

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-4-140-148

# ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ КОНСЕРВАЦИИ СЕРДЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА НА АКТИВАЦИЮ БЕЛКОВ АДГЕЗИИ И СИНТЕТИЧЕСКУЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ

М.О. Жульков<sup>1</sup>, Н.А. Кармадонова<sup>1</sup>, М.А. Суровцева<sup>1, 2</sup>, И.И. Ким<sup>1, 2</sup>, О.В. Повещенко<sup>1, 2</sup>, И.С. Зыков<sup>1</sup>, А.Р. Таркова<sup>1</sup>, Д.А. Сирота<sup>1, 3</sup>, А.В. Протопопов<sup>1</sup>, А.Г. Макаев<sup>1</sup>, Ф.Ю. Косимов<sup>1</sup>, М.Н. Муртазалиев<sup>1</sup>, А.В. Гусева<sup>1</sup>, Х.А. Агаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр – Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

**Цель.** Провести сравнительное исследование эффективности фармакохолодовой консервации раствором Кустодиола® (Custodiol НТК, Dr Franz Köhler Chemie GmbH, Бенсхайм, Германия) и нормотермической аутоперфузии сердечного трансплантата в составе сердечно-легочного комплекса *ex vivo*. **Материалы и методы.** В качестве модели для проведения серии острых экспериментов использовали свиней породы ландрас весом  $50 \pm 5$  кг в возрасте 4–5 мес. ( $n = 10$ ). В экспериментальной группе ( $n = 5$ ) кондиционирование сердечно-легочного комплекса проводили методом аутоперфузии в течение 6 ч. В контрольной группе восстановление насосной функции сердца осуществляли после 6-часовой фармакохолодовой консервации Кустодиолом®. Эффективность методов консервации сердечного трансплантата оценивали путем измерения маркеров ишемии миокарда, синтетической функции эндотелиоцитов, маркеров эндотелиальной активации (селектины Е/Р, эндотелиальный фактор роста). **Результаты.** После реперфузии сердечного трансплантата было обнаружено статистически значимое повышение концентрации маркеров ишемии миокарда в контрольной группе, также отмечалось значительное снижение синтеза эндотелиального релаксирующего фактора в группе консервации раствором Кустодиола® (378,5 [226,4; 539,7] против 542,1 [377,6; 853,2] мкмоль/мл в группе аутоперфузии,  $p < 0,05$ ). Степень реперфузионного повреждения/активации коронарного эндотелия в контрольной группе была в несколько раз выше, чем в группе нормотермического аутоперфузионного кондиционирования. При этом сердечный выброс после 6-часового кондиционирования трансплантатов составил 0,63 [0,37; 0,80] и 0,37 [0,23; 0,37] л/мин в экспериментальной и контрольной группах соответственно ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Нормотермическая аутоперфузия показала значительное преимущество в сохранении морфофункционального статуса донорского сердца по сравнению с фармакохолодовой консервацией кустодиолом® в течение 6 ч кондиционирования трансплантата *ex vivo*.

*Ключевые слова:* аутоперфузия, консервация сердца, нормотермическая перфузия, реперфузионное повреждение, трансплантация сердца, фармакохолодовая консервация.

**Для корреспонденции:** Макаев Александр Геннадьевич. Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, д. 15. Тел. (905) 198-33-31. E-mail: makaev\_a@meshalkin.ru

**Corresponding author:** Alexander Makaev. Address: 15, Rechkunovskaya str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation. Phone: (905) 198-33-31. E-mail: makaev\_a@meshalkin.ru

# EFFECT OF PROLONGED CARDIAC GRAFT PRESERVATION ON ADHESION PROTEIN ACTIVATION AND SYNTHETIC ENDOTHELIAL FUNCTION

M.O. Zhulkov<sup>1</sup>, N.A. Karmadonova<sup>1</sup>, M.A. Surovtseva<sup>1, 2</sup>, I.I. Kim<sup>1, 2</sup>, O.V. Poveshchenko<sup>1, 2</sup>, I.S. Zykov<sup>1</sup>, A.R. Tarkova<sup>1</sup>, D.A. Sirota<sup>1, 3</sup>, A.V. Protopopov<sup>1</sup>, A.G. Makaev<sup>1</sup>, F.Yu. Kosimov<sup>1</sup>, M.N. Murtazaliev<sup>1</sup>, A.V. Guseva<sup>1</sup>, K.A. Agaeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

