

ПРОГНОСТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ВЫЖИВАЕМОСТИ ПАРАТИРЕОИДНОГО КЛЕТОЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Исследование посвящено установлению прогностических факторов выживаемости паратиреоидного клеточного аллотрансплантата у 19 реципиентов с гипопаратиреозом. Была изучена взаимосвязь между длительностью функционирования аллотрансплантата и возрастом донора и реципиента, длительностью гипопаратиреоза, количеством трансплантированных паратироцитов, концентрацией сывороточного паратгормона до пересадки. Использование для пересадки гиперплазированной паратиреоидной ткани, полученной от доноров с высокими показателями сывороточного паратгормона (≥ 500 пг/мл), анамнез гипопаратиреоза ≥ 5 лет, дооперационная концентрация сывороточного паратгормона < 15 пг/мл и пересадка не менее 8 миллионов паратироцитов способствовали наибольшей (> 6 месяцев) продолжительности функционирования паратиреоидного аллотрансплантата.

Ключевые слова: гипопаратиреоз, паратироциты, аллотрансплантация.

V. Y. Khryshchanovich

PROGNOSTIC FACTORS OF CELLULAR PARATHYROID ALLOGRAFT SURVIVAL

The aim of the study was detected of prognostic factors of cellular parathyroid allograft survival. The relationship between duration of allograft functioning and age of donors and recipients, duration of hypoparathyroidism, amount of transplanted parathyroid cells, serum parathyroid hormone levels before transplantation were studied. Hyperplastic parathyroid tissue, obtained from donors with high parathyroid hormone levels (≥ 500 pg/ml), duration of hypoparathyroidism more than 5 years, parathyroid hormone serum level before transplantation less than 15 pg/ml, grafting not less than 8 million parathyroid cells contributed to the greatest (> 6 months) duration of parathyroid allograft functioning.

Key words: hypoparathyroidism, parathyroid cells, allotransplantation.

Одним из решений проблемы, связанной с необратимой утратой в организме источника аутологичной паратиреоидной ткани, является паратиреоидная аллотрансплантация, которая представляет физиологически обоснованную альтернативу заместительной терапии, позволяя избежать ее возможных осложнений и побочных эффектов [1]. Экспериментальные и клинические исследования в этом направлении начались уже через 20 лет после изучения анатомо-функциональных особенностей паращитовидных желез. В 1905 году W. Halsted был первым, кто осуществил аллотрансплантацию паращитовидных желез в эксперименте [2]. Полученные научные результаты позволили опровергнуть гипотезу об иммунологической привилегированности эндокринных тканей, но, вместе с тем, указали на возможность длительного сохранения паратиреоидного аллотрансплантата в анатомических областях с редуцированным лимфатическим оттоком. Значительно позже A. Bloom et al. [3], S. Kukreja et al. [4] пришли к выводу, что для достижения положительных результатов трансплантации, необходимо осуществлять иммуносупрессию донора и/или реципиента, а также иммуномодуляцию аллографта.

другие авторы [2, 10, 11], пролонгация секреторной активности аллогенных паратирицитов была обусловлена не только применением иммуносупрессивной терапии, но также выраженным дефицитом паратормона до трансплантации, гиперфункцией донорской паратиреоидной ткани, более длительным анамнезом гипопаратиреоза и т.д. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось установление прогностических факторов выживаемости паратиреоидного клеточного аллотрансплантата.

Материалы и методы

Для получения аллогенных паращитовидных желез из числа пациентов, которым выполнялась тотальная паратиреоидэктомия по поводу вторичного гиперпаратиреоза, были отобраны 17 неродственных по отношению к реципиентам доноров в возрасте от 27 до 59 лет (таблица 1). Показания к паратиреоидэктомии соответствовали критериям, обозначенным в рекомендациях Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO, 2009) [12]. Для последующей трансплантации были использованы 1–3 паращитовидные железы каждого из семнадцати доно-

Таблица 1. Клинико-демографическая характеристика живых неродственных доноров паращитовидной железы (n = 17)

Пол		Возраст, лет Me [25–75]	Ca, ммоль/л Me [25–75]	ПТГ, пг/мл Me [25–75]	Патология щитовидной железы (n)
Мужской (n)	Женский (n)				
6	11	44 [30,8–52]	2,1 [2,1–2,5]	1581 [1500–1600]	Узловой зоб (1)

С целью увеличения сроков функционирования аллотрансплантата предпринимались попытки краткосрочной иммуносупрессии циклоспорином А, предтрансплантационного культивирования в атмосфере 5% CO₂ и рентгеновского облучения трансплантата [5, 6, 7]. В последующем I. Nawrot et al. [8], T. Tolloczko et al. [9] отказались от проведения иммуносупрессии, поскольку у большинства пациентов развитие дисфункции трансплантата не было связано с какой-либо конкретной причиной, в том числе иммунным ответом, в то время как циклоспорин вызывал серьезные побочные эффекты. Как показали

ров с диффузной гиперплазией, которые подвергали предтрансплантационной обработке с целью получения первичной культуры паратирицитов [13].

