

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ  
«МОСКОВСКИЙ ОБЛАСТНОЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
КЛИНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. М.Ф. ВЛАДИМИРСКОГО»**

*На правах рукописи*

**АРТЁМОВ ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ**

**Селективная сорбция цитокинов у пациентов старших  
возрастных групп после трансплантации почки**

14.01.04 – внутренние болезни

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, доцент  
Зулькарнаев Алексей Батыргараевич

Москва – 2020 г.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПАТОГЕНЕЗЕ И МЕТОДАХ КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Трансплантация почки как метод заместительной почечной терапии	15
1.2. Патогенез синдрома ишемии-реперфузии	17
1.2.1. Последствия ишемии в клетках	19
1.2.2. Роль активных форм кислорода	20
1.2.3. Роль системы комплемента	21
1.2.4. Роль лейкоцитов	22
1.2.5. Роль лимфоцитов патогенезе ИР-синдрома	24
1.2.6. Роль цитокинов и хемокинов	27
1.2.7. Роль повреждения тубулярных эпителиальных клеток и эндотелиальной дисфункции	29
1.2.8. Особенности иммунологического статуса у пожилых лиц	30
1.3. Профилактика и лечение синдрома ишемии-реперфузии	36
1.3.1 Реанимационные мероприятия у донора	36
1.3.2 Ишемическое прекондиционирование	37
1.3.3 Холодовая консервация	39
1.3.4 Аппарат гипотермической перфузии	39
1.3.5 Нормотермическая консервация	40
1.3.6. Воздействие на посредников воспаления	41
1.3.7 Плазмаферез	43
1.3.8 Применение биологических таргетных препаратов	44
1.3.9 Перспективы применения клеточной терапии	45
1.4. Селективные экстракорпоральные методы: области применения и преимущества	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Контингент обследованных больных	49

2.2. Выделение иммунокомпетентных клеток	54
2.3. Определение концентрации цитокинов в сыворотке крови	55
2.4. Метод определения электрофоретической подвижности клеток крови	57
2.5. Метод витальной компьютерной морфометрии клеток	58
2.6. Выполнение селективной сорбции цитокинов	60
2.7. Методика приготовления и исследования пункционных биоптатов	62
2.8. Методы статистической обработки результатов	65
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ МОРФО -ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЕСКОЙ КРОВИ И ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ	66
3.1. Особенности цитокинового профиля у больных старшей возрастной группы с хронической болезнью почек 5Д стадией	67
3.2. Особенности цитокинового профиля у реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде	68
3.3. Субпопуляции лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде	76
3.4. Морфофункциональное состояние мононуклеаров периферической крови у реципиентов почечного трансплантата в раннем посттрансплантационном периоде	79
ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕЛЕКТИВНОЙ СОРБЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ- РЕПЕРФУЗИИ И РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ	89
4.1. Динамика клинических и лабораторных показателей в раннем послеоперационном периоде	89
4.2. Результаты протокольных биопсий трансплантатов в раннем послеоперационном периоде	98
4.3. Течение позднего послеоперационного периода у больных обеих групп	100

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ВЫВОДЫ	119
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	122

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования.**

В последние годы количество больных с хронической болезнью почек V ст. (ХБП) неуклонно растет [140, 176]. Это обусловлено не только фактическим увеличением пациентов с заболеваниями, которые имеют прогрессирующий характер и, в конечном итоге, приводят к ХБП 5 стадии, но и значительным улучшением качества современной заместительной почечной терапии, благодаря чему увеличивается продолжительность жизни данной категории больных.

Среди всех методов лечения ХБП 5 стадии именно аллотрансплантация трупной почки (АТП) обеспечивает лучшие результаты по сравнению с другими видами заместительной почечной терапии: медицинскую и социальную реабилитацию, качество и продолжительность жизни [31, 44, 75, 78, 117]. Однако за последнее десятилетие темп роста количества трансплантаций почек несколько снижается, поскольку число доноров остается относительно постоянным. Тем самым усугубляется дефицит донорских органов и увеличивается очередь в листе ожидания, поскольку количество проводимых трансплантаций почек ниже, чем зарегистрированное число больных с ХБП 5 стадии. В связи с этим, произошел пересмотр критериев отбора доноров в сторону их расширения. Основным способом увеличения количества донорских органов и, в том числе, почек является использование органов, полученных от субоптимальных (маргинальных) доноров, то есть доноров с расширенными критериями (нестабильной гемодинамикой, сахарным диабетом, гипертонической болезнью, травмами, возрастными доноров и т.п.) [4, 5, 6].

В этих случаях крайне актуальной задачей является оптимизация протоколов иммуносупрессии, так как развитие реакции острого отторжения может усугублять морфологические изменения в скомпрометированном органе [56]. Однако простое увеличение дозы иммуносупрессии опасно в виду риска развития специфических осложнений: нефротоксичности, инфекций и др.

Известно, что функциональная состоятельность почечного аллотрансплантата (ПАТ) в ранние сроки после трансплантации зависит от

тяжести развивающихся в нем патологических изменений, которые могут носить иммунный и не иммунный характер. Как ранние, так и отдаленные результаты трансплантации зависят от двух основных факторов: степени повреждения органа и способность к регенерации его ткани [27, 39]. При этом в случае трансплантации почек от субоптимальных доноров исходно более выраженное повреждение почек и сниженные способности к регенерации диктуют необходимость к поиску новых подходов для улучшения результатов [5].

Расширение донорского пула привело к тому, что часто трансплантированные органы, полученные от «возрастных» доноров или доноров с небьющимся сердцем, то есть – подверженные первичной тепловой ишемии, имеют повышенную иммуногенность, и более склонны к кризам отторжения и тяжелым реперфузионным повреждениям [5, 33, 48]. Это отрицательно влияет на функциональное состояние трансплантата и, соответственно, длительность его функционирования. Тяжесть реперфузионного повреждения во многом определяет функциональную состоятельность органа, а также вероятность развития реакции отторжения (особенно на ранних сроках после операции) [138]. В результате нарушений гемодинамики донора и выраженных нарушений его гомеостаза в почках возникают ишемические повреждения, которые нередко приводят к развитию острого канальцевого некроза (ОКН) трансплантата в раннем послеоперационном периоде, клинически проявляющегося отсутствием его начальной функции. В патогенезе развития синдрома реперфузии одну из главных ролей играют как циркулирующие биологически активные вещества, такие как хемокины и другие цитокины, эндотелины, молекулы адгезии и др. [146, 165] Поэтому одним из перспективных направлений клинической трансплантологии является применение методов экстракорпоральной гемокоррекции для снижения риска развития отторжения, позволяющих эффективно удалять из сосудистого русла реципиента различные гуморальные факторы, которые могут усугублять ОКН и отторжение органа.

В литературе имеются отдельные сообщения об успешном применении после- и даже интраоперационного плазмафереза (ПА) а также сорбции

цитокинов с целью купирования реперфузионного синдрома в общей популяции пациентов с ХБП [1, 2, 5, 72, 115, 152, 158]. Однако на сегодняшний день, отсутствует опыт применения селективных методов лечения реперфузионного повреждения, таких как селективная сорбция цитокинов, у больных старшей возрастной группы. Вмешавшись в патофизиологический механизм на начальном этапе, сорбция цитокинов может предотвратить в будущем сложные для лечения осложнения. Известно, что повреждение структур почечной паренхимы, развивающееся на этапе кондиционирования донора, консервации, трансплантации и в раннем послеоперационном периоде, в ряде случаев приводят к необратимому склерозу, что значительно ухудшает долгосрочный прогноз функционирования трансплантата. Существующий ныне принцип «old for old» способствует улучшению результатов лечения ХБП в общей популяции больных, однако, компрометирует реципиентов возрастных реципиентов. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования клинического применения сорбции цитокинов после трансплантации почки, у пациентов старших возрастных групп.

Одним из перспективных методов лечения ишемического и реперфузионного повреждения трансплантата является метод селективной сорбции цитокинов (ССЦ), который позволяет удалять из циркулирующей крови про- и противовоспалительные цитокины [15, 16, 170]. Этот метод также показал свою эффективность для снижения тяжести ишемического и реперфузионного повреждения в общей популяции пациентов с ХБП, а также при лечении инфекционных осложнений. Опыт применения данного метода у реципиентов почечного трансплантата старших возрастных групп в настоящее время отсутствует.

Таким образом, несмотря на все достижения в медицине и накопленный клинический опыт в трансплантологии, проблема профилактики и лечения синдрома ишемии/реперфузии остается крайне важной. Это и явилось основанием для проведения данного исследования.

**Цель исследования:** изучить потенциал селективной сорбции цитокинов в снижении тяжести ишемического и реперфузионного повреждения почечного трансплантата у пациентов старших возрастных групп.

**Задачи исследований:**

1. Оценить особенности цитокинового профиля и морфофункциональное состояние мононуклеаров периферической крови у реципиентов почечного аллотрансплантата старших возрастных групп.

2. Изучить влияние селективной сорбции цитокинов на цитокиновый профиль в раннем послеоперационном периоде.

3. Изучить в режиме реального времени качественные и количественные изменения морфометрических и электрокинетических показателей функционального состояния мононуклеаров периферической крови реципиентов почечного аллотрансплантата старших возрастных групп.

4. Изучить влияние селективной сорбции цитокинов на тяжесть ишемического и реперфузионного повреждения, трансплантационной нефропатии, а также частоту и тяжесть кризов отторжения трансплантата на основе данных протокольных биопсий и биопсий по требованию.

5. Оценить эффективность раннего применения селективной сорбции цитокинов по клиническим и лабораторным признакам у больных старших возрастных групп в ближайшем и отдаленном послеоперационных периодах.

**Связь данного исследования с планом научных исследований, проводимых в институте**

Исследование выполнено в рамках научного направления №7 «Создание научно-обоснованных подходов в трансплантологии и регенеративной медицине» и темы научно-исследовательской работы «Разработка и внедрение инновационных селективных фильтрационно-сорбционных методов экстракорпоральной гемокоррекции при трансплантации почки» в хирургическом отделении трансплантации почки ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского».



### **Научная новизна**

Проведено оригинальное клиническое исследование, направленное на оценку эффективности раннего применения селективной сорбции цитокинов в коррекции синдрома ишемии/реперфузии у больных старших возрастных групп.

Впервые проведена комплексная оценка цитокинового профиля и морфофункционального состояния мононуклеаров периферической крови у реципиентов почечного аллотрансплантата старших возрастных групп.

На достаточном клиническом материале впервые проведен сравнительный анализ влияния селективной сорбции цитокинов на цитокиновый профиль в раннем послеоперационном периоде.

Впервые изучены качественные и количественные изменения морфометрических и электрокинетических показателей функционального состояния мононуклеаров периферической крови реципиентов почечного аллотрансплантата старших возрастных групп при стандартной терапии, а также на фоне применения селективной сорбции цитокинов.

Впервые изучено влияние селективной сорбции цитокинов на тяжесть ишемического и реперфузионного повреждения у больных старших возрастных групп на основе данных протокольных биопсий и биопсий по требованию.

Оценена клиническая эффективность раннего применения селективной сорбции цитокинов у больных старших возрастных групп в раннем и позднем послеоперационных периодах.

### **Практическая значимость работы**

Разработан и внедрен в клиническую практику метод коррекции синдрома ишемии/реперфузии у больных старших возрастных групп путем применения селективной сорбции цитокинов (патент РФ на изобретение № 2494686 от 23.05.2012 г.).

Комплексная оценка цитокинового профиля и морфофункционального состояния мононуклеаров периферической крови у реципиентов почечного трансплантата старших возрастных групп позволила оценить нарушения

клеточного иммунного гомеостаза и выявить основные патогенетические звенья, доступные для специфической терапии.

Сравнительный анализ влияния селективной сорбции цитокинов на цитокиновый профиль в раннем послеоперационном периоде позволил патогенетически обосновать эффективность этого метода для коррекции синдрома ишемии/реперфузии почечного аллотрансплантата и определить оптимальную тактику его применения.

Изучение качественных и количественных изменения морфометрических и электрокинетических показателей функционального состояния мононуклеаров периферической крови позволило определить критерии оценки тяжести ишемического и реперфузионного повреждения почечного трансплантата, а также критерии эффективности селективной сорбции цитокинов.

Оценка влияния селективной сорбции цитокинов на тяжесть ишемического и реперфузионного повреждения биопсий в сопоставлении с клинико-лабораторными данными в раннем и отдаленном послеоперационных периодах позволило подтвердить большой практический потенциал этого метода для коррекции ишемического и реперфузионного повреждения трансплантата и улучшения результатов трансплантации почки.

#### **Основные положения, вынесенные на защиту:**

1. У пациентов старших возрастных групп с хронической болезнью почек 5Д стадии отмечаются типичные качественные и количественные изменения морфометрических и электрокинетических показателей морфофункционального состояния мононуклеаров периферической крови, а также цитокинового профиля, которые можно охарактеризовать как хроническая воспалительная реакция на фоне нарушений клеточного звена иммунитета.

2. Применение селективной сорбции цитокинов способствует нормализации цитокинового профиля, популяционного состава лимфоцитов, а также функционального состояния мононуклеаров периферической крови.

3. Раннее применение селективной сорбции цитокинов позволяет улучшить результаты трансплантации почки у больных старших возрастных групп: снизить

тяжесть ишемического и реперфузионного повреждения, риск развития отторжения, тяжесть хронической трансплантационной нефропатии и улучшить функцию трансплантата в ближайшем и отдаленном послеоперационном периодах.

### **Внедрение результатов работы в практику.**

Результаты диссертационной работы внедрены автором в практическую деятельность хирургического отделения трансплантации почки ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

По теме диссертации издано 1 учебно-методическое пособие.

### **Апробация результатов.**

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- XI международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» (Бенидорм, 2012);
- XII международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» (Бенидорм, 2013);
- XIII международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» (Бенидорм, 2014);
- XIV международной конференции «Высокие медицинские технологии XXI века» (Бенидорм, 2015);
- международной конференции, посвященной 100-летию первого плазмафереза «Терапевтический аферез – от истории через настоящее к будущему» (Санкт-Петербург, 2013);
- European renal association and European dialysis transplantation association 50th congress (Стамбул, 2013);
- 31st annual meeting of the international society of blood purification (Болонья, 2013);
- World congress of nephrology (Гонконг, 2013);
- 16th congress of the European society for organ transplantation (Вена, 2013);

- European renal association and European dialysis transplantation association 51th congress (Амстердам, 2014).
- научно-практической конференции Центрального Федерального округа РФ с международным участием «Нефрологические и хирургические проблемы трансплантации почки и диализа» (Москва, 2016);
- 18th congress of the European society for organ transplantation (Барселона, 2017);
- научно-практической конференции Центрального федерального округа РФ «Нефрологические и хирургические проблемы трансплантации почки и диализа» (Домодедово, 2018);
- международной научно-практической конференции Центрального Федерального округа РФ «Актуальные вопросы нефрологии, заместительной почечной терапии и гемафереза» (Тверь, 2018);

Апробация работы состоялась на заседании секции «Терапия» ученого совета ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (протокол № 11 от 21.11.2019 г.).

Работа выполнена на кафедре трансплантологии, нефрологии и искусственных органов факультета усовершенствования врачей ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (заведующий кафедрой профессор А.В. Ватазин).

### **Публикации.**

По теме диссертации опубликовано 24 печатные работы, из них 12 работ в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой кандидата медицинских наук, 1 учебно-методическое пособие, получен 1 патент на изобретения.

### **Объем и структура диссертации.**

Диссертация изложена на 143 страницах компьютерного текста, состоит из: введения, обзора литературы, характеристики больных и описания методов

исследования, а также 2 глав собственных наблюдений, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, содержащего 207 источников, из них - 6 отечественных и 201 – иностранных. Иллюстрирована 39 рисунками, содержит 3 таблицы.

## **ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ПАТОГЕНЕЗЕ И МЕТОДАХ КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.**

Терминальная стадия хронической почечной недостаточности представляет собой важную проблему общественного здравоохранения как в развитых, так и в развивающихся странах. Подсчитано, что в России примерно 11% взрослого населения страдают ХБП I-IV ст. В США примерно 15% взрослого населения страдают ХБП I-V ст. и 8,1 ХБП III-V ст. [140]. В Европе по данным Европейской ассоциации The European Kidney Health Alliance примерно у 10% населения диагностируется та или иная стадия ХБП [176]. Наиболее распространёнными причинами ХБП в странах Северной Америки и Европы считаются диабетическая нефропатия, артериальная гипертензия и гломерулонефрит. В России основной причиной ХБП является гломерулонефрит, пиелонефрит, диабетическая нефропатия. Имеются сложности с классификацией ХБП: до сих пор в разных учреждениях могут пользоваться разными классификациями. В 2002 году для унификации подходов к оценке стадии хронических заболеваний почек в странах Европы и США ассоциациями нефрологов, трансплантологов и врачей гемодиализа — NKF/KDOQI (National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) была принята классификация хронической болезни почек по NRF/ KDOQI, согласно которой выделяют пять стадий ХБП в зависимости от уровня скорости клубочковой фильтрации [74, 82].

ХБП, а особенно V стадия хронической болезни почек, приводят к волевым и электролитным расстройствам, анемии, нарушению костно-минерального обмена, повышению риска сердечно-сосудистых заболеваний и в целом связаны с повышенным риском смерти, увеличением частоты госпитализаций и снижением средней продолжительности жизни [70].

## **1.1. Трансплантация почки как метод заместительной почечной терапии**

Пациентам с ХБП V ст. могут получить различные методы заместительной почечной терапии: гемодиализ, перитонеальный диализ или трансплантацию почки. В настоящее время общепризнано, что именно трансплантация почки обеспечивает наилучшие результаты лечения этой категории пациентов.

В настоящее время ХБП V ст., то есть терминальная почечная недостаточность, наблюдается у 0,1% населения Земли [80]. Достижение терминальной стадии поражения почек приводит к необходимости применения дорогостоящих методов заместительной терапии [3, 38]. Следовательно, хроническая болезнь почек является не только медицинской, но также значимой экономической и социальной проблемой [192].

Несмотря на успешное применение вышеперечисленных методов, методом выбора лечения ХБП V ст. является трансплантация почки [50]. Трансплантация существенно продлевает выживание пациентов и сокращает расходы на здравоохранение [10]. Благодаря использованию новых методов иммуносупрессии, улучшению хирургических методик и посттрансплантационного ухода за больными краткосрочная выживаемость трансплантата значительно повысилась и превысила 90% [31, 44, 75, 78, 117], при этом пятилетняя выживаемость трансплантата также улучшилась и составляет более 70% [4, 6, 43, 73].

Оценка кандидата в реципиенты направлена на определение противопоказаний к трансплантации, к которым относят анатомические особенности и технические сложности, высокий риск периоперационной смерти, активные инфекции, злокачественные новообразования, высокий риск повторного поражения почек (быстро прогрессирующий фокально-сегментарный гломерулосклероз, атипичный гемолитико-уремический синдром, оксалоз и др.). Крайне важна оценка иммунологических рисков (AB0-несовместимость, перекрестная реакция с лимфоцитами донора, высокий уровень реактивных иммуноглобулинов, полная HLA-несовместимость, системные аутоиммунные

заболевания, реакция отторжения трансплантата в анамнезе) для оптимального выбора индукционной и поддерживающей иммуносупрессии [14].

Особую группу реципиентов почки составляют пациенты старшей возрастной группы (более 55 лет), в том числе пожилые пациенты (65 лет и старше). В ряде исследований убедительно доказано, что трансплантация почки у этой возрастной категории значительно превосходит диализ по эффективности, показателям выживаемости, продолжительности и качества жизни [34, 114, 168]. При этом у пациентов старшего возраста выявляется ряд посттрансплантационных проблем, связанных со снижением иммунореактивности (большой риск инфекционных осложнений и новообразований), сопутствующими заболеваниями, а также изменениями фармакокинетики иммуносупрессивных препаратов. Все это обуславливает необходимость особого подхода к иммуносупрессивной терапии [81].

Стандартные медицинские противопоказания к донорству включают в себя снижение фильтрационной функции почек, тяжелую артериальную гипертензию, злокачественные заболевания почек, инфекции, сахарный диабет и др. [14, 161]. Необходимо отметить, что в последние годы наблюдается тенденция к существенному расширению пула доноров за счет изменения критериев пригодности доноров, что позволяет увеличить число трансплантаций и уменьшить число пациентов на диализе [141]. Показано, что использование так субоптимальных доноров позволило практически удвоить объем трансплантаций трупных почек за пятилетний период при удовлетворительных результатах выживаемости трансплантатов [119]. В настоящее время успешно трансплантируются почки от доноров с почечными аномалиями, корригируемыми *ex vivo* [130], почки пожилых доноров (старше 60 лет) [119], с длительной и выраженной артериальной гипертензией [141], с некоторыми злокачественными новообразованиями [121]. Производятся попытки разработки скоринговых моделей для оценки качества почки у доноров с небьющимся сердцем [53].

В недавнем систематическом обзоре, представленном Miret Alomar с соавторами (2017), были определены предикторы сохранения функциональности



почечного трансплантата, среди которых индексы риска доноров, расчет функционального веса почек или оценка массы нефронов, сосудистое сопротивление во время перфузии при гипотермии, измерение биомаркеров в моче и в перфузионной жидкости донора, функциональные и реперфузионные параметры при нормотермии и морфологические параметры (микроскопических и макроскопических) органов-мишеней [136].

Показано, что среднесрочная и долгосрочная выживаемость трансплантата аналогичны при трансплантации почки от донора с сердечной смертью и со смертью мозга [127, 177]. Несмотря на это, почки, полученные от доноров с небьющимся сердцем, более восприимчивы к ишемическому поражению и имеют более высокую частоту отсроченного функционирования трансплантата [171].

Одним из наиболее тяжелых осложнений, во многом определяющим функциональные возможности трансплантированной почки, развитие воспалительной реакции и влияющих на ее выживаемость, является синдром ишемии-реперфузии (ИР-синдром).

## **1.2 Патогенез синдрома ишемии-реперфузии**

Ишемия вносит свой вклад в патофизиологию многих состояний, таких как инфаркт миокарда, периферическая сосудистая недостаточность, инсульт, гиповолемический шок и др. Восстановление нормального кровотока в ишемизированном органе является необходимым условием для предотвращения необратимых повреждений клеток. Реперфузия, в свою очередь, также способна увеличить повреждения сверх тех, которые причинила ишемия [39, 41].

ИР-синдром, или ишемическая / реперфузионная травма является наиболее частым неблагоприятным последствием трансплантации почки и практически неизбежно сопровождает АТП. Механизм, лежащий в основе развития ИР-синдрома, сложный и многофакторный; соответственно, исследования возможностей предупреждения и компенсации последствий ишемии / реперфузии нацелены на разные звенья патогенеза ИР-синдрома. Предотвращение и лечение

ишемии и реперфузии может быть сфокусировано на элиминации активных форм кислорода, уменьшении воспаления, стимулировании регенерации клеток; важное значение имеет консервация донорской почки, ишемическое пре- и посткондиционирование, фармакологическое лечение, клеточная терапия и др. [148, 163].

Патогенез ишемии трупной почки связан с генерализованной гиперактивностью симпатической нервной системы при смерти мозга, нарушением циркуляции при сердечной смерти, а также введением сосудосуживающих препаратов при гипотензии донора. Травма усиливается в процессе холодной консервации и тепловой ишемии. Все это приводит к торможению окислительных процессов, накоплению продуктов метаболизма и истощению АТФ. Реперфузия еще более усугубляет повреждение органа, вызванное ишемией. Реперфузия приводит к реоксигенации и возвращению к аэробному метаболизму, однако, при этом образуются реакционноспособные формы кислорода, которые повреждают цитоскелетные и функциональные компоненты клеток. Защитный эффект антиоксидантных ферментов подавляется быстрым образованием активных форм кислорода, что приводит к повреждению тканей и гибели клеток. Вовремя реперфузии повреждение ткани усугубляется воспалительным ответом, который инициирует каскад негативных клеточных реакций, приводящий к продукции и экспрессии воспалительных цитокинов, хемокинов и компонентов комплемента, что приводит к миграции и активации лейкоцитов. Длительно протекающая воспалительная реакция в ткани трансплантата приводит к развитию интерстициального фиброза, что влияет на долгосрочные результаты трансплантации. Выраженная воспалительная реакция, возникающая после ИР-синдрома, может в дальнейшем приобретать системный характер и/или приводить к полиорганной недостаточности [148, 165, 204].

Ишемическая / реперфузионная травма влияет как на краткосрочные последствия, так и на долгосрочный результат трансплантации. Клинически ИР-синдром проявляется задержкой функции трансплантата, отторжением трансплантата, хронической дисфункцией трансплантата [165].

### 1.2.1. Последствия ишемии в клетках

Длительная ишемия трансплантата сопровождается различными ультраструктурными изменениями и нарушением клеточного метаболизма. Вызванное ишемией снижение окислительного фосфорилирования в клетках ведет к неспособности их ресинтезировать энергетические фосфаты, такие как АТФ и креатинфосфат. В результате функция АТФ-зависимых ионных каналов клеточной мембраны изменяется, нарушается ионный баланс, ионы Са, Na и вода поступают в клетку в избыточном количестве. Эти процессы приводят к клеточному отеку, а увеличение внутриклеточной концентрации Са способствует образованию мочевой кислоты и пирофосфата кальция, что индуцирует активацию фосфолипаз и протеаз, в частности, кальпаинов и каспаз, запускающих апоптоз [104].

Мочевая кислота принадлежит к группе так называемых опасных сигнальных молекул. В макрофагах и нейтрофилах они могут связываться с внутриклеточными белковыми комплексами инфламмасомами, опосредующими увеличение продукции и секреции интерлейкина 1(ИЛ-1), а следовательно, провоцирующими развитие воспалительной реакции [128].

Снижение АТФ ведет к набуханию митохондрий и, как следствие, к высвобождению из них цитохрома С, который активирует апоптотический сигнальный путь с участием каспаз 1 и 9. Эти события, помимо активации запрограммированной клеточной смерти, ведут к индукции системного воспалительного ответа посредством выработки ИЛ-1 [122].

На уровне эндотелия ишемия способствует экспрессии генов некоторых провоспалительных и биологически-активных компонентов, таких как молекулы адгезии лейкоцитов, эндотелин, тромбоксан А<sub>2</sub>, в то время как экспрессия генов защитных молекул, таких как оксид азота, тромбомодулин, простациклин, напротив, подавляется [27, 129].

Таким образом, ишемия способствует прогрессированию провоспалительного процесса, что увеличивает восприимчивость тканей к повреждениям, обусловленным последующей реперфузией.

### 1.2.2. Роль активных форм кислорода

Результатом реперфузии ишемизированных тканей является образование токсических активных форм кислорода (АФК), таких как супероксид-анион ( $\bullet\text{O}_2^{2-}$ ), гидроксил-радикал ( $\bullet\text{OH}$ ), перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ), хлорноватистая кислота ( $\text{HOCl}$ ). Во время ишемии клеточный АТФ распадается с образованием гипоксантина. В норме, гипоксантин окисляется до ксантина (а далее до мочевой кислоты) ксантиндегидрогеназой (КДГ), для которой он является субстратом.

В неишемизированных клетках КДГ использует никотинамид-адениндинуклеотид ( $\text{NAD}^+$ ) вместо молекулярного кислорода в качестве акцептора электронов в реакции преобразования  $\text{NAD}^+$  в  $\text{NADH}$ . Однако во время ишемии КДГ превращается в ксантиноксидазу, не способную катализировать превращение гипоксантина, что приводит к его накоплению в клетках. После восстановления кровотока электроны переносятся не к  $\text{NAD}^+$ , а к молекулярному кислороду, вследствие чего происходит формирование АФК, которые являются сильными окислителями и восстановителями и оказывают непосредственное повреждающее действие на клеточные мембраны путем перекисного окисления липидов [181].

Кроме того, АФК стимулируют активацию лейкоцитов и хемотаксис посредством фосфолипазы А2 плазматической мембраны с образованием арахидоновой кислоты – предшественника синтеза эйкозаноидов (тромбоксана А<sub>2</sub>, лейкотриенов). АФК также повышают экспрессию генов молекул адгезии лейкоцитов и цитокинов путем активации транскрипционного ядерного фактора NF-κB (nuclearfactor) [180]. В частности, АФК, особенно производные перекиси водорода, через MAP-киназы активируют NF-κB, тем самым способствуя

выработке фактора некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа) – активного медиатора воспаления [132].

Таким образом, в условиях ишемии-реперфузии АФК, помимо прямого повреждающего действия на клетки, повышают активность лейкоцитов, вызывают их хемотаксис и адгезию к эндотелию.

### 1.2.3. Роль системы комплемента

Система комплемента обеспечивает врожденный иммунитет человеческого организма и играет важную роль в процессах воспаления в посттрансплантационном периоде. Активация системы комплемента может происходить с помощью классического, альтернативного или лектинового пути, в результате чего образуются анафилатоксины C3a и C5a, обладающие широким спектром иммунных функций, а также сборка конечного комплементарного каскада, способного к прямому лизису клеток. Показано, что альтернативный путь усиливает активацию комплемента независимо от путей инициации [28]. Важно, что наличие анти-HLA-антител реципиента, фиксирующих комплемент, более опасно в аспекте негативного исхода для трансплантата по сравнению с неспецифичными по отношению к комплементу антителами [108, 111].

ИР-синдром всегда сопровождается активацией системы комплемента, компоненты которого осаждаются вдоль базальной мембраны трубчатого эпителия [32, 162]. Наиболее значимыми из них являются C3a, C5a и компоненты комплемента iC3b и C5b-9. Самым мощным из них считается компонент C5a. Его активность превышает действие C3a более чем в 20 раз. C5a стимулирует активацию лейкоцитов и хемотаксис, усиливает воспалительный ответ путем увеличения синтеза целого ряда провоспалительных цитокинов: Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1), ФНО-альфа, ИЛ-1, ИЛ-6 и др. [40, 49].

Компоненты C5b-9 и iC3b способствуют изменению сосудистого гомеостаза. Так, iC3b образуется после расщепления C3b и является специфическим лигандом для адгезии лейкоцитов к сосудистому эндотелию с

помощью бета-2-интегринов. C5b-9 активирует ядерный фактор NF- $\kappa$ B в эндотелиальных клетках, увеличивая, таким образом, продукцию молекул адгезии лейкоцитов, к которым относятся vascular cell adhesion molecule (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-селектин и P-селектин. Кроме того, C5b-9 также способствует активации лейкоцитов и хемотаксиса, индуцируя секрецию эндотелиального ИЛ-8 и MCP-1. В конечном итоге этот компонент системы комплемента может изменить тонус сосудов, ингибируя эндотелий-зависимую релаксацию и снижая содержание циклического гуанозинмонофосфата в эндотелии, что еще в большей степени усугубляет ишемизацию органа [32, 59, 103].

Активация системы комплемента при ИР-синдроме может приводить к развитию острого почечного повреждения [207]. На животных моделях показано, что активация комплемента приводит к снижению экспрессии фактора Klotho в дистальных почечных канальцах, что также играет роль в развитии дисфункции трансплантата [29].

#### 1.2.4. Роль лейкоцитов

Лейкоциты взаимодействуют с сосудистым эндотелием посредством нескольких этапов: “rolling” лейкоцитов вдоль эндотелия, фиксация лейкоцитов к эндотелию, трансмиграция через эндотелий (рисунок 1). Первый шаг инициируется увеличением экспрессии P-селектинов на поверхности эндотелия, что является следствием И-Р-синдрома. P-селектины взаимодействуют со своими ко-рецепторами P-selectin glycoprotein 1, находящимися на поверхности лейкоцитов. Исходно низкая аффинность данных рецепторов приводит к прерывистому связыванию лейкоцитов с эндотелием, называемому “rolling”. Последующее взаимодействие бета-2-интегринов лейкоцитов, таких как Mac-1, с ICAM-1 молекулами эндотелия способствует плотной фиксации лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и прекращению их движения. Последующую миграцию лейкоцитов в почечный интерстиций облегчают platelet–endothelial cell adhesion

molecule 1(PECAM-1), которые постоянно экспрессируются на уровне межклеточных соединений эндотелия. Достигнув внесосудистого пространства, активированные лейкоциты выделяют токсичные АФК, протеазы и эластазы, которые способствуют повышенной проницаемости стенок капилляров, отеку, тромбозу и гибели паренхиматозных клеток.

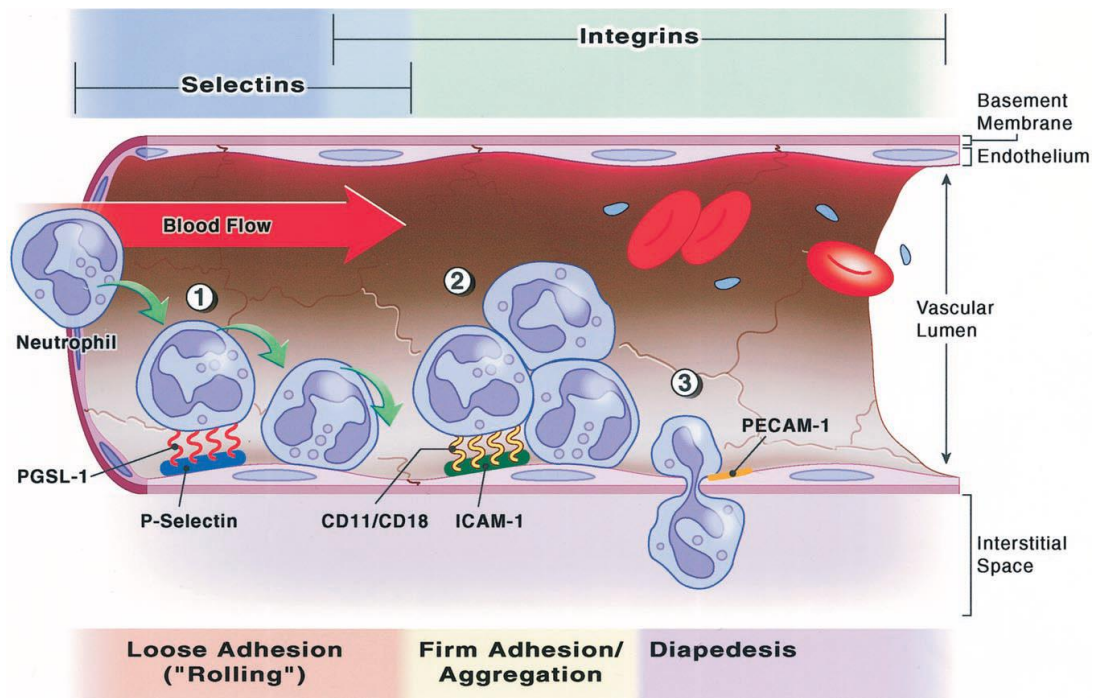


Рисунок 1. Схема лейкоцитарно-клеточной адгезии и трансмиграции лейкоцитов в условиях ИР-синдрома [39]

При ИР-синдроме описаны фенотипические и функциональные изменения в популяции почечных мононуклеарных фагоцитов [98]. В работе Snelgrove с соавторами (2017) почечные мононуклеарные фагоциты изучались через 24 и 72 часа после получасовой почечной ишемии или фиктивной операции в мышинной модели. Фенотипы популяций лейкоцитов анализировали с помощью проточной цитометрии. Было выявлено, что ишемическая реперфузионная травма вызвала миграцию моноцитов, дендритных клеток (ДК), макрофагов и нейтрофилов в почки. Классификация субпопуляций мононуклеаров на основе экспрессии CD11b / CD11c показала, что при ИР-синдроме они представлены преимущественно моноцитарными воспалительными дендритными клетками. Кроме того,

ишемическая / реперфузионная травма также способствовала ДК-зависимому перекрестному представлению почечных антигенов в CD8 Т-клетки в лимфатическом узле. Таким образом, при ИР-синдроме происходит почечная функциональная активация ДК с увеличением способности к активированию антигенспецифических CD8 Т-клетки в лимфоидной ткани [173].

#### 1.2.5. Роль лимфоцитов в патогенезе ИР-синдрома

Ранее считалось, что Т- и В-лимфоциты не играют важной роли в патогенезе ИР-синдрома, однако последние данные, полученные в результате исследования на животных моделях, оспаривают эту точку зрения [84].

Естественные киллеры (ЕК) – важный компонент врожденного иммунитета. Их вклад в развитие ИР-синдрома почек, по-прежнему, не определен до конца. Между тем, в одном из недавних исследований было показано, что ЕК могут оказывать повреждающее действие непосредственно на тубулярные эпителиальные клетки после ИР-синдрома. Более того, снижение числа ЕК в опытах на мышах имело защитный эффект [203].

