



Новые технологии в трансплантологии. Ишемически-реперфузионное повреждение трансплантата

А.А. Темнов
НИИ СП им. Н.В. Склифосовского

New technologies in Transplantology. Ischemia-reperfusion injury of the graft

A.A. Temnov
Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine

В своем докладе мы остановимся на подробном анализе экспериментальных работ, направленных на борьбу с ишемически-реперфузионными повреждениями (ИРП). В докладе наряду с литературными данными представлены результаты работы лаборатории института им. Н.В. Склифосовского, полученные совместно с Институтом биофизики клетки и Московским отоларингологическим центром.

Ишемия при заборе органа у донора и последующая реперфузия трансплантата приводят к развитию тяжелых осложнений: отторжению пересаженного органа, первичной дисфункции, развитию воспалительного процесса. При этом в патогенезе ИРП можно выделить следующие фазы:

1. Метаболический дисбаланс, сопровождающийся повреждением митохондрий и нарушением гомеостаза Ca^{2+} .
2. Повышение продукции активных форм кислорода (АФК) и нитрогенных субстанций (NO).
3. Нарушение микроциркуляции.
4. Активацию клеток иммунной системы с выделением провоспалительных и проапоптотических факторов.

Все это в конечном итоге приводит к дисфункции эндотелия, развитию воспалительной реакции и апоптозу/некрозу клеток трансплантата.

Это лишь небольшая часть изменений, происходящих в тканях в результате ИРП, однако новые подходы к терапии данных патологиче-

ских состояний должны учитывать все аспекты их сложного патогенеза. И именно знания звеньев патогенеза подсказывает нам три основных пути в борьбе за снижение уровня повреждений – это:

- ингибирование апоптоза и снижение уровня воспалительной реакции;
- использование антиоксидантов для снижения уровня окислительного стресса в тканях трансплантата;
- снижение уровня метаболизма тканей трансплантата при ишемии.

На сегодняшний день одним из наиболее привлекательных методов лечения ИРП является введение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в кровеносное русло ишемизированного органа. Однако механизм их действия до сих пор остается недостаточно ясным.

Сложилась две основных гипотезы. Сторонники первой полагают, что положительный эффект основывается на способности МСК трансдифференцироваться в клетки окружающей ткани, таким образом способствуя регенерации поврежденного органа, восстановлению его структуры и функций. Другая гипотеза, наиболее новая, рассматривает как основной механизм положительного эффекта МСК выделение ими паракринных факторов, к которым в первую очередь относятся цитокины различных групп (ростовые факторы, противовоспалительные цитокины, хемокины и др.). Ростовые факторы, выделяемые стволовыми клетками, снижают уровень апоптоза

и фиброза в трансплантате, активируют ангиогенез и пролиферацию паренхиматозных клеток.

В НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского проводятся работы по выделению и характеристике пептидов получаемых культивированных стволовых клеток костного мозга. Основные этапы – это забор костного мозга у донора, культивирование стволовых клеток и, наконец, получение белково-пептидных препаратов. Иммуногистохимическая окраска на маркеры апоптоза, проведенная сотрудниками Московского центра отоларингологии, подтвердила, что белково-пептидные препараты, полученные в лаборатории НИИ скорой помощи, защищают от апоптоза ткани экспериментального животного путем выработки антиапоптотического фактора Bcl-2.

Однако использование только антиапоптотического фактора, на наш взгляд, недостаточно. Необходимо блокировать более раннюю стадию, приводящую к апоптозу и некрозу тканей, а именно выработку активных форм кислорода, используя природные эндогенные антиоксиданты.

Мы считаем, что наиболее перспективным для дальнейшего изучения в качестве фармакологического агента для борьбы с ИРП является препарат пероксиредоксин, характеристика и выпуск которого налажен в лаборатории механизмов рецепции под руководством профессора Новоселова. Данный препарат показал свою высокую эффективность на модели оксидативного стресса при изолированной перфузии сердца раствором, содержащим перекись водорода. Данные иммуногистохимического анализа показали, что как эндогенный, так и экзогенный пероксиредоксин накапливается в стенках сосудов, защищая эндотелий от повреждения, ингибируя перекисное окисление липидов и как следствие защищает ткань миокарда от повреждения.

