с ФГА, 5 мкг/мл) осаждали на фильтрах, фильтры промывали 0,85% раствором NaCl, 5% ТХУ, метанолом и измеряли их радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном бета-спектрометре «Picker-Nuclear». Результаты в виде имп./мин для спонтанного синтеза (СС) в контроле и для индуцированного ФГА в опыте (ФГА) выражали как индекс стимуляции ИС = ФГА/СС.

В группе контроля подобное исследование проводили однократно.

Статистическую обработку данных проводили, используя t-критерий Стьюдента для оценки вероятности различий (p) между средними величинами $M \pm m$. Для описания и статистических оценок кинетических зависимостей использовали аппроксимации различными функциями в программе «Microsoft Office Excel 2007».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предварительная оценка в группе условно здоровых лиц, находящихся на поликлиническом наблюдении, показала, что концентрация СГК в их крови составляет $0,155 \pm 0,0158\%$ во фракции мононуклеаров. Изучение динамики уровня СГК в крови пациентов после обширного хирургического вмешательства обнаружило первоначальное падение их концентрации до $0,1 \pm 0,021$ ($p=0,04$) и последующее восстановление до $0,175 \pm 0,017$ ($p=0,016$) соответственно к 6 ± 2 сут (95% доверительный интервал $4,5 \div 8,5$ сут) и к $20,85 \pm 2,1$ сут (95% доверительный интервал $19 \div 23$ сут) после операции. Направленность и сроки полученных контрольных изменений уровня цирку-

лирующих СГК при обширных оперативных вмешательствах соответствовали изменениям основных клеточных показателей общего анализа крови, описанным для клиники критических состояний [2].

С учетом вышеизложенных предварительных данных результаты измерений СГК в основной группе с трансплантированной печенью были анализированы в пределах двух 99% доверительных интервалов времени: 1) 1÷9 сут, 2) 10÷30 сут.

Индивидуальные изменения уровней СГК были классифицированы путем подбора аппроксимирующих кривых в программе «Microsoft Excel». Такая классификация формы индивидуальных кинетических кривых позволила сгруппировать их в четыре статистически различающихся варианта изменений, происходящих в пределах указанных временных интервалов (рис. 1).

Вариант I отличается аномально высоким уровнем СГК в обоих интервалах времени 1 и 2, превышая контрольные значения при обширном хирургическом вмешательстве в 5,6 и 3,1 раза соответственно ($p=0,001$ и $p=0,001$). Является ли данная аномалия реакцией на трансплантацию или исходно высоким уровнем, предсуществовавшим до операции, неизвестно. Однако в пользу реактивной природы механизма подъема СГК в варианте I свидетельствует вариант III, при котором еще больший первоначальный подъем СГК сменяется глубоким падением до уровня в 4 раза меньшего по сравнению с таковым для «хирургического» контроля в соответствующем интервале времени 10÷30 сут ($p<0,001$). Вариант IV,

как антипод варианта I, также подтверждает предположение о реактивной природе первоначального подъема СГК в I и III вариантах, так как такой подъем в нем отсутствует, а во втором периоде времени происходит глубокое, в 2,6 раза меньше уровня «хирургического» контроля, падение ($p<0,001$). В варианте II, наиболее часто встречающемся среди обследованных реципиентов, первоначальный подъем показателя имеет место, но он сравнительно невелик, всего в 1,9 раза над уровнем «хирургического» контроля ($p=0,03$), а во втором временном периоде достоверные отличия от «хирургического» контроля отсутствуют ($p=0,24$).

Из приведенных в поле рис. 1. вероятностей следует, что к 10÷30 сут (второй период) уровни СГК закономерно понижаются от варианта I к варианту II и далее к вариантам III–IV, при этом в варианте I СГК оказываются выше (в 3,5 раза, $p=0,04$) уровня поликлинического контроля, обозначенного стрелкой на оси ординат, а в вариантах III и IV – ниже в 3,5 ($p<0,001$) и в 2,3 раза 5 ($p<0,001$) соответственно. Из выделенных вариантов, два первых (I и II) характеризовались благоприятным течением послеоперационного периода, а в вариантах III и IV возникали осложнения, поэтому было сделано предварительное заключение о положительном патогенетическом влиянии циркулирующих СГК на состояние трансплантата печени в раннем послеоперационном периоде и о зависимости результата операции от способности кроветворной системы производить СГК для поддержания их концентрации в крови на достаточно высоком уровне, даже в условиях жесткой иммунодепрессивной терапии.