Естественные киллерные Т-клетки (ЕКТ-клетки) – уникальная популяция, являющаяся промежуточным звеном между врожденным и приобретенным иммунитетом. ЕКТ-клетки обладают иммунорегуляторными функциями за счет продукции Т-хелперных цитокинов, активации эффекторных клеток, таких как ЕК, макрофаги, дендритные клетки, CD4+ и CD8+-лимфоциты, а также за счет непосредственного цитолитического действия [98, 133]. Скопление ЕКТ-клеток было обнаружено в постишемической почке через 3 часа после включения почки в кровотоки. Однако спустя 24 часа их число уменьшалось [8]. Ингибирование активации ЕКТ-клеток или уменьшение их количества сопровождалось снижением интенсивности проявления ИР-синдрома и ассоциировалось со сниженным уровнем интерферона-гамма (ИФН-гамма), продуцируемого нейтрофилами в почке. Это дало повод предположить, что ЕКТ-клетки



способствуют раннему повреждению почек за счет влияния на продукцию нейтрофилами ИФН-гамма [118].

Роль Т-лимфоцитов, а особенно CD4+клеток, в ишемическом повреждении почек было продемонстрировано рядом исследований [52]. Линии мышей, лишенных CD4+лимфоцитов (но не CD8+), были более защищены от ИР-синдрома, в то время как введение CD4+-клеток сопровождалось ранними постишемическими изменениями [25]. Патогенетический эффект в данном случае связывали с ИФН-гамма, вырабатываемым CD4-Т-лимфоцитами. Однако более детальные исследования на животных позволили предположить, что только CD4+лимфоциты с фенотипом Th1 являются патогенными для ИР-синдрома, в то время как, клетки фенотипа Th2 обладают протективными свойствами. Дефицит Signal Transducer and Activator of Transcription protein family-4 (STAT-4 - фермент регуляции Th1) приводил к восстановлению почечных функций после ИР-синдрома. Роль CD4+клеток в патогенезе ранних почечных повреждений после ИР-синдрома убедительно подтверждена работами S.Wang, et al. (2008), демонстрирующими, что инактивирование ИЛ-16 (хемоаттрактанта Т-лимфоцитов, интенсивно экспрессирующегося в почечных канальцах после ИР-синдрома, приводило к сохранению почек и снижению миграции Т-лимфоцитов) [191], через 6 недель после ИР-синдрома в постишемической почке числа активированных Т-лимфоцитов и эффекторных Т-клеток памяти, подтверждая, участие Т-клеток в отдаленных структурных изменениях постишемической почки [9].

Th-2 фенотип CD4+клеток, как было отмечено ранее, обладает защитной функцией для почек после И-Р. Дефицит Signal Transducer and Activator of Transcription protein family – 6 (STAT-6) (сигнальные молекулы, регулирующие функцию Th-2-лимфоцитов) усугублял структурные и функциональные изменения почек после И-Р на животных моделях. Так, у мышей с дефицитом ИЛ-4 были выявлены повреждения в той же степени, что и у мышей с дефицитом STAT6. Данный факт свидетельствует, что ИЛ-4 также принимает важное участие в STAT6-опосредованной защите почек после ИР-синдрома [200].

В последние годы пристальное внимание уделяется роли регуляторных Т-клеток (Трег) в патогенезе ИР-синдрома. Известно, что Трег подавляют чрезмерный иммунный ответ и являются потенциальными терапевтическими мишенями при отторжении трансплантата. Функции Трег (CD4+, CD25+, Foxp3+) и экспрессия ими хемокинового рецептора CXCR3 были проанализированы в мышинной модели ранней стадии И-Р. Было показано, что количество Трег значительно увеличивается через 72 часа после реперфузии. Напротив, прекондиционное введение моноклональных антител к CD25 PC61 приводило к уменьшению уровня Трег и усугублению повреждения почек. У мышей с неповрежденными почками Трег практически не экспрессировали CXCR3, тогда как количество CXCR3+ Трег значительно увеличивалось через 72 часа после реперфузии и обратно коррелировало с концентрацией мочевины, креатинина и гистологической картиной повреждения почек. Следовательно, восстановление функционирования почки связано с миграцией Трег, и важную роль в этом процессе играет экспрессия CXCR3 [91].

В другом исследовании было выявлено, что супрессия CD4 + CD25 + CD127lo / и CD4 + CD127lo / - TNFR2 (рецептор к фактору некроза опухолей)+ Трег является предиктором острого почечного повреждения при ИР-синдроме. Экспрессия TNFR2 + на CD4 + CD127lo / - Т-клетках коррелировала с подавлением функцией клеток Трег ( $r = 0,63$ ,  $p < 0,01$ ), что позволило авторам использовать их как суррогатный маркер иммунного статуса реципиента и определения вероятности развития дисфункции трансплантата [139].

Роль В-лимфоцитов в патогенезе синдрома ИР-синдрома практически не установлена. Имеются результаты, показывающие, что дефицит В-клеток обеспечивает защиту почек в ранней фазе синдрома. Кроме того, недавно было обнаружено увеличение В-клеток в постишемической почке и их дифференциация в течение восстановительной фазы ИР-синдрома, что дает основание считать, что В-клетки, вероятно, участвуют в восстановлении почки. Тем не менее, более конкретную роль В-клеток в патогенезе ИР-синдрома еще предстоит выяснить [26, 88].

### 1.2.6. Роль цитокинов и хемокинов

Известно, что ИР-синдром характеризуется выраженной воспалительной реакцией, приводя к повреждению тканей почек. При этом отмечается повышенный синтез хемокинов и провоспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-альфа и др., указывающий на то, что данные молекулы играют одну из ведущих ролей в патогенезе синдрома [22, 179]. Ишемия почек сама по себе является стимулом к выработке ИЛ-1, а С5а компонент системы комплемента активизирует выработку хемокина MCP-1 и цитокинов ФНО-альфа, ИЛ-1, ИЛ-6.

Так, ИЛ-1 индуцирует экспрессию молекул адгезии на клетках эндотелия, тем самым способствуя клеточной инфильтрации. Кроме того, он стимулирует выработку простагландинов путем повышения экспрессии циклооксигеназы, и увеличивает количество циркулирующих нейтрофилов и тромбоцитов. Наконец, ИЛ-1 может стимулировать эпителиальные клетки канальцев к выработке других медиаторов воспаления, таких как ФНО-альфа и ИЛ-6 [47].

Конечным результатом многих процессов вовлеченных в воспалительную реакцию ИР-синдрома является активация транскрипционного фактора NF-κB: АФК, С5b активируют NF-κB, тем самым увеличивая уровень цитокинов в зоне воспаления.

Одним из важных посредников активации NF-κB - Toll-подобные рецепторы. Иммунная система человека имеет несколько механизмов распознавания патогенов, так известны Toll-подобные рецепторы, связываясь с чужеродным агентом вызывают иммунный ответ, направленный на элиминацию агента. Те же самые рецепторы узнают поврежденные клетки собственного организма и эндогенные лиганды [39, 41, 154]. Замечено, что экспрессия Toll-подобных рецепторов эпителиальными клетками канальцев почек увеличивается в ответ на ИР-синдром [100]. После развития ИР-синдрома Toll-подобные рецепторы реагируют на белки, структура которых была повреждена в ходе ишемии. В конечном итоге стимуляция Toll-подобных рецепторов приводит к

увеличению секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов через активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [164].

Транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B играет ключевую роль в возникновении воспалительной реакции, он активируется, когда клетка находится в состоянии стресса, что и наблюдается при ИР-синдроме, или при уже имеющем место воспалении. Результатом его включения является активация и синтез из таких провоспалительных факторов, как ИЛ-1, ФНО-альфа, ИФН-гамма и ряда хемокинов, (ИЛ-8, MCP-1, RANTES, потенцирующих воспалительную реакцию). В процессе активации и адгезии участвуют такие молекулы, как leukocyte function associated antigen-1 (LFA-1), ICAM-1. Этот процесс сопровождается инфильтрацией лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и гранулоцитов в поврежденные ткани. Клеточная инфильтрация вместе с усиленным образованием медиаторов воспаления усугубляют интерстициальный отек воспаленной ткани [122].

Впрочем, не только местная выработка цитокинов и хемокинов после ИР-синдрома может привести к повреждению трансплантата, но и цитокины, циркулирующие в крови донора. Системному воспалительному ответу у донора способствует смерть мозга и цитокины. Такой «цитокиновый шторм» ухудшает функцию органа и приводит к более выраженному отторжению трансплантата и снижению его долгосрочной функции [12, 94]. Значение подобных эффектов подчеркивается в экспериментах, демонстрирующих вредное влияние коры головного мозга на долгосрочные перспективы (даже когда холодная ишемия была ликвидирована) [149, 151, 188].

Если устранить воспаление, то можно предотвратить грозные последствия ИР-синдрома, однако, если воспалительный ответ не удастся разрешить, то воспаление может стать хроническим и привести к ремоделированию ткани. К фиброзу органа и потери его функций и, соответственно, к несостоятельности трансплантата. Фиброз с накоплением внеклеточного матрикса является поздним неспецифическим результатом ИР-синдрома. Тем не менее, нарушение

внеклеточного матрикса также способствует и острому повреждению тканей после ИР-синдрома [71].

### 1.2.7 Роль повреждения тубулярных эпителиальных клеток и эндотелиальной дисфункции

В исследованиях *in vivo* было показано, что в активации иммунных механизмов воспаления при ИР-синдроме (в частности, активации комплемента) пусковым фактором является дисфункция эндотелия [17, 42]. У крыс с индуцированной ишемией / реперфузией протекция эндотелия специфическим белком значительно улучшает функцию почек, что проявляется снижением креатинина сыворотки ( $p < 0,05$ ), а также ингибирует продукцию С3 ( $p < 0,05$ ) [153]. Другим механизмом эндотелиальной дисфункции при ишемическом повреждении является активация NO-синтазы (нитрит-редуктазы), которая ингибирует защитные нитрит-зависимые механизмы при ИР-синдроме [135].

С другой стороны, если на ранних стадиях ишемии основное значение имеют антиангиогенные механизмы, то на поздних стадиях гипоксия может активировать ангиогенные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), индуцированный гипоксией фактор HIF-1 $\alpha$ , что может стабилизировать микроциркуляцию и нивелировать отрицательные эффекты ишемизации [145].

Центральной мишенью ИР травмы являются клетки эпителия почечных канальцев. Патофизиологическим механизмом тубулярного повреждения, как и эндотелиальной дисфункции, является окислительный стресс. Показано влияние ИР-синдрома на метаболизм клеток проксимального канальцевого эпителия, обсуждается роль его воздействия на экспрессию и активность мембранных транспортеров, а также временная модуляция транспортеров в периоды ишемии и реперфузии [11]. Кроме непосредственных последствий повреждения (ОКН) в виде канальцевой дисфункции, повреждение тубулярного эпителия приводит к иммунной активации [174, 175].

### 1.2.8. Особенности иммунологического статуса у пожилых лиц

Средний возраст населения планеты с каждым годом увеличивается на 0,67 лет, что приводит к увеличению числа лиц с хроническими заболеваниями, в том числе и с хронической болезнью почек.

Согласно возрастной периодизации, принятой ВОЗ, в группу пожилого возраста относятся мужчины 60-74 лет и женщины 55-74 лет, к группе старческого возраста относятся лица 75 лет и старше. По данным TNHNES (The Third National Health and Nutrition Examination Survey), в США у лиц старше 70 лет ХБП имеется в 37,8% случаев, при этом терминальная стадия ХБП чаще встречается у лиц старше 65 лет вне зависимости от пола. За последние 10 лет отмечен неуклонный рост пациентов старше 65 лет, нуждающихся в трансплантации почки или реципиентов трансплантата. В настоящее время лица данной возрастной категории составляют около 20% пациентов, ожидающих трансплантацию почки, и около 18% реципиентов органа от посмертных доноров [50, 186]. Увеличение продолжительности жизни неизбежно приводит к росту пожилых пациентов с ХБП. При этом трансплантация может стать рутинным методом заместительной почечной терапии для пациентов пожилого возраста. Тем более что продолжительность жизни пациентов после трансплантации почки, включая реципиентов почек от доноров с расширенными критериями, дольше, чем лиц, находящихся на диализе [156].

Другая сторона проблемы: на основе многофакторного анализа сотрудниками Московского городского центра трансплантации почки ГКБ №7 и отделения гемодиализа с пересадкой почки ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского разработаны и внедрены критерии понятия "маргинальный донор": возраст донора 60-72 лет; сопутствующие заболевания (сахарный диабет II типа, гипертоническая болезнь); уровень сывороточного креатинина, превышающий 200 мкмоль/л (200 - 300 мкмоль/л); уровень инотропной поддержки допамином более 10 мкг/кг/мин (10-30 мкг/кг/мин); смерть донора от черепно-мозговой травмы, осложненной травматическим и/или геморрагическим

шоком; смерть донора от сочетанной травмы. Как видно из приведенных критериев, у таких доноров изначально могут иметь место нарушения почечных функций, что может негативно сказаться на выживаемости трансплантированного органа у реципиента. [5].

Таким образом, учитывая прогрессирующее старение населения и увеличение средней продолжительности жизни, вопросы трансплантации почки пожилым пациентам или от пожилых пациентов становятся все более актуальными. Трансплантация у пожилых сопряжена с рядом проблем. Выживаемость как трансплантата, так и пациента снижена по сравнению с таковыми у молодых: для лиц в возрасте 30-49 лет выживаемость реципиента с органом от посмертного донора составляет 75%, тогда как для лиц старше 65 лет – 61% [101]. Кроме того, у пожилых реципиентов отмечено большее число инфекционных осложнений. В результате, особо важным является изучение возрастных изменений в иммунной системе и определение адекватной иммуносупрессии для предотвращения отторжения трансплантата и минимизация побочных эффектов, связанных с проведением иммуносупрессивной терапии [45, 168].

Возникает вопрос, какое влияние оказывает ассоциированные с возрастом иммунные изменения на риск отторжения трансплантата. По данному вопросу существуют спорные данные. Согласно одним исследованиям частота острых отторжений уменьшается с увеличением возраста реципиента, в то время как увеличение возраста донора сопряжено с увеличенным риском отторжения [183]. Согласно другим – аллореактивность более выражена у пожилых реципиентов [150]. Риск осложнений значимо выше в группе пожилых реципиентов по сравнению с молодыми: отсроченная функция трансплантата в исследовании крупного центра наблюдалась у 6,3% пациентов молодого возраста и у 13,5% пациентов старшей возрастной группы ( $p < 0,001$ ). Анализ общей выживаемости показал, что 1,6% пациентов в молодой возрастной группе и 6,8% пациентов в пожилых группах умерли в течение 10 лет ( $p = 0,003$ ) [143].

Есть работы, показавшие, что острое отторжение трансплантата в первые 6 месяцев наблюдений развивается реже у пожилых реципиентов по сравнению с молодыми вне зависимости от того, являлся ли донор посмертным или прижизненным. В то же время, некоторые исследователи обнаружили, что у пожилых реципиентов, получивших почку от доноров старше 65 лет, риск отторжения был выше независимо от HLA-совместимости [60]. Следует отметить, что чаще в литературе встречается утверждение, что ранняя выживаемость пациента и трансплантата у пожилых сопоставима с таковой у молодых пациентов, однако, по-видимому, риск отдаленной летальности у пожилых лиц выше, чем у молодых (в связи с ассоциированными со старением сопутствующими заболеваниями) [58]. В то же время, в исследованиях, посвященных АТПП пожилым донорам (старше 65 лет), при множественном логистическом регрессионном анализе была показана худшая начальная функция трансплантата и более частые реакции острого отторжения, особенно при трансплантации почек пожилых доноров по сравнению с молодыми донорами (отношение шансов (ОШ) 10,43 [95% доверительный интервал (95% ДИ) 5,75-18,91] и ОШ 2,78 [95% ДИ 1,35-5,73] соответственно). В регрессионном анализе Кокса у пожилых реципиентов, получивших почки от пожилых доноров с небьющимся сердцем, риск смерти через 5 лет был выше, чем у пожилых реципиентов, получивших почки от молодых доноров со смертью головного мозга (ОШ 1,86, 95% ДИ, 1,15-3,02). Пожилые реципиенты «пожилых» почек имели 5-летнюю смертность, сопоставимую с пожилыми пациентами, получающими диализ. Таким образом, на выживаемость оказывает влияние как возраст донора, так и реципиента [147].

Многие исследователи показали, что в процессе старения происходят заметные изменения в функционировании иммунной системы, в том числе повышение восприимчивости к инфекциям, снижение иммунологической реактивности, повышение риска малигнизации и нарушение заживления тканей [55, 125]. Показана, но не до конца изучена роль этих изменений при трансплантации [166, 169], понимание возрастных преобразований иммунной



системы может помочь врачам рассмотреть индивидуальный подход к подбору адекватной иммуносупрессивной терапии, чтобы избежать необоснованной иммуносупрессии [168].

При подробном изучении возрастных аспектов «иммунологического старения» («Immunosenescence») были выявлены изменения практически всех составляющих иммунного статуса человека. Изменения касаются, в первую очередь, антигенпредставляющих клеток (активированных макрофагов и дендритных клеток. Наблюдается снижение миграционной способности нейтрофилов. Во время старения макрофаги значительно уменьшают продукцию цитокинов, таких как ФНО- $\alpha$  и ИЛ-6, а также отмечено снижение экспрессии рецептора В7, активирующего Т-клетки [62].

Дендритные клетки пожилых проявляют глубокие признаки митохондриальной дисфункции, снижение АТФ-зависимых реакций, снижение исходного окислительного фосфорилирования, уменьшение протонов и реактивных форм кислорода [37]. ДК пожилых выделяют повышенное количество провоспалительных цитокинов и демонстрируют снижение выделения противовоспалительных и иммуномодулирующих цитокинов. Это может способствовать как хроническому воспалению, так и потере толерантности. В совокупности эти изменения способствуют иммунной дисфункции и воспалению у пожилых людей [7].

Также у пожилых наблюдаются изменения в клеточной популяции ЕК, которые сопровождаются снижением реактивности, замедлением разрешения воспалительных реакций и увеличением инфекционной заболеваемости. Во время старения происходит перераспределение подмножеств ЕК-клеток, что показано уменьшением клеток CD56<sup>+</sup> и увеличением CD56-CD16<sup>+</sup>. Это сопровождается снижением секреции IFN- $\gamma$ . Кроме этого, отмечаются изменения в соотношении TH17/Трег клеток с выраженным снижением Трег [62, 167].

Старение влияет на развитие и функционирование нескольких клеточных субпопуляций, затрагивая как врожденный, так и приобретенный иммунитет (Т- и В-клетки). Доказательством дисфункции иммунного ответа, ассоциированного с

возрастом, служат исследования, демонстрирующие нарушение Т- и В-клеточного ответа при распознавании новых антигенов у пожилых, в результате чего снижается ответ на вакцинацию и собственно ее эффект [109, 195].

Так, известно, что дефицит Т-клеточного иммунитета считается основным иммунным нарушением у гериатрического контингента [134]. Старение вызывает инволюцию тимуса, значительное уменьшение количества Т-лимфоцитов, сокращение их жизненного цикла, блокирование стимулов для образования новых клеток. Снижается пролиферативная активность Т-лимфоцитов в ответ на индукцию митогенов, (что коррелирует со снижением синтеза ИЛ-2). Несмотря на накопление с возрастом Т-клеток памяти, распознающих и уничтожающих ранее встречающихся с организмом патогены, их репертуар становится уже при старении [198]. В результате, формируется дефектный Т-клеточный иммунитет, играющий важную роль в отторжении трансплантата [46].

Антитело-опосредованное отторжение является частой причиной отсроченной потери почечного трансплантата. По мере старения происходит нарушение антительного иммунного ответа, что связано со снижением В-клеточного лимфопозза и ослаблением влияния CD4<sup>+</sup> Т-клеток, необходимого для нормального опосредованного В-клетками антителообразования. Интересно, что функция CD4<sup>+</sup> Т-клеток может быть восстановлена добавлением ИЛ-2 [131]. Кроме того, иммунная функция пожилых людей ослабляется из-за истощения наивных Т-клеток (CD95<sup>-</sup>), которые заменяются клональным увеличением пула CD28-Т-клеток [189].

С возрастом развивается нарушение продукции ряда цитокинов, в том числе ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО-альфа. Лейкоциты пожилых людей продуцируют большее количество этих медиаторов после индукции липополисахаридом [160], чем лейкоциты молодых. Довольно интересны работы по оценке продукции ИЛ-6. Данный цитокин был назван “цитокином старения” (‘gerontologist cytokine’), так как при старении отмечается его увеличение [57]. Ранние исследователи поддерживали эту концепцию, оценка иммунного статуса здоровых лиц показала, что изменения, о которых говорилось ранее, могли быть отражением

воспалительного процесса, часто встречаемого у пожилых лиц, а не самого по себе старения. У 75% обследованных старших возрастных групп не было обнаружено никаких изменений в продукции ИЛ-6, остальные равномерно распределились между ее увеличением и уменьшением. Отсутствие связанных с возрастом изменений наблюдалось и при оценке уровня продукции ИЛ-10 [66]. Таким образом, вероятно, при обычных условиях уровень данных цитокинов с возрастом не меняется, но при стимуляции липополисахаридом продукция их лейкоцитами и моноцитами возрастает, что может объяснить повышенный воспалительный статус пожилых пациентов [189].

Дополнительный вклад в нарушение функций лимфоцитов вносит укорочение теломер в клетках, что в дальнейшем усугубляет иммунологическую дисфункцию у пожилых людей [144].

Установленные изменения в дифференцировке и функциях гемопоэтических стволовых клеток. В частности, утверждается, что старение уменьшает количество предшественников стволовых клеток, что также приводит к снижению способности организма обеспечивать адекватный иммунный ответ. Остаются до конца непонятными механизмы блокирования стимуляции костного мозга у пациентов пожилого и старческого возраста [36].

Таким образом, вышесказанное диктует необходимость дальнейших исследований иммунологических особенностей у пожилых пациентов с целью определения эффективного терапевтического лечения и подбора иммуносупрессивной терапии у данной группы пациентов. В настоящее время отсутствуют четкие клинические рекомендации по иммуносупрессии у пожилых пациентов после трансплантации, несомненно, этот аспект требует дальнейшего изучения [114]. Вероятно, большой потенциал имеет разработка методов коррекции иммунных реакций с участием селективной экстракорпоральной сорбции.

### **1.3. Профилактика и лечение синдрома Ишемии-реперфузии**

Основные негативные последствия почечной ишемии-реперфузии - первичное нефункционирование трансплантата и развивающаяся хроническая дисфункция постепенно приводят к возвращению пациента к диализу. Эти побочные эффекты более выражены в группе доноров с расширенными критериями отбора, так как их почки более чувствительны к повреждениям после ИР-синдрома. Золотым стандартом при трансплантации почки остается холодовая консервация органа в специальных растворах, однако, это не в состоянии полностью защитить орган в случаях доноров с расширенными критериями отбора или после остановки сердца. Тем самым подчеркивается актуальность разработок новых стратегий для улучшения сохранения и восстановления трансплантата [21].

#### **1.3.1 Реанимационные мероприятия у донора**

Эффективный контроль состояния потенциальных доноров в отделении интенсивной терапии повышает пригодность органов для трансплантации [172]. Существуют различные подходы, для того чтобы уменьшить патологическое воздействие смерти мозга на почки [193].

Смерть мозга вызывает каскад гормональных изменений, таких как изменение уровня катехоламинов, которые приводят к нарушению иннервации сосудов и гемодинамическим изменениям - гипотонии и органной гипоперфузии. Гипотензия требует адекватного фармакологического вмешательства. Хотя экзогенные катехоламины эффективно используются в борьбе с гемодинамическими изменениями, некоторые из них оказывают влияние на функцию трансплантата [149, 151]. Было установлено, что борьба с сосудистой дисфункцией с помощью допамина снижала риск отсроченной функции трансплантата, в то время как использование норадреналина этот риск

увеличивало [69]. Таким образом, выбор вазоактивного препарата оказывает влияние на результат трансплантации [155].

Кроме того, смерть мозга ассоциирована с высвобождением провоспалительных цитокинов: ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 [67]. Гипоперфузия и воспалительная реакция оказывают повреждающее действие на трансплантат еще до развития ИР-синдрома, что потенциально может объяснять низкий уровень выживаемости трансплантатов, полученных от доноров, перенесших смерть мозга, по сравнению с живыми донорами [23].

Было показано, что применение низкомолекулярного гидроксиэтилкрахмала более благоприятно, чем применение высокомолекулярного [19]. Исследование почек, изъятие которых производилось в течение 24 часов после смерти мозга, показало негативное влияние применения адреналина, маннитола, десмопрессина [20]. Последующие исследования показали влияние проводимой у донора терапии на результаты трансплантации [48].

### 1.3.2 Ишемическое прекондиционирование

Другая протективная техника ишемическое прекондиционирование донора – которая заключается в применении коротких циклов ишемии-реперфузии до изъятия органа с целью повышения его толерантности к ишемии. Однако пережатие непосредственного почечной ножки приводит к неоднозначным результатам.

Известен метод, называемый дистанционное ишемическое прекондиционирование, который заключается в проведении кратких циклов ишемии-реперфузии конечностей с использованием манжеты для измерения кровяного давления [35, 68, 83].

Хотя данный метод ранее не применяли для трансплантации, ряд клинических исследований продемонстрировал снижение почечного повреждения у пациентов, перенесших плановую операцию на сердце, с предварительным проведением прекондиционирования по данной методике [206].

Исследования показали, что двустороннее наложение манжет оказывает более выраженный защитный эффект от ИР-синдрома по сравнению с односторонним. Авторы сделали вывод, что масса ткани, использованная для дистанционного ишемического прекондиционирования имеет важное значение для выживаемости трансплантата [194]. На сегодняшний день эффективность этого метода доказана в других областях медицины, в частности в кардиохирургии [77].

После получения многообещающих результатов дистанционного ишемического прекондиционирования при трансплантации почки на животных моделях [99], было проведено несколько клинических испытаний при АТП. Результаты этих исследований противоречивы, что, вероятно, связано с разнородностью временных интервалов предтрансплантационной ишемии, ограниченными размерами выборки и другими пациент-ассоциированными причинами, но все же демонстрируют клиническую эффективность методики [35]. Так, в работе Wu с соавторами (2014) 48 реципиентов парных донорских почек были рандомизированы в группы получающих и не получающих ишемическое прекондиционирование. Согласно результатам, у пациентов исследуемой группы были значительно ниже уровни креатинина и выше скорость клубочковой фильтрации через 12 часов после трансплантации ( $p < 0,05$ ), хотя эти различия нивелировались в период 1-14 дней после трансплантации. Также в группе получающих ишемическое прекондиционирование были значительно ниже ранние маркеры ИР-синдрома (желатиназа-ассоциированный липокаин нейтрофилов мочи). Авторы заключили, что ишемическое прекондиционирование ускоряет восстановление функции почек у реципиентов после трансплантации почек [196]. Рандомизированные клинические исследования оценки эффективности ишемического прекондиционирования в настоящее время продолжаются [105].

### 1.3.3 Холодовая консервация

Между изъятием органа и трансплантацией проходит определенное время. В течение этого времени орган подвержен повреждению в результате ацидоза, ионного дисбаланса и иных причин, деструктивное влияние которых может быть уменьшено путем применения холодовой консервации. Было предложено несколько методов консервации [104].

Одним из стандартных методов снижения выраженности повреждения органа является холодовая консервация – консервация органов и тканей охлаждением в жидких средах до температуры, близкой к 0 С°. Перспективы развития этого метода заключаются в добавлении новых компонентов к уже существующим растворам или приготовление совершенно новых растворов [87]. Так, добавление к раствору холодовой консервации полиэтиленгликоля и ингибиторов р38 MAP-киназы, замедляющих истощение АТФ и ингибирующих накопление кальция в клетке, успешно применили с целью уменьшения выраженности синдрома И-Р после трансплантации [102, 201]. Однако термические повреждения, которые орган может получить в результате непосредственно холодовой консервации, сложности в оценке жизнеспособности органа диктуют необходимость развития метода. [76].

### 1.3.4 Аппарат гипотермической перфузии

С расширением критериев отбора доноров вопрос хранения органа приобретает все большую актуальность. Аппарат гипотермической перфузии (АГП) все чаще используют в качестве альтернативы метода холодовой консервации трансплантатов, полученных от субоптимальных доноров [54, 106, 107]. Хотя вопрос о преимущественном использовании АГП остается спорным, тем не менее существует ряд исследований, подтверждающих преимущество этого метода по сравнению с холодовой консервацией с точки зрения одногодичной и десятилетней выживаемости трансплантатов [13, 85, 137].

Особенно эффективно его применение у доноров с расширенными критериями [79], а также от доноров с остановкой сердца [182].

Еще одно преимущество АГП – это возможность непосредственной оксигенации перфузата, что в опытах на свиньях также способствовало повышению жизнеспособности почки [124]. Существует и успешных опыт применения этого методу у людей при трансплантации почки от маргинального донора [157].

Точный механизм, при котором использование аппарата гипотермической перфузии улучшает качество трансплантата при АТП до сих пор остается неясным. Есть данные, что у животных при применении АГП существенно подавляется экспрессия мРНК MMP-9 и NF-κB, а также провоспалительных цитокинов, что может быть защитным механизмом при ИР-синдроме [61].

АГП может быть полезен для снижения тяжести хронического отторжения, интерстициального фиброза, тубулярной атрофии [106, 107].

### 1.3.5. Нормотермическая консервация

Метод нормотермической консервации лишен многих недостатков холодной консервации. Нормотермическая консервация может способствовать лучшему восстановлению функции трансплантата по сравнению с холодной консервацией. В основе техники лежит создание физиологической среды для трансплантата во время его хранения, используя специальные перфузионные растворы. Это может быть выполнено различными путями, в частности посредством специальных аппаратов для перфузии. Так, исследования на свиньях показали, что нормо- или субнормотермическая поддерживают жизнеспособность и функционирование органа [187]. Более того, трансплантаты, подвергшиеся нормотермической консервации *ex vivo*, продемонстрировали более низкий креатинин сыворотки через 1-7 дней после трансплантации и более низкие пиковые значения креатинина. Эффективность этого метода подтверждает и исследование иммунных маркеров ишемии. Таким образом, описанная методика



консервации улучшает посттрансплантационную функцию и может способствовать расширению пула доноров [95]. Показано, что использование метода нормотермической консервации позволяет производить эффективную оценку качества и пригодности почки к трансплантации [97].

Наибольший опыт применения метода получен в гепатологии, однако перспективность метода и данные пилотных испытаний дают основания для расширенных клинических исследований [65, 96, 159].

### 1.3.6. Воздействие на медиаторы воспаления

Ввиду того, что большинство провоспалительных цитокинов требуют активации транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [64], блок передачи сигнала на этом уровне занимает особое место в лечении ИР-синдрома. Для активации NF- $\kappa$ B необходима p38 MAP-киназа и, следовательно, ингибирование этой киназы способствует снижению цитокинов и, соответственно, уменьшению повреждения в ходе ИР-синдрома, что и было показано в экспериментальной модели гипоксии [89].

В цитоплазме клетки NF- $\kappa$ B находится в неактивном состоянии в комплексе с цитозольным ингибиторным белком  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Стимулирующий агент приводит к тому, что I $\kappa$ B фосфорилируется под действием киназы IKK (I $\kappa$ B-киназа), что приводит к деградации I $\kappa$ B в результате действия протеасомы 26S. При этом NF- $\kappa$ B высвобождается от ингибирующего комплекса, транслоцируется в ядро и активирует транскрипцию контролируемых генов. Определенные антагонисты комплекса IKK способствуют уменьшению повреждений, вызванных ИР-синдромом. [142]. Однако этот подход требует дальнейших исследований для применения его в трансплантологии.

Другой способ препятствовать деградации I $\kappa$ B – ингибирование протеасом, отвечающих за его разрушение. Введение ингибитора протеасом лактацистина (lactacystin) или его производное PS519 до начала ишемии может предотвратить

ишемические повреждения при почечной, церебральной, а также печеночной ишемии [86, 123, 199].

Наконец, возможно ингибирование непосредственно генов экспрессии NF- $\kappa$ B, но на сегодняшний день недостаточно клинических исследований [110].

Известно, что продукция цитокинов увеличивается уже через несколько часов после трансплантации, и ингибирование NF- $\kappa$ B, p38 MAPK эффективно уменьшают повреждения при ИР-синдроме. Тем не менее для снижения действия цитокинов недостаточно только сократить их выработку, должны быть заблокированы их эффекты.

Перспективными мишенями для этого направления лечения являются Met-RANTES – производное хемокина RANTES – которое блокирует действие RANTES на уровне рецепторов [123]. При этом благоприятный эффект, достигается за счет уменьшения воспалительного ответа, в результате чего долгосрочные результаты функционирования трансплантата оказываются лучше. Аналогичные эффекты были достигнуты при блокаде MCP-1 и MIP [63].

Помимо хемокинов, важную роль в опосредовании ИР-синдрома играют цитокины, особенно ИЛ-1. Физиологическое действие ИЛ-1 ингибируется ИЛ1-РА (рецепторный антагонист) (подобные препараты используются при лечении ревматоидного артрита). Эксперименты на крысах показали, что животные, у которых лечение ИР-синдрома осуществлялось с использованием ИЛ1-РА, имели значительно менее выраженные повреждения. Также уменьшалась воспалительная инфильтрация и количество апоптотических клеток, по сравнению с не леченной контрольной группой [24].

Молекулы адгезии, в частности LFA-1 и ICAM-1, необходимы для инфильтрации иммунных клеток из сосудистого пространства в ткани. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что снижение экспрессии молекул адгезии оказывает благоприятный эффект на последствия И-Р повреждений после трансплантации [126, 205]. Так, опубликованы результаты клинических исследований препарата эфализумаб, в состав которого входит человеческие антитела IgG1 к LFA-1. Введение их реципиенту после

трансплантации почки сопровождалось снижением тяжести повреждения в результате ИР-синдрома [190]. Однако более детальная информация об отсроченном влиянии данного вида лечения на трансплантат отсутствует. Использование анти-ICAM-1 антител в целях предотвращения острого отторжения трансплантата не показало преимуществ по сравнению с обычной иммуносупрессивной терапией [93].

Положительные результаты были получены при использовании антагонистов P-селектина, при этом за счет снижения фиксации иммунных клеток на стенках эндотелия сокращалась инфильтрация воспалительных клеток в почечном интерстиции. В целом же, на сегодняшний день терапия, основанная на устранении эффектов молекул адгезии, нуждается в большем количестве экспериментальных и клинических теоретических исследований [33, 90].

Наконец, еще одним звеном в патогенезе выработки медиаторов воспаления является система комплемента. Ингибирование комплемента C5 и C1 в экспериментах с животными также продемонстрировало благоприятное влияние на течение ишемии-реперфузии на восстановление функции и выживаемости трансплантата [30, 116]. Некоторые ингибиторы, такие как C1INH, уже используются в клинике при других патологиях, однако требуются дальнейшие исследования для выяснения их механизма действия при ИР-синдроме [51].

Таким образом, возможности терапевтического лечения ИР-синдрома путем воздействия на медиаторы воспаления достаточно широк, и дальнейшие исследования в этом направлении могут принести значительные результаты.

### 1.3.7 Плазмаферез

В настоящий момент по мировым и российским данным литературы имеется большой опыт применением ПА для коррекции и лечения ИР-синдрома [2, 115].

Множество ученых полагают, неселективное удаление циркулирующих иммунных комплексов является полезным у реципиентов группы риска (больные,

ожидающие повторную трансплантацию; больные с малым совпадением по HLA, реципиенты почечного трансплантата, полученного от субоптимального донора [1].

Но при этом у данного метода есть и недостатки, которые ограничивают его применение. Одним из основных осложнений является необходимость введения гепарина, что может вызывать сложности у пациентов в раннем послеоперационном периоде или у больных с синдромом ДВС; не исключается развитие такого осложнения, как гипотония даже при восполнении объема циркулирующей крови. Не исключаются так же повреждение эритроцитов и гемолиз под воздействием работы насосов. Так же во время процедуры удаляется большое количество белка. Инфузии белковых растворов часто сопровождаются аллергическими реакциями, а при введении свежзамороженной плазмы существует риск заражения вирусными гепатитами [152].

Большинства данных недостатков лишены методы селективной экстракорпоральной сорбции.

### 1.3.8 Применение биологических таргетных препаратов

Предупреждение иммунологических последствий ИР-синдрома путем блокирования тех или иных патогенетических звеньев воспаления является перспективным направлением исследований последних нескольких лет. Учитывая, что важную роль в развитии дисфункции трансплантата при ИР-синдроме играет комплемент, был разработан ряд биологических агентов, воздействующих на его компоненты [113].