Наконец, третьим путем уменьшения повреждений является снижение метаболизма в ишемизированном органе.

Одним из интересных направлений, активно разрабатываемых, является ингаляция газов, резко снижающих метаболизм тканей. Речь идет об ингаляции CO, NO и H₂S. Воздействие данных газов приводит к:

- снижению потребности тканей в АТФ,
- расширению сосудов,
- ингибированию проапоптотических ферментов,
- снижению адгезии нейтрофилов к эндотелиальным клеткам.

В работе, опубликованной в 2012 г., авторы утверждают, что ингаляция H₂S перед и после 30-минутной тепловой ишемии достоверно повы-

шает выделительную функцию почки, улучшая перфузию органа и снижая уровень креатинина в крови. При этом в ткани почки снижается уровень апоптоза, уменьшаются зоны поврежденной ткани и зоны лейкоцитарной инфильтрации. При этом отмечается, что ингаляция сероводородом после ишемии не приводит к каким-либо положительным эффектам. Авторы считают, что причиной таких изменений является резкое (практически в 3 раза) снижение уровня метаболической активности ткани, уровня потребления АТФ и кислорода.

Обращу ваше внимание на работы, проводимые в г. Пущино под руководством акад. И.П. Ашмарина. Речь пойдет о такой интересной группе животных, как теплокровные зимоспящие. Чем они так ценны для экспериментальных трансплантологов?

Было показано, что при погружении в спячку в тканях этих животных выделяются биологически активные вещества, защищающие их ткани от ИРП. Куртц и соавторы в 2006 г. показали, что ткань тонкого кишечника у суслика, находящегося в состоянии анабиоза, способна выдерживать 30-минутную ишемию с последующей реперфузией. При этом иммуногистохимически было показано, что у животного, находящегося в состоянии анабиоза, отсутствуют признаки апоптотического повреждения ткани. В другой работе, опубликованной в 2009 г., было показано, что выделенные из тканей суслика энкефалиноподобные нейропептиды, ответственные за развитие анабиоза, могут защищать ткани головного мозга других млекопитающих при развитии ИРП, снижая уровень проапоптотических белков.