Для уточнения более конкретных исполнительных механизмов благотворного влияния циркулирующих СГК на состояние трансплантата было произведено сравнение усредненных по всему месячному периоду изучения величин субпопуляций мононуклеаров крови у конкретных пациентов из числа отнесенных к благоприятному варианту II и «неблагоприятному» – IV. К варианту II отнесены большинство реципиентов с благополучным состоянием после трансплантации (>50%), а вариант IV включал пациентов с отсроченным восстановлением функции трансплантата (≈15–20%). Результаты сравнения представлены в табл. 1.

Согласно данным табл. 1, IV, «неблагоприятный», вариант имеет статистически значимое повышение CD8+ клеток, которое согласуется с увеличением фракции прелимфоцитов с маркером TdT (рис. 2). Последние образуются из стволовых гемопоэтических клеток CD34+ и являются непосредственными предшественниками вначале CD8+, позднее – CD4+ лимфоцитов [24]. Наряду со сниженным в варианте IV регуляторным индексом (РИ) (рис. 2), выявлен-

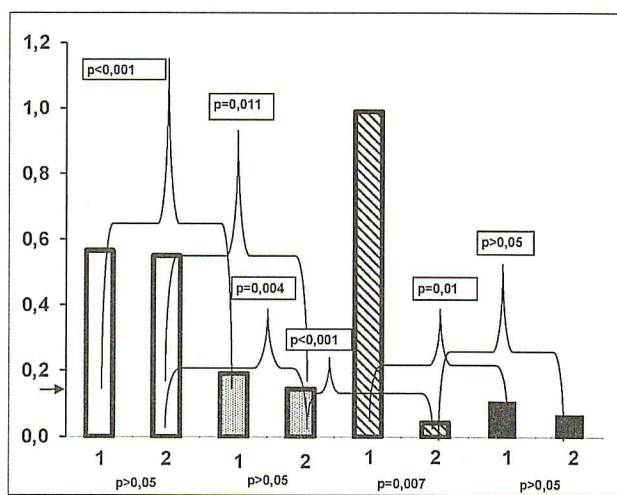


Рис. 1. Варианты изменений уровней СГК крови после трансплантации печени: по оси абсцисс – 99% доверительные интервалы времени: 1) 1–9 сут 2) 10–30 сут; по оси ординат – концентрация СГК в суммарной фракции (G1+G2+G3) мононуклеаров крови, %, варианты: I – белый; II – серый; III – штрих; IV – черный, вероятность p для сравнения значений СГК внутри варианта указана на оси абсцисс, между вариантами – в поле рисунка

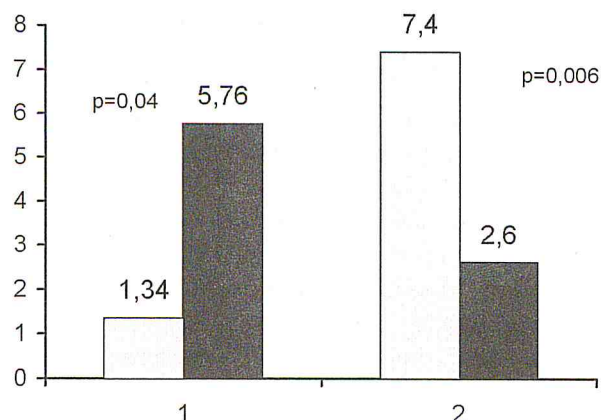


Рис. 2. Сравнение вариантов II и IV для TdT+ и РИ: по оси абсцисс: 1 – терминальная дезоксирибонуклеотидил трансфераза (TdT), 2 – регуляторный индекс, РИ, по оси ординат: концентрация TdT в суммарной фракции (G1+G2+G3) мононуклеаров крови, % (1); отношение CD4/CD8, относительные ед. (2). Варианты: II – серый; IV – черный