Гуманизированные моноклональные антитела к C5 компоненту (экулизумаб) исходно продемонстрировал эффективность при атипичном гемолитико-уремическом синдроме, в том числе после трансплантации почки. Далее ряд доклинических испытаний определил такие направления его использования, как несовместимая по АВ0 трансплантация, предотвращение острого и хронического отторжения трансплантата, а также отсроченной его

функции [112]. В недавнем рандомизированном клиническом исследовании биологических агентов в профилактике и улучшении исходов ИР-синдрома у пациентов, получавших экулизумаб, была отмечена значительно лучшая ранняя функция трансплантата, меньше артериолярного гиалиноза и хронической гломеруллопатии при протокольной биопсии, сделанной на 30-й день, 1 и 3 года после трансплантации. Был сделан вывод, что препарат ассоциирован с предупреждением ранней дисфункции и улучшением морфологии трансплантированной почки [92].

Другим направлением снижения активации комплемента стало использование человеческих C1-блокаторов. В мышинной модели у животных, получавших C1-ингибитор до реперфузии, значительно улучшалась выживаемость наряду с улучшением функции почек. Предварительное введение препарата также предотвращало выделение ИЛ-6, CXCL1 и MCP-1, высвобождение C5a и C3b, а также инфильтрацию нейтрофилами и макрофагами почечной ткани. Этот противовоспалительный эффект коррелировал со значительным снижением экспрессии маркеров фиброза альфа-гладкомышечного актина, десмина и пикросириуса красного в течение 30 и 90 дней после ИР и сниженных почечных уровней TGF- $\beta$ 1 по сравнению с контрольной группой [49]. Аналогичные данные были получены на крысах, причем кроме описанных эффектов, C1-ингибитор предотвращал активацию эндотелиальных клеток, блокируя эндотелиальный механизм повреждения при ИР-синдроме [202].

В настоящее время ведутся экспериментальные исследования применения других блокаторов комплемента (блокаторы альтернативного пути активации, анти-fB), демонстрирующие многообещающие данные при ИР-повреждении [28].

### 1.3.9 Перспективы применения клеточной терапии

Большим терапевтическим репаративным и регенеративным потенциалом обладают мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые являются перспективным кандидатом в предупреждении и лечении ИР. МСК мигрируют в

поврежденные ишемией участки почечной ткани, где проявляют противовоспалительные и иммуномодулирующие свойства. МСК способны модифицировать микроокружение и способствовать восстановлению тубулярных клеток с помощью паракринных факторов. Тем не менее, их благоприятные эффекты ограничены плохой выживаемостью в условиях ишемии [197].

Опубликованы данные, полученные на крысах, о положительном влиянии на дисфункцию почек после ИР микрочастиц, полученных из эндотелиальных клеток-предшественниц (защитные микро РНК, в частности, miR-126) [18]. Привлекательным для исследователей типом МСК являются регенерирующие клетки эндометрия, также показавшие в эксперименте на мышах эффективное предотвращение последствий ИР, связанное с увеличением уровней ИЛ-4 в сыворотке, но снижением ФНО- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и ИЛ-6, а также снижение селезеночных и почечных CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> популяций Т-клеток [178].

#### **1.4. Селективные экстракорпоральные методы: области применения и преимущества**

Одним из селективных экстракорпоральных методов, применяемых в трансплантологии является, метод каскадной (двойной) плазмофильтрации (КПФ) - метод очистки плазмы крови человека с использованием специальных фракционаторов плазмы, позволяющих разделять плазму на компоненты. Данная методика продемонстрировала большую эффективность при профилактике и лечении реакции острого отторжения аллотрансплантата (особенно резистентных гуморальных кризов отторжения) и хронической трансплантационной нефропатии, а также при необходимости удаления предсуществующих антител [158]. При помощи КПФ из кровеносного русла могут быть эффективно удалены иммуноглобулины G и M, некоторые вирусы, липопротеиды низкой плотности,  $\alpha$ 2-макроглобулины, миоглобин [72, 120].

Многих отрицательных сторон лишен метод селективной сорбция цитокинов (ССЦ), который позволяет удалять из циркулирующей крови про- и

противовоспалительные цитокины [16]. Технология метода состоит из следующих шагов: забор плазмы через плазмафильтр, ее последующая обработка на адсорбирующем картридже с удалением воспалительных медиаторов, реинфузия, гемофильтрация. В отличие от плазмафереза, плазма пациента не удаляется, что делает трансфузию свежемороженой плазмы необязательной и исключает риск заражения инфекциями, перегрузку жидкостью и трансфузионные реакции [15].

Известно применение ССЦ для удаления из кровотока цитокинов и медиаторов воспаления, ассоциированных с септическим шоком и тяжелым сепсисом. Турани и соавторы в своих исследованиях сравнивали ССЦ и вено-венозный гемодиализ, пришли к выводу, что ССЦ является более эффективным, для удаления ИЛ-6 и прокальцитонина, чем гемодиализ, что способствует улучшению гемодинамического статуса [184, 185].

Таким образом, использование субоптимальных доноров для трансплантации почки делает вопрос ИР-синдрома все более актуальным, ввиду того что скомпрометированный орган более остро реагирует на изменения в ходе ИР-синдрома. Непосредственно патогенез данного синдрома представляет собой систему сложных молекулярных и клеточных взаимодействий, в которых значительная роль отводится медиаторам воспаления. Так, ишемические изменения в клетке, накоплений АФК, активация системы комплемента в ответ на ИР-синдром приводят к увеличению секреции ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1, RANTES и других активных молекул, потенцирующих воспалительную реакцию.

В связи с этим перспективным методом лечения ИР-синдрома представляется удаление цитокинов и хемокинов из кровотока реципиента. Тем не менее, как следует из литературного обзора (и это отражено нами), патогенез синдрома ишемии-реперфузии изучен значительно лучше, чем методы его коррекции.

Экстракорпоральные методы, используемые в широкой практике, обладают рядом недостатков ввиду своей неселективности, и вместе с вредными компонентами теряются полезные – альбумины, фибриноген, факторы

свертываемости. Селективные экстракорпоральные методы очистки крови лишены этих недостатков, позволяя элиминировать строго патогенные агенты.

Эти методы активно используются для лечения больных сепсисом, тогда как в литературе имеется ограниченное количество данных о применении селективных экстракорпоральных методов при ИР-синдроме. Тем не менее, единые принципы применения селективных методов дают основания считать, что они будут эффективны и при ИР-синдроме.

Имеются косвенные свидетельства того, что селективная сорбция цитокинов может быть эффективна для коррекции синдрома ишемии-реперфузии. Этот метод также показал свою эффективность для снижения тяжести ишемического и реперфузионного повреждения в общей популяции пациентов с ХБП. Тем не менее, пациенты старших возрастных групп – наиболее подверженные ишемии-реперфузии в условиях реализации распределения донорских почек по принципу «old for old», имеют особенности, которые, главным образом, обусловлены изменениями адаптационно-компенсаторных механизмов иммунного гомеостаза. Опыт применения ССЦ у данной категории пациентов в настоящее время отсутствует, что и стало основанием для настоящего исследования.



## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базе кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО Московского областного научно-исследовательского института им. М.Ф. Владимирского (г. Москва) и в лаборатории компьютерной цитоморфометрии филиала ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России НКЦ Геронтологии (г. Москва) в период с 2010 по 2018 годы.

### 2.1. Контингент обследованных больных

В диссертации обобщены результаты проспективного обследования 60 реципиентов старшей возрастной группы, которым была выполнена неродственная трансплантация трудной почки. Пациенты были случайным образом отнесены к одной из двух групп. У 30 реципиентов основной группы в раннем послеоперационном периоде для снижения тяжести ишемического и реперфузионного повреждения проводилась процедура селективной сорбции цитокинов. У 30 больных группы сравнения выполнялся аналогичный объем лечебно-диагностических процедур за исключением ССЦ. Мы оценили клинико-лабораторные показатели в этих двух группах на определенных этапах раннего и отдаленного послеоперационного периода. Больные находились под наблюдением от 9 до 59 месяцев, в среднем –  $34,8 \pm 16,1$  месяцев.

В указанный выше период времени 18% реципиентов были отнесены к старшей возрастной группе (более 55 лет). Средний возраст в основной группе составил  $62,4 \pm 3,2$  года (55-70 лет), в группе сравнения –  $61,6 \pm 4,7$  лет (55-69 лет) - рисунок 2.

Группы были хорошо сопоставимы не только по возрасту, но и по характеру заболеваний, ставших причиной развития ХБП 5 стадии. Наиболее частой причиной в обеих группах были различные варианты хронического нефрита. Второй по частоте причиной был хронический пиелонефрит. Следует учитывать, что у пациентов старшей возрастной группы пиелонефрит в большинстве случаев был связан с мочекаменной болезнью, а не аномалиями

развития, как у более молодых пациентов. Длительно протекающий инфекционный процесс с частыми обострениями порождает как местные, так и системные изменения, что связано со значительными сложностями лечения. Примерно в четверти случаев, причиной развития ХБП были артериальная гипертензия и сахарный диабет, что отягощало коморбидный фон пациентов. У 10% больных был поликистоз почек. У большинства пациентов до трансплантации выполнялась нефрэктомия (рисунок 2).

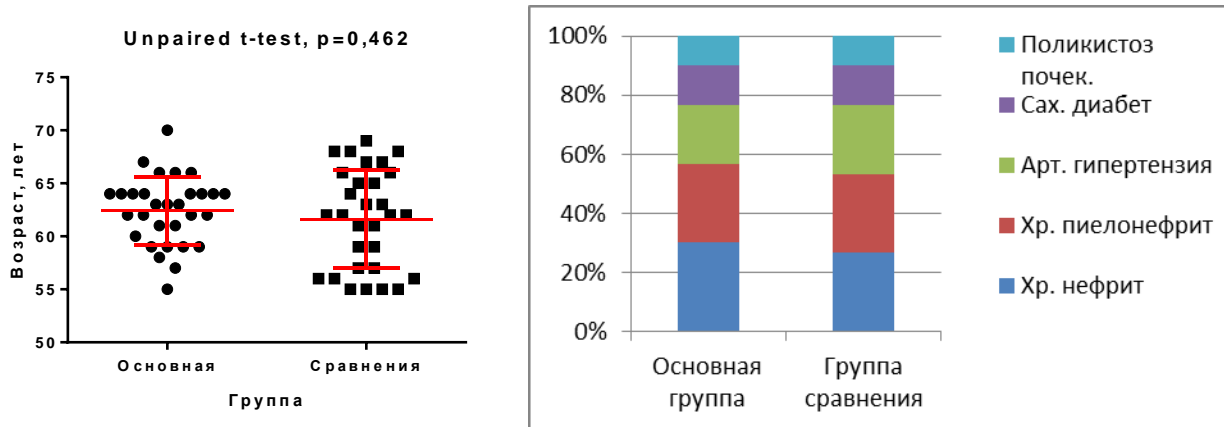


Рисунок 2. Возраст реципиентов и причины развития ХБП.

Реципиенты почечного аллотрансплантата старших возрастных групп по сравнению с лицами молодого возраста, отличаются наличием неблагоприятного преморбидного фона, связанного с высокой частотой сопутствующих хронических заболеваний (артериальной гипертензией и гипертонической болезни; ишемической болезни сердца; хронического гастрита, сахарного диабета, хронической анемии и др.) и высоким индексом полиморбидности. Клинические проявления и осложнения хронической болезни почек замаскированы под терапевтический симптомокомплекс, определяющий заболевания внутренних органов.

Больные старшей возрастной группы склонны иметь сопутствующие заболевания. Для оценки коморбидного фона мы использовали шкалу Cumulative illness Rating Scale for Geriatrics (CIRS-G). Показатель коморбидности имел прямую связь с возрастом и был сопоставим в группах – рисунок 3.

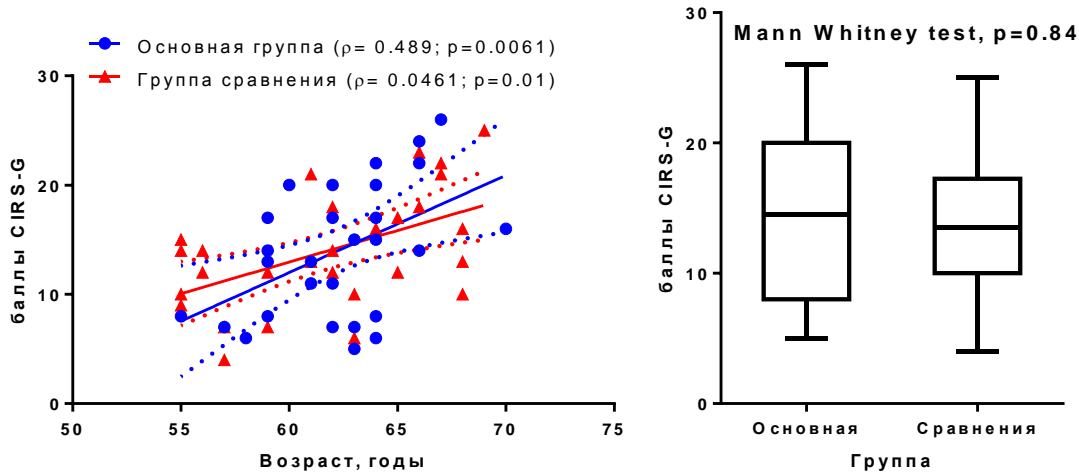


Рисунок 3. Коморбидный фон у больных обеих групп (по шкале CIRS-G).

В одном случае (группа сравнения) была выполнена додиализная трансплантация при СКФ 12-13 мл/минуту, креатинин плазмы составлял 550-600 мкмоль/л. Большинство больных получали заместительную почечную терапию: 47 больных – гемодиализ (22 – основной группы и 25 – группы сравнения) и 12 больных – перитонеальный диализ (8 больных основной группы и 4 больных группы сравнения)

При трансплантации почки от субоптимальных доноров («возрастных» доноров и «асистолических» доноров 3-4 категории по Маастрихтской классификации) приоритет отдавался реципиентам старшей возрастной группы, которые и составили основную и группу сравнения. Реализуемый таким образом подход «old for old» требовал применения новых методов протекции трансплантата.

Сроки консервации донорских почек в обеих группах были сопоставимы и составили в среднем  $13,4 \pm 4$  часа в основной группе и  $13,2 \pm 3,4$  часа в группе сравнения. В подавляющем большинстве случаев у донора были изъяты только почки. При наступлении остановки сердца до диагностики смерти мозга, в реанимации через бедренную артерию в аорту устанавливался двухбаллонный катетер и начиналась перфузия почек *in situ*, для оттока перфузата канюлировали бедренную вену. После этого донор транспортировался в операционную для изъятия.

Селекция пары донор-реципиент осуществлялась с учетом группы крови (мы выполняли только одnogруппные трансплантации) и лейкоцитарных антигенов человека А, В и DRB1 локусов. В зависимости от количества и сочетания несовпадений по локусам, вычисляли индекс совместимости (минимум 1, максимум 15). В основной группе этот показатель составил 7 (5; 8), в группе сравнения 6 (6;7),  $p=0,371$ .

У всех реципиентов трансплантация выполнялась впервые, предсуществующих анти-HLA антител больные не имели. Трансплантация выполнялась только при отрицательной перекрестной пробе (комплемент-зависимый микролимфоцитотоксический тест).

По принятой методике выполняли гетеротопическую трансплантацию – забрюшинное в подвздошную ямку. В типичном случае формировались анастомозы между артерией и веной трансплантата и соответствующими наружными подвздошными сосудами реципиента по типу «конец в бок». В двух случаях была отсечена площадка (участок аорты в области устья почечной вены), а у двух реципиентов имелся выраженный атеросклероз и кальциноз наружной подвздошной артерии. В этих случаях для оптимального кровотока и снижения вероятности гемодинамических нарушений и тромбоза артерии трансплантата, артериальный анастомоз формировался с внутренней подвздошной артерией по типу «конец в конец». При наличии добавочной почечной артерии, имеющей устье в аорте на расстоянии 1-1,5 см от устья почечной артерии, у двух больных анастомоз формировался с общей аортальной площадкой и наружной подвздошной артерией. Если расстояние было больше 1,5 см (один больной), то формировалось два анастомоза по типу «конец в бок».

В случае недостаточной длины вены донорской почки выполнялась реконструкция с удлинением вены за счет участка нижней полой вены. Такая реконструкция потребовалась в семи случаях.

После возобновления кровотока формировали неоуретероцистоанастомоз по Мебелю-Шумакову-Брауну с использованием внутреннего стента.

Для индукции иммуносупрессии пациент до операции принимал суточную дозу такролимуса из расчета 0,2 мг/кг массы тела и суточную дозу микофенолатов. Индукционная терапия включала внутривенно капельное введение анти-CD25 антител за 30 минут до операции и болюсное введение метилпреднизолона в дозе 500-750 мг перед возобновлением кровотока в трансплантате. Введение анти-CD25 антител и метилпреднизолона повторяли на четвертые сутки.

У всех больных нами был использован трехкомпонентный протокол иммуносупрессии. Больные получали такролимус с еженедельным контролем для своевременной коррекции дозы и поддержания оптимальной концентрации в крови. Целевые концентрации («нулевая концентрация» – т.е. перед приемом очередной утренней дозы) составляли 8-15 нг/мл в течение первого месяца после трансплантации, 8-12 нг/мл – в течение 2-3 месяца, 8-10 нг/мл в течение 4-6 месяца, 8-9 нг/мл в течение 7-12 месяца, после года – 7-8 нг/мл. Доза микофенолатов составляла 1-2г в сутки, доза преднизолона 30 мг в сутки. У ряда больных доза преднизолона постепенно снижалась при условии постоянного мониторинга функции трансплантата.

При развитии отторжения выполнялась биопсия трансплантата и проводилась противокризовая терапия, которая заключалась в пульс-терапии метил-преднизолоном. При выявлении «гуморального» криза отторжения в случае выявления антидонорских антител в крови или определении свечения C4d-компонента комплемента при иммуногистохимическом исследовании пункционных биоптатов проводили плазмаферез с последующим внутривенным введением препаратов иммуноглобулина человека. В случае повторного «гуморального» криза в двух случаях вводился ритуксимаб. В одном случае для купирования тяжелого клеточного криза отторжения применялся антитимоцитарный глобулин.

Всем пациентам в послеоперационном периоде проводились стандартные клиничко-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые доплеровские исследования. Оценивали клинический и биохимический анализ крови

(определение белковых фракций, глюкозы, ферментов АСТ и АЛТ, ЛДГ, щелочной фосфатазы, общего холестерина и холестерина липопротеидов высокой и низкой плотности, триглицеридов, концентрацию мочевины, креатинина, мочевой кислоты, электролитов), клинический и биохимический (оценивали концентрацию креатинина, протеинурию) анализ мочи, определение клиренса креатинина, вирусологическое и бактериологическое исследование.

Дополнительно у реципиентов обеих групп оценивали кровоток в трансплантате – ультразвуковое доплеровское исследование, выполняли протокольные биопсии на 3-4 неделе послеоперационного периода, а также биопсии по показаниям в более позднем периоде. Мы оценивали размеры трансплантата, наличие дополнительных объемных образований, размеры чашечно-лоханочной системы, а также максимальная систолическая скорость кровотока ( $V_s$ ), максимальная диастолическая скорость кровотока ( $V_d$ ), наличие и скорость реверсивного кровотока ( $V_{rev}$ ), индекс резистивности ( $R_i$ ), который рассчитывался по формуле  $R_i = (V_s - V_d) / V_s$ .

Удовлетворительной первичной функцией трансплантата считали отсутствие необходимости в продолжении заместительной почечной терапии в послеоперационном периоде.

Дисфункцию ренального трансплантата определяли, как необходимость проведения заместительной почечной терапии в послеоперационном периоде. Конкретными показаниями для этого были нарастающая уремия, электролитный дисбаланс или гиперволемиа. При дисфункции трансплантата, продолжающейся более трех недель, выполняли биопсию.

## **2.2. Выделение иммунокомпетентных клеток**

Для проведения анализов кровь получали самотеком из периферических вен на конечности, свободной от артериовенозной фистулы, а качестве антикоагулянта использовали гепарин (250 ЕД на 1 мл). Затем клеточную взвесь наслаивали на два слоя градиента плотностью 1,093 и 1,077 и центрифугировали пробирки в течение 40 минут при скорости 1500 оборотов в минуту. В результате

в пробирках формировались 2 интерфазы (кольца): верхняя на границе плазма-фиколл (плотность 1,077), которая была представлена мононуклеарами и нижняя – фиколл-фиколл (плотность 1,077 – 1,119), представленная гранулоцитами.

Затем мононуклеарные клетки на границе градиента собирали и два раза отмывали физиологическим раствором с центрифугированием по 5-7 мин при скорости 1000 оборотов в минуту.

### **2.3. Определения концентрации цитокинов в сыворотке крови**

Для определения цитокинов применяли наборы реактивов для иммуноферментного анализа производства ООО «ЦИТОКИН», Санкт-Петербург.

Кровь из кубитальной вены в объеме 5 мл заготавливали в сухие стерильные стеклянные пробирки. После отстаивания в течение 30 минут при комнатной температуре, центрифугировали пробирки при 400 G в течение 10 минут. Собирали сыворотку и разливали по 1 мл в пластиковые пробирки (Эппендорф) и хранили до проведения анализа в условиях низкотемпературного холодильника при T - 20°C. Таким образом формировался банк сывороток.

При выполнении анализов во флаконы с калибровочными пробами добавляли по 1,0 мл дистиллированной воды, выдерживали в течение 20 минут и затем тщательно перемешивали до полного растворения, избегая пенообразования. Вскрывали и устанавливали на рамку необходимое количество стрипов.

В стакан с 480 мл дистиллированной воды добавляли содержимое флакона с маркировкой «Буфер Р». Перемешивали, избегая пенообразования. Все реагенты доводили до комнатной температуры.

Вносили во все лунки по 0,10 мл «Буфер А», а затем в соответствующие лунки по 0,10 мл калибровочных проб или исследуемой сыворотки в дубликатах, внесение образцов не должно занимать более 15 мин. Стрипы инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов со встряхиванием.

В зависимости от количества используемых стрипов готовили необходимый объем однократного раствора конъюгата антител (анти-И4-

пероксидаза) путем смешивания 40 мкл концентрированного раствора конъюгата Е с 1 мл промывочного буфера из расчета на один стрип.

По окончании инкубации удаляли содержимое лунок декантированием и промывали лунки пять раз. При каждой промывке во все лунки добавляли по 0,3 мл промывочного буфера, встряхивали рамку на шейкере в течение 5-10 сек с последующим декантированием. При каждом декантировании тщательно удаляли остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. Внесли во все лунки по 0,1 мл раствора конъюгата Е. Инкубировали стрипы при температуре 37°C в течение 60 мин. со встряхиванием.

По окончании инкубации лунки промывали как и в пункте 6. Перед окраской стрипы споласкивали дистиллированной водой для более полного удаления не связавшего конъюгата.

За 5 минут до окончания инкубации готовили необходимое количество субстратной смеси: из расчета на 1 стрип 1 мл субстратного буфера из флакона с маркировкой «Буфер С» и 0,2 мл раствора тетраметилбензидина из флакона с маркировкой «ТМБ». Во все лунки вносили по 0,1 мл субстратной смеси и инкубировали стрипы в темноте в течение 15-20 мин в зависимости от степени развития окраски.

Добавляли во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и субстратную смесь, по 0,05 мл «Стоп-реагента» для остановки ферментной реакции, встряхивали на шейкере 5-10 мин. 10. Оптическую плотность в лунках измеряли при длине волны 450 нм.

Результаты иммуноферментного анализа регистрировали на вертикальном фотометре Multiskan MCC 340 в при длине волны 450 нм. Для определения концентрации интерлейкинов и интерферона гамма в анализируемых образцах строился калибровочный график по средним значениям оптической плотности каждого стандартного раствора. При статистической обработке данных, в соответствии с рекомендациями производителя, были выведены границы нормативных значений методом прибавления или вычитания сигмального



отклонения из среднего значения показателя. Использование в работе критерия верхней и нижней границ нормы позволяет определить достоверное повышение или снижение уровня изучаемого показателя у конкретного пациента обследованной группы.

#### 2.4. Метод определения электрофоретической подвижности клеток крови

Технология клеточного микроэлектрофореза основана на динамическом измерении амплитуды колебаний клеток в однородном переменном электрическом поле, которая пропорциональна их эффективному электрическому заряду. Поле создается в электрофоретической камере, между графитовыми электродами при подаче на них стабилизированного напряжения с профилем симметричного биполярного меандра, перемещения клеток фиксируются с помощью микроскопа.

Для выполнения электрофоретического клеточного анализа лимфоцитов крови пациентов использовался аппаратно-программный комплекс «Цито-Эксперт» (рисунок 4).

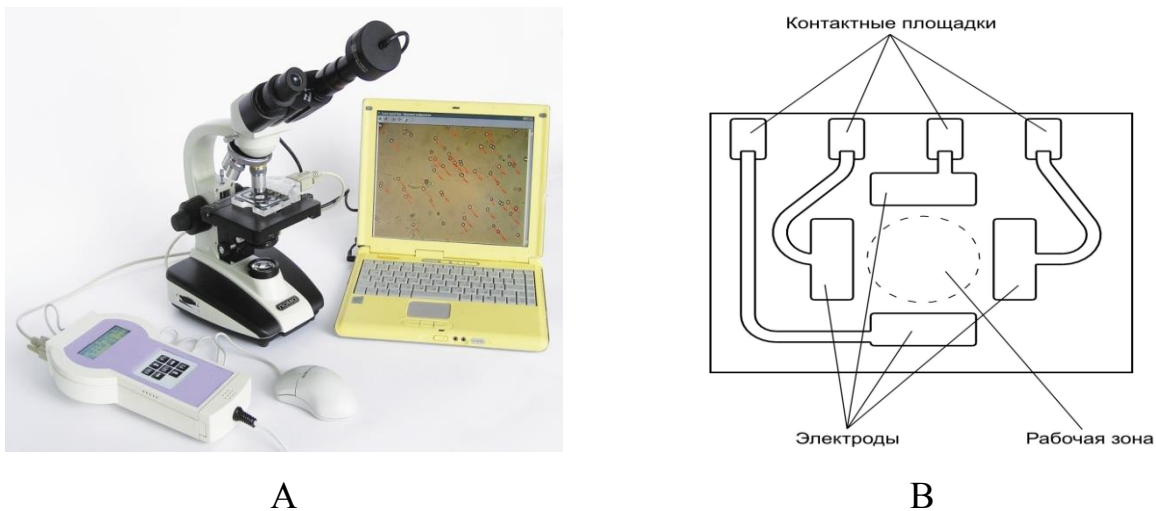


Рисунок 4. Комплект устройств проведения клеточного микроэлектрофореза для электрофоретических цитологических исследований «ЦИТО-ЭКСПЕРТ» (А), электрофоретическая ячейка (В).

Возвратно-поступательные движения клеток в переменном поле записывали цифровой видеокамерой. Полученные данные обрабатывали в автоматическом режиме программой NTU Complex.

Для анализа достаточно 10 мкл цельной крови. Поскольку при работе с цельной кровью измеряемые характеристики клеточного электрофореза традиционно считаются характеристиками эритроцитов, так как их концентрация в крови значительно превышает остальных клеток, мы использовали соответствующее количество сепарированных живых мононуклеарных клеток.

Электрофоретическая подвижность – величина не постоянная и зависит не только от структуры и заряда клеточной мембраны, но также и от других факторов: параметров электрического поля, рН, ионного окружения, вязкости и температуры среды и др. При использовании методики определения электрофоретической подвижности, примененной в нашей работе, характеристики поля и вышеупомянутые параметры клеточного окружения остаются постоянными. В результате, изменения электрофоретической подвижности мононуклеаров крови объясняются только особенностями их мембранных свойств. Таким образом, электрофоретическая подвижность иммунных клеток является косвенным параметром, отражающим состояние иммунного гомеостаза организма.

## **2.5. Метод витальной компьютерной морфометрии клеток**

Для витальной оценки морфофункционального состояния клеток периферической крови использовали метод компьютерной лазерной фазовой цитоморфометрии.

Исследования проводили на базе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа “Цитоскан”, представляющего собой интерферометр Линника на базе модифицированного и автоматизированного МИИ-4 (рисунок 5). В этом комплексе используется метод регистрации фазы света (лазер с длиной волны 633нм) путем модуляции опорной волны.

Взвесью клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имеет зеркальное напыление. После 3-5 минутного интервала, необходимого для оседания клеток, производили съемку изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки составляет 50 – 100 клеток. Для проведения исследований

использовали штатный 30-кратный микрообъектив с числовой апертурой 0,65. Увеличение в канале регистрации составляет 500х.

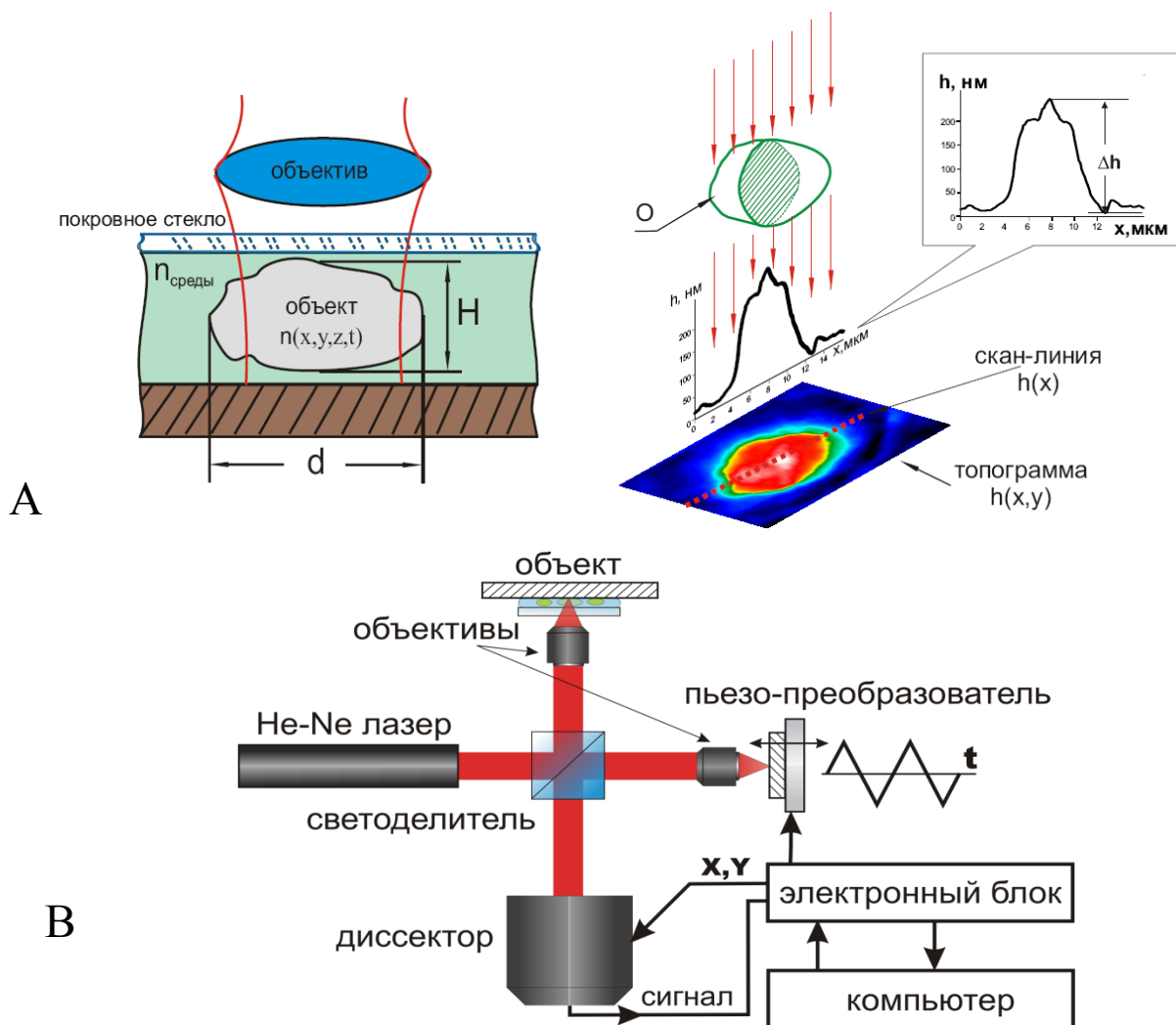


Рисунок 5. Метод витальной компьютерной фазовой морфометрии (КФМ).

А - концепция КФМ; В – принцип действия фазово-интерференционного комплекса «Цитоскан». Прозрачный объект (живая клетка) в иммерсионной среде представляет собой локальную оптическую неоднородность, которая деформирует волновой фронт. Его деформация в интерференционном микроскопе воспринимается как фазовое изображение объекта

В основе принципа действия микроскопа, содержащего идентичные объективы в сигнальном и реберном плечах, лежит сравнение волнового фронта, прошедшего через объект, с опорным, отраженным от высококачественного зеркала. Преобразование сигнала состоит в его дискретизации с последующей записью распределения фаз в виде цифровой матрицы. Результаты расчетов

выводятся на дисплей в виде таблицы параметров каждого объекта и серии графиков.

Для оценки ядерного полиморфизма циркулирующей популяции лимфоцитов мы использовали показатель функциональной активности (ПФА) ядра – величину, обратно пропорциональную фазовой высоте каждой клетки в выборке по формуле:

$$\text{ПФА} = (3 \cdot n_3 + 2 \cdot n_2 + n_1 + 0 \cdot n_0) / n,$$

где  $n_3$  – количество клеток с фазовой высотой  $\leq 1,5$  мкм;  $n_2$  – с фазовой высотой  $> 1,5$ , но  $\leq 2$  мкм;  $n_1$  – с фазовой высотой  $> 2$ , но  $\leq 2,5$  мкм;  $n_0$  – с фазовой высотой  $> 2,5$ ;  $n$  – число клеток в выборке.

Чем выше анизотропия хроматина и, соответственно, фазовая высота, тем ниже активность ядра. Снижение уровня анизотропии ядра, свидетельствует о переходе гетерохроматина в эухроматин, что указывает на биологическую активацию хроматина, и является предпосылкой для появления матричной активности ДНК. Таким образом, фазовая высота клетки, измеренная при витальной компьютерной морфометрии, позволяет оценить функциональную активность ядер лимфоцитов.

Использование данного метода иммунных клеток имеет ряд существенных преимуществ перед другими методами исследования: минимальная инвазивность, высокая чувствительность, возможность проведения анализа в режиме реального времени, высокая информативность, достигаемая в результате использования живых клеток.

## **2.6 Выполнение селективной сорбции цитокинов**

Процедура селективной сорбции цитокинов является комбинированным методом. В процессе этой процедуры проводится плазмифiltrация, после чего сепарированная плазма поступает в сорбционный картридж Mediasorb на основе макроскопической синтетической стироловой смолы в виде нерастворимых микросфер. После картриджа плазма вновь смешивается с клетками крови и поступает в гемофильтр, где проводится гемофильтрация в режиме постдилюции.

Мы проводили процедуру на аппарате Lynda (Bellco, Италия). Процедуру начинали сразу после окончания операции трансплантации и продолжали на протяжении 12 часов. У каждого больного основной группы проведена одна процедура. В качестве сосудистого доступа использовался двух- или трех-просветный катетер, установленный в одну из центральных вен или артерио-венозную фистулу. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (от 1500 до 5000 ЕД болюсно в зависимости от показателя времени активированного свертывания, далее - через инфузомат из расчета 20 ед. на 1 кг массы тела больного в час).

Объём перфузии крови составлял 36-54 литров, объём перфузии плазмы составил 9-13,5 литров. Общая схема проведения процедуры представлена на рисунке 6.