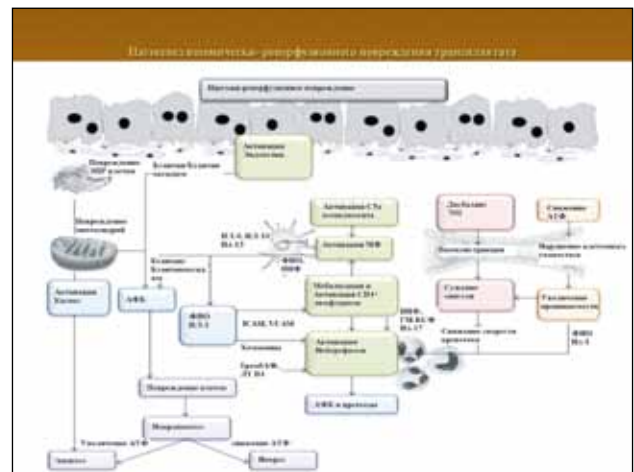
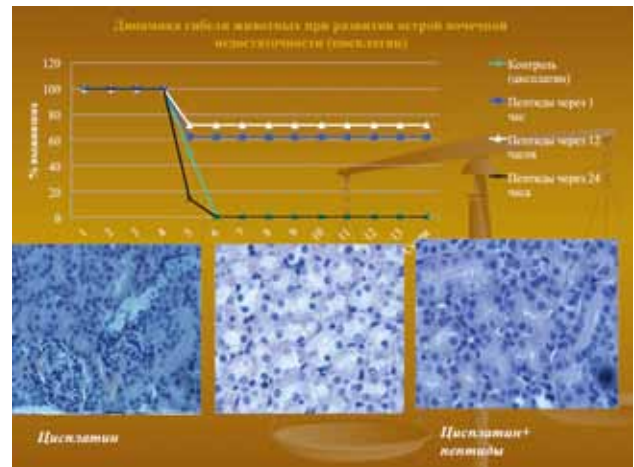
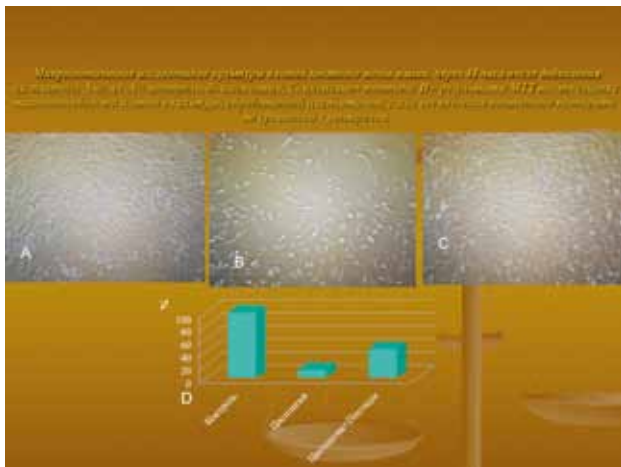
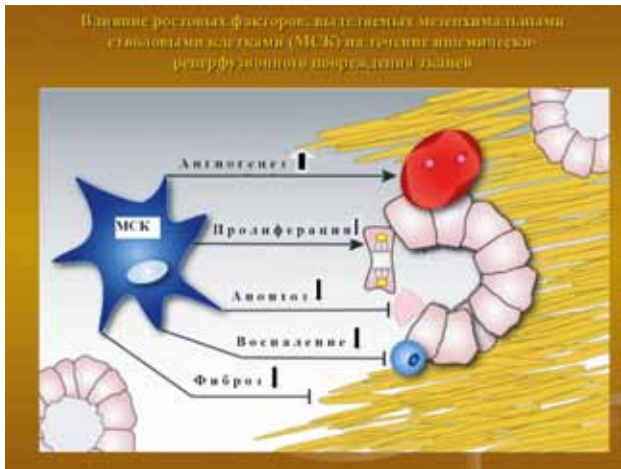
Какие нам видятся перспективы для дальнейшей работы?

1. Разработка новых методов культивирования клеток для получения комбинации биологически активных пептидов, обладающих выраженными антиапоптотическими и противовоспалительными свойствами.

2. Комбинация получаемых белково-пептидных препаратов с биологическими антиоксидантами (пероксиредоксин).

3. Оработка модели гипотермии у теплокровных экспериментальных животных с целью разработки новых методов борьбы с ИРП.

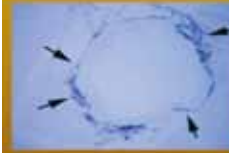
4. Разработка перфузионных сред, обладающих повышенной емкостью для (NO, H₂S) газов, снижающих метаболическую активность ишемизированной ткани.



Модель окислительного стресса при перфузии изолированного сердца



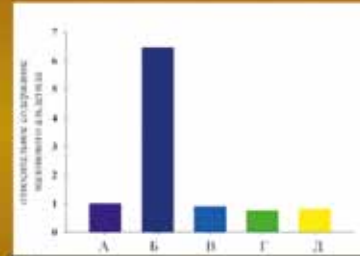
Доказательство внешнего Рeбt при реперфузии сердца в присутствии перекиси водорода.



Доказательство внешнего Рeбt при реперфузии сердца в присутствии перекиси водорода.

По данным лаборатории механизмов реперфузии (рук. профессор В.Н.Новоселов) ИВК РАН

Окислительный стресс в изолированных органах



Снижение окислительного стресса в печени и почках крысы при реперфузии после перекисного повреждения, с использованием реперфузионной защиты ингибитора окислителя.