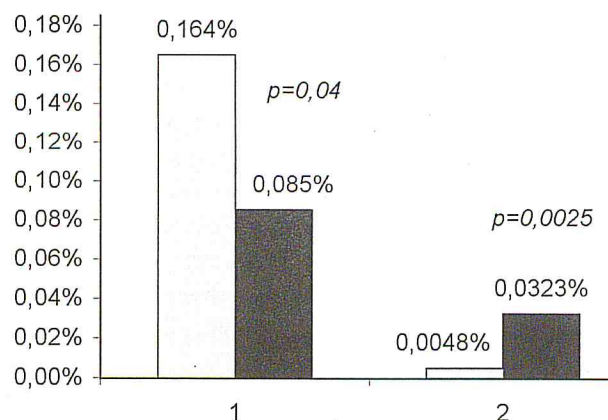


Рис. 3. Сравнение вариантов II и IV для CD34 и CD133: по оси абсцисс: 1 – СГК CD34+, 133-; 2 – СГК CD34+, 133+; по оси ординат: концентрация CD34+, % во фракции (G1+G2) мононуклеаров крови; варианты: II – серый; IV – черный

ные особенности формально могли бы трактоваться скорее как способствующие сохранению трансплантата, чем наоборот. Однако отдельный анализ содержания супрессоров CD8+11b+ и цитотоксических клеток CD8+11b- показал существенное повышение последних в IV, «неблагоприятном», варианте (см. табл. 1).

Подтвержденный в варианте IV сравнительный дефицит CD34+, 133-стволовых гемопоэтических клеток (рис. 1, 3) явился, вероятно, причиной недостатка низкодифференцированных HLA-DR+ клеточных форм, происходящих непосредственно из СГК (рис. 4), и CD19+ В-лимфоцитов (рис. 4).

Важным элементом субпопуляционного состава в варианте IV оказалось сравнительно низкое содержание фракции CD3+, 31+ клеток, которые относят к ангиогенным Т-клеткам (рис. 5). Содержание клеток, несущих васкулярно-эндотелиальный фактор роста (VEGF), было снижено также в варианте IV (рис. 5).

В противоположность этому в варианте IV повышен уровень происходящих из костного мозга цир-

кулирующих предшественников эндотелиоцитов с двойными маркерами CD133+, CD34+ (рис. 3).

В совокупности обнаруженные особенности варианта IV можно трактовать как сдвиг системы сосудобразования («неоангиогенеза») «влево» по сравнению с вариантом II. Такой сдвиг в варианте IV мог быть причиной относительного перераспределения продукции стволовых гемопоэтических клеток с приоритетом насыщения крови предшественниками эндотелиоцитов с фенотипом CD133+, 34+ в ущерб представительству родоначальных CD34+, 133- форм (рис. 3).

Чтобы точнее оценить направленности зарегистрированных изменений в раннем периоде, были использованы результаты контрольных обследований пациентов через 1–1,5 года после трансплантации печени. В табл. 2 содержатся статистически значимые результаты такого сравнения. При благоприятном варианте II по истечении года после трансплантации показатели VEGF+, CD31+ и РИ более чем в 5 раз понизились, что подтверждает их действительный подъем в раннем посттрансплантационном периоде. В противоположность этому, данные таблицы также дают основание предполагать существование в

Таблица 1

Сравнение средних показателей (M±m, %) у больных, имеющих II и IV варианты динамики CD34+ (согласно рис. 1)