Всего было выполнено девятнадцать аллотрансплантаций паратирицитов, показанием к которым был гипопаратиреоз после операций на щитовидной и паращитовидной железах по поводу рака (n = 13), болезни Грейвса (n = 3), аутоиммунного тиреоидита Хашимото (n = 1) и вторичного гиперпаратиреоза (n = 1). В зависимости от метода оперативного вмешательства пациенты были разделены на две группы (таблица 2). В первой группе (n = 7) производили

Таблица 2. Клинико-демографическая характеристика реципиентов обеих групп паратиреоидной аллотрансплантации (n = 19)

Характеристики реципиентов, Me [25–75]	1 группа (n = 7)	2 группа (n = 12)
Возраст, лет	40 [38–57]	38,5 [27,5–50,3]
Длительность гипопаратиреоза, лет	10 [1–11]	2 [1–8]
Кальций сывороточный общий, ммоль/л	1,8 [1,67–1,9]	1,98 [1,76–2,3]
Кальций сывороточный ионизированный, ммоль/л	0,92 [0,81–0,95]	1,04 [0,89–1,11]
Фосфор сывороточный неорганический, ммоль/л	1,9 [1,5–1,9]	1,5 [1,38–1,74]
[Ca]×[P], ммоль ² /л ²	3,39 [2,89–3,42]	3,25 [2,77–3,69]
Паратгормон сывороточный, пг/мл	6,31 [5–20,03]	4,76 [2,75–14,51]

Характеристики реципиентов, Ме [25–75]	1 группа (n = 7)	2 группа (n = 12)
Заместительная терапия:		
Элементарный кальций, мг/сутки	2000 [1500–4000]	1750 [1000–3000]
Холекальциферол, МЕ/сутки	1600 [1200–3200]	1400 [800–2400]
Кальцитриол, мкг/сутки	0 [0–0,5]	0,88 [0,5–1,13]
Левотироксин, мкг/сутки	150 [100–175]	125 [100–181,25]
Суточное потребление с пищей:		
Кальция, мг	1117 [654–1126]	959,2 [636,2–1147]
Витамина Д, мкг	0,65 [0,36–1,98]	1,53 [0,82–3,68]

имплантацию макроинкапсулированного в синтетическую микропористую мембрану трансплантата (~6–9×10⁶ клеток) в глубокую бедренную артерию, во второй группе осуществляли рентгенэндоваскулярную «доставку» суспензии паратироцитов (~6–40×10⁶ клеток) в селезеночную артерию.

Распределение пар реципиент/донор по АВО-фенотипу крови в обеих группах было следующим: O(I)/A(II) – 1, A(II)/A(II) – 2, A(II)/O(I) – 3, A(II)/AB(IV) – 2, B(III)/O(I) – 4, B(III)/B(III) – 1, A(II)/B(III) – 1, O(I)/O(I) – 5. Совпадение по АВО-фенотипу донора в 1 группе реципиентов было в 1 случае, во 2 группе – в 7 случаях. HLA-типирование не проводили.

Критериями функционирования аллотрансплантата считали повышение концентрации сывороточного кальция ≥2 ммоль/л, снижение потребности в кальций-содержащих лекарственных средствах, повышение уровня сывороточного паратгормона в сравнении с предтрансплантационными показателями, купирование или улучшение основных симптомов заболевания. Критериями дисфункции трансплантата являлись очень низкие или неопределяемые уровни сывороточного паратгормона, сохранение или возобновление клинических симптомов заболевания и гипокальциемии на фоне возрастания потребности в кальций-содержащих лекарственных средствах до исходного уровня.