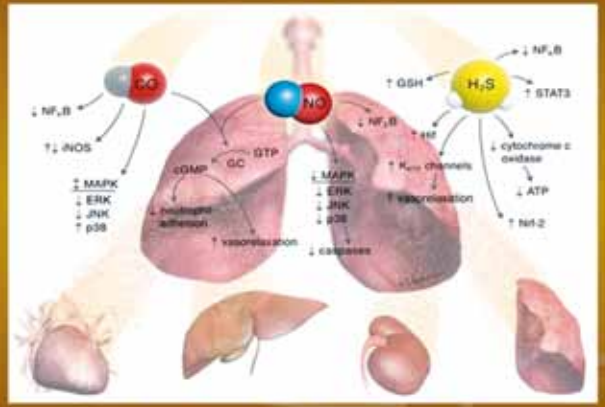
1) Функциональное реперфузии: 100% → 100% (p < 0.05); 2) Рeбt: контроль окислительного стресса → 100% (p < 0.05); 3) 100% NADPH/NO2- → контроль окислительного стресса → 100% (p < 0.05); 4) 100% NADPH/NO2- → контроль окислительного стресса → 100% (p < 0.05).

По данным лаборатории механизмов реперфузии (рук. профессор В.Н. Новоселов) ИВК РАН

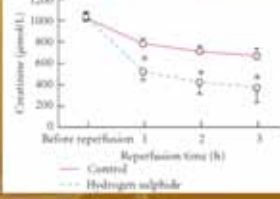
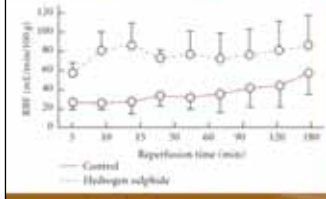
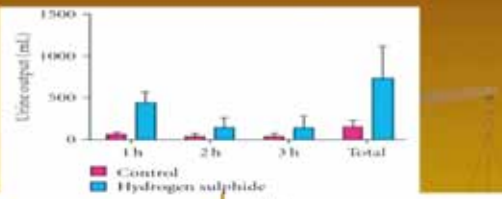
Физиологические параметры изолированного сердца крысы при реперфузии

	Давление, (mmHg)	Частота серд.сокр. (х/з/мин)	Механика сердца
Контроль	60-70	60	Хорошая
200 μM H ₂ O ₂	40-50	130	Слабая
Пероксидредуктаза b	55-65 50-60 (H ₂ O ₂)	80 60 (H ₂ O ₂)	Хорошая
НУМРРРР/ННС	60-70 50-60 (H ₂ O ₂)	88 55 (H ₂ O ₂)	Хорошая

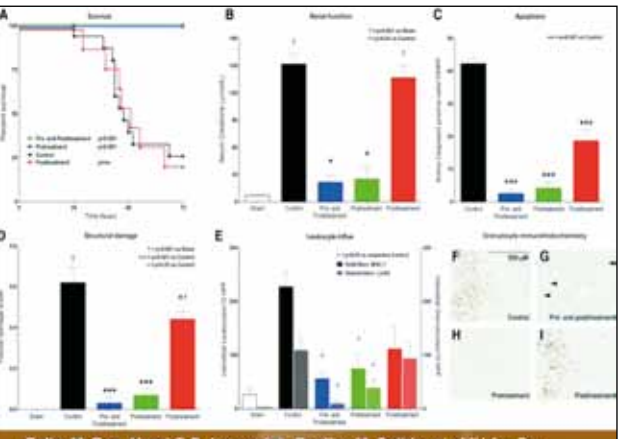
По данным лаборатории механизмов реперфузии (рук. профессор В.Н.Новоселов) ИВК РАН



Arantxa Sotomayor, Lucinda J. Chen, and John D. Lora, *J Transplant*, 2012;2012: 819182.



Arantxa Sotomayor, Lucinda J. Chen, and John D. Lora, *J Transplant*, 2012;2012: 819182.



Elke M. Bos, Henri G.D. Leuvenink, Pauline M. Snijder et al, *J Am Soc Nephrol*, 2009 September; 20(9): 1901-1905.