Вариант	CD3+	CD4+	CD4+,62+	CD8+	CD8+,11b+	CD56+
II	27,1±4,4	22,7±2,9	19,7±2,9	3,6±0,6	0,3±0,2	3,2±1,1
IV	42±7,7	27,3± 4,15	24,2±4,5	14,2±2,1	0,057±0,02	5,9±1,3
p	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05
	CD 154+	CD3+,25+	CD8+,11b-	СС	РБТ	ИС
II	0,04±0,02	0,03±0,003	2,66±0,47	337±145	3978±3358	22±20
IV	0,36±0,16	0,21±0,17	14,7±2,1	154±19	167±26	1,1±0,04
p	>0,05	>0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05

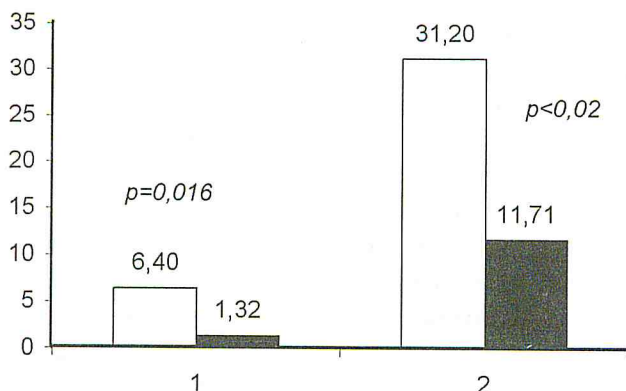


Рис. 4. Сравнение вариантов II и IV для CD19+ и HLA-DR+: по оси абсцисс: 1 – CD19+ В-лимфоциты; 2 – HLA-DR+ клетки; по оси ординат: концентрация (%) для суммарной фракции (G1+G2+G3) мононуклеаров крови, варианты: II – серый, IV – черный

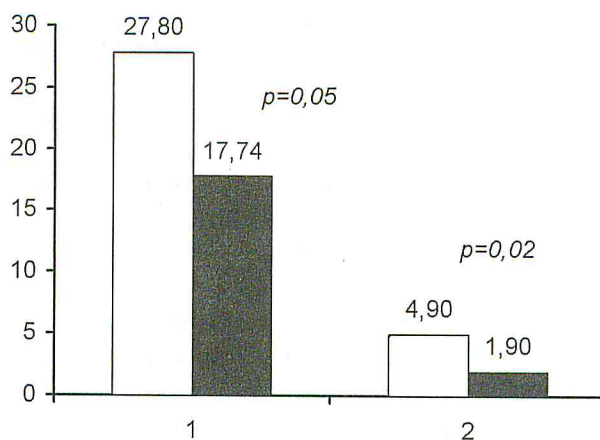


Рис. 5. Сравнение вариантов II и IV для CD3+,31+ и VEGF+: по оси абсцисс: 1 – CD3+,31+ лимфоциты; 2 – VEGF+ клетки; по оси ординат: концентрация (%) для лимфоцитов (G1) и VEGF+ клеток в суммарной фракции (G1+G2+G3) мононуклеаров крови, варианты: II – серый, IV – черный

варианте II и раннего дефицита CD3+, CD8+11b- и CD3+,25+. Увеличение в позднем периоде благоприятного варианта II цитотоксических клеток CD8+11b- и CD3+,25+ клеток с рецепторами к интерлейкину II затрудняет отнесение их к патогенетически негативным параметрам.

В «неблагоприятном» варианте IV, согласно данным табл. 2, ранний период характеризуется недостатком CD34+,133- стволовых гемопоэтических клеток, HLA+ ранних клеточных форм, Т-супрессоров CD8+,11b+, а также CD56+ натуральных киллеров и, напротив, некоторым избытком популяции CD31+ ангиогенных Т-клеток. Важно подчеркнуть, что этот «избыток» уступает, однако, по масштабу аналогичным данным в благоприятном варианте II, но он также указывает на общую для двух вариантов особенность – на реактивный подъем уровня CD3+,31+ ангиогенных лимфоцитов в ранний срок после трансплантации. Примечательно, что у переживших ранний период больных в отдаленные сроки сохраняется изначально высокое содержание цитотоксических клеток CD8+11b-, равно, как и увеличи-

вается концентрация CD56+ натуральных киллеров, что не позволяет однозначно трактовать эти два параметра как способствующие отторжению, поскольку у больных изучаемой группы не было ни клинических, ни морфологических признаков отторжения.

Таким образом, трактовка ранней направленности субпопуляционных изменений в виде неблагоприятного «сдвига влево» ангиогенного потенциала крови, вытекающая из сравнения «благоприятного» и «неблагоприятного» вариантов (табл. 1, рис. 2–5), нашла независимое подтверждение при сравнении этих вариантов с характеристиками позднего периода, вне условий повышенного риска острого отторжения трансплантата (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что риск острого отторжения максимален в первый месяц после операции [9]. По результатам настоящего исследования такому риску сопутствует снижение содержания CD34+стволовых гемопоэтических клеток в крови (вариант IV рис. 1;

Таблица 2

Сравнение средних показателей (M±m, %) у больных, имеющих II и IV варианты динамики CD34+ клеток (согласно рис. 1), с контрольными значениями в отдаленном периоде после трансплантации (К)

	VEGF+	CD3+, 25+	CD8+, 11b+	CD3+, 31+	CD8+, 11b-	CD3+
К	0,73±0,1	0,54± 0,1	1,62±0,51	4,3±2,7	15,8±3,1	48,4±7,5
II	4,9±1,13	0,03±0,003	0,3±0,18	27,5±4,0	3,6±0,6	27,1±4,35
p	0,004	<0,001	0,03	<0,001	0,002	0,03
	CD34+,133-	HLA	CD8+, 11b+	CD3+, 31+	CD8+, 11b-	CD56+
К	0,18±0,039	32,2± 8,4	1,62±0,51	4,3±2,7	15,8±3,06	9,8±1,4
IV	0,085±0,029	11,7±4,3	0,057±0,016	17,7±3,2	14,2±2,12	5,9±1,34
p	0,07	0,05	0,01	0,01	>0,05	0,07

рис. 3). Как следствие этого снижения можно рассматривать и недостаток субпопуляций с маркерами В-клеток CD 19+, HLA+ (рис. 4), ангиогенных Т-лимфоцитов с маркером CD31+ и клеток с VEGF (рис. 5).

Те же показатели (ангиогенные Т-лимфоциты с маркером CD31+ и клетки с VEGF), при благоприятном варианте II в раннем периоде значительно выше (рис. 3–5) и затем снижаются в течение года (табл. 2). Т-лимфоциты CD31+ и CD34+ стволовые гемопоэтические клетки являются продуцентами ангиогенных цитокинов [7], что объясняет одинаковую направленность изменений этих показателей с изменениями содержания VEGF+ клеток в двух вариантах.

Повышенный уровень CD34+ стволовых гемопоэтических клеток в варианте II по сравнению с вариантом IV существует на фоне сравнительно скудного представительства клеток CD34+,133+ (рис. 3). Эти клетки формируют колонии предшественников эндотелиоцитов. Для этих так называемых колониеформирующих эпителиальных предшественников (CFU-EPCs) [7], являющихся прообразом эмбриональных ангиобластов, характерна мобилизация их из костного мозга с преходящим подъемом концентрации в крови не только при травмах, но и при функциональной недостаточности сосудистого русла [10]. Поскольку дифференцирование CFU-EPCs в собственно клетки эндотелия – процесс не самостоятельный, а поддерживается паракринными процессами с участием лимфоцитов [1, 3, 28], необходимо интерпретировать изменения обеих субпопуляций в совокупности. Так, зарегистрированный в благоприятном варианте II подъем CD3+,31+ клеточных форм заметно превосходит подъем их в «неблагоприятном» варианте IV (рис. 5), а содержание CD34+,133+ клеток в варианте II, наоборот, значительно меньше, чем в варианте IV (рис. 3). Если принять в качестве результирующего критерия функциональной активности этих двух популяций уровень клеточных форм, несущих важнейший цитокин ангиогенеза VEGF, то, во-первых, таких форм больше в благоприятном варианте II, а во-вторых, только при этом варианте их увеличение воспринимается как динамичное, сохраняясь только в раннем периоде и исчезая в отдаленном периоде, когда восстанавливается такой показатель, как CD3+,25+, являющийся элементом клеточной системы, взаимодействующей с цитокином ИЛ-2 (табл. 2).

У переживших 30-дневный ранний период реципиентов в «неблагоприятном» варианте IV надежного восстановления CD34+ СГК не предполагается (табл. 2). Отмечена лишь тенденция ($p=0,07$) на фоне увеличения HLA+ ранних клеточных форм и CD56+ натуральных киллеров. Недостаток продукции CD34+ СГК в варианте IV сравнительно с вариантом II (рис.

1, 3) сочетался с повышением в раннем периоде содержания TdT+ прелимфоцитов и CD8+ популяции (табл. 1, рис. 1). Однако при учете данных табл. 2 следует заключить, что фракция CD8+ клеток в варианте IV количественно не изменялась, а истинное ее уменьшение имело место только в варианте II, в его раннем периоде. При этом фракция CD8+ была представлена в основном цитотоксическими клетками CD8+,11b- и, следовательно, следует констатировать ранний дефицит этих клеток в благополучном варианте II. Тем не менее переоценивать патогенетическую роль отсутствия аналогичного дефицита цитотоксических клеток CD8+,11b- в «неблагоприятном» варианте IV не следует, так как в отдаленном периоде они сохраняются на неизменно высоком уровне. Более того, их концентрация увеличивается до такого же высокого уровня в позднем периоде «благоприятного» варианта II (табл. 2). Фракция собственно супрессоров CD8+,11b+, будучи вначале минимальной в обоих вариантах (табл. 1), слегка возрастает в них через год, не доминируя, однако, в общем пуле CD8+ (табл. 2). В совокупности полученные данные позволяют рассматривать компонент кроветворения, поддерживающий функцию эндотелия, в качестве самостоятельного патогенетического звена раннего периода после трансплантации печени.

Таким образом, при благоприятном исходе трансплантации на фоне раннего снижения уровня цитотоксических лимфоцитов активируется комплекс клеток, поддерживающих ангиогенез, CD3+,31+ и VEGF+ клетки. Активность этих исполнительных элементов зависит от способности кроветворной системы продуцировать необходимое количество CD34+ СГК и поддерживать их количество в циркуляции на уровне физиологической нормы в условиях иммуносупрессивной терапии. С учетом ее однотипности в обоих вариантах клинико-лабораторные различия в них рассматриваются как следствие индивидуальной вариативности физиологического ресурса гемопоэза потенциальных реципиентов.

Литература

1. Гранов А.М., Шутко А.Н. Парадоксы злокачественного роста и тканевой совместимости. СПб.: Гиппократ, 2002.
2. Масютин В.А., Широков Д.М., Пивоварова Л.П. и др. Оценка лабораторных данных в критических состояниях (трактовка, прогнозирование, медикаментозная коррекция): Пособие для врачей / под ред. С. И. Перегудова. СПб.: Отдел оперативной полиграфии СПб УАП.
3. Парфенова Т.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // Кардиол. вестн. 2007. Т. 2. № 2. С. 1–8.

4. Рябов С.И., Шутко А.Н., Ракитянская И.А. Почки и система иммунитета. Ленинград: Наука, 1989.
5. Старостина Н.М., Пальцев А.И., Останин А.А. и др. Аутологичные костно-мозговые клетки в комплексном лечении цирроза печени // Мед. иммунол. 2009. Т. 11. № 4–5. С. 463.
6. Шутко А.Н., Герасимова О.А., Екимова Л.П. и др. Субпопуляции периферической крови человека после трансплантации печени // Мед. иммунол. 2009. Т. 11. № 4–5. С. 464.
7. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis // Science. 1997. Vol. 275. P. 964–967.
8. Costillo-Roma M., Castro M., Bemardo I. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease long allograft survival: role of HLA compatibility // Liver Transplantation. 2008. Vol. 14. P. 554–562.
9. 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.
10. Gill M., Dias S., Hattori K. et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2+ AC133+ endothelial precursor cells // Corc. Res. 2001. Vol. 88. P. 167–174.
11. Harraz R., Jiao C., Hanlon H. et al. CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors // Stem. Cells. 2001. Vol. 19. P. 304–312.
12. Jacob S., Navarro V., Colombe B. et al. Human Leukocyte Antigen and adult living donor transplantation outcome: analysis of the organ procurement and transplantation network database // Liver Transplantation. 2007. Vol. 13. P. 1405–1413.
13. Jin Hur, Han-Mo Yang, Chang-hwan Yoon et al. Identification a novel role of T cells in postnatal vasculogenesis. Characterization of endothelial progenitor cell colonies // Circulation. 2007. Vol. 116. P. 1671–1682.
14. Kamei H., Oike F., Fujimota Y. Fatal-graft-versus-host disease after living donor liver transplantation: different impact of donor-dominant one-way HLA matching // Liver Transplantation. 2006. Vol. 12. P. 140–145.
15. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M. et al. Purified hematopoietic stem cell scan differentiate into hepatocytes in vivo // Nat. Med. 2000. Vol. 6. P. 1229–1234.
16. Langrehr J., Phul G., Bahra M. et al. Influence of donor/recipient HLA matching on outcome and recurrence of hepatitis C after liver transplantation // Liver Transplantation. 2006. Vol. 12. P. 644–651.
17. Marioka O., Egava H., Kasahara M. Impact of Human Leukocyte Antigen mismatching on outcomes of living donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis // Liver Transplantation. 2007. Vol. 13. P. 80–90.
18. Moya-Quiles M., Muro M., Torio A. et al. Human Leukocyte Antigen-C in short- and long-term liver graft acceptance // Liver Transplantation. 2003. Vol. 9 (3). P. 218–227.
19. Morales-Buenrostro L., Castro R., Terasaki P. Single Human Leukocyte Antigen-antibody test after heart and lung transplantation is predictive of survival // Transplantation. 2008. Vol. 85. P. 478–481.
20. Navarro V., Herrine S., Katopes Ch. The effect of HLA Class I (A and B) and Class II (DR) Compatibility in liver transplantation outcomes: on analysis of the OPTN database // Liver Transplantation. 2006. Vol. 12. P. 652–658.
21. Oo Ye H., Neuberger J. HLA and outcome in living donor liver transplantation in primary biliary cirrhosis: a new piece in jigsaw? // Liver Transplantation. 2007. Vol. 13. P. 8–13.
22. Oertel M., Berr F., Shroder S. et al. Acute rejection of hepatic allograft from HLA-DR 13 (allele DRBI* 1301) – positive donors // Liver Transplantation. 2000. Vol. 6. P. 728–723.
23. Peichev M., Naiyer A., Zhu Z. et al. Expression of VEGFR-1 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors // Blood. 2000. Vol. 95. № 3. P. 952–958.
24. Sugavara Y., Mizuta K., Kavarasaki H. Risk factors for acute rejection of pediatric living related liver transplantation; the impact of HLA matching // Liver Transplantation. 2001. Vol. 7 (9). P. 769–773.
25. Soejima Y., Shimada M., Suchiro T. Graft versus host disease following living donor liver transplantation // Liver Transplantation. 2004. Vol. 10. P. 460–464.
26. Shoutko A., Karamullin M., Ekimova L. et al. Latent time of generation of different lymphocytes subtypes in blood of Chernobyl's cleanup workers // 34th Annual Meeting of the European Society for Radiation Biology. 5–8.09.2005. University of Leicester. UK. P. 166–167.
27. Terasaki P., Cai Ju. Human Leukocyte Antigen antibodies and chronic rejection: from association to causation // Transplantation. 2008. Vol. 86. P. 377–383.
28. Ziegelhoeffer T., Fernandes B., Kostin S. et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature // Circ. Res. 2004. Vol. 94. P. 230–238.