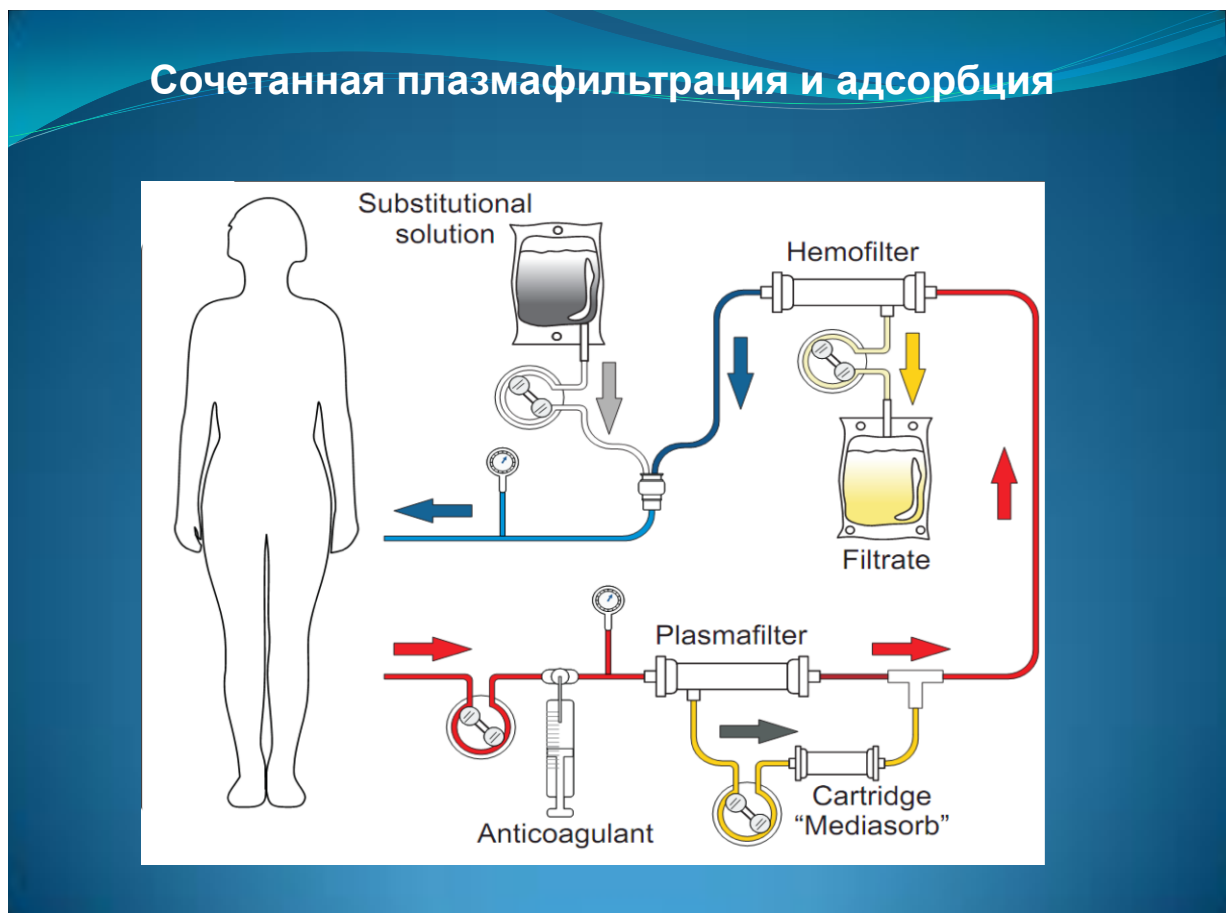


Рисунок 6. Селективная сорбция цитокинов.

## 2.7. Методика приготовления и исследования пункционных биоптатов

В ходе исследования всем реципиентам были выполнены пункционные биопсии почечных трансплантатов (протокольные биопсии и биопсии «по требованию»).

Пункционные биоптаты трансплантата получали в стерильных условиях под местной анестезией и ультразвуковым контролем. Пункции осуществлялись с помощью аппарата для биопсий GTGUN 22 (Италия). Для гистологического исследования биоптаты фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, обезвоживали в спиртах нарастающей крепости и заливали в парафин по общепринятой методике. Срезы толщиной 5-7 мкм исследовали гистологически, гистохимически и иммуногистохимически.

Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, препараты изучали в световом микроскопе при увеличениях от x100 до x1000. Оценку патологии в трансплантате осуществляли в соответствии с классификацией Banff 2007 года – Таблица 1.

Таблица 1.

### Классификация Banff 2007 года

<b>1. Нормальный биопсийный материал.</b>	
<b>2. Антител-опосредованные изменения (могут совпадать с категориями 3-6).</b>	
<b><i>A. Острое антитело-опосредованное отторжение.</i></b>	
<b>Тип</b>	<b>Гистопатологические выводы</b>
I	антитело-подобное, минимальное воспаление, CD4+.
II	Капиллярное и /или гломерулярное воспаление и/или тромбозы, инфильтрация CD4+.
III	Артериальные v3 изменения, инфильтрация CD4+.
<b><i>B. Хроническое активное антитело-опосредованное отторжение.</i></b>	
<b>Тип</b>	<b>Гистопатологические выводы</b>

---	CD4+, Двойные контуры клубочков и/или перитубулярная многослойность базальной мембраны капилляров и/или интерстициальный фиброз/ тубулярная атрофия и/или волокнистое утолщение артериальной интимы.
-----	--

**3. Пограничные изменения: "подозрительные" для острого Т-клеточно-опосредованного отторжения (могут совпадать с категориями 2, 5 или 6).**

Тип	Гистопатологические выводы
---	Эта категория используется, когда нет интимального артериита, но есть очаги тубулита (t1, t2 или t3) с минимальной интерстициальной инфильтрацией (i0 или i1) или интерстициальной инфильтрацией (i2, i3) со слабым (t1) тубулитом.

**4. Т-клеточно-опосредованное отторжение (может совпадать с категориями 2, 5 и 6).**

***A. Острое Т-клеточное отторжение.***

Тип	Гистопатологические выводы
IA.	Случаи со значительной интерстициальной инфильтрацией (повреждено > 25% паренхимы, i2 или i3) и очаги умеренного тубулита (t2).
IB.	Случаи со значительной интерстициальной инфильтрацией (повреждено > 25% паренхимы, i2 или i3) и очаги значительного тубулита (t2).
IIA.	Случаи с легким и среднетяжелым интимальным артериитом (v1).
IIB.	Случаи с тяжелым интимальным артериитом, составляющим >25% от люменальной области (v2).
III	Случаи с "трансмуральным" артериитом и/или напоминающий фибрин изменения артерий и некроз медиальных

	гладкомышечных клеток с сопровождающим лимфоцитарным воспалением (v3).
--	--

***В. Хроническое активное Т-клеточное отторжение.***

Тип	Гистопатологические выводы
---	"Хроническая артериопатия аллотрансплантата " (артериальный интимальный фиброз с инфильтрацией одноядерными клетками и фиброзом, формирующими нео-интиму).

**5. Интерстициальный фиброз и тубулярная атрофия (нет доказательств какой-либо конкретной этиологии).**

**Примечание:** Оценки I, II и III могут включать неспецифический сосудистый и клубочковой склероз, но эта тяжесть градуирована по тубулоинтерстициальным особенностям.

Оценки	Гистопатологические выводы
Оценка I (легкая)	Мягкий интерстициальный фиброз и тубулярная атрофия (<25% от площади коры).
Оценка II (умеренная)	Умеренный интерстициальный фиброз и тубулярная атрофия (26-50% от корковой области).
Оценка III (тяжелая)	Тяжелый интерстициальный фиброз и тубулярная атрофия/гибель (> 50% от площади коры).

**6. Другое: изменения не рассматриваются как острое отторжение и/или хроническое.**

Диагностика	Гистопатологические (и другие) особенности.
Хроническая гипертония	Артериальное/фиброинтимальное утолщение с удвоением, как правило, с гиалиновыми изменениями.
Токсичность кальциневрина	Артериологиалиноз с периферическими гиалиновыми включениями и/или постепенное увеличение в отсутствие гипертонии или диабета. Трубочатое повреждение клеток с изометрической вакуолизацией.



Хроническая обструкция	Отмечаются трубчатые дилатации. Большие Тамма-Хорсфолл белки, кровоподтеки в интерстиции и/или лимфатических.
Бактериальный пиелонефрит	Интратубулярные и перитубулярные нейтрофилы, образование лимфоидных фолликулов.
Вирусные инфекции	Вирусные включения по данным гистологии и иммуногистологии и/или электронной микроскопии.

## 2.8. Методы статистической обработки результатов

Статистический анализ экспериментальных и клинических данных проводили в программах Statistica v.10, SPSS v.23, GraphPad Prism v.6. Данные, имеющие нормальное распределение, представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение. Данные, распределение которых отлично от нормального, представлены как медиана и интерквартильный размах. Оценка соответствия распределения нормальному закону проводилась при помощи одновыборочного критерия Колмогорова-Смирнова.

При анализе различий средних значений (или медиан) применялись непарный критерий Стьюдента с учетом равенства дисперсий, дисперсионный анализ с повторными измерениями с апостериорным критерием Тьюки, критерий Манн-Уитни. Связь между двумя выборками оценивалась при помощи расчета коэффициентов корреляции Пирсона (метрические данные) и Спирмена (ординальные данные).

При анализе частот применялся критерий  $\chi^2$  (при необходимости – точный критерий Фишера). Критическим уровнем p-value считали  $<0,05$ .

### **ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ПРОФИЛЯ ЦИТОКИНОВ У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА В РАННЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ**

Иммунной системе человека свойственно два удивительных свойства – единство и способность к саморегуляции. Посредством скоординированного взаимодействия множества регуляторных механизмов достигается гомеостаз. Одну из ключевых ролей в поддержании зыбкого динамического баланса как в системе клеточного, так и гуморального иммунитета, является цитокиновая сеть. Благодаря плеiotропности, способности к паракринному и эндокринному действию в большом диапазоне концентраций, цитокины являются основными медиаторами физиологических и патологических процессов. Цитокиновая система обеспечивает универсальный интегрированный ответ с вовлечением нативного и адаптивного иммунитета на множество этиологических факторов: инфекции, шок, а также синдром ишемии-реперфузии.

Если не брать во внимание, проблему предсенсублизированных пациентов, то тяжелые гуморальные реакции на трансплантат, клиническим проявлением которых является реакция отторжения, относятся, как правило, к позднему послеоперационному периоду и протекают при активном участии адаптивного иммунитета. В патогенезе синдрома ишемии-реперфузии основную роль играют неспецифические реакции нативного иммунитета с активацией, главным образом, клеточного звена. В связи с этим, мы оценили динамику цитокинов в послеоперационном периоде (как важного регуляторного механизма синдрома ишемии реперфузии), а также морфофункциональные параметры клеточного звена иммунитета (как основного эффекторного звена) у реципиентов почечного аллотрансплантата.

### 3.1. Особенности цитокинового профиля у больных старшей возрастной группы с хронической болезнью почек 5Д стадии

Мы проанализировали концентрации про- и противовоспалительных цитокинов у реципиентов почечного трансплантата в течение первых 5 дней после трансплантации почки: ИЛ2, ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12 и ФНО $\alpha$ : до трансплантации, до и через 15 минут после реперфузии, после трансплантации, через 4, 8, 12, 24 часа и через 5 дней после трансплантации.

Известно, что как хроническая болезнь почек сама по себе, так и процедуры гемодиализа способствуют изменению базального уровня цитокинов в крови. С целью изучения влияния особенностей цитокинового профиля у больных с ХБП мы сравнили базальные уровни (до трансплантации) с группой (15 человек) добровольцев 55-70 лет без острых воспалительных заболеваний и без признаков почечной недостаточности – рисунок 7.

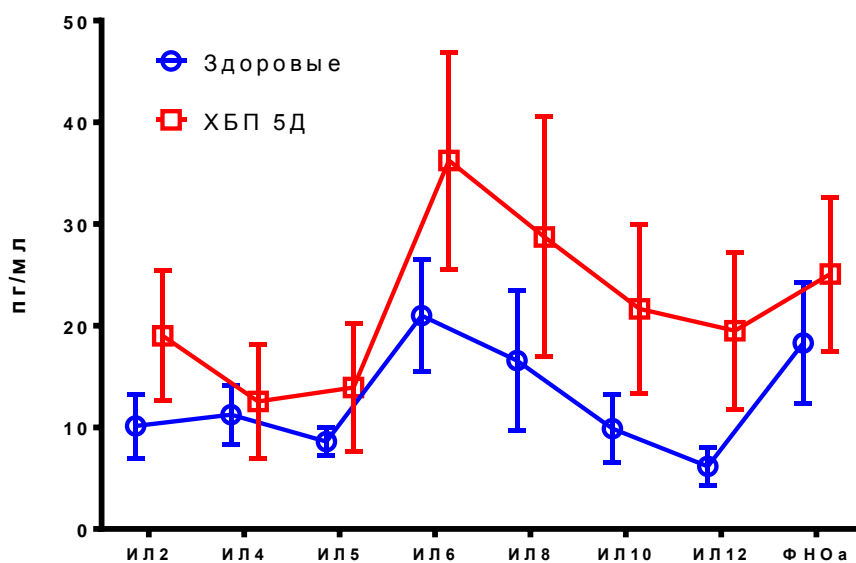


Рисунок 7. Профиль цитокинов у здоровых добровольцев и больных 5Д стадией ХБП.

Из графика видно, что у здоровых добровольцев, как и у больных ХБП 5Д стадии все цитокины были в пределах нормы. В то же время, при развитии 5Д стадии ХБП концентрации ИЛ2, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12, ФНО $\alpha$  статистически значимо увеличиваются ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0025$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,00064$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,0043$  соответственно), а рост концентрации ИЛ4 не

достиг необходимого уровня статистической значимости ( $p=0,41$ ). Данные изменения могут свидетельствовать о развитии сбалансированной системной воспалительной реакции низкой интенсивности с регуляторным повышением активности противовоспалительного цитокина ИЛ10 и сохранением иммунного гомеостаза.

### 3.2. Особенности цитокинового профиля у реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде

У больных группы сравнения, у которых методы экстракорпоральной гемокоррекции сразу после трансплантации не применялись, можно оценить естественный цитокиновый профиль реципиентов почечного трансплантата старшей возрастной группы в раннем послеоперационном периоде. У больных основной группы сразу после окончания трансплантации мы проводили ССЦ в течение 12 часов. Мы детально проанализировали динамику основных цитокинов в послеоперационном периоде. Динамика ИЛ2 представлена на рисунке 8.

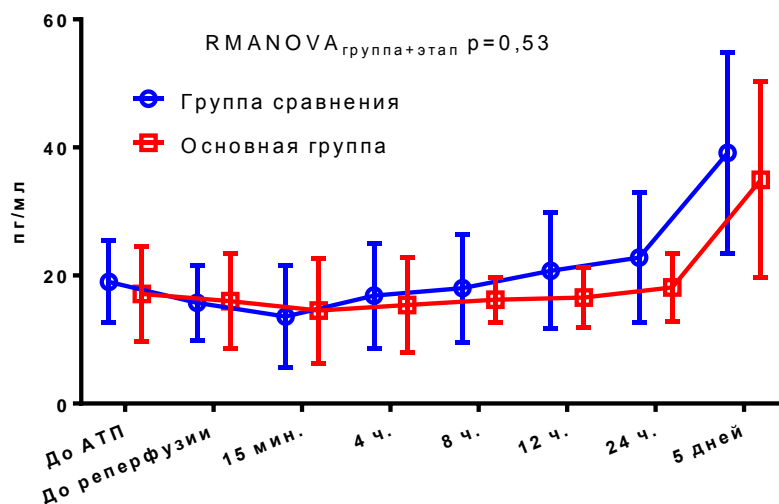


Рисунок 8. Профиль ИЛ2 у больных обеих групп.

ИЛ2 – один из важнейших лимфокинов. Синтезируемый макрофагами, крупными гранулярными лимфоцитами, В-клетками, макрофагами, фибробластами и эндотелиоцитами, ИЛ2 индуцирует пролиферацию В-клетки, активирует цитотоксические Т-клетки и естественные киллеры, стимулирует продукцию других цитокинов (ИЛ4, ИЛ6, ФНО $\alpha$ ,  $\gamma$ -интерферона, колоний-

стимулирующих факторов. ИЛ2 имеет ключевую роль в активации клеточного звена иммунитета при трансплантации почки. Антитела к  $\alpha$ -субъединице интерлейкин-2 рецепторного комплекса активно применяются в качестве индукционной терапии.

После трансплантации у всех больных происходит значительное ( $p < 0,0001$ ) повышение концентрации этого цитокина, главным образом, к пятым суткам послеоперационного периода. Несмотря, на то, что у больных основной группы во время проведения сорбции, концентрация этого цитокина была ниже, чем у больных группы сравнения, различия в динамике между группами не достигли необходимого уровня статистической значимости ( $p = 0,53$ ). Также обращает на себя внимание небольшое (статистически незначимое), но монотонное снижение концентрации ИЛ2 в обеих группах вплоть до момента реперфузии (15 минут после включения трансплантата в системный кровоток реципиента). Мы можем объяснить этого двумя обстоятельствами: во-первых, постепенным разведением в результате интраоперационной инфузионной терапии, а во-вторых – отсутствием повышения продукции этого цитокина в результате всех манипуляций до реперфузии. После реперфузии же постепенно концентрация этого цитокина имела монотонную тенденцию к увеличению с различной интенсивностью на разных сроках. Схожие тенденции мы отметили и при анализе динамики концентрации других цитокинов, что свидетельствует в пользу того, что реперфузия трансплантата имеет значительный генерализованный эффект на организм реципиента.

ИЛ4, динамика концентрации которого представлена на рисунке 9, продуцируется Т-клетками и тучными клетками. Именуемый ранее В-клеточным ростовым фактором I, ИЛ4 является ключевым регулятором гуморального адаптивного иммунитета и имеет много биологических функций: костимуляция пролиферации и дифференцировки В-клеток в плазматические клетки, селекция изотипа IgE и IgG. Кроме того, этот цитокин индуцирует дифференцировку наивных Т-хелперов ( $Th_0$  клеток) в  $Th_2$  клеток. Кроме провоспалительных эффектов ИЛ4 обладает и противовоспалительными: препятствует

дифференцировке Th<sub>1</sub>-клеток, ингибирует активность макрофагов и подавляет секрецию цитокинов этими клетками.

У всех больных обеих групп динамика этого цитокина была выражена ( $p < 0,0001$ ), различия между группами в динамике также были статистически значимы ( $p < 0,0001$ ). Таким образом, процедура ССЦ способствует снижению концентрации этого цитокина.

У больных группы сравнения начиная с 8-ми часов после реперфузии (что, как правило, соответствовало 4-м часам после завершения операции трансплантации) отмечалось нарастание концентрации ИЛ4 с достижением максимума (в изучаемом интервале времени) к пятым суткам. У больных основной группы постепенное нарастание концентрации было отмечено только после завершения процедуры. Статистически значимые различия с исходным уровнем мы наблюдали лишь через пять дней после реперфузии ( $p = 0,00027$ ), тем не менее на этом этапе концентрация ИЛ4 была ниже ( $p = 0,000029$ ), чем у больных группы сравнения.

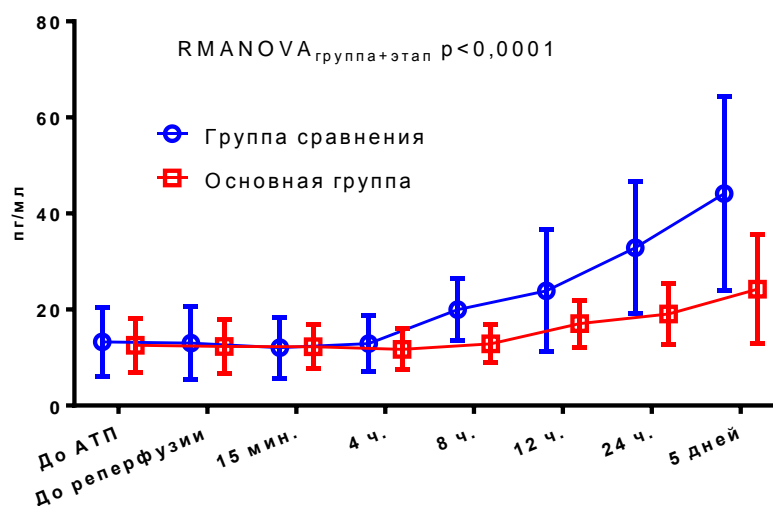


Рисунок 9. Профиль ИЛ4 у больных обеих групп.

ИЛ5 - В-клеточный ростовой фактор II, продуцируемый Т-хелперами, способствует созреванию с дифференцировки В-клеток, индуцируя конечную дифференцировку поздних В-клеток в плазматические клетки. Этот цитокин также известен как эозинофильный колониестимулирующий фактор, является ключевым посредником в активации эозинофилов и высвобождения

цитотоксических белков гранул. Динамика концентрации ИЛ5 (рисунок 10) в целом напоминала динамику ИЛ4. Между группами мы отметили статистически значимые различия ( $p=0,0003$ ). У больных группы сравнения с 4-го часа после реперфузии начинался постепенный рост концентрации ИЛ5 с максимумом на пятые сутки. У больных основной группы во время проведения процедуры концентрация ИЛ5 оставалась стабильной, сравнимой с начальным уровнем ( $p>0,3$ ), более того, статистически значимые отличия от исходного уровня были отмечены только через пять дней после реперфузии ( $p=0,000036$ ). В результате через пять дней после операции концентрация ИЛ5 у больных основной группы была значительно ( $p=0,00031$ ) ниже, чем у больных группы сравнения.

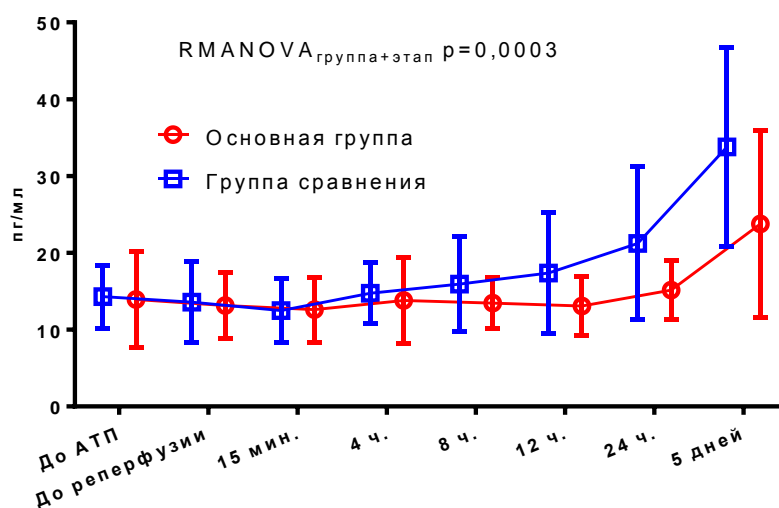


Рисунок 10. Профиль ИЛ5 у больных обеих групп.

ИЛ6 – один из основных провоспалительных цитокинов, продуцируемый Т- и В-клетками, а также макрофагами и фибробластами, связываясь со своим рецептором - гетеродимерным комплексом, стимулирует синтез белков острой фазы гепатоцитами. Этот цитокин (известный ранее, как В-клеточный стимулирующий фактор II) является кофактором при дифференцировке В-лимфоцитов (способствует переключению с IgM на IgG и является мощным фактором роста и дифференцировки В-клеток), стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и нейтрофилов, является антагонистом образования регуляторных Т-клеток.

Динамика концентрации ИЛ6 отличалась от динамики ИЛ2, ИЛ4 и ИЛ5 – рисунок 11. Уже начиная с 4-х часов после реперфузии у больных группы сравнения отмечалось повышение концентрации ИЛ6, которое к восьмому часу после реперфузии статистически значимо отличалось от исходного уровня ( $p=0,00028$ ). Своего максимума концентрация ИЛ6 достигла уже через 24 часа после реперфузии, а затем незначительно ( $p=0,47$ ) снизилась. У больных группы сравнения в результате проведения процедуры сорбции концентрация ИЛ6 оставалась стабильной на протяжении всего изучаемого периода ( $p>0,31$ ) и даже через пять дней после трансплантации не отличалась от концентрации от исходного уровня ( $p=0,099$ ), но выражено отличалась от группы сравнения ( $p<0,00001$ ). Общая динамика также статистически значимо различалась между группами ( $p<0,00001$ ).

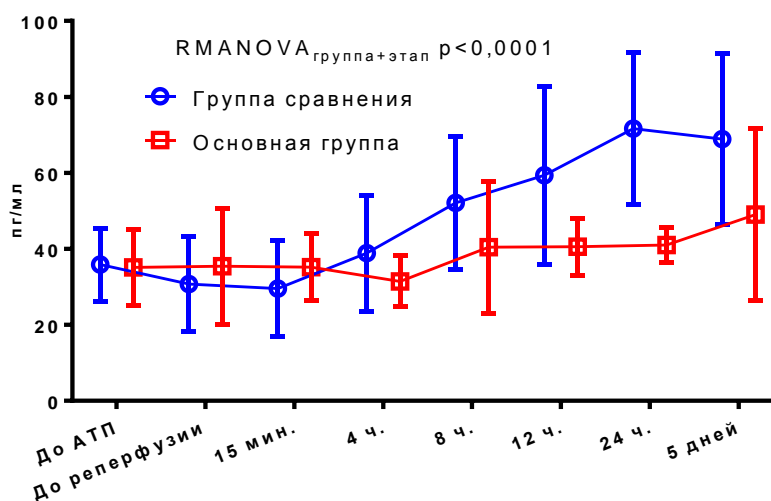


Рисунок 11. Профиль ИЛ6 у больных обеих групп.

ИЛ8 продуцируется моноцитами, эндотелиоцитами и фибробластами. Клетки-мишени этого цитокина – нейтрофилы, базофилы, Т-клетки. Относится к хемокинам подсемейства СХС и играет важную роль в системе нативного иммунитета. ИЛ-8, также известен как нейтрофильный хемотактический фактор, имеет две основные функции: он индуцирует хемотаксис гранулоцитов (в первую очередь нейтрофилов), а также индуцирует фагоцитоз и дегрануляцию.

Динамика концентрации ИЛ8 (рисунок 12) имела много общего с динамикой ИЛ6. Так, у больных группы сравнения к четвертому часу после



реперфузии начала повышаться и через восемь часов статистически значимо отличалась от исходного уровня ( $p=0,000029$ ). Своего максимума концентрация ИЛ8 достигла уже через 12 часов и далее оставалась относительно стабильной, а через пять дней после операции начала снижаться (статистически незначимо:  $p=0,77$ ). У больных группы сравнения концентрация ИЛ8 оставалась стабильной и не отличалась от исходного уровня ( $p>0,98$ ). В результате через пять дней после трансплантации сывороточный уровень в двух группах ИЛ8 значительно различался ( $p=0,0022$ ). Общая динамика концентрации ИЛ8 в двух группах также же выражено различалась ( $p<0,0001$ ).

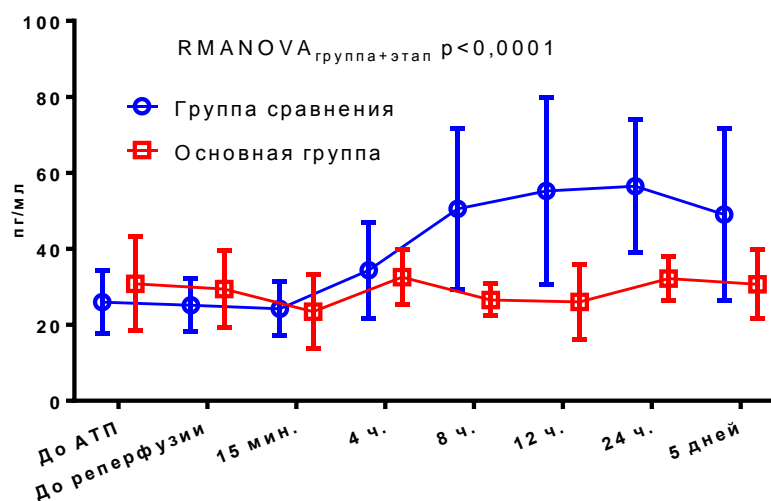


Рисунок 12. Профиль ИЛ8 у больных обеих групп.

ИЛ10, также известный как человеческий фактор, ингибирующий синтез цитокинов, является одним из основных противовоспалительных цитокинов. Он продуцируется  $Th_2$ -клетками, тучными клетками и Т-регуляторными клетками, а его основные мишени – Т-хелперы 1 типа. ИЛ10 – плеiotропный регулятор воспаления. Он подавляет экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости II класса на  $Th_1$  клетках и ко-стимулирующих молекул на макрофагах.

Общая динамика ИЛ10 (рисунок 13) в двух группах различалась статистически значимо ( $p=0,001$ ). У больных группы сравнения концентрация ИЛ10 оставалась стабильной ( $p>0,97$ ) и статистически значимо отличалась от исходного уровня только через 24 часа после реперфузии ( $p=0,017$ ), после чего (к

пятым суткам) она вновь снизилась до уровня, сравнимого с исходным ( $p=0,65$ ). У больных основной группы концентрация ИЛ10 также оставалась относительно стабильной в течение всего анализируемого периода ( $p>0,55$ ) и через пять дней после трансплантации была сравнима с группой сравнения ( $p=0,81$ ). Тем не менее в течение всего периода у больных основной группы концентрация ИЛ10 была ниже, чем у больных группы сравнения. Через 8 и 12 часов после реперфузии концентрации в группах значительно различались:  $p=0,0066$  и  $p=0,0091$  соответственно.

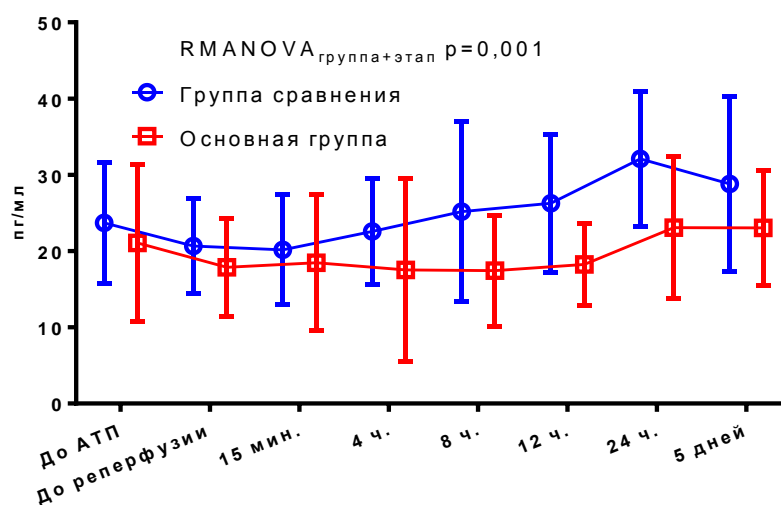


Рисунок 13. Профиль ИЛ10 у больных обеих групп.

ИЛ12 продуцируется дендритными клетками, макрофагами, нейтрофилами. Клетками мишенями являются Т-клетки. Этот цитокин участвует в дифференцировке наивных Т-клеток в  $Th_1$  – клетки и стимулирует продукцию  $\gamma$ -интерферона и ФНО $\alpha$ . ИЛ12 опосредует усиление цитотоксической активности естественных киллеров клеток и CD8<sup>+</sup> цитотоксических Т-лимфоцитов.

Общая динамика концентрации ИЛ12 (рисунок 14) различалась в группах статистически значимо ( $p<0,0001$ ). В группе сравнения уже через 15 минут после реперфузии рост концентрации относительно исходного уровня был статистически значим ( $p=0,047$ ). Далее отмечался дальнейший рост концентрации, которая достигла максимума к концу первой суток после операции. Дальше уровень ИЛ12 оставался относительно стабильным. В основной группе после возобновления кровотока в трансплантате также был

зафиксирован значительный подъем концентрации ИЛ12 относительно исходного уровня ( $p=0,044$ ), что с учетом результатов в группе сравнения свидетельствует в пользу значительного раннего выброса этого цитокина в результате реперфузии. Тем не менее, на фоне проведения процедуры сорбции уровень этого цитокина оставался относительно стабильным ( $p>0,48$ ). Начиная с четырех часов после реперфузии в основной группе концентрация ИЛ12 была ниже, чем у больных группы сравнения. Через пять суток после операции в основной группе концентрация ИЛ12 увеличилась относительно исходного уровня ( $p=0,0034$ ), тем не менее, была значительно ниже, чем в группе сравнения ( $p<0,0001$ ).

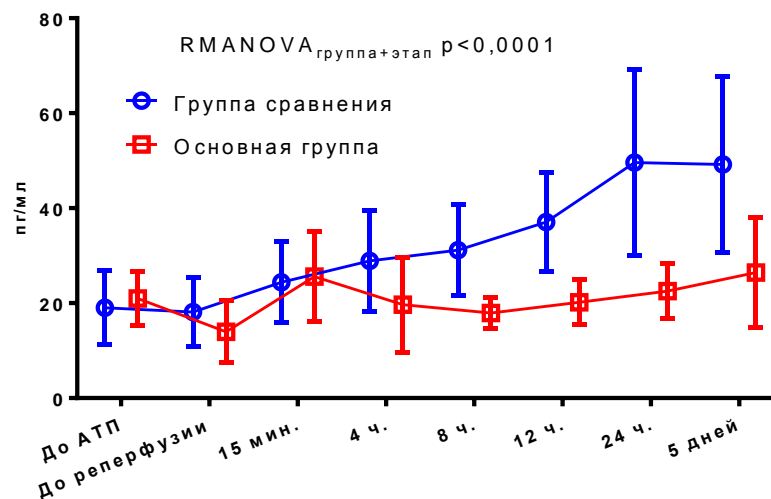


Рисунок 14. Профиль ИЛ12 у больных обеих групп.

ФНО $\alpha$  продуцируется макрофагами, тучными клетками, лимфоцитами. Это многофункциональный провоспалительный цитокин, воздействующий на макрофаги, гранулоциты, CD4+лимфоциты, НК-клетки, эндотелиоциты. ФНО $\alpha$  стимулирует продукцию белков острой фазы гепатоцитами, а также выделение провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8,  $\gamma$ -интерферона), является мощным хемоаттрактантом для нейтрофилов, стимулирует экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках, способствуя миграции нейтрофилов.

Общая динамика концентрации ФНО $\alpha$  в группах различалась статистически значимо –  $p<0,0001$  (рисунок 15). В группе сравнения через 8 часов после реперфузии рост концентрации этого цитокина стал статистически значимым –

$p=0,00003$ . Своего максимума концентрация достигла к первым суткам и далее оставалась относительно стабильной с небольшой тенденцией к снижению ( $p=0,99$ ). В основной группе концентрация ФНО $\alpha$  оставалась относительно стабильной и через пять дней после реперфузии незначительно отличалась от исходного уровня ( $p=0,17$ ). Начиная с восьми часов после реперфузии концентрации в группах различались статистически значимо ( $p<0,00003$ ).

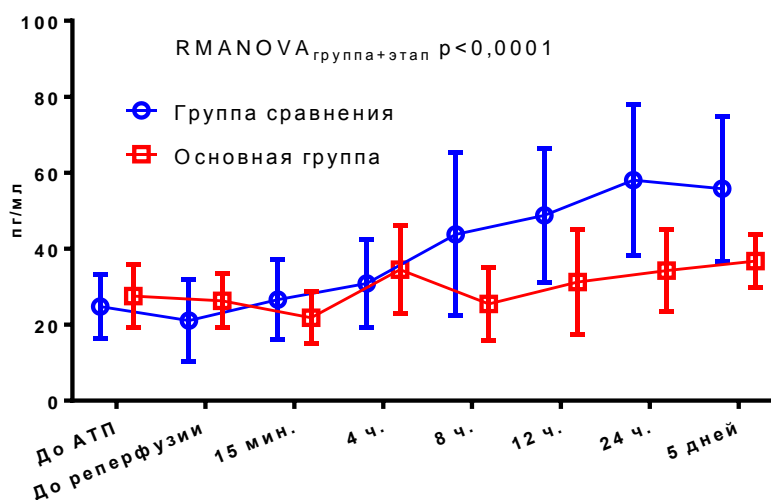


Рисунок 15. Профиль ФНО $\alpha$  у больных обеих групп.

Таким образом, мы можем заключить, что реперфузия трансплантата инициирует системный воспалительный ответ, который проявляется повышением концентрации цитокинов в крови реципиента. При этом, ССЦ позволяет существенно уменьшить выраженность цитокинового ответа.

### 3.3. Субпопуляции лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде

С целью анализа особенностей активации клеточного звена иммунитета при трансплантации почки мы проанализировали различия субпопуляций лимфоцитов у здоровых добровольцев, больных ХБП 5Д стадии, получающих лечение программным гемодиализом, а также реципиентов почечного трансплантата в двух группах через пять суток после трансплантации – рисунок 16.

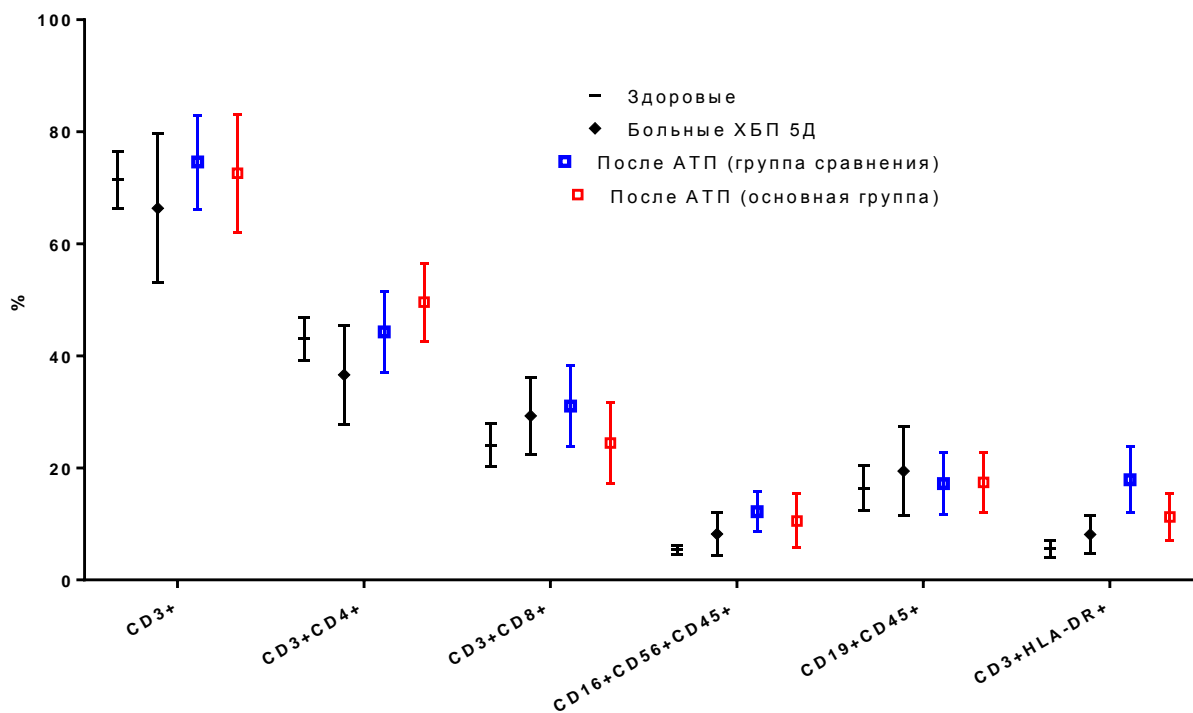


Рисунок 16. Субпопуляции лимфоцитов, доли HLA-DR<sup>+</sup> клеток и естественных киллеров у здоровых добровольцев, диализных больных и реципиентов почечного трансплантата обеих групп.

При сравнении субпопуляций клеток больных с ХБП 5Д, получающих лечение диализом, с показателями здоровых добровольцев, видно, что значительно возрастает вариабельность. Это свидетельствует о высокой неоднородности популяции диализных пациентов. При этом, при статистически незначимой тенденции к сокращению доли CD3 клеток ( $p=0,137$ ), значительно сокращается доля CD4 клеток ( $p=0,009$ ) и возрастает доля CD8 клеток ( $p=0,02$ ). В результате такой разнонаправленной динамики снизился иммунорегуляторный индекс (отношение CD4/CD8) –  $p=0,017$  (рисунок 17).

Кроме того, у больных на диализе возрастает количество естественных киллеров ( $p=0,025$ ) и отмечается тенденция к некоторому увеличению доли В-клеток ( $p=0,135$ ), а также увеличению экспрессии HLA-DR CD3-клетками ( $p=0,072$ ).

Таким образом, у больных, получающих программный гемодиализ, формируется склонность к иммунодефицитному состоянию, на фоне увеличения

доли активированных CD3-клеток и эффекторных клеток – CD8+ и естественных киллеров.

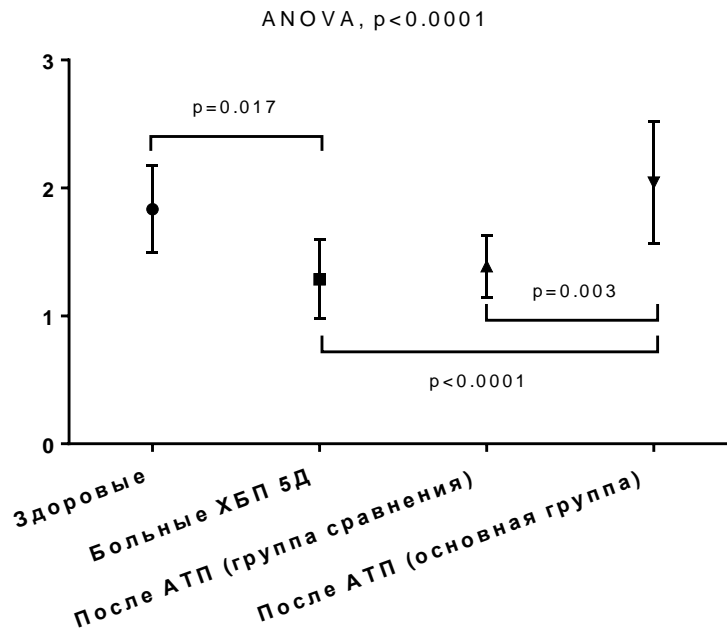


Рисунок 17. Отношение CD4/CD8 у здоровых добровольцев, гемодиализных больных и реципиентов почечного трансплантата обеих групп.

Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов после типичной трансплантации почки была изучена нами на примере больных группы сравнения, у которых применялся стандартный протокол иммуносупрессии. Так, на пятые сутки после операции доля CD3 клеток статистически значимо увеличивается ( $p=0,017$ ) за счет, главным образом, роста доли CD4-клеток ( $p=0,002$ ) при незначительном увеличении доли CD8-клеток ( $p=0,439$ ). В результате иммунорегуляторный индекс незначительно возрос ( $p=0,236$ ). Также увеличилось содержание естественных киллеров ( $p=0,002$ ) и незначительно уменьшилась доля В-клеток ( $p=0,277$ ). Экспрессия HLA-DR на CD3-клетках значительно повысилась ( $p<0,0001$ ).

Таким образом, не смотря на иммуносупрессивную терапию, у больных после трансплантации почки отмечается признаки активации как нативного, так и адаптивного иммунитета.

У реципиентов основной группы (у которых в раннем послеоперационном периоде проводилась селективная сорбция цитокинов), доля CD3+ клеток была сопоставима ( $p=0,555$ ) с реципиентами группы сравнения и здоровыми

добровольцами ( $p=0,724$ ), будучи несколько выше, чем в среднем у больных на гемодиализе ( $p=0,068$ ). Доля CD4 по отношению к больным с ХБП 5Д ( $p<0,0001$ ) и здоровым добровольцами ( $p=0,008$ ) возросла значительно, и была выше, чем у больных группы сравнения ( $p=0,027$ ). При этом, доля CD8 клеток практически не отличалась от этого показателя у здоровых добровольцев ( $p=0,863$ ) и была ниже, чем у реципиентов в группе сравнения ( $p=0,004$ ), а также, чем у больных на гемодиализе ( $p=0,03$ ). В результате значительно возрос иммунорегуляторный индекс: по сравнению с реципиентами группы сравнения ( $p=0,003$ ) и больными на гемодиализе ( $p<0,0001$ ). У больных основной группы иммунорегуляторный индекс был несколько выше, но статистически значимо не отличался от здоровых добровольцев ( $p=0,066$ ).

Доля естественных киллеров была несколько ниже, чем у в группе сравнения ( $0,184$ ), а доля В-клеток – не различалась ( $p=0,928$ ). Несмотря на то, что экспрессия HLA-DR на CD3 клетках у больных основной группы была выше, чем у здоровых добровольцев ( $p=0,0002$ ) и больных на гемодиализе ( $p=0,028$ ), этот показатель был ниже, чем у больных группы сравнения ( $p=0,0001$ ).

Таким образом, у больных после трансплантации почки отмечается активация клеточного звена как нативного, так и адаптивного иммунитета. Изменений доли В-клеток в раннем послеоперационном периоде мы не отметили. Применение сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде позволяет несколько уменьшить выраженность активации клеточного иммунитета, что выражается в сокращении доли эффекторных клеток и доли активированных лимфоцитов (снижении экспрессии молекул HLA-DR на CD3-клетках).

#### **3.4. Морфофункциональное состояние мононуклеаров периферической крови у реципиентов почечного трансплантата в раннем посттрансплантационном периоде**

Оценка морфометрических показателей клеток обладает не только высокой научной ценностью в современных исследованиях, но и значительной клинической информативностью. Этот метод позволяет в онлайн режиме оценить

функциональное состояние, как клеток иммунной системы, так и других клеток крови, поскольку их размерные показатели и поверхностная архитектура, изменения оптической плотности имеют тесную связь с активностью. При этом преимуществом компьютерной фазометрии является возможность оценки витального морфофункционального состояния нефиксированных и неокрашенных клеток.

Типичные фазово-интерференционные портреты живых клеток приведены на рисунках 18 – 20. Популяции лимфоцитов имеют свои особенности. Так, моноциты представляются большими клетками округлой или неправильной (за счет мембранных образований, отмечаемых в ряде случаев) формы с крупным ядром и широким ободком цитоплазмы – рисунок 18.

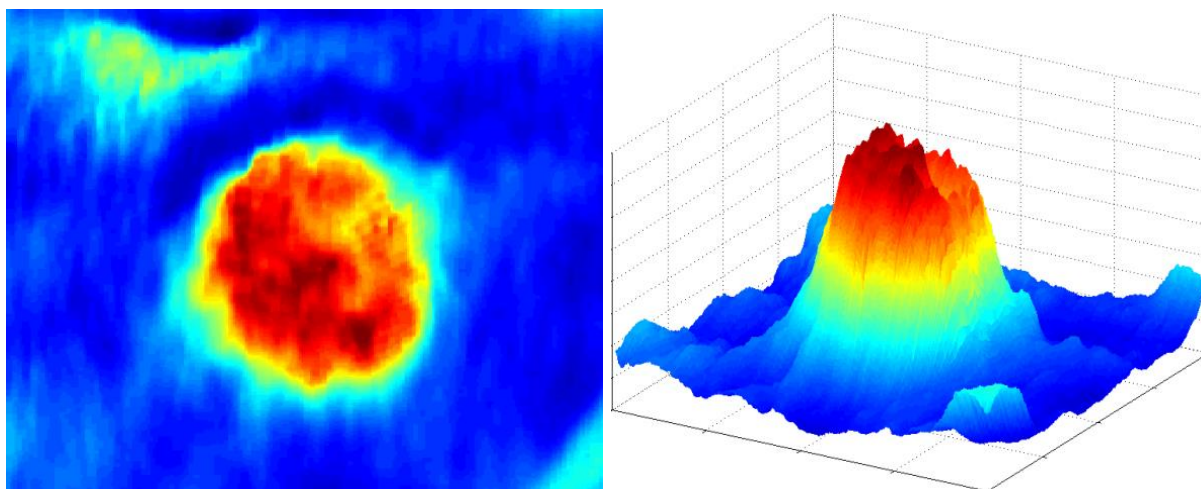


Рисунок 18. Типичный фазово-интерференционный портрет живого моноцита периферической крови (топограмма и трехмерная реконструкция в псевдоцвете).

T-лимфоциты в покое представляются как клетки округлой или овальной формы, на топограмме которых определяется большое плотное (с высокой концентрацией белков) ядро и узкий ободок цитоплазмы – рисунок 19. В-лимфоциты имеют большие размеры и менее выраженную рельефность поверхности – рисунок 20.

При анализе фазово-интерференционных изображений следует учитывать, что размерные параметры фазового портрета содержат информацию не только о пространственно-объемных характеристиках клетки, но и ее оптических



свойствах, в частности о внутриклеточной анизотропии. Величина показателя преломления, измеряемая в каждой точке цитобъекта, непосредственно зависит от концентрации, химического состава, агрегатного состояния внутриклеточного вещества, наличия или отсутствия органелл и включений. Изменение любого из указанных условий находит отражение в характерных локальных трансформациях фазового изображения клетки.

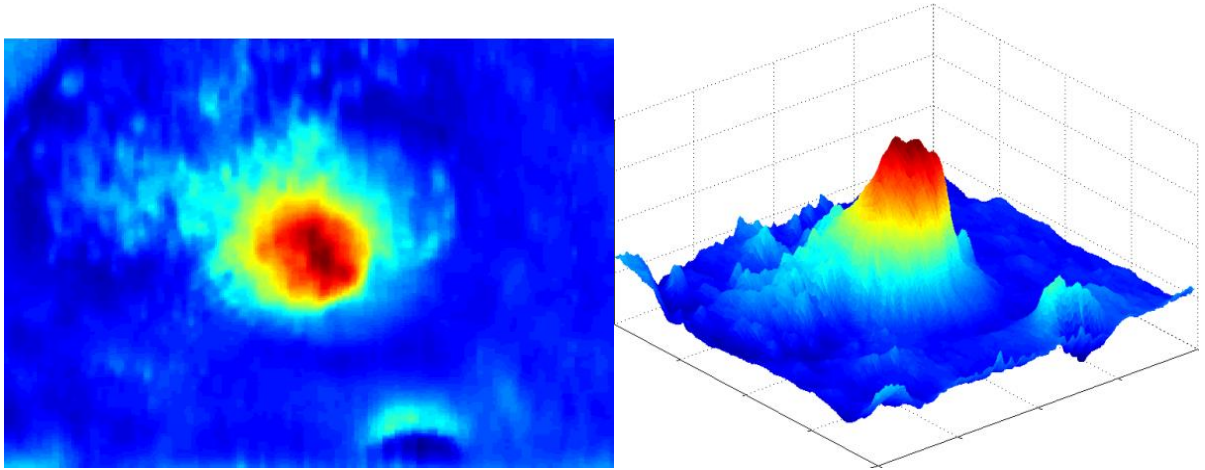


Рисунок 19. Типичный фазово-интерференционный портрет живого Т-лимфоцита периферической крови (топограмма и трехмерная реконструкция в псевдоцвете).

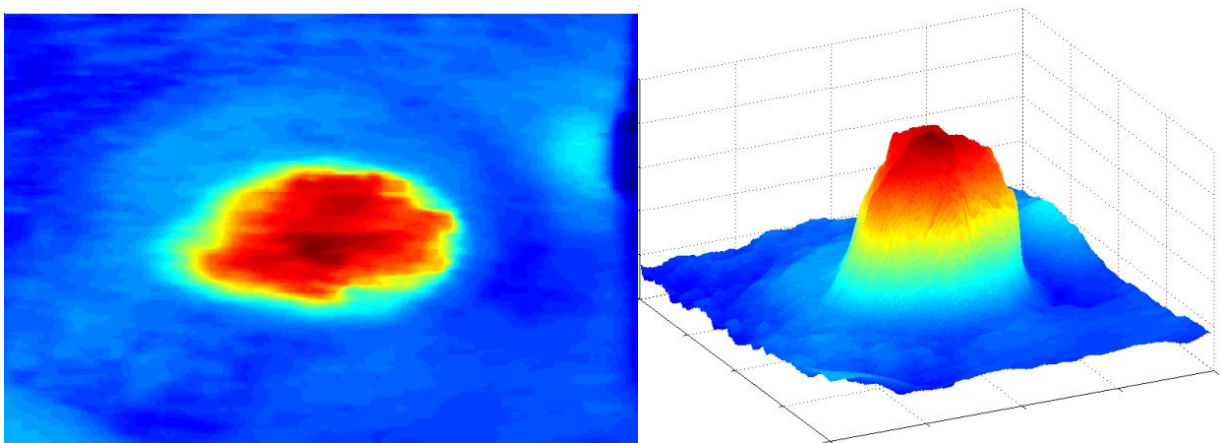


Рисунок 20. Типичный фазово-интерференционный портрет живого В-лимфоцита периферической крови (топограмма и трехмерная реконструкция в псевдоцвете).

Следует отметить, что измеряемые при компьютерной фазовой морфометрии оптико-геометрические параметры позволяют количественно оценить неоднородность популяций различных клеток периферической крови. Для каждого вида клеток характерны определенные размерные показатели, по которым они могут быть идентифицированы. Изменение морфометрических параметров, в частности, диаметра, периметра и площади с оценкой фазовой высоты, и объема, отражает уровень функциональной активности клеток.

Основным компонентом в фазово-интерференционного портрете мононуклеарных клеток является ядро. Гетерохроматин располагается в ядре равномерно с эухроматином, или же образует крупные конгломераты по периферии и в центре ядра. В процессе дифференцировки клеток меняются свойства хроматина: конденсированный хроматин метаболически менее активен в отношении синтеза ДНК по сравнению с его диффузной формой. Таким образом, цитоморфометрические показатели характеризуют светооптические свойства ядерных структур мононуклеаров, их величины несут информацию о функциональных изменениях хроматина и предоставляют возможность оценивать пролиферативную активность клеток. Следовательно, морфометрические параметры, отражающие количественные и качественные изменения клеток иммунной системы, могут служить информативными и высокочувствительными критериями различных нарушений иммунного гомеостаза, оценка в динамике которых является очень важной для реципиентов почечного трансплантата, особенно на ранних сроках послеоперационного периода.

Информативным показателем для эффективной оценки функционального состояния мононуклеаров, может служить показатель функциональной активности (ядра) – ПФА. При расчете ПФА учитываются количества клеток с различной фазовой высотой (<1,5 мкм; 1,5 - 2,0 мкм; 2,0 - 2,5 мкм; > 2,5 мкм) – см. раздел 2.5. Этот показатель представляет собой количественную оценку ядерного полиморфизма циркулирующей популяции лимфоцитов. На первом этапе мы провели сравнительную оценку ПФА у практически здоровых добровольцев и

больных с ХБП 5Д стадии, получающих лечение программным гемодиализом – рисунок 21.

У больных ХБП 5Д стадии, получающих лечение гемодиализом происходит снижение функциональной активности клеток по сравнению со здоровыми добровольцами, что отражается в статистически значимом ( $p=0,0325$ ) снижении показателя ПФА на 18,2%. Следует отметить, что мы отметили статистически значимую связь этого показателя с возрастом среди больных ХБП 5Д стадии – рисунок 22.

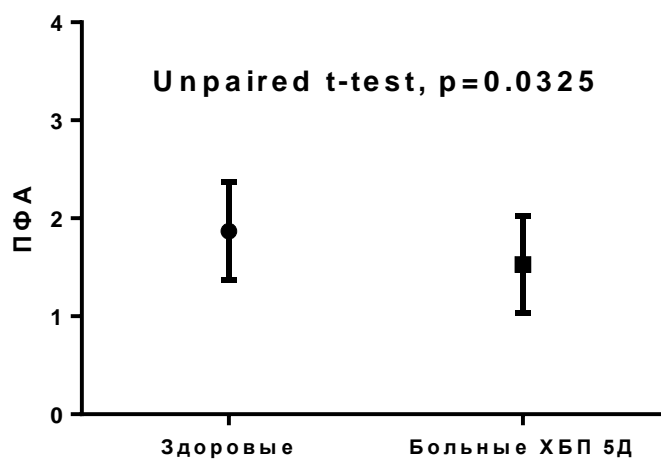


Рисунок 21. Показатель функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови у практически здоровых добровольцев и больных ХБП 5Д стадии на гемодиализе.

На клеточной мембране существует электрический поверхностный потенциал, который обусловлен особенностями клеточной стенки и активности клетки. Поверхностный электрический заряд клетки меняется при изменении ее метаболизма. Таким образом, электрический потенциал клетки соответствует ее энергетическому потенциалу и меняется при изменении активности. Одним из информативных и относительно новых перспективных способов оценки уровня активности иммунных клеток является анализ изменений потенциала клеточной мембраны с помощью компьютерного микроэлектрофореза.

Мы оценили особенности электрического потенциала мембраны мононуклеарных клеток периферической крови при помощи измерения

электрофоретической подвижности у практически здоровых добровольцев и больных с ХБП 5Д стадии (рисунок 23).

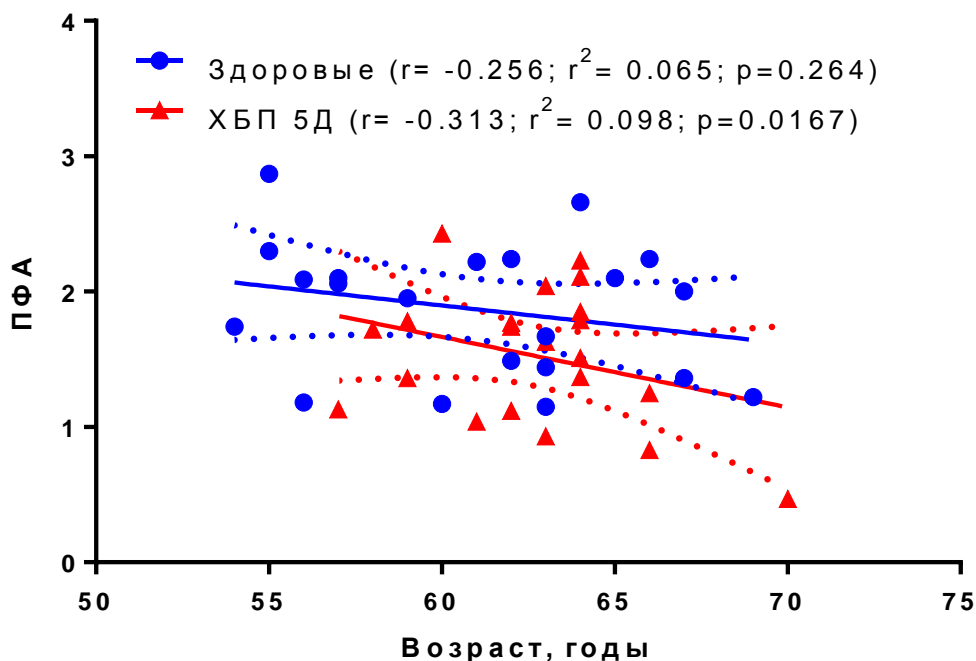


Рисунок 22. Зависимость показателя ПФА мононуклеарных клеток периферической крови у практически здоровых добровольцев и больных ХБП 5Д стадии на гемодиализе от возраста.

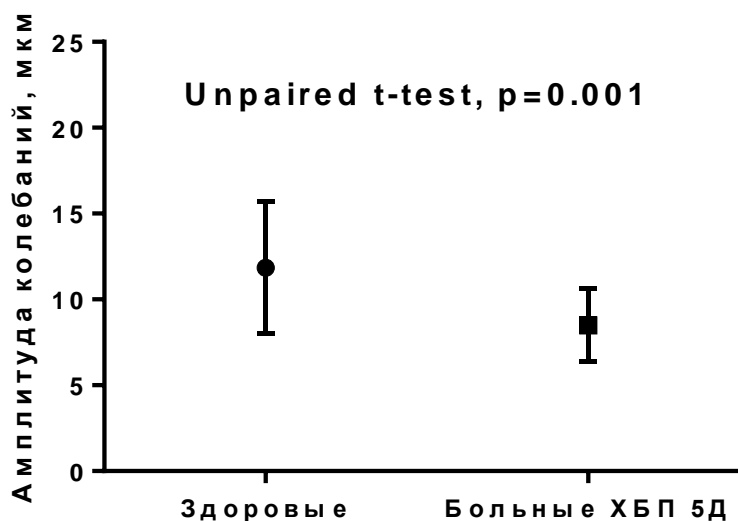


Рисунок 23. Электрофоретическая подвижность мононуклеарных клеток периферической крови у практически здоровых добровольцев и больных с ХБП 5Д стадии.

Видно, что больным с ХБП 5Д стадии свойственно значительное снижение амплитуды колебаний мононуклеаров периферической крови в электрическом поле. При этом и у относительно здоровых пациентов и больных ХБП отмечается отрицательная связь этого показателя с возрастом – рисунок 24.

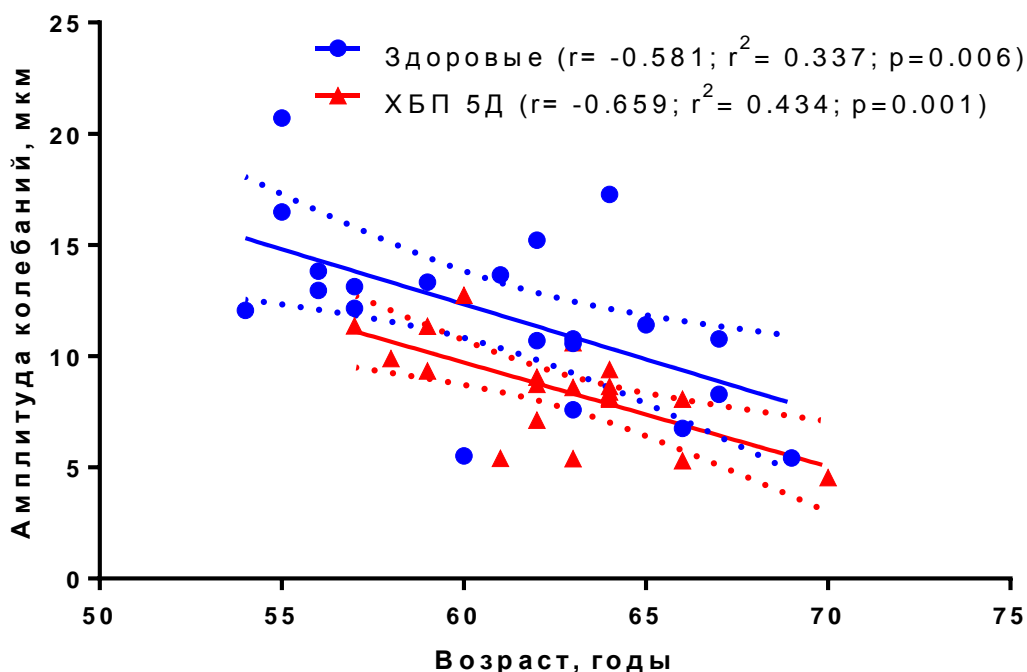


Рисунок 24. Связь электрофоретическая подвижность мононуклеарных клеток периферической крови у практически здоровых добровольцев и больных с ХБП 5Д ст. в зависимости от возраста.

Уменьшение электрофоретической подвижности, а также показателя функциональной активности свидетельствует о снижении активности иммунных клеток у больных с ХБП. Причем, чем старше пациент, тем это снижение выражено сильнее.

В послеоперационном периоде исследование мононуклеаров периферической крови проводили у реципиентов, составивших две группы. В группе сравнения после аллотрансплантации трупной почки реципиенты получали стандартную терапию, в основной группе в комплекс лечебных процедур дополнительно была включена селективная сорбция цитокинов. Динамика показателя функциональной активности ядра мононуклеарных клеток представлена на рисунке 25.

Полученные данные показали, что после трансплантации на фоне иммуносупрессивной терапии отмечено небольшое снижение ПФА у больных обеих групп. Позднее у реципиентов группы сравнения отмечалось постепенное нарастание показателя функциональной ядра мононуклеарных клеток, что свидетельствует о повышении их активности в послеоперационном периоде. У больных основной группы, получивших сеанс селективной сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде, ПФА оставался относительно стабильным с тенденцией к снижению. Различия в динамике между группами были статистически значимы  $p=0,009$ .

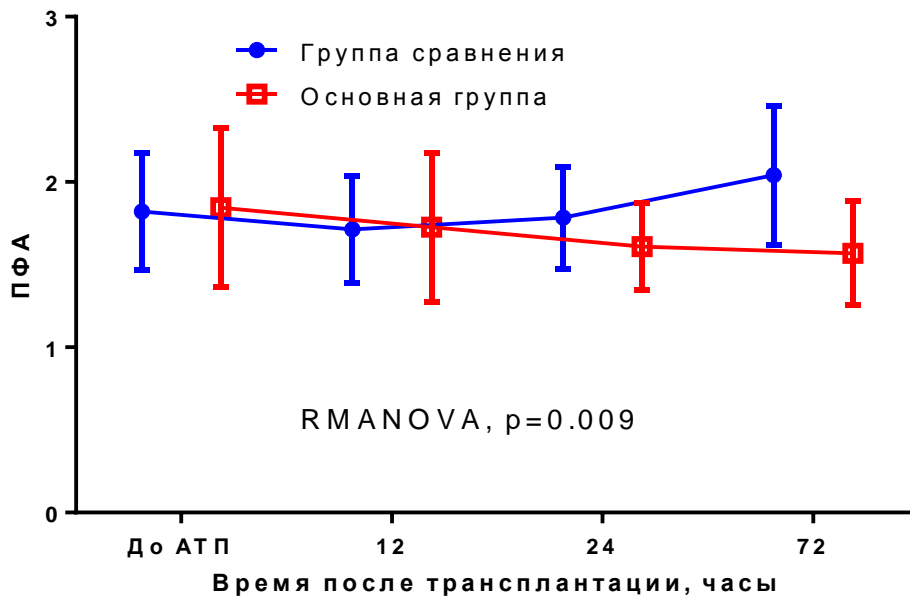


Рисунок 25. Динамика показателя функциональной активности ядра у реципиентов после аллотрансплантации трупной почки в двух группах.

Анализ динамики электрокинетической активности мононуклеаров у реципиентов почечного аллотрансплантата в послеоперационном периоде представлен на рисунке 26.

В группе реципиентов, получавших процедуры селективной сорбции цитокинов, амплитуда колебаний лимфоцитов постепенно снижалась, демонстрируя стабилизацию морфофункционального состояния клеток на фоне комплексной иммуносупрессии. В группе сравнения, где сорбция цитокинов не проводилась, динамика до 24 часов в целом была похожа, однако, отмечена

тенденция к росту электрофоретической подвижности мононуклеаров к 72-м часам послеоперационного периода. Не смотря на схожесть динамики этого показателя на первых этапах после трансплантации, различия к третьим суткам все же обусловили статистически значимые различия между группами ( $p=0,0147$ ).

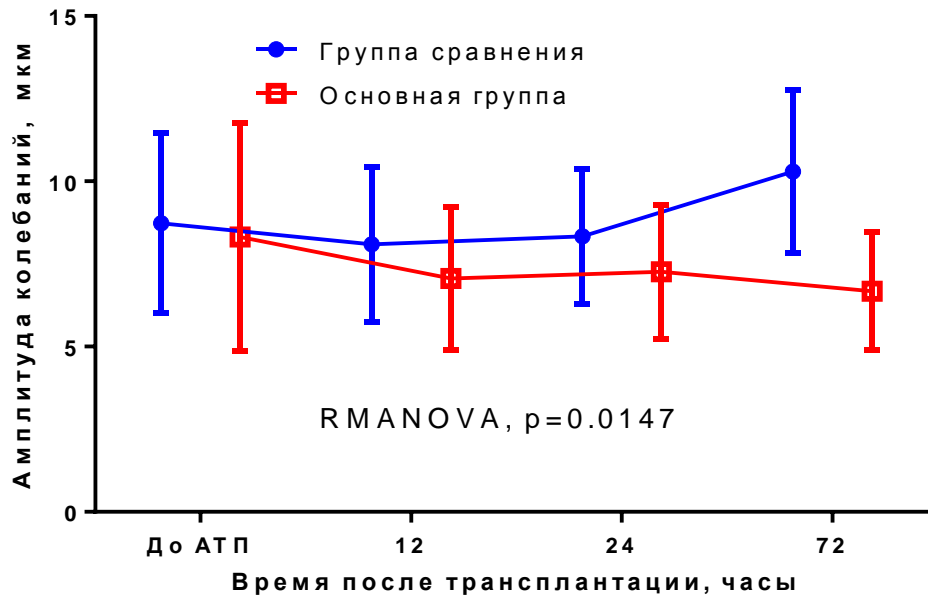


Рисунок 26. Динамика амплитуды колебаний мононуклеаров периферической крови у реципиентов после аллотрансплантации трупной почки.

Полученные результаты позволяют заключить, что популяция функционально активных мононуклеарных клеток обладает вполне определенными морфофункциональными характеристиками, а именно показателем функциональной активности ядра и средней амплитуды колебаний (электрофоретической подвижности). Параметры морфофункционального состояния мононуклеарных клеток периферической крови могут быть количественно оценены. Динамика этих биофизических показателей характеризуют перестройку иммунных клеток, отражая функциональный потенциал клеточного звена иммунитета.

Представленные результаты свидетельствуют, что процедуры селективной сорбции цитокинов у реципиентов почечного аллотрансплантата оказывают положительное влияние на мононуклеарные клетки. Действие этого

экстракорпорального метода непосредственным образом связано со снижением активности и стабилизацией морфофункционального состояния клеток иммунной системы и, соответственно, адекватным ответом на аллоантигенную стимуляцию в виде почечного трансплантата и проводимую иммуносупрессию.



## **ГЛАВА 4. КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕЛЕКТИВНОЙ СОРБЦИИ ЦИТОКИНОВ ПРИ КОРРЕКЦИИ СИНДРОМА ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ И РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА СТАРШЕЙ ВОЗРАСТНОЙ ГРУППЫ**

Из 60 обследованных нами реципиентов ПАТ в раннем послеоперационном периоде диагностировали 23 случая дисфункции трансплантата: 10 (33,3%) случаев в основной группе и 13 (43,3%) случаев в группе сравнения. Пациентам проводили рутинные лабораторные и инструментальные исследования для выявления причин дисфункции почечного трансплантата: динамическая оценка азотемии, протеинурии, скорости клубочковой фильтрации, ультразвуковое исследование с оценкой внутриорганный кровотока. Эти исследования дополнялись компьютерной фазовой цитоморфометрии мононуклеаров периферической крови. Дисфункцию трансплантата диагностировали, в случае если у пациентов была «отсроченная» функция: потребность в сеансах гемодиализа в послеоперационном периоде.

После исключения инфекционных и хирургических осложнений для верификации диагноза проводилась транскутанная биопсия почечного трансплантата. У больных с нормальной функцией трансплантата выполнялась протокольная биопсия почечного трансплантата на 30-е сутки послеоперационного периода (перед выпиской из стационара).

### **4.1. Динамика клинических и лабораторных показателей в раннем послеоперационном периоде**

Все трансплантаты сохранили свою функцию в течение месяца после трансплантации. Доли больных с первичной и отсроченной функцией (33,3% в основной группе и 43,3% - в группе сравнения,  $\chi^2$   $p=0,596$ ) не различались. Несмотря на это, мы отметили значительные различия в динамике других показателей.

Одним из показателей функции трансплантата на раннем послеоперационном периоде случит динамика диуреза. У больных обеих групп с отсроченной функцией трансплантата диурез на ранних сроках был недостаточный, что было одним из показаний к проведению гемодиализа – рисунок 27.

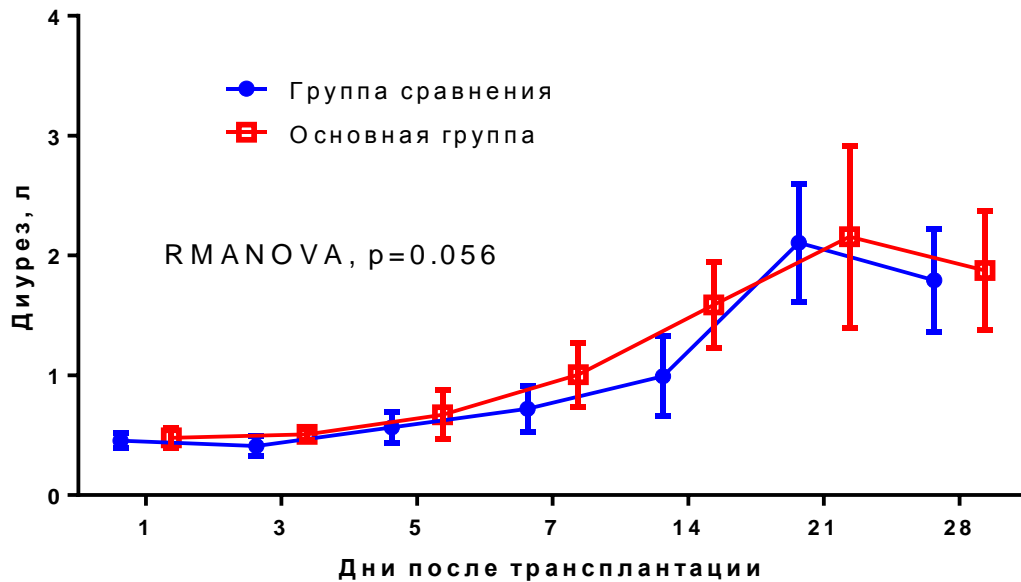


Рисунок 27. Динамика суточного диуреза у реципиентов обеих групп с отсроченной функцией трансплантата.

У больных обеих групп постепенно происходило нарастание суточного диуреза. При этом у больных основной группы темп нарастания диуреза был несколько больше: к концу первой недели средний диурез превышал литр, тогда как в группе сравнения это происходило лишь к концу второй недели. Тем не менее, различия не достигли необходимого уровня статистической значимости ( $p=0,056$ ).

Тем снижения концентрации креатинина сыворотки крови был значительно ( $p=0,001$ ) выше у больных основной группы (рисунок 28). У больных группы сравнения уверенное снижение креатинина крови началось только к концу первой недели. Немонотонную динамику концентрации креатинина у больных группы сравнения можно объяснить проведением сеансов гемодиализа, которые приводили к закономерному, но временному снижению.

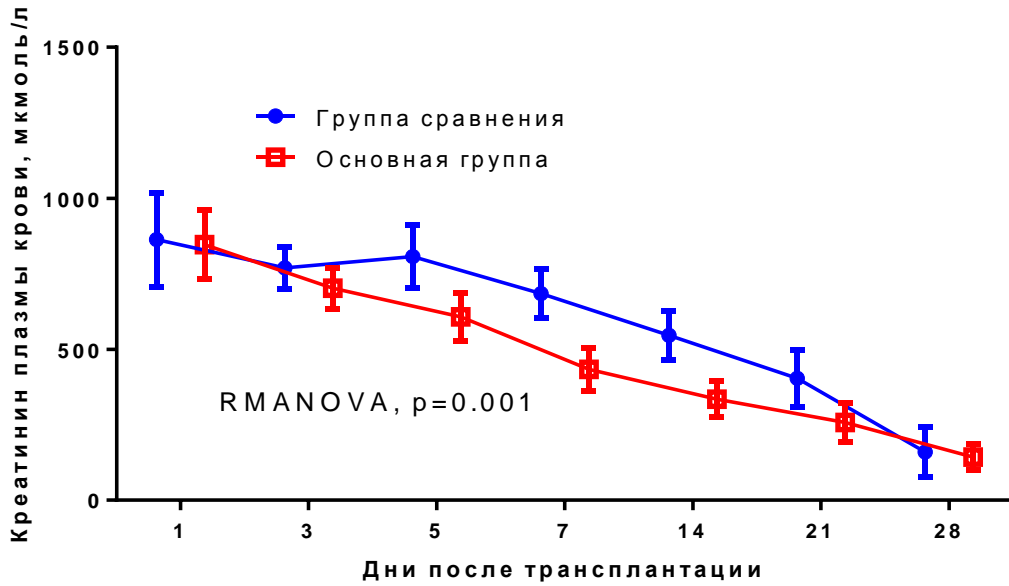


Рисунок 28. Динамика концентрации креатинина плазмы крови у реципиентов обеих групп с отсроченной функцией трансплантата.

Уверенное снижение концентрации креатинина у больных основной группы было обусловлено хорошим темпом нарастания скорости клубочковой фильтрации, который был выше ( $p=0,0073$ ), чем у больных группы сравнения – рисунок 29.

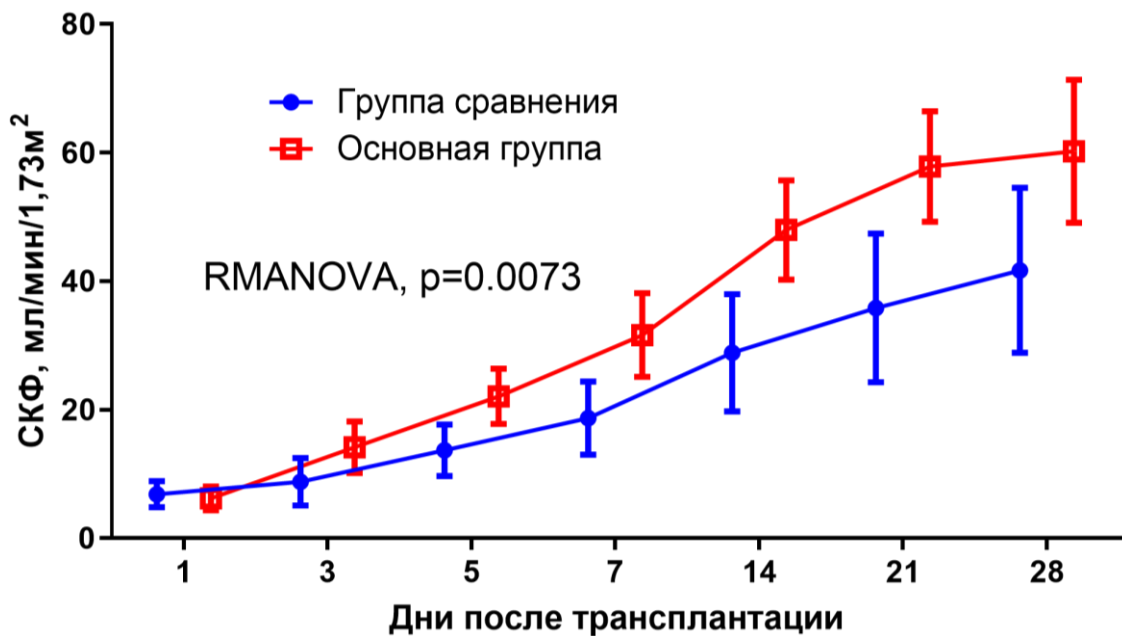


Рисунок 29. Динамика скорости клубочковой фильтрации у реципиентов обеих групп с отсроченной функцией трансплантата.

Несмотря на то, что проведение селективной сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде принципиальным образом не изменило характер

начальной функции трансплантата, срок ее восстановления был значительно короче у больных основной группы.

У больных с хорошей начальной функцией трансплантата с первых суток после операции отмечалось быстрое нарастание суточного диуреза – рисунок 30.

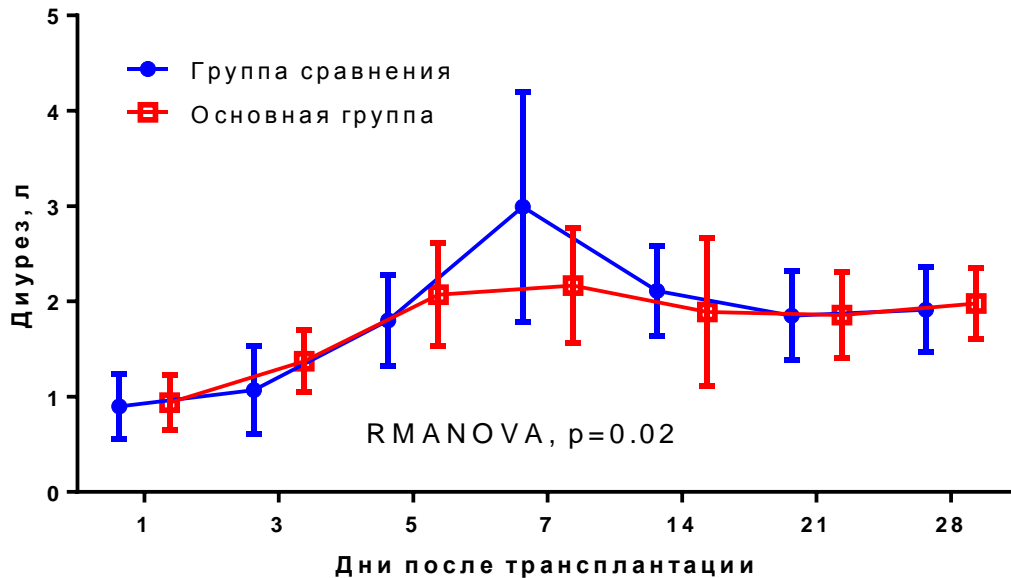


Рисунок 30. Динамика скорости клубочковой фильтрации у реципиентов обеих групп с хорошей начальной функцией трансплантата.

В целом, динамика нормализации суточного диуреза в группах была очень похожа. Тем не менее, у части реципиентов группы сравнения мы отметили эпизод полиурии, которые требовал тщательно спланированной массивной инфузионной терапии. Как правило, это происходило в период 7-14 суток. У больных основной группы нарастание диуреза было несколько более физиологично. В результате различия между группами оказались статистически значимы.

У больных обеих групп происходила быстрая нормализация концентрации креатинина в крови. При этом, у больных основной группы ее темп был значительно выше ( $p < 0,0001$ ), особенно на начальных этапах послеоперационного периода – рисунок 31.

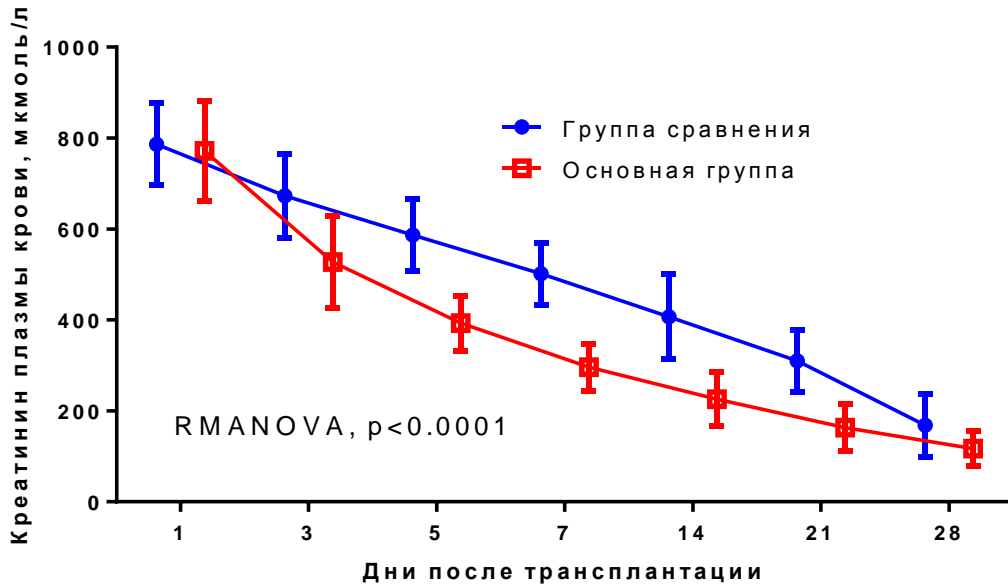


Рисунок 31. Динамика концентрации креатинина плазмы крови у реципиентов обеих групп с хорошей начальной функцией трансплантата.

Темп нарастания скорости клубочковой фильтрации (рисунок 32) был также выше у больных основной группы ( $p=0,033$ ), особенно это заметно с седьмых суток после трансплантации.

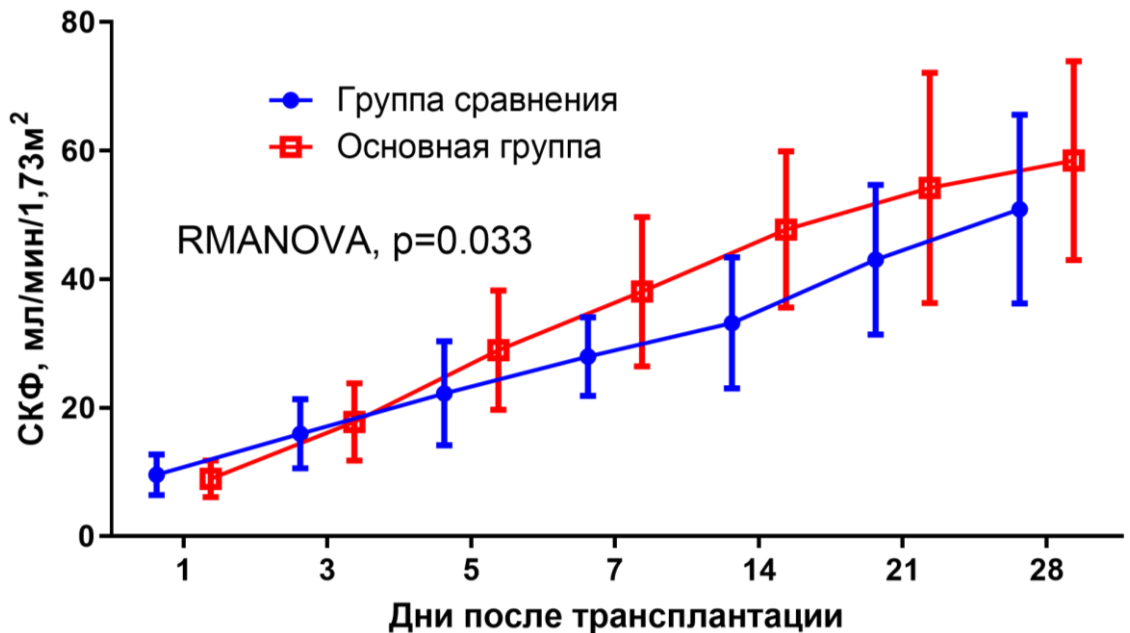


Рисунок 32. Динамика скорости клубочковой фильтрации у реципиентов обеих групп с хорошей начальной функцией трансплантата.

Таким образом, комплексное действие селективной сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде способствует снижению тяжести

ишемического и реперфузионного повреждения и улучшению функции трансплантата.

Приведем два клинических примера.

**Клинический пример 1.** Больной Н., 1948 г.р. (65 лет на момент трансплантации), с диагнозом хронический гломерулонефрит, хроническая болезнь почек 5Д стадии, артериальная гипертензия, миокардиодистрофия, анемия, наблюдается в МОНИКИ с 2004 г.

Считает себя больным в течение более 10 лет, когда при обследовании выявили высокие значения артериального давления, протеинурию.

Ухудшение состояния с 2011 г., когда отмечен монотонный рост креатинина, мочевины, протеинурии. Проводилась консервативная терапия без значительного эффекта. В 2012 году в связи со стойким снижением СКФ до 10-11 мл/мин. и развитием ХБП 5Д стадии, начато лечение перитонеальным диализом с использованием низко- и среднеосмолярных растворов общим объемом 8 литров в сутки. В 2013г. перенес эпизод диализного перитонита.

В октябре 2013 года выполнена аллотрансплантация трупной почки с несовпадением по трем HLA (A, B, DR) антигенам от донора 49 лет, умершего от острого нарушения мозгового кровообращения. Была диагностирована смерть головного мозга, изъятие почек проводилось при работающем сердце. Срок «холодовой» консервации составил 15 часов. Иммуносупрессивная терапия включала такролимус, микофенолата мофетил, преднизолон, индукция осуществлялась такролимусом, базиликсимабом, метилпреднизолоном согласно протоколу. Предсуществующих антител не было.

В первые часы после трансплантации была проведена селективная сорбция цитокинов, которая продолжалась 10,5 часов.

В посттрансплантационном периоде проводилась комплексная оценка клинико-лабораторных показателей, ультразвуковое исследование с динамической оценкой внутриорганного кровотока.

С первых суток после трансплантации у больного отмечен хороший темп диуреза, постепенный рост скорости клубочковой фильтрации, что обеспечило

уверенную нормализацию азотемии – рисунок 33. Перитонеальный диализ после трансплантации не возобновлялся.

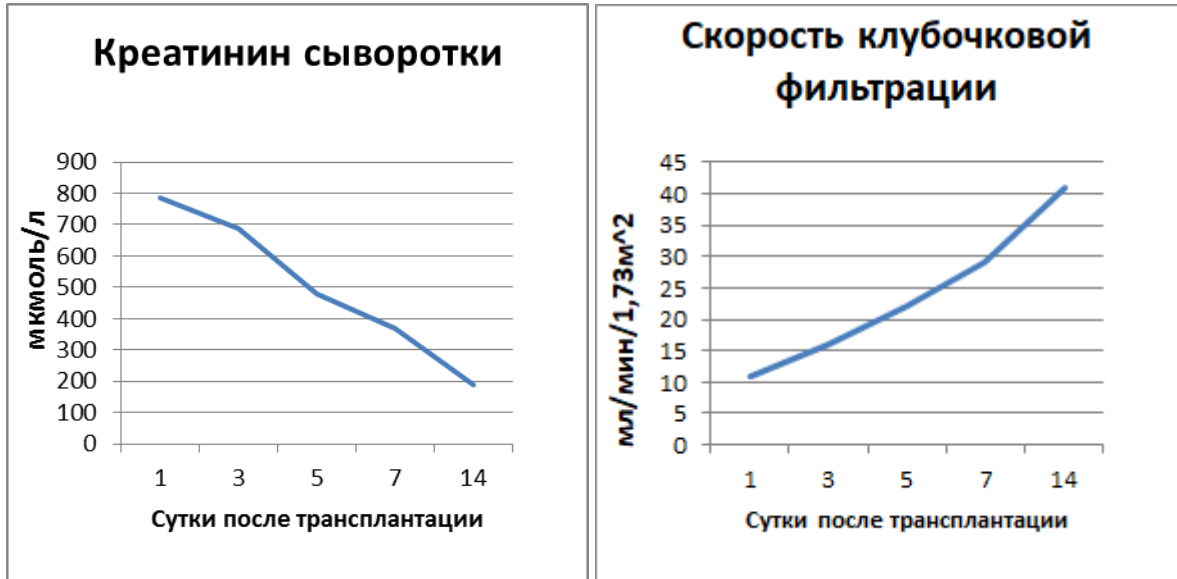


Рисунок 33. Динамика креатинина сыворотки крови и скорости клубочковой фильтрации у больного Н.

Показатели функциональной активности и электрофоретической подвижности мононуклеаров периферической крови оставались стабильными – рисунок 34.

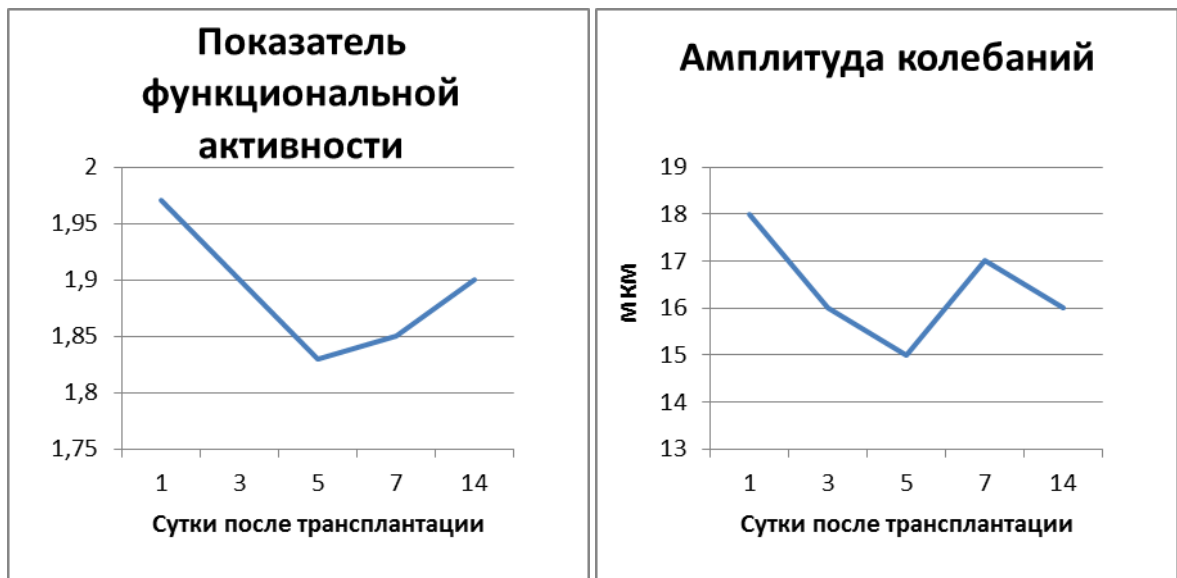


Рисунок 34. Показатели функциональной активности и электрофоретической подвижности мононуклеаров периферической крови у больного Н.

К 28-м суткам послеоперационного периода креатинин сыворотки крови составил 95 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации – 52 мл/мин. Выполнена

протокольная биопсия – остаточные явления острого канальцевого некроза легкой степени. Перитонеальный катетер удален, больной выписан из стационара на 31-е сутки. Через год после трансплантации функция трансплантата остается стабильной (креатинин сыворотки крови 91 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации – 51 мл/мин, суточная протеинурия 0,28 г/л), больной продолжает амбулаторное наблюдение. В связи с хорошей функцией трансплантата для профилактики системных осложнений, постепенно снижается суточная доза преднизолона.

Второй клинический пример представлен описанием истории болезни реципиента, получившего парную почку.

**Клинический пример 2.** Больная М., 57 лет (на момент трансплантации), поступила в МОНИКИ в октябре 2013 года для трансплантации почки. Диагноз: артериальная гипертензия, нефросклероз, хроническая болезнь 5Д стадии, анемия. В течение 5 лет наблюдалась в связи с ростом креатинина крови, который был случайно выявлен при плановой диспансеризации. Артериальной гипертензией страдает более 30 лет, не обследовалась, не лечилась. В течение прошлых трех лет артериальное давление контролирует при помощи комбинированной медикаментозной терапии. В начале 2012 года была сформирована дистальная артериовенозная фистула и планово начат программный гемодиализ 12 часов в неделю.

Трансплантация выполнена, как и в первом случае, с несовпадением по трем HLA (2 В, DR). Предсуществующих антител не было. Срок «холодовой» консервации составил 8 часов. Иммуносупрессивная терапия включала такролимус, микофенолата мофетил, преднизолон, индукция осуществлялась такролимусом, базиликсимабом, метилпреднизолоном согласно протоколу.

Селективная сорбция цитокинов у больной не проводилась, поэтому больная была отнесена к группе сравнения.

Комплекс послеоперационного обследования был аналогичен тому, который применялся у пациента основной группы.



После трансплантации также отмечена хорошая начальная функция трансплантата – рисунок 35.

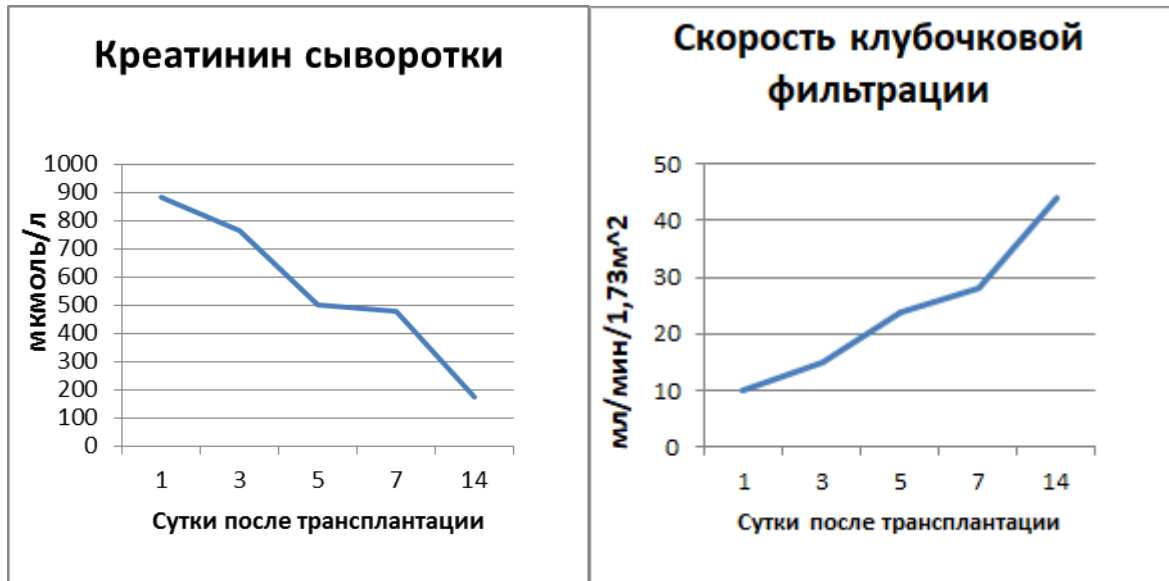


Рисунок 35. Динамика креатинина сыворотки крови и скорости клубочковой фильтрации у больной М.

В то же время, динамика показателя функциональной активности и электрофоретическая подвижность мононуклеаров периферической крови отличалась от динамики, представленной в первом примере – рисунок 36.

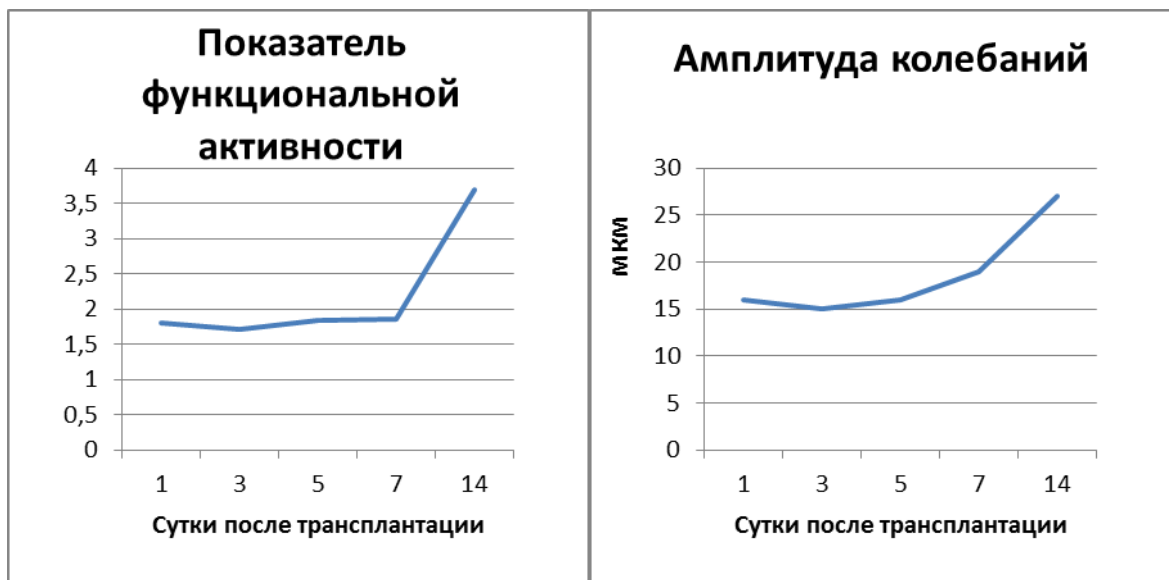


Рисунок 36. Показатели функциональной активности и электрофоретической подвижности мононуклеаров периферической крови у больной М.

К началу 2 недели послеоперационного периода у больной произошло значительное повышение активности мононуклеаров периферической крови: показатель функциональной активности возрос в два раза, электрофоретическая подвижность – 1,68 раз.

На 28 день креатинин сыворотки крови был 131 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации – 45 мл/мин. На протокольной биопсии у больной выявлены пограничные изменения, подозрительные в отношении клеточноопосредованного отторжения: умеренные явления тубулита (4-5 клеток на срез канальца) и легкая очаговая воспалительная инфильтрация паренхимы (до 10% площади). Проведена пульс-терапия метилпреднизолоном, после чего артериовенозная фистула была разобрана, и больная была выписана со стабильной функцией трансплантата.

Через год после трансплантации отмечены признаки хронической трансплантационной нефропатии: креатинин сыворотки крови 168 мкмоль/л, скорость клубочковой фильтрации – 38 мл/мин, суточная протеинурия 0,88 г/л). Была выполнена биопсия: значительный склероз интерстиция, склероз 6 из 18 клубочков. Больная продолжает амбулаторное наблюдение.

Данные клинические примеры, с одной стороны, свидетельствуют в пользу того, что селективная сорбция цитокинов в раннем послеоперационном периоде может улучшить результаты трансплантации почки путем подавления активности клеток иммунной системы в отношении трансплантата в раннем послеоперационном периоде. С другой стороны – эти примеры демонстрируют, что повышение функциональной активности и электрофоретической подвижности мононуклеаров периферической крови ассоциировано с активизацией иммунного ответа на аллотрансплантат.

#### **4.2. Результаты протокольных биопсий трансплантатов в раннем послеоперационном периоде**

Биопсии были выполнены у всех 30 пар реципиентов, результаты суммированы в таблице 2.

Результаты морфологического исследования пункционных биоптатов больных  
обеих групп

Изменения в трансплантате	Основная группа	Группа сравнения
Легкий острый канальцевый некроз	6	8
Тяжелый острый канальцевый некроз	3	7
Острая ингибиторов кальциневрина	1	1
Пограничные изменения	1	2
Клеточноопосредованное отторжение	0	3
Антителоопосредованное отторжение	0	0
Всего событий	11	21

У 6 пациентов основной группы и 8 реципиентов группы сравнения при морфологическом исследовании биоптатов были обнаружены остаточные явления острого канальцевого некроза. При этом количество больных с тяжелым поражением (отек интерстиция, дистрофические изменения и некроз групп клеток извитых канальцев) было значительно больше в группе сравнения.

Острая токсичность ингибиторов кальциневрина, которая проявлялась фокальными микрокальцификатами в отдельных клетках проксимальных канальцев, изомерической вакуолизацией, расширением просвета канальцев и уплощением клеток канальцевого эпителия без отека и инфильтрации интерстиция, была причиной дисфункции трансплантата в двух случаях. Была проведена редукция дозы с положительным эффектом.

У одного реципиента основной группы и двух реципиентов группы сравнения в биоптатах были выявлены легкий тубулит (до 3 клеток на срез канальца) и воспалительная инфильтрация паренхимы легкой степени (менее 20%). Картина расценена как пограничные изменения, у всех больных проведена терапия метилпреднизолоном с положительным эффектом.

Признаков отторжения у больных основной группы мы не отметили. У трех больных группы сравнения при морфологическом исследовании биоптатов

выявлены признаки клеточноопосредованного отторжения: воспалительная инфильтрация паренхимы, тубулит (IA, IB), в одном случае – начальные признаки интимального артериита (IIA). После проведенной терапии отмечена редукция воспалительных изменений, все больные выписаны из стационара с удовлетворительной функцией трансплантата.

Таким образом, у больных группы сравнения на ранних сроках послеоперационного периода отмечена большая склонность к развитию воспалительных изменений в трансплантате в виде реакции отторжения (инфильтрации паренхимы, тубулита), чем в группе сравнения.

#### **4.3. Течение позднего послеоперационного периода у больных обеих групп**

С момента выписки больные находились на постоянном амбулаторном наблюдении. Выживаемость реципиентов в течение первого года была 100% в основной группе и 96,7% в группе сравнения. Один реципиент умер вследствие развития вирусно-бактериальной пневмонии, осложнившейся септическим шоком и полиорганной недостаточностью на 8-м месяце послеоперационного периода.

Выживаемость трансплантатов через год после трансплантации в двух группах не различалась: в каждой из групп был удален один трансплантат. В основной группе у больного через три месяца после трансплантации выявлен протяженный стеноз мочеточника трансплантата. Была выполнена реконструкция – нефрэктомия, формирование пиелоуретероанастомоза с собственным мочеточником. В послеоперационном периоде – несостоятельность анастомоза, формирование уриномы. После ревизии трансплантат был удален.

В группе сравнения трансплантат был утрачен в результате развития тяжелого криза гуморального отторжения (подтвержденного пункционной биопсией: ишемия капиллярных петель, частичное разрушение капиллярных петель в некоторых клубочков, выраженные явления гломерулита, диффузная инфильтрация интерстиция лимфоцитами с примесью нейтрофилов, дистрофия канальцевого эпителия, тубулит, артерии с трансмуральным артериитом, свечение

C4d компонента комплемента в перитубулярных капиллярах ++)) через 6 месяцев после операции. Противокризисная терапия была (сеансы плазмафереза, ритуксимаб) – без значительного эффекта. Функция трансплантата была полностью утрачена через восемь месяцев после трансплантации хроническая трансплантационная нефропатия III степени. При морфологическом исследовании биоптата трансплантата выявлен выраженный диффузный фиброз интерстиция со склерозом большинства (15 из 18) клубочков. Выполнена трансплантатэктомия.

Мы отметили значительные различия в функции трансплантатов у больных двух групп – рисунки 37, 38, 39.

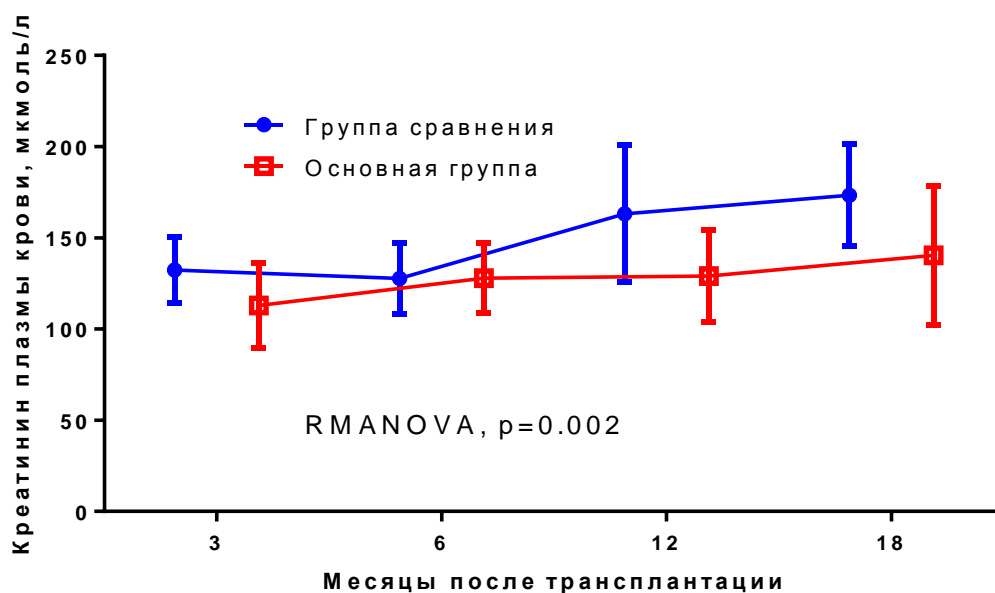


Рисунок 37. Динамика креатинина плазмы крови в позднем послеоперационном периоде.

В течение первых шести месяцев после трансплантации у больных основной группы мы отметили небольшой рост концентрации креатинина. К концу же первого года у больных группы сравнения концентрация креатинина значительно возросла, тогда как у больных основной группы – оставалась стабильной. Таким образом, рост концентрации креатинина у больных основной группы был выражен значительно меньше, чем у больных группы сравнения ( $p=0,002$ ).

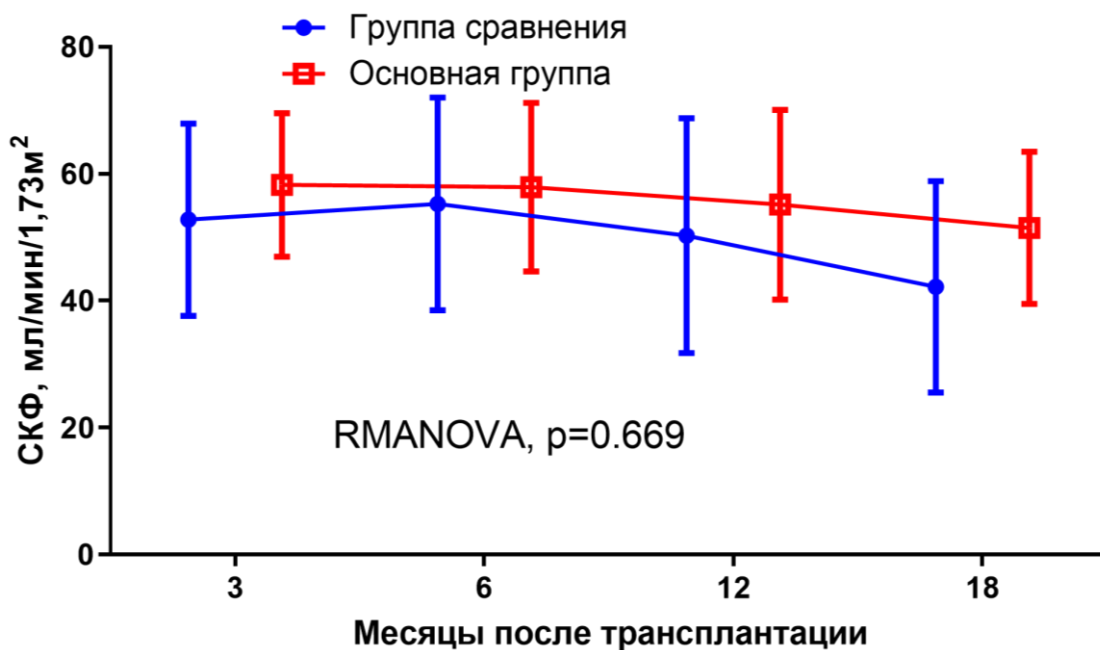


Рисунок 38. Динамика скорости клубочковой фильтрации в позднем послеоперационном периоде.

В динамике скорости клубочковой фильтрации на протяжении 1,5 лет мы не отметили статистически значимых различий ( $p=0,669$ ). Тем не менее, у больных основной группы этот показатель был несколько выше, чем у больных группы сравнения.

Весьма ценным прогностическим показателем является тяжесть суточной протеинурии. У больных группы сравнения после трансплантации мы отметили постепенный рост этого показателя. В итоге, через полтора года после трансплантации суточная протеинурия у 6 больных превышала 1 г/л. У больных основной группы через 18 месяцев после трансплантации суточная протеинурия была вдвое меньше, чем у больных группы сравнения. Различия в динамике суточной протеинурии была статистически значимой –  $p<0,001$

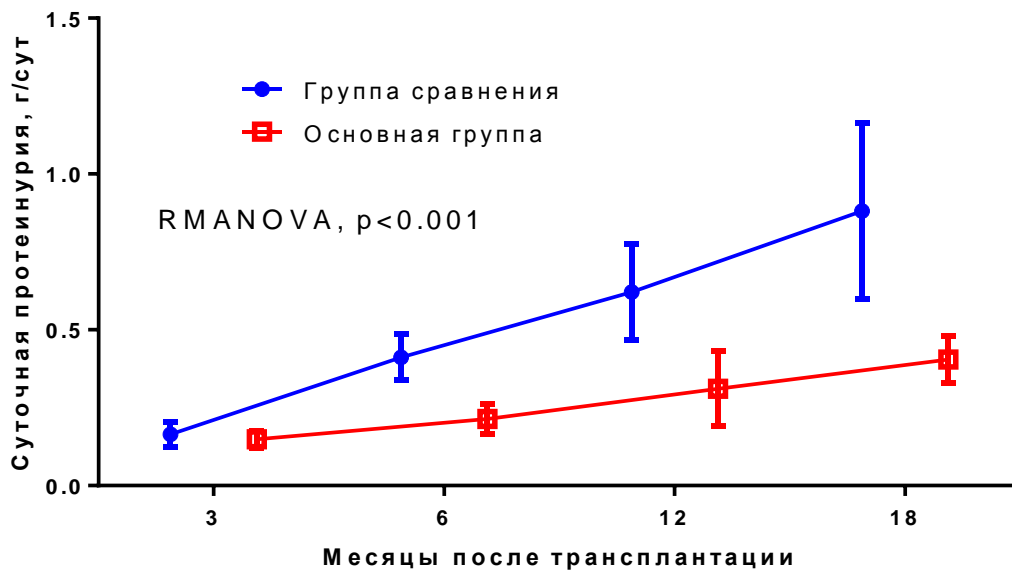


Рисунок 39. Динамика суточной протеинурии в позднем послеоперационном периоде.

Различия в функции трансплантата у больных двух групп были обусловлены, в первую очередь, состоянием почечной паренхимы. Результаты морфологического исследования пункционных биоптатов в позднем послеоперационном периоде суммированы в таблице 3.

У 4 больных основной группы (IA, IB, IIA, IIB) и 7 больных группы сравнения (IA, IB, IB, IIA, IIB, IIB, III) было диагностировано острое клеточно-опосредованное отторжение. У 5 больных было диагностировано антитело-опосредованное отторжение, подтвержденное при иммунофлюоресценции свечением C4d-компонента: в основной группе – в одном случае хроническое активное хроническое антитело-опосредованное отторжение, в одном случае острое гуморальное отторжение II типа; в группе сравнения – один случай активного хронического антитело-опосредованного отторжения и два случая острого гуморального отторжения II типа.

В итоге у 5 больных основной группы и 9 больных группы сравнения была диагностирована хроническая трансплантационная нефропатия, при этом количество больных с II и III степенями было вдвое выше в группе сравнения.

Результаты морфологического исследования пункционных биоптатов больных  
обеих групп в позднем послеоперационном периоде

Изменения	Основная группа	Группа сравнения
Клеточноопосредованное отторжение,	4	7
Антителоопосредованное отторжение	2	3
Хроническая токсичность ингибиторов кальциневрина	2	1
Хроническая нефропатия трансплантата, из них:	5	9
I степени	2	3
II степени	2	4
III степени	1	2
Всего событий	13	28

Проведенные исследования позволяют заключить, что селективная сорбция цитокинов является эффективным методом лечения реперфузионного повреждения почечного аллотрансплантата у больных разных возрастных групп после трансплантации почки. Введение данных процедур в алгоритм послеоперационного лечения реципиентов старших возрастных групп с реперфузионным повреждением почечного аллотрансплантата способствует улучшению клинической картины и исходов трансплантации трупной почки.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые за последнее десятилетие в области трансплантологии, результаты пересадки аллогенной трупной почки больным с терминальной стадией хронической почечной недостаточности нельзя считать в полной мере удовлетворительными. Так же за последнее десятилетие темп роста количества трансплантаций почек несколько снизился, так как число доноров остается относительно постоянным. Тем самым усугубляется дефицит донорских органов и увеличивается очередь в листе ожидания, поскольку количество проводимых трансплантаций почек ниже, чем зарегистрированное число больных с ХБП 5 стадии. В результате, произошел пересмотр критериев отбора доноров в сторону их расширения. Главным способом увеличения количества донорских органов и, в том числе, почек является использование органов, полученных от субоптимальных (маргинальных) доноров, то есть доноров с расширенными критериями (нестабильной гемодинамикой, сахарным диабетом, гипертонической болезнью, травмами, возрастными доноров и т.п.).

В этих случаях крайне актуальной задачей является оптимизация протоколов иммуносупрессии, так как развитие реакции острого отторжения может усугублять морфологические изменения в скомпрометированном органе. Однако простое увеличение дозы иммуносупрессии опасно в виду риска развития специфических осложнений: нефротоксичности, инфекций и др.

Известно, что функциональная состоятельность почечного аллотрансплантата в ранние сроки после трансплантации зависит от тяжести развивающихся в нем патологических изменений, которые могут носить иммунный и неиммунный характер. Как ранние, так и отдаленные результаты трансплантации зависят от двух основных факторов: степени повреждения органа и способность к регенерации его ткани. При этом в случае трансплантации почек от субоптимальных доноров исходно более выраженное повреждение почек и сниженные способности к регенерации диктуют необходимость к поиску новых подходов для улучшения результатов.

Расширение донорского пула привело к тому, что часто трансплантированные органы, полученные от «возрастных» доноров или доноров с небьющимся сердцем, то есть – подверженные первичной тепловой ишемии, имеют повышенную иммуногенность, и более склонны к кризам отторжения и тяжелым реперфузионным повреждениям. Это отрицательно влияет на функциональное состояние трансплантата и, соответственно, длительность его функционирования. Тяжесть реперфузионного повреждения во многом определяет функциональную состоятельность органа, а также вероятность развития реакции отторжения (особенно на ранних сроках после операции). В результате нарушений гемодинамики донора и выраженных нарушений его гомеостаза в почках возникают ишемические повреждения, которые нередко приводят к развитию острого канальцевого некроза трансплантата в раннем послеоперационном периоде, клинически проявляющегося отсутствием его начальной функции. В патогенезе развития синдрома реперфузии одну из главных ролей играют как циркулирующие биологически активные вещества, такие как хемокины и другие цитокины, эндотелины, молекулы адгезии и др. Поэтому одним из перспективных направлений клинической трансплантологии является применение методов экстракорпоральной гемокоррекции для снижения риска развития отторжения, позволяющих эффективно удалять из сосудистого русла реципиента различные гуморальные факторы, которые могут усугублять ОКН и отторжение органа.

Приведённые в литературе отдельные сообщения об успешном применении после- и даже интраоперационного плазмафереза, а также сорбции цитокинов с целью купирования реперфузионного синдрома в общей популяции пациентов с ХБП являются недостаточными. И на сегодняшний день, отсутствует опыт применения селективных методов лечения реперфузионного повреждения, таких как селективная сорбция цитокинов, у больных старшей возрастной группы. Вмешавшись в патофизиологический механизм на начальном этапе, сорбция цитокинов может предотвратить в будущем сложные для лечения осложнения. Известно, что повреждение структур почечной паренхимы, развивающееся на

этапе кондиционирования донора, консервации, трансплантации и в раннем послеоперационном периоде, в ряде случаев приводят к необратимому склерозу, что значительно ухудшает долгосрочный прогноз функционирования трансплантата. Существующий ныне принцип «old for old» способствует улучшению результатов лечения ХБП в общей популяции больных, однако, компрометирует реципиентов возрастных реципиентов. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования клинического применения сорбции цитокинов после трансплантации почки, у пациентов старших возрастных групп.

Цитокиновая сеть формирует систему инициирующих, амплифицирующих и супрессорных сигналов, что приводит к формированию и интеграции физиологических и патологических реакций организма на любое антигенное воздействие, в том числе и при трансплантации почки. На уровне организма цитокины осуществляют связь между иммунной, нервной, эндокринной, кроветворной и другими системами и служат для их вовлечения в организацию и регуляцию защитных реакций.

Роль отдельных цитокинов в механизмах системного и локального иммунитета активно изучается на протяжении многих лет. В запуске специфического иммунного ответа участвуют провоспалительные цитокины: ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$  и другие. Противовоспалительные цитокины составляют альтернативную группу: ИЛ-4, ИЛ-10 и другие.

Знание патогенетических механизмов развития является неотъемлемой частью лечения больных после трансплантации почки. Установлено, что микроциркуляторные нарушения при трансплантации почки в раннем послеоперационном периоде являются следствием повреждающего действия цитокинов на эндотелий, которые приводят к тяжелым нарушениям тканевой перфузии и развитию органной дисфункции. Поэтому многие специалисты предлагают в качестве маркера нарушения проницаемости и тяжести микроциркуляторных нарушений использовать уровень провоспалительных цитокинов и, прежде всего, интерлейкина-1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли.

Не подлежит сомнению, что тактика лечения и прогноз непосредственным образом зависят от правильной интерпретации клинических и лабораторных показателей и результатов инструментальных исследований, выполненных с учетом возможных патогенетических механизмов.

Известно, что системы неспецифической резистентности организма, иммунитета и гомеостаза в целом составляют единую интегральную клеточно-гуморальную систему защиты. Связующим звеном в этой системе выступают цитокины. Поэтому, в соответствии с задачами настоящего исследования, особое значение приобретает комплексное изучение иммунных реакций, характер которых во многом определяет особенности нарушений гомеостаза при трансплантации почки.

В связи с этим перспективным методом лечения ИР-синдрома представляется удаление цитокинов и хемокинов из кровотока реципиента. Однако экстракорпоральные методы, используемые в широкой практике, обладают рядом недостатков ввиду своей не селективности, и вместе с вредными компонентами теряются полезные – альбумины, фибриноген, факторы свертываемости. Селективные экстракорпоральные методы очистки крови лишены этих недостатков, позволяя элиминировать строго патогенные агенты.

Эти методы активно используются для лечения больных сепсисом, тогда как в литературе имеется ограниченное количество данных о применении селективных экстракорпоральных методов при ИР-синдроме. Тем не менее, единые принципы применения селективных методов дают основания считать, что они будут эффективны и при ИР-синдроме. Одним из перспективных селективных методов удаления циркулирующих цитокинов является селективная сорбция цитокинов. Однако клинический потенциал применения данного метода у пациентов старших возрастных групп, у которых трансплантация сопряжена с повышенным риском осложнений, в настоящее время отсутствует, что и стало поводом для проведения настоящего исследования.

Исследования были проведены на базе кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов факультета усовершенствования врачей

ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» в период с 2010 по 2018 годы. За это время накоплен опыт трансплантации почки 60 реципиентов старшей возрастной группы (старше 55 лет, максимальный возраст – 70 лет). Средний возраст в основной группе составил  $62,4 \pm 3,2$  года (55-70 лет), в группе сравнения –  $61,6 \pm 4,7$  лет (55-69 лет). Пациенты были случайным образом отнесены к одной из двух групп. У 30 реципиентов основной группы в раннем послеоперационном периоде для снижения тяжести ишемического и реперфузионного повреждения проводилась процедура селективной сорбции цитокинов. У 30 больных группы сравнения выполнялся аналогичный объем лечебно-диагностических процедур за исключением ССЦ. Максимальный срок наблюдения составил 59 месяцев, в среднем –  $34,8 \pm 16,1$  месяцев.

Группы были хорошо сопоставимы по возрасту, полу и структуре причин ХБП, продолжительности консервации, тканевой совместимости. Наиболее частой причиной в обеих группах были различные варианты хронического нефрита. У всех реципиентов трансплантация выполнялась впервые, предсуществующих анти-HLA антител больные не имели. У пациентов обеих групп за исключением процедур ССЦ применялся одинаковый протокол иммуносупрессии: стандартная трехкомпонентная терапия (такролимус, микофенолаты, преднизолон) с применением индукции такролимусом метилпреднизолоном и анти-CD25 антителами.

Реципиенты почечного аллотрансплантата старших возрастных групп по сравнению с лицами молодого возраста, отличаются наличием неблагоприятного коморбидного фона. Для оценки коморбидного фона мы использовали шкалу Cumulative illness Rating Scale for Geriatrics (CIRS-G). Группы были сопоставимы по данному показателю.

При трансплантации почки от субоптимальных доноров («возрастных» доноров и «асистолических» доноров 3-4 категории по Маастрихтской классификации) приоритет отдавался реципиентам старшей возрастной группы, которые и составили основную и группу сравнения. Реализуемый таким образом

подход «old for old» требовал применения новых методов протекции трансплантата.

Всем пациентам в послеоперационном периоде проводились стандартные клинично-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые доплеровские исследования. Кроме этого дополнительно исследовали концентрацию ИЛ2, ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12 и ФНО $\alpha$  в динамике. Для исследования активности мононуклеаров периферической крови исследовали их электрофоретическую подвижность с применением аппаратно-программного комплекса «Цито-Эксперт», а также проводили витальную компьютерную морфометрию с использованием компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа «Цитоскан». Для оценки ядерного полиморфизма циркулирующей популяции лимфоцитов мы использовали показатель функциональной активности (ПФА) ядра – величину, обратно пропорциональную фазовой высоте каждой клетки в выборке по формуле. Чем выше анизотропия хроматина и, соответственно, фазовая высота, тем ниже активность ядра. Снижение уровня анизотропии ядра, свидетельствует о переходе гетерохроматина в эухроматин, что указывает на биологическую активацию хроматина, и является предпосылкой для появления матричной активности ДНК. Таким образом, фазовая высота клетки, измеренная при витальной компьютерной морфометрии, позволяет оценить функциональную активность ядер лимфоцитов.

В ходе исследования всем реципиентам были выполнены пункционные биопсии почечных трансплантатов (протокольные биопсии и биопсии «по требованию» - при развитии дисфункции трансплантата).

Процедура ССЦ является комбинированным методов. В процессе этой процедуры проводится плазмофильтрация, после чего сепарированная плазма поступает в сорбционный картридж Mediasorb на основе макроскопической синтетической стироловой смолы в виде нерастворимых микросфер. После картриджа плазма вновь смешивается с клетками крови и поступает в гемофильтр, где проводится гемофильтрация в режиме постдилюции. Процедуру начинали сразу после окончания операции трансплантации и продолжали на

протяжении 12 часов. У каждого больного основной группы проведена одна процедура.

Полученные результаты анализировали при помощи комплекса статистических процедур в программах Statistica v.10, SPSS v.23, GraphPad Prism v.6.

Известно, что как хроническая болезнь почек сама по себе, так и процедуры гемодиализа способствуют изменению базального уровня цитокинов в крови. С целью изучения влияния особенностей цитокинового профиля у больных с ХБП мы сравнили базальные уровни (до трансплантации) с группой (15 человек) добровольцев 55-70 лет без острых воспалительных заболеваний и без признаков почечной недостаточности. При развитии 5Д стадии ХБП мы отметили, что концентрации ИЛ2, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12, ФНО $\alpha$  статистически значимо выше, чем у здоровых добровольцев. Исключение оставила лишь концентрация ИЛ4, которая статистически значимо не отличалась. Данные изменения могут свидетельствовать о развитии сбалансированной системной воспалительной реакции низкой интенсивности с регуляторным повышением активности противовоспалительного цитокина ИЛ10 и сохранением иммунного гомеостаза.

При исследовании цитокинового профиля в раннем послеоперационном периоде у больных двух групп, мы не отметили статистически значимых различий в динамике ИЛ2. Концентрация остальных цитокинов (ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12, ФНО $\alpha$ ) у пациентов основной группы на фоне сорбции оставалась относительно стабильной с умеренной тенденцией к росту, тогда как в группе сравнения отмечена стойкая тенденция к значительному росту концентрации. Таким образом, мы можем заключить, что реперфузия трансплантата инициирует системный воспалительный ответ, который проявляется повышением концентрации цитокинов в крови реципиента. При этом, ССЦ позволяет существенно уменьшить выраженность цитокинового ответа.

Мы также сосредоточили свое внимание на особенностях субпопуляционного состава лимфоцитов и морфофункционального состояния

мононуклеаров периферической крови у больных ХБП 5Д стадии, а именно – у пациентов старшей возрастной группы до и после трансплантации почки. Больным хронической болезнью почек свойственно развитие хронического воспаления в сочетании со стойкой дисфункцией нативного и адаптивного иммунитета. Клиническим проявлением этого факта, а также косвенным его подтверждением является повышенный риск инфекционных осложнений и злокачественных новообразований, а также снижение эффективности вакцинации.

Нами было установлено, что у пациентов ХБП 5 стадии происходит уменьшение доли CD4 клеток и увеличение доли CD8 Т-клеток, при этом их соотношение значительно уменьшается. Кроме этого, происходит некоторое снижение общей доли CD3 клеток (статистически незначимое в нашем исследовании) со значительным увеличением вариабельности этого показателя, что косвенно свидетельствует о неоднородности популяции пациентов ХБП.

Есть свидетельства тому, что тяжесть лимфопении связана с рядом факторов: тяжестью нарушения функции почек и окислительного стресса, уровнем мочевины, креатинина, фосфора, сахарным диабетом и др. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, как и сокращение их общего количества, обусловлено повышенной склонностью к апоптозу, преобразованием цитокинового профиля, что свойственно больным ХБП.

Связанные с прогрессирующей утратой почечной функции нарушения регуляции Т-клеток часто описывают как преждевременное «старение иммунной системы», что характеризуется значительным сокращением популяции наивных Т-клеток и относительным увеличением Т-клеток памяти, снижением соотношения CD4/CD8 Т-клеток, повышенной склонностью к апоптозу, изменением рецепторного репертуара Т-клеток и сокращением длины теломер. Выраженность изменений Т-клеточного иммунитета имеет непосредственную связь с результатами трансплантации почки. Увеличение времени ожидания трансплантации почки на диализе способствует накоплению аллореактивных Т-клеток и сопровождается с увеличением риска острого отторжением трансплантата и значительно ухудшает результаты трансплантации. Несмотря на



то что особенности Т-клеточного иммунитета оказывают влияние на результаты трансплантации почки, в настоящее время эти знания не позволяют модифицировать существующую клиническую практику путем персонализации иммуносупрессивной терапии, что подчеркивает актуальность исследований в этом направлении.

Естественные киллеры (ЕК) являются одной из специализированных субпопуляций лимфоцитов, которые играют важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете, а также – регуляции гомеостаза и воспалительных процессов в тканях. В нашем исследовании доля этих клеток у больных ХБП была значительно больше, чем у здоровых добровольцев. Это свидетельствует об активации нативного иммунитета, что может носить компенсаторно-адаптационный характер на фоне дисфункции адаптивного Т-клеточного иммунитета при ХБП. С другой стороны, увеличение доли ЕК у больных ХБП можно объяснить активным участием этих клеток в прогрессировании ХБП (независимо от основной этиологии заболевания почек) [48-51].

Доля В-клеток у здоровых лиц и пациентов ХБП различалась статистически незначимо. Тем не менее у последних она была несколько выше, как и неоднородность этого показателя. Этому также есть несколько не исключающих друг друга объяснений. В-клетки играют важную роль с патогенезе многих аутоиммунных поражений почек. В нашем исследовании у значительной доли больных формальной причиной ХБП был гломерулонефрит и артериальная гипертензия (10 из 21). Тем не менее надо учитывать, что гистологическая верификация диагноза (причины ХБП) проводится крайне редко, что не позволяет исключить возможность наличия иной причины. В пользу этого также косвенно свидетельствует и факт того, что структура причин ХБП в нашей стране, по данным всероссийского регистра, значительно отличается от других крупных регистров. К тому же, например, мы не учитывали форму гломерулонефрита (что можно отнести к ограничению исследования). Другим объяснением (вытекающим из первого) может быть применение различных препаратов для лечения

основного заболевания (причины ХБП). Например, ритуксимаб (анти-CD20 моноклональное антитело) широко применяется для лечения многих аутоиммунных заболеваний: ANCA-ассоциированного васкулита, мембранозной нефропатии, волчаночного нефрита, смешанной криоглобулинемии, нефротического синдрома при болезни минимальных изменений, фокально-сегментарного гломерулосклероза и др.

В нашем исследовании пациенты с ХБП имели повышенный уровень экспрессии HLA-DR по сравнению со здоровыми лицами. Этому может способствовать хроническое воспаление низкой степени активности, свойственное пациентам ХБП.

У реципиентов почечного трансплантата на пятые сутки после трансплантации нами было отмечено увеличение доли CD3-клеток, CD4-клеток, ЕК, а также – экспрессии HLA-DR. Это можно рассматривать, с одной стороны, как неспецифическую реакцию на оперативное вмешательство. С другой стороны, синхронное увеличение доли CD4-клеток и ЕК может быть специфической реакцией на аллотрансплантацию.

Таким образом, не смотря на иммуносупрессивную терапию, у больных после трансплантации почки отмечается признаки активации как нативного, так и адаптивного иммунитета.

Если не брать во внимание проблему предсенсублизированных пациентов, то тяжелые гуморальные реакции на трансплантат, клиническим проявлением которых является реакция отторжения, относятся, как правило, к позднему послеоперационному периоду и протекают при активном участии адаптивного иммунитета. Мы сознательно сформировали выборку пациентов, не имеющих предсуществующих анти-HLA антител. В патогенезе синдрома ишемии-реперфузии основную роль играют неспецифические реакции нативного иммунитета с активацией, главным образом, клеточного звена. В связи с этим, мы оценили морфофункциональные параметры клеточного звена иммунитета (как основного эффекторного звена) у реципиентов почечного аллотрансплантата.

После трансплантации происходит увеличение активности мононуклеаров периферической крови (даже по сравнению со здоровыми добровольцами). Это вполне ожидаемо и может объясняться как неспецифическими, так и специфическими механизмами. В то же время у больных ХБП 5Д стадии, как до, так и после трансплантации, выявлена статистически значимая зависимость ПФА от возраста, что не было отмечено в группе здоровых добровольцев. Это достаточно хорошо укладывается в современную концепцию формирующихся на фоне ХБП нарушений морфофункционального состояния клеток иммунной системы. Вместе с тем выявленная зависимость свидетельствует в пользу того, что возраст реципиента является важным фактором, способным повлиять на выбор режима иммуносупрессивной терапии. Это приобретает еще большую актуальность в свете того, что пожилым пациентам свойственно существенное изменение метаболизма иммуносупрессивных препаратов и, соответственно, их концентрации в крови (в частности – ингибиторов кальцинейрина), что делает еще более сложным достижение зыбкого баланса между недостаточной и избыточной иммуносупрессией.

Оценка морфометрических показателей клеток обладает не только высокой научной ценностью в современных исследованиях, но и значительной клинической информативностью. Этот метод позволяет в онлайн режиме оценить функциональное состояние, как клеток иммунной системы, так и других клеток крови, поскольку их размерные показатели и поверхностная архитектоника, изменения оптической плотности имеют тесную связь с активностью. Информативным показателем для эффективной оценки функционального состояния мононуклеаров, может служить показатель функциональной активности (ядра) – ПФА. У больных ХБП 5Д стадии, получающих лечение гемодиализом, происходит снижение функциональной активности клеток по сравнению со здоровыми добровольцами, что отражается в статистически значимом снижении показателя ПФА. При этом, мы отметили статистически значимую связь этого показателя с возрастом среди больных ХБП 5Д стадии.

На клеточной мембране существует электрический поверхностный потенциал, который обусловлен особенностями клеточной стенки и активности клетки. Поверхностный электрический заряд клетки меняется при изменении ее метаболизма. Таким образом, электрический потенциал клетки соответствует ее энергетическому потенциалу и меняется при изменении активности. Одним из информативных и относительно новых перспективных способов оценки уровня активности иммунных клеток является анализ изменений потенциала клеточной мембраны с помощью компьютерного микроэлектрофореза.

Больным с ХБП 5Д стадии свойственно значительное снижение амплитуды колебаний мононуклеаров периферической крови в электрическом поле. При этом и у относительно здоровых пациентов и больных ХБП отмечается отрицательная статистически значимая связь этого показателя с возрастом. Уменьшение электрофоретической подвижности, а также показателя функциональной активности свидетельствует о снижении активности иммунных клеток у больных с ХБП. Причем, чем старше пациент, тем это снижение больше сильнее.

После трансплантации почки на фоне иммуносупрессивной терапии отмечено небольшое снижение ПФА у больных обеих групп. Позднее у реципиентов группы сравнения отмечалось постепенное нарастание показателя функциональной активности ядра мононуклеарных клеток, что свидетельствует о повышении их активности в послеоперационном периоде. У больных основной группы, получивших сеанс селективной сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде, ПФА оставался относительно стабильным с тенденцией к снижению. Различия в динамике между группами были статистически значимы. Похожую динамику в группах мы отметили при анализе амплитуды колебаний мононуклеаров периферической крови.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что процедуры селективной сорбции цитокинов у реципиентов почечного аллотрансплантата оказывают положительное влияние на мононуклеарные клетки. Действие этого экстракорпорального метода непосредственным образом связано со снижением ПФА и стабилизацией морфофункционального состояния клеток иммунной

системы и, соответственно, адекватным ответом на аллоантигенную стимуляцию в виде почечного трансплантата и проводимую иммуносупрессию.

Все трансплантаты сохранили свою функцию в течение месяца после трансплантации. Доли больных с первичной и отсроченной функцией (33,3% в основной группе и 43,3% - в группе сравнения,  $\chi^2$   $p=0,596$ ) не различались. За исключением диуреза, динамика которого в группах не различалась, мы отметили статистически значимые различия в динамика креатинина и СКФ: в основной группе на фоне проведения ССЦ, функция трансплантата восстанавливалась быстрее. Это было отмечено нами и в группе пациентов с хорошей начальной функцией трансплантата, так и у пациентов с отсроченной функцией.

Таким образом, комплексное действие селективной сорбции цитокинов в раннем послеоперационном периоде способствует снижению тяжести ишемического и реперфузионного повреждения и улучшению функции трансплантата в раннем послеоперационном периоде. В основной группе количество пациентов с тяжелым острым канальцевым некрозом оказалось меньше (3 против 7). Кроме этого, признаков отторжения у больных основной группы мы не отметили. У трех больных группы сравнения при морфологическом исследовании биоптатов выявлены признаки клеточноопосредованного отторжения. Таким образом, у больных группы сравнения на ранних сроках послеоперационного периода отмечена большая склонность к развитию воспалительных изменения в трансплантате в виде реакции отторжения, а также чаще сохраняются последствия тяжелых последствий реперфузионного синдрома.

С момента выписки больные находились на постоянном амбулаторном наблюдении. Выживаемость трансплантатов через год после трансплантации в двух группах не различалась: в каждой из групп был удален один трансплантат.

В позднем послеоперационном периоде функция трансплантата у пациентов основной группы была лучше: ниже концентрация креатинина, выше СКФ, но главное – значительно ниже уровень суточной протеинурии. Последний параметр является весьма ценным прогностическим показателем. У пациентов основной

группы уровень суточной протеинурии был вдвое меньше, чем у пациентов группы сравнения.

Различия в функции трансплантата у больных двух групп были обусловлены, в первую очередь, состоянием почечной паренхимы. У 5 больных основной группы и 9 больных группы сравнения была диагностирована хроническая трансплантационная нефропатия, при этом количество больных с II и III степенями было вдвое выше в группе сравнения. Мы связываем это с меньшей частотой развития отторжения почечного трансплантата в позднем послеоперационном периоде.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что селективная сорбция цитокинов является эффективным методом лечения реперфузионного повреждения почечного аллотрансплантата у больных разных возрастных групп после трансплантации почки. ССЦ позволяет снизить тяжесть реперфузионного повреждения почечного трансплантата и улучшить его функцию, как в раннем, так и в позднем послеоперационном периоде. Введение данных процедур в алгоритм послеоперационного лечения реципиентов с реперфузионным повреждением почечного аллотрансплантата способствует улучшению исходов трансплантации трупной почки у пациентов старших возрастных групп.

## ВЫВОДЫ

1. Больным ХБП 5Д стадии старшей возрастной группы свойственно развитие сбалансированной системной воспалительной реакции с повышением концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ2, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ12, ФНО $\alpha$ ), регуляторном повышением активности противовоспалительного цитокина ИЛ10, снижением доли CD4<sup>+</sup> клеток, повышением доли CD8<sup>+</sup> клеток и CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> клеток, а также снижением активности мононуклеаров периферической крови.

2. Селективная сорбция цитокинов позволяет значительно снизить концентрации ИЛ4, ИЛ5, ИЛ6, ИЛ8, ИЛ10, ИЛ12, ФНО $\alpha$ , но не ИЛ2 в раннем послеоперационном периоде по сравнению со стандартной терапией.

3. Селективная сорбция цитокинов способствует увеличению доли CD4<sup>+</sup> клеток, снижению доли CD8<sup>+</sup> клеток, нормализации иммунорегуляторного индекса, снижению экспрессии HLA-DR на CD3<sup>+</sup>, а также - отсутствию повышения активности мононуклеаров периферической крови.

4. Проведение селективной сорбции цитокинов у больных старших возрастных групп непосредственно после трансплантации позволяет снизить тяжесть ишемического и реперфузионного повреждения, риск развития отторжения трансплантата и тяжесть хронической трансплантационной нефропатии.

5. Применение селективной сорбции цитокинов у больных старшей возрастной группы не позволяет коренным образом изменить характер начальной функции почечного трансплантата, однако, в значительной мере способствует улучшению функции трансплантата в ближайшем и отдаленном послеоперационном периоде.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В связи со сниженными регенеративными способностями и нарушениями иммунного гомеостаза у реципиентов почечного трансплантата старших возрастных групп необходимо применение дополнительных методов коррекции синдрома ишемии/реперфузии. Перспективным методом является селективная сорбция цитокинов.
2. Наиболее оптимальной тактикой является начало процедуры сразу после завершения трансплантации (не позднее 3-4 часов после начала перфузии трансплантата в организме реципиента) и продолжение ее на протяжении 10-14 часов.
3. Для контроля эффективности проводимого лечения следует определять цитокины через 12, 24 часа и 5 дней после трансплантации, а также показатель функциональной активности (ядра) и электрокинетическую активность мононуклеаров периферической крови через 24 и 72 часа после трансплантации.
4. Наиболее целесообразно применять селективную сорбцию цитокинов у реципиентов старших возрастных групп в случае предполагаемой отсроченной функции трансплантата: при изъятии почки у субоптимального донора, длительной консервации или тепловой ишемии, предсуществующей донорской патологии.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГП - Аппарат гипотемической перфузии  
АТПП – аллотрансплантат трупной почки  
АФК – активные формы кислорода  
ЕК – естественные киллеры  
ЕКТ-клетки – естественные киллерные Т-клетки  
ИЛ – интерлейкин  
ИЛ1-РА - рецепторный антагонист интерлейкина-1  
И-Р – ишемия-реперфузия  
ИР-синдром – синдром ишемии-реперфузии  
ИФН-гамма – интерферон-гамма  
КДГ - ксантиндегидрогеназой  
КПФ – каскадная плазмофльтрация  
МЭФ - микроэлектрофорез  
ОКН – острый канальцевый некроз  
ОПП – острое почечное повреждение  
ПА - плазмаферез  
ПАТ – почечный аллотрансплантат  
ПФА – показатель функциональной активности  
ССЦ – селективная сорбция цитокинов  
ХБП - хронической болезнью почек  
ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа  
ICAM-1 - intercellular adhesion molecule-1  
LFA-1 - leukocyte function associated antigen-1  
NAD<sup>+</sup> - никотинамид-аденин-динуклеотид  
NF- $\kappa$ B – транскрипционный ядерный фактор  
PECAM-1 - platelet–endothelial cell adhesion molecule 1  
VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule-1  
MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein-1

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Каабак М.М., Горяйнов В.А., Дьяченко И.В. Использование плазмафереза для коррекции реперфузионной травмы при пересадке почки // Нефрология и диализ. – 2001. – Т. 3. – № 3. – С. 345–354.
2. Каабак М.М., Горяйнов В.А., Соловьева И.Н., Алексеева Л.А., Синютин А.А.: Влияние посттрансплантационного плазмафереза на результаты пересадки трупной почки // Хирургия. – 2002. – № 12. – С. 18–23.
3. Куразов Б.Р. Заболеваемость терминальной хронической почечной недостаточностью // Вестник Казахского национального медицинского университета. – 2013. – № 2. – С. 234–236.
4. Мойсюк Я.Г., Сушков А.И., Шаршаткин А.В., Бикбов Б.Т., Азаренкова О.В. Современные технологии и клинические исследования в трансплантации почки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т.16. – № 3. – С. 63–75.
5. Нестеренко И.В. Аллотрансплантация трупных почек, полученных от маргинальных доноров: Дис. ... д-ра медицинских наук: 14.00.27 / И. В. Нестеренко. – Московский областной научно-исследовательский клинический институт. – Москва – 2009. – 186 с.
6. Столяр А.Г., Будкаръ Л.Н., Климушева Н.Ф., Лесняк О.М. Улучшение результатов трансплантации почки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2015. – Т.16. – № 4. – С. 55–61.
7. Agrawal A., Agrawal S., Gupta S. Role of dendritic cells in inflammation and loss of tolerance in the elderly // *Frontiers in Immunology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 896–903.
8. Ascon D.B., Lopez-Briones S., Liu M. et al. Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury // *J. Immunol.* – 2006. – Vol.177. – № 5. – P. 3380–3387.

9. Ascon M., Ascon D.B., Liu M. et al. Renal ischemia–reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector–memory T lymphocytes // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 75. – № 5. – P. 526–535.
10. Axelrod D.A., Schnitzler M.A., Xiao H. et al. An economic assessment of contemporary kidney transplant practice // *American Journal of Transplant.* – 2018. – Vol. 18. – P. 1168–1176.
11. Barin–Le Guellec C., Largeau B., Bon D. et al. Ischemia/reperfusion–associated tubular cells injury in renal transplantation: Can metabolomics inform about mechanisms and help identify new therapeutic targets? // *Pharmacol. Res.* – 2018. – Vol. 129. – P. 34–43.
12. Barklin A. Systemic inflammation in the brain–dead organ donor // *Acta Anaesthesiol. Scand.* – 2009. – Vol. 53. – P. 425–435.
13. Barrou B., Chatauret N., Hauet T. et al. Ischémie–reperfusion. Liquides de conservation et machines de perfusion en transplantation rénale // *Progrès en Urologie.* – 2016. – Vol. 26. – № 15. – P. 964–976.
14. Barry J.M. Renal transplantation in 2016 // *Indian J. Urol.* – 2016. – Vol. 32. – № 3. – P. 175–177.
15. Bellomo R., Tetta C., Ronco C. Coupled plasma filtration adsorption. Intensive // *Care Med.* – 2003. – Vol. 29. – P. 1222–1228.
16. Berlot G., Tomasini A., Agbedjro A. Coupled Plasma Filtration–adsorption // *Annual. Update in Intensive Care and Emergency Medicine.* – 2012. – Vol. 18. – P. 653 – 658.
17. Bhalodia Y.S., Navin S., Vaghasiya J., Jivani N.P. Homocysteine–dependent endothelial dysfunction induced by renal ischemia/reperfusion injury // *J. of Nephrology.* – 2011. – Vol. 24. – № 5. – P. 631–635.
18. Bitzer M., Ben–Dov I.Z., Thum T. Microparticles and microRNAs of endothelial progenitor cells ameliorate acute kidney injury // *Kidney Int.* – 2012. – Vol. 82. – № 4. – P. 375–377.
19. Blasco V., Leone M., Antonini F. et al. Comparison of the novel hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6 in brain–dead donor

- resuscitation on renal function after transplantation // *British Journal of Anaesthesia*. – 2008. – Vol. 100. – № 4. – P. 504–508.
20. Blasco V., Leone M., Bouvenot J. et al. Impact of intensive care on renal function before graft harvest: results of a monocentric study // *Crit. Care*. – 2007. – Vol. 11. – № 5. – P. 103–112.
21. Bon D., Chatauret N., Giraud S. et al. New strategies to optimize kidney recovery and preservation in transplantation // *Nat. Rev. Nephrol.* – 2012. – Vol. 8. – № 6. – P. 339–347.
22. Bonventre J.V., Zuk A. Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease? // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 66. – P. 480–485.
23. Bouma H.R., Ploeg R.J., Schuurs T.A. Signal transduction pathways involved in brain death-induced renal injury // *Am. J. Transplant.* – 2009. – Vol. 9. – P. 989–997.
24. Bresnihan B., Cunnane G. Interleukin-1 receptor antagonist // *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* – 1998. – Vol. 24. – P. 615–628.
25. Burne M.J., Daniels F., Ghandour A., et al. – Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure // *J. Clin. Invest.* – 2007. – Vol. 108. – P. 1283–1290.
26. Burne-Taney M.J., Ascon D.B., Daniels F. et al. B cell deficiency confers protection from renal ischemia reperfusion injury // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 3210–3215.
27. Carden D.L., Granger D.N. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury // *J. Pathol.* – 2000. – Vol. 190. – P. 255–266.
28. Casiraghi F., Azzollini N., Todeschini M. et al. Complement alternative pathway deficiency in recipients protects kidney allograft from ischemia/reperfusion injury and alloreactive T cell response // *Am. J. Transplant.* – 2017. – Vol. 17. – № 9. – P. 2312–2325.
29. Castellano G., Intini A., Stasi A. et al. Complement modulation of anti-aging factor klotho in ischemia/reperfusion injury and delayed graft function // *Am. J. Transplant.* – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 325–333.

30. Castellano G., Melchiorre R., Loverre A. et al. Therapeutic targeting of classical and lectin pathways of complement protects from ischemia–reperfusion induced renal damage // *Am. J. Pathol.* – 2010. – Vol. 176. – № 4. – P. 1648–1659.
31. Cecka J.M. The OPTN/UNOS renal transplant registry // *Clin. Transpl.* – 2005. – P. 1–16.
32. Cernoch M., Viklicky O. Complement in kidney transplantation // *Front. Med. (Lausanne)*. – 2017. – Vol. 4. – P. 66–78.
33. Cheadle C., Watkins T., Ehrlich E., Barnes K., Gaber O.A., Hemmerich S., Rabbet H. Effects of anti–adhesive therapy on kidney biomarkers of ischemia reperfusion injury in human deceased donor kidney allografts // *Clin. Transplantation*. – 2011. – Vol. 25. – № 5. – P. 766–775.
34. Chen L. –X. Josephson M.A., Hedeker D., Campbell K.H., Stankus N., Saunders M.R. A clinical prediction score to guide referral of elderly dialysis patients for kidney transplant evaluation // *Kidney Int. Rep.* – 2017. – Vol. 2. – № 4. – P. 645–653.
35. Cheungpasitporn W., Khoury N.J., Thongprayoon C., Craici I.M. Is remote ischemic conditioning of benefit to patients undergoing kidney transplantation? // *Journal of Investigative Surgery*. – 2017. – Vol. 32. – № 1. – P. 1–3.
36. Cho R.H., Sieburg H.B., Muller–Sieburg C.E. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells // *Blood*. – 2008. – Vol. 111. – P. 5553–5561.
37. Chougnet C.A., Thacker R.I., Shehata H.M. et al. Loss of phagocytic and antigen cross–presenting capacity in aging dendritic cells is associated with mitochondrial dysfunction // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 195. – № 6. – P. 2624–2632.
38. Cobo G., Hecking M., Port F.K. et al. Sex and gender differences in chronic kidney disease: progression to end–stage renal disease and haemodialysis // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2016. – Vol. 130. – № 14. – P. 1147–1163.

39. Collard C.D., Gelman S, Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of Ischemia–reperfusion injury // *Anesthesiology*. – 2001. – Vol. 94. – P. 1133–1138.
40. Collard C.D., Lekowski R., Jordan J.E. et al. Complement activation following oxidative stress // *Mol. Immunol.* – 1999. – Vol. 36. – P. 941–948.
41. Collard C.D., Montalto M.C., Reenstra W.R. et al. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1 // *Am. J. Pathol.* – 2001. – Vol. 159. – № 3. – P.1045–1054.
42. Collett J.A., Mehrotra P., Crone A. et al. Endothelial colony–forming cells ameliorate endothelial dysfunction via secreted factors following ischemia–reperfusion injury // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* – 2017. – Vol. 312. – № 5. – P. F897–F907.
43. Collins A.J., Kasiske B., Herzog C., et al. Excerpts from the United States Renal Data System 2006 Annual Data Report // *Am. J. Kidney Dis.* – 2007. – Vol. 49. – № 1. – P. A6–A7.
44. Connell P.J., Kuypers D.R., Mannon R.B. et al. Clinical trials for immunosuppression in transplantation: The case for reform and change in direction // *Transplantation*. – 2017. – Vol. 101. – № 7. – P. 1527–1534.
45. Coresh J., Astor B. C., Greene T. et al. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third national health and nutrition examination survey // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41. – № 1. – P. 1–12.
46. Czesnikiewicz–Guzik M., Lee W. –W., Cui D. et al. T cell subset–specific susceptibility to aging // *Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 127. – № 1. – P. 107–118.
47. Daha M.R., van Kooten C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2000. – Vol.15. – № 6. – P. 41–43.
48. Damman J., Hoeger S., Boneschansker L. et al. Targeting complement activation in brain–dead donors improves renal function after transplantation // *Transpl. Immunol.* – 2011. – Vol. 24. – № 4. – P. 233–237.

49. Danobeitia J.S., Ziemelis M., Ma X. et al. Complement inhibition attenuates acute kidney injury after ischemia–reperfusion and limits progression to renal fibrosis in mice // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 8. – P. e0183701–e0183721.
50. Danovitch, G.M., Cohen D.J., Weir M.R. et al. Current status of kidney and pancreas transplantation in the United States, 1994–2003 // *Am. J. Transplant.* – 2005. – Vol. 5. – P. 904–915.
51. Davis A.E., Lu F., Mejia P. C1 inhibitor, a multi–functional serine protease inhibitor // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol. 104. – P. 886–893.
52. De Greef K.E., Ysebaert D.K., Dauwe S., et al. Anti–B7–1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia // *Kidney Int.* – 2001. – Vol. 60. – P. 1415–1427.
53. Ding C. –G., Li Y., Tian X. –J. et al. Predictive score model for delayed graft function based on easily available variables before kidney donation after cardiac death // *Chin. Med. J. (Engl.)*. – 2017. – Vol. 130. – № 20. – P. 2429–2434.
54. Diuwe P. Domagala P., Durlík M., et al. The effect of the use of a TNF–alpha inhibitor in hypothermic machine perfusion on kidney function after transplantation // *Contemp. Clin. Trials*. – 2017. – Vol. 59. – P. 44–50.
55. Dorshkind K., Swain S. Age–associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal // *Curr. Opin. Immunol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 404–407.
56. Ekberg H. Improved immunosuppression leads to better kidney transplantations // *Lakartidningen*. – 2012. – Vol. 109. – № 39–40. – P. 1739–1742.
57. Ershler W.B. Interleukin–6: a cytokine for gerontologists // *J. Am. Ger. Soc.* – 1993. – Vol. 41. – P. 176–181.
58. Eufrásio P., Moreira P., Parada B. et al. Renal transplantation in recipients over 65 years old // *Transplant. Proc.* – 2011. – Vol. 43. – № 1. – P. 117–119.
59. Farrar C.A., Zhou W., Sacks S.H. Role of the lectin complement pathway in kidney transplantation // *Immunobiology*. – 2016. – Vol. 221. – № 10. – P. 1068–1072.

60. Frei U., Noeldeke J., Machold–Fabrizii V. et al. Prospective age–matching in elderly kidney transplant recipients—a 5 year analysis of the eurotransplant senior program // *Am. J. Transplant.* – 2008. – Vol. 8. – № 1. – P. 50–57.
61. Fu Z., Ye Q., Zhang Y. et al. Hypothermic machine perfusion reduced inflammatory reaction by downregulating the expression of matrix metalloproteinase 9 in a reperfusion model of donation after cardiac death // *Artif. Organs.* – 2016. – Vol. 40. – № 6. – P. E102–111.
62. Fuentes E., Fuentes M., Alarcón M., Palomo I. Immune system dysfunction in the elderly // *An. Acad. Bras. Cienc.* – 2017. – Vol. 89. – № 1. – P. 285–299.
63. Furuichi K., Wada T., Iwata Y., et al. Gene therapy expressing amino–terminal truncated monocyte chemoattractant protein–1 prevents renal ischemia–reperfusion injury // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 1066–1071.
64. Furuichi K., Wada T., Kaneko S., Murphy P.M. Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 4021–4028.
65. Gage F., Leeser D.B., Porterfield N.K. et al. Room temperature pulsatile perfusion of renal allografts with lifor compared with hypothermic machine pump solution // *Transplant. Proc.* – 2009. – Vol. 41. – P. 3571–3574.
66. Gardner E.M., Murasko D.M. Age–related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans // *Biogerontology.* – 2002. – Vol. 3. – P. 271–289.
67. Gasser M., Waaga A. M., Laskowski I.A. et al. Organ transplantation from brain–dead donors: Its impact on short– and long–term outcome revisited // *Transplant. Rev.* – 2001. – Vol. 15. – № 1. – P. 1–10.
68. Ge Y. –Z., Wu R., Xin H. et al. Effects of ischemic preconditioning on the systemic and renal hemodynamic changes in renal ischemia reperfusion injury // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* – 2015. – Vol. 8. – № 2. – P. 1128–1140.
69. Giral, M., Bertola J., Foucher Y. et al. Effect of brain–dead donor resuscitation on delayed graft function: results of a monocentric analysis // *Transplantation.* – 2007. – Vol. 83. – P. 1174–1181.



70. Go A.S., Chertow G.M., Fan D. et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol.351. – № 13. – P. 1296–1305.
71. Gueler F., Gwinner W., Schwarz A., Haller H. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury // *Kidney Int.* – 2004. – Vol. 66 – P. 523–527.
72. Gungor O., Sen S., Kircelli F. et al. Plasmapheresis therapy in renal transplant patients: five-year experience // *Transplant. Proc.* – 2011. – Vol. 43. – № 3. – P. 853–857.
73. Gupta G., Unruh M. L., Nolin T.D. et al. Primary care of the renal transplant patient // *J. Gen. Intern. Med.* – 2010. – Vol.25. – № 7. – P. 731–740.
74. Harambat J., van Stralen K., Kim J.J., Tizard E.K. Epidemiology of chronic kidney disease in children // *Pediatr Nephrol.* – 2012. – Vol.27. – P. 363–373.
75. Hariharan S., Johnson C.P., Bresnahan B.A. et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996 // *N. Engl. J. Med.* – 2000. – Vol. 342. – № 9. – P. 605–612.
76. Hauet T., Goujon J.M., Baumert H., et al. Polyethylene glycol reduces the inflammatory injury due to cold ischemia/reperfusion in autotransplanted pig kidneys // *Kidney Int.* – 2002. – Vol.62. –P. 654–667.
77. Hausenloy D.J., Yellon D.M. The therapeutic potential of ischemic conditioning: an update // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2011. – Vol. 8. – P. 619–629.
78. Hernandez-Fuentes M.P., Franklin C., Rebollo-Mesa I. et al. Long- and short-term outcomes in renal allografts with deceased donors: A large recipient and donor genome-wide association study // *Am. J. Transplant.* – 2018. – Vol. 18. – № 6. – P. 1370–1379.
79. Hevesi Z.G. Supportive care after brain death for the donor candidate. // *Int. Anesthesiol. Clin.* – 2006. – Vol. 44. – № 3. – P. 21–34.
80. Hill N.R., Fatoba S.T., Oke J.L. et al. Global prevalence of chronic kidney disease – A Systematic review and meta-analysis // *PloS One.* – 2016. – Vol. 11. – № 7. – P. e0158765.

- 81.Hod T., Goldfarb–Rumyantzev A.S. Clinical issues in renal transplantation in the elderly // *Clin. Transplant.* – 2015. – Vol. 29. – № 2. – P. 167–175.
- 82.Hogg R.J., Furth S., Lemley K.V. et al. National kidney foundation's kidney disease outcomes quality initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification // *Pediatrics.* – 2003. – Vol.111. – № 6. – P. 1416–1421.
- 83.Huang Y., Shan J., Wang C. et al. Can ischemic preconditioning alone really protect organs from ischemia reperfusion injury in transplantation // *Transpl. Immunol.* – 2009. – Vol.20. – № 3. – P. 127–131.
- 84.Huang Y., Rabb H., Womer K.L. Ischemia–reperfusion and immediate T cell responses // *Cell. Immunol.* – 2007. – Vol. 248. – № 1. – P. 4–11.
- 85.Irish W. D., Katz E. Cold machine perfusion or static cold storage of kidneys: why the debate continues // *Am. J. Transplant.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1955–1956.
- 86.Itoh M., Takaoka M., Shibata A., et al. Preventive effect of lactacystin, a selective proteasome inhibitor, on ischemic acute renal failure in rats // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2001. – Vol. 298. – P. 501–507.
- 87.Jamieson R.W., Friend P.J. Organ reperfusion and preservation // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 221–235.
- 88.Jang H. R., Ko G. J. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney // *J. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 87. – P. 859–864.
- 89.Jaswal J.S., Gandhi M., Finegan B.A. et al. Inhibition of p38 MAPK and AMPK restores adenosine–induced cardioprotection in hearts stressed by antecedent ischemia by altering glucose utilization // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2007. – Vol. 293. – P. 1107–1114.
- 90.Jayle C., Milinkevitch S., Favreau F. et al. Protective role of selectin ligand inhibition in a large animal model of kidney ischemia–reperfusion injury // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69. – № 10. – P. 1749–1755.

91. Jun C., Quingshu L., Ping L. et al. Protective effect of CXCR3+CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T Cells in renal ischemia–reperfusion injury // *Mediators Inflamm.* – 2015. – Vol. – 2015. – P. 360973–360980.
92. Kaabak M., Babenko N., Shapiro R. et al. A prospective randomized, controlled trial of eculizumab to prevent ischemia–reperfusion injury in pediatric kidney transplantation // *Pediatr. Transplant.* – 2018. – Vol. 22. – № 2. – P. e13129–e13136.
93. Kahan B.D., Stepkowski S., Kilic M., et al. Phase I and phase II safety and efficacy trial of intercellular adhesion molecule–1 antisense oligodeoxynucleotide (ISIS 2302) for the prevention of acute allograft rejection // *Transplantation.* – 2004. – Vol. 78. – P. 858–863.
94. Kaminska D., Tyran B., Mazanowska O. et al. Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia–reperfusion injury using in situ reverse–transcription polymerase chain reaction analysis // *Transplantation.* – 2007. – Vol. 84. – № 2. – P. 1118–1124.
95. Kathis J.M., Echeverri J., Chun Y.M. et al. Continuous normothermic *ex vivo* kidney perfusion improves graft function in donation after circulatory death pig kidney transplantation // *Transplantation.* – 2017. – Vol. 101. – № 4. – P. 754–763.
96. Kathis J.M., Paul A., Robinson L.A., Selzner M. *Ex vivo* machine perfusion for renal graft preservation // *Transplant. Rev. (Orlando).* – 2018. – Vol. 32. – № 1. – P. 1–9.
97. Kathis J.M., Hamar M., Echeverri J. et al. Normothermic *ex vivo* kidney perfusion for graft quality assessment prior to transplantation // *Am. J. Transplant.* – 2018. – Vol. 18. – № 3. – P. 580–589.
98. Kezić A., Stajic N., Thaiss F. Innate immune response in kidney ischemia/reperfusion injury: Potential target for therapy // *J. Immunol. Res.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 6305439.
99. Kierulf–Lassen C., Kristensen M.L.V., Birn H. et al. No effect of remote ischemic conditioning strategies on recovery from renal ischemia–reperfusion

- injury and protective molecular mediators // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 12. – P. e0146109–e0146127.
100. Kim B.S., Lim S.W., Li C. et al. Ischemia–reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys // *Transplantation*. – 2005. – Vol. 79. – № 10. – P. 1370–1377.
101. Knoll G .A. Kidney transplantation in the older adult // *Am. J. Kidney Dis*. – 2013. – Vol.61. – № 5. – P. 790–797.
102. Koike N., Takeyoshi I., Ohki S., et al. Effects of adding P38 mitogen–activated protein–kinase inhibitor to celsior solution in canine heart transplantation from non–heartbeating donors // *Transplantation*. – 2004. – Vol. 77. – P. 286–292.
103. Kościelska–Kasprzak K., Bartoszek D., Myszka M. et al. The complement cascade and renal disease // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. – 2014. – Vol. 62. – № 1. – P. 47–57.
104. Kosieradzki M., Rowinski W. Ischemia/Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Mechanisms and Prevention // *Transplantation Proceedings*. – 2008. – Vol. 40. – P. 3279–3288.
105. Krogstrup N.V., Oltean M., Bibby B.M. et al. Remote ischaemic conditioning on recipients of deceased renal transplants, effect on immediate and extended kidney graft function: a multicentre, randomised controlled trial protocol (CONTEXT) // *BMJ Open*. – 2015. – Vol. 5. – № 8. – P. e007941–e007944.
106. Kwiatkowski A., Wszola M., Perkowska–Ptasinska A. et al. Influence of preservation method on histopathological lesions of kidney allografts // *Ann. Transplant*. – 2009. – Vol. 14. – P. 10–13.
107. Kwiatkowski A., Wszola M., Kosieradzki M. et al. The early and long term function and survival of kidney allografts stored before transplantation by hypothermic pulsatile perfusion. A prospective randomized study // *Ann. Transplant*. – 2009. – Vol. 14. – P. 14–17.

108. Lan J.H., Tinckam K. Clinical Utility of Complement Dependent Assays in Kidney Transplantation // *Transplantation*. – 2018. – Vol. 102. – № 1S. – P. S14–S22.
109. Larbi A., Pawelec G., Wong S.C. et al. Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? // *Ageing Res. Rev.* – 2011. – Vol. 10. – № 3. – P. 370–378.
110. Latanich C.A., Toledo–Pereyra L.H. Searching for NF–kappaB–based treatments of ischemia reperfusion injury // *J. Invest. Surg.* – 2009. – Vol. 22. – P. 301–315.
111. Lefaucheur C., Viglietti D., Hidalgo L.G. Complement–activating anti–HLA antibodies in kidney transplantation: Allograft gene expression profiling and response to treatment // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2018. – Vol. 29. – № 2. – P. 620–635.
112. Legendre C., Sberro–Soussan R., Zuber J., Rabant M. et al. Eculizumab in renal transplantation // *Transplant. Rev. (Orlando)*. – 2013. – Vol. 27. – № 3. – P. 90–92.
113. Legendre C., Sberro–Soussan R., Zuber J., Frémeaux–Bacchi V. The role of complement inhibition in kidney transplantation // *Br. Med. Bull.* – 2017. – Vol. 124. – № 1. – P. 5–17.
114. Lemoine M., Guerrot D., Bertrand D. Focusing on kidney transplantation in the elderly // *Nephrol. Ther.* – 2018. – Vol. 14. – № 2. – P. 71–80.
115. Lennertz A., Fertmann J., Thomae R. et al. Plasmapheresis in C4d–positive acute humoral rejection following kidney transplantation: a review of 4 cases // *Ther. Apher. Dial.* – 2003. – Vol. 7. – № 6. – P. 529–535.
116. Lewis A.G., Kohl G., Ma Q., et al. Pharmacological targeting of C5a receptors during organ preservation improves kidney graft survival // *Clin. Exp. Immunol.* – Vol. 153. – P. 117–126.
117. Li J., Qi G., Tu G. et al. Gene therapy in kidney transplantation: Evidence of efficacy and future directions // *Curr. Gene Ther.* – 2017. – Vol. 17. – № 6. – P. 434–441.

118. Li L., Huang L., Sung S.S., et al. NKT cell activation mediates neutrophil IFN- $\gamma$  production and renal ischemia-reperfusion injury // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 5899–5911.
119. Lionaki S., Kapsia H., Makropoulos I. et al. Kidney transplantation outcomes from expanded criteria donors, standard criteria donors or living donors older than 60 years // *Ren. Fail.* – 2014. – Vol. 36. – № 4. – P. 526–533.
120. Livigni S., Silengo D., Maio M., et al. Characterization of the coupled plasma filtration-adsorption resin cartridge adsorptive capacity for cytokines and inflammatory mediators: adsorption profiles from septic patient plasma and in vitro endotoxin-stimulated whole blood // *Crit. Care.* – 2007. – Vol. 11. – № 2. – P. 118.
121. Lugo-Baruqui A., Guerra G., Arocha A. et al. Use of kidneys with small renal tumors for transplantation // *Curr. Urol. Rep.* – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 3–12.
122. Lutz J., Thürme K., Heemann U. Anti-inflammatory treatment strategies for ischemia/reperfusion injury in transplantation // *J. Inflamm.* – 2010. – Vol. 7. – P. 27–34.
123. Lutz J., Yao Y., Song E., et al. Inhibition of matrix metalloproteinases during chronic allograft nephropathy in rats // *Transplantation.* – 2005. – Vol. 79. – P. 655–661.
124. Maathuis M. H., Manekeller S., van der Plaats A. et al. Improved kidney graft function after preservation using a novel hypothermic machine perfusion device // *Ann. Surg.* – 2007. – Vol. 246. – № 6. – P. 982–988.
125. Martín S., Pérez A., Aldecoa C. Sepsis and Immunosenescence in the Elderly Patient: A Review // *Front. Med.* – 2017. – Vol. 4. – P. 20.
126. Martinez-Mier G., Toledo-Pereyra L.H., Ward P.A. Adhesion molecules in liver ischemia and reperfusion // *J. Surg. Res.* – 2000. – Vol. 94. – P. 185–194.
127. Martínez-Vaquera S., Navarro Cabello M.D., López-Andreu M. et al. Outcomes in renal transplantation with expanded-criteria donors // *Transplant. Proc.* – 2013. – Vol. 45. – № 10. – P. 3595–3598.

128. Martinon F., Burns K., Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$  // *Mol. Cell.* – 2002. – Vol. 10. – P. 417–426.
129. Maxwell S.R., Lip G.Y. Reperfusion injury: A review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options // *Int. J. Cardiol.* – 1997. – Vol.58. – P. 95–117.
130. McGregor T.B., Rampersad C., Patel P. Expanding living kidney donor criteria with ex-vivo surgery for renal anomalies // *Can. Urol. Assoc. J. J. Assoc. Urol. Can.* –2016. – Vol. 10. – № 9–10. – P. 301–305.
131. McKay D., Jameson J. Kidney transplantation and the ageing immune system // *J. Nat. Rev. Nephrol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 700–708.
132. Meldrum D.R., Dinarello C.A., Cleveland J.C. Jr. et al. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor  $\alpha$  mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated protein kinase dependent mechanism // *Surgery.* – 1998. – Vol.124. – № 2. – P. 291–297.
133. Metelitsa L.S., Naidenko O.V., Kant A. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – № 6. – P. 3114–3122.
134. Miller R.A. The aging immune system primer and prospectus // *Science.* – 1996. – Vol. 273. – P. 70–74.
135. Milsom A.B., Patel N.S.A., Mazzon E. et al. Role for endothelial nitric oxide synthase in nitrite-induced protection against renal ischemia-reperfusion injury in mice // *Nitric Oxide.* – 2010. – Vol. 22. – № 2. – P. 141–148.
136. Miret-Alomar E., Trilla-Herrera E., Lorente-Garcia D. et al. Systematic review of kidney transplantation functional predictors // *Actas Urol. Esp.* – 2017. – Vol. 42. . – № 4. – P. 218–226.
137. Moers C., Smits J.M., Maathuis M. –H.J. et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360. – P. 7–19.

138. Neary P., Redmond H.P. Ischaemia–reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome, *Ischemia–Reperfusion Injury // Science.* – Vol. 1999. – P. 123–136.
139. Nguyen M. –T.J., Fryml E., Sahakian S. et al. Pretransplant recipient circulating CD4+CD127lo/– tumor necrosis factor receptor 2+ regulatory T cells: A surrogate of regulatory T cell–suppressive function and predictor of delayed and slow graft function after kidney transplantation // *Transplantation.* – 2016. – Vol. 100. – № 2. – P. 314–324.
140. Nissenson A.R., Pereira B.J.G., Collins A.J., Steinberg E.P. Prevalence and characteristics of individuals with chronic kidney disease in a large health maintenance organization // *Am. J. Kidney Dis.* – 2001. – Vol. 37. – № 6. – P. 1177–1183.
141. Oikawa M., Hatakeyama S., Narita T. et al. Safety and effectiveness of marginal donor in living kidney transplantation // *Transplant. Proc.* – 2016. – Vol. 48. – № 3. – P. 701–705.
142. Onai Y., Suzuki J., Kakuta T. et al. Inhibition of IkappaB phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* – 2004. – Vol. 63. – P. 51–59.
143. Ozkul F., Erbis H., Yilmaz V.T. et al. Effect of age on the outcome of renal transplantation: A single–center experience // *Pak. J. Med. Sci.* – 2016. – Vol. 32. – № 4. – P. 827–830.
144. Paganelli R., Scala E., Quinti I., Ansotegui I.J. Humoral immunity in aging // *Aging.* – 1994. – Vol. 6. – P. 143–150.
145. Pallet N., Thervet E., Timsit M. –O. Angiogenic response following renal ischemia reperfusion injury: new players // *Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol.* – 2014. – Vol. 24. – Suppl 1. – P. S20–25.
146. Panes J., Perry M., Granger D.N. Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention // *Br. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol.126. – P.537–550.



147. Peters–Sengers H., Berger S.P., Heemsker M.B.A. et al. Stretching the Limits of Renal Transplantation in Elderly Recipients of Grafts from Elderly Deceased Donors // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2017. – Vol. 28. – № 2. – P. 621–631.
148. Ponticelli C. Ischaemia–reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2014. – Vol. 29. – № 6. – P. 1134–1140.
149. Pratschke J., Wilhelm M.J., Laskowski I. et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2001. – Vol.12. – № 11. –P. 2474–2481.
150. Pratschke J., Merk V., Reutzel–Selke A. et al. Potent early immune response after kidney transplantation in patients of the European senior transplant program // *Transplantation.* – 2009. – Vol. 87. – № 7. – P. 992–1000.
151. Pratschke J., Wilhelm M.J. et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2001. – Vol.12. – P.2474–2481.
152. Pruijm M.T., Cherpillod A., Vogt B., Burnier M. Plasmapheresis: technique, complications and indications // *Rev. Med. Suisse.* – 2008. – Vol. 5. – № 4. – P. 581–588.
153. Pushpakumar S.B., Perez–Abadia G., Soni C. et al. Enhancing complement control on endothelial barrier reduces renal post–ischemia dysfunction // *J. Surg. Res.* – 2011. – Vol. 170. – № 2. – P. e263–270.
154. Quintana F.J., Cohen I.R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation // *J. Immunol.* – 2005. – Vol.175. – P.2777–2782.
155. Ranasinghe A. M., Bonser R. S. Endocrine changes in brain death and transplantation // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2011. – Vol. 25. – P. 799–812.
156. Rao P. S., Merion R.M., Ashby V.B. et al. Renal transplantation in elderly patients older than 70 years of age: results from the scientific registry of transplant recipients // *Transplantation.* – 2007. – Vol. 83. – № 8. – P. 1069–1074.

157. Ravaioli M., De Pace V., Comai G. и др. Successful dual kidney transplantation after Hypothermic oxygenated perfusion of discarded human kidneys // *Am. J. Case Rep.* – 2017. – Vol. 18. – P. 1009–1013.
158. Ravichandran P., Nataraj T., Jaganath C. Splenic radiation and double-filtration plasmapheresis in crossmatch-positive live renal transplantation // *Transplant. Proc.* – 2005. – Vol. 37. – № 4. – P.1806–1807.
159. Regner K. R., Nilakantan V., Ryan R.P. et al. Protective effect of Lifor solution in experimental renal ischemia-reperfusion injury // *J. Surg. Res.* – 2010. – Vol. 164. – № 2. – P. 291–297.
160. Rink L., Cakman I., Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly // *Mech. Ageing Dev.* – 1998. – Vol. 102. – № 2–3. – P.199–209.
161. Rodrigue J.R., LaPointe Rudow D., Hays R. Living donor kidney transplantation: Best practices in live kidney donation – recommendations from a consensus conference // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2015. – Vol. 10. – № 9. – P. 1656–1657.
162. Rosenberger C., Griethe W., Gruber G. et al. Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction // *Kidney Int.* – 2003. – Vol.64. – № 3. – P.874–886.
163. Saat T.C., van den Akker E.K., IJzermans J.N.M. et al. Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? // *J. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 20.
164. Sabroe I., Read R.C., Whyte M.K.B. et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain // *J. Immunol.* – 2003. – Vol.171. – № 4. – P. 1630–1635.
165. Salvadori M., Rosso G., Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment // *World J. Transplant.* – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 52–67.
166. Scalea J.R., Redfield R.P., Muth B.L. et al. Older kidney transplant patients experience less antibody-mediated rejection: a retrospective study of patients

- with mild to moderate sensitization // *Clin. Transplant.* – 2015. – Vol. 29. – № 12. – P. 1090–1097.
167. Schmitt V., Rink L., Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging // *Exp. Gerontol.* – 2013. – Vol. 48. – № 12. – P. 1379–1386.
168. Segall L., Nistor I., Pascual J. et al. Criteria for and appropriateness of renal Transplantation in elderly patients with end-stage renal disease: A literature review and position statement on behalf of the european renal association–european dialysis and transplant association descartes working group and european renal best practice // *Transplantation.* – 2016. – Vol. 100. – № 10. – P. e55–65.
169. Seyda M., Quante M., Uehara H. et al. Immunosenescence in renal transplantation: a changing balance of innate and adaptive immunity // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2015. – Vol. 20. – № 4. – P. 417–423.
170. Shah S.H. Recent advances in extracorporeal therapies // *Apollo medicine.* – 2013. – Vol. 10. – P. 2.
171. Singh R.P., Farney A.C., Rogers J. et al. Kidney transplantation from donation after cardiac death donors: lack of impact of delayed graft function on post-transplant outcomes // *Clin. Transplant.* – 2011. – Vol. 25. – № 2. – P. 255–264.
172. Smith M., Vyas H. Management of the potential organ donor // *Pediatr. Child Health.* – 2011. – Vol. 21. – P. 182–186.
173. Snelgrove S.L., Lo C., Hall P. et al. Activated renal dendritic cells cross present intrarenal antigens after ischemia–reperfusion injury // *Transplantation.* – 2017. – Vol. 101. – № 5. – P. 1013–1024.
174. Snoeijs M.G., van Bijnen A., Swennen E. et al. Tubular epithelial injury and inflammation after ischemia and reperfusion in human kidney transplantation // *Ann. Surg.* – 2011. – Vol. 253. – № 3. – P. 598–604.
175. Snoeijs M.G.J., van Bijnen A., Swennen E. et al. Tubular epithelial injury and inflammation after ischemia and reperfusion in human kidney transplantation // *Ann. Surg.* – 2011. – Vol. 253. – № 3. – P. 598–604.

176. Stemer G., Lemmens–Gruber R. Clinical pharmacy activities in chronic kidney disease and end–stage renal disease patients: a systematic literature review // *BMC Nephrol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 35.
177. Summers D.M., Watson C.J.E., Pettigrew G.J. et al. Kidney donation after circulatory death (DCD): state of the art // *Kidney Int.* – 2015. – Vol. 88. – № 2. – P. 241–249.
178. Sun P., Liu J., Li W. et al. Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice // *J. Transl. Med.* – 2016. – Vol. 14. – P. 28.
179. Takada M., Nadeau K.C., Shaw G.D. et al. The cytokine–adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney inhibition by a soluble P–selectin ligand // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99. – № 11. – P. 2682–2690.
180. Thurman J. M. Triggers of Inflammation after Renal Ischemia/Reperfusion // *Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 123. – № 1. – P. 7–13.
181. Toyokuni S. Reactive oxygen species–induced molecular damage and its application in pathology // *Pathol. Int.* – 1999. – Vol. 49. – P. 91–102.
182. Treckmann J., Moers C., Smits J.M. et al. Machine perfusion versus cold storage for preservation of kidneys from expanded criteria donors after brain death // *Transpl. Int.* – 2011. – Vol. 24. – № 6. – P. 548–554.
183. Tullius S. G., Milford E. Kidney allocation and the aging immune response // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364. – P. 1369–1370.
184. Turani F., Falco M., Barchetta R., et al. Different effect of CVVHDF and coupled plasma filtration and adsorption on IL–6 and procalcitonin in sepsis // *Crit. Care.* – 2011. – Vol. 15. – № 1. – P. 117.
185. Turani F., Falco M., Natoli S., et al. Coupled plasma filtration and adsorption in septic shock: a multicentric experience // *Crit. Care.* – 2010. – Vol. 14. – № 1. – P. S139.

186. US Department of health and human services. OPTN organ transplant and procurement network [online],  
<http://optn.transplant.hrsa.gov/latestData/viewDataReports.asp> (2012).
187. van de Kerkhove M. P., Hoekstra, R., van Nooijen, et al. Subnormothermic preservation maintains viability and function in a porcine hepatocyte culture model simulating bioreactor transport // *Cell Transplant.* – 2006. – Vol. 15. – № 2. – P. 161–168.
188. van der Hoeven J.A., Molema G., Ter Horst G.J. et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys // *Kidney Int.* – 2003. – Vol. 64. – № 5. – P. 1874–1882.
189. Ventura M.T., Casciaro M., Gangemi S., Buquicchio R.  
Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation // *Clin. Mol. Allergy.* – 2017. – Vol. 15. – P. 21.
190. Vincenti F., Mendez R., Pescovitz M., et al. A phase I/II randomized open-label multicenter trial of efalizumab, a humanized anti-CD11a, anti-LFA-1 in renal transplantation // *Am. J. Transplant.* – 2007. – Vol. 7. – P. 1770–1777.
191. Wang S., Diao H., Guan Q., et al. Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation // *Kidney Int.* – 2008. – Vol. 73. – P. 318–326.
192. Wang V., Vilme H., Maciejewski M.L. et al. The economic burden of chronic kidney disease and end-stage renal disease // *Semin. Nephrol.* – 2016. – Vol. 36. – № 4. – P. 319–330.
193. Westendorp W.H., Leuvenink H.G., Ploeg, R.J. Brain death induced renal injury // *Curr. Opin. Organ Transplant.* – 2011. – Vol. 16. – P. 151–156.
194. Wever K.E., Warlé M.C., Wagener F.A. et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2011. – Vol. 26. – № 10. – P. 3108–3117.

195. Weyand C.M., Goronzy J.J. Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets // *Ann. Am. Thorac. Soc.* – 2016. – Vol. 13. – № 5. – P. S422–S428.
196. Wu J., Feng X., Huang H. et al. Remote ischemic conditioning enhanced the early recovery of renal function in recipients after kidney transplantation: a randomized controlled trial // *J. Surg. Res.* – 2014. – Vol. 188. – № 1. – P. 303–308.
197. Xu H., Chen C., Hu L., Hou J. Gene-modified mesenchymal stem cell-based therapy in renal ischemia-reperfusion injury // *Curr. Gene Ther.* – 2018. – Vol. 18. – № 6. – P. 453–460.
198. Yager E. J., Agmed M., Lanzer K. et al. Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus // *J. Exp. Med.* – 2008. – Vol. 205. – № 3. – P. 711–723.
199. Yao J.H., Li Y.H., Wang Z.Z., et al. Proteasome inhibitor lactacystin ablates liver injury induced by intestinal ischaemia-reperfusion // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – Vol. 34. – P. 1102–1108.
200. Yokota N., Burne-Taney M., Racusen L., Rabb H. Contrasting roles for STAT4 and STAT6 signal transduction pathways in murine renal ischemia-reperfusion injury // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – № 2. – P.319–325.
201. Yoshinari D., Takeyoshi I., Kobayashi M., et al. Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to university of wisconsin solution on reperfusion injury in liver transplantation // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 72. – P. 22–27.
202. Zhang S., Shaw-Boden J., Banz Y. et al. Effects of C1 inhibitor on endothelial cell activation in a rat hind limb ischemia-reperfusion injury model // *J. Vasc. Surg.* – 2018. – Vol. 68. – № 6. – P. 209S–221S.e2.
203. Zhang Z.X., Wang S., Huang X., et al. NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 7489–7498.

204. Zhao H., Alam A., Soo A.P. et al. Ischemia–reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond // *EBioMedicine*. – 2018. – Vol. 28. – P. 31–42.
205. Zhou T., Sun G.Z., Zhang M.J., et al. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia–reperfusion injury and anti–adhesive intervention with anti–P–selectin lectin–EGF domain monoclonal antibody // *World J. Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11. – P. 1005–1010.
206. Zimmerman R. F., Ezeanuna P.U., Kane J.C. et al. Ischemic preconditioning at a remote site prevents acute kidney injury in patients following cardiac surgery // *Kidney Int.* – 2011. – Vol. 80. – № 8. – P. 861–867.
207. Zwaini Z. Dai H., Stover C., Yang B. Role of complement properdin in renal ischemia–reperfusion injury // *Curr. Gene Ther.* – 2017. – Vol. 17. –№ 6. – P. 411–423.