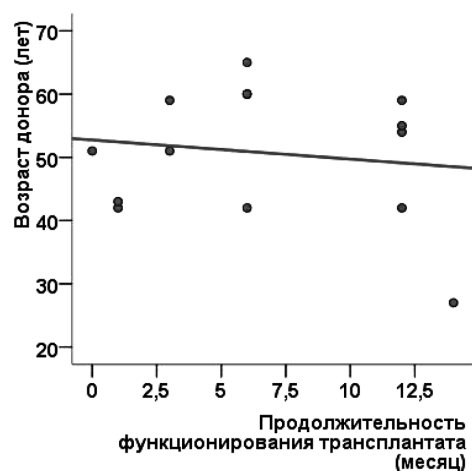


Рис. 1. Корреляционная зависимость длительности функционирования аллотрансплантата от возраста донора ($r_s = -0,02$; $P > 0,05$)

В исследовании использовали непараметрические методы статистического анализа. Полученные данные представлены в виде медианы и перцентилей (Ме [25–75]). Оценка связи между длительностью функционирования аллотрансплантата и переменными (возраст донора и реципиента, длительность гипопаратиреоза, количество трансплантированных паратироцитов, концентрация сывороточного паратгормона до пересадки) осуществлялась путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Spearman (r_s). Статистически значимой корреляция считалась при значении $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Предположение о большей целесообразности использования паращитовидных желез, полученных от молодых доноров (в возрасте 30–40 лет), не нашло своего подтверждения как в проведенном исследовании (рисунок 1), так и в работе I. Nawrot et al. [8], которые не выявили влияния возраста доноров на выживаемость аллотрансплантата ($P < 0,11$). Вместе с тем, наибольшая продолжительность функционирования паратиреоидного аллотрансплантата была отмечена у реципиентов, получивших паращитовидную железу от доноров с очень высокой концентрацией паратгормона (≥500 пг/мл) (рисунок 2).

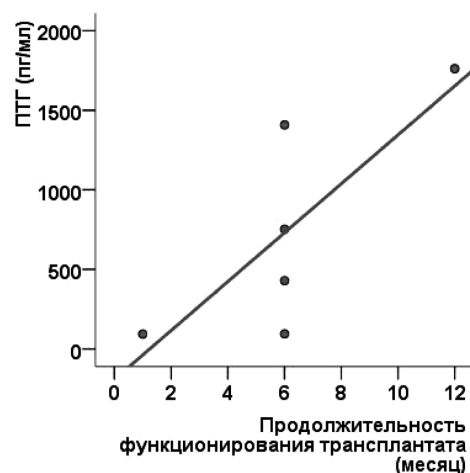


Рис. 2. Корреляционная зависимость длительности функционирования аллотрансплантата от концентрации паратгормона донора ($r_s = 0,85$; $P = 0,03$)

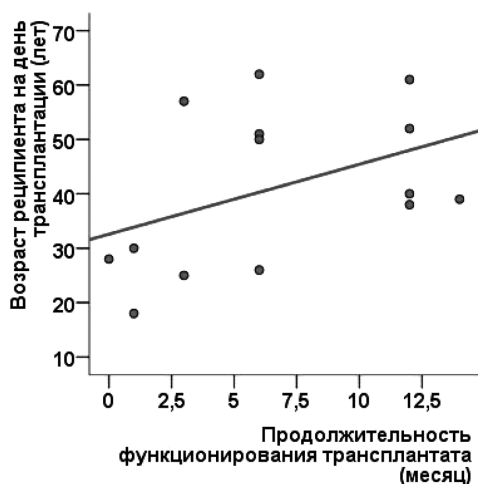


Рис. 3. Корреляционная зависимость длительности функционирования аллотрансплантата от возраста реципиента ($r_s = 0,45$; $P > 0,05$)

Возраст реципиентов не оказывал статистически достоверного влияния на сроки функционирования трансплантата (рисунок 3), в то же время, нами была установлена слабая линейная зависимость по формуле (1):

$$T = 0,1 \times B + 2,3, \quad (1)$$

где T – длительность функционирования трансплантата (в месяцах), B – возраст реципиента (лет). То есть при увеличении возраста реципиента на 1 год длительность функционирования трансплантата по указанной формуле возрастает на 0,1 месяца (положительный тренд). Влияние возрастного фактора на T составляет только 20%, следовательно остальные 80% приходится на другие факторы. Погрешность прогнозирования составляет 53%. Пример: если возраст реципиента 45 лет, тогда $T = 0,1 \times 45 + 2,3 = 6,8 \pm 3,5$ месяцев. Интервальная оценка с доверительной вероятностью $\gamma = 0,9$ (9 случаев из 10) будет (1; 13).

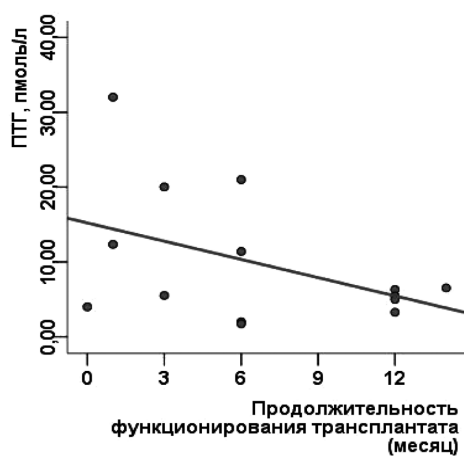


Рис. 5. Корреляционная зависимость сроков функционирования аллотрансплантата от концентрации сывороточного паратгормона до пересадки ($r_s = - 0,28$; $P > 0,05$)

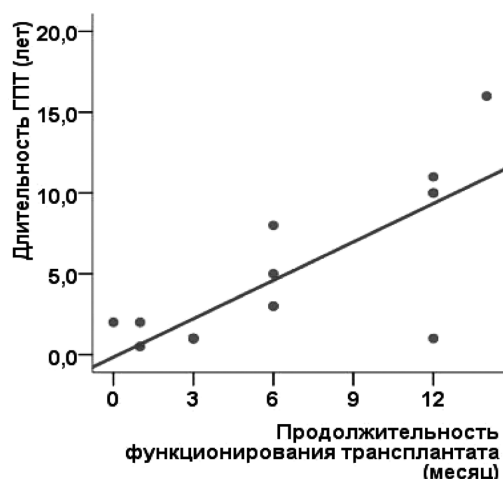


Рис. 4. Корреляционная зависимость сроков функционирования аллотрансплантата от длительности гипопаратиреоза ($r_s = 0,73$; $P = 0,002$)

У пациентов с более длительным анамнезом гипопаратиреоза (≥ 5 лет) результаты паратиреоидной аллотрансплантации были достоверно лучше – максимальная функциональная активность аллогraftа (12–14 месяцев) наблюдалась у пациентов с более чем 10-летним анамнезом гипопаратиреоза (рисунок 4). В этом случае была получена средняя линейная зависимость с коэффициентов корреляции 0,73 и положительным трендом, которую можно рассчитать по формуле (2):

$$T = 0,6 \times t + 3,4, \quad (2)$$

где t – длительность гипопаратиреоза (лет). То есть, при увеличении длительности заболевания реципиента на 1 год длительность функционирования трансплантата возрастает на 0,6 месяца. Влияние анамнеза гипопаратиреоза на T более сильное и составляет 45% с погрешностью прогнозирования 35%. Пример: если длительность гипопаратиреоза 6 лет, тогда $T = 0,6 \times 6 + 3,4 = 7 \pm 2,5$ месяцев. При доверительной вероятности $\gamma = 0,9$ T будет в интервале (5,7; 8,3).

Как показал корреляционный анализ, более низкое содержание сывороточного паратгормона у реципиентов до пересадки способствовало увеличению продолжительности выживания аллотрансплантата (рисунок 5). В условиях выраженного и стойкого гормонодефицита (при «стартовой» концентрации паратгормона < 15 пг/мл) сроки функциональной активности аллогraftа достигали 6–14 месяцев. Тем самым, мы подтвердили гипотезу, предложенную W. Halsted [2], о возможности функционирования эндокринного трансплантата только в условиях «гормонального голода».

Более длительная (12–14 месяцев) секреторная активность паратиреоидного аллотрансплантата в 1 группе пациентов была отмечена у двух пар реципиент/донор с фенотипом группы крови В(III)/O(I) (таблица 3). Во 2 группе пациентов функционирова-

ние аллотрансплантата в течение 6 и более месяцев наблюдалось при фенотипах группы крови A(II)/O(I) в 2 случаях и B(III)/O(I), O(I)/O(I), A(II)/B(III) – по одному случаю. Таким образом, совпадение фенотипа группы крови не оказывало достоверного влияния на продолжительность функционирования паратиреоидного аллотрансплантата, что согласуется с результатами исследования I. Nawrot et al. [8]. В том же исследовании авторами были установлены минимальные и максимальные сроки функционирования аллографта в случаях совпадения фенотипа группы крови O(I) и A(II) соответственно ($P < 0,086$ и $P < 0,118$).

Таблица 3. Распределение пар реципиент/донор по фенотипу группы крови и длительности функционирования аллотрансплантата

Па-циент	ABO	Резус-фактор	Длительность функционирования трансплантата, месяцев
1 группа (n = 7)			
1	B(III)/O(I)	+/+	14
2	B(III)/O(I)	+/-	12
3	A(II)/A(II)	+/+	9
4	O(I)/A(II)	+/+	9
5	A(II)/AB(IV)	+/+	6
6	A(II)/O(I)	+/-	3
7	A(II)/AB(IV)	+/-	6
2 группа (n = 12)			
1	B(III)/O(I)	+/-	1
2	B(III)/O(I)	+/+	6
3	O(I)/O(I)	+/+	1
4	O(I)/O(I)	-/+	3
5	A(II)/O(I)	+/+	6
6	O(I)/O(I)	+/+	1
7	A(II)/O(I)	+/+	9
8	O(I)/O(I)	+/-	6
9	A(II)/B(III)	+/+	6
10	A(II)/A(II)	+/-	1
11	O(I)/O(I)	-/+	1
12	B(III)/B(III)	+/+	1

По мнению некоторых авторов, пролонгации функциональной активности трансплантата может способствовать повышение количества трансплантируемых паратироцитов, а также создание особых условий культивирования для предупреждения их старения [10]. Полученные собственные результаты в отношении количества пересаженных клеток не выявили подобной взаимосвязи ($r_s = -0,2$; $P > 0,05$), но, в то же время, было установлено, что для одной клинически значимой трансплантации необходимо не менее 8 миллионов паратироцитов. Наши попытки увеличения количества пересаживаемых паратироцитов, которое колебалось от 20 до 40 миллионов, существенно не влияло на послеоперационный результат. Скорее всего, большее значение имеет функциональная активность культуры [14]. Одной из вероятных причин не полного терапевтического эффекта пересадки может быть гибель определенного пула паратироцитов в раннем посттрансплантационном периоде из-за нарушения трофики клеток [15]. Тщательный анализ

полученных данных, к сожалению, не выявил достоверных прогностических факторов, влияющих на выживаемость аллогенных паратироцитов.

В настоящее время отсутствуют не только надежные маркеры развития реакции отторжения паратироцитов, но и показатели, характеризующие количество остающихся жизнеспособными и функционирующих клеток после клинической трансплантации. Дополнительные исследования должны быть направлены на установление более сложных иммунологических феноменов, определяющих жизнеспособность пересаженных клеток. Например, необходимо выяснить роль ре-экспрессии HLA антигенов I класса имплантированных паратироцитов в развитии реакции отторжения в отдаленном периоде [10]. Вместе с тем, результаты экспериментальной ксенотрансплантации человеческого паратироцитов в брюшную полость мышам показали возможность длительного (15 месяцев) сохранения их эндокринной функции в отсутствие реакции отторжения [11]. По мнению авторов, предварительное культивирование паратиреоидной ткани и введение анти-CD4 моноклональных антител приводит к элиминации антигенов на поверхности паратироцитов. Как показали I. Nawrot et al. [8], реаллотрансплантация паратироцитов, полученных от того же донора, являлась весьма эффективной, что косвенно свидетельствовало об отсутствии иммунизации организма реципиента к донорским антигенам после первой трансплантации.

Внутрисосудистая аллотрансплантация паратироцитов в клинических условиях без использования иммуносупрессивной терапии явилась первым мировым опытом паратиреоидной трансплантации в лечении недостаточности паращитовидных желез, которая у некоторых пациентов с гипопаратиреозом, развившимся после операций на щитовидной железе, служит эффективной терапевтической альтернативой стандартным методам лечения. Использование других методов имплантации паратироцитов (например, в мышцы) является недостаточно эффективным ввиду быстрой гибели трансплантата, в первую очередь, из-за реакции отторжения, несмотря на тщательную очистку культуры клеток от иммуногенной стромальной ткани [16]. В то же время, изучение секреции паратгормона позволило подтвердить очевидную функциональную активность пересаженных внутриартериально аллогенных паратироцитов более чем у половины пациентов. Возраст доноров и реципиентов не оказывали существенного влияния на длительность функционирования трансплантата. Длительный анамнез гипопаратиреоза, низкие и крайне низкие показатели паратгормона до пересадки, количество трансплантируемых паратироцитов (не менее 8 миллионов) оказывали положительное влияние на сроки секреторной активности паратиреоидного аллографта. Наряду с невысокой (в 1 группе пациентов) и минимальной (во 2 группе пациентов) травматичностью

оперативного вмешательства и возможностью его выполнения в большинстве хирургических стационаров, дополнительным преимуществом разработанных методов является возможность проведения повторных пересадок в случае снижения функциональной активности паратиреоидного трансплантата.

Таким образом, использование для культивирования паратирицитов и последующей аллотрансплантации гиперплазированной паратиреоидной ткани, полученной от доноров с высокими показателями сывороточного паратгормона (≥ 500 пг/мл) способствует наибольшей (> 6 месяцев) продолжительности функционирования паратиреоидного аллотрансплантата. Длительный (от 6 до 14 месяцев) положительный результат паратиреоидной аллотрансплантации наблюдается у пациентов с анамнезом гипопаратиреоза ≥ 5 лет и дооперационной концентрацией сывороточного паратгормона < 15 пг/мл после пересадки не менее 8 миллионов паратирицитов. Совпадение фенотипа группы крови не оказывает достоверного влияния на сроки функциональной активности аллогенных паратирицитов.

Литература

1. *Hypoparathyroidism in the adult: epidemiology, diagnosis, pathophysiology, target-organ involvement, treatment, and challenges for future research* / J. P. Bilezikian [et al.] // *J. Bone Min. Res.* – 2011. – Vol. 26, № 10. – P. 2317–2337.
2. *Halsted, W. S. Hypoparathyreosis, status parathyreoprivus and transplantation of the parathyroid glands* / W. S. Halsted // *Amer. J. Med. Sci.* – 1907. – Vol. 1. – P. 134.
3. *Bloom, A. D. Indefinite survival of rat parathyroid allografts without postoperative immunosuppression* / A. D. Bloom, S. G. Economidou, H. M. Hebel // *Surgery.* – 1986. – Vol. 100, № 6. – P. 1032–1038.
4. *Allotransplantation of rat parathyroid glands: effects of organ culture and transplantation into the adrenal*

gland / S. C. Kukreja [et al.] // *Experientia.* – 1979. – Vol. 35, № 4. – P. 559–560.

5. *Bromberg, J. S. Routes to allograft survival* / J. S. Bromberg, B. Murphy // *J. Clin. Invest.* – 2001. – Vol. 107, № 7. – P. 797–798.

6. *Naji, A. Effect of culture in 95% O₂ on the survival of parathyroid allografts* / A. Naji, W. Silvers, C. Barker // *Surg. Forum.* – 1979. – Vol. 30. – P. 109.

7. *Short-term immunosuppression after rat parathyroid allotransplantation* / S. Timm [et al.] // *Microsurgery.* – 2003. – Vol. 23, № 5. – P. 503–507.

8. *Allotransplantation of cultured parathyroid progenitor cells without immunosuppression: clinical results* / I. Nawrot [et al.] // *Transplantation.* – 2007. – Vol. 83, № 6. – P. 734–740.

9. *Cultured parathyroid cells allotransplantation without immunosuppression for treatment of intractable hypoparathyroidism* / T. Tolloczko [et al.] // *Ann. Transplant.* – 1996. – Vol. 1. – P. 51–53.

10. *Rossini, A. A. Induction of immunologic tolerance for transplantation* / A. A. Rossini, D. L. Greiner, J. P. Mordes // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79, № 1. – P. 99–141.

11. *Human parathyroid grafts survived and functioned in mice treated with anti-CD4 monoclonal antibody* / M. Niimi [et al.] // *Transpl. Proc.* – 2000. – Vol. 32. – P. 1040.

12. *Subtotal parathyroidectomy in renal failure: still needed after all these years* / P. A. Decker [et al.] // *World J. Surg.* – 2001. – Vol. 25. – P. 708–712.

13. *Харламова, А. Н. Особенности длительного культивирования клеток паращитовидной железы человека* / А. Н. Харламова, В. Я. Хрыщанович, С. И. Третьяк // *Военная медицина.* – 2014. – № 1. – С. 106–109.

14. *Thyroid allograft immunogenicity is reduced after a period in organ culture* / K. J. Lafferty [et al.] // *Science.* – 1975. – Vol. 188. – P. 259–261.

15. *Survival of macroencapsulated allogeneic parathyroid tissue one year after transplantation in non-immunosuppressed humans* / A. Tibell [et al.] // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10 (7). – P. 591–599.

16. *Allotransplantation of cultured human parathyroid cells: present status and perspectives* / T. Tolloczko [et al.] // *Transplant Proc.* – 1997. – Vol. 29. – P. 998–1000.