**Objective:** to conduct a comparative study of the efficacy of Custodiol<sup>®</sup> cardioplegia (Custodiol HTK, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Germany) and normothermic autoperfusion of heart graft as a part of an *ex vivo* cardiopulmonary complex (CPC). **Methods.** Landrace pigs weighing  $50 \pm 5$  kg and aged 4–5 months ( $n = 10$ ) were used as the model for a series of acute experiments. In the experimental group ( $n = 5$ ), the CPC was conditioned by autoperfusion for 6 hours. In the control group, the heart's pumping function was restored after a 6-hour cold preservation with Custodiol<sup>®</sup>. The effectiveness of cardiac graft preservation methods was evaluated by measuring myocardial ischemic markers, endothelial synthetic function, and endothelial cell activation markers (E- and P-selectins, endothelial growth factor). **Results.** Following cardiac graft reperfusion, the control group exhibited a statistically significant increase in the concentration of myocardial ischemia markers; also, there was a significant decrease in the synthesis of endothelium-derived relaxing factor in the Custodiol<sup>®</sup> solution preservation group ( $378.5 [226.4; 539.7]$  vs.  $542.1 [377.6; 853.2]$   $\mu\text{M/mL}$  in the autoperfusion group,  $p < 0.05$ ). The degree of coronary endothelial reperfusion injury/activation was several times higher in the control group than in the normothermic autoperfusion conditioning group. Moreover, cardiac output after a 6-hour graft conditioning was  $0.63 [0.37; 0.80]$  and  $0.37 [0.23; 0.37]$  L/min in the experimental and control groups, respectively ( $p < 0.05$ ). **Conclusion.** Normothermic autoperfusion showed a significant advantage in preserving the morphofunctional status of the donor heart compared with cold preservation with Custodiol<sup>®</sup> during 6 hours of *ex vivo* graft conditioning.

*Keywords:* autoperfusion; heart preservation; normothermic perfusion; reperfusion injury; heart transplantation; cold preservation.

## ВВЕДЕНИЕ

Первичная дисфункция трансплантата является наиболее частой причиной смерти и заболеваемости реципиентов сердца [1]. Время ишемии, состав консервирующего раствора, а также способ консервации являются потенциальными факторами, ответственными за начальную эндотелиальную дисфункцию, и возможно, модулируют поздние эндотелиальные функциональные изменения – васкулопатию трансплантата. Именно поэтому экспериментальные и клинические исследования все чаще используют миокардиальные и эндотелиальные конечные точки как маркер качества сохранения функции трансплантата [2].

Одним из неизбежных явлений на этапе реперфузии трансплантата является взаимодействие между эндотелием коронарных сосудов и циркулирующими в крови нейтрофилами. Именно повреждение эндотелия является первичным результатом реперфузии, приводящим к перегрузке кардиомиоцитов кальцием («кальциевый парадокс»), развитию отека и образованию кислородных радикалов нейтрофилами. Это повреждение происходит через 2,5–5 минут после

начала реперфузии и предполагает первоначальное замедление или ролинг (*от англ. rolling* – перекачивание) нейтрофилов вдоль эндотелия в первые моменты реперфузии с последующей прочной фиксацией и диапедезом нейтрофилов в миокард, где происходит взаимодействие нейтрофилов и миоцитов, приводящее к некрозу [3]. Адгезия лейкоцитов к сосудистой стенке является первоначальным этапом не только иммунного ответа, но и воспалительного компонента реперфузии. Особенно при постишемической реперфузии миокарда инфильтрация лейкоцитов (преимущественно нейтрофилов) вызывает значительные функциональные нарушения [4]. Ишемия с последующей реперфузией также способствует уменьшению стимулируемого агонистами базального синтеза оксида азота (NO) [5], которое, как было показано ранее, увеличивает адгезию лейкоцитов к эндотелию [6]. Более того, начало реперфузии совпадает с выраженным снижением синтеза эндотелий-релаксирующего фактора, всплеском образования свободных радикалов и экспрессией P-селектина [3, 7].

Антиадгезионная терапия – это новый подход к ингибированию процессов ишемически реперфу-

зионного повреждения. Один из таких подходов заключается в использовании моноклональных антител против специфических молекул адгезии [8]. Антитела, блокирующие адгезию, способствуют уменьшению степени реперфузионного повреждения миокарда [9]. Терапевтическое использование этой или подобных антиадгезионных стратегий может улучшить восстановление функции миокарда и коронарных сосудов после операции на сердце или трансплантации, однако по-прежнему подобные подходы ограничиваются исключительно экспериментальными работами. Поэтому исследование и внедрение в клиническую практику эффективных и экономически выгодных способов длительного кондиционирования сердечных трансплантатов позволит не только увеличить число трансплантаций за счет расширения географии донорских баз, но и значительно улучшить отдаленные результаты трансплантации, уменьшая риск развития васкулопатии трансплантата.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модели для проведения серии экспериментов были использованы свиньи породы ландрас, самки, весом  $50 \pm 5$  кг в возрасте 4–5 месяцев ( $n = 10$ ). Уход, обеспечение эксперимента, наблюдение и вывод животных из него выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986). Проведение экспериментального исследования было одобрено локальной комиссией по биоэтике (Протокол № 2 от 01.09.2022 года).

В экспериментальной группе ( $n = 5$ ) кондиционирование сердца проводили в условиях 6-часовой нормотермической аутоперфузии сердечно-легочного комплекса *ex vivo*, затем выполняли фармакохолодовую консервацию раствором Кустодиола® при  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа с последующей реперфузией аппаратом искусственного кровообращения. В качестве группы контроля ( $n = 5$ ) выступали сердца, консервированные в течение 6 часов согласно принятому к клинике протоколу фармакохолодовой консервации трансплантата раствором Кустодиола® (рис. 1).

### Предоперационная подготовка и анестезиологическое пособие

В день эксперимента всем животным натошак выполняли премедикацию (золетил-100). Дозу подбирали индивидуально, согласно весо-ростовым параