

**«Регенеративная медицина и клеточные технологии
в практической медицине»**



С.С. Сапарбаев



Lorenz Lorenz Co., Ltd
2nd Street, Los Angeles
CA 90012

УДК616-003

ББК 54.1

Утверждено на ученом совете АО «ННМЦ» протокол №3 от 10.10.2019г.

С 19 «Регенеративная медицина и клеточные технологии в практической медицине»/
С.С. Сапарбаев.-Астана: Типография «IndigoPrint», 2020.-132с

ISBN:978-601-80817-3-6

Автором проведен обзор современной литературы исследований мировых ученых в данном направлении. В монографии приведен анализ современных взглядов на патогенез, клинические проявления и современные подходы лечения наиболее распространенных хронических заболеваний, значения оптимального процесса заготовок клеточного материала и режима низкотемпературного замораживания фетальных клеток, а также в полном объеме описаны методы трансплантации фетальных гепатоцитов, нефроцитов, хондроцитов, нейроцитов, островковых клеток Лангерганса, клиническая эффективность клеток после длительного низкотемпературного хранения, определены основные биохимические показатели до и после трансплантации фетальных клеток.

Фетальная терапия представляет собой новую медицинскую лечебную технологию, основанную на трансплантации фетальных тканей и клеток для активизации множественных резервных возможностей организма.

Актуальность выбранной темы монографии не вызывает сомнения, потому как проблема лечения хронических заболеваний таких как сахарный диабет, цирроз печени, почечная недостаточность, заболевания ЦНС остаются одной из важнейших вопросов в современной хирургии. В этой связи, применение клеточных технологий в лечении данной категории пациентов обусловлена прежде всего широкими положительными свойствами стволовых фетальных клеток и их применением в трансплантологии.

УДК616-003

ББК 54.1

ISBN:978-601-80817-3-6

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ВНЕСЕНИИ СВЕДЕНИЙ В ГОСУДАРСТВЕННЫЙ РЕЕСТР
ПРАВ НА ОБЪЕКТЫ, ОХРАНЯЕМЫЕ АВТОРСКИМ ПРАВОМ

№ 8023 от «7» февраля 2020 года

Фамилия, имя, отчество, (если оно указано в документе, удостоверяющем личность) автора (ов):
САПАРБАЕВ САМАТ САГАТОВИЧ

Вид объекта авторского права: **произведение науки**

Название объекта: **Регенеративная медицина и клеточные технологии в практической медицине**

Дата создания объекта: **2.12.2019**



Құжат түпнұсқасын <http://www.kazpatent.kz/ru> сайтының
"Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады. <https://copyright.kazpatent.kz>

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz
в разделе «Авторское право» <https://copyright.kazpatent.kz>

Подписано ЭЦП

Абулкаиров Н.А.

Содержание

	Нормативные ссылки	6
	Определения	7
	Обозначения и сокращения	8
	Введение	10
	Основная часть	20
1	Выбор направления исследования	20
1.1	Хронические диффузные заболевания печени	25
1.2	Гипотиреоз	27
1.3	Хронический гломерулонефрит	29
1.4	Органические заболевания ЦНС	30
1.5	Дегенеративные заболевания опорно-двигательного аппарата	32
1.6	Сахарный диабет	33
2	Процесс теоретических и экспериментальных исследований	35
	Забор, диссоциация, консервация, хранение и трансплантация различных фетальных	35
2.1	клеток	
2.1.1	Характеристика объекта исследований	35
2.1.2	Методы исследования. Клинические и лабораторные методы	37
	исследования	
2.1.2.1	Цитологическое исследование до криоконсервации	37
2.1.2.2	Цитологическое исследование после криоконсервации	38
2.1.2.3	Методики определения функциональной активности фетальных клеток человека	38
2.1.3	Криопрезервация	41
2.1.3.1	Исследования длительного хранения суспензии	42
	изолированных фетальных гепатоцитов человека и способы оценки их	
	жизнеспособности	
2.1.3.2	Определение оптимального режима низкотемпературного	44
	замораживания фетальных гепатоцитов человека	
2.1.3.3	Разработка оптимального способа низкотемпературного	46
	замораживания фетальных печёночных клеток	
2.1.3.4	Исследования функциональной активности фетальных	48
	гепатоцитов человека в условиях гипотермии	
2.1.4	Методы трансплантации фетальных гепатоцитов	59
2.1.5	Методы трансплантации фетальных тиреоцитов	59
2.1.6	Методы трансплантации фетальных нефроцитов	62
2.1.7	Методы трансплантации фетальных хондроцитов	62

2.1.8	Методы трансплантации фетальных нейроцитов	62
2.1.9	Метод трансплантации островковых клеток	64
3	Обобщение и оценка результатов исследований	65
3.1	Оценка длительного низкотемпературного замораживания фетальных гепатоцитов человека	65
3.2	Оценка клинической эффективности трансплантации криоконсервированных фетальных гепатоцитов человека	66
3.3	Оценка лабораторных показателей после ТФГ у больных ЦП в зависимости от класса по Чайлд-Пью	73
3.3.1	Динамика показателей общего билирубина после ТФГ	73
3.3.2	Динамика показателей АЛат после ТФГ	75
3.3.3	Динамика показателя ГГТП после ТФГ	77
3.3.4	Динамика показателя ЩФ после ТФГ	77
3.3.5	Динамика показателя сывороточного альбумина после ТФГ	78
3.3.6	Динамика ТВ после ТФГ	79
3.3.7	Динамика уровня АФП после ТФГ	81
3.4	Оценка эффективности трансплантации ФТ у больных гипотиреозом	82
3.5	Оценка эффективности трансплантации фетальных нефроцитов у больных ХЗП	83
3.5.1	Критерии эффективности ТФН по анализу показателей гемостаза при хронических заболеваниях почек	88
3.5.2	Особенности изменений системы гемостаза и состояния липидного обмена при различных клинических формах хронического гломеруло-нефрита до и после трансплантации фетальных нефроцитов	90
3.6	Оценка эффективности трансплантации фетальных нейроцитов у больных с органическими заболеваниями ЦНС	90
3.6.1	Клинико-неврологическая динамика в основной группе исследования после трансплантации фетальных нейроцитов	92
3.7	Оценка эффективности трансплантации фетальных хондроцитов у больных с заболеваниями опорно-двигательного аппарата	109
3.8	Оценка эффективности трансплантации островковых клеток у больных сахарным диабетом	113
	Заключение	118
	Список использованных источников	120

Нормативные ссылки

В настоящей монографии использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 1.5-93 Государственная система стандартизации РФ. Общие требования к построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов

ГОСТ 2.105-95 Единая система конструкторской документации. Общие требования к текстовым документам

ГОСТ 2.111-68 Единая система конструкторской документации. Нормоконтроль

ГОСТ 6.38-90 Унифицированные системы документации. Система организационно-распорядительной документации. Требования к оформлению документов

ГОСТ 7.1-84 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования

ГОСТ 7.12-93 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила

ГОСТ 7.54-88 Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования

ГОСТ 8.417-81 Государственная система обеспечения единства измерений. Единицы физических величин

ГОСТ 13.1.002-80 Репрография. Микрография. Документы для съемки. Общие требования и нормы

ГОСТ 15.011-82 Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок проведения патентных исследований

ГОСТ 9327-60 Бумага и изделия из бумаги. Потребительские форматы.

Определения

В настоящей монографии применены следующие термины с соответствующими определениями:

- Фетальные клетки - взвесь диссоциированных внутренних органов нежизнеспособных плодов человека, в сроках гестации 17-22 недель.

- Клеточная терапия – лечение морфофункциональной недостаточности внутренних органов и систем трансплантацией клеток.

- Фетальные тиреоциты – взвесь диссоциированной щитовидной железы нежизнеспособных плодов человека, в сроках гестации 17-22 недель

- Фетальные нефроциты – взвесь диссоциированной почечной ткани нежизнеспособных плодов человека, в сроках гестации 17-22 недель.

- Фетальные островковые клетки поджелудочной железы - взвесь диссоциированной поджелудочной железы (островковая часть) нежизнеспособных плодов человека, в сроках гестации 17-22 недель

- Гипотиреоз – гетерогенный синдром, характеризующийся снижением или полным выпадением функции щитовидной железы и изменениями функции различных органов и систем, обусловленными недостаточным содержанием в организме тиреоидных гормонов.

- Хронический гломерулонефрит – хроническое диффузное иммуновоспалительное поражение клубочков, прогрессирующее и переходящее на всю почечную паренхиму, приводящее к постепенному снижению функций почек.

- Хроническая почечная недостаточность – симптомокомплекс, характеризующийся снижением экскреторной и инкреторной функций почек, приводящий к нарушению гомеостаза внутренней среды организма.

- Сахарный диабет - симптомокомплекс, характеризующийся отсутствием или снижением инкреторной функций поджелудочной железы.

Обозначения и сокращения

- HGF – ростовой фактор гепатоцитов
IWP – международная рабочая группа
L_p – водная проницаемость плазматической мембраны
M – средняя арифметическая величина
m – стандартная ошибка средней арифметической величины
p – показатель достоверности
pCO₂ – парциальное давление углекислого газа
pO₂ – парциальное давление кислорода
V_b – неосмотический реактивный объём клеток
WCOG – всемирный конгресс гастроэнтерологов
АлАТ – аланинаминотрансфераза
АсАТ – аспаратаминотрансфераза
АФТКГ – аллофетотрансплантация криопрезервированных гепатоцитов
АФТСГ – аллофетотрансплантация свежеизолированных гепатоцитов
ВГ – вторичный гипотиреоз
ВГ – вирусный гепатит
ВРВ – варикозно расширенные вены
ДМСО – диметилсульфоксид
ИКП – изолированные клетки печени
ИЧЭ – ионочувствительный электрод
КП – криопротектор
ОА – остеоартроз
ОАК – общий анализ крови
ОАМ – общий анализ мочи
ОСК – объемная скорость кровотока
ПГ – первичный гипотиреоз
ПГ – портальная гипертензия
РБТЛ – реакция бласттрансформация лимфоцитов
РСК – региональные стволовые клетки
СД – сахарный диабет
СКФ – скорость клубочковой фильтрации.
ССК – специализированные соматические клетки

ТПН – терминальная почечная недостаточность.
ТФГ – трансплантация фетальных гепатоцитов
ФГА – фитогемаглютинин
ФН – фетальные нефроциты.
ФТ – фетальные тиреоциты
ХВГ – хронический вирусный гепатит
ХГ – хронический гепатит
ХГВ – хронический гепатит В
ХГН – хронический гломерулонефрит.
ХДПП – хронических диффузных поражений печени
ХПН – хроническая почечная недостаточность.
ЦП – цирроз печени
УЗИ- ультразвуковое исследование
ЧПСШ – чреспеченочное системное шунтирование
ЭСК – эмбриональные стволовые клетки
ТФН – трансплантация фетальных нейроцитов
ФКЧ-фетальные клетки человека
ХЗП – хронические диффузные заболевания почек
ЩФ- щелочная фосфатаза
ГГТП – гаммаглутаминтранспептидаза
ТВ - тромбиновое время
ЦНС - центральная нервная система
ННМЦ - Национальный научный медицинский центр
КЖ - качество жизни
МРТ- магнитно-резонансная томография
ПЦР- полимеразно-цепная реакция
ИФА- иммуно-ферментный анализ
ЦИК- циркулирующие иммунные комплексы
ЦСЖ- цереброспинальная жидкость
НСТ тест – тест восстановления нитрасинего тетразолия
ГШТД - Госпитальная шкала тревоги и депрессии

Введение

Одним из достижений медицины XX - столетия является разработка методов трансплантации органов. Трансплантология занимает особое место среди клинических дисциплин ввиду исключительности основной её задачи - интегрирования чужеродного генетического материала в систему обеспечения жизненных функций пациента.

В то же время клиническая трансплантология сталкивается с весьма сложными проблемами, сдерживающими её развитие. Это проблемы исключительной трудоёмкости и высокой стоимости операций, сложности в получении адекватного донорского материала, повышенного риска иммунного отторжения трансплантатов и осложнений, связанных с необходимостью жёсткого подавления функций иммунной системы. Клеточная трансплантология позволяет успешно решать некоторые из этих проблем. Отпадает необходимость в значительном хирургическом вмешательстве и существенно сокращается потребность в донорском материале, поскольку для замещения многих жизненно важных функций дефектного органа оказывается достаточно введения сравнительно небольшого количества донорских клеток. Наиболее подходящим для этих целей донорским материалом могут быть фетальные клетки.

В настоящее время одним из направлений в современной медицине является клеточная терапия, посредством, которой можно добиваться коррекции различных заболеваний. Одним из направлений клеточной терапии является трансплантация фетальных клеток, получаемых из абортивного материала. На данный момент методом трансплантации фетальных клеток проводится лечение заболеваний различных органов, в частности диффузных заболеваний печени, посттравматических и дегенеративных заболеваний центральной и периферической нервной системы, патологии щитовидной железы и многих других нозологических форм [1, 2].

Клетки человека в современной медицине являются не только важнейшей моделью, но и эффективным средством лечения заболеваний человека. Пересадка лишь 3 – 5 % гепатоцитов компенсирует практически любой метаболический дефект печени. Существенно, что линии специализированных соматических клеток лишены примеси ретикулоэндотелиальной ткани, которая содержит до 70% антигенов органа. Поэтому уровень иммунологических проблем в организме реципиента значительно уменьшен по сравнению с пересадкой исходных органов. Наконец, не последнюю роль играет и меньшая себестоимость клеточных трансплантаций по сравнению с пересадкой целого органа. Стоимость операции трансплантации печени в США и Европе колеблется между 250–350

тысяч долларов. Экономические соображения делают целесообразным развитие более дешевых клеточных пересадок в нашей стране [3,4,5].

Клиническое применение трансплантации фетальных тканей основано на достаточно богатом экспериментальном опыте. В перспективе клеточные трансплантации обладают рядом важнейших преимуществ по сравнению с пересадкой целого органа. Мини трансплантации клеток вполне достаточно для полной эффективной компенсации дефекта.

Хроническая печеночная недостаточность является исходом необратимых диффузных поражений печени. В оценке течения, прогноза и выбора метода лечения хронических заболеваний печени важное значение придается установлению их этиологии, прежде всего вирусной.

Высокая инфицированность населения вирусом гепатита «В» – около 2-х миллиардов человек и вирусом гепатита «С» – около 5-ти миллионов человек делают чрезвычайно высоким риск развития прогрессирующего хронического заболевания печени. Оно развивается среди носителей вируса гепатита «В» в 5-10 %, среди инфицированных вирусом гепатита «С» 65-85 % случаев. Около 1,5 миллионов человек в мире ежегодно умирают от связанных с вирусом гепатита «В» заболеваний печени [6,7,8,9,10,11,12,13].

По данным ВОЗ ежегодно регистрируется до 2 млн. случаев смерти от цирроза печени и печеночной недостаточности. В США за последние 15 лет смертность от цирроза печени и его осложнений увеличилась больше, чем от какого-либо другого заболевания, а общая смертность от цирроза печени определяется как 14,8 на 100 000. В Японии смертность от цирроза печени составляет 13,6 на 100 000. Летальность от цирроза печени имеет стойкую тенденцию к росту [14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26]. При необратимых быстро прогрессирующих поражениях печени в настоящее время радикальным единственным методом лечения является трансплантация органа [27,28,29,30]. Ежегодно в мире выполняется более 8000 тысяч трансплантаций печени. Несмотря на такое большое количество операций, число больных в листе ожидания неуклонно растет [31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43]. Потребность современной медицины в донорской печени составляет 10 органов в год на 1 миллион человек. Не более 2-х из 10-ти пациентов доживают до спасительной операции, остальные погибают без радикального лечения. И в современной трансплантологии делаются попытки пересаживать человеку не целый орган, а ткань донора, что открывает новые возможности коррекции нарушенных функций [44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59]. Научные исследования, проведенные на протяжении последних 50 лет, явились основой для развития современной фетальной терапии. Этика спасения умирающих больных толкает на новые радикальные решения и

становится одним из «моторов» прогресса клеточной трансплантологии [60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73, 74,75,76,82].

Клетки человека в современной медицине являются не только важнейшей моделью, но и эффективным средством лечения заболеваний человека.

Пересадка лишь 3-5 % гепатоцитов компенсирует практически любой метаболический дефект печени. Существенно, что линии специализированных соматических клеток лишены примеси ретикулоэндотелиальной ткани, которая содержит до 70% антигенов органа. Поэтому уровень иммунологических проблем в организме реципиента значительно уменьшен по сравнению с пересадкой исходных органов.

Одной из актуальных проблем внутренней медицины является нефрология. Число больных с ХПН, нуждающихся в пожизненной терапии диализом или трансплантации почки, во всех экономических развитых странах неуклонно увеличивается, причем число пациентов, поступающих на диализ, превышает число умерших больных. В результате, количество больных, получающих заместительную терапию, постоянно возрастает, что отражает увеличение распространенности хронических прогрессирующих заболеваний почек. Так в США за 10 лет число больных, которым проводится заместительная терапия, увеличилась, в 2 раза и составило 372000 человек [77,78,79,80,81].

Весьма перспективным в мировой фундаментальной науке является разработка методов забора, консервации, путей доставки и доз введения, фетальных нефроцитов и клеточных медиаторов в аспекте клеточной трансплантологии и терапии уроандрологических заболеваний.

Увеличение числа заболеваний, вызванных нарушениями гормональной регуляции, в частности заболевания щитовидной железы, является актуальной проблемой в клинике внутренних болезней. По распространенности заболевания щитовидной железы занимают первое место среди болезней эндокринной системы [131,132]. Распространенность гипотиреоза среди населения составляет 0,5-1%, а среди лиц старше 65 лет – 2-4%. Высокая частота неудовлетворительных исходов (летальность от гипотиреоидной комы за последние годы снижена с 80% до 50%), даже если лечение начато своевременно, свидетельствует об исключительной важности ее профилактики [133,134].

Бимодальные, преходящие, мономодальные формы заболеваний щитовидной железы требуют совершенствования диагностики и разработки новых подходов к лечению. В последние годы обсуждается возможность использования трансплантации фетальных тиреоцитов в качестве заместительной, иммуномодулирующей терапии при значительной недостаточности функции железы [135,136,137].

В современном мире увеличивается продолжительность жизни, человечество стареет, и вместе с развитием технического прогресса увеличивается распространенность и продолжающийся рост экзогенных вредных воздействий, вызывающих органическое поражение нервной системы.

Неуклонно увеличивается заболеваемость дегенеративными, травматическими, сосудистыми и демиелинизирующими заболеваниями мозга.

Широкий спектр неврологической патологии, трудности диагностики и лечения, высокий уровень летальности и инвалидизации определяют огромное социальное и медицинское значение данной проблемы [156,157].

Болезни и травмы нервной системы, как правило, существенно ограничивают физическую активность индивидуума, нарушают самообслуживание, трудоспособность, снижают уровень доходов и социально значимые функции, вызывают изменения в интеллектуально-мнестической и психоэмоциональной сферах [161,163].

Согласно статистическим данным, на 100 000 населения приходится примерно 60-140 человек с болезнью Паркинсона [162]. Возможно, возрастание продолжительности жизни в последние десятилетия обусловило увеличение распространенности болезни Паркинсона в развитых странах мира. По данным ВОЗ, в 90-е годы в мире более 4 миллионов человек страдало болезнью Паркинсона [159,164].

При болезни Паркинсона имеет место неуклонное прогрессирование симптомов - ежегодный темп ухудшения двигательных функций наиболее значителен в течение первых 4-9 лет заболевания, что соответствует лежащей в основе заболевания патологии нигральных структур.

Факторы, обуславливающие инвалидизацию при болезни Паркинсона, многообразны. Помимо физикальных симптомов, таких как тремор, ригидность мышц, постуральные нарушения, расстройства речи, амимия, следует отметить психические и психологические изменения, в том числе деменцию, депрессию, беспокойство. Степень инвалидизации больных, как правило, возрастает с увеличением тяжести заболевания. Изменения качества жизни пациентов с паркинсонизмом определяются не только стадией болезни и принимаемыми препаратами, но и связаны с наличием и уровнем депрессии, а также пониманием сущности своего заболевания и своих возможностей [165].

Консервативная заместительная терапия препаратами леводопы и применение других медикаментозных средств, направленных на коррекцию дисбаланса нейромедиаторов, со временем перестают быть эффективными у ряда больных, даже при увеличении дозы. Хирургические методы лечения, также в большинстве случаев не приводят к существенному

и стойкому положительному эффекту. Все это диктует необходимость дальнейшей разработки различных методов лечения и реабилитации данных пациентов.

Распространенность сирингомиелии составляет 8-9 человек на 100 000 населения. Заболевание чаще всего возникает в трудоспособном возрасте – от 10 до 60 лет и нередко приводит к формированию грубого неврологического дефекта с нарушением бытового и социального функционирования больных [159,166]. Лечение всех форм данного заболевания хирургическое и направлено на декомпрессию сирингомиелитической полости с целью предотвращения прогрессирующего поражения и декомпрессию спинного мозга в случае расширения спинномозгового канала. Оперативное вмешательство лишь стабилизирует состояние, но не приводит к регрессу уже существующих нарушений.

Проблема лечения больных с позвоночно-спинальной травмой и в настоящее время не теряет актуальности. Это определяется постоянным ростом удельного веса больных с осложненной травмой позвоночника в структуре общей травмы опорно-двигательной системы, преобладанием среди пострадавших лиц трудоспособного возраста, большими сроками лечения, почти 100% инвалидизацией и, как следствие, низким уровнем качества жизни.

Частота возникновения позвоночно-спинальной травмы в разных странах колеблется от 11 до 112 человек на 100 000 жителей. В настоящее время не существует эффективных методов терапии травматического повреждения спинного мозга, особенно когда после травмы прошли годы. Применение традиционных хирургических и консервативных методов лечения позволяет достигнуть лишь некоторого ослабления клинических проявлений последствий тяжелой позвоночно-спинальной травмы. Развившийся неврологический дефицит и органные дисфункции обычно остаются резистентными к применяемым лечебным воздействиям. Очевидна необходимость поиска новых эффективных методов лечения и улучшения качества жизни пациентов с травматической болезнью спинного мозга.

В настоящее время в мире насчитывается около 3 млн. больных рассеянным склерозом. Распространенность данного заболевания составляет от 10 до 50 случаев на 100 000 населения в зависимости от зоны эпидемиологического риска. Несмотря на расширение арсенала диагностических возможностей, позволивших углубить представление об этиологии и патогенезе рассеянного склероза, современные методы традиционной терапии далеко не всегда позволяют достичь желаемого результата, что наряду с большой социальной значимостью проблемы выводит изучение рассеянного склероза в круг наиболее актуальных задач неврологии XXI века [78,79,157].

Как правило, рассеянный склероз начинается в возрасте 20-40 лет и существенно не влияет на общую продолжительность жизни, но неизбежно приводит к снижению качества

жизни индивида. У большинства пациентов через несколько лет после дебюта заболевания наблюдается различная степень инвалидизации. С учетом распространенности болезни, общество стоит перед лицом комплекса проблем большой прослойки инвалидов молодого и среднего возраста. Очевидна необходимость мер, направленных на поддержание физической независимости, коррекцию психологических и социальных последствий болезни у этой категории больных.

В целом, проблеме лечения и медико-социальной реабилитации неврологических пациентов в последнее время во всем мире уделяется все большее внимание. Одной из главных самостоятельных целей реабилитации больных с поражениями нервной системы является повышение качества их жизни.

Несмотря на бурное развитие фундаментальных исследований мозга в последние 15-20 лет, достижения в понимании этиологии и патогенеза неврологических заболеваний и успехи клинической нейрофармакологии в их лечении остаются более чем скромными. Существующая патогенетическая и симптоматическая терапия, а также хирургические методы лечения, к сожалению, зачастую не приводят к регрессу уже существующего неврологического дефицита. Полагают, что задержка регресса клинических проявлений органических поражений ЦНС связана с крайне низким восстановительным потенциалом нервной ткани, а также с тем, что нейрогенез, т.е. формирование нервных клеток, уже завершается к моменту рождения, после которого новые нейроны практически не образуются [78,156].

Все это определяет необходимость поиска новых подходов в коррекции нарушенных функций при тяжелых неврологических расстройствах.

В последние годы большие надежды в терапии и реабилитации заболеваний ЦНС связаны с внедрением в комплекс лечебных мероприятий трансплантации фетальных тканей и клеток человека.

Большой интерес к методам нейротрансплантации, осуществляемой с целью восстановления нейроэндокринных и нейротрансмиссионных функций, обусловлен новейшими достижениями в области трансплантологии, связанными с расширением показаний к пересадке тканей и клеток, а также совершенствованием техники трансплантации и забора фетального материала [156,157,162].

Основанием к развитию нейротрансплантологии послужили фундаментальные нейробиологические исследования на животных по трансплантации эмбриональных и фетальных нервных клеток. В эксперименте доказана способность фетальной нервной клетки устанавливать синаптические и несинаптические контакты с тканями реципиента,

наблюдается реиннервация мозга реципиента с устойчивым выделением медиаторов на физиологическом уровне.

Успехи современной клинической нейротрансплантологии убедительно доказывают возможность эффективного лечения ряда, считавшихся ранее неизлечимых заболеваний. Появилась возможность оказания существенной помощи и улучшения качества жизни неврологическим пациентам [163,164]. На сегодняшний день метод трансплантации фетальных нервных клеток может считаться перспективным направлением, требующим дальнейших научных разработок на доклиническом и клиническом уровнях.

Клеточная терапия - метод, предполагающий те или иные разновидности трансплантации живых клеток с лечебной целью. В клиническое понятие «нейротрансплантация» входит трансплантация тканей и клеток центральной нервной системы, взятых от эмбрионов, плодов и взрослых особей, в различные участки ЦНС реципиента. Ожидаемый результат клеточной терапии при заболеваниях, сопровождающихся гибелью или дегенерацией нейронов - обеспечивать замещение погибших нейронов, адекватную продукцию трансплантантом нейротрофиков и нейротрансмиттеров, установление синаптических связей с окружающими отделами мозга и в конечном итоге восстановление поврежденных нейрональных сетей [161].

Идея использования живого организма как среды для трансплантации и выращивания нервной ткани возникла еще в конце XIX, начале XX века. Первые попытки пересадки ткани центральной нервной системы млекопитающих были неудачными в основном в связи с тем, что для них брали ткань взрослых животных. Первые же попытки использования для трансплантации нервной ткани эмбрионов или новорожденных животных оказались в какой-то степени обнадеживающими. Было обнаружено, что пересаженная нервная ткань растет, дифференцируется и функционирует. При этом эмбриональная ткань мозга оказывает нейротрофическое влияние на ткани реципиента. Несмотря на вероятную перспективность предложенного метода, долгое время эти работы не привлекали внимание, и к 50-60 годам XX столетия исследования в этой области практически прекратились. Возможно, это было связано с традиционным убеждением о почти мгновенной гибели ткани мозга при травме, аноксии, нарушении кровообращения и устоявшимися суждениями об отсутствии способности клеток ЦНС к регенерации. Однако за последние годы получен ряд принципиально новых данных, показывающих способность центральных нейронов к регенерации аксонов [78,156,162].

В эксперименте было доказано, что пересаженные нейроны способны реиннервировать близлежащие участки мозга, формируя синаптические и несинаптические контакты с нервными клетками реципиентов. Нейроны трансплантантов обнаруживают

спонтанную активность, высвобождают присущие им медиаторы, трофические и ростовые факторы. Эти биологически активные вещества (нейротрофины-3 и -4, нервный ростовой фактор, мозговой нейротрофический фактор, ганглиозиды, стадиоспецифические белки и пептиды, антиоксиданты и перехватчики активных форм кислорода, адаптогены, противовоспалительные бактериостатические соединения, пептиды, стимулирующие иммунокомпетентные клетки, опиаты, гормоны и др.) способны обеспечивать выживание нейронов, стимулировать регенерацию поврежденных тканей реципиента и создавать благоприятное микроокружение для аксонального роста [160,161,163]

Было показано, что при повреждении головного мозга взрослых животных происходят мощные компенсаторные пластические преобразования в виде коллатерального ветвления сохранных аксонных и дендритных систем и занятия ими «вакантных» синаптических локусов. Этим самым были созданы предпосылки для представлений о возможности интеграции экзогенной нервной ткани с поврежденным мозгом реципиента.

В исследованиях, выполненных в Институте экспериментальной медицины АМН СССР (под руководством Н.П.Бехтеревой) установлена принципиальная возможность использования для трансплантаций мозга эмбрионов человека [156]. В многочисленных опытах на лабораторных животных было установлено, что интрапаренхимально трансплантированные участки мозга эмбрионов встраиваются в мозг животных-реципиентов с образованием рубца различной степени плотности. В трансплантате происходят процессы пролиферации и дифференцировки клеточных элементов, новообразование синапсов и кровеносных сосудов. Важно отметить, что опухоли мозга после пересадок участков эмбрионального и фетального мозга человека крысам и обезьянам не развивались (срок наблюдения от 1 мес. до полутора лет), а митотически делящиеся клетки в трансплантатах, содержащих зрелые элементы ткани, при морфологическом исследовании не были обнаружены, что подтверждается многочисленными исследованиями [159]

При электронно-микроскопическом изучении эмбриональный трансплантат представлен густо расположенными клеточными элементами, как нейронами, так и глиальными клетками, в которых выявлены все присущие этим клеткам органеллы. В месте введения незрелых нервных клеток в большинстве случаев отмечается картина восстановления четкой архитектоники коры мозга. О высокой степени дифференцировки нейронов свидетельствует обнаружение в трансплантатах всех видов синаптических контактов, в том числе и аксошипиковых.

Долгое время работы по алло- и ксенотрансплантации нервной ткани вначале казались практически невозможными в связи с общеизвестным опытом трансплантационной иммунологии, показавшей неизбежность отторжения аллогенной и ксеногенной

трансплантированной ткани, принадлежащей индивидам с другим генотипом. Однако сами иммунологи обнаружили, что действие иммунных механизмов в головном мозге осуществляется иным образом. В связи с этим ими было выдвинуто представление об «иммунной привелигированности» мозга, которая основывается на отсутствии в этих областях лимфоттока, а также антиген-презентирующих клеток, в результате чего здесь отсутствует афферентное звено иммунной реакции. В результате иммунные реакции развиваются медленно и слабо. Кроме того фетальные и эмбриональные клетки и их ассоциаты в большинстве случаев практически не вызывают иммунной реакции отторжения, поскольку в I и II триместрах гестации ещё не экспрессированы белки главного комплекса гистосовместимости 1 и 2 класса [130,165]. Проникновение макромолекул в незрелый мозг не должно вызывать аутоиммунных реакций, как это имеет место в зрелом мозге при нарушении целостности гематоэнцефалического барьера ещё и потому, что все этапы беременности протекают на фоне выраженной комплексной иммуносупрессии как со стороны матери, так и зародыша. Из эмбрионального мозга млекопитающих выделен α -фетопротеин и ростовой фактор TGF- β 2, обладающие иммуносупрессивными свойствами. Считают, что иммунитет подавляют также дофамин и серотонин, концентрация которых в развивающемся мозге высока. По-видимому, благодаря этим механизмам эмбрион может расти и развиваться при минимальных энергетических затратах, не отторгаясь от иммунологически чужеродного организма матери.

К другим важным свойствам фетальной ткани была отнесена большая пластичность связанная с высоким содержанием бластных клеток, которая обуславливает высокую приспособляемость за счет роста, миграции, возможности образовывать межклеточные контакты. Фетальные ткани 17-32 недель развития практически полностью состоят из прогениторных клеток с высоким потенциалом миграции и репопуляции. Каждая фетальная клетка имплантируется в 10-100 раз активнее в тканях реципиента и дает в 100-10 000 раз больше клеток в ростках по сравнению с дифференцированными клетками человека из взрослых органов [80,130,165].

Постепенное накопление научных фактов, позволившее преодолеть указанные выше предубеждения, в начале 70-х годов привело к коренному изменению взглядов на возможности нейротрансплантации. Широко развернувшиеся в мире фундаментальные биологические исследования по трансплантации эмбриональных и фетальных нервных тканей в мозг взрослых млекопитающих послужили основой клинического использования этого метода для восполнения функционального дефицита при различной патологии центральной нервной системы.

Несмотря на существующие недостатки клеточной трансплантологии большинство исследователей считают, что данное направление необходимо развивать и совершенствовать. В настоящее время стало очевидным, что эта область исследований является одной из самых приоритетных в развитии национальной медицины.

Основная часть

1. Выбор направления исследования

Фетальная терапия представляет собой новую медицинскую лечебную технологию, основанную на трансплантации фетальных тканей и клеток для активизации множественных резервных возможностей организма. Однако полная замена больных органов и тканей в подавляющем большинстве случаев представляет собой невыполнимую задачу. Тем не менее, возможности организма можно резко повысить посредством трансплантации низкодифференцированных (фетальных) клеток [81].

В настоящее время фетальные клетки и ткани, а также созданные на их основе биопродукты используются для лечения хронических воспалительных и дегенеративных заболеваний центральной нервной системы: болезнь Паркинсона, Альцгеймера, различные миопатии, рассеянный склероз, заболевания желудочно-кишечного тракта, репродуктивной, эндокринной и иммунной систем, заболевания почек, мужское бесплодие, импотенция, хронические заболевания, трудно поддающиеся лечению общепринятыми методами [82,83]. Применение фетальной терапии позволило получить впечатляющие результаты по восстановлению нормального функционирования организма при сахарном диабете, гепатите, циррозе печени [84,85,86]. Значительные успехи достигнуты в лечении детского церебрального паралича, задержки психо-речевого развития, болезни Дауна, офтальмологических нарушений, рассеянного склероза [87].

Клеточная биология в качестве основного средства борьбы с болезнями предлагает использовать клетки, но не всякие, а только эмбриональные, зародышевые. Их получают из тканей зародыша при абортах. Из эмбриона, удовлетворяющего требованиям по срокам, выделяются необходимые для медицинских целей материалы. Эмбриональные, фетальные клетки являются универсальным модулем для любых клеточных реконструкций. Донорские клетки встраиваются в организм человека и позволяют создавать устойчивые ростки новой, здоровой ткани в больных органах.

Резюмируя изложенное, необходимо отметить, что в настоящее время наблюдается значительный интерес практических врачей и научных работников к проблеме использования фетальных клеток человека для лечения различных заболеваний. Это обусловлено тем, что уже накоплен значительный экспериментально-клинический опыт, свидетельствующий об эффективности данного вида терапии [88,89,90].

Существующие методы получения изолированных клеток, как известно, подразделяются на 4 основные группы: диссоциирующие, ферментные, механические и комбинированные.

В основе диссоциирующих методов лежит использование хелаторов – веществ (цитрата, тетрафенилбора, этилендиамилтетраацетат), способных образовывать комплексы с ионами Ca^{++} и K^+ , которые ведут к ослаблению межклеточных связей. Уменьшение ионов Ca^{++} в межклеточной жидкости в первые 5 минут привело к понижению адгезивных свойств клеточных поверхностей только в низкоадгезивной части простого сочленения клеток печени. То есть, хелаторы быстро повреждают метаболические процессы в самих клетках и слабо воздействуют на межклеточные соединения, что препятствует получению значительного количества жизнеспособных ИКП.

Общепринятым методом выделения метаболически активных клеток, до сегодняшнего дня, являлся ферментативный. Данный способ предусматривает использование коллагеназы, разрушающей межклеточные связи. Недостатком этого метода являются различия в активности препаратов коллагеназы и степени загрязненности их неспецифическими протеазами. Фетальные клетки, полученные без применения коллагеназы, в условиях *in vitro* быстро теряют функциональную активность вследствие повреждения плазматической мембраны при изоляции. Оценка функционального состояния клеток, изолированных неферментативным способом и инкубированных *in vitro* в течение 2 часов в питательной натрийсодержащей среде, показала, что при сохранении высокого уровня адениннуклеотидов и скорости эндогенного дыхания, обеспечивается перспективность использования неферментативного метода выделения ФК.

При получении ФК механическим способом в основе лежит перфузия целого органа буферным раствором под давлением с последующим механическим воздействием: пипетированием, продавливанием ткани через специальное сито с определенным размером пор, интенсивным перемешиванием кусочков ткани или встряхиванием их с бусинками и т.д.

В данное время большинство исследователей применяют комбинированные способы получения взвеси ФК. Они заключаются в использовании ферментов, механической обработки и, в некоторых случаях, хелаторов. Усовершенствовав ферментный метод, исследователи применили дополнительно механическую обработку тканей после рециркуляторной перфузии [91].

Значительное влияние на конечный результат того или иного способа получения ФК оказывают такие факторы, как время тепловой и холодовой ишемии органа, режим насыщения кислородом, режим инкубации органной ткани в ферментном растворе, состав среды суспендирования клеток, температурный режим и др. Было доказано, что дифференцированные функции клеток снижаются после 6-и дней культивирования, а продолжительность жизни дифференцированных ФК в условиях *in vitro* находится в пределах 20 дней.

Было выявлено, что при консервации клеток в жидких средах при обычной температуре происходит снижение эндогенного дыхания, разобщение окислительного фосфорилирования и уменьшение содержания цитохрома P-450. Таким образом, происходит снижение функциональной активности клеток, что и определяет необходимость быстрого применения или хранения их при оптимальных условиях. Консервация ФК при температуре +4°C в средах Игла и Игла с добавлением 20% глицерина также вызывает их повреждение.

В настоящее время разработаны и достаточно изучены различные среды для сохранения жизнеспособности тканей клеток. Так, например, растворы Рингера, Рингер-Локка, Рингер-Тироде, Хенкса, Эрла, являющиеся простыми солевыми растворами, способны поддержать жизнеспособность клеток и тканей на короткий срок. Сложные среды, в состав которых входят аминокислоты, витамины, нуклеотиды, белки, желатин и др., обеспечивают более длительную их жизнеспособность [86,87,92].

В работах других учёных, при оценке жизнеспособности изолированных гепатоцитов человека в растворе Хенкса допустимое количество гепатоцитов сохранялось при температуре +4°C до 66,4±2,2% на протяжении 3-х суток, в среде Игла - 66,2±3,2% до 5-ти суток. Данные исследования доказали что, хранение клеток печени при температуре +4°C является непродолжительным, создаёт проблемы с перевозкой материала на большие расстояния, ведёт за собой низкий уровень выживаемости при попытках длительного хранения.

Исходя из данных фактов, появилась потребность в криопрезервации изолированных ФК, когда клетки могли бы храниться при низких температурах (ниже -80°C) и выживали бы в больших количествах после размораживания. Ранние исследования в криопрезервации клеток были основаны на технологиях, развитых прежде в области замораживания компонентов крови, имеющих экспериментальную основу и положительный эффект при исследованиях у млекопитающих.

Это дало возможность долгосрочного хранения клеточных суспензий при отрицательных температурных режимах, однако были и некоторые трудности, так как в результате воздействия низких температур на ткани происходило образование кристаллов льда, рекристаллизация, образование гиперконцентрированных растворов, дегидратация клетки, денатурация внутриклеточного белка при оттаивании. Было известно, что возможность клеток выходить из замороженного состояния жизнеспособными, обуславливалась применением химических «антифризов» или криопротекторов (КП), веществ, способных защитить клетку от повреждающего действия отрицательной температуры, и использованием специальных температурных условий для режимов замораживания и размораживания.

Режим медленного замораживания (между -1°C /мин и 10°C /мин) помог получить оптимальную выживаемость по данным теста на жизнеспособность [158] и зафиксировать активацию метаболизма, демонстрируемую уреазным синтезом. Было выдвинуто мнение, что инфузирванные криоконсервированные клетки могут действовать в течение короткого фрагмента времени и продуцировать биоактивные абсорбирующие материалы для удаления гепатотоксинов и выделения некоторых гепатотропных факторов, стимулирующих печень. Применяя схожий протокол криопрезервации, было найдено, что после размораживания синтез протеина был существенно снижен. Было выявлено, что, несмотря на высокую выживаемость клеток по данным тестов на жизнеспособность с трипановым синим, более 80 % клеток имели ультраструктурные изменения, сразу же после размораживания. Клетки, замороженные при более быстрых режимах температурного понижения (приблизительно -300°C /мин), путём моментального погружения в жидкий азот, показали серьёзные повреждения, полное разрушение органелл и архитектуры цитоплазмы, возможно благодаря интрацеллюлярному образованию кристаллов льда. Для досконального определения функциональной активности криопрезервированных гепатоцитов исследователи провели интраспленальную трансплантацию криопрезервированных гепатоцитов у крыс, продемонстрировавшую длительную выживаемость клеток (порядка 6 недель после трансплантации).

Отбор достоверных критериев оценки жизнеспособности и функциональной активности является важной задачей для применения изолированных фетальных клеток. Существующие методы в настоящее время не позволяют всесторонне оценить возникшие изменения в строении и функции клетки, степень обратимости клеточных повреждений. Однако отдельные этапы в дезинтеграции клеточной структуры, и связанные с этим, нарушения функции хорошо известны и могут быть установлены [93].

О характере повреждения клеток также можно судить по количеству электролитов и микроэлементов в среде суспензирования. Так, при нарушении целостности клеток происходит выход ферментов, белков и метаболитов, в состав которых входят железо, кальций, цинк, медь, марганец др. О функциональном состоянии изолированных клеток можно судить по содержанию ДНК, РНК, гликогена и др. Так, высокая активность АТФазы, глюкозо-6-фосфатазы, неспецифических эстераз, кислой фосфатазы в этих клетках, выявляемая цитохимически, позволяет считать их функционально - активными.

Многие авторы с успехом используют для оценки получаемых клеток световую микроскопию с подсчетом целых и разрушенных фетальных клеток. Методика определения проста, легка и быстро воспроизводима. При этом у жизнеспособных и функционально-активных клеток четко определяются клеточная оболочка, форма клеток, ядро, крупные

внутриклеточные включения. Поврежденные клетки более крупных размеров, с неправильными контурами и нечетко определяемой мембраной.

В настоящее время самое широкое распространение получило суправитальное окрашивание с последующей микроскопией, благодаря своей простоте и достаточной информативности для экспресс методов. В разработку метода внес вклад Д.Н. Насонов и его школа. Метод основан на способности мембран живых клеток избирательно исключать некоторые вещества, которые в нежизнеспособные клетки проникают свободно. Большое значение для получения достоверных результатов имеет рациональный выбор красителя и самой методики. Так, Phillips, Terryberg использовали для этих целей эритрозин-В в количестве 20 мг/ 100 мл сбалансированного раствора, который окрашивал мертвые клетки. Kaltenbach применял нигрозин в количестве 20 мг/100 мл сбалансированной среды. Hanks, Wallace отмечали лучшим красителем эозин, из расчета 150 мг/100 мл раствора, так как после окрашивания клетки были способны расти (цит. по Дж. Пол, 1963). В настоящее время многие исследователи применяют для суправитального окрашивания клеток 0,2% трипановый синий. По интенсивности окрашивания клеток можно судить о степени их функциональной активности.

Применяя стандартный протокол (ДМСО, медленное замораживание, быстрое размораживание), исследователи доказали, что фетальные клетки могут быть криопрезервированы и культивированы с хорошим уровнем выживаемости ультраструктурных характеристик и метаболической активностью. Большое количество схожих исследований за последнюю декаду подтвердили возможность выживаемости клеток с активным метаболизмом и ненарушенными секреторными функциями у крыс, собак, обезьян и людей, но максимальный уровень функциональной активности был зафиксирован при пересадке свежих, не консервированных клеток.

Таким образом, проведенный литературный обзор, к сожалению, свидетельствует о недостаточной информации по длительной консервации фетальных клеток (основное внимание исследователей было направлено на работу со зрелыми клетками), неотточенности протоколов низкотемпературного замораживания и стандартов определения жизнеспособности фетальных клеток и их функционального статуса.

В связи с этим остро встает вопрос о необходимости разработки оптимальных условий длительного поддержания жизнеспособности фетальных клеток в условиях гипотермии, способствующих сохранению их морфологической целостности и функциональной активности, создания банка клеток, оценки эффективности трансплантации криопрезервированными клетками.

1.1 Хронические диффузные заболевания печени (ХДЗП)

ХДЗП являются сложной проблемой здравоохранения во всем мире, обусловленной неуклонным ростом заболеваемости и летальности больных с данной патологией. По данным ВОЗ ежегодно в мире регистрируется до 2 млн. случаев смерти от цирроза печени, развившегося как исход хронического гепатита [93,94,95]. Хроническая печеночная недостаточность занимает пятое место среди факторов смертности населения Земли. Актуальность проблемы во многом обусловлена низкой эффективностью методов консервативного и оперативного лечения хронического гепатита и цирроза печени. Определенные достижения современной хирургии в лечении хронических диффузных заболеваний печени связаны с разработкой и внедрением в практику операций малой травматичности. Основным радикальным методом лечения данной патологии является органная трансплантация гистосовместимой печени - спрос на такие операции превышает возможные объёмы их реализации [96,97, 98,100].

В современной трансплантологии делаются попытки пересаживать человеку не целый орган, а ткань донора, что открывает новые возможности коррекции нарушенных функций. Преимущество данных методик от органной трансплантации заключается в доступности, технической простоте, уменьшении инвазивности и травматизации больного, в решении проблемы ожидания донорского органа, снижении стоимости лечения в тысячи раз (избегая больших затрат на интенсивную и длительную иммуносупрессивную терапию), в исключении развития осложнений хирургического и постиммуносупрессивного характера, в хороших терапевтических результатах и др. [101,102,103]

Несмотря на положительные результаты лечения, существует ещё много пробелов в связи с проблемами становления биоэтических концепций и норм их проведения, низкой приживляемостью и иммуногенностью донорских гепатоцитов, перехода от курсовой трансплантации к монопроцедуре, вопросами длительной презервации и увеличения пластичности фетальной ткани, подбора оптимального метода хирургической трансплантации, клинической исследованности динамических изменений и неотточенности концепций в подходе к терапии данной патологии [104,105,106].

С широким распространением фетальной клеточной трансплантологии возникли вопросы с длительным хранением клеточного материала и созданием банка фетальных печёночных клеток с целью планомерности терапии и снижения листа ожидания, а также определение оптимальных методов диагностики морфофункциональной активности клеток и оценкой эффективности трансплантации криопрезервированных клеток [107,108,109,110].

В Японии, где запрещён забор органов от доноров с констатированной гибелью коры головного мозга, трансплантация прижизненно взятых фрагментов печени осуществлена

более чем у 300 пациентов, с лучшими результатами, чем при органной трансплантации. Концепция фрагментированной трансплантации печени, включающая использование сегментов и долей печени, привела к идее пересадки небольшого количества печёночной ткани и гепатоцитов в клинической практике [111,112,113,114].

Основной целью трансплантации печёночной ткани в середине 20го века была не функциональная поддержка повреждённой печени, а выяснение механизмов регенерации после некроза и восстановления печёночной ткани после эктопической печёночной трансплантации. Несмотря на очень редкое образование эктопических печёночных очагов, полученных из мультипотентной стволовой ткани, имелись случаи нахождения их в желчном пузыре, поддерживающих связках, пуповине и лёгких, которые не имели связи с естественной печенью. Полученные очаги печёночной ткани не контактировали и не имели поддержки со стороны портальной венозной системы [115,116,117,118]. Эктопически трансплантированная печёночная ткань продемонстрировала гистологическую пролиферацию гепатоцитов в фрагментах подкожных тканей и интракапсулярно в почках на протяжении длительного периода (от 6 месяцев до 1 года). Данные находки подтвердили, что генетически чужеродная фрагментированная печень, эктопически трансплантированная, может пролиферировать без поддержки портальной венозной системы и создали важную научную базу для трансплантации гепатоцитов [119,120].

Применение печёночной ткани в лечении заболеваний печени впервые было предпринято не в области трансплантологии, а в области искусственных органов. Ученые попытались создать искусственную печень, применяя пласты печени и низкотемпературно - высушенные печёночные гранулы в реакторе циркулярной экстракорпоральной перфузии. Огромных усилий потребовалось для развития системы поддержания искусственной печени, введения технологий изоляции гепатоцитов и развития био - и искусственных материалов. Трансплантации печени предшествовали клинические исследования по применению гибридной искусственной печени [121,122]. Несмотря на это эффективность использования искусственной печени и трансплантации гепатоцитов требовало дальнейших исследований [123,124].

Итак, пересадка гепатоцитов упирается в два взаимоисключающие условия: нужно множество дифференцированных и одновременно способных к пролиферации клеток. Для решения этой важной проблемы перспективным является использование фетальных клеток. Важный аспект фетотерапии – замещение отсутствующих клонов специализированных клеток в организме больного. Лечение сводится к пересадке стволовых клеток и формированию устойчивых ростков здоровой донорской ткани [125,126,127,128,129,130].

1.2 Гипотиреоз

Частота распространения гипотиреоза постоянно увеличивается. Среди женщин частота манифестного гипотиреоза составляет 1,4%, среди мужчин – 0,15%. Частота латентного первичного гипотиреоза 7-10% и 2-3% соответственно [131,132,133,134,135]. При профилактическом обследовании процент больных гипотиреозом достигает 3,9-4,0%. За год 5% латентного гипотиреоза переходит в манифестный [136,137,138]. Кроме того, неблагоприятные экологические условия, наличие значительного числа лиц, перенесших контакт с радиоактивными элементами в предыдущие десятилетия, обуславливает высокую частоту больных с узловыми образованиями щитовидной железы различного генеза, подвергшимся оперативному лечению. В этой связи проблема врожденного и приобретенного гипотиреоза является актуальной, особенно среди лиц работоспособного возраста.

Наиболее частыми причинами гипотиреоза является уменьшение количества функционально активной ткани с замещением ее фиброзной (в исходе аутоиммунного тиреоидита); сохранение незначительного количества тиреоидной ткани после струмэктомии с развитием деструкции тиреоидного остатка вследствие аутоиммунного поражения; врожденный гипотиреоз с гипо-аплазией щитовидной железы [139].

Потребность в гормонах щитовидной железы в организме варьирует в зависимости от различных факторов внешней среды и гормонального статуса организма. Поэтому в норме продукция гормонов тиреоцитом является регулируемым процессом и зависит от взаимодействия тиреоцита с такими регуляторами как тиреотропный гормон (ТТГ), катехоламины, наличие пула йода в организме, активности дейодиназ в периферических тканях.

Компенсация обменных процессов при гипотиреозе стандартно проводится с помощью синтетических гормонов щитовидной железы, однако возможности полной компенсации ограничены из-за риска осложнений со стороны сердечнососудистой системы и невозможностью учесть точную дозировку гормона по отношению к быстро изменяющимся внутренним факторам.

Исходя из вышеизложенного, в лечении гипотиреоидных состояний перспективной представляется пересадка щитовидной железы. Однако трансплантация цельного органа сталкивается со сложными проблемами, сдерживающими ее развитие. Это исключительная трудоемкость и высокая стоимость операций, сложность в получении адекватного донорского материала, повышенного риска отторжения трансплантата и осложнений, связанных с необходимостью подавления иммунной системы. В этом плане, учитывая наибольшую патогенетическую адаптированность, более целесообразно изучение

возможности применения клеточной трансплантации, позволяющей успешно решать многие из этих проблем: нет необходимости в сложных хирургических вмешательствах, существенно сокращается потребность в донорском материале, снижается риск иммунного отторжения донорских клеток. Наиболее подходящим для этих целей донорским материалом могут быть фетальные клетки [140].

В пользу применения фетальной клеточной трансплантации свидетельствуют созданные серьезные научные предпосылки. Трансплантация фетальных тиреоцитов применяется с заместительной целью (с учетом уменьшения функционирующей паренхимы щитовидной железы) в качестве комбинированной терапии, наряду с традиционным лечением тиреоидными гормонами. В настоящее время, несмотря на значительный опыт, накопленный в области клеточной трансплантологии (трансплантация гепатоцитов при диффузных поражениях печени, фетальных островковых клеток при сахарном диабете и др.) исследований, посвященных пересадке фетальных тиреоцитов при гипотиреозе, в Казахстане нет. Поэтому изучение влияния трансплантации фетальных тиреоцитов (ТФТ) у больных гипотиреозом и накопление практического опыта представляется на сегодняшний день необходимым.

Принципы традиционной заместительной гормональной терапии недостаточности щитовидной железы разработаны давно и с успехом применяются в клинической практике, однако применение препаратов, по мнению некоторых авторов, оказывает побочное отрицательное воздействие на организм больного [144]. Необходимость в пожизненном приеме этих гормонов создает определенные неудобства для самого больного, как в моральном, так и в экономическом плане. Малоперспективным лечением гипотиреоидных состояний является пересадка щитовидной железы ввиду быстро развивающихся иммунологических проблем в организме реципиента. Бурно развивающаяся клеточная трансплантология недостаточности органов и систем организма заслуживает в этом отношении определенный интерес.

Исследование проводилось на 50 - ти больных с первичным гипотиреозом. Лечение проводилось фетальными тиреоцитами, с разработкой различных способов их введения. Разработан забор фетальных тиреоцитов с методикой длительного сохранения фетальных тиреоцитов, способом криопрезервации с различными температурными режимами. Исследование культуры клеток проводилось с применением патоморфологических, биохимических, гормональных и инструментальных методов исследования. Сравнительная характеристика осуществлена между пациентами с различным патогенезом гипотиреоза. Проведена сравнительная оценка между клетками до и после криоконсервации с различными

температурными режимами и консервирующими средами. Проведена оценка биохимического, гормонального состояния щитовидной железы до трансплантации фетальными тиреоцитами и в различные сроки после имплантации клеток.

1.3 Хронический гломерулонефрит

Хронический гломерулонефрит (ХГН) – заболевание с неуклонно прогрессирующим течением, которое постепенно приводит к потере массы функционирующих нефронов, развитию хронической почечной недостаточности (ХПН), и в итоге – к терминальной почечной недостаточности (ТПН). Причинами прогрессирующего падения почечных функций могут быть как иммунновоспалительные, так и неиммунные процессы. Среди последних наибольшее значение имеют системная артериальная и внутриклубочковая гипертензия [145]. В то же время темпы прогрессирования и прогноз заболевания даже в рамках одной морфологической формы могут значительно различаться [146].

Прогноз ХГН определяется совокупностью как клинических, так и морфологических факторов. В многочисленных исследованиях установлено, что ряд прогностических признаков являются общими для различных морфологических форм – это наличие нефротического синдрома (НС), тяжелой артериальной гипертензии (АГ) и выраженных тубуло-интерстициальных изменений при биопсии почки [147,148,149,150,151,152].

Общепризнанным является факт неуклонного роста числа больных, нуждающихся в длительной (пожизненной) заместительной терапии гемодиализом или в трансплантации почки. К примеру, во всех экономически развитых странах число вновь поступающих на диализ больных превышает число умерших, а общая группа пациентов, получающих заместительную почечную терапию, постоянно увеличивается. По данным США (2000г.) на заместительной терапии находилось более 372 тыс. больных, что в 2 раза превысило показатели 1991 года. А к 2010 году число больных уреимией увеличилось до 650 тыс. человек [153,154,155]. Все это делает чрезвычайно актуальным поиск способов и средств, использование которых позволяет максимально увеличивать время додиализного периода развития ХПН.

В настоящее время единственным радикальным методом лечения терминальной стадии ХПН является трансплантация донорской почки. Вместе с тем, быстрое прогрессирование симптомов уремической интоксикации с развитием необратимых электролитных, метаболических и сердечно-сосудистых осложнений, ограничивающих проведение трансплантации органа, возрастающее число нуждающихся в трансплантации больных, высокая затратность данного метода лечения, требуют разработки новых подходов к трансплантологии [156]. Статистика подтверждает и высокую частоту послеоперационных

осложнений в виде острого или хронического отторжения донорской почки, обусловленного иммунной несовместимостью реципиента и донора. Поэтому в современной трансплантологии предпринимаются попытки пересаживать не целый орган, а ткань донора, что открывает более широкие возможности коррекции нарушенных функций почек [157, 158].

Созданы серьезные научные предпосылки для развития фетальной терапии и трансплантации клеток [89,130]. Специализированные соматические клетки лишены примеси ретикулоэндотелиальной ткани, которая содержит до 70% антигенов органа, поэтому уровень иммунологических проблем в организме реципиента сведен до минимума по сравнению с пересадкой исходных органов.

К настоящему времени продолжают уточняться особенности взаимодействия резидентных гломерулярных клеток с другими клетками формирующегося иммунновоспалительного инфильтрата.

В эксперименте доказана роль интерлейкина-1 и интерлейкина-6 в пролиферации мезангиальных клеток и увеличении секреции компонентов внеклеточного матрикса и синтезе коллагена 4 типа, что создает условия для прогрессирования ГН и развития склероза [81,83].

Введение взвеси фетальных нефроцитов, возможно, вызывает гиперсекрецию растворимых медиаторов, регулирующих межклеточные взаимодействия в почечном клубочке. Если механизмы самозащиты клубочка недостаточны в результате формирования гломерулосклероза, то введение взвеси фетальных нефроцитов, содержащей ингибиторы цитокинов, комплемент, регулирующий протеин, противовоспалительные цитокины, антитромбоцитарные молекулы, белки теплового шока, медиаторы, угнетающие ангиотензин II, возможно, замедлит прогрессирование интерстициального фиброза и окажет косвенное воздействие на сосудистый эндотелий.

1.4 Органические заболевания ЦНС

Нервная ткань взрослого организма обладает довольно ограниченным репаративным потенциалом, поэтому лечение пациентов с тяжелой органической патологией нервной системы не дает ощутимых результатов. Имеющиеся данные указывают на два возможных подхода к увеличению восстановительного потенциала ЦНС. Первый основывается на создании условий, благоприятствующих росту нервных клеток, тогда как второй – на замещении разрушенных клеток новыми функционально полноценными клетками. Трансплантация клеток незрелой нервной ткани представляется весьма перспективным инновационным методом лечения неврологических расстройств, поскольку сочетает в себе

оба вышеупомянутых подхода. В действительности установлено, что такая клеточная трансплантация, с одной стороны, может создавать микроокружение благоприятное для аксонального роста, а с другой стороны, обеспечивать замещение поврежденных нейронов функционально полноценными донорскими клетками [82,83,157].

Несмотря на значительные успехи в понимании патогенетических механизмов рассеянного склероза и разработке подходов его лечению, многие проблемы, касающиеся различных аспектов заболевания, остаются нерешенными. Лечение рассеянного склероза остается одной из наиболее актуальных проблем современной неврологии. В последние годы особенно возрос интерес к применению живых фетальных тканей и клеток человека. Восстановление утраченных функций возможно за счет компенсации и мобилизации резервных возможностей организма. Утраченный морфологический субстрат функционирования нервной системы может быть восполнен за счет замещения его донорскими эмбриональными нервными клетками [158]. Поэтому становится оправданной терапия фетальными нервными тканями (даже в тех случаях, когда не эффективна гормональная терапия), но остается проблема изучения и исследования механизма воздействия донорского клеточного трансплантата на мозг реципиента. Для дальнейшего совершенствования лечебных мероприятий важно выяснить влияние фетальной нейротрансплантации на иммунохимический статус у больных с демиелинизирующей патологией.

Заболевания нервной системы, связанные с органическим поражением головного и спинного мозга сопровождаются, как правило, тяжелыми инвалидизирующими нарушениями физического состояния и отклонениями в психологической, эмоциональной, ментальной, духовной и социальной сферах жизни пациента. До недавнего времени решение этой проблемы представлялось сложным. Тем не менее, в результате серьезной работы международного сообщества в течении последнего десятилетия был разработан уникальный подход, позволивший принципиально изменить традиционный взгляд на проблему болезни и больного. В основу новой парадигмы понимания болезни и определения эффективности её лечения было положено понятие «качества жизни» как «восприятие индивидуумом его положения в жизни в контексте культуры и системы ценностей, в которых индивидуум живет, и в связи с целями, ожиданиями, стандартами и интересами этого индивидуума» [159,160,161].

Изучение качества жизни является сравнительно новой областью клинических исследований. Однако оно привлекает к себе все большее внимание и в некоторых случаях может служить основным критерием клинической эффективности новых методов лечения.

Качество жизни считают одним из ключевых параметров при изучении конечных результатов терапии [162,163,164,165].

1.5 Дегенеративные заболевания опорно-двигательного аппарата

В последние годы в иммунопатогенезе РА особое значение придают противовоспалительному цитокину фактору некроза опухоли (ФНО). Этот цитокин рассматривается как прототип семейства молекул, с одной стороны, играющих важную роль в регуляции нормальной дифференцировки роста и метаболизма различных клеток, с другой выступающих в роли медиаторов патологических иммуновоспалительных процессов при различных заболеваниях человека.

В настоящее время для лечения РА используется весь арсенал противовоспалительных и иммуноактивных препаратов моно- и комбинированной терапии базисными противовоспалительными препаратами и глюкокортикостероидами, а также «биологические агенты». К ним относятся моноклональные антитела к ФНО-ремикейд. Широко применяется локальная инъекционная терапия, а также экстракорпоральные методы лечения в сочетании с иммуносупрессивной терапией.

Хотя патогенетическая терапия позволила существенно улучшить качество жизни и прогноз многих пациентов, остается немало больных, у которых она недостаточно эффективна по ряду причин: токсичность препаратов, снижение эффективности в процессе длительного применения препаратов, возникновение ряда осложнений, побочного действия, требующих отмены препаратов. Менее широко применяются хирургические методы лечения поражения суставов, синовэктомия, так как эффект отмечается при проведении в крупных суставах, но при синовэктомии мелких суставов дает низкий процент хороших результатов. Последние годы проводится эндопротезирование суставов тазобедренных, коленных; мелких суставов кистей рук, силиконовые конструкции. В Казахстане проводится эндопротезирование тазобедренных и коленных суставов. При этом используются эндопротезы российского, германского производства. Высокая затратность эндопротезирования, сложности при проведении операции (наличие вторичного остеопороза, высокая кровоточивость), осложнения во время операции (летальность от жировой эмболии, острого инфаркта миокарда, острой надпочечниковой недостаточности), все это ограничивает широкое применение данного метода лечения.

Применяемые методы лечения при остеоартрозе позволяет добиться положительных результатов, но в большинстве случаев эффект терапии оказывается нестойким. Длительность ремиссии более 2-х лет наблюдается у 25% больных, у половины обострения наблюдаются через год, у 20%--в течение первого года. Используются консервативные

методы лечения - противовоспалительные препараты (НПВП), хондропротекторы, внутрисуставное введение лекарственных препаратов, хирургические методы-артропластика, артродез, хирургические вмешательства на суставных поверхностях, связках, менисках, включая аллотрансплантацию и применение имплантов из металла, полимеров, керамики, углеродных волокон, коллагена, комбинированные методы с привлечением тканевой инженерии, эндопротезирование суставов. Однако, эффективность хондропротекторов снижается при значительных по глубине и площади поражения хряща. НПВП обладают значительными побочными эффектами. Артропластика (выравнивание суставных поверхностей, временно обеспечивающее их конгруэнтность, нанесение микрофрактур, обнажение субхондральной кости), направлена на открытие доступа к источникам хрящевого дифферона, дает кратковременный эффект, так как в дефектах образуется фиброзный хрящ, содержащий, в основном, коллаген I типа, который не может быть адекватным демпфером, в связи с чем подвергается быстрой деструкции при нагрузках и движениях в суставе.

Вышеизложенное требует поисков новых методов лечения, в том числе использование трансплантации фетальных хондроцитов.

1.6 Сахарный диабет

Распространенность сахарного диабета стремительно увеличивается как в промышленно-развитых странах, где она составляет 5-6%, так и в развивающихся странах и этнических меньшинствах. По данным ВОЗ в мире насчитывается около 100 млн. больных диабетом, причем ежегодно число больных увеличивается на 5-7%, а каждые 12-15 лет – удваивается. Так, согласно прогнозу экспертов ВОЗ, к 2020 г. количество больных с диабетом типа 2 составит 250 миллионов человек.

В государствах Центральной Азии количество больных диабетом составляет 350 тыс. человек. В Казахстане, согласно исследованиям Зельцера М. Е., истинная распространенность заболевания также выше регистрируемой, в 2-5 раз.

Сохранность жизни и работоспособность больных сахарным диабетом типа 1 обеспечивается проведением пожизненной заместительной инсулинотерапии. Несмотря на значительные успехи в производстве различных препаратов инсулина (монокомпонентные генноинженерные препараты инсулина человека короткого и средней длительности действия; аналоги инсулина человека как ультракороткого действия - хумалог, новорапид, так и аналоги инсулина человека средней продолжительности действия - лантус, детемир) и средствах его введения (инсулиновые шприцы, шприц-ручки, помпы для постоянной инфузии инсулина), в клинической практике сохраняется множество проблем, обусловленных невозможностью достижения полной компенсации

диабета, т.е. нормализации углеводного обмена на протяжении длительного времени, что является необходимым условием для предупреждения развития сосудистых осложнений диабета, которые, как известно, являются причиной ранней инвалидизации и высокой летальности [132,133].

На протяжении десятилетий проводятся исследования, направленные на возможность замещения утраченной функции островков Лангерганса, восстановления функции инсулярного аппарата поджелудочной железы и нормальной регуляции углеводного обмена. К настоящему времени разработаны и соблюдаются международные протоколы (Эдмонтонский протокол, 2000 г.) и национальные регистры трансплантации ткани поджелудочной железы.

Таким образом, все более широкое внедрение различных трансплантационных методов лечения диабета в виде пересадки островковых клеток и поджелудочной железы – открывают новые перспективы для улучшения возможностей компенсации, качества жизни и профилактики осложнений у больных диабетом как 1-го, так и 2-го типа [84,165].

2. Процесс теоретических и экспериментальных исследований.

2.1 Забор, диссоциация, консервация, хранение и трансплантация различных фетальных клеток.

2.1.1 Характеристика объекта исследований.

Исследования проводились на 60 плодах человека. Этические положения соответствовали законопроектам Международного комитета по изучению аспектов трансплантации человеческих тканей (Канада, 1994 год), Конвенции о правах человека и биомедицине (Страсбург, 1996), в частности:

-окончательное решение о прерывании беременности должно быть принято женщиной до того, как встанет вопрос о возможном использовании зародышевых тканей;

-женщина не должна знать получателя абортивного материала, чтобы исключить попытку аборта с целью лечения родственников или наживы;

-техника прерывания беременности должна исходить из принципов безопасности женщины.

В качестве источника донорских гепатоцитов служили нежизнеспособные плоды человека, массой менее 500 г, полученные от женщин, искусственно прерывающих беременность по социальным и медицинским показаниям в сроках гестации от 18 до 22 недель (согласно рекомендациям ВОЗ). Забор донорских клеток производился при условии отрицательных результатов исследований сыворотки крови матери и плода при тестировании на СПИД, сифилис, гепатиты В и С, цитомегаловирус, вирус простого герпеса и, кроме того, ряд внутриклеточных бактерий (хламидии, микоплазма, уреаплазма). Взятие донорского органа производили непосредственно после прерывания беременности. Абортивный материал помещали на холод, использовали плоды без видимых дефектов развития и нарушений кожных покровов.

Объектом исследования были: головной и спиной мозг, щитовидная железа, поджелудочная железа, печень, почки и хрящевая ткань плода. Забор материала производился непосредственно после прерывания беременности, по оригинальной разработанной научной группой методике, с последующей обработкой и гомогенизацией при помощи устройства для отделения клеток от стромы, показанного на рисунке 1.

На каждый плод заполнялась карта донора. Сроки плодов варьировали от 18 до 22 недель гестации (таблица 1). У плодов учитывались пол, масса тела, рост эмбриона, характеристика которых приведена в таблице 2.

В целях получения более достоверных данных было произведено подразделение по группам крови и резус фактору, что требовалось для проведения эффективной дальнейшей

трансплантации реципиентам с идентичной группой крови и резус фактором, для избежания реакций отторжения клеток (таблица 3).



Рисунок 1. Хирургический инструментарий для отделения клеток от стромы

Таблица 1. Соотношение количества исследуемых эмбрионов и сроков гестации

№	Сроки гестации (в неделях)	Количество
1	18	12
2	19	14
3	20	11
4	21	13
5	22	10
Всего	18 - 22	60

Таблица 2. Антропометрические данные исследуемых эмбрионов

Данные плода					
масса (в граммах)	кол-во	рост (см)	кол-во	Пол	
				Жен.	Муж.
200 –250	6	15-18	5	24	36
250-300	9	18-21	10		
300-350	10	21-24	11		
350-400	11	24-27	11		
400-450	12	27-30	12		

Таблица 3. Соотношение групп крови и резус факторов исследуемых плодов

Резус фактор	Группы крови			
	0 _{αβ} (I)	A _β (II)	B _α (III)	AB(IV)
положительный	12	13	18	5
отрицательный	6	1	3	2
Итого:	18	14	21	7

2.1.2 Методы исследования. Клинические и лабораторные методы исследования

2.1.2.1 Цитологическое исследование до криоконсервации.

С целью определения жизнеспособности клеточного материала делается мазок из предоставленного контейнера с взвесью фетальных клеток и окрашивается раствором 0,1% Трипанового синего по стандартной методике.

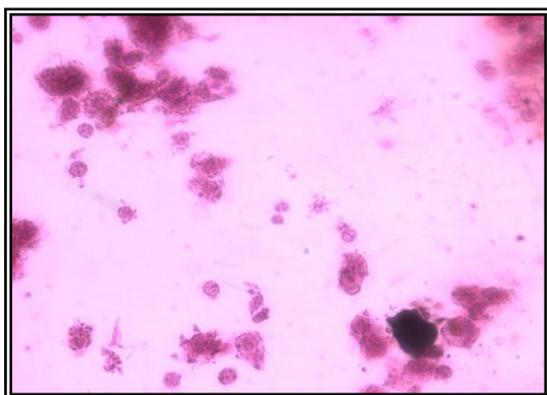
Производится анализ и подсчет фетальных клеток с помощью бинокулярного микроскопа Axioscop фирмы Carl Zeiss при 100 кратном увеличении, который имеет связь с компьютером, за счет чего поводится фотодокументирование. Клеточный материал оценивается следующим образом:

Заключение: в данном материале:

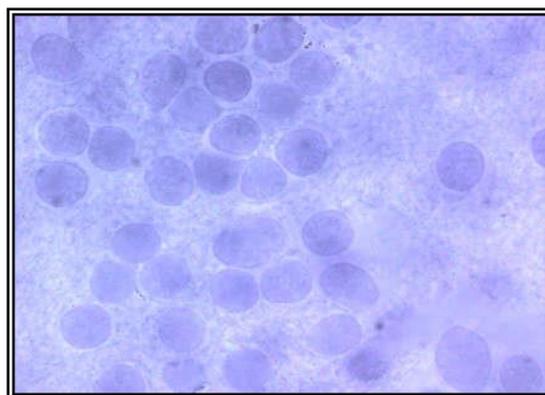
живые клетки составляют – 94%

голаядерные составляют –4%

разрушенные составляют – 2%.



Гепатоциты



Нейроциты

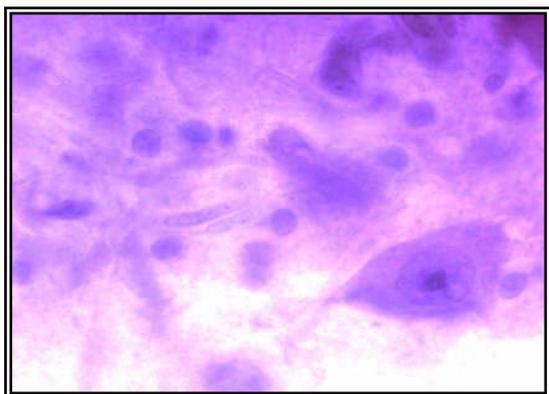


Стволовые клетки

Рисунок 2. Фетальные клетки человека (x:100, окрас. трипан.син)

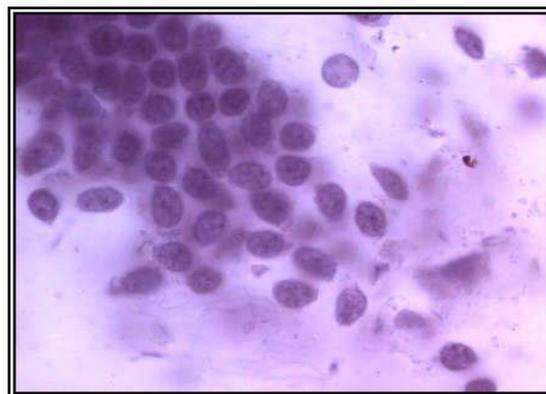
2.1.2.2 Цитологическое исследование после криоконсервации.

С целью определения жизнеспособности клеточного материала подвергнутого криоконсервации, делается мазок из предоставленного контейнера с взвесью фетальных клеток, и окрашен раствором 0,1% Трипанового синего, по стандартной методике. Производится анализ и подсчёт фетальных клеток с помощью бинокулярного микроскопа Axioscop фирмы Carl Zeiss при 100 кратном увеличении, который имеет связь с компьютером, за счет чего поводится фотодокументирование.



нейроциты через 2 мес.

после консервации



нефроциты через 4 мес

после консервации

Рисунок 3. Размороженные фетальные клетки человека (x:100, окрас. трипан.син)

2.1.2.3 Методики определения функциональной активности фетальных клеток человека

Функциональную активность определяли по сдвигам pH, концентрации HCO_3^- , парциального давления CO_2 ($p\text{CO}_2$), парциального давления O_2 ($p\text{O}_2$) и содержания ионов K^+ , Na^+ , Ca^{++} в надосадочном слое взвеси фетальных клеток, используя анализатор газов «AVL COMPACT» (рисунок 4).

Принцип pH-измерений

Когда pH- чувствительное стекло погружается в водный раствор, молекулы воды диффундируют через структуру стекла, формируется гидратный слой. Этот увеличивающийся слой способен поглощать ионы водорода (протоны). Таким образом, создаётся электрический потенциал, который зависит от степени кислотности или, соответственно активности ионов водорода и, следовательно, величины pH в растворе.

Принцип измерения парциального давления CO_2 ($p\text{CO}_2$)

Метод основан на модифицированном pH-измерении. pH-стандартный электрод и Ag/AgCl референсный электрод, образующий внешнюю часть, окружены общим электролитическим раствором. Они отделены от пробы надосадка и калибровочного газа с

помощью проницаемой для углекислого газа, но ионнепроницаемой мембраной. Углекислый газ диффундирует через мембрану в обоих направлениях до тех пор, пока не установится равновесие между парциальным давлением CO_2 в пробе и парциальным давлением CO_2 в очень тонком электролитном слое между мембраной и стеклянным электродом.

В это время величина pH электролитного раствора изменяется под воздействием химической реакции. Данное изменение величины pH измеряется, усиливается и иницируется как значение pCO_2 . $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$



Рисунок 4. Анализатор газов

Принцип измерения парциального давления O_2 (pO_2). Определение pO_2 основано на электрохимическом процессе.

Молекулы кислорода, которые растворены в водном растворе, восстанавливаются электрохимическим способом на положительном электроде (катоде), на который приложен постоянный потенциал $-0,7 \text{ V}$ (поляризационное напряжение) относительно референсного электрода (анода). Между анодом и катодом устанавливается электрический ток. Выходная часть электрической цепи соединяется с входным терминалом усилителя. Между катодом и мембраной находится очень тонкий слой электролита. Под воздействием диффузии молекул

O₂ через мембрану, которое обуславливается превышением парциального давления кислорода в пробе над электролитом, в котором кислород потребляется во время катодной реакции.

Принцип измерения с использованием ионочувствительного электрода (ИЧЭ) (рисунок 5) основан на взаимодействии свободно перемещающихся ионов пробы с активным сенсорным материалом для определения содержания ионов K⁺, Na⁺, Ca⁺⁺ в надосадочном слое взвеси фетальных гепатоцитов.

Ионочувствительная мембрана отделяет пробу, электролитная концентрация которой неизвестна, от электродного раствора, электролитная концентрация которой известна. Мембрана сконструирована таким образом, что она вступает в реакцию с конкретным типом электролита, содержащимся в пробе. В данном случае мембрана несёт функцию ионообменника, и её воздействие на ионовалентность соответствующего иона отражается на изменении её потенциала, образующегося в барьерном слое между ней и пробой. Концентрация электродной жидкости, как величина постоянная, определяет потенциал на этой стороне мембраны. Однако потенциал на той стороне мембраны, которая соприкасается с пробой, неизвестен. Для определения разности значений потенциалов на обеих сторонах мембраны необходима гальваническая измерительная система с каломельным электродом.



Рисунок 5. Анализатор ИЧЭ

Гальваническая цепь замыкается через пробу с одной стороны посредством каломельного электрода, эталонного электрода и «открытого зажима», и с другой стороны –

посредством мембраны внутреннего электролита и внутреннего электрода. Ввиду различия ионных концентраций внутреннего электролита и пробы на мембране активного электрода формируется электрохимический потенциал. Потенциал проводится через внутренний электролит на дифференциальный вход усилителя. Второй вход усилителя соединён с каломельным электродом (электрод сравнения). Потенциал, поступающий с каломельного электрода, не зависит от ионной концентрации пробы, и поэтому различие потенциалов на входах усилителя пропорционально ионной концентрации пробы.

2.1.3 Криопрезервация

Разработан оптимальный режим криоконсервации и условия хранения подходящий для любого типа клеток, а также в последующем оценена клиническая эффективность применения криоконсервированных фетальных тканей. Криопрезервация фетальных клеток производилась в холодильной установке Jouan SA VX – 100 (рисунок 6), с применением сосуда Дюара, в специально разработанных режимах и условиях, с дальнейшим разогревом в водяной бане при температуре $t=37^{\circ}\text{C}$ (рисунок 7) и отмыванием осмотическим буфером с центрифугированием.



Рисунок 6. Холодильная установка Jouan SA VX – 100



Рисунок 7. Водяная баня Jouan

2.1.3.1 Исследования длительного хранения суспензии изолированных фетальных гепатоцитов человека и способы оценки их жизнеспособности

После получения взвеси фетальных гепатоцитов человека в среде 199, отрицательных результатов бактериологических анализов, провели суправитальный тест на жизнеспособность с 0,1% раствором трипанового синего. Исходный уровень жизнеспособности составил $92,7 \pm 1,3$ % - целых (живых клеток), $5,3 \pm 0,7$ % - голаядерных, $2,0 \pm 1$ % - разрушенных фетальных клеток печени. Данный гомогенат разделили на 10 стерильных вакутейнеров по 5 мл с равным количеством клеточного материала. В 8 из них были добавлены Глюгоцир, Биосифос, глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО) (в качестве криопротекторов) – раздельно по 2 вакутейнера каждый, в соотношении 10:1. Два вакутейнера с несмешанной взвесью клеток было оставлено для контрольной группы. Таким образом, получили пять исследуемых пар вакутейнеров с разным составом.

Все вакутейнеры были заморожены в холодильной установке Jouan SA VX - 100 со скоростью $-0,5$ °C\мин по стандартной программе (I–этап. Охлаждение взвеси до $+4$ °C в течение 30 минут. II–этап. Замораживание до -85 °C). По одному из каждой пары вакутейнеров опустили в жидкий азот, остальные были оставлены в холодильной установке. Через 30 дней все вакутейнеры с замороженной взвесью фетальных печёночных клеток в среде с криопротекторами были разморожены и разогреты в водяной бане Jouan при $t = +37$ °C, в течение 15 минут, отмыты осмотическим буфером 1 моль/литр раствора глюкозы, для целей снижения воздействия криопротектора на клеточную массу, отцентрифугированны и

цитологически исследованы на жизнеспособность с подсчётом количественного состава целостности клеток. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4. Зависимость процентного содержания состояния целостности клеток после размораживания от добавления различных криопротекторов при различных режимах криопрезервации

Режим замораживания	Цитолог. исследование	Взвесь фетальных гепатоцитов	% содержание фетальных гепатоцитов, при добавлении в качестве криопротектора данных веществ				
	Состояние целостности клеток	Изначальный % жизнеспособности до замораживания	Контроль (без конста).	Глюгоцир	Биосифос	Глицерин	ДМСО
В холодильной установке Joan SAVX - 100	Целые	92,7±1,3*	0±0,0*	47,7±2,3	60,7±2,3	68,7±1,7	67,7±1,7
	Голоядерные	5,3±0,7*	13,0±2,0	10,3±2,3	7,7±0,3*	6,7±1,3*	7,3±1,7
	Разрушенные	2,0±1,0*	87,0±2,0	42,0±3,0	32,3±2,7	24,7±0,7*	25,0±3,0
В холодильной установке Joan SA VX - 100 + Жидкий азот	Целые	92,7±1,3*	0±0,0*	44,7±2,7	57,3±1,7	65,7±1,7*	63,7±2,3
	Голоядерные	5,3±0,7*	8,7±1,7	11,0±2,0	9,3±1,7	8,7±0,7*	10,3±1,3*
	Разрушенные	2,0±1,0*	88,3±1,7	37,7±2,7	33,7±1,7	25,7±1,3*	26±1,0*

* Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

В контрольной группе (взвесь фетальных гепатоцитов без добавления криопротекторов) при обоих режимах замораживания наблюдается полное отсутствие жизнеспособных клеток печени ($0 \pm 0,0\%$), с преобладанием голоядерных и разрушенных фракций. Максимальная выживаемость зафиксирована в вакутейнерах с глицерином ($68,7 \pm 1,7$ - целых; $6,7 \pm 1,3$ - голоядерных; $24,7 \pm 0,7$ - разрушенных) для замороженных только в холодильной установке и ($65,7 \pm 1,7$ - целых; $8,7 \pm 0,7$ - голоядерных; $25,7 \pm 1,3$ - разрушенных) для замороженных в холодильной установке с дальнейшим погружением и хранением в жидком азоте. С незначительным отрывом в показателях выживаемости зафиксированы данные вакутейнеров с добавленным ДМСО в качестве криопротектора ($67,7 \pm 1,7$ - целых; $7,3 \pm 1,7$ - голоядерных; $25,0 \pm 3,0$ - разрушенных) для замороженных только

в холодильной установке и ($63,7 \pm 2,3$ - целых; $10,3 \pm 1,3$ - голаядерных; $26,0 \pm 1,0$ – разрушенных) для замороженных в холодильной установке и погруженных в сосуд Дюара с жидким азотом.

По результатам проведённого исследования следует судить об эффективности применения криопротекторов для низкотемпературного замораживания фетальных печёночных клеток. Криопротекторами выбора являются ДМСО и глицерин, с преимуществом последнего, определённого нами как стандарт. Положительные данные по показателям выживаемости при хранении в жидком азоте свидетельствуют о реальной возможности транспортировать клеточный материал на большие расстояния в мобильных сосудах Дюара.

2.1.3.2 Определение оптимального режима низкотемпературного замораживания фетальных гепатоцитов человека

Полученная взвесь фетальных гепатоцитов человека в среде 199 с глицерином (взятом в качестве стандартного криопротектора, для снижения осмотического шока во время размораживания) в соотношении 10:1 с исходным уровнем жизнеспособности $95,0 \pm 1,6$ % целых клеток (по данным теста на жизнеспособность с 0,1% раствором трипанового синего), была разделена на 10 одинаковых порций с равным количеством клеток в каждой и помещена в стерильные вакутейнеры. Все вакутейнеры были заморожены в холодильной установке Jouan SA VX - 100 со скоростью $-0,5$ °C/мин по стандартной программе (I–этап. Охлаждение взвеси до $+4$ °C в течение 30 минут. II–этап. Замораживание до -85 °C) с разницей во времени прерывания замораживания при $t = -25$ °C и шагом равным 10 минут (от 0 до 90 мин.). Прерывистое замораживание по данным последних исследований в области криобиологии клеток (Koebe H., Dahnhardt C., Schildberg F. et al) способствует трансмембранному переходу внутриклеточной жидкости и позволяет достичь клеткам оптимального уровня дегидратации, при котором, под влиянием низких температур, не происходит интрацеллюлярная формация кристаллов льда, что способствует максимальной их выживаемости. Через 30 дней все вакутейнеры с криоконсервированной взвесью фетальных гепатоцитов были разморожены и разогреты в водяной бане Jouan при $t = +37$ °C, в течение 15 минут, отмыты осмотическим буфером 1 моль/литр раствора глюкозы и цитологически исследованы на жизнеспособность. Результаты проведенных манипуляций представлены в таблице 5.

Как видно на таблице, максимальный уровень живых (морфологически целых) гепатоцитов, после прерывистого низкотемпературного замораживания, находится на отметке 30 минут и в среднем равным ($89,7 \pm 2,3$)%, с низким уровнем голаядерных

($6,3 \pm 0,7$)% и разрушенных ($4,0 \pm 3,0$) %, в сравнении с меньшими показателями, полученными при других временных интервалах и, в частности, в случае без интервала прерывания процесса криопрезервации.

Таблица 5 - Зависимость процентного содержания состояния целостности клеток после размораживания от временного интервала в промежуточной фазе замораживания при температуре $t = -25^{\circ}\text{C}$.

Состояние целостности клеток		Живые (целые)	Голоядерные	Разрушенные
Интервал времени промежуточной фазы замораживания (мин)	0	$69,3 \pm 1,7$	$7,7 \pm 1,3^*$	$23 \pm 2,0$
	10	$76,0 \pm 2,0$	$11,0 \pm 1,0^*$	$13,0 \pm 1,0^*$
	20	$87,7 \pm 1,7$	$7,3 \pm 0,7^*$	$5,0 \pm 1,0^*$
	30	$89,7 \pm 2,3$	$6,3 \pm 0,7^*$	$4,0 \pm 3,0$
	40	$84,3 \pm 2,7$	$7,3 \pm 1,3^*$	$8,3 \pm 1,7$
	50	$76,0 \pm 3,0$	$14,0 \pm 2,0$	$10,0 \pm 3,0$
	60	$60,3 \pm 2,7$	$18,7 \pm 1,3^*$	$21,0 \pm 2,0$
	70	$50,3 \pm 3,3$	$17,0 \pm 1,0^*$	$31,3 \pm 1,7$
	80	$39,3 \pm 3,7$	$23,0 \pm 1,0^*$	$37,7 \pm 2,7$
	90	$27,3 \pm 2,7$	$30,3 \pm 1,3^*$	$42,3 \pm 1,7$

* Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

Изменение времени прерывистой промежуточной фазы низкотемпературного замораживания, в сторону повышения либо понижения температуры, приводит к снижению популяции жизнеспособных фетальных печёночных клеток и увеличению количества голоядерных и разрушенных.

Таким образом, проведенная прижизненная оценка жизнеспособности фетальных гепатоцитов человека, после проведения прерывистого низкотемпературного замораживания, выявила оптимальный временной интервал для промежуточной фазы замораживания равный 30 минутам.

Это, на наш взгляд, обусловлено уровнем дегидратации клеток, при изменении параметров которого, в сторону повышения либо понижения, происходит внутриклеточное образование кристаллов льда, нарушение целостности клеточной мембраны и структуры клеток, развитие гиповолемического шока клеток со снижением их функциональной

активности. Благодаря введению промежуточной фазы замораживания удалось повысить процент жизнеспособных фетальных клеток печени, тем самым модернизировать процесс криоконсервации.

2.1.3.3 Разработка оптимального способа низкотемпературного замораживания фетальных печёночных клеток

Свежеизолированная цельная печень плода была поделена на две равные части. Одну половину гомогенизировали по стандартной методике, взяв лишь небольшой фрагмент паренхимы для гистологического исследования. Тестом на определение жизнеспособности клеток, путём суправитального окрашивания 0,1% раствором трипанового синего, определили исходный уровень жизнеспособности клеток ($93,0 \pm 2,0\%$ - целых, $4,7 \pm 2,7\%$ - голоядерных, $2,3 \pm 1,7\%$ - разрушенных). Следующим этапом, поделив фрагмент печёночной паренхимы надвое, одну часть паренхимы печени инфильтрировали стерильным раствором глицерина, помещали в специальный контейнер, с последующим добавлением среды 199 в количестве 100 мл и раствора глицерина, в соотношении 10:1 и в 5 этапов низкотемпературно замораживали (I-этап. Охлаждение взвеси до $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. II-этап. Замораживание до -25°C со скоростью $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (1 час). III-этап. Экспозиция 30 минут при $t = -25^{\circ}\text{C}$. IV этап. Замораживание до -85°C со скоростью $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (2 часа)). Оставшийся фрагмент заморозили без глицерина (контрольная группа 1). Через аналогичную схему замораживания провели половину гомогенизированной ткани печени, поместив их в контейнер со средой 199 и добавив стерильного раствора глицерина в соотношении 10:1. Вторую половину заморозили без криопротектора для контрольной группы 2.

Через 30 дней контейнеры с криоконсервированной взвесью фетальных гепатоцитов и фрагментами паренхимы цельной печени были разморожены и разогреты в водяной бане Jouan при $t = +37^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут, отмыты осмотическим буфером 1 моль/литр раствора глюкозы. Небольшие участки фрагментов печёночной паренхимы замороженной с криопротектором и контрольной группы 1 отправлены на гистологическое исследование. Остальные размороженные части отдельно гомогенизированы и исследованы цитологически на жизнеспособность. Контейнеры с гомогенизированной тканью печени контрольной группы 2 и замороженной с глицерином, также провели через цитологический тест на жизнеспособность. Микроскопически, при стабилизации ткани фетальной печени (криопротектором), отмечалась формирующаяся структура ткани. Прослеживались сформированные печёночные дольки, в которых определялось балочное расположение гепатоцитов. Печёночные клетки с крупным ядром, занимающим почти половину площади гепатоцита. Цитоплазма светлая, с признаками гиалиново-капельной и гидропической

дистрофии. Видны центролобулярные участки гепатоцитов в состоянии коагуляционного и колликвационного некроза. Мембрана паренхиматозных клеток не повреждена. В синусоидах отмечается скопление большого количества клеток крови, особенно лимфоцитов, они расположены как в просветах, так и прилежат к стенкам синусоидов, располагаются клетки крови цепочками и очагово. Портальные тракты формируются, в них определяются сосуды и желчные протоки. В сосудах признаки острого венозного полнокровия. Гистологическое заключение: большое количество сохранённой паренхимы (особенно гепатоцитов в состоянии лишь гиалиново-капельной и гидropической дистрофии) и стромальных элементов [195]. После гомогенизации данного фрагмента печеночной паренхимы уровень жизнеспособности составил ($71,7 \pm 2,7\%$ - целых, $10,3 \pm 1,3\%$ - голоядерных, $18,0 \pm 3,0\%$ - разрушенных). Результаты данного исследования представлены на рисунке 8.

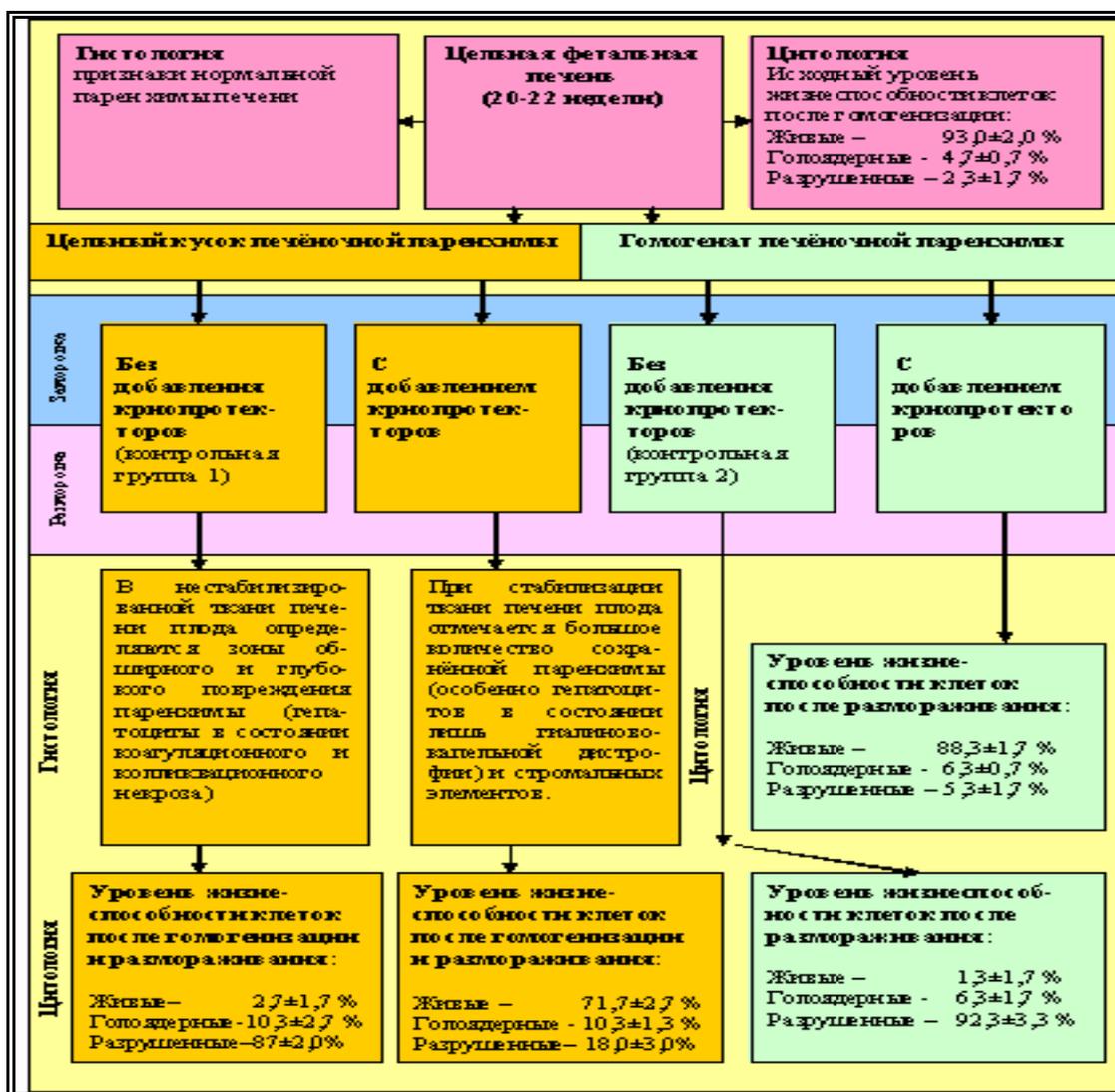


Рисунок 8. Схема определения эффективности криопрезервации при проведении различных методик низкотемпературного замораживания

В нестабилизированной ткани (без применения криопротектора – контрольная группа 1) отмечается нарушение структуры ткани. Прослеживаются печёночные дольки, гепатоциты центрлобулярно и перипортально в состоянии коагуляционного и колликвационного некроза. Небольшое количество сохранённых печёночных клеток с крупным ядром, цитоплазма светлая, с признаками гидропической дистрофии. Мембрана паренхиматозных клеток почти на всём протяжении повреждена. В синусоидах отмечается большое количество клеток крови, эти клетки располагаются также в зонах некроза гепатоцитов. В портальных трактах определяются полнокровные сосуды. Гистологическое заключение: определяются зоны глубокого и обширного повреждения паренхимы (гепатоциты в состоянии коагуляционного и колликвационного некроза).

После проведённой гомогенизации по данным цитологического исследования жизнеспособность составила ($2,7 \pm 1,7\%$ - целых, $10,3 \pm 2,7\%$ - голоядерных, $87,0 \pm 2,0\%$ - разрушенных). После процесса размораживания, определили жизнеспособность изначально гомогенизированной печёночной ткани без криопротектора (контрольная группа 2), в которой уровень жизнеспособности клеток составил ($1,3 \pm 1,7\%$ - целых, $6,3 \pm 1,7\%$ - голоядерных, $92,3 \pm 3,3\%$ - разрушенных).

В случае гомогенизированной печёночной ткани с добавленным глицерином, наблюдался высокий уровень жизнеспособности ($88,3 \pm 1,7\%$ - целых, $6,3 \pm 1,7\%$ - голоядерных, $5,3 \pm 1,7\%$ - разрушенных).

Проведённое исследование свидетельствует об эффективности применения глицерина в качестве криопротектора для фетальной печени, как цельной, так и гомогенизированной. Максимальная эффективность была достигнута при замораживании изначально гомогенизированной печёночной ткани с криопротектором, позволяющая взять данный способ криоконсервации за основу в дальнейших манипуляциях.

2.1.3.4 Исследования функциональной активности фетальных гепатоцитов человека в условиях гипотермии

Считая своей задачей определение и обоснование допустимых сроков функционирования и тепловой ишемии клеток не только по структурным, менее информативным, а по функциональным гомеостатическим критериям, мы сопоставили динамику данных процессов до и после глубокого охлаждения. Учитывая, что в процессе своей жизнедеятельности фетальные гепатоциты потребляют питательные вещества из внешней среды, а так же выделяют в нее продукты метаболизма, нами были использованы следующие тесты:

- метод динамической регистрации активности ионов K^+ , Na^+ , Ca^{++} в зависимости от времени при $t = 37^{\circ}C$, для определения уровня перераспределения ионов в клетках и сроков развития клеточной смерти;

-определение парциального давления газов (pO_2 , pCO_2) в надосадке взвеси фетальных гепатоцитов в зависимости от временного интервала при $t = 37^{\circ}C$, свидетельствующее об активности энергетического обмена в клетках;

-оценка степени сдвига рН надосадка взвеси фетальных печёночных клеток и концентрации HCO_3^- , обусловленной выделением клетками продуктов метаболизма.

Оценка динамики морфофункциональных изменений при трансплантации пациентам с циррозом печени криопрезервированных фетальных гепатоцитов. Динамику регистрации активности ионов K^+ , Na^+ , Ca^{++} до и после процесса низкотемпературного замораживания (используя разработанный стандартный протокол) определяли в анализаторе ИЧЭ (AVL 988-3). Температура во всех исследованиях поддерживалась одинаковая $t = 37^{\circ}C$ путём подогрева в водяной бане Jouan. Определение проводилось в 6 сериях опытов как до, так и после размораживания: исходный уровень, через 30 мин., 60 мин., 90 мин., 120 мин., 150 мин., 180 мин. Каждый опыт осуществлялся в пяти параллельных пробах. Полученные данные представлены на рисунках 9, 10 и 11.

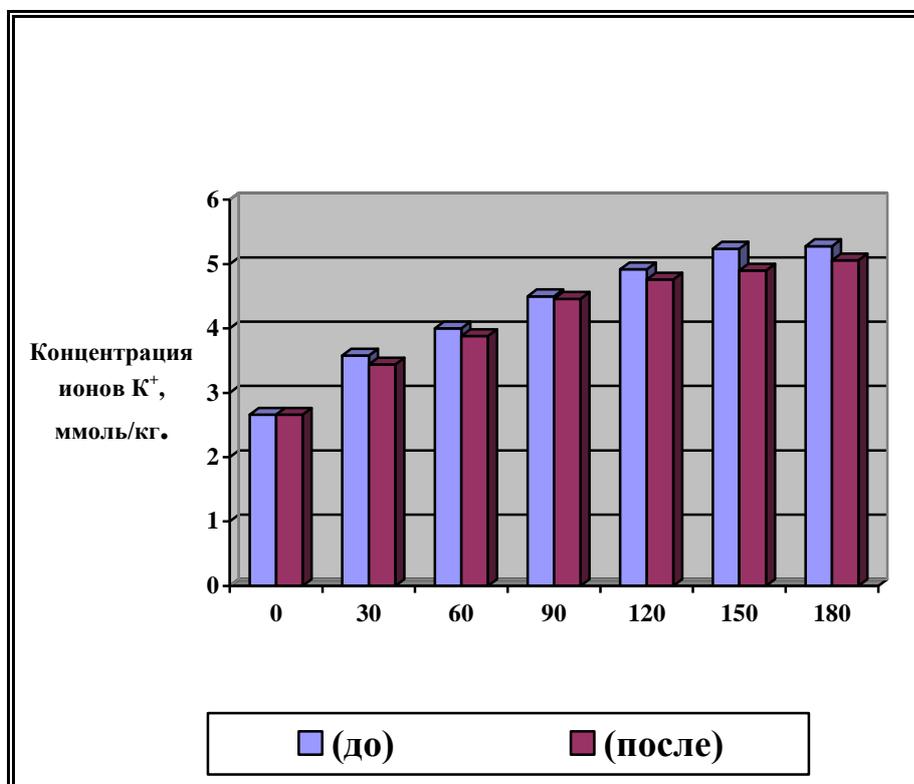


Рисунок 9. Изменение внеклеточной концентрации K^+ в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при $t = 37^{\circ}C$

Как видно из представленных на рисунках данных, концентрация ионов K^+ умеренно повышалась в обоих случаях (как до, так и после криопрезервации) от изначальной величины равной $2,66 \pm 0,13$ и $2,66 \pm 0,4$ ммоль/кг соответственно до $4,92 \pm 0,11$ и $4,76 \pm 0,15$ ммоль/кг при временном интервале 120 минут, с фактическим отсутствием изменений при интервалах времени пребывания 150 и 180 минут в водяной бане (150 мин.- $5,24 \pm 0,08$ и $4,9 \pm 0,14$ ммоль/кг; 180 мин.- $5,28 \pm 0,09$ и $5,06 \pm 0,08$ ммоль/кг). В случае с ионами Na^+ , концентрация наоборот активно снижалась с $160,2 \pm 0,22$ и $159,5 \pm 0,24$ ммоль/кг (до и после криоконсервации соответственно) до $146,98 \pm 0,23$ и $148,96 \pm 0,18$ ммоль/кг при времени выдерживания 120 минут. После чего динамика снижения концентраций резко замедлилась, о чём свидетельствуют результаты при интервалах времени 150 и 180 минут равные $145,92 \pm 0,17$ и $148,04 \pm 0,21$ ммоль/кг для 150 минут и $145,02 \pm 0,15$ и $147,72 \pm 0,2$ ммоль/кг для 180 минут.

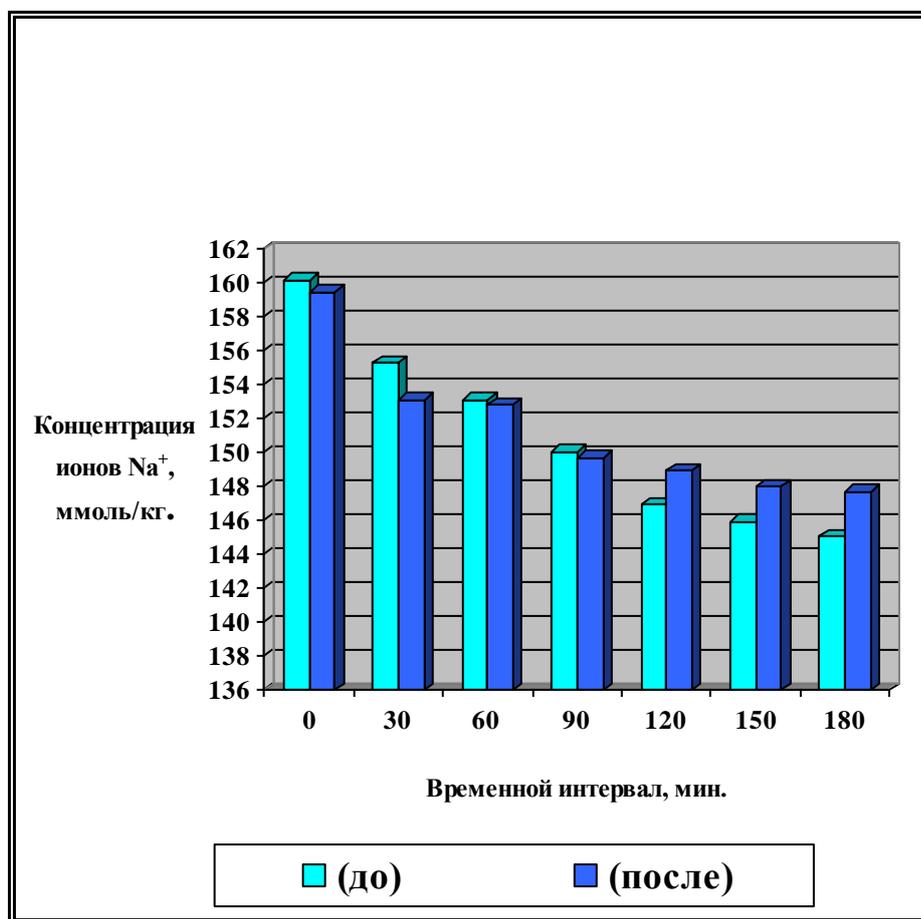


Рисунок 10. Изменение внеклеточной концентрации Na^+ в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при $t = 37^{\circ}C$

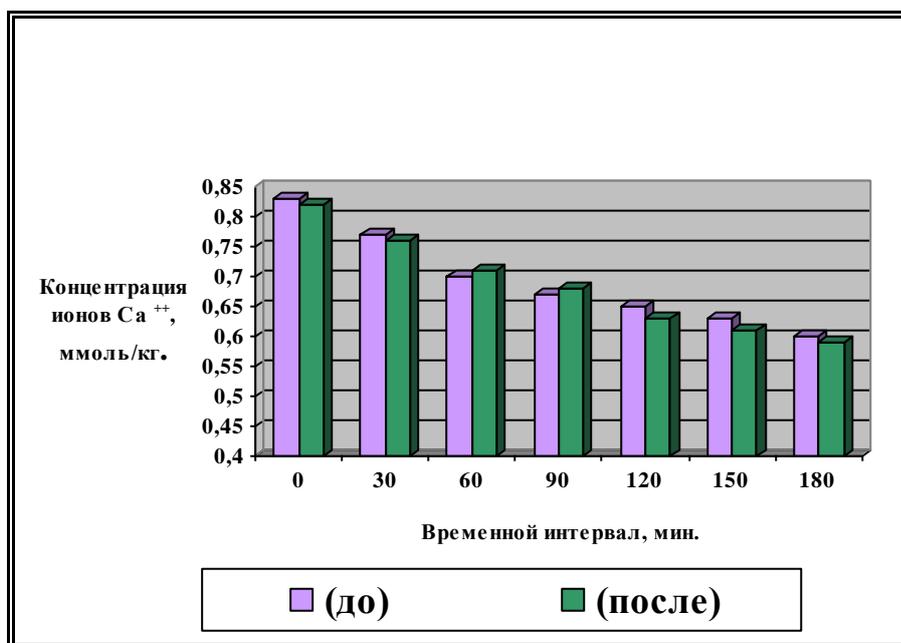


Рисунок 11. Изменение внеклеточной концентрации Ca⁺⁺ в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при t = 37⁰C

При измерении значений концентраций ионов Ca⁺⁺ наблюдалось незначительное снижение показателей, начиная с 0,83 ± 0,04 и 0,82 ± 0,03 ммоль/кг (до и после криоконсервации) до 0,6 ± 0,08 и 0,59 ± 0,03 ммоль/кг при для 180 минут.

Полученные данные свидетельствуют о процессе устойчивой адаптации изолированных гепатоцитов плода человека к условиям *in vitro*, достигающего максимума в интервале 0-30 минут (максимальная разница перепадов значений) при t = 37⁰C. Последующее снижение активности метаболических процессов, особенно в интервале 150-180 минут, указывает на истощение питательной среды и гибели части клеток, что подтверждается цитоморфологическими исследованиями. Из данных проведённого исследования видно, что по изменению концентрации ионов в надосадочном слое взвеси фетальных гепатоцитов можно судить о косвенном подтверждении функциональной активности клеток, в частности эффективности адаптационного трансмембранного перехода. Несмотря на высокий уровень функциональной активности у криопрезервированных клеток, наблюдается несколько более высокий метаболический эффект, в случае с клетками, не подвергшимися действию крайне низких температур. Следует особо подчеркнуть, что действие на клетки различных стрессовых факторов постоянно сопряжено с дополнительными энергетическими затратами и поэтому адекватным критерием адаптации (функциональной активности) служит способность биосистемы сохранять (восстанавливать) постоянство своего энергетического потенциала. По всей видимости, энергетическая активность криопрезервированных клеток слегка снижена за счёт потери части

аккумуляции внутриклеточной энергии и её расходования на дегидратацию клеток (активация энергозависимого трансмембранного транспорта) во время процессов замораживания, что и отразилось на полученных показателях. Несмотря на это, пройдя через «холодовой коллапс», криопрезервированные клетки, сохранив свою морфологическую целостность, устойчиво метаболизируют (и сохраняют свою функциональную активность) в первые 90 минут и снижают свои адаптогенные свойства в последующем, за счёт истощения и отсутствия подпитки извне.

Определение парциального давления газов (pO_2 , pCO_2) в надсадке взвеси фетальных гепатоцитов в зависимости от временного интервала при $t = 37^{\circ}C$ производилась на анализаторе газов AVL COMPACT. Определение проводилось в 6 сериях опытов как до, так и после размораживания: исходный уровень, через 30 мин., 60 мин., 90 мин., 120 мин., 150 мин., 180 мин. Каждый опыт осуществлялся в пяти параллельных пробах. Результаты исследований показаны на рисунках 12, 13.

Руководствуясь полученными данными, парциальное давление кислорода (pO_2) равномерно снижалось в обоих случаях (как до, так и после криопрезервации) от изначальной величины равной $173,56 \pm 0,8$ и $170,56 \pm 0,4$ мм. рт.ст. соответственно до $83 \pm 0,22$ и $84,96 \pm 0,23$ мм. рт. ст. при временном интервале 90 минут, с незначительными изменениями при интервалах времени пребывания 120, 150 и 180 минут в водяной бане (120 мин.- $64,94 \pm 0,21$ и $70,92 \pm 0,24$ мм. рт. ст.; 150 мин.- $59,96 \pm 0,25$ и $68,14 \pm 0,19$ мм. рт. ст.; 180 мин.- $58,4 \pm 0,22$ и $65,96 \pm 0,21$ мм. рт. ст.).

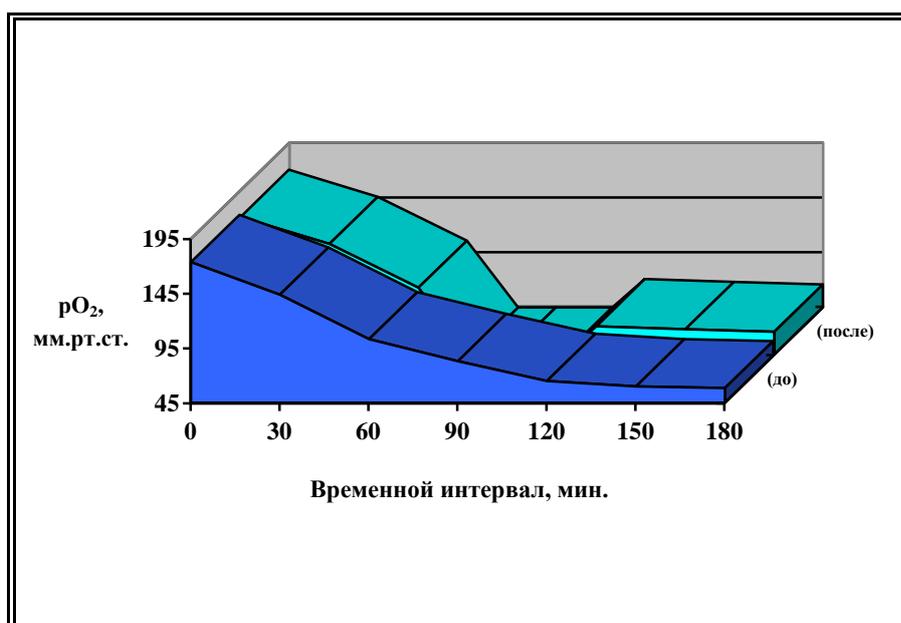


Рисунок 12. Изменение внеклеточного pO_2 в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при $t = 37^{\circ}C$

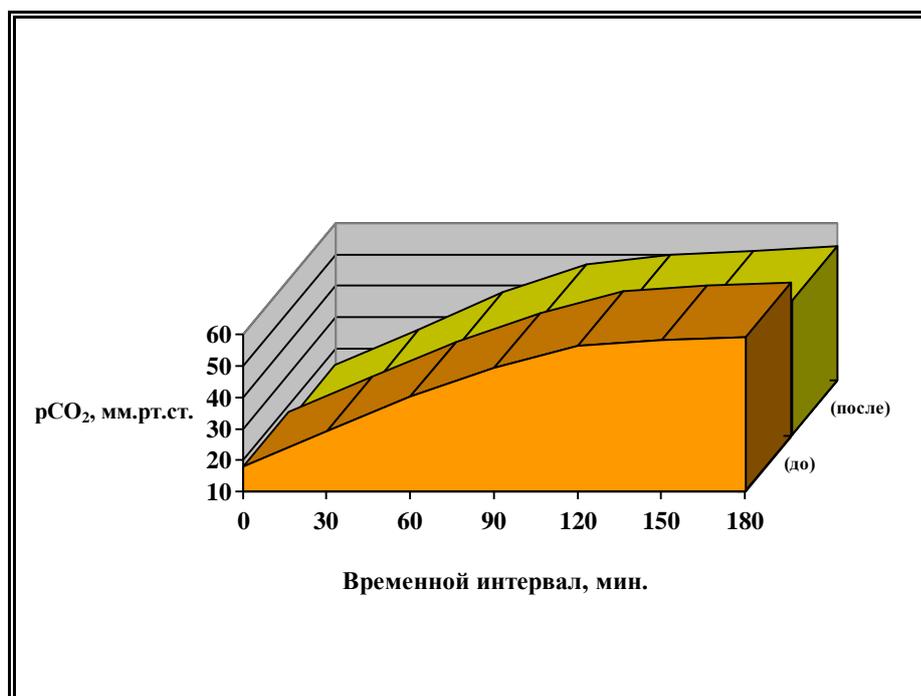


Рисунок 13. Изменение внеклеточного pCO_2 в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при $t = 37^{\circ}C$

Парциальное давление углекислого газа (pCO_2), в противовес (pO_2), резко снижалось с $17,8 \pm 0,22$ и $14,84 \pm 0,24$ мм. рт. ст. (до и после криоконсервации соответственно) до $49,2 \pm 0,24$ и $47,06 \pm 0,15$ мм. рт. ст. при времени выдерживания 90 минут. После чего динамика снижения (pCO_2) замедлилась и фактически угасла, о чём свидетельствуют результаты при интервалах времени 120, 150 и 180 минут равные $56,22 \pm 0,24$ и $49,9 \pm 0,22$ мм. рт. ст. для 120 минут, $58,08 \pm 0,25$ и $51,38 \pm 0,2$ мм. рт. ст. для 150 минут и $58,92 \pm 0,13$ и $52,88 \pm 0,19$ мм. рт. ст. для 180 минут.

Таким образом, стремительное повышение уровня (pCO_2) и одновременное снижение (pO_2) в надсадке взвеси фетальных гепатоцитов в интервале от 0 до 90 минут свидетельствует о протекании активных процессов метаболизма газов в данном промежутке времени и утихании динамики в дальнейшем до минимальных цифр, является эффективным показателем функциональной активности клеток. После снижения до минимума динамики данных процессов происходит выключение аэробного фосфорилирования в клетках и как следствие, прогрессирует снижение концентрации макроэргических соединений. Основным резервным путём поддержания энергетического статуса клеток в условиях изоляции и ишемии становится гликолиз (гликогенолиз). Однако даже в период максимальной интенсивности анаэробное окисление не может обеспечить клетки достаточным количеством энергии для сохранения структурной и функциональной полноценности, а содержание

макроэргов продолжает неуклонно снижаться, что приводит к интрацеллюлярным деструктивным процессам и гибели клеток.

Следующим тестом, свидетельствующим о сохранении функциональных свойств гепатоцитов *in vitro*, была оценка степени сдвига рН и концентрация HCO_3^- , которая велась с помощью аналогичного анализатора газов AVL COMPACT при $t = 37^\circ\text{C}$. Определение проводилось в 6 сериях опытов как до, так и после размораживания: исходный уровень, через 30 мин., 60 мин., 90 мин., 120 мин., 150 мин., 180 мин. Каждый опыт осуществлялся в пяти параллельных пробах. Результаты исследования приведены на рисунках 14, 15.

Изначальное значение рН равнялось $7,4 \pm 0,0$ как до, так и после криоконсервации. Затем произошёл стремительный спад в интервале от 0 до 90 минут в сторону закисления, достигнув отметки $6,72 \pm 0,089$ и $6,78 \pm 0,089$ соответственно при времени 90 минут. В дальнейшем, происходило незначительное снижение уровня рН с угасанием активности, достигая значений $6,46 \pm 0,077$ для гепатоцитов не подвергшихся криопрезервации и $6,54 \pm 0,077$ для клеток прошедших все этапы замораживания при экспозиции в водяной бане в течение 180 минут. Концентрация HCO_3^- менялась в обратном направлении в сравнении с динамикой рН надосадка. При изначальных концентрационных значениях равных $2,1 \pm 0,0$ и $2,08 \pm 0,089$ ммоль/л (до и после криоконсервации) динамичное падение уровня наблюдалось до 60 минутного барьера, и была равна $2,58 \pm 0,089$ и $2,6 \pm 0,022$ ммоль/л соответственно. В дальнейшем определялась картина замедленного снижения показателей, вплоть до фактической остановки с концентрацией равной $3,08 \pm 0,89$ и $3,02 \pm 0,089$ ммоль/л при 180 минутной экспозиции клеток в водяной бане при $t = 37^\circ\text{C}$.

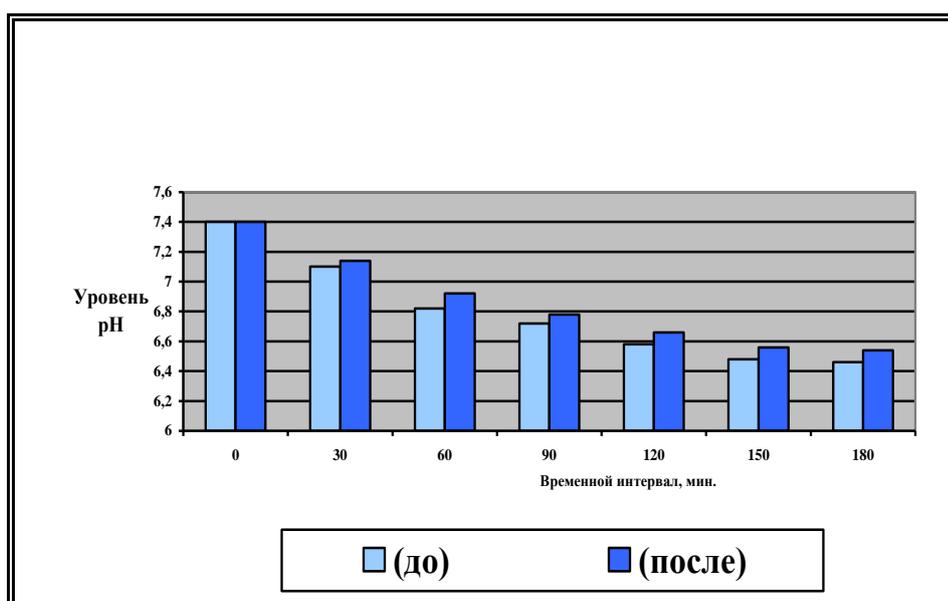


Рисунок 14. Динамика изменения рН надосадка взвеси фетальных гепатоцитов в зависимости от времени (до и после криоконсервации)

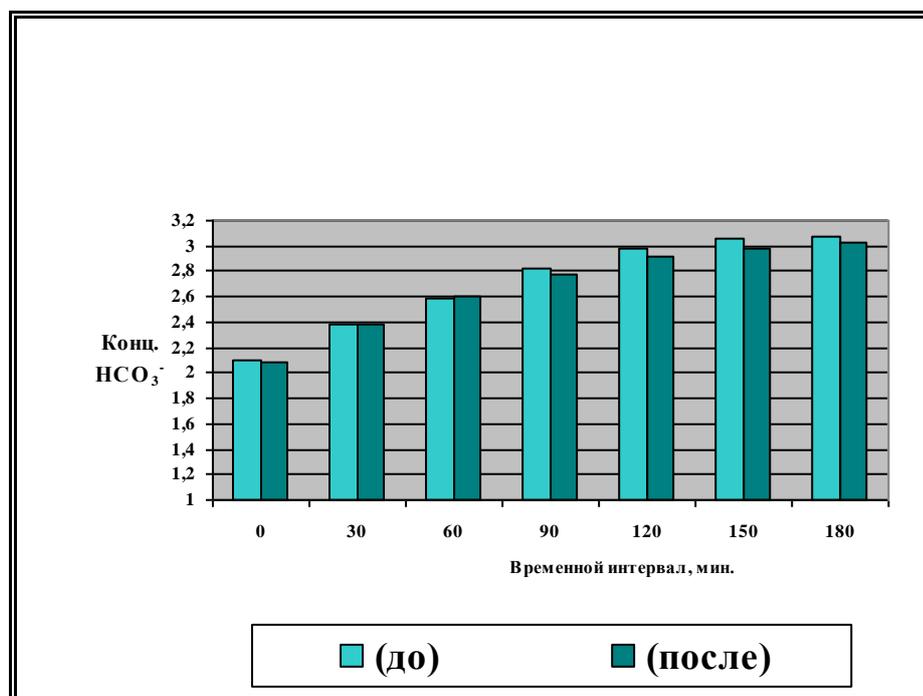


Рисунок 15. Динамика изменения концентрации HCO_3^- в зависимости от времени (до и после криоконсервации) при $t = 37^\circ\text{C}$

Интерпретируя полученные результаты, можно заключить, что в интервале времени от 0 до 60 минут, фетальные гепатоциты активно метаболизируют, с чем связана активация процессов закисления (повышение концентрации HCO_3^- и других веществ) и как следствие снижение значений pH. Последующее замедление уровня кислотности, указывает, на наш взгляд, нарастание дискомфорта клеток при криоконсервации в условиях *in vitro* без энергетической подпитки извне, вызывая нарушение продукции энергии и продуктов метаболизма внутри клетки.

Инструментальная, лабораторная база исследований

- Рентгенодиагностический комплекс “DUO DIAGNOST”;
- Кабинет общей рентгенологии оснащен универсальным цифровым рентгенодиагностическим аппаратом «Duo Diagnost» PHILIPS на 2 рабочих места с пультом управления и монитором дистанционной флюороскопии, проявочной машиной KODAK. Проводятся рутинные рентгенологические исследования всех органов и систем, используются следующие специальные методы исследования: полипозиционное исследование сердца с контрастированием пищевода, полипозиционное исследование желудочно-кишечного тракта, ирригоскопия с применением метода двойного контрастирования, релаксационная дуоденография. Выполняются контрастные методы исследования: экскреторная и ретроградная урография, цистография, гистеросальпингография, фистулография с использованием неионных контрастных

препаратов «Ультравист», «Омнискан». Полипозиционная цифровая флюороскопия является одним из новых методов Р-исследования, получивших широкое применение за счет низкой дозы излучения и цифрового преобразователя изображения;

- Рентгеновский компьютерный томограф со спиральной программой «TOMOSCAN AV». Исследование всех органов и систем, КТ-ангиография крупных сосудов, чрескожное дренирование абсцессов и гематом, кист брюшной полости, чрескожные холангиостомии;

- Магнитно-резонансный томограф «GIROSCAN». МРТ -исследования головного и спинного мозга, позвоночника, органов брюшной полости и забрюшинного пространства, органов малого таза, суставов, молочной железы. При исследованиях используются следующие специальные неинвазивные методы: МР-миелография, МР-артериография, МР-урография, МР-холангиопанкреатография, не требующие внутривенного введения контрастных веществ. Выполняются и методы исследования с усилением контрастирующими агентами «Магневист», «Омнискан», МР-ангиография;

- Рентгенодиагностический комплекс «MULTIDIAGNOST 4L». Назначение: ангиография, эндоваскулярные рентгенохирургические вмешательства, эндоваскулярная трансплантация фетальных клеток, инвазивные электрофизиологические исследования сердца;

- УЗИ HDI – 1500 Philips-5 аппаратов;
- Электрокардиограф Page-writer XLIPhilips;
- Электроэнцефалограф Erih Jaeger;
- Электромиограф Erih Jaeger;
- Мониторирование АД Shiller,
- Ультразвуковая компьютерная система Vetrasound Diagnostic Sistem. Модель WED -2018;
- Аппарат для визометрии «Zeiss»;
- щелевая лампа «Zeiss»;
- прямой офтальмоскоп «Zeiss»;
- автопериметр «Zeiss»;
- бесконтактный тонометр;
- тонометр Маклакова;
- караторефрактометр «Zeiss»;
- УЗИ- аппарат «Compuscan»;
- Мастер-ИОЛ «Zeiss»;

- аппарат для определения центрального поля зрения «Zeiss»;
- операционный микроскоп ОРМІ - «Zeiss»;
- факоэмульсификатор «Millennium»;
- витреотом «Millennium»;
- эндолазер «Millennium»;
- фундус-камера для флуоресцентной ангиографии;
- аппарат КВЧ-терапии «Прамень»;
- аппарат для определения зрительных вызванных потенциалов;
- офтальмологическая лазерная установка «Visulas 532 combi».
- ЛОР-комбайн Danctke;
- Диагностический микроскоп ОРМІ PICO;
- Аудиометр;
- Импедансометр;
- Звукоизоляционная камера;
- Синускоп;
- Операционный микроскоп ОРМІ PROMIGIS с комплектами для микрохирургии уха и гортани.
- видеоэндоскопические комплексы «Storz»;
- холедохоскоп;
- эндоскопы;
- аппаратура функциональной и лучевой диагностики.
- инструментальный набор для лапароскопических операций «Karl Storz»;

При выполнении научной работы в планируемом использовано материально – техническое оснащение следующих подразделений: терапевтический блок, операционный блок, отделение анестезиологии и реаниматологии, отделение лучевой диагностики и рентгенохирургии, отделение ультразвуковой и функциональной диагностики, отделение лабораторной диагностики, отделение бактериологической лаборатории, отделение патоморфологии, отделение хирургии №1, отделение хирургии №2.

Операционный блок укомплектован различной современной медицинской техникой, но наиболее востребованной для научных целей являлась следующая аппаратура: видеолапароскопический комплекс пр. Германия «Карл Шторц» 7 компл.; хирургический лазер Medilas-Fiberton 5100, пр. Германия «Dornier»; ВЧ- хирургический аппарат АРГОН-3000 пр. Германия ARCO "Soring", артропомпа пр. Германия «Карл Шторц»; Автокон – 200(коагулятор)- 8 комплектов пр. Германия «Карл Шторц»; Автокон артро (коагулятор) пр.

Германия «Карл Шторц»; Кальпусплит (система для литотрипсии) пр. Германия «Карл Шторц»; Дуомат (аквапуратор) пр. Германия «Карл Шторц»; Артрофлятор пр. Германия «Карл Шторц»; Микроскоп операционный – офтальмологический. Пр.США« Karl Zees»; Микроскоп операционный-Лор, США «Karl Zees»; Офтальмологическая микрохирургическая система Миллениум, пр. США «Миллениум»; УЗ хирургический аппарат SONOKA-400 Германия; Хирургический отсасыватель Itkavas -V-40, 6 комплектов пр.Финляндия, «Мериваара»; Эндофлятор пр. Германия «Карл Шторц».

Подразделения клинико-диагностической лаборатории оснащены следующим оборудованием: счетчик клеток крови Super L2; микроскоп Axiostar; рефлотрон; А – р Urelux S; центрифуга В-4i BB_BB_VV; AVL Compact-3 ph(Bloodgas); Mikro-Osmometer; анализатор электролитов AVL998-3; фотометр 5010; центрифуга гематокритная CM-70; термостат Т W-2; анализатор ТЕХНО; сушижаровой шкаф EU; весы аналитические Sartorius; Ph-метр Basis; аллергоанализатор Unicar; система электрофореза белков SCANION; анализатор Элексис 1010; спектрофотометрVertaspee2100PRO; снегофункциональная центрифуга с охлаждением BR 4i; прецизионные весы; миницентрифуга настольная BB_VV; Шейкер S4; анализатор Антос 2020; миксер Меди-Микс; восьмиканальный дозатор; универсальный биохимический анализатор ChemWell.Модель 2900; микроскоп Axiostar; счет элементов крови Super L2; микроскоп Axiolab; центрифуга CM-6M; центрифуга клиническая CM-6M; термостат водяной TVV ELMI; автоматический анализатор STA Compact; агрегометр с принтером EPSON; коагулометр Trombostat-2; микроскоп Axiostar; урино анализатор Мидитрон; миницентрифуга настольная BBVV; микроскоп Мик-Мед; КФК-3; геманализатор Nemoluxs; дистиллятор Д-25 200; станция для окраски стекол Linistain GLX; термостат воздушный Инкуселл; автоматический измеритель времени свертываемости крови АСТ II(Metronik); камера гелевая(гель граб. электрофорез); вортекс; ПЦР Express Chasis (ампликатор); серологическая баня.

Специальные методы исследования:

-Морфологические (гистологические, иммуногистохимические (моно-, поликлональные антитела, HCV, HbsAg). Биоптаты печени (количественное определение ИГА и индекса фиброза). Биоптаты почек: моно-, поликлональные антитела HCV, HbsAg в гломерулярных депозитах, морфологические варианты и индекс фиброза, межклеточное взаимодействие и индекс фиброза, межклеточное и матриксно-клеточное взаимодействие.

- Иммунологические – АНЦА, цитокины (ИЛγ, ИЛ 1β, ИЛ 2, ИЛ 6, α ФНО, ИЛ 4, ИЛ 5, ИЛ 10, ИЛ3), фактор некроза опухоли, ревматоидный фактор – количественный, СРБ – количественный.

- Гормональный – уровень С-пептида для оценки функционального состояния β -клеток, антитела к тиреоглобулину и тиреоидной пероксидазе, ренин, альдостерон, ангиотензин.

- Эндovasкулярные и визуализирующие методы:

-Селективная рентгенангиография и эндovasкулярная трансплантация в чревный ствол и почечные артерии

-Цветовое доплеровское и энергетическое картирование

-Доплеровское исследование в импульсно-волновом режиме с определением кровотока в сегментарных междолевых и дуговых артериях, КТ, МРТ.

2.1.4 Методы трансплантации фетальных гепатоцитов

Перед трансплантацией фетальных гепатоцитов проводили определение групповой принадлежности крови по системе АВО, резус принадлежности и пробы на совместимость компонентов крови между кровью донора (плода) и реципиента (больного с хроническим диффузным заболеванием печени).

Трансплантацию проводили по следующим методикам:

1. После обработки операционного поля трижды спиртом 76%, под местной анестезией (Новокаин 0,5% - 10 мл), под контролем УЗИ аппарата в правом подреберье производилась чрезкожно-интрапечёночная пункция на 3 см ниже края рёберной дуги по правой переднеподмышечной линии. После пункции по данным УЗИ аппарата игла визуализировалась в 6-7 сегменте паренхимы печени. Шприцем через пункционную иглу вводилась взвесь гепатоцитов в количестве 20 мл. На УЗИ образовывалось депо в 6-7 сегменте паренхимы печени, по типу «облачка». После выведения иглы операционное поле обрабатывалось 70% спиртом с наложением асептической повязки.

2. Под контролем эндовидеоскопического оборудования аналогично вводили взвесь фетальных гепатоцитов чрезкожно-интрапечёочно в 6-7 сегменты печени.

3. Под контролем компьютерного томографа, с последующими динамическими наблюдениями.

2.1.5 Методы трансплантации фетальных тиреоцитов

Трансплантацию ФТ больным различными формами гипотиреоза проводили по следующим методикам:

1) В паренхиму железы

Пациент лежал на медицинской кушетке в положении на спине, голова повернута в противоположную сторону от места манипуляции, врач стоял у изголовья пациента.

Производили ультразвуковое сканирование щитовидной железы или её культы (аппарат HDI 1500 «PHILIPS». Голандия) с определением формы, размера и объема железы, расстояния от передней поверхности шеи до железы, а также положение общей сонной артерии (рисунок 16).

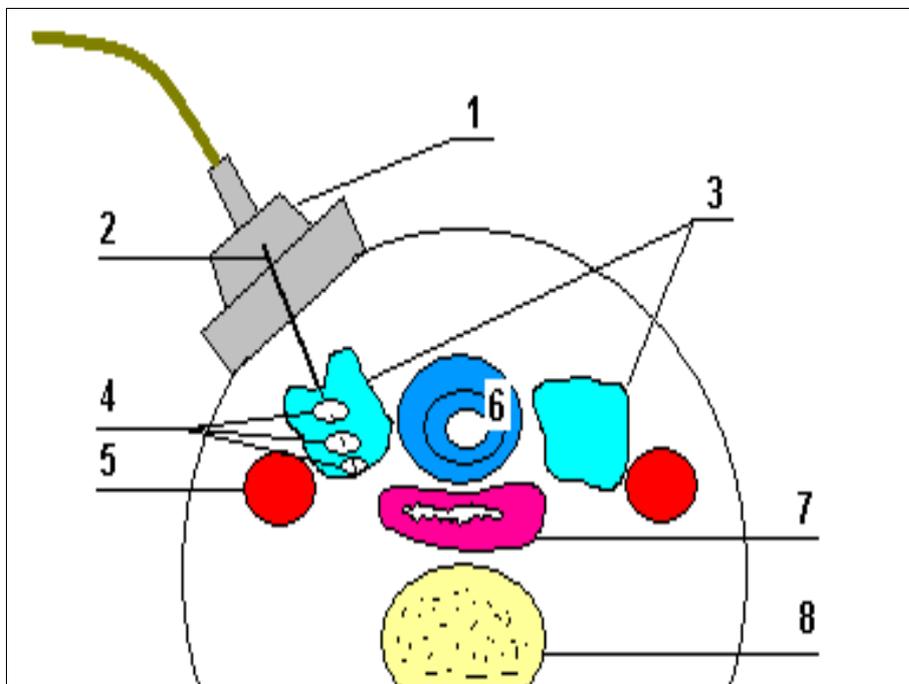


Рисунок 16. Датчик УЗИ-1; 2-пункционная игла; 3-культя щитовидной железы; 4-взвесь фетальных тиреоцитов; 5-общая сонная артерия; 6-трахея; 7-пищевод; 8-тело позвонка.

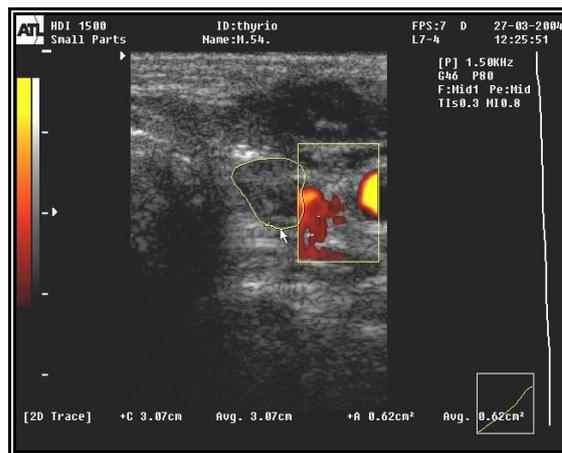


Рисунок 17. Введение ФТ в паренхиму щитовидной железы

Определялась точка пункции на коже передней поверхности шеи. Кожа шеи пациента обрабатывалась раствором антисептика и без применения анестезии производилась пункция иглой (2) от одноразового 5,0 мл шприца. Игла продвигается под контролем датчика УЗИ – аппарата (1) строго перпендикулярно передней поверхности шеи до капсулы щитовидной

железы или её культы (3). Далее с некоторым усилием капсулу прокалывали и игла, проходя всю толщу железы, достигала её задней поверхности. После этого в другой 5,0 мл шприц набирали взвесь фетальных тиреоцитов человека в физиологическом растворе, подогретых до температуры 36⁰С, в количестве 1,5-2,0 мл в зависимости от толщины паренхимы железы, шприц соединяли с пункционной иглой и затем взвесь тиреоцитов (4) вводили дробно и болюсно в паренхиму железы по мере продвижения иглы в обратном направлении, что позволяло добиться более равномерного распределения тиреоцитов в паренхиме железы и свести к минимуму риск кровотечения из ее паренхимы (рисунок 17).

После этого производили повторное ультразвуковое сканирование щитовидной железы или её культы, определяли форму, размеры и объем железы после пункции.

Пункционное отверстие на шею заклеивали медицинским пластырем.

Все манипуляции проводились с соблюдением правил асептики в условиях хирургического перевязочного кабинета.

2) Эндоваскулярно

В условиях рентгеноперационной пациенту под местной анестезией проводили пункцию правой бедренной артерии, в которую устанавливали интрадьюссер 6F через который вводили катетер 6F и под контролем ангиографа с введением контрастного вещества (Урографин) достигали чревный ствол. Затем проводили введение взвеси фетальных тиреоцитов в количестве 3-5 мл одновременно (рисунок 18). Затем удаляли катетер и интрадьюссер. На пункционное отверстие накладывали давящую повязку.

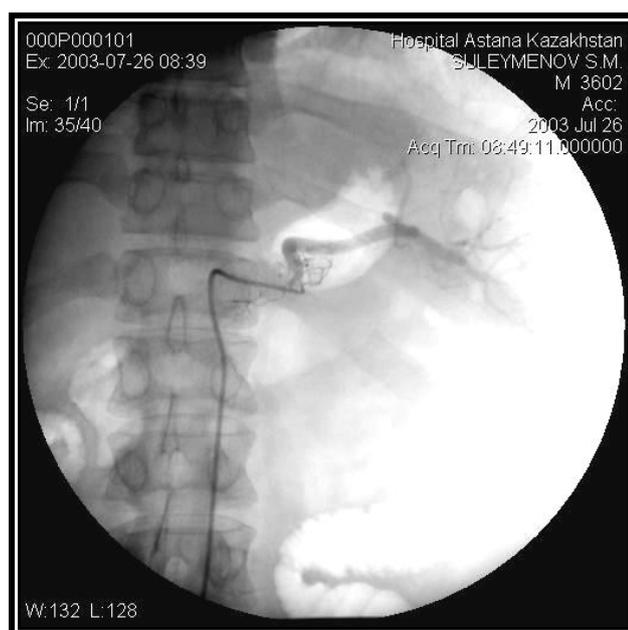


Рисунок 18. Эндоваскулярное введение взвеси фетальных тиреоцитов в паренхиму печени и селезенки

2.1.6 Метод трансплантации фетальных нефроцитов

Трансплантацию фетальных нефроцитов проводили эндоваскулярно. В условиях рентгенооперационной пациенту под местной анестезией проводили пункцию правой бедренной артерии, в которую устанавливали интрадьюссер 6F через который вводили катетер 6F и под контролем ангиографа с введением контрастного вещества почечных артерий. Затем проводили введение взвеси фетальных нефроцитов в количестве 7-10 мл в каждую артерию. Удаляли катетер и интрадьюссер. На пункционное отверстие накладывали давящую повязку.

2.1.7 Метод трансплантации фетальных хондроцитов

Трансплантацию фетальных хондроцитов проводили следующим образом. В условиях операционной под рентгенконтролем и контролем артроскопии фетальные хондроциты вводили в головку бедренной кости, в медиальный мыщелок большеберцовой кости и в полость сустава.

2.1.8 Метод трансплантации фетальных нейроцитов

Нами разработаны дифференцированные методы введения фетальных нейроцитов при различной органической патологии нервной системы. При заболеваниях ЦНС, таких как рассеянный склероз, болезнь Паркинсона, травматическая болезнь спинного мозга и сирингомиелия введение фетальных нервных клеток осуществлялось эндолюмбальным методом.

Экспериментально доказано что, максимальный эффект трансплантационного лечения следует ожидать, когда непосредственное влияние трансплантированных фетальных клеток и нейромедиаторов на поврежденные участки мозга сочетается с их диффузным воздействием на разные мозговые структуры, так или иначе участвующих в выполнении нарушенной функции. Поэтому, есть основание полагать, что имплантация клеток в ликвороциркуляцию позволяет достичь более выраженного клинического эффекта. Данный подход привлекателен еще и тем, что он минимально травматичен, многократно повторяем и не требует специального инструментального оснащения.

Эндолюмбальная трансплантация фетальных нейроцитов осуществлялась в условиях малой операционной или процедурного кабинета с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Суспензия фетальных нейроцитов вводилась эндолюмбальным методом. После местной анестезии раствором 0,5% новокаина в положении пациента на правом боку производили пункцию спинномозгового пространства на уровне L3-L4, проводили барботаж (в шприц набиралась спинномозговая жидкость в количестве 3,0 мл). В спинномозговое пространство в растворе ликвора вводилась суспензия криоконсервированных нейроцитов, идентичных группе крови реципиента, в количестве 5,0 мл. После проведенной

нейротрансплантации больной в течение 2 часов находился в положении на боку или на животе.

При поражении периферических нервов трансплантация осуществлялась интраоперационно. Производился хирургический доступ к стволу периферического нерва. С применением микрохирургической техники осуществляли экзо-эндоневролиз. Проксимальный и дистальный концы нерва мобилизовали, края освеживались до появления аксонов. С применением микроскопа производился шов нерва атрауматикой. Целостность ствола восстанавливалась, компрессию нерва ликвидировали. Эндоневрально вверх и вниз вводили 5,0 мл. суспензии одноклеточных криоконсервированных фетальных нейроцитов. По данному способу получен предварительный патент РК № 48181 «Способ хирургического лечения травматического поражения периферического нерва».

В 2-х случаях эндоневральное введение фетальных нейроцитов осуществлялось пациентом с осложненной нейропатией лицевого нерва. Нейротрансплантация проводилась следующим способом: после обработки операционного поля под интубационным наркозом производили продольный разрез между основанием мочки уха и передним краем сосцевидного отростка. С помощью микроскопа выделяли околоушную железу с капсулой, которую тупым путем сдвигали кпереди. В пространстве между железой и сосцевидным отростком из рубцовых тканей выделяли лицевой нерв. Проводили экзо-эндоневролиз путем рассечения рубцово измененного эпинеурия и разделения нервного ствола на группы пучков. Эндоневрально вводили 5,0 мл. одноклеточных криоконсервированных фетальных нейроцитов. По данному способу введения фетальных нервных клеток получен предварительный патент РК № 48192 «Способ хирургического лечения нейропатии лицевого нерва».

В некоторых случаях, у пациентов с травматической болезнью спинного мозга при возникновении показаний к хирургическому вмешательству, таких как устранение рубцово-спаечного процесса, при проведении ревизии спинного мозга и менингомиелолизе осуществлялось интраоперационное введение фетальных нервных клеток. Нейротрансплантация осуществлялась следующим способом. После обработки операционного поля под эндотрахеальным наркозом производился линейный разрез над остистыми отростками в проекции повреждения спинного мозга. Производилось скелетирование дужек с двух сторон и ламинэктомия. Из рубцовых тканей тупым и острым путем выделяли твердую мозговую оболочку. Последнюю брали на держалки и вскрывали линейно. Производили ревизию спинного мозга, менингомиелолиз. Непосредственно в зону спаечного процесса проводили трансплантацию криоконсервированных одноклеточных фетальных нейроцитов в количестве 5,0 мл.

2.1.9 Метод трансплантации островковых клеток

Трансплантацию фетальных островковых клеток поджелудочной железы осуществляли следующим образом. В условиях рентгеноперационной пациенту под местной анестезией проводили пункцию правой бедренной артерии, в которую устанавливали интродьюсер 6F, через который вводят катетер 6F и под контролем ангиографа с введением контрастного вещества (Урографин) достигали чревного ствола. Затем проводили введение взвеси фетальных тиреоцитов в количестве 3-5 мл одновременно. Удаляли катетер и интродьюсер. На пункционное отверстие накладывали давящую повязку.

3. Обобщение и оценка результатов исследований

3.1 Оценка длительного низкотемпературного замораживания фетальных гепатоцитов человека

Полученный свежий гомогенат печёночной паренхимы в среде 199 цитологически исследовали на исходную жизнеспособность, которая составила: $91,7 \pm 1,3\%$ - целых, $4,7 \pm 0,3\%$ - голоядерных, $3,7 \pm 0,3\%$ - разрушенных клеток печени. Разделили на десять вакутейнеров, с равным количеством клеточного материала, и добавили глицерин, в соотношении 10:1, и в 4 этапа низкотемпературно замораживали (I-этап. Охлаждение взвеси до $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. II-этап. Замораживание до -25°C со скоростью $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (1 час). III-этап. Экспозиция 30 минут при $t = -25^{\circ}\text{C}$. IV этап. Замораживание до -85°C со скоростью $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (2 часа)). Процесс размораживания проходил при одинаковых условиях в водяной бане Jouan при $t = +37^{\circ}\text{C}$, в течение 15 минут, отмыванием осмотическим буфером 1 моль/литр раствора глюкозы. Первые пять вакутейнеров были разморожены с периодичностью 5 суток, последние пять с интервалом 3 месяца. После размораживания, все вакутейнеры с взвесью фетальных гепатоцитов были исследованы на жизнеспособность. Результаты проведённого эксперимента представлены на таблице 6.

Таблица 6. Оценка жизнеспособности фетальных гепатоцитов при длительной криоконсервации.

	Состояние	Живые (целые)	Голоядерные	Разрушенные
Длительность замораживания	Изначально	$91,7 \pm 1,3^*$	$4,7 \pm 0,3^*$	$3,7 \pm 0,3^*$
	5 сут.	$86,0 \pm 1,0^*$	$6,3 \pm 1,3^*$	$7,7 \pm 1,7$
	10 сут.	$86,7 \pm 1,7$	$6,3 \pm 1,7$	$7,0 \pm 2,0$
	15 сут.	$86,0 \pm 2,0$	$6,0 \pm 1,0^*$	$8,0 \pm 1,0^*$
	20 сут.	$86,3 \pm 1,7$	$5,7 \pm 1,7$	$8,0 \pm 2,0$
	25 сут.	$86,7 \pm 1,7$	$5,3 \pm 1,3^*$	$8,0 \pm 1,0^*$
	1 мес.	$86,0 \pm 2,0$	$5,7 \pm 0,7$	$8,3 \pm 2,7$
	3 мес.	$85,3 \pm 1,7$	$5,7 \pm 1,3^*$	$9,0 \pm 2,0$
	6 мес.	$85,7 \pm 0,3^*$	$5,7 \pm 0,3^*$	$9,3 \pm 1,7$
	9 мес.	$86,3 \pm 0,7$	$5,7 \pm 1,7$	$8,0 \pm 2,0$
	12 мес.	$85,7 \pm 1,3^*$	$5,7 \pm 1,3^*$	$8,7 \pm 2,3$

* Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

По результатам первой группы вакутейнеров, замороженных на периоды: 5, 10, 15, 20, 25 суток, зафиксирован высокий стабильный уровень выживаемости клеточного материала.

В связи с этим, было решено увеличить интервал размораживания следующей пятёрки до 3х месяцев. Данный факт был обусловлен стабильным уровнем выживаемости в предыдущих пробах и экономией клеточного материала. Клеточный материал, полученный от одного фетуса, возможно было разделить лишь на 10 равных частей, с объёмом достаточным для проводимых исследований, что требовалось для чистоты эксперимента. Поэтапное размораживание последних пяти порций клеточной взвеси показало аналогичную картину выживаемости со средним показателем равным 85-86 % во всех вакутейнерах.

Исходя из данных результатов проведённого исследования, следует заключить, что разработанный протокол длительной криопрезервации в комбинации криопротективным действием глицерина и оптимальным методом замораживания (взвесью фетальных печёночных клеток) является эффективным инструментом, позволяющим поддерживать жизнеспособность фетальных гепатоцитов на протяжении длительного периода времени (как минимум в течение 1 года), благодаря чему созданы предпосылки для формирования банка печёночных ФКЧ в Казахстане.

3.2 Оценка клинической эффективности трансплантации криоконсервированных фетальных гепатоцитов человека.

До начала исследований была отобрана контрольная группа больных, состоявшая из 20 пациентов (контрольная группа 1), страдающих циррозом печени и получавших только консервативное лечение. Трансплантация свежеизолированных фетальных гепатоцитов была использована в лечении 20 пациентов с циррозом печени, которые составили контрольную группу 2. Трансплантация криоконсервированных фетальных гепатоцитов проведена у 20 пациентов, составивших исследуемую группу. До проведения аллофетотрансплантации общее состояние больных оценивалось как средней и тяжелой степени тяжести. Вне зависимости от способа введения трансплантата все больные удовлетворительно перенесли операцию и анестезиологическое пособие. Как представлено в таблицах 7, 8, 9, из клинических синдромов у всех обследованных пациентов до какого-либо лечения преобладали: астеновегетативный, диспепсический, гепатолиенальный, синдром портальной гипертензии и болевой.

В контрольной группе 1 (таблица 7), на фоне проводимой консервативной терапии, на 5 сутки фиксировалось снижение проявления всех синдромов в среднем до 5%, в то время как у пациентов перенесших трансплантацию как свежеизолированных, так и криопрезервированных фетальных гепатоцитов, наблюдалось достоверное снижение показателей в среднем на 8-10%.

При оценке динамики показателей через 3 месяца в контрольной группе 1 наблюдалось снижение проявления астеновегетативного, диспепсического, энтероколитического, болевого, гепатолиенального синдромов и лихорадочного состояния в среднем на 10 % от изначальных показателей, с неизменным уровнем активности проявления «малых» печёночных признаков и геморрагического синдрома, причём процент выявления синдрома портальной гипертензии увеличился на 10 %. В контрольной группе 2 (таблица 8) и исследуемой группе отмечалась положительная динамика по всем показателям, уменьшение проявления синдромов в среднем в два раза, при незначительном отставании в случае трансплантации криопрезервированными клетками.

Таблица 7. Частота клинических синдромов у больных с циррозом печени, получавших только консервативное лечение (контрольная группа 1)

№	Синдромы хронических диффузных заболеваний печени	Цирроз печени					
		до АФТГ (n-20)		после АФТГ			
				5 дней (n-20)		3 месяца (n-10)	
		абс.	(%)	абс.	(%)	абс.	(%)
1	Астеновегетативный	14	70	13	65	6	60
2	Диспепсический	10	50	9	45	4	40
3	Энтероколитический	4	20	3	15	1	10
4	Болевой	9	45	7	35	3	30
5	Геморрагический	3	15	2	10	1	10
6	Желтуха	7	35	6	30	2	20
7	Гепатолиенальный	12	60	11	5	5	50
8	«малые» печеночные признаки	5	25	4	20	2	20
9	Портальная гипертензия	8	40	8	40	5	50
10	Лихорадка	5	25	3	1	1	10

Таблица 8. Частота клинических синдромов у больных с циррозом печени до и после аллотрансплантации свежеизолированных гепатоцитов (АФТСГ) (контрольная группа2)

№	Синдромы хронических диффузных заболеваний печени	Цирроз печени					
		До АФТСГ (n-20)		после АФТСГ			
				5 дней (n-20)		3 месяца (n-12)	
		абс.	(%)	абс.	(%)	абс.	(%)
1	Астеновегетативный	13	65	8	40	4	33,3
2	Диспепсический	11	55	7	35	3	25
3	Энтероколитический	3	15	2	10	1	8,3
4	Болевой	10	50	7	35	2	16,7

5	Геморрагический	3	15	2	10	1	8,3
6	Желтуха	6	30	4	20	2	16,7
7	Гепатолиенальный	14	70	12	60	5	41,7
8	«малые» печеночные признаки	4	20	3	15	1	8,3
9	Портальная гипертензия	9	45	8	40	3	25
10	Лихорадка	4	20	3	15	1	8.3

*Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

Таблица 9. Частота клинических синдромов у больных с циррозом печени до и после аллофетотрансплантации криопрезервированных гепатоцитов (АФТКГ) (исследуемая группа)

№	Синдромы хронических диффузных заболеваний печени	Цирроз печени					
		До		после АФТКГ			
		АФТКГ (n-20)		5 дней (n-20)		3 месяца (n-12)	
		абс.	(%)	абс.	(%)	абс.	(%)
1	Астеновегетативный	11	55	9	45	4	33,3
2	Диспепсический	13	65	8	40	4	33,3
3	Энтероколитический	5	25	4	20	2	16,7
4	Болевой	7	35	6	30	2	16,7
5	Геморрагический	5	25	4	20	1	8,3
6	Желтуха	7	35	6	30	2	16,7
7	Гепатолиенальный	12	60	11	55	3	25
8	«малые» печеночные	5	25	4	20	1	8,3
9	портальная гипертензия	13	65	11	55	3	25
10	Лихорадка	5	25	4	20	2	16,7

*Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

В аналогичных группах провели динамическое измерение биохимических показателей с момента первоначального поступления в стационар, через пять дней после лечения и через три месяца. Полученные данные отражены в таблицах 10, 11, 12.

В контрольной группе 1 на 5 сутки фиксировалось снижение аланинаминотрансферазы (АлАТ) в среднем на 17,6%, аспартатаминотрансферазы (АсАТ) на 7%, общего билирубина на 11,6%, прямого на 8,5%, мочевины на 15,8%, глюкозы на 20,9%, повышением уровня альбумина на 27,2% и фактически неизменной величиной протромбинового времени. Практически у всех больных данной группы в схему лечения входило переливание белковых препаратов.

На 5 сутки в контрольной группе 2 отмечено улучшение практически всех изученных показателей. Так, в среднем на 30,7 % снизился уровень АлАТ при одновременном снижении АсАТ на 16%, что указывает на уменьшение проявлений синдрома цитолиза. Кроме того, выявлено повышение уровня альбумина крови на 31,8. Данный факт свидетельствует о том, что уже в ранние посттрансплантационные сроки выявляется тенденция к нормализации функциональных свойств клеток печени реципиента. Кроме того, происходит регресс проявлений синдрома холестаза, на что указывает достоверное снижение общего билирубина на 25,8%. В случае с исследуемой группой, уровень АлАТ снизился на 29,4 %, АлАТ на 14%, общего билирубина на 22,78 %, мочевины на 18,1 %, глюкозы на 22,9 %, с одновременным повышением альбумина до 20,52 %.

Таблица 10. Биохимические показатели у больных с циррозом печени, получавших консервативное лечение (контрольная группа 1)

№	Показатели	Норма	Изначально M±m (n=20)	3-5 сутки M±m (n=20)	через 3 мес. M±m (n=10)
1	АлАТ	0,1-0,68 мкмоль/л	1,19±0,05*	0,98±0,06*	0,83±0,02*
2	АсАТ	0,1-0,45 мкмоль/л	0,71±0,02*	0,66±0,07*	0,69±0,03*
3	Щелочная фосфатаза	10-60 ед/л	108,0±5,3	87,9±4,4	85,9±2,1
4	общий белок	60-80 г/л	48,4±2,91	78,9±2,51	72,6±2,37
5	Альбумин	31,8-53,3 г/л	24,8±2,39	34,1±1,44	49,4±2,61
6	γ-глобулин	7,2-18,0 г/л	31,4±2,14	24,4±2,37	20,1±2,27
7	общий билирубин	8,5-20,5 мкмоль/л	29,2±2,19	25,8±2,63	23,1±1,91
8	прямой билирубин	25% от общего	9,4±1,2*	8,6±0,73*	7,4±0,93*
9	Мочевина	2,5-8,3 мкмоль/л	10,9±0,52*	9,17±0,38*	8,9±0,4*
10	протромб. Индекс	80-100%	41,3±4,61	42,6±4,37	42,4±3,18
11	Глюкоза	4,4-6,6 ммоль/л	8,6±0,71*	6,8±0,91*	6,9±0,87*

*Различия достоверны по сравнению с исходными данными p<0,05

Таблица 11. Биохимические показатели у больных с циррозом печени до и после аллофетотрансплантации свежеизолированных гепатоцитов (контрольная группа 2)

№	Показатели	Норма	изначально M±m (n=20)	3-5 сутки M±m (n=20)	через 3 мес. M±m (n=10)
1	АлАТ	0,1-0,68 мкмоль/л	1,17±0,06*	0,81±0,06*	0,48±0,04*
2	АсАТ	0,1-0,45 мкмоль/л	0,67±0,02*	0,56±0,04*	0,23±0,02*
3	щелочная фосфатаза	10-60 ед/л	102,0±8,5	81,5±3,6	48,5±2,5
4	общий белок	60-80 г/л	48,4±2,91	75,2±2,45	77,7±2,35
5	Альбумин	31,8-53,3 г/л	23,1±2,23	34,8±1,48	51,4±2,21

6	Г-глобулин	7,2-18,0 г/л	30,4±2,15	24,7±2,53	19,1±2,22
7	Общий билирубин	8,5-20,5 мкмоль/л	29,1±2,12	21,8±2,65	12,6±1,71
8	прямой билирубин	25% от общего	9,3±1,25*	7,8±0,91*	3,6±0,73*
9	Мочевина	2,5-8,3 мкмоль/л	11,6±0,62*	9,05±0,35*	8,6±0,25*
10	протромб. Индекс	80-100%	42,2±3,65	43,6±4,77	71,4±3,48
11	Глюкоза	4,4-6,6 ммоль/л	8,9±0,41*	6,7±0,41*	6,5±0,97*

*Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

Через три месяца, в контрольной группе 1 наблюдался незначительный положительный сдвиг показателей, не достигнувших нормы (таблица 10).

В аналогичный период в контрольной группе 2 практически все изученные показатели достоверно приближались или соответствовали норме. Так средняя концентрация АЛАТ снизилась до $0,48 \pm 0,04$ мкмоль/л (при исходной $1,17 \pm 0,06$ мкмоль/л), а уровень АсАТ с $0,67 \pm 0,02$ мкмоль/л до $0,23 \pm 0,02$ мкмоль/л.

Таблица 12. Биохимические показатели у больных с циррозом печени до и после аллофетотрансплантации криопрезервированных гепатоцитов (исследуемая группа)

№	Показатели	Норма	Изначально M±m (n=20)	3-5 сутки M±m (n=20)	через 3 мес. M±m (n=10)
1	АЛАТ	0,1-0,68 мкмоль/л	1,19±0,06*	0,84±0,06*	0,50±0,02*
2	АсАТ	0,1-0,45 мкмоль/л	0,64±0,02*	0,55±0,04*	0,21±0,02*
3	Щелочная фосфатаза	10-60 ед/л	111,0±8,3	75,8±5,6	47,9±2,8
4	общий белок	60-80 г/л	50,2±2,31	71,2±2,41	73,6±2,37
5	Альбумин	31,8-53,3 г/л	27,1±2,83	34,1±1,48	49,4±2,61
6	Г-глобулин	7,2-18,0 г/л	30,3±2,19	24,4±2,43	20,1±2,27
7	общий билирубин	8,5-20,5 мкмоль/л	29,4±2,17	22,7±2,66	13,8±1,91
8	прямой билирубин	25% от общего	9,2±1,3*	7,6±0,93*	3,9±0,93*
9	Мочевина	2,5-8,3 мкмоль/л	11,2±0,65*	9,17±0,38*	8,7±0,4*
10	протромб. Индекс	80-100%	39,2±5,68	40,6±4,77	69,4±3,18
11	Глюкоза	4,4-6,6 ммоль/л	8,7±0,61*	6,7±0,91*	6,6±0,87*

*Различия достоверны по сравнению с исходными данными $p < 0,05$

Данный факт указывает на исчезновение проявлений синдрома цитолиза. Кроме того, практически исчезают явления печеночно-клеточной недостаточности, о чем свидетельствует стабильная нормализация содержания альбуминов сыворотки крови, протромбинового индекса и функциональных проб печени на протяжении данного периода

наблюдения. Общий билирубин снизился в среднем до $12,6 \pm 1,71$ мкмоль/л по сравнению с исходным уровнем $29,1 \pm 2,12$ мкмоль/л.

У исследуемой группы все изученные биохимические показатели соответствовали норме. Так средняя концентрация АЛАТ составила $0,50 \pm 0,02$ мкмоль/л, а уровень АсАТ $0,21 \pm 0,02$ мкмоль/л. Кроме того, не выявляются признаки печеночно-клеточной недостаточности. Общий билирубин составил в среднем $13,8 \pm 1,91$ мкмоль/л, а прямой $3,9 \pm 0,93$ мкмоль/л.

У большинства пациентов проводили забор биопсийного материала как до, так и после трансплантации.

На примере частного случая нами изучены зафиксированные морфологические изменения в печени больного, 52 лет с диагнозом цирроз печени в стадии декомпенсации, причиной которого явился вирусный гепатит «С» после проведённой фетально-клеточной трансплантации.

До фетальной трансплантации морфологические изменения в печени больного характеризовались формированием цирроза печени мультимонолобулярного типа (рисунок 18).

При микроскопическом исследовании сформированы ложные дольки. Повреждение паренхимы печени проявлялось в виде выраженной диффузной крупно-, средне- и мелкокапельной жировой дистрофии гепатоцитов, а также очагово-гидропической белковой. Наряду с дистрофическими процессами гепатоцитов наблюдалась воспалительная клеточная реакция из лимфоцитов и нейтрофильных лейкоцитов в портальных трактах и септах. Звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов в капилляризированных синусоидах мало и они не активны.

Спустя 3 месяца после фетальной трансплантации гепатоцитов в цирротическую печень провели повторное взятие биопсии из сегмента печени, в который была произведена подсадка клеток. По результатам гистологического исследования, у больного наблюдалось значительное уменьшение количества гепатоцитов в состоянии жировой дистрофии, особенно крупно- и средне капельной, уменьшение количества гепатоцитов в состоянии гидропической белковой дистрофии, увеличение печёночных клеток с сохранной структурой (рисунок 19).

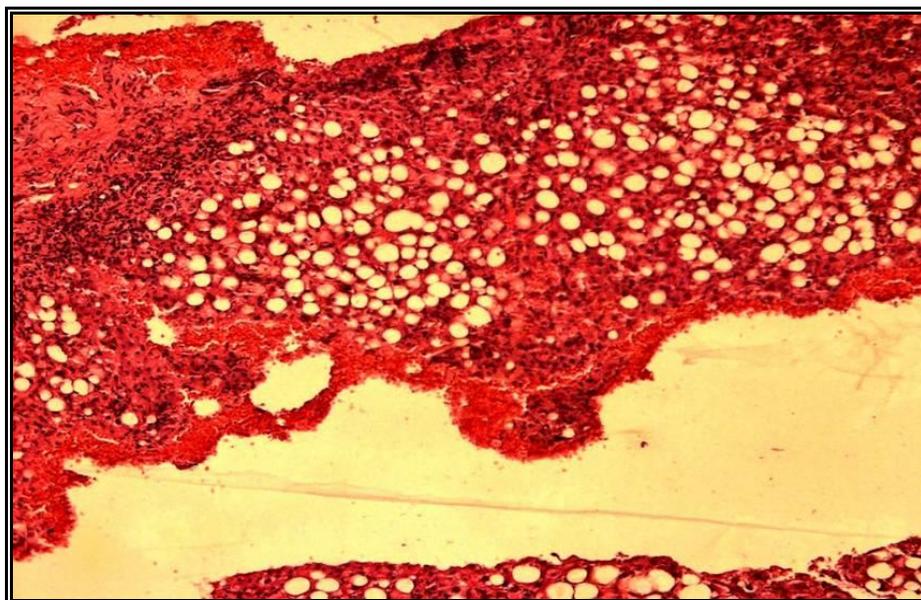


Рисунок 19. Микроскопическая картина формирующегося мультимнолобулярного цирроза печени.

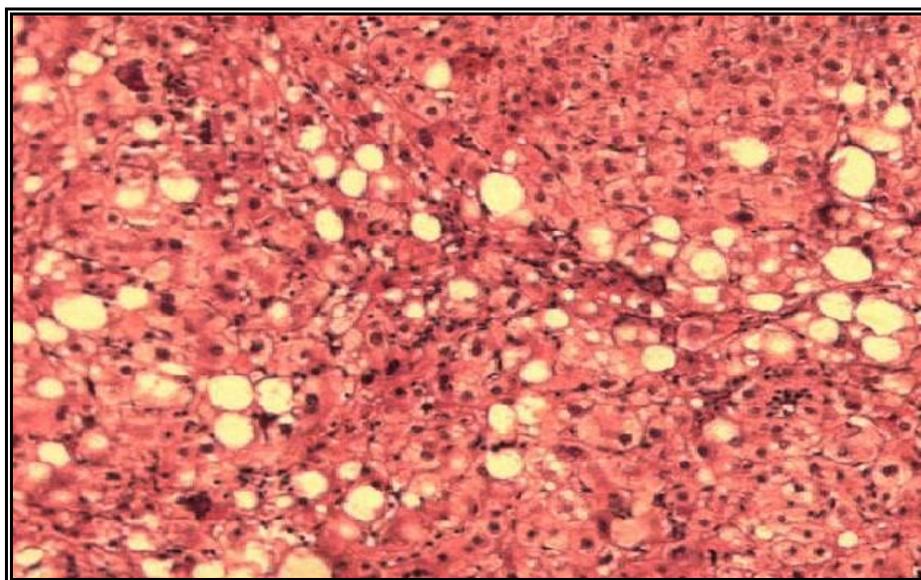


Рисунок 20. Картина выраженного репаративного процесса: увеличение количества гипертрофированных гепатоцитов, двуядерных клеток, делящихся, в ядрах многих гепатоцитов преобладает диффузный хроматин.

Отмечался выраженный репаративный процесс: увеличение количества гипертрофированных гепатоцитов, двуядерных клеток, в ядрах многих гепатоцитов преобладал диффузный хроматин. По периферии ложных и истинных печёночных долек определялись гепатоциты с малыми размерами, с хорошо окрашиваемым ядром и цитоплазмой. Наблюдалось повышение макрофагальной активности за счёт увеличения количества звездчатых ретикулоэндотелиоцитов. Но вместе с тем, сохранилась активность

клеточных элементов. Проведенный сравнительный морфологический анализ показал, что наблюдалась положительная динамика структурных изменений в ткани печени, которая выражалась в уменьшении количества дистрофированных гепатоцитов и увеличении печёночных клеток с сохранной структурой. Положительная динамика проявлялась также в усилении пролиферативной активности гепатоцитов, увеличении количества фагоцитирующих макрофагов. Пролиферативная активность гепатоцитов прямо коррелировала с количеством фагоцитирующих макрофагов.

В одном случае, после трансплантации криопрезервированных фетальных печёночных клеток, у пациента с диагнозом: смешанный цирроз печени в исходе вирусного гепатита «В», стадия декомпенсации, наблюдалось образование дополнительного субсегмента печени.

По данным гистологического исследования, в новом субсегменте печени морфологическая картина соответствовала репаративной регенерации печени за счет активно делящихся фетальных гепатоцитов. В препаратах самой печени определялись выраженные дистрофические изменения гепатоцитов, разрастание фиброзной ткани с множеством ложных долек, дистрофия эпителия дуктул; расстройство кровообращения в виде стазов, тромбоза и кровоизлияний, усиленная пролиферация ретикулоэндотелиоцитов (положительная динамика), с заключением: смешанный цирроз печени. Проведенное гистологическое исследование биоптатов печени больных циррозом печени показало в динамике наличие позитивных морфологических изменений после трансплантации как свежеизолированных, так и криопрезервированных фетальных клеток печени в течение трех месяцев с момента операции.

3.3 Оценка лабораторных показателей после ТФГ у больных ЦП в зависимости от класса по Чайльд-Пью

3.3.1 Динамика показателей общего билирубина после ТФГ

В наших исследованиях у всех 90 больных проводилось исследование уровня общего билирубина. В исследуемой группе (n=26) наблюдалось повышение исходных цифр общего билирубина до $104,88 \pm 54,82$ мкмоль/л, в контрольной (n=64) до $80,43 \pm 67,39$ мкмоль/л. Через 2 недели показатели без достоверных изменений: в исследуемой группе $81,15 \pm 62,89$ мккат/л, в контрольной $90,88 \pm 74,46$ мккат/л. Через 3 месяца уровень общего билирубина также без достоверных изменений: в исследуемой группе $47,31 \pm 31,43$ мккат/л, в контрольной $59,19 \pm 44,11$ мккат/л. Через 6 месяцев у больных исследуемой группы наблюдалось значительное снижение уровня общего билирубина до $27,04 \pm 16,9$ мккат/л, достоверность различий по сравнению с контрольной группой $p_1 < 0,001$, с исходными данными $p_2 < 0,05$; в

контрольной группе показатели без достоверных изменений $74,62 \pm 56,89$ мкмоль/л. Что позволяло определить показатель общего билирубина как предиктор эффективности через 6 месяцев после проведения трансплантации фетальных гепатоцитов.

Согласно классификации Чайлд – Пью больные распределены по уровню билирубина на 3 группы (таблица 13): группа «А» < 34 мкмоль/л (<2,0 мг %), группа «В» - 34- 51 мкмоль/л (2-3 мг %), группа «С» >51 мкмоль/л (>3 мг %).

Таблица 13. Распределение больных ЦП по уровню общего билирубина (по Чайлд-Пью)

Уровень билирубина, Мкмоль/л (мг %)	Контрольная группа n=64		Исследуемая группа n=26	
	Абсол. Число	%	Абсол. число	%
<34 мкмоль/л (< 2,0 мг %)	24	37,5	9	34,61
34-51 мкмоль/л (2-3 мг %)	6	9,35	3	11,53
>51 мкмоль/л (>3 мг %)	34	53,125	14	53,84

При распределении по уровню общего билирубина в исследуемой и контрольной группах выявлен большой процент больных с показателем > 51 мкмоль/л – более 53 % в обеих группах, что соответствует классу «С» по Чайлд–Пью. По уровню общего билирубина (по Чайлд-Пью) больные исследуемой группы (n=26) разделены на 12 подгрупп и изучена достоверность изменений показателей в сравнительном аспекте после проведения ТФГ (таблица 14).

Таблица 14. Динамика показателей общего билирубина в зависимости от его уровня (по Чайлд-Пью) у исследуемой группы больных после ТФГ

Показатель общего билирубина, мкмоль/л							
<34 мкмоль/л (< 2,0 мг %)				34-51 мкмоль/л (2-3 мг %)			
До ТФГ	ч/з 2 нед	ч/з 3 мес	ч/з 6 мес	До ТФГ	ч/з 2 нед	ч/з 3 мес	ч/з 6 мес
18,83±5,6	16,75±5,8	17,46±4,8	16,51±4,5	42,0±5,2	29,66±6,1	18,58±6,1	17,58±5,4

В группе «А» исходные показатели общего билирубина через 2 недели, 3 и 6 месяцев после проведения ТФГ без достоверных изменений.

В группе «В» исходный уровень общего билирубина достоверно отличается от показателей 1-4 подгрупп группы «А». Через 2 недели после ТФГ отмечалось достоверное снижение показателя общего билирубина по сравнению с исходными данными, а также с 1-4

подгруппами группы «А». Через 3 месяца сохраняется достоверное снижение общего билирубина по сравнению с исходными показателями и 6 подгруппой группы «В». Через 6 месяцев наблюдалась стабилизация показателя общего билирубина с достоверной разницей с исходным уровнем и 6 подгруппой группы «В».

В группе «С» исходные показатели достоверно отличались от уровня общего билирубина всех предыдущих подгрупп. Через 2 недели не выявлено достоверной динамики с исходными показателями, но наблюдалась достоверная разница с уровнем общего билирубина в сравнении с 1-8 подгруппами групп «А» и «В». Через 3 месяца показатели были достоверно отличны от исходных данных группы «С», а также от показателей 1-8 подгрупп групп «А» и «В». Через 6 месяцев после фетальной трансплантации в группе «С» наблюдалось значительное достоверное снижение показателей общего билирубина по сравнению с исходными данными; с уровнем общего билирубина через 2 недели и 3 месяца после ТФГ группы «С», а также со всеми подгруппами группы «А» и 7-8 подгруппой группы «В».

Таким образом, показатель общего билирубина в группе «А» (< 34 мкмоль/л) достоверно не меняется после проведения ТФГ и не может служить предиктором эффективности.

При уровне от 34 до 51 мкмоль/л (группа «В») достоверная положительная динамика уже через 2 недели после ТФГ с продолжающимся достоверным снижением в течение 3-х месяцев и стабилизацией на протяжении 6-ти месяцев, т.е. показатель общего билирубина с повышением от 34 до 51 мкмоль/л может являться критерием эффективности ТФГ.

При уровне общего билирубина > 51 мкмоль/л (группа «С») эффект от фетальной трансплантации, с достоверным снижением его, лишь через 3 месяца, с продолжающимся достоверным снижением на протяжении 6-ти месяцев. Таким образом, при повышении > 51 мкмоль/л через 3 месяца после ТФГ показатель общего билирубина можно рассматривать в качестве критерия эффективности ТФГ.

3.3.2 Динамика показателей АЛаТ после ТФГ

В наших исследованиях у всех 90 больных определяли уровень АЛаТ. До проведения фетальной трансплантации наблюдалось повышение показателей АЛаТ в исследуемой группе до $2,38 \pm 0,95$ мккат/л, в контрольной до $1,87 \pm 1,30$ мккат/л. Через 2 недели показатели без достоверных изменений в исследуемой группе $1,78 \pm 0,70$ мккат/л, в контрольной $1,39 \pm 1,22$ мккат/л. Через 3 месяца отмечалось достоверное уменьшение уровня АЛаТ в исследуемой группе до $1,235 \pm 0,48$ мккат/л по сравнению с исходными показателями и контрольной группой ($p_1 < 0,05, p^2 < 0,05$), в контрольной группе показатели без достоверных

изменений $2,02 \pm 1,31$ мккат/л. Через 6 месяцев наблюдалась нормализация показателя АЛаТ в исследуемой группе – снижение до $0,62 \pm 0,25$ мккат/л при сравнении с исходными данными и контрольной группой ($p_1 < 0,001$, $p^2 < 0,001$); в контрольной группе без достоверных изменений $1,57 \pm 1,0$ мккат/л.

Таким образом, выявлено достоверное уменьшение показателя АЛаТ через 3 месяца и нормализация через 6 месяцев после проведения ТФГ. Показатель АЛаТ можно рассматривать в качестве критерия эффективности ТФГ.

Обе группы были разделены по уровню АЛаТ: с повышением до 2-х норм - минимальная степень активности, от 2-х до 10-ти норм – умеренная степень активности и выше 10 норм – высокая степень активности (таблица 15).

Таблица 15. Распределение больных ЦП по уровню АЛаТ

Уровень АЛаТ, мккат/л	Контрольная группа N=64		Исследуемая группа N=26	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
До 2-х норм	30	46,87	12	46,15
От 2-х до 10 норм	34	53,125	14	53,84
> 10 норм	0	-	0	-

В обеих группах преобладали больные с уровнем АЛаТ от 2-х до 10-ти норм: 53,125% исследуемой группы и 53,84% контрольной группы. Среди 90 обследованных больных циррозом печени не выявлено повышения АЛаТ более 10 норм.

По уровню АЛаТ больные исследуемой группы были разделены на 8 подгрупп и изучен сравнительный анализ между ними. Данные представлены в таблице 16.

Таблица 16. Динамика в зависимости от уровня АЛТ в 8 подгруппах исследуемой группы больных (после ТФГ)

АЛТ до 2-х норм, мккат/л				АЛТ от 2 до 10 норм, мккат/л			
До ТФГ	Через 2 недели после ТФГ	Через 3 мес после ТФГ	Через 6 мес после ТФГ	До ТФГ	Через 2 недели после ТФГ	Через 3 мес после ТФГ	Через 6 мес после ТФГ
$0,2 \pm 0,56$	$0,2 \pm 0,6$	$0,67 \pm 0,2$	$0,67 \pm 0,25$	$2,33 \pm 0,9$	$1,733 \pm 0,7$	$0,933 \pm 0,45$	$0,147 \pm 0,38$

При анализе показателей в группе с повышением АЛТ до 2-х норм достоверных изменений через 2 недели, 3 и 6 месяцев не выявлено.

При повышении АЛТ от 2 до 10 норм исходный показатель достоверно отличался от показателей 1-4 подгрупп. Через 2 недели после фетальной трансплантации наблюдалось достоверное уменьшение по сравнению с исходными данными и отмечалось достоверное различие от 1-4 подгрупп. Через 3 месяца также наблюдалось достоверное уменьшение по сравнению с исходными данными и показателями 1-4 и 6 подгрупп. Через 6 месяцев после фетальной трансплантации (подгруппа 8) выявлено достоверное снижение АЛТ по сравнению с исходными данными; а также с подгруппами 6-7.

Таким образом, при повышении АЛТ до 2-х норм не выявлено достоверных изменений, т.е. при минимальной степени активности АЛТ не может служить предиктором эффективности ТФГ.

При повышении АЛТ от 2 до 10 норм уже через 2 недели отмечалось достоверное снижение, продолжавшееся на протяжении 3 и 6 месяцев; т.е. при умеренной степени активности показатель АЛТ может служить критерием эффективности ТФГ.

3.3.3 Динамика показателя ГГТП после ТФГ

В наших наблюдениях ГГТП повышено в 77,7 %. Исходные показатели ГГТП до проведения ТФГ в исследуемой группе были повышены до $3,5 \pm 2,9$ мккат/л, в контрольной группе до $3,89 \pm 1,29$ мккат/л; через 2 недели уровень без достоверных изменений в исследуемой группе $2,65 \pm 1,41$ мккат/л, в контрольной $4,12 \pm 2,36$ мккат/л. Через 3 месяца сохранялось повышение уровня ГГТП до $4,077 \pm 2,84$ мккат/л в контрольной группе и достоверное снижение в исследуемой группе до $2,0 \pm 0,71$ мккат/л по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). Через 6 месяцев в контрольной группе сохранялось повышение ГГТП до $4,42 \pm 3,48$ мккат/л, тогда как в исследуемой группе отмечалось достоверное снижение до $0,99 \pm 1,19$ мккат/л по сравнению с контрольной группой и исходными данными ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$). Таким образом, показатель ГГТП можно рассматривать в качестве предиктора эффективности через 3 и 6 месяцев после проведения ТФГ.

3.3.4 Динамика показателя ЩФ после ТФГ

Как в исследуемой ($n=26$), так и в контрольной группах ($n=6$) исходно отмечалось повышение показателя щелочной фосфатазы более 5,0 мккат/л: соответственно $5,6 \pm 2,8$ мккат/л и $5,16 \pm 2,4$ мккат/л. Через 2 недели показатели без достоверных изменений: в исследуемой группе $4,9 \pm 2,9$ мккат/л, в контрольной $5,0 \pm 2,2$ мккат/л. Через 3 и 6 месяцев также не отмечалось достоверных изменений показателей: в исследуемой группе

соответственно $3,75 \pm 1,0$ мккат/л и $4,08 \pm 2,3$ мккат/л; в контрольной $4,75 \pm 1,7$ мккат/л и $4,9 \pm 2,3$ мккат/л. Таким образом, показатель щелочной фосфатазы при ЦП не может служить предиктором эффективности на протяжении 6-ти месяцев после проведения ТФГ.

3.3.5 Динамика показателя сывороточного альбумина после ТФГ

В наших исследованиях у всех 90 больных исследовали уровень сывороточного альбумина. Исходно отмечалось снижение уровня сывороточного альбумина в исследуемой группе до $30,69 \pm 6,24$ г/л, в контрольной до $29,38 \pm 9,54$ г/л. Через 2 недели после проведения ТФГ в контрольной группе сохранялся низкий уровень сывороточного альбумина $28,92 \pm 9,0$ г/л, тогда как в исследуемой группе уже через 2 недели отмечалось достоверное повышение по сравнению с контрольной группой до $34,38 \pm 8,48$ г/л ($p_1 < 0,05$). Через три месяца в исследуемой группе наблюдалось достоверное повышение по сравнению с контрольной группой и исходными показателями до $38,34 \pm 8,68$ ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,05$), тогда как в контрольной группе сохранялся низкий уровень альбумина $26,5 \pm 7,0$ г/л. Через 6 месяцев после проведения ТФГ отмечалось достоверное повышение показателя сывороточного альбумина по сравнению с контрольной группой и исходными данными до $42,35 \pm 10,19$ г/л ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,01$). В контрольной группе сохранялось снижение показателя сывороточного альбумина до $27,5 \pm 7,44$ г/л. Таким образом, показатель сывороточного альбумина можно рассматривать в качестве предиктора эффективности через 2 недели и на протяжении 3 и 6 месяцев после ТФГ.

Согласно классификации Чайлд-Пью пациенты разделены по уровню альбумина: группа «D» с уровнем альбумина >35 г/л; группа «F» с показателем от 28-35 г/л; группа «G» <28 г/л (таблица 17).

Таблица 17. Распределение больных ЦП по уровню альбумина (по Чайлд-Пью)

Уровень альбумина, г/л (мг/л)	Контрольная группа N=64		Исследуемая группа N=26	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
>35 г/л ($> 3,5$ мг/л)	16	25,0	6	23
28-35 г/л (2,8-3,5 мг/л)	26	40,62	10	38,46
< 28 г/л ($< 2,8$ мг/л)	22	34,37	10	38,46

В 75,55 % выявлено снижение показателя альбумина сыворотки <35 г/л, в 74,99 % исследуемой группы и в 76,92 % контрольной группы. Распределение больных в зависимости от уровня сывороточного альбумина свидетельствует о преобладании низкого уровня: <35 г/л, что соответствует классам «B» и «C» по Чайлд-Пью. По уровню

сывороточного альбумина (по Чайлд-Пью) больные разделены на 12 подгрупп и изучена динамика показателей после ТФГ в сравнительном аспекте (таблица 18).

Таблица 18. Динамика показателя сывороточного альбумина в зависимости от его уровня (по Чайлд-Пью) в сравнительном аспекте (в 12 подгруппах) после проведения ТФГ

Группа «G» < 28г/л (< 2,8 мг/л)				Группа «F» 28-35г/л (2,8-3,5 мг/л)	
До ТФГ	Через 2 нед	Через 3 мес	Через 6 мес	До ТФГ	Через 2 нед
21,41±3,9	27,33±8,2	33,75±7,3	35,41±9,6	30,58±2,4	33,55±3,5

Анализируя динамику сывороточного альбумина в зависимости от уровня по Чайлд – Пью, выявлено снижение исходных показателей в группе «G». Через 2 недели и 3 месяца после проведения ТФГ отмечалось достоверное повышение по сравнению с исходными данными. Через 6 месяцев выявлено достоверное повышение по сравнению с исходными и показателями подгруппы 2, что позволяет рассматривать показатель сывороточного альбумина группы «G» через 2 недели, 3 и 6 месяцев в качестве предиктора эффективности ТФГ.

В группе «F» исходный показатель достоверно различался с исходными данными группы «G». Через 2 недели наблюдалось достоверное повышение по сравнению с исходными и показателями подгрупп 1-2 группы «G». Через 3 и 6 месяцев уровень сывороточного альбумина также достоверно различался с исходными показателями, подгруппами 1-2 группы «G», т.е. показатель сывороточного альбумина группы «F» уже через 2 недели и на протяжении 3-6 месяцев можно рассматривать в качестве критерия эффективности ТФГ.

Исходный показатель в группе «D» отличался достоверно с 1-6 подгруппами групп «G» и «F». Через 2 недели достоверных изменений по сравнению с исходными данными не отмечалось. Через 3 и 6 месяцев выявлена достоверная разница с исходными показателями. Таким образом, показатель сывороточного альбумина группы «D» можно рассматривать в качестве предиктора эффективности через 2 недели и на протяжении 3 и 6 месяцев после ТФГ.

3.3.6 Динамика ТВ после ТФГ

До проведения ТФГ у пациентов исследуемой группы выявлялось удлинение тромбинового времени до 25,62±6,0 сек., в контрольной группе до 22,15±6,39 сек., через 2 недели после фетальной трансплантации показатели без достоверных изменений: в исследуемой группе 23,11±4,91 сек., в контрольной - 21,96±5,5 сек.. Через три месяца

отмечалось достоверное укорочение по сравнению с исходными показателями в исследуемой группе до $19,69 \pm 4,25$ сек. ($p_2 < 0,001$), тогда как в контрольной группе показатели оставались без достоверных изменений $21,88 \pm 5,55$ сек. Через шесть месяцев наблюдалось достоверное укорочение ТВ в исследуемой группе по сравнению с исходными данными и контрольной группой до $17,80 \pm 2,81$ сек. ($p_1 < 0,001$, $p_2 < 0,001$), в контрольной группе достоверных изменений не выявлено, показатель - $23,61 \pm 6,36$ сек. Больные исследуемой и контрольной групп разделены на III группы по уровню ТВ – с удлинением до 3 сек., до 6 сек. и более 6 сек. - согласно классификации Чайлд-Пью (таблица 19).

Таблица 19. Распределение больных по уровню тромбинового времени (по Чайлд-Пью)

Показатель тромбинового времени (сек)	Контрольная группа n=64		Исследуемая группа n=26	
	Абсолютное число	%	Абсолютное число	%
Удлинение < 3	26	40,6	14	53,84
Удлинение от 4 до 6	15	23,43	1	3,84
Удлинение >6	23	35,93	11	42,3

В 55,4% отмечалось удлинение ТВ > 4 сек, что соответствует классам «В» и «С» по Чайлд-Пью. С учётом показателей ТВ больные разделены на 12 групп и прослежена динамика в сравнительном аспекте после проведения ТФГ. Данные представлены в таблице 20.

Таблица 20. Динамика показателей ТВ в зависимости от уровня удлинения после ТФГ

I – Удлинение < 3 сек.				II - Удлинение > 6 сек		
До ТФГ	через 2 нед	через 3 мес	через 6 мес	До ТФГ	через 2 нед	через 3 мес
$19,8 \pm 4,1$	$18,46 \pm 2,7$	$16,6 \pm 1,8$	$16,13 \pm 1,8$	$29,26 \pm 3,6$	$25,6 \pm 4,4$	$21,73 \pm 4,38$

ТВ в 1 подгруппе I группы $19,8 \pm 4,1$ сек., через 2 недели без достоверных изменений, через 3 месяца наблюдалось достоверное укорочение по сравнению с исходными данными. Через 6 месяцев (4 подгруппа) наблюдалось достоверное укорочение по сравнению с 1 и 2

подгруппами. Во II группе до проведения фетальной трансплантации показатель ТВ достоверно различался от показателей 2,3,4 подгрупп I группы. Через 2 недели после фетальной трансплантации (6 подгруппа) во II группе уровень ТВ достоверно различался от 3,4,5 подгрупп. В 7 подгруппе II группы ТВ достоверно различалось от 3,4 подгрупп I группы, а также от показателей 5 подгруппы II группы.

В 8 (через 6 месяцев) подгруппе показатель ТВ достоверно различался от показателей 3 и 4 подгрупп I группы. Достоверной разницы с исходными данными II группы не выявлено. В 9 подгруппе III группы исходный показатель имел достоверную разницу с 1-8 группами. Через 2 недели после ТФГ в III группе (10 подгруппе) уровень ТВ имел достоверную разницу со всеми 8 подгруппами I и II групп, а также с достоверным укорочением по сравнению с 9 подгруппой III группы. Через 3 месяца в 11 подгруппе ТВ было достоверно различно по сравнению со 2, 3, 4, 7 подгруппами I – II групп, 9 (исходной) и 10 подгруппами III группы. Через 6 месяцев после проведения ТФГ в III группе отмечалось достоверное различие показателей с 3,4,5 подгруппами I – II групп, а также достоверное укорочение по сравнению с исходными показателями 9 подгруппой и 10 подгруппой – уровнем ТВ через 3 месяца после фетальной трансплантации в III группе.

Таким образом, показатель ТВ может служить предиктором эффективности ТФГ. Через 3 и 6 месяцев после проведения фетальной трансплантации при удлинении до 3 сек и уже через 2 недели после ТФГ при удлинении ТВ > 4 сек. выявлено достоверное укорочение ТВ по сравнению с контрольной группой, в которой уровень ТВ достоверно не меняется.

3.3.7 Динамика уровня АФП после ТФГ

Проводилось исследование уровня АФП в обеих группах больных. Показатели АФП не превышали норму как в исследуемой группе (n=26): $5,1 \pm 1,80$ МЕ/мл; так и в контрольной (n=64): $5,0 \pm 1,99$ МЕ/мл. После проведения ТФГ через 2 недели - показатели АФП соответственно $5,2 \pm 2,42$ МЕ/мл и $6,2 \pm 2,1$ МЕ/мл, через 3 месяца - $6,11 \pm 1,92$ МЕ/мл и $7,6 \pm 2,6$ МЕ/мл, т.е. без достоверных изменений.

Через шесть месяцев после проведения ТФГ в исследуемой группе снижение уровня АФП до $4,40 \pm 1,43$ МЕ/мл ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой $6,6 \pm 1,4$ МЕ/мл, хотя показатели не превышали норму (до 10 МЕ/мл). Таким образом, можно сделать вывод о том, что АФП после фетальной трансплантации не превышает нормальных показателей и достоверно снижается к 6-му месяцу после неё, что свидетельствует об отсутствии угрозы малигнизации.

3.4 Оценка эффективности трансплантации ФТ у больных гипотиреозом

Таблица 21. Влияние трансплантации фетальных тиреоцитов на тиреоидный профиль пациентов с гипотиреозом через 1 месяц после трансплантации

Показатели	Гипотиреоз в стадии медикаментозной субкомпенсации	
	До ТФТ n=7	После ТФТ n=7
Тироксин, нмоль/л	40,8±3,08	56,6±7,6 p=0,030
Трийодтиронин, нмоль/л	1,29±0,31	1,50±0,16 p=0,026
ТТГ, мкМЕ/мл	74,4±25,5	64,7±23,9 p=0,039
А-ТПО, МЕ/мл	119,2±102,2	126,4±109 p=0,380

Анализ полученных в динамике данных (таблица 21) показал, что через 1 месяц после введения фетальных тиреоцитов отмечалось статистически значимое увеличение уровня тироксина в крови пациентов с гипотиреозом; так, если до трансплантации содержание тироксина составляло 40,8±3,09 нмоль/л, то после применения клеточной терапии – 56,6±7,6 нмоль/л (p=0,030). Если принять исходные значения гормона за 100%, то прирост содержания тироксина в крови составит в среднем 49,4%. Нормальные значения общего тироксина находятся в пределах от 66,0 до 181,0 нмоль/л. Клеточная терапия оказала позитивное влияние на содержание трийодтиронина, концентрация которого до проведения клеточной терапии была равна 1,29±0,31 нмоль/л, а спустя месяц - 1,50±0,16 нмоль/л (p=0,026), прирост гормона составил в среднем 36,6%. Нормальные значения гормона в крови составляют 1.3-3.1 нмоль/л. Под влиянием клеточной терапии произошло снижение уровня регулирующего гормона гипофиза тиреотропного в среднем на 7%, перед проведением трансплантации уровень ТТГ составил 74,4±25,5 мкМЕ/мл (норма 0.27-4,20 мкМЕ/мл), через 1 месяц наблюдения за пациентами - 64,7±23,9 мкМЕ/мл (p=0,039). Концентрация антител к тиреойодпероксидазе не изменялась у наблюдаемых 7 пациентов. Под влиянием клеточной терапии произошло снижение уровня регулирующего гормона гипофиза тиреотропного в среднем на 7%, перед проведением трансплантации уровень ТТГ составил 74,4±25,5 мкМЕ/мл (норма 0.27-4,20 мкМЕ/мл), через 1 месяц наблюдения за

пациентами - $64,7 \pm 23,9$ мкМЕ/мл ($p=0,039$). Концентрация антител к тиреойодпероксидазе не изменялась у наблюдаемых 7 пациентов.

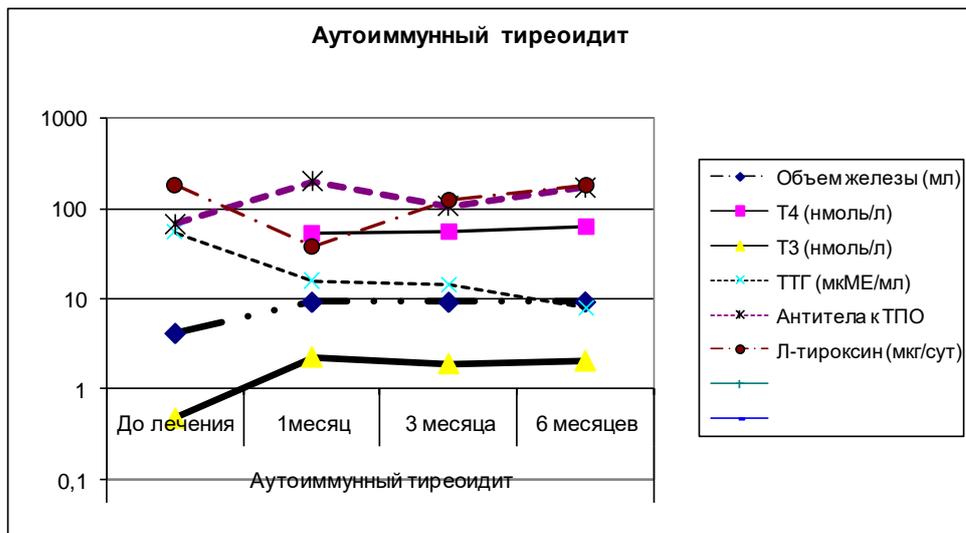


Рисунок 21. Динамика показателей после ТФТ при аутоиммунном тиреоидите

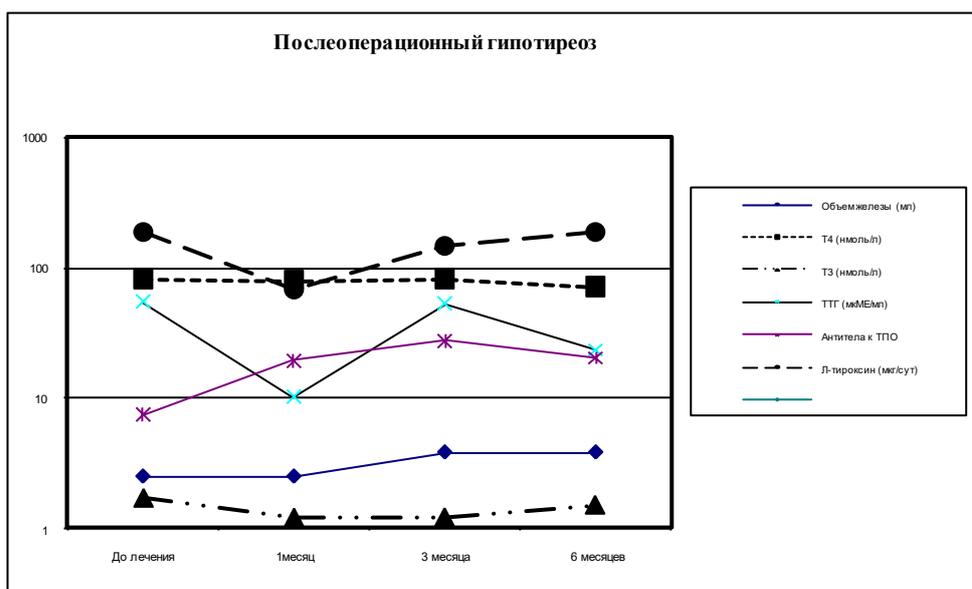


Рисунок 22. Динамика показателей после ТФТ при послеоперационном гипотиреозе

За 3 года трансплантация фетальных тиреоцитов проведена 48 пациентам с различными формами гипотиреоза.

3.5 Оценка эффективности трансплантации фетальных нефроцитов у больных ХЗП

В группу исследуемых больных взяты 78 пациентов с хроническим гломерулонефритом (ГН) и вторичными нефропатиями с хронической почечной недостаточностью (ХПН) разной стадии.

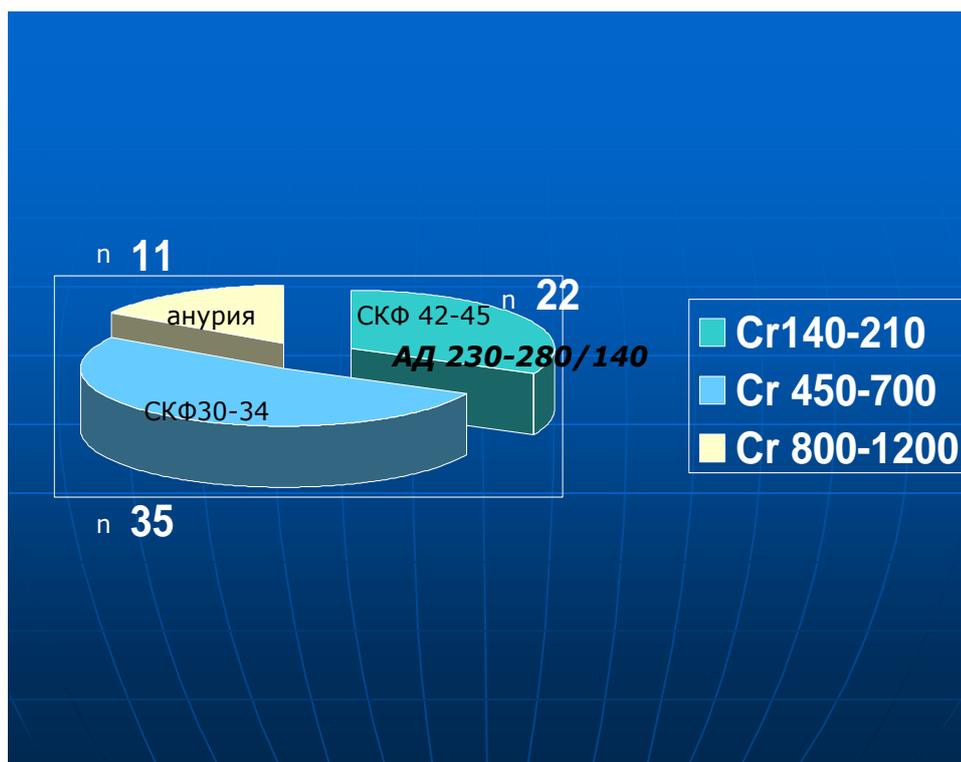


Рисунок 23. Распределение больных по группам в зависимости от уровня креатинина сыворотки

Результаты исследования представлены в таблицах 22, 23 и 24.

Таблица 22. Распределение больных - 1-ая группа (n-22)

Средние значения	До трансплантации	Через 1 месяц после трансплантации	Через 3-6 месяцев после трансплантации
Протеинурия	1.0-3.0 г/л	0.99-2.48 г/л	0.67-0.69 г/л
Креатинин	160-210 мкм/л	163-220 мкм/л	160-207 мкм/л
АД	280/140-230/130	140/100-150/100	140/100-130/100
СКФ	42-45 мл/мин	42-45 мл/мин	76-80 мл/мин

Таким образом, наблюдение за пациентами данной группы в течение 6 и более месяцев выявило значимое снижение протеинурии, выраженное снижение АД вплоть до его нормализации к 3-5 месяцу после ТФН, отсутствие прироста уровня азотемии, улучшение СКФ, что является критерием эффективности ТФН у больных с ХПН 1 ст.

Таблица 23. Распределение больных - 2-ая группа (n-35)

Средние значения	До трансплантации	Через 1 месяц	Через 3-6 месяцев
Протеинурия	2.0-2.3 г/л	0.99-1.03 г/л	0.66-0.67 г/л
Креатинин	450-700 мкм/л	430-550 мкм/л	380-420 мкм/л
АД	250/130-230/130	140/100-150/100	130/90
СКФ	30-34 мл/мин	46-48 мл/мин	56-60 мл/мин

У больных данной группы динамическое наблюдение в течение 6-8 месяцев показало, что уже через 1 месяц после проведенной ТФН отмечается снижение потери белка с мочой до значительного к исходу 6-го месяца, у всех пациентов этой группы выявлено значительное снижение и нормализация АД, умеренное повышение СКФ, а также у 100% - отсутствие прогрессирования уровня креатинина в сыворотке крови.

Таблица 24. Распределение больных - 3-я группа (n-8)

Средние значения	До трансплантации	Через 1 месяц	Через 3-6 месяцев
Креатинин	800-1200 мкм/л	800-1000 мкм/л	760-1000 мкм/л
АД	280/140-230/130	150/100-160/100	150/100-160/100
СКФ	анурия	анурия	анурия

У больных с ТПН, находящихся различное время на программном гемодиализе, также отмечена стабилизация гемодинамики со значительным снижением дозы антигипертензивных препаратов, у 100% пациентов улучшение качества жизни в виде снижения признаков уремической интоксикации.

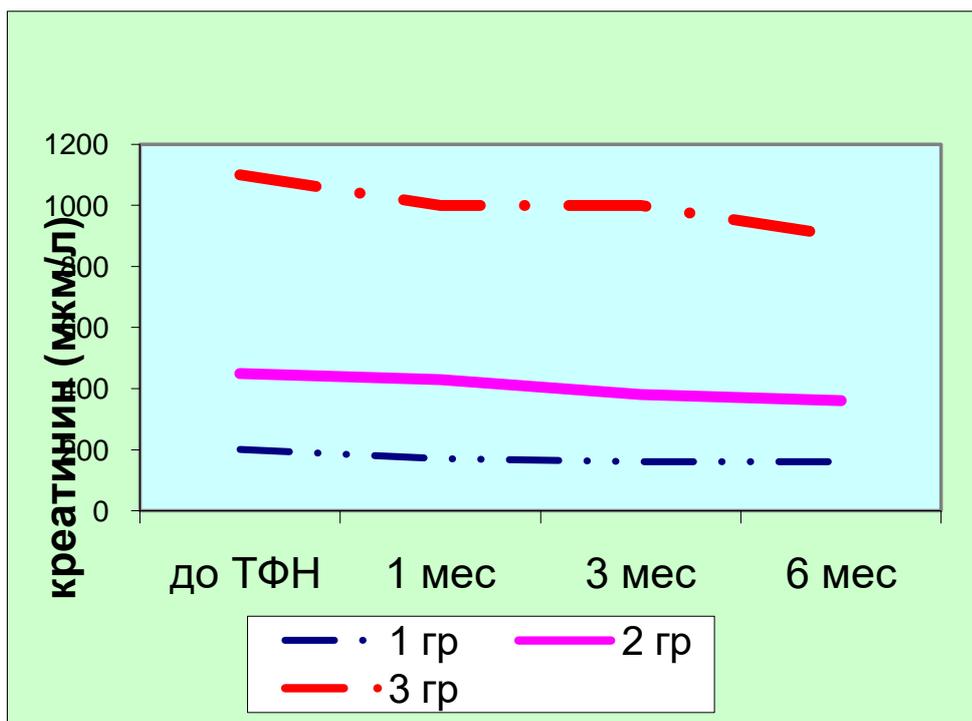


Рисунок 24. Динамика уровня креатинина сыворотки после ТФН

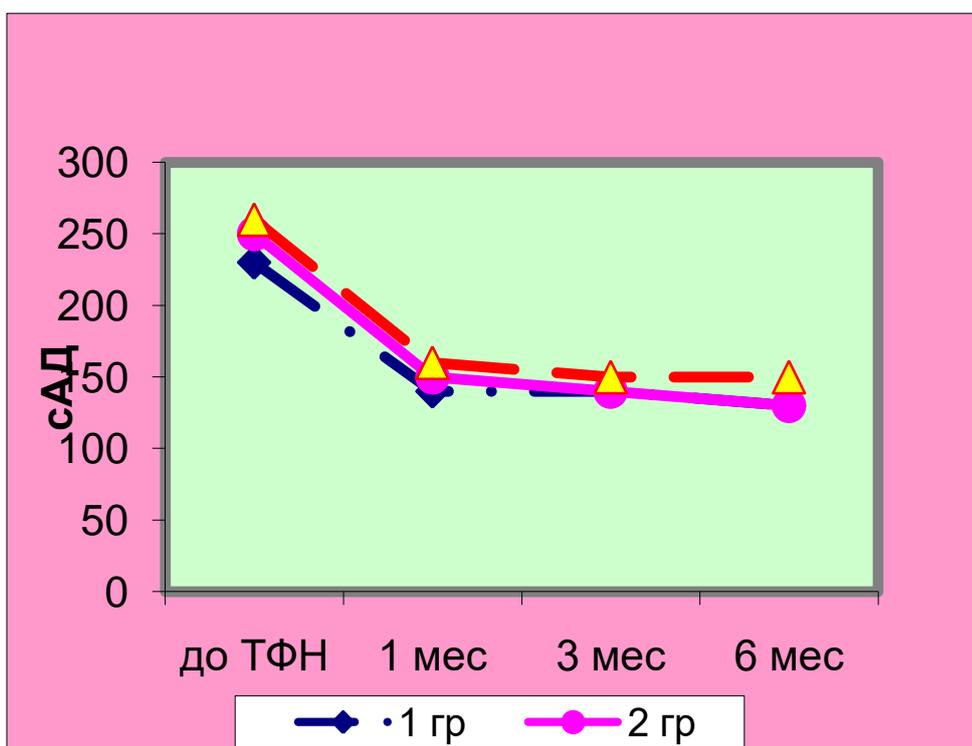


Рисунок 25. Динамика систолического артериального давления после ТФН

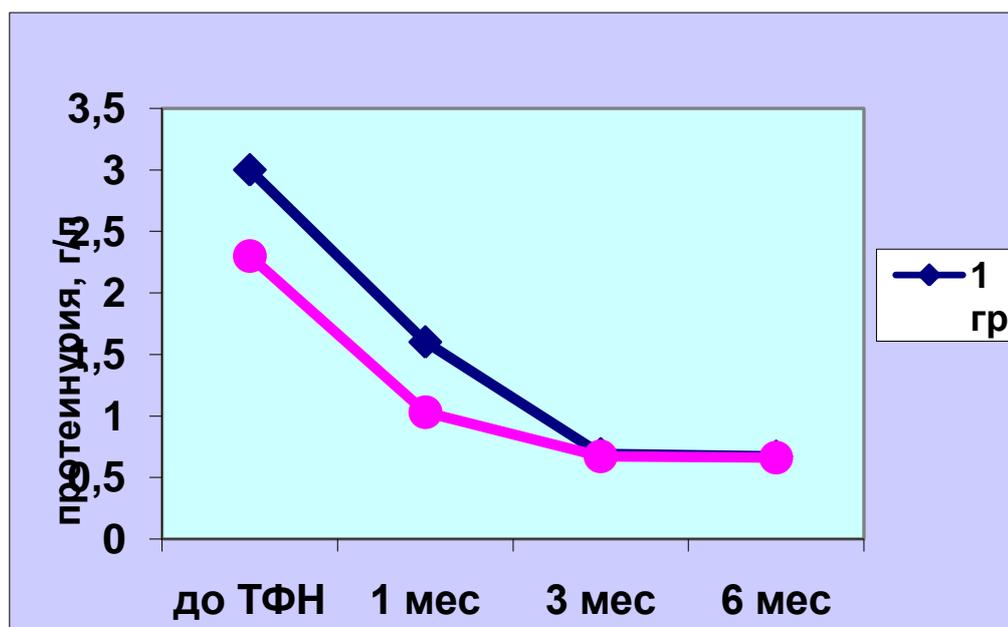


Рисунок 26. Динамика ПУ после ТФН

Современная нефропротективная стратегия направлена на снижение темпов прогрессирования ХПН, основными из которых являются АГ и протеинурия. В патогенезе и механизмах прогрессирования нефропатий ключевая роль отводится патологической активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) в ответ на иммуновоспалительное поражение ткани почек, их ишемию и несоответствие числа нефронов массе тела.

Повышение концентрации АТ-II, основной эффекторной молекулы РААС, в крови и непосредственно в ткани почек приводит к целому комплексу неблагоприятных последствий, играющих роль в повышении АД и развитии нефросклероза. ТФН блокирует патологическую выработку АТ-II, снижает стимуляцию рецепторов 1 типа, а именно эти эффекты играют большую роль в прогрессировании ХПН и развитии сердечно-сосудистых осложнений, являющихся одной из основных причин гибели больных на додиализной стадии заболевания и после начала заместительной почечной терапии.

Нарушение внутрпочечной гемодинамики - повышение внутр клубочкового давления вследствие изменения соотношения между просветом приносящей и выносящей артериол с развитием феномена гиперфльтрации - приводит к повышению проницаемости клубочкового фильтра с увеличением ПУ и является одним из основных неиммунных механизмов прогрессирования гломерулосклероза. Проведенные исследования показали, что после ТФН устраняется внутр клубочковая гипертензия. В наших исследованиях состояние внутрпочечной гемодинамики оценивали по величине функционального ренального резерва (ФРР), который определялся в ходе пробы с нагрузкой мясным белком по известной методике. В группе пациентов, которым проведена ТФН, ФРР исследован у 29-ти человек.

Из них исходно сохранный ФРР ($\text{ФРР} \geq 5\%$) выявлен только у 3-х больных (10,3%). После ТФН – в 65% случаев.

Следовательно, ТФН оказывает отчетливый антигипертензивный и антипротеинурический эффект, не вызывая динамического ухудшения функции почек. В проведенных исследованиях определялась прогностическая роль уровня азотемии, создавалась математическая модель прогрессирования ХПН, оценивалась «почечная» выживаемость моментным методом Kaplan-Meier. В исследуемой группе пациентов в течение 6-ти и более месяцев отсутствовал прирост креатинина, что является положительным прогностическим признаком ХПН и удлиняет время додиализного периода заболевания.

3.5.1 Критерии эффективности ТФН по анализу показателей гемостаза при хронических заболеваниях почек

Больные с ХПН по половому признаку распределились следующим образом: в контрольной группе мужчин было 19 (7%), женщин – 21 (3,3%) и в исследуемой группе после ТФН мужчин 15 (67,8%), женщин – 28 (32,2%). Среди больных преобладали лица женского пола. Возраст больных колебался в пределах от 19 до 64 лет. Средний возраст составил в контрольной группе $39,1 \pm 9,6$ лет, в исследуемой – $44,8 \pm 10,9$ лет. Как видим, заболевание чаще наблюдалось в молодом и трудоспособном возрасте. Срок наблюдения за пациентами составил от 10 дней до 3 лет после ТФН.

Таблица 25. Параметры тромбоцитарного звена гемостаза у больных с хронической почечной недостаточностью до и после трансплантации фетальных нефроцитов ($M \pm m$)

Больные с ХПН (n=43)	Количество тромбоцитов $\times 10^9/\text{л}$	Спонтанная агрегация%	Индукцированная агрегации (S%)		
			АДФ-агрегация $1 \times 10^5 \text{M}$, %	Адреналин 10мг/мл,%	Ристо-мицин 0,17мг/мл,%
До ТФН	$98,9 \pm 2,9$ ($p < 0,01$)	$4,6 \pm 2,4$ ($p < 0,01$)	$47,0 \pm 1,0$ ($p < 0,01$)	$49,6 \pm 3,1$ ($p < 0,01$)	$51,2 \pm 3,8$ ($p < 0,01$)
После ТФН через 3 месяца	$241,5 \pm 5,4$ ($p > 0,5$)	$10,8 \pm 2,0$ ($p < 0,5$)	$67,2 \pm 1,6$ ($p > 0,5$)	$51,5 \pm 3,5$ ($p < 0,01$)	($p > 0,5$)
После ТФН через 6 мес.	$172 \pm 4,7$ ($p < 0,05$)	$9,2 \pm 2,1$ ($p < 0,5$)	$58,6 \pm 2,9$ ($p < 0,05$)	$49,9 \pm 3,3$ $p < 0,01$	$70,4 \pm 3,8$ ($p < 0,05$)

После ТФН через 1 год	96,1±2,4 (p<0,01)	9,0±1,9 (p<0,5)	55,2±2,7 (p<0,01)	46,9±2,8 (p<0,01)	70,2±3,8 (p<0,05)
После ТФН через 3 года	88,7±1,1 (p<0,01)	5,5±2,3 (p<0,01)	51,7±1,1 (p<0,01)	48,9±2,9 (p<0,01)	53,6±3,7 (p<0,01)
Показатели в норме (n=40)	232,4±3,7	12,0±1,4	67,4±1,6	71,0±3,7	80,0±4,3

Из таблицы видно, что у больных с ХПН без ТФН средние показатели количества тромбоцитов и их агрегации были значительно и достоверно пониженными по сравнению с нормой. После ТФН через 3 месяца количество тромбоцитов и показатели агрегации тромбоцитов улучшились, приближаясь максимально к норме, однако, в последующем вновь нарастает тромбоцитопения и ухудшается агрегационная функция, приближаясь к показателям больных без ТФН, что говорит о необходимости повторной ТФН.

Максимальная положительная динамика состояния гемостаза наблюдалась к 3 месяцам после ТФН (рисунок 27).

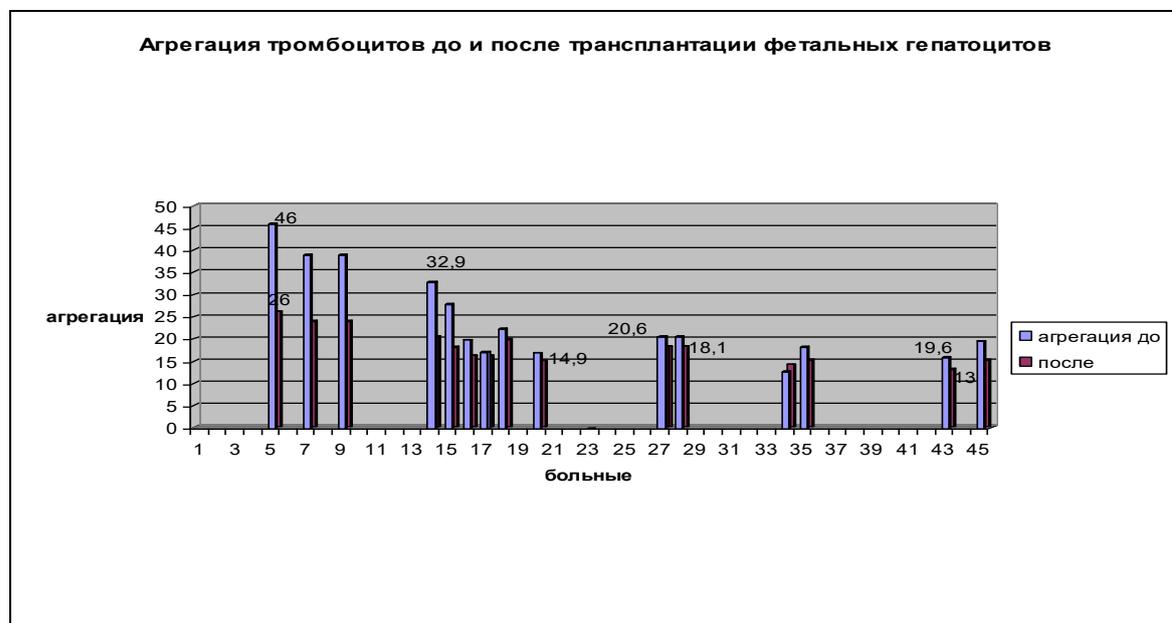


Рисунок 27. Динамика агрегации тромбоцитов до и после ТФН

Таким образом, в нашем исследовании выявилось значительное и стабильное понижение количества тромбоцитов, а также снижение спонтанной и индуцированной агрегации тромбоцитов у больных с ХПН без ТФН и стабилизация данных показателей после ТФН, особенно выраженная к 3 месяцу после трансплантации.

3.5.2 Особенности изменений системы гемостаза и состояния липидного обмена при различных клинических формах хронического гломерулонефрита до и после трансплантации фетальных нефроцитов

Преимущественное большинство составили больные с нефротическим синдромом (65% случаев), по 10% составили больные с изолированной артериальной гипертензией и гематурией, в 15% случаев отмечалась смешанная форма ХГН. По данным нефробиопсии, у 50% больных выявлен мезангиопролиферативный ГН (МзПГН), у 30% - мембранозный ГН (МБГН), 15% составил мезангиокапиллярный вариант ГН (МзКГН).

Наряду с общеклиническими исследованиями проводилось изучение состояния липидного обмена. Анализ спектра липидных нарушений в зависимости от морфологического варианта ГН выявил следующие особенности: наиболее выраженная гиперхолестеринемия наблюдалась у больных с МзКГН ($8,83 \pm 2,25$ мм/л), липопротеинемия – при МзПГН ($116,75 \pm 20,52$ ЕД), после ТФН отмечено достоверное уменьшение показателей липидного обмена.

При анализе показателей гемостаза в зависимости от морфологической формы выявлены следующие особенности. Так, у больных с МБГН все показатели гемостаза находились на верхней границе нормы. При МзПГН нарушения гемостаза проявлялись более выраженным удлинением ПВ, повышением РФМК при нормальных показателях АЧТВ. После ТФН показатели ПВ, РФМК достоверно приблизились к показателям здоровых людей.

Таким образом, нами установлена взаимосвязь морфологических изменений в почках со степенью выраженности нарушений липидного обмена и системы гемостаза, обуславливающих тяжесть нефротического синдрома у больных с ХГН. После проведенной ТФН все показатели липидного обмена, а также некоторые показатели системы гемостаза нормализовались.

3.6 Оценка эффективности трансплантации фетальных нейроцитов у больных с органическими заболеваниями ЦНС

Трансплантация фетальных нейроцитов была проведена 113 пациентам с различной органической патологией нервной системы: демиелинизирующие заболевания, болезнь Паркинсона, сирингомиелия, последствия позвоночно-спинальных травм, поражение периферических нервных стволов (см. таблицу 26).

В контрольную группу были включены 40 больных, сопоставимых по возрасту, нозологии, тяжести заболевания, получавших традиционную терапию, без применения метода фетальной нейротрансплантации.

Таблица 26. Нозологическая, половая и возрастная структура основной группы больных

№	Нозология	Кол-во	Возраст (лет)	пол	
				м	ж
1	Сирингомиелия	17	41	8	9
2	Демиелинизирующие заболевания ЦНС	26	32	10	16
3	Травматическая болезнь спинного мозга	24	29	18	6
4	Болезнь Паркинсона	12	49	5	7
5	Поражения периферических нервных стволов	14	23	8	6
6	Другие дегенеративные заболевания ЦНС	20	39	12	8
	Итого	113	38	61	52

При заболеваниях центральной нервной системы фетальные нейроны вводились эндолумбальным методом. При поражении периферических нервов трансплантация осуществлялась интраоперационно. Производился хирургический доступ к стволу периферического нерва. С применением микрохирургической техники осуществляли экзоневролиз. Проксимальный и дистальный концы нерва мобилизовали, края освеживались до появления аксонов. С применением микроскопа производился шов нерва атрауматикой. Целостность ствола восстанавливалась, компрессию нерва ликвидировали. Эндоневрално вверх и вниз вводили 5,0 мл. суспензии одноклеточных криоконсервированных фетальных нейронов. Получены патенты РК на изобретения с применением фетальной нейротрансплантации: «Способ хирургического лечения травматического поражения периферического нерва» и «Способ хирургического лечения нейропатии лицевого нерва»

Всем больным основной и контрольной групп исследовался неврологический статус и оценивалось качество жизни по международным опросникам и шкалам (индекс Бартела и международная шкала функциональной независимости). Оценка психоэмоционального статуса проводилась по Госпитальной шкале тревоги и депрессии. Обследование проводилось до фетальной нейротрансплантации и в различные сроки после трансплантации фетальных нейронов (через неделю, через 4-7 месяцев, через 12 месяцев).

Проведены иммунологические исследования сыворотки крови и спинномозговой жидкости до и после фетальной нейротрансплантации 18 пациентам с демиелинизирующей патологией нервной системы. Динамически исследовались следующие лабораторные

показатели: основной белок миелина, белок S 100, мозговой нейротрофический фактор, T-супрессоры, ЦИК.

3.6.1 Клинико-неврологическая динамика в основной группе исследования после трансплантации фетальных нейроцитов

Все пациенты, включенные нами в основную группу удовлетворительно перенесли первую и последующие процедуры нейротрансплантации. Кратность эндолюмбального введения фетальной взвеси составила в большинстве случаев 3 раза, с временными промежутками между трансплантациями в среднем $7,06 \pm 1,27$ месяцев. Ни в одном случае не было зафиксировано каких-либо серьезных осложнений, ухудшающих соматическое состояние или способствующих нарастанию неврологического дефицита. Ранние послеоперационные реакции в виде менингизма, повышения температуры тела до 37°C - $38,0^{\circ}\text{C}$ и диффузной головной боли купировались к концу 2-3-х суток после пункции, как правило, без существенной медикаментозной коррекции.

Наблюдалась положительная динамика в неврологическом статусе, более существенная по сравнению с контрольной группой. Уменьшение степени неврологического дефицита отмечалось уже через 7 дней после фетальной нейротрансплантации.

Существенные сдвиги в объективном неврологическом статусе были выявлены через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после фетальной нейротрансплантации в виде дальнейшего регресса двигательного дефекта, значительного восстановления функции тазовых органов, объективного уменьшения чувствительных расстройств, существенного регресса координаторных нарушений.

Так у пациентов с сирингомиелией позитивные изменения характеризовались прежде всего уменьшением выраженности спастических парезов и тазовой дисфункции. Существенная динамика достигнута также в чувствительной сфере. В меньшей степени регрессу подвергались мышечные атрофии. Наибольшего клинического эффекта в этой группе пациентов удавалось достичь через 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов.

Объективная динамика основных неврологических синдромов через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов представлена в рисунке 28.

Следует отметить, что количество пациентов с регрессом патологических симптомов в группе сравнения через аналогичные промежутки времени было значительно ниже, чем в основной группе исследования, рисунок 29.

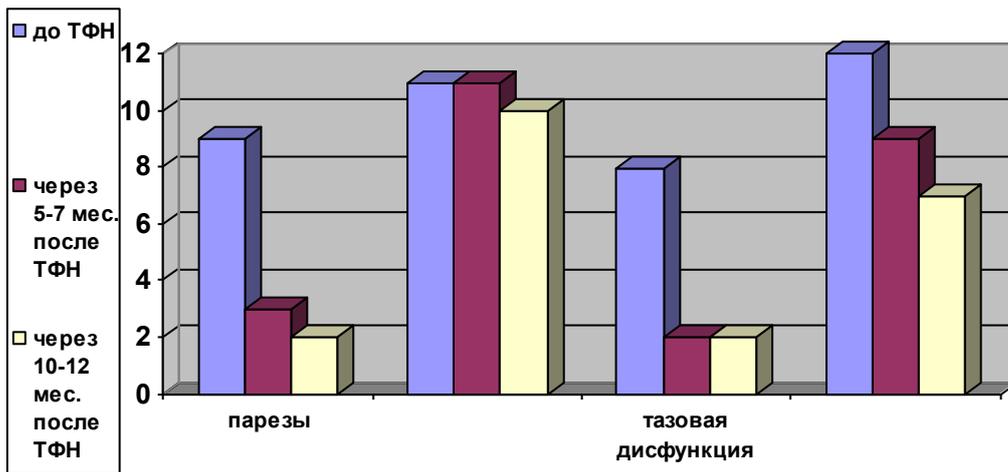


Рисунок 28. Динамика основных неврологических синдромов у больных сирингомиелией через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов (ТФН)

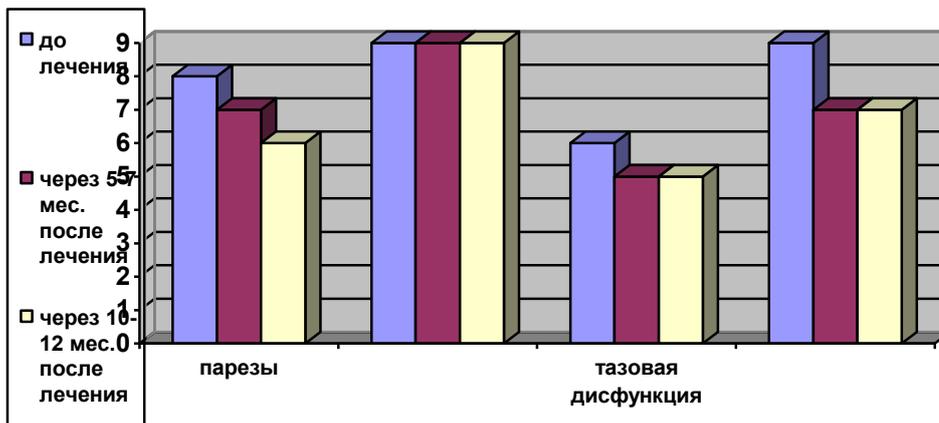


Рисунок 29. Динамика основных неврологических синдромов у больных сирингомиелией контрольной группы через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после лечения

В одном случае через 10 месяцев после фетальной нейротрансплантации прослеживалось изменение размеров сирингомиелитической полости при МРТ-исследовании, где отмечалась тенденция к облитерации или коллапсу (спадению) кисты спинномозгового канала.

У пациента К. 33 лет с давностью заболевания 4 года с момента появления первых клинических симптомов, при исходном проведении магнитно-резонансной томографии была выявлена интрамедулярная полость протяженностью с уровня С2 позвонка по Th 11, диаметром в поперечнике до 7,2 мм, с неровными контурами за счет синехий, рисунок 30.



Рисунок 30. МРТ картина сирингомиелической кисты до трансплантации
фетальных нейроцитов

Через 10 месяцев после нейротрансплантации диаметр интрамедулярной кисты с той же протяженностью уменьшился в поперечнике на шейном уровне до 5,2мм. На уровне грудного отдела полость была неравномерной ширины, на верхнем уровне до 4,1 мм, на среднем до 5,3 мм, на остальном протяжении киста представлялась «щелевидной» с неровными контурами за счет синехий, рисунок 31.



Рисунок 31. МРТ картина сирингомиелической кисты через 10 месяцев после
трансплантации фетальных нейроцитов

Результаты наших клинических наблюдений пациентов с болезнью Паркинсона после проведенной трансплантации фетальных нейроцитов позволяют говорить об отсутствии серьезных осложнений и положительной динамике в неврологическом статусе исследуемых больных. Изменения в состоянии пациентов характеризовались прежде всего снижением выраженности мышечной ригидности и брадикинезии. В меньшей степени регрессу подвергались тремор и поструральные расстройства.

Кроме того, после фетальной нейротрансплантации отмечалось заметное уменьшение проявлений вегетативной дисфункции.

Нами также зафиксировано повышение эффективности фармакотерапии DOFA-содержащими препаратами в виде достоверного ($p < 0,05$) снижения суточной дозы накома на 34,48%, более отчетливого в сопоставлении с контрольной группой, таблица 27.

Таблица 27. Динамика средней суточной дозы препаратов леводопы (наком) у пациентов с болезнью Паркинсона в различные сроки после фетальной нейротрансплантации

	До ТФН (M± m)	Через 7 дней (M± m)	Через 5-7 мес. (M± m)	Через 10-12 мес. (M± m)
Средняя суточная доза накома (мг)	906,25±332,41	734,37±270,89	609,37±140,74*	593,75±145,62*

Примечание. Разница результатов в сравнении с исходными показателями (до ТФН) достоверна: *- $p < 0,05$.

При динамическом исследовании больных по Унифицированной шкале оценки болезни Паркинсона выявлена существенная положительная динамика (по сравнению с больными контрольной группы) в виде достоверного ($p < 0,05$) снижения среднего суммарного показателя через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после фетальной нейротрансплантации, таблица 28.

Таблица 28. Изменение среднего суммарного показателя унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона в различные сроки после трансплантации фетальных нейроцитов (баллы)

	До ТФН (M± m)	Через 7 дней (M± m)	Через 5-7 мес. (M± m)	Через 10-12 мес. (M± m)
Суммарный балл Унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона	65,25±16,93	58,87±17,24	46,5±14,34*	46,62±11,77 *

Примечание. Разница результатов в сравнении с исходными показателями достоверна: *- $p < 0,05$.

Наши наблюдения выявили положительные изменения в неврологическом статусе пациентов с последствиями позвоночно-спинальных травм после проведенной трансплантации фетальных нейроцитов без серьезных клинических осложнений. Первые результаты нейротрансплантации наблюдались уже в течение 7 дней и проявлялись улучшением общего самочувствия больных, снижением патологического мышечного тонуса и тенденцией к улучшению функции тазовых органов. В более отдаленные сроки обследования (через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после нейротрансплантации) мы отмечали отчетливые, выраженные в той или иной степени клинические сдвиги в виде объективного уменьшения пирамидной симптоматики, чувствительных расстройств и тазовой дисфункции. Частичный регресс неврологической симптоматики на протяжении всего периода наблюдений способствовал изменению категории степени тяжести неврологического дефицита у существенно большей (в сравнении с контрольной группой) части больных по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга, рисунки 32, 33.

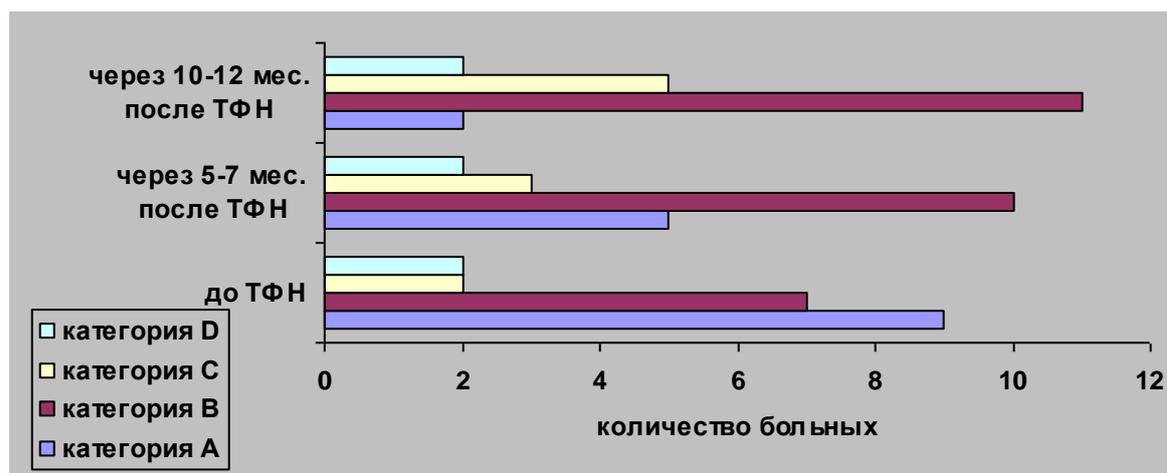


Рисунок 32. Динамика категорий степени тяжести больных основной группы по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга (ASIA) после трансплантации фетальных нейроцитов

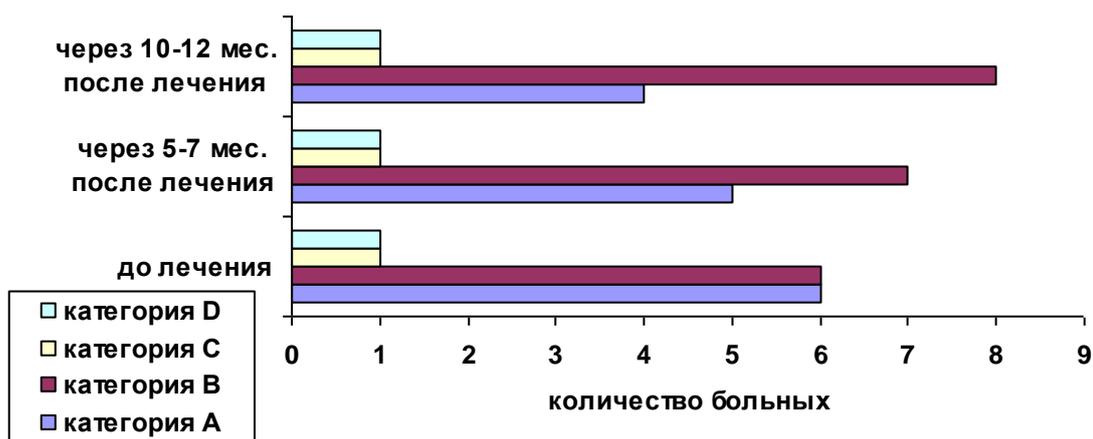


Рисунок 33. Динамика категорий степени тяжести больных контрольной группы по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга (ASIA) в различные сроки после лечения

Представленные выше диаграммы демонстрируют сравнительную степень регресса неврологического дефицита в основной и контрольной группах. В группе больных с применением метода трансплантации фетальных нейроцитов достигалась заметная динамика в виде существенного уменьшения (на 77,78%) количества больных с тяжелой степенью неврологических проявлений по шкале ASIA (категория A). Соответственно за 10-12 месяцев увеличивалось число пациентов с более легкой степенью неврологических проявлений по шкале ASIA (категория C на 60% и категория B на 36,36%). В контрольной группе наблюдалась в значительной степени меньшая динамика. Количество больных с тяжелой степенью неврологического дефицита (категория A) уменьшилось на 2 человека (14,28%) за счет перехода в категорию B. В других категориях изменений не отмечалось.

Также после фетальной нейротрансплантации отмечался стойкий достоверный положительный клинический эффект у пациентов рассеянным склерозом в основной группе в виде ремиссии и стабилизации процесса с уменьшением выраженности степени инвалидизации пациентов, скорости прогрессирования заболевания и количества обострений. Мы наблюдали у всех пациентов повышения фона настроения и общего жизненного тонуса, снижения депрессии. Позитивная динамика в неврологическом статусе имела место главным образом за счет уменьшения двигательных нарушений, улучшения контроля над тазовыми функциями, атаксии. Из неврологических синдромов наиболее толерантными к терапии у всех больных были чувствительные и зрительные расстройства, с другой стороны легче купировались спастические парезы конечностей и тазовые нарушения, в сравнении с контрольной группой

Таблица 29. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 7 дней после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе (M±m)

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 7 дней после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	4,0±0,98*	4,3±0,73
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	3,1±0,51^	4,0±0,13#
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	2,35±0,78^	2,91±0,35
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,16±0,32	2,1±0,69
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	2,17±0,85^	2,56±0,19
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,35±0,59	1,55±0,14

Примечания:* Достоверность различий между показателями до начала лечения и на седьмые сутки после лечения; ^ - достоверность различий между показателями до начала лечения и на седьмые сутки после лечения; # - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы (p<0,05)

Из таблицы 29 видно, что исходно в обеих клинических группах достоверной разницы в баллах неврологического дефицита по всем функциональным системам не выявлено. Мы наблюдали достоверную положительную динамику с регрессом неврологических нарушений в основной группе пациентов уже через 7 дней после фетальной нейротрансплантации. Максимальный регресс неврологической симптоматики был отмечен в системе мозжечковых нарушений на 24% (p<0,001).

Пирамидные нарушения уменьшились также достоверно на 13% (p<0,05) в основной группе пациентов. Достоверно восстановились функции тазовых органов и краниальных нервов на 23% (p<0,001) и 22% (p<0,001) соответственно. Зрительные и чувствительные нарушения без заметной динамики. В контрольной группе достоверного снижения баллов неврологических нарушений не выявлено. Через 7 дней после лечения нами отмечена достоверная разница в баллах системы мозжечковых нарушений между контрольной и основной группами на 23% (p<0,05), по другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

Таблица 30. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 6 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе (M±m)

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 6 месяцев после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	3,4±0,4 [^]	4,46±0,34 [#]
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	2,68±0,68 [^]	4,2±0,12 [#]
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	1,9±0,61 [^]	3,1±0,13 [#]
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,1±0,2	2,13±0,33
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	1,86±0,63 [^]	2,99±0,35 [#]
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,23±0,42	1,5±0,1

Примечания: * Достоверность различий между показателями до начала лечения и через 6 месяцев после лечения; [^] - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 6 месяцев после лечения; [#] - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы (p< 0,05)

Из таблицы 30 видно, что через 6 месяцев в основной группе пациентов после трансплантации фетальных нейроцитов удерживается первоначально достигнутый (после первой нейротрансплантации) клинический эффект. Помимо этого отмечается дальнейший регресс неврологического дефекта. Максимальное восстановление отмечено в функциях черепно-мозговых нервов, где при сравнении с первоначальными данными балл неврологического дефицита достоверно снизился на 37% (p<0,001), в основном, за счет уменьшения бульбарных нарушений. Достоверная динамика наблюдалась в системе тазовых нарушений, здесь восстановление было отмечено на 34%(p<0,001), в сравнении с исходными показателями, Регресс пирамидных симптомов и координаторных нарушений, также достоверен, на 26% и 34% (p<0,001), соответственно при сопоставлении с первоначальными баллами. При оценке чувствительных и зрительных расстройств отмечается тенденция к уменьшению неврологического дефицита.

В контрольной группе по данным шкалы функциональных повреждений Kurtzke достоверного снижения баллов неврологических нарушений при сопоставлении с исходными значениями не выявлено. Через 6 месяцев после лечения мы наблюдали достоверную разницу в баллах между контрольной и основной группами в следующих

функциональных системах: в мозжечковой системе различия составила 36% ($p<0,05$), в пирамидной системе на 24% ($p<0,05$), в функциях тазовых органов и черепно-мозговых нервов разница составила 38% и 39% ($p<0,05$) соответственно наибольшим восстановлением в основной группе. По другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

Таблица 31. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе ($M\pm m$)

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 12 месяцев после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	3,04±0,43 [^]	4,78±0,48 [#]
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	2,47±0,8 [^]	4,43±0,33 [#]
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	1,8±0,48 [^]	3,8±0,56 [#]
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,0±0,11	2,3±0,4
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	1,8±0,6 [^]	3,22±0,58 [#]
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,3±0,2	1,77±0,09

Примечания: * - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 12 месяцев после лечения; [^] - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 12 месяцев после лечения; [#] - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы ($p<0,05$)

Таблица 31 демонстрирует, что через 12 месяцев в основной группе пациентов после трансплантации фетальных нейроцитов удерживается первоначально достигнутый (после первой нейротрансплантации) клинический эффект. Помимо этого отмечается дальнейший регресс неврологического дефекта. Максимальное восстановление отмечено в функциях черепно-мозговых нервов, где при сравнении с первоначальными данными балл неврологического дефицита достоверно снизился на 41% ($p<0,001$), в основном, за счет восстановления бульбарных нарушений. Достоверная динамика наблюдалась в системе мозжечковых нарушений, здесь восстановление было отмечено на 39% ($p<0,001$), в сравнении с исходными показателями, Регресс пирамидных симптомов и тазовых нарушений, также достоверен, на 34% и 36% ($p<0,001$), соответственно при сопоставлении с

первоначальными баллами. При оценке чувствительных и зрительных расстройств отмечалась тенденция к уменьшению неврологического дефицита.

В контрольной группе по данным шкалы функциональных повреждений Kurtzke наблюдалось нарастание патологических симптомов, что подтверждается увеличением баллов неврологических нарушений при сопоставлении с исходными значениями. Через 12 месяцев после проведенного курса лечения мы наблюдали нарастание спастических парезов на 4%, мозжечковые нарушения углубились на 8% по данным шкалы повреждения функциональных система Kurtzke. Балл в системе краниальных нервов и тазовых органов увеличился на 16% и 14% соответственно.

Мы зафиксировали достоверную разницу в баллах между контрольной и основной группами с регрессом неврологического дефицита в следующих функциональных системах: в мозжечковой системе разница составила 44% ($p < 0,05$), в пирамидной системе - 36% ($p < 0,05$), в функциях тазовых органов и черепно-мозговых нервов разница составила 44% и 53% ($p < 0,05$) соответственно. По другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

Все пациенты, включенные нами в основную группу удовлетворительно перенесли первую и последующие процедуры нейротрансплантации. Кратность эндолюмбального введения фетальной взвеси составила в большинстве случаев 3 раза, с временными промежутками между трансплантациями в среднем $7,06 \pm 1,27$ месяцев. Ни в одном случае не было зафиксировано каких-либо серьезных осложнений, ухудшающих соматическое состояние или способствующих нарастанию неврологического дефицита. Ранние послеоперационные реакции в виде менингизма, повышения температуры тела до 37°C - $38,0^{\circ}\text{C}$ и диффузной головной боли купировались к концу 2-3-х суток после пункции, как правило, без существенной медикаментозной коррекции.

Наблюдалась положительная динамика в неврологическом статусе, более существенная по сравнению с контрольной группой. Уменьшение степени неврологического дефицита отмечалось уже через 7 дней после фетальной нейротрансплантации.

Существенные сдвиги в объективном неврологическом статусе были выявлены через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после фетальной нейротрансплантации в виде дальнейшего регресса двигательного дефекта, значительного восстановления функции тазовых органов, объективного уменьшения чувствительных расстройств, существенного регресса координаторных нарушений.

Так у пациентов с сирингомиелией позитивные изменения характеризовались прежде всего уменьшением выраженности спастических парезов и тазовой дисфункции. Существенная динамика достигнута также в чувствительной сфере. В меньшей степени

регрессу подвергались мышечные атрофии. Наибольшего клинического эффекта в этой группе пациентов удавалось достичь через 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов.

Объективная динамика основных неврологических синдромов через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов представлена в рисунке 34.

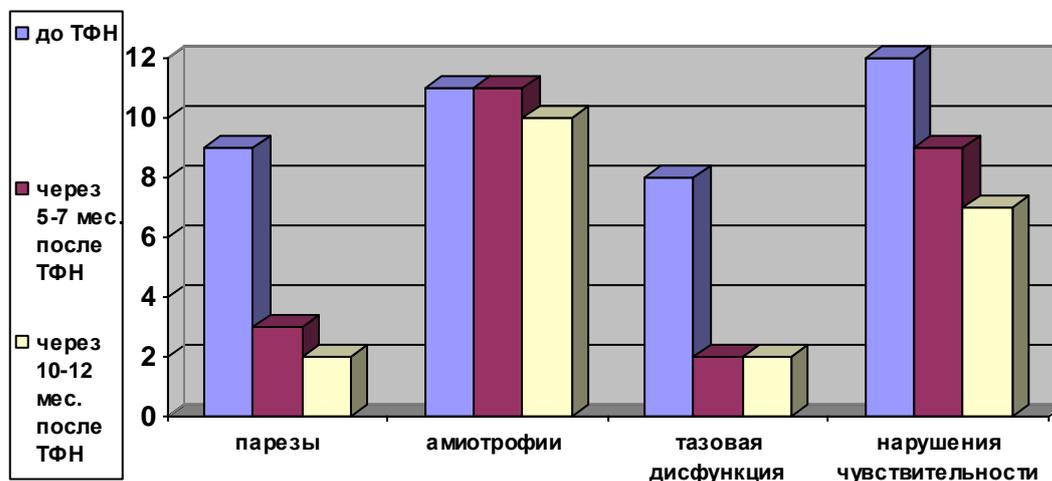


Рисунок 34. Динамика основных неврологических синдромов у больных сирингомиелией через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов (ТФН)

Следует отметить, что количество пациентов с регрессом патологических симптомов в группе сравнения через аналогичные промежутки времени было значительно ниже, чем в основной группе исследования, рисунок 35.

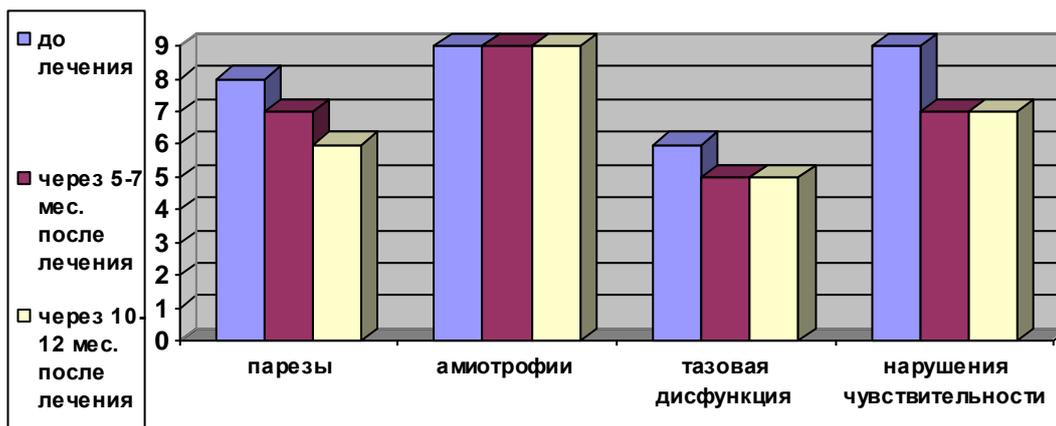


Рисунок 35. Динамика основных неврологических синдромов у больных сирингомиелией контрольной группы через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после лечения

В одном случае через 10 месяцев после фетальной нейротрансплантации прослеживалось изменение размеров сирингомиелитической полости при МРТ-

исследовании, где отмечалась тенденция к облитерации или коллапсу (спадению) кисты спинномозгового канала.

У пациента К. 33 лет с давностью заболевания 4 года с момента появления первых клинических симптомов, при исходном проведении магнитно-резонансной томографии была выявлена интрамедулярная полость протяженностью с уровня С2 позвонка по Th 11, диаметром в поперечнике до 7,2 мм, с неровными контурами за счет синехий, рисунок 36.



Рисунок 36. МРТ картина сирингомиелической кисты до трансплантации фетальных нейроцитов

Через 10 месяцев после нейротрансплантации диаметр интрамедулярной кисты с той же протяженностью уменьшился в поперечнике на шейном уровне до 5,2мм. На уровне грудного отдела полость была неравномерной ширины, на верхнем уровне до 4,1 мм, на среднем до 5,3 мм, на остальном протяжении киста представлялась «щелевидной» с неровными контурами за счет синехий, рисунок 37.



Рисунок 37. МРТ картина сирингомиелической кисты через 10 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов

Результаты наших клинических наблюдений пациентов с болезнью Паркинсона после проведенной трансплантации фетальных нейроцитов позволяют говорить об отсутствии серьезных осложнений и положительной динамике в неврологическом статусе исследуемых больных. Изменения в состоянии пациентов характеризовались прежде всего снижением выраженности мышечной ригидности и брадикинезии. В меньшей степени регрессу подвергались тремор и постуральные расстройства. Кроме того, после фетальной нейротрансплантации отмечалось заметное уменьшение проявлений вегетативной дисфункции. Нами также зафиксировано повышение эффективности фармакотерапии DOFA-содержащими препаратами в виде достоверного ($p < 0,05$) снижения суточной дозы накома на 34,48%, более отчетливого в сопоставлении с контрольной группой, таблица 32.

Таблица 32. Динамика средней суточной дозы препаратов леводопы (наком) у пациентов с болезнью Паркинсона в различные сроки после фетальной нейротрансплантации

	До ТФН (M± m)	Через 7 дней (M± m)	Через 5-7 мес. (M± m)	Через 10-12 мес. (M± m)
Средняя суточная доза накома (мг)	906,25±332,41	734,37±270,89	609,37±140,74*	593,75±145,62*

Примечание- Разница результатов в сравнении с исходными показателями (до ТФН) достоверна: *- $p < 0,05$.

При динамическом исследовании больных по Унифицированной шкале оценки болезни Паркинсона выявлена существенная положительная динамика (по сравнению с больными контрольной группы) в виде достоверного ($p < 0,05$) снижения среднего суммарного показателя через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после фетальной нейротрансплантации, таблица 33.

Таблица 33 - Изменение среднего суммарного показателя Унифицированной шкалы оценки болезни Паркинсона в различные сроки после трансплантации фетальных нейроцитов (баллы)

	До ТФН	Через 7 дней после ТФН	Через 5-7 мес. после ТФН	Через 10-12 мес. после ТФН
Суммарный балл	65,25±16,93	58,87±17,24	46,5±14,34*	46,62±11,77*

Примечание- Разница результатов в сравнении с исходными показателями (до ТФН) достоверна: *- $p < 0,05$

Наши наблюдения выявили положительные изменения в неврологическом статусе пациентов с последствиями позвоночно-спинальных травм после проведенной трансплантации фетальных нейроцитов без серьезных клинических осложнений. Первые результаты нейротрансплантации наблюдались уже в течение 7 дней и проявлялись улучшением общего самочувствия больных, снижением патологического мышечного тонуса и тенденцией к улучшению функции тазовых органов. В более отдаленные сроки обследования (через 5-7 месяцев и 10-12 месяцев после нейротрансплантации) мы отмечали отчетливые, выраженные в той или иной степени клинические сдвиги в виде объективного уменьшения пирамидной симптоматики, чувствительных расстройств и тазовой дисфункции. Частичный регресс неврологической симптоматики на протяжении всего периода наблюдений способствовал изменению категории степени тяжести неврологического дефицита у существенно большей (в сравнении с контрольной группой) части больных по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга, рисунки 38, 39.

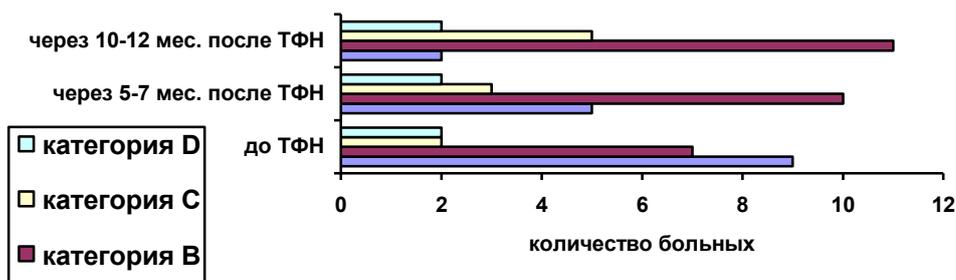


Рисунок 38. Динамика категорий степени тяжести больных основной группы по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга (ASIA) после трансплантации фетальных нейроцитов

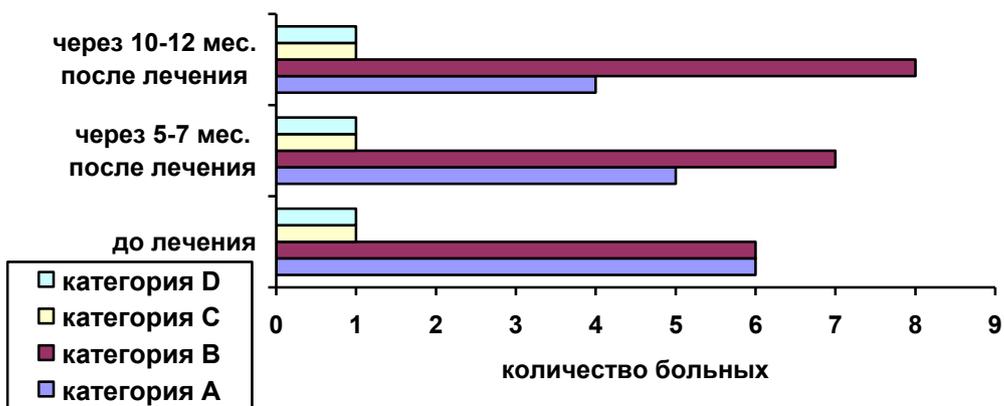


Рисунок 39. Динамика категорий степени тяжести больных контрольной группы по единой классификации неврологических проявлений травмы позвоночника и спинного мозга (ASIA) в различные сроки после лечения

Представленные выше диаграммы демонстрируют сравнительную степень регресса неврологического дефицита в основной и контрольной группах. В группе больных с применением метода трансплантации фетальных нейроцитов достигалась заметная динамика в виде существенного уменьшения (на 77,78%) количества больных с тяжелой степенью неврологических проявлений по шкале ASIA (категория А). Соответственно за 10-12 месяцев увеличивалось число пациентов с более легкой степенью неврологических проявлений по шкале ASIA (категория С на 60% и категория В на 36,36%). В контрольной группе наблюдалась в значительной степени меньшая динамика. Количество больных с тяжелой степенью неврологического дефицита (категория А) уменьшилось на 2 человека (14,28%) за счет перехода в категорию В. В других категориях изменений не отмечалось.

Также после фетальной нейротрансплантации отмечался стойкий достоверный положительный клинический эффект у пациентов рассеянным склерозом в основной группе в виде ремиссии и стабилизации процесса с уменьшением выраженности степени инвалидизации пациентов, скорости прогрессирования заболевания и количества обострений. Мы наблюдали у всех пациентов повышения фона настроения и общего жизненного тонуса, снижения депрессии. Позитивная динамика в неврологическом статусе имела место главным образом за счет уменьшения двигательных нарушений, улучшения контроля над тазовыми функциями, атаксии. Из неврологических синдромов наиболее толерантными к терапии у всех больных были чувствительные и зрительные расстройства, с другой стороны легче купировались спастические парезы конечностей и тазовые нарушения, в сравнении с контрольной группой.

Таблица 34. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 7 дней после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе (M±m).

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 7 дней после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	4,0±0,98*	4,3±0,73
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	3,1±0,51^	4,0±0,13#
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	2,35±0,78^	2,91±0,35
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,16±0,32	2,1±0,69
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	2,17±0,85^	2,56±0,19
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,35±0,59	1,55±0,14

Примечания:* Достоверность различий между показателями до начала лечения и на седьмые сутки после лечения менее 0,05; ^ - достоверность различий между показателями до начала лечения и на седьмые сутки после лечения менее 0,001; # - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы менее 0,05

Из таблицы 34 видно, что исходно в обеих клинических группах достоверной разницы в баллах неврологического дефицита по всем функциональным системам не выявлено. Мы наблюдали достоверную положительную динамику с регрессом неврологических нарушений в основной группе пациентов уже через 7 дней после фетальной нейротрансплантации. Максимальный регресс неврологической симптоматики был отмечен в системе мозжечковых нарушений на 24% ($p < 0,001$). Пирамидные нарушения уменьшились также достоверно на 13% ($p < 0,05$) в основной группе пациентов. Достоверно восстановились функции тазовых органов и краниальных нервов на 23% ($p < 0,001$) и 22% ($p < 0,001$) соответственно. Зрительные и чувствительные нарушения без заметной динамики.

В контрольной группе достоверного снижения баллов неврологических нарушений не выявлено. Через 7 дней после лечения нами отмечена достоверная разница в баллах системы мозжечковых нарушений между контрольной и основной группами на 23% ($p < 0,05$), по другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

Таблица 35. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 6 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе ($M \pm m$)

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 6 месяцев после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	3,4±0,4 [^]	4,46±0,34 [#]
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	2,68±0,68 [^]	4,2±0,12 [#]
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	1,9±0,61 [^]	3,1±0,13 [#]
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,1±0,2	2,13±0,33
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	1,86±0,63 [^]	2,99±0,35 [#]
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,23±0,42	1,5±0,1

Примечания:* - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 6 месяцев после лечения; ^ - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 6 месяцев после лечения; # - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы ($p < 0,05$)

Из таблицы 35 видно, что через 6 месяцев в основной группе пациентов после трансплантации фетальных нейроцитов удерживается первоначально достигнутый (после первой нейротрансплантации) клинический эффект. Помимо этого отмечается дальнейший регресс неврологического дефекта. Максимальное восстановление отмечено в функциях черепно-мозговых нервов, где при сравнении с первоначальными данными балл неврологического дефицита достоверно снизился на 37% ($p < 0,001$), в основном, за счет уменьшения бульбарных нарушений. Достоверная динамика наблюдалась в системе тазовых нарушений, здесь восстановление было отмечено на 34% ($p < 0,001$), в сравнении с исходными показателями, Регресс пирамидных симптомов и координаторных нарушений, также достоверен, на 26% и 34% ($p < 0,001$), соответственно при сопоставлении с первоначальными баллами. При оценке чувствительных и зрительных расстройств отмечается тенденция к уменьшению неврологического дефицита.

В контрольной группе по данным шкалы функциональных повреждений Kurtzke достоверного снижения баллов неврологических нарушений при сопоставлении с исходными значениями не выявлено. Через 6 месяцев после лечения мы наблюдали достоверную разницу в баллах между контрольной и основной группами в следующих функциональных системах: в мозжечковой системе различия составила 36% ($p < 0,05$), в пирамидной системе на 24% ($p < 0,05$), в функциях тазовых органов и черепно-мозговых нервов разница составила 38% и 39% ($p < 0,05$) соответственно наибольшим восстановлением в основной группе. По другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

Таблица 36. Динамика клинических данных по шкале Kurtzke через 12 месяцев после трансплантации фетальных нейроцитов в основной группе и после иммуносупрессивной терапии в контрольной группе ($M \pm m$)

Функциональные системы	Баллы неврологического дефицита до лечения		Баллы неврологического дефицита через 12 месяцев после терапии	
	Основная группа	Контрольная группа	Основная группа	Контрольная группа
Пирамидная	4,6±0,68	4,51±0,43	3,04±0,43 [^]	4,78±0,48 [#]
Мозжечковая	4,07±0,76	4,1±0,37	2,47±0,8 [^]	4,43±0,33 [#]
Краниальные нервы	3,03±0,84	3,2±0,66	1,8±0,48 [^]	3,8±0,56 [#]
Чувствительность	2,26±0,59	2,11±0,44	2,0±0,11	2,3±0,4
Тазовые функции	2,81±0,86	2,78±0,29	1,8±0,6 [^]	3,22±0,58 [#]
Зрение	1,46±0,77	1,65±0,33	1,3±0,2	1,77±0,09

Примечания: * - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 12 месяцев после лечения; ^ - достоверность различий между показателями до начала лечения и через 12 месяцев после лечения; # - достоверность различий между показателями контрольной и основной группы ($p < 0,05$)

Таблица 36 демонстрирует, что через 12 месяцев в основной группе пациентов после трансплантации фетальных нейроцитов удерживается первоначально достигнутый (после первой нейротрансплантации) клинический эффект. Помимо этого отмечается дальнейший регресс неврологического дефекта. Максимальное восстановление отмечено в функциях черепно-мозговых нервов, где при сравнении с первоначальными данными балл неврологического дефицита достоверно снизился на 41% ($p < 0,001$), в основном, за счет восстановления бульбарных нарушений. Достоверная динамика наблюдалась в системе мозжечковых нарушений, здесь восстановление было отмечено на 39% ($p < 0,001$), в сравнении с исходными показателями, Регресс пирамидных симптомов и тазовых нарушений, также достоверен, на 34% и 36% ($p < 0,001$), соответственно при сопоставлении с первоначальными баллами. При оценке чувствительных и зрительных расстройств отмечается тенденция к уменьшению неврологического дефицита.

В контрольной группе по данным шкалы функциональных повреждений Kurtzke наблюдается нарастание патологических симптомов, что подтверждается увеличением баллов неврологических нарушений при сопоставлении с исходными значениями. Через 12 месяцев после проведенного курса лечения мы наблюдали нарастание спастических парезов на 4%, мозжечковые нарушения углубились на 8% по данным шкалы повреждения функциональных система Kurtzke. Балл в системе краниальных нервов и тазовых органов увеличился на 16% и 14% соответственно.

Мы зафиксировали достоверную разницу в баллах между контрольной и основной группами с регрессом неврологического дефицита в следующих функциональных системах: в мозжечковой системе разница составила 44% ($p < 0,05$), в пирамидной системе - 36% ($p < 0,05$), в функциях тазовых органов и черепно-мозговых нервов разница составила 44% и 53% ($p < 0,05$) соответственно. По другим функциональным системам достоверных различий не выявлено.

3.7 Оценка эффективности трансплантации фетальных хондроцитов у больных с заболеваниями опорно-двигательного аппарата

Для решения поставленных задач нами обследовано всего 143 больных, из них ревматоидным артритом -98, остеоартрозом-45. Проведена трансплантация фетальных хондроцитов 93 пациентам. Контрольная группа: ревматоидный артрит-30, остеоартроз-20.

Проводились следующие исследования:

- Клиническое обследование: оценка состояния опорно-двигательного аппарата по 5-бальной шкале (приложение А);
- Лабораторная диагностика: уровень СОЭ, СРБ, фибриноген, серомукоид, ревматоидный фактор, иммуноглобулины, антитела к гистонам, суммарные антиядерные антитела, ПЦР-диагностика;
- Микробиологические методы исследования;
- Морфологическое исследование синовиальной оболочки;
- Исследование синовиальной жидкости;
- Лучевые методы диагностики: рентгенологическое , МРТ,
- Артроскопическое исследование;

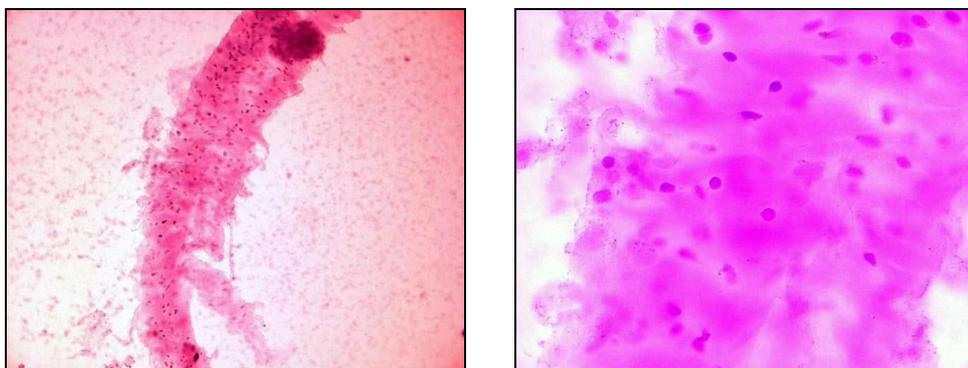


Рисунок 40. Морфологическая картина фетальных хондроцитов.

Состав взвеси фетальных клеток (в 1 мл взвеси):

а). Состояние целостности клеток (цитологически):

- 1) целые- 92.7%.
- 2) голаядерные- 5.3%.-
- 3) разрушенные- 2.0%.

б) Содержание протеинов в взвеси:

- 1) альфафетопротеин- 56%;
- 2) альбумин- 18%;
- 3) альфа-2глобулин- 11%;

4) вета-2микроглобулин- 15%

5) Биологически активные вещества:

в) Гормоны: гонадотропный, пролактин, лютеинизирующий, адренокортикотропный, соматотропный, тиреотропный, кортизол, фолликулостимулирующий, эстрогены, андрогены.

г) Цитокины, интерлейкины, факторы некроза опухоли, моноклональные антитела, фактор роста гепатоцитов, тромбоцитов.

Путь введения: фетальные хондроциты вводились в головку бедренной кости, в медиальный мыщелок большеберцовой кости, в полость сустава под рентгенконтролем и под контролем артроскопии.

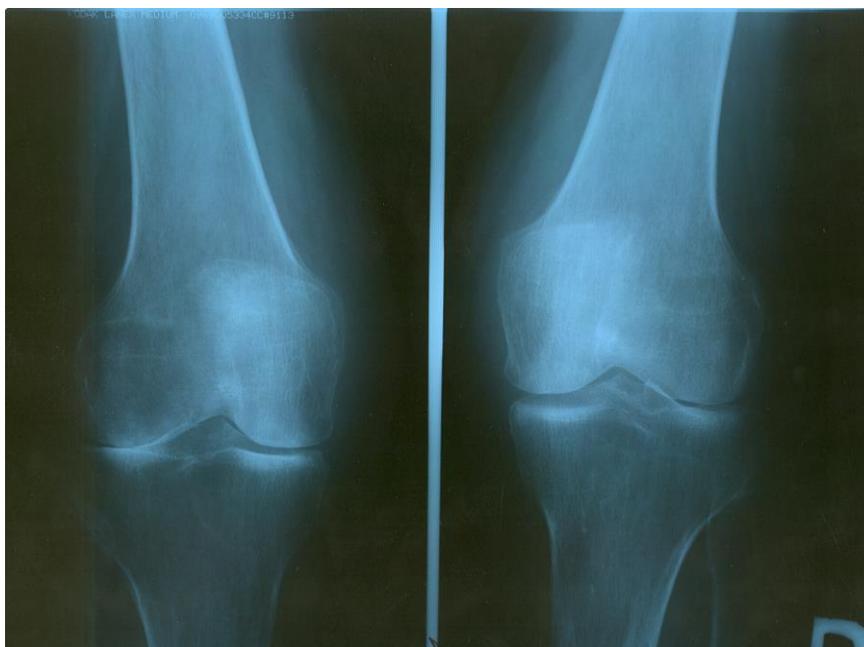


Рисунок 41. Пациентка О., 46 лет, рентгенография коленных суставов до трансплантации фетальных хондроцитов.

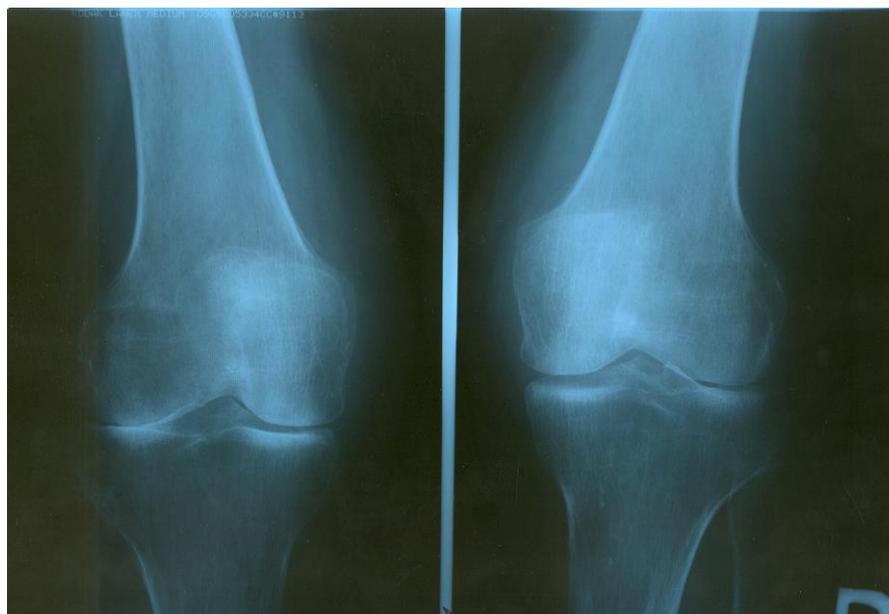


Рисунок 42. Пациентка О, 46 лет, Рентгенография коленных суставов через 3 месяца после трансплантации фетальных хондроцитов методом артроскопии

Собственные результаты исследования

Обследовано 143 больных ревматоидным артритом и 45 больных остеоартрозом, проведена трансплантация фетальных хондроцитов всего 93 больным, из них ревматоидным артритом 45, асептический некроз 24, остеоартрозом 25. Контрольная группа: ревматоидный артрит -30, остеоартроз -20. Возраст больных варьировал от 21 до 68 лет. Клинико-лабораторные и рентгенологические параметры и динамическое наблюдение после трансплантации фетальных хондроцитов (ФХ) проводилось в течение 3-х лет. Все пациенты обеих групп регулярно наблюдались амбулаторно и госпитализировались в клинику ННМЦ, диагноз был верифицирован по общепринятым критериям согласно международной статистической классификации болезней класс XIII. Суставной синдром оценивался по 3-х бальной системе Лансбури (Л). Рентгенологические критерии по методике А.Ларсена (1987).

Исследуемые больные распределены по группам в зависимости от диагноза, стадии процесса РА, длительности заболевания, возрасту, половой принадлежности.

Полученные результаты:

Результаты исследования представлены в таблицах 37, 38, 39,40.

Таблица 37. Характеристика больных по нозологическим группам

Кол-во, пол	Ревматоидный артрит	Асептический некроз головки бедренной кости	Остеоартроз

n=	45	24	24
Мужчин	15	13	8
Женщин	30	11	19

Таблица 38. Распределение больных ревматоидным артритом по стадии поражения

Кол-во, пол	II	III	IV
n=	12	27	6
Мужчин	8	5	2
Женщин	4	22	4

Таблица 39. Распределение больных остеоартрозом по стадии поражения

Кол-во, пол	I	II	III
N	5	9	10
Мужчин	2	3	3
Женщин	3	9	7

Таблица 40. Динамика лабораторных показателей больных ревматоидным артритом после трансплантации

Параметры	до трансплант.	через месяц	через 6 мес	через год
СОЭ	35 ± 5	30±5	20±5	20±5
СРБ	++++	++	+++отр	отр+++
Фибриноген	6,0±2,0	4,0 ±2,0	4,0	
гамма-глобулины	26,0±2,0	18,0±2,0	18,0±2,0	17,0±2,0
РФ	полож.	отриц.	полож.	полож
ANA, ENA	полож	отриц.	отриц.	отриц
Иммуноглобулины:				
A	5,5±2,5	4,5±2,0	4,5±2,0	3,5±2,0
G	22,8 ±2,4	21,0±2,0	18,0±2,0	18,0±2,0
Серомукоид	0,800±0,200	0,400±0,200	0,200±0,100	0,200±0,100

3.8 Оценка эффективности трансплантации островковых клеток у больных сахарным диабетом

Все более широкое внедрение различных трансплантационных методов лечения диабета в виде пересадки островковых клеток и поджелудочной железы открывают новые перспективы для улучшения возможностей компенсации, качества жизни и профилактики

осложнений у больных диабетом как 1-го, так и 2-го типа. Общее количество проведенных рентгеендоваскулярных трансплантаций фетальных островковых клеток (РЭТФОК) за 3 года составило – 133 (таблицы 41, 42). Из них пациентам с сахарным диабетом 1 типа 58, сахарным диабетом 2 типа – 75.

Таблица 41. Динамика показателей у больных сахарным диабетом 1 типа, (n = 58)

Параметры	До ТФК	через 1месяц	через 6 мес.	через год
Уровень тощачковой гликемии	12,5 ± 8,0	10,5±5,0	11,0±7,0	9,0±4,0
Гликированный гемоглобин	11,0±1,2	9,8±1,0	9,0±0,8	8,0±1,1
С-пептид	0,30±0,28	0,60 ±0,56	0,30±0,25	0,40±0,1

Таблица 42. Динамика показателей у больных сахарным диабетом 2 типа, (n = 77)

Параметры	До ТФК	через 1месяц	через 6 мес	через год
Уровень тощачковой гликемии	11,5 ± 6,6	8,5±4,0	9,0±4,3	7,0±3,0
Гликированный гемоглобин	11,0±1,4	9,4±1,0	8,7±0,8	7,6±1,0
С-пептид	0,30±1,4	0,60 ±1,3	1,0±1,3	1,0±1,4

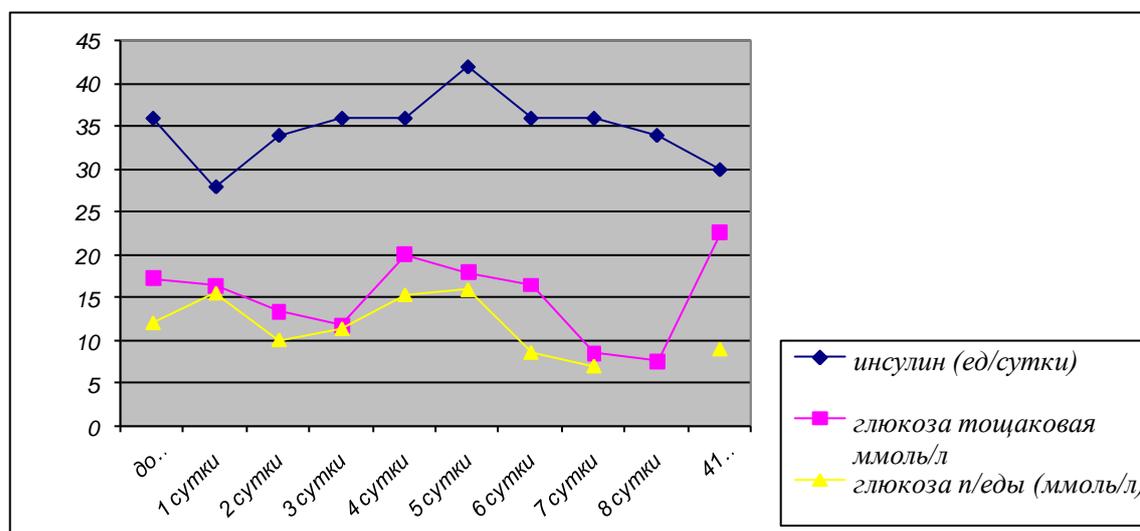


Рисунок 42. Доза инсулина после ТОК

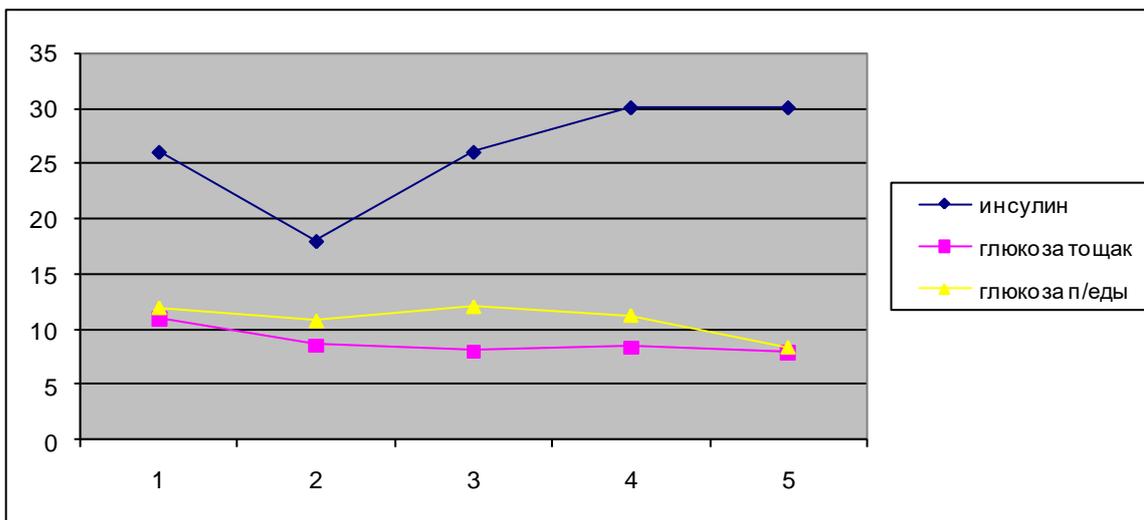


Рисунок 43. Доза инсулина после ТОК

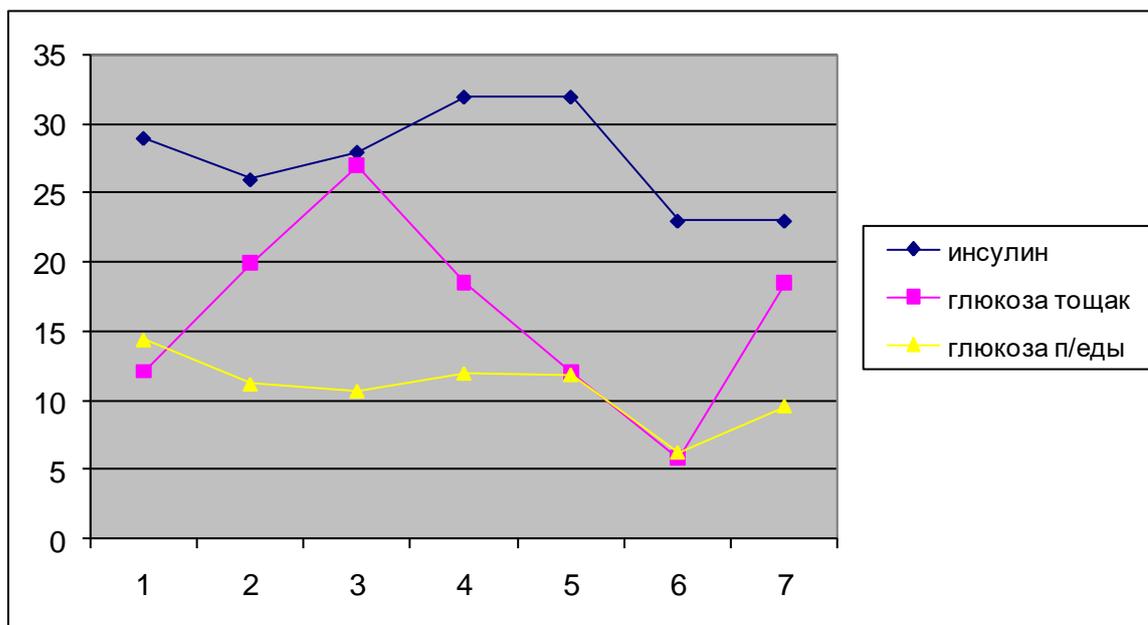


Рисунок 44. Доза инсулина после ТОК

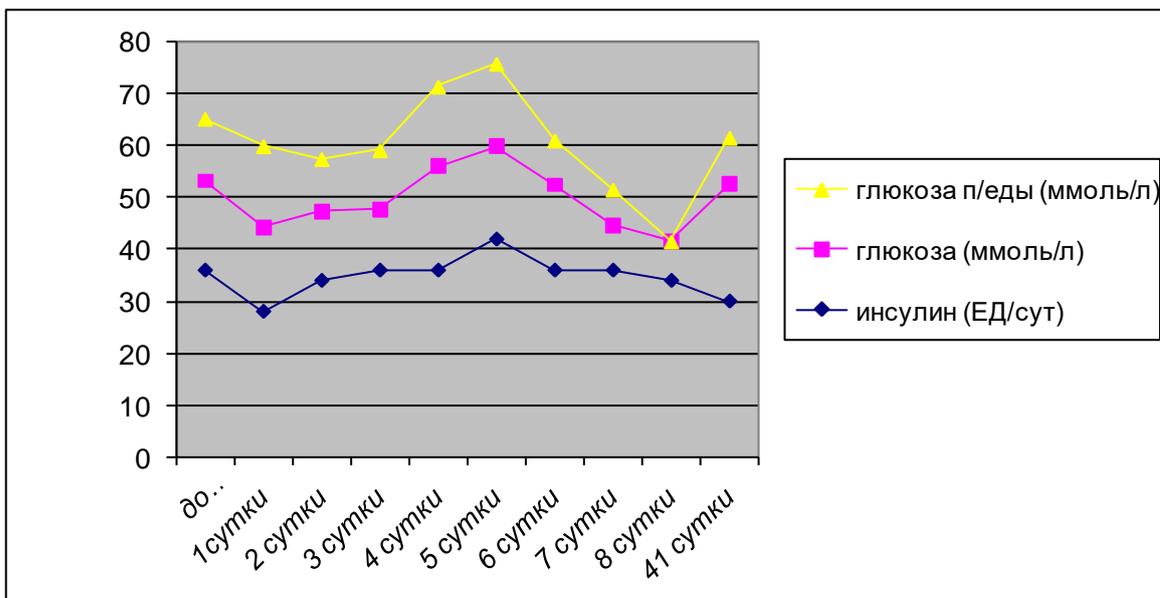


Рисунок 45. Доза инсулина после ТОК



Рисунок 46. Соотношение между показателями тощачевой гликемии и суточной дозой инсулина после трансплантации у пациента с СД типа 2

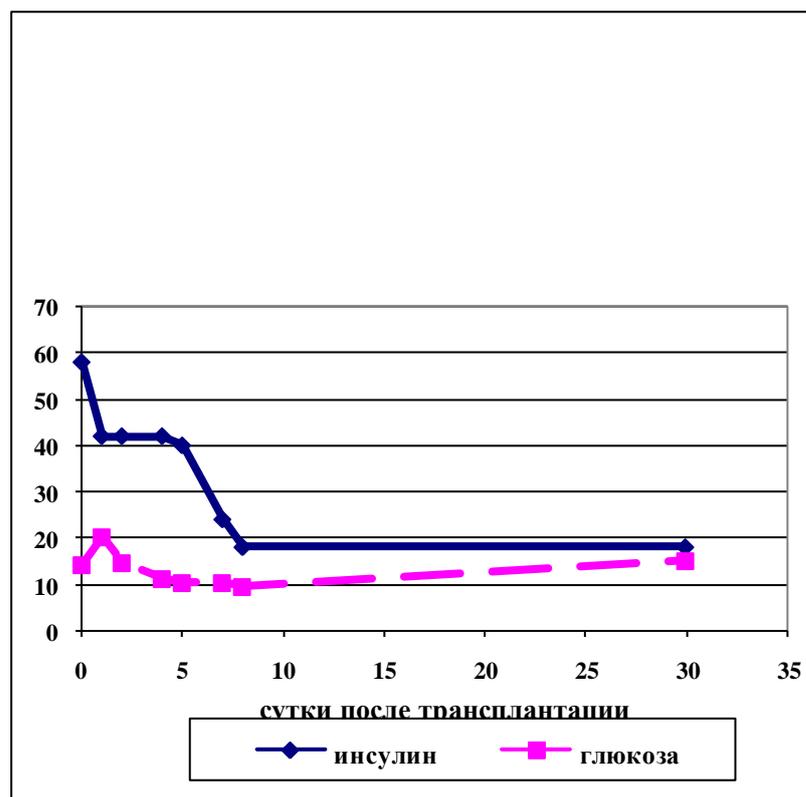


Рисунок 47. Соотношение между показателями постпрандиальной гликемии и суточной дозой инсулина после трансплантации у пациента с СД типа 2

Проведенные в динамике после трансплантации клиничко-объективные данные, результаты обследования и анализ качества сахароснижающей терапии позволили сделать следующие выводы:

1. стабилизация течения сахарного диабета – у 82 % больных;
2. уменьшение дозы короткого инсулина у больных сахарным диабетом 1 типа на 28% - у 76% пациентов;
3. уменьшение дозы пролонгированного инсулина у больных сахарным диабетом 2 типа на 32% - у 84% больных;
4. снижение дозы инсулина у больных сахарным диабетом 2 типа на 66% - 75% пациентов;
5. отмена инсулинотерапии у больных сахарным диабетом 2 типа – 12% пациентов;
6. снижение дозы пероральных средств у больных с сахарным диабетом 2 типа – у 79% пациентов.

Заключение

В последнее время экспериментальные исследователи и практические врачи широко пользуются методами клеточной биотехнологии в трансплантологии при лечении различных заболеваний органов и тканей.

Клеточная терапия давно завоевала огромную популярность среди исследователей и практикующих врачей, посредством которой можно добиваться коррекции различных заболеваний. И это легко объяснимо, любой живой организм образован клетками различных типов, характерным образом организующихся в ткани, которые формируют органы, заполняют между ними пространство или покрывают снаружи. Одним из направлений клеточной терапии является трансплантация фетальных клеток, получаемых из абортивного материала. На данный момент методом трансплантации фетальных клеток проводится лечение заболеваний различных органов, в частности диффузных заболеваний печени, посттравматических и дегенеративных заболеваний центральной и периферической нервной системы, патологии щитовидной железы и многих других нозологических форм.

В связи с этим, было проведено исследование на эффективность использования фетальных стволовых клеток при хронических диффузных заболеваниях печени, гипотиреозе, хронический гломерулонефрит, органических заболеваний ЦНС, дегенеративных

заболеваний опорно-двигательного аппарата, сахарном диабете. В результате данных исследований мы пришли к соответствующим выводам.

1. Применение глицерина для поддержания жизнеспособности фетальных клеток человека в условиях гипотермии выявило более стойкий криопротективный эффект и высокую морфофункциональную активность клеток после размораживания, в сравнении с другими криопротекторами (Глюгоцир, Биосифос, ДМСО). Разработанный технологический режим длительной низкотемпературной консервации фетальных клеток человека в среде с глицерином, заключающийся в применении протокола - «медленное замораживание / быстрый разогрев» с прерывистым замораживанием при $t = -25^{\circ}\text{C}$ (30 минутная экспозиция), показал высокую выживаемость фетальных клеток печени человека через 1 год, составляющую 95,4% целых (живых) клеток от изначального уровня жизнеспособности, с высоким уровнем функциональной активности в интервале от 0 до 60 минут после размораживания без дополнительной энергетической подпитки. Применение криопрезервированных фетальных гепатоцитов у больных циррозами печени показало их клиническую эффективность независимо от срока хранения. Сравнительная оценка трансплантации свежеизолированных и криопрезервированных фетальных печёночных клеток не выявила достоверной разницы, что позволило создать банк фетальных гепатоцитов. Применение криоконсервированных фетальных клеток (спинного и головного мозга, щитовидной железы, хондроцитов, нефроцитов) у больных с недостаточностью внутренних органов, показало их клиническую эффективность и создает предпосылки для дальнейшего развития этого направления реконструктивной хирургии.

2. При циррозе печени вирусной и токсической этиологии и в исходе аутоиммунных заболеваний ТФГ приводит к регрессии основных клинических синдромов, снижению уровня общего билирубина, АЛТ, ГГТП, повышению сывороточного альбумина, укорочению тромбинового времени, что позволяет рекомендовать данные параметры в качестве критериев эффективности трансплантации фетальных гепатоцитов.

3. Проведенная трансплантация фетальных тиреоцитов приводит к уменьшению симптомов гипотиреоза с улучшением качества жизни, стабилизации гормонального статуса и снижению дозы заместительных тиреоидных гормонов.

4. Динамическое наблюдение в течение 12-18-ти месяцев показало, что проведенная трансплантация фетальных нефроцитов снижает темпы прогрессирования в виде стабилизации и отсутствия прироста уровня сывороточного креатинина у больных с ХПН 1 ст., а у пациентов с ХПН 2 и 3 ст. отмечается улучшение качества жизни в виде уменьшения признаков уремической интоксикации и стабилизации АД.

5. После применения метода трансплантации фетальных нейроцитов у больных с органическими заболеваниями центральной и периферической нервной системы отмечался положительный клинический эффект в виде частичного регресса неврологической симптоматики и улучшения качества жизни в сравнении с пациентами контрольной группы, получавших традиционную терапию.

6. Динамическое наблюдение в течение года после проведения трансплантации фетальных хондроцитов показало, что улучшается качество жизни больных, купирован болевой синдром, синовит, увеличивается объем движений в данном суставе, положительная рентгенологическая динамика.

7. Проведенная трансплантация фетальных островковых клеток поджелудочной железы приводит к стабилизации течения сахарного диабета, достижению компенсации углеводного обмена на фоне уменьшения доз сахароснижающих препаратов.

Список использованных источников

1. Хазанов А.И., Васильев А.П., Пехташев С.Г. и др. Значение основных и добавочных этиологических факторов в развитии HCV- и HBV- циррозов печени //Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2001, Т.11, № 4, С. 8-12.
2. Никитин И.Г. Лечение хронического гепатита С: вчера, сегодня, завтра.// Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол., 2002, Т.ХII, № 6, 11с.
3. Тареев Е.М., Назаретян Е.Л., Семендяева М.Е., Таррева И.Е. Эпидемический гепатит, Медицина, Москва, 1970, 36с.
4. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей, Пер. с англ., М. ГЭОТАР Медицина, 1999, 19с.
5. Ивашкин В.Т.с соавт. Болезни печени и желчевыводящих путей, М., ООО «Издат дом «М-Вести», 2002, С. 134-138.
6. Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver Biopsy Interpretation, 5 th edn. WB Saunders, Philadelphia, 1994, P. 23-35.

7. Камалов Ю.Р. Значение ультразвукового исследования при хронических диффузных заболеваниях печени. М., 1987, 28с.
8. Камалов Ю.Р., Сандриков В.А., Крыжановская Е.Ю., Цирульникова О.М. Ультразвуковые доплеровские параметры печёночного кровотока при циррозе печени: зависимость от стадии по Чайлд и степени расширения варикозных вен пищевода.// Сб. научн. трудов РНЦХ «Ультразвуковая, лучевая и функциональная диагностика», М., 2002, С.162 – 163.
9. Северов М.В., Минакова Е.Г., Олейникова Е.Б., Северова М.М. Фиброз печени – возможна ли динамическая оценка его развития неинвазивными методами? //Сб. научных трудов, Москва – Тула, 2002, С.266 – 267.
10. Винницкая Е.В. Сравнительная оценка диагностической значимости серомасштабной сонографии и сцинтиграфии печени при хронических диффузных заболеваниях печени. // Сб. научн. тр., М. 1988, С. 101 – 105.
11. Камалов Ю.Р., Северов М.В. Диагностические возможности ультразвукового исследования печени // Тер. Архив., 1986, Т. 58, № 2, С. 89-90.
12. Баспаев Б.И., Елеуова Б.У., Аймагамбетов И.Н., Галкин В.А., Аскангалиев К.Ж., Поляков В.И., Бралов З.Б., Сахипов С.Ж. Ультразвуковая диагностика в хирургии // Здоровоохранение Казахстана, 1989, № 3, С. 46 – 48.
13. Шатихин А.И., Дрозд Т.Н., Мальцев В.А., Кованов В.В. Ультразвуковые и морфологические параллели у больных хроническими диффузными заболеваниями печени // Тер. Архив, 1983, Т. 55, №2, С. 45 – 48.
14. Митьков В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике. М., Видар, 1996, Т.1,336 с.
15. Цыб А.Ф., Котляров П.М., Дергачёв А.И., Демин В.А., Косичкин М.М. Руководство по ультразвуковой диагностике заболеваний органов брюшной полости и забрюшинного пространства. М., 1993, 100 с.
16. Бирюков В.П., Алмолдин С.А., Мукашев У.И. Ультразвуковая диагностика заболеваний гепатобилиарной системы // Здоровоохранение Казахстана, 1988, № 3, С. 64 – 65.
17. Ходжибеков М.Х., Расхиева Л.Э., Назыров Ф.Г. Радионуклидное и ультразвуковое исследование при циррозе печени с портальной гипертензией // Мед. радиология, 1988, №8, С. 42-47.
18. Ходжибеков М.Х., Расхиева Л.Э., Назыров Ф.Г. Радионуклидное и ультразвуковое исследование при циррозе печени с портальной гипертензией // Мед. радиология, 1988, №8, С. 42-47.

19. Галимова С.Ф., Надинская М.Ю., Маевская М.В., Ивашкин В.Т. Новые данные о диагностике и течении фиброза печени. // Рос. журнал гастроэнтерол., гепат., колопроктол., 2001, №4, С.22 – 28.
20. Шерлок Ш. Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей, Пер. с англ. – М. ГЭОТАР Медицина, 1999, 425с
21. М.В.Северов, Е.Г.Минакова, А.В.Макаров, Т.Х.Фатхутдинов, М.М.Северова. Фиброз печени – новая страница в клинической гепатологии. // Клиническая фармакология и терапия, 2003, №1, С. 28 – 29.
22. Галимова С.Ф., Надинская М.Ю., Маевская М.В., Ивашкин В.Т. Новые данные о диагностике и течении фиброза печени. //Рос. журнал гастроэнт., гепатол., колопроктол., 2001, №4, С. 22-28.
23. М.В.Северов, Е.Г.Минакова, А.В.Макаров, Т.Х.Фатхутдинов, М.М. Северова. Фиброз печени – новая страница в клинической гепатологии. Клиническая фармакология и терапия, 2003, №1, 27с.
24. Хазанов А.И. Функциональная диагностика заболеваний печени, М., Медицина, 1998, 301с.
25. Яковенко Э.П., Григорьев П.Я. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение // РМЖ, 2003, №5, С.11.
26. Окорочков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов. Москва, 2002, 548 с.
27. Kuzushita N., Hayashi N., Katyama K. et. al. High levels of serum interleukin-10 are associated wiith a poor respont to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C // Scand. J. Gastroenterol., 2000, V.32, №2, P.169-175.
28. Серов В., Апросина З., Игнатова Т. Вирусный гепатит - ведущая проблема современной медицины // Врач, 2002, №10, С.3.
29. Абдурахманов Д.Т. Вирус гепатита В в патологии человека // Клин. фарм. и терапия, 2002, №11, С.48-50.
30. Modal L., Lai M. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic and antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication // J. Virol., 2000, №74 (16), P.7373-7380.
31. Никитин И.Г., Сторожаков Г.И., Байкова И.Е. Вирусный гепатит дельта: актуальные вопросы эпидемиологии, естественного течения и терапии // Клиническая фармакология и терапия, 2002, №11 (2), С.20-22.
32. Дмитриева Е.В., Москалева Е.Ю., Северин Е.С. Роль апоптоза в патогенезе хронических вирусных гепатитов В и С // РЖГГК, 2003, №5, С.7-73.

33. Григорьев П.Я., Яковенко Э.П. Диагностика и лечение органов пищеварения. Москва, 1996, 151 с.
34. Молдагалиева Ж.Т. Вирусный гепатит и его актуальность // Сборник тезисов международной конференции «Актуальные проблемы гепатологии» Астана, 18-19 июня 2002, 159 с.
35. Ивашкин В.Т. Болезни печени и желчевыводящих путей. Москва, 2002, 416с.
36. Майер К.П. Гепатит и последствия гепатита. Москва, 1999, 423с.
37. Gzaja A.J. Autoimmune hepatitis//J Amer. J. Epidemiol., 1996, V. 144, P. 290-299.
38. Ильченко Л.Ю., Голованова Е.В. Первичный билиарный цирроз // БОП, 2002, Т.4, №1, С.18-21.
39. Маянский Д.Н., Зубахин А.А. Клеточно-молекулярные механизмы формирования цирроза печени // РЖГГК, 1998, Т.8, №6, С.6-13.
40. Пальгова Л.К. Цирроз печени. Современная фармакотерапия основных клинических симптомов и синдромов // Медицина, 2003, №3, С.8.
41. Подымова С.Д. Болезни печени. Москва, 1998, 704с.
42. Маевская М.В. Алкогольная болезнь печени //Consilium Medicum, 2002, Т. 3, №6, С.19-23.
43. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. Москва, 2002, С.864.
44. Непомнящих Д.Л., Попов А.Л. Эндоскопический и патоморфологический анализ состояния слизистой оболочки желудка при хроническом гепатите // Новосибирск, 1998, 237с.
45. Игнатова Е.М., Апросина З.Г., Серов В.В. и др. Внепеченочные проявления хронического гепатита С // Тер. арх., 1998, № 70(11), С.9-16.
46. Комаров Ф.И., Заводская И.С. Нейрогенные механизмы гастродуоденальной патологии Москва, 1984, 357с.
47. Жеребцов Л.А. О сочетании хронического гепатита и цирроза печени с язвенной болезнью желудка или двенадцатиперстной кишки // Клиническая медицина, 1971, Т.49, №1, С.94-98.

48. Нерсесов А.В. Заболевания желудка и двенадцатиперстной кишки, сопутствующие активной фазе хронического гепатита; тактика их лечения // Медицина, 2001, №3, С.36-37.
49. Герловин Е.Ш. Пролиферативные свойства эпителия слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки при хроническом гепатите и циррозе печени // Архив патологии, 1977, Т41, №1, С.43-47.
50. Braniki F.J., Coleman S.Y., Fok P.J. et al. Bleeding peptic ulcer: a prospective evaluation fo risk factors for rebleeding and mortality // Word. J. Surg., 1990, V.14, №2, P.262-270.
51. Di Mario F., Gottardello L., Germana B. et al. Peptic ulcer in cirrhotic patients: a short – and long-term study with antisecretory drugs // Ital. J. Gastroenterol., 1992, V.24, P.122-125.
52. Ханевич М.Д., Хрупкин В.И. и др. Кровотечения из хронических гастродуоденальных язв у больных с внутрпеченочной портальной гипертензией. Новосибирск, 2003, 87с.
53. Радченко В.Г., Шабров А.В., Нечаев В.В. Хронические заболевания печени. С-Пб., 2000, 190с.
54. Sebiff E., Sorrell M., Maderry W. ed. by. Diseases of the Liver // Hepatol., 1999, №1, P.943-77.
55. Шулушко Б.И. Болезни печени и почек. С-Пб., 1995, 479 с.
56. Мукомолов С.Л., Вамкова И.В., Чайка Н.А. Вирусные гепатиты, С-Пб., 1992, 93 с.
57. Гребенев А.Л., Хазанов А.И. Подымова С.Д. и др. Болезни печени и билиарной системы. Москва, 1995, 528с.
58. Fleig W.E., Stange E.F., Winkler K. Chronic hepatitis B // J. Gastroent. 1987, №3, P.47-51.
59. Логинов А.С., Аруин Л.И. Клиническая морфология печени. М., 1985, 753с.
60. Hoofnagle J.H. Chronic Hepatitis B // N. Engl. y. Med., 1990, V.323, №5, P.337-339.
61. Magnus L.O., Espmark J.A. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouver determinants // J. Immunol., 1992, №109, P.1017-1025.

62. Маянский А.Н., Бурков А.Н., Астафьев Д.Г. и др. Персистенция вирусов: иммунологические и патогенетические аспекты // Клиническая медицина, 1998, №12, С.19-25.
63. Kawai K., Misaki F. et al. Hepatitis B vaccine down under // Med. Klin, 1971, №66 (3), P.83-87.
64. Arrieta J.J., Rodriguez-Inigo E., Casqueiro M. et al. Detection of hepatitis C virus replication by in situ hybridization in epithelial cells of anti-hepatitis C virus-positive patients with and without oral lichen planus // Hepatology, 2000, №32, P97-103.
65. Muller R. Interferons in chronic viral hepatitis // Hepatogastroenterology, 1991, V.38, P.4-9.
66. Балаян М.С., Михайлов М.И. Энциклопедический словарь - вирусные гепатиты. Москва, 1994, 207с.
67. Игнатова Т.М., Апроксина З.Г., Шехтман М.М. Вирусные хронические заболевания печени и беременность // Акуш.и гин., 1993, №2, С.20-24.
68. Brown S.A., Inada R.K., Gillin J.C. et al. Prospects for hepatitis C vaccine // Am. J. Psychiatry, 1995, V.152, P.45-52.
69. Di Perri T., Sacco T. et al. Hepatitis C virus six years on // Gastroenterol., 1999, №12 (2), P.62-8.
70. Dibisceglie A.M. Hepatitis C: the promise and the challenge // Hepatology, 1995, №22, P.660-664.
71. Feray C., Gigou M., Samuel D. et al. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation // Gastroenterology, 1995, №108, P.1088-1091.
72. Menealos N., Manoussakis M.D. Salivary gland diseases // Otolaryngol. Clin. N. Am., 1999, №32 (5), P.843-860.
73. Gretch D.R., Bacchi C.E., Gorey L. et al. Persistent hepatitis C virus infection after liver transplantation: Clinical and virological features // Hepatology, 1995, №22, P.1.
74. Campo S., Crax A., Di Marlo V., Tringali A. Hepatitis C virus: a Cause of cryptogenic Liver Disease // Hepatology, 1996, V.25, №1, P.78-87.
75. Farci P., Mandas A., Coiana A. et al. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a // N.Engl. J. Med., 2000, V.330, №2, P.88-94.

76. Mc.Cormack T.T., Sims J.,Eyre-Brook I. et al. Viral hepatitis // J. Gastroent., 1985, V.26, №11, P.1226-1232.
77. Васильев Н. В., Коляда Т. И., Волянский Ю. Л. и др. // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека. Сб. статей. - 1996. - С. 28-30.
78. Александрова М.А., Полтавцева Р.А., Марей М.В. и др. Трансплантация культивированных нейральных прогениторных клеток человека в мозг крыс: миграция и дифференцировка// Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 2001. №10.
79. Брюховецкий А.С. Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях. – М. – 2003.- С. 13-17.
80. Доскалиев Ж. А., Исмагилов Р. З., Рысбеков М. М. и др. Интрапортальная имплантация культуры островковых клеток поджелудочной железы больным инсулинзависимым сахарным диабетом. // Сборник научных трудов « Актуальные проблемы клинической хирургии». – Алматы, 1997 г. – С. 52-53.
81. Доскалиев Ж. А., Григоревский В. П., Туганбекова С.К. и др. Опыт применения трансплантации фетальных нефроцитов. // Центрально-азиатский медицинский журнал.- 2004. - Т. X,- приложение 5, - С. 83 - 84.
82. Доскалиев Ж. А., Хамзабаев Ж .Х., Григоревский В. П. и др. Применение контрастных веществ при трансплантации фетальных гепатоцитов. // Медицина. – 2003. - № 6 - С. 37-38.
83. Овечко В.Н. Нейрохирургическое лечение больных с цереброорганическим и эпилептическим синдромом методом трансплантации эмбриональной нервной ткани: Автореф. дис. канд. мед. наук.-СПб., 1995.
84. Гусев Е.И., Демина Т.Л., Бойко А.Н. // Рассеянный склероз. – М. – 1997.
85. Демина Т.Л. Клинико-иммунологические изучения больных рассеянным склерозом и вопросы патогенетической терапии: Автореф. дис. д-ра мед. наук – М., 1992.
86. С.Е. Blumer, S Quin., Prevalence of spinal cord injury: an international comparison. Neurospidemiology, 1995.
87. Бехтерева Н. П., Гилерович Е. Г., Гурчин Ф. А. и др. // Журн. невропатол. и психиатр. - 1990. - Т. 90, № 11. - С. 10-13.
88. Новик А.А., Ионова Т.И., Кайнд П. Концепция исследования качества жизни в медицине. Ст-Петербург: Элби 1999.
89. Доскалиев Ж.А., Омарова К.П.. К вопросу о получении фетальных гепатоцитов и оценки их жизнедеятельности //Астана медициналык журналы.-2000.-№4.-С.80-82.

90. Крылова А.К. Гастроэнтерологические аспекты клиники внутренних болезней // Тер. арх., 1991, №32, С.139-141.
91. Виноградова Е.Н. Вирусный гепатит С. С-Пб., 1996, 122 с.
92. Покровский В.И. Инфекционные болезни. Москва, 1996, 528с.
93. Григорьев П.Я., Яковенко Э.П. Течение и исход хронических гепатитов // Южно-рос. мед. журн., 2000, №31, С.1-2.
94. Преображенский В.Н., Златкина А.Р., Уметова М.Д. Практическая гастроэнтерология. Алматы, 1999, 430 с.
95. Григорьев П.Я., Яковенко А.В. Справочное руководство по гастроэнтерологии. Москва, 2003, 469 с.
96. Nakanuma Y., Harada K., Kajit K. et al. Clinicopathological Study of Primary Biliary Cirrhosis Negative for Antimitochondrial antibodies // Liver AN Intern. Journal., 2001, V.17, №6, P.281-287.
97. Ивашкин В.И., Хазанов А.И. К новой классификации хронических гепатитов // РМЖ, 1995, Т.1, №3, С.7-10.
98. Решетняк В.И. Механизм развития внутрипеченочного холестаза и лечение больных ПБЦ // Южно-рос. мед. журн., 1996, №7, С.12-15.
99. Ивашкин В.Т., Буеверов А.О. Аутоиммунные заболевания печени в практике клинициста. Москва, 2001, 336 с.
100. Sherlock S., Dooley J. Diseases of the liver and Biliary System // Hepatol., 1993, №17, P.1063-1082.
101. Ягода А.В. Молекулярно клеточные аспекты патогенеза, клиники и лечение хронического гепатита и цирроза печени. Автореф.... док. мед. наук: 18.09.94. М.:МГУ, 1994, 27с.
102. Апросина З.Г. Хронические диффузные заболевания печени // Клиническая фармакология и терапия, 1996, №5 (1), С.14-18.
103. Григорьев П.Я., Яковенко А.В. Клиническая гастроэнтерология // Москва, 2001, 704с.
104. Трэвис С.П., Тэйлор Р.Х., Мисевич Дж. Дж. Гастроэнтерология. Москва, 2002, 640с.

105. Курдыбайло Ф.В., Шляхтенко Л.И., Нечаев В.В. Хронические гепатиты и циррозы печени (клиника, диагностика, лечение, профилактические и противоэпидемические мероприятия). Методические рекомендации, Л., 1987, 24 с.
106. Hill D.B., Marsano L.S., McClain C.J. Increased plasma interleukin 8 concentration in alcoholic hepatitis // *Hepatology*, 1993, V.18, P.576.
107. Abittan Cb., Lieber Cb. Hepatitis C and alcohol // *Clin. Perspect Gastroenterol*, 1999, P.257-263.
108. Высоцкая Р.А., Логинов А.С., Кондрашова З.Д. и др. Простагландины слизистой оболочки печени при циррозе печени // *Вопр. мед. химии*, 1992, Т.38, №1, С.26-28.
109. Циммерман Я.С. Хронический алкогольный и неалкогольный стеатогепатиты // *Клиническая медицина*, 2004, №7, С.9-14.
110. Григорьев П.Я., Георгиевский Н.И., Трийгер И.И. и др. Некоторые особенности состояния гастродуоденальной зоны у больных хроническим гепатитом // *Тер. архив*, 1976, Т. 48, №9, С.57-60.
111. Яхонтова О.И., Крутских Е.В. Секреторные и морфологические нарушения желудка и двенадцатиперстной кишки у больных хроническим гепатитом и циррозом печени // *Клин. мед.*, 1974, №7, С.67-71.
112. Катаев С.С., Шифрин О.С., Голованова О.Ю. и др. Гепатогенная язва // *Клин. мед.*, 1989, №6, С.32-36.
113. Крылова А.А. О патогенетических соотношениях гастродуоденальных язв и хронических заболеваний печени // *Клинич. медицина*, 1985, №2. С.145-148.
114. Ивашкин В.И., Хазанов А.И., Васильев А.С. и др. Вирусы гепатитов В и С: эпидемиология, роль в патогенезе острых и хронических заболеваний печени // *РЖГГК*, 1994, №2, С.12-15.
115. Таточенко В.К. Гепатит В. Стратегия профилактики в России и за рубежом // *Медицина для всех*, 1996, №1, С.8-10.
116. Holbert V.L., Campbell W.L., Skolnick M.L. Evaluation of transplanted liver and postoperative complication // *Radion. Clin. North. Am.*, 1995, №33, P. 521.
117. Апросина З.Г., Серов В.В., Крель П.Е., Игнатова Т.М. Внепеченочные проявления хронических вирусных заболеваний печени // *Архив патологии*, 1999, №5, С.51-55.

118. Koike K., Morya K., Ishibashi K. et al. Sialodenitis histologicallly resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis B virus envelope genes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, №94 (1), P.233-236.
119. Luketic V.A., Shiftman M.L., McCall J.B. et al. Sialodenitis liver for chronic hepatitis B infection // J. Ann. Intern. Med., 1991, P114-112.
120. Menelaos N., Manoussakis M.D. Salivary gland diseases // Otolaryngol. Clin. N. Am., 1999, №32 (5), P.843-860.
121. Finkel E. Hepatitis B vaccin down under // Lancet., 1997, V.349, №9066, P.1680.
122. Kang J.P. Peptic ulcer in hepatic cirrhosis and renal failure // J. Gastroenterol. Hepatol., 1994, V.9, №1, P.20-23.
123. Эльштейн Н.В. Ошибки в гастроэнтерологической практике. Причины, тенденции, профилактика. Москва, 1998, 224 с.
124. De Vita S., Sansonno D., Dolcetti R. et al. Hepatitis virus within lesion in the course crioglobulinemia // Hepatology, 1995, №86, P18-39.
125. Катаев С.С. Функционально-морфологическое состояние желудка, двенадцатиперстной кишки и поджелудочной железы у больных хроническим гепатитом и циррозом печени различной этиологии. Автореф. ... докт. мед. наук: 12.14.02. М.:ММА, 1992, 30 с.
126. Cacoub P., Renou C., Rosenthal E. et al. Extrahepatic manifestations associated with hepatitis C virus infection, a prospective multicenter study of 321 patients // Medicine (Baltimore), 2000, №79 (1), P. 47-56.
127. Jorgensen C., Legouffe M. C.,Perney P. et al. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection // Arthr. and Rheum., 1996, №39 (7), P.1166-1171.
128. Ерамишанцев А.К., Готье С.В., Цирульникова О.М. Проблема пересадки печени в 1996 г. Отбор больных для пересадки печени. Ведение больных после операции // РЖГГП, 1997, Т.7, №1, С.80-83.
129. Чистова Л.В., Панченко Е.Л., Дворяковский И.В. О механизмах воздействия трансплантации фетальных тканей человека на патологический процесс в печени у детей с хроническим вирусным гепатитом и циррозом печени //Бюл. эксперим.биол. и мед.- 1998.- С.117-125.

130. Омарова К.П. - Перспективы использования гепатоцитов для коррекции различных форм печеночной недостаточности, //Астана медициналык журналы.-2000.- №4.- С.19 –22.
131. Зудакова-Суворова Р. Ф., Калинина Г. П., Макаренко К. И.// Всероссийский съезд эндокринологов, 2-й: Тезисы докладов. – Челябинск, 1991. – С. 155
132. Алиев М. А., Мамадалиев С. М., Рысбеков М. М. и др. Клинический опыт трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы. // Здравоохранение Казахстана. – 1995 г. - № 11. – С. 49-50.
133. Lillioja S., Mott D.M., Howard B. V. et al. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. // N. Engl. J. Med. – 1988. – Vol. 318. – P. 217-225.
134. Zimmet P. Z., McCarty D., de Courten M. P. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. // J. Diabetes Complications. – 1997. – Vol. 11. – P. 60-68.
135. Zimmet P. Epidemiology and natural history of type 2 diabetes and the prediabetic state. // Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. – 1999. – Vol. 6 (suppl. 1). – P. 23-27.
136. Holde A. M., Dowse G. K., Zimmet P. Z. et al. Prevalence and secular trends in obesity in Pacific and Indian Ocean island populations. // Obes. Res. – 1995. - Vol. 3 (suppl 2). – P. 77-87.
137. McCarty D., Zimmet P. Diabetes 1994 to 2010: global estimates and projection. – Melbourn: International Diabetes Institute, 1994. – 84 P.
138. Prevention of Diabetes Mellitus: Report of WHO Study group. // Technical Report Series № 844. – Geneva: 1994. – 57 P.
139. Зельцер М. Е., Рысбеков М. М. Второй конгресс диабетологов Центральной Азии. // Хирургия Казахстана. – 1996. - № 3-4. – С. 90.
140. Зельцер М. Е. Сахарный диабет в Казахстане как медико-социальная проблема. // Здравоохранение Казахстана. – 1994 г. - № 9. – С. 44-45.
141. Зельцер М. Е. Изучение эпидемиологии сахарного диабета в Казахстане. // Материалы 1 конгресса диабетологов Центральной Азии. – Алматы, 1994 г. – С. 4.
142. Дедов И.И., Шестакова М. В. Сахарный диабет. – Москва, 2003. – 455 С.
143. R. Paul Robertson. Islet Transplantation as a treatment for diabetes – a work in progress. – A New Therapeutic Concept // N. Engl. J. Med. – August, 7, 2003. – Vol. 350. – P. 694-705.
144. World Health Organization International Diabetes Federation Europe. Diabetes care and research in Europe: the St Vincent Declaration. // Diabet Med.- 1990. – Vol. 7. – P. 360.

145. Cattran D.C. Current status of cyclosporin in the treatment of membranous, IgA and membranoproliferative glomerulonephritis // *Clinical nephrology*, 1991 - v. 35 - №1 - p. 43-47.
146. Dinant H.J., Decker J.L., Klippel J.H. et al // *Ann. Intern. Med.*, 1982 - v.96 - p. 728.
147. Briggs J.D. Annual report on management of renal failure in Europe 28, 1998. presented at the 35-th congress of the European dialysis and transplant association. Rimini 1998/6-9 June/, p 5-13.
148. Нефрология: Руководство для врачей /Под ред. И.Е. Тареевой.- М.: Медицина, 2000, 688с
149. Ермоленко В.М. Руководство по нефрологии./ Под редакцией И.Е. Тареевой. Москва, 1995, е.1, с.343 – 379.
150. Балакирев Э.М. Прогнозирование развития ХПН и организация трансплантологической помощи нефрологическим больным. М. 1990, Автореф. дисс... д.м.н., 50 с.
151. Мухаметзянов И.Ш. Терминальная стадия хронической почечной недостаточности и совершенствование управления службой заместительного лечения на региональном уровне (медико -социальные , клинические и организационно - управленческие аспекты) Дисс...д.м.н. 2002, 380 с.
152. Клименко Г.Я., Захаров В.П., Мухин Г.В. Повышение эффективности амбулаторно -поликлинической помощи пациентам с патологией почек. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины, 1998, №4, с. 33-35
153. Тареева И.Е., Томилина Н.А. Национальный регистр больных с хронической почечной недостаточностью , 2000
154. Алиев М.А., Исмагилов Р.З. Актуальные проблемы лечения больных с почечной недостаточностью в Казахстане. Клиницист, 1998, №4, с. 9 -12.
155. А.П. Сельцовский, Н.Ф. Плавунин, Н.А. Томилина и др. Актуальные проблемы организации нефрологической помощи в г Москва Экономика здравоохранения. 1997, №8 (9), с. 32-35.
156. И.Г. Низамов, И.Ш. Мухаметзянов Организационные аспекты создания регистра с почечной недостаточностью. Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины, 2000, №4, с. 28-32
157. Полежаев Л. В., Александрова М. А. Трансплантация ткани мозга в норме и патологии. - 1986. С. 32-41.
158. Полежаев Л.В., Александрова М.А. Трансплантация нервной ткани мозга в головной мозг крыс. Докл. АН СССР, 1982, Т.263, № 2, С. 460-463.

159. Быстронь И.П., Отеллин В.А., Вежба-Бобрович Т., Дымецки Е. //Цитология.- 1997.-Т. 39, № 7.-С.560-565.
160. Лисяный Н.И., Руденко В.А., Цымбалюк В.И. и др. //Нейроиммунология. Нейроинфекция. Нейроимидж : Материалы 4-й науч. Конференц.-СП б., 1995.-С.65-67.
161. Лисяный Н.И. Иммунная система головного мозга. Киев, 1999.
162. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Нейральная стволовая клетка: биология и перспективы нейротрансплантации//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001. № 3.
163. Миронов Н.В., Шмырев В.И., Бугаев В.С. и др. Комплексное лечение пациентов с паркинсонизмом с использованием живых фетальных клеток // Трансплантация фетальных тканей и клеток. Приложение 1 к журн. "Бюл. эксперим. биологии и медицины". М., 1998. С. 63.
164. Новик А.А., Одинак М.М., Ионова Т.И. и др. Концепция исследования качества жизни в неврологии. // Невр. Журнал.- 2002.- Т.7, №6. -С. 49-52.
165. Семернин Е.Н, Шляхто Е.В., Козлова С.Н. и др. Качество жизни, связанное со здоровьем: теория, методы и практика. Качественная клиническая практика 2002; 2: С.48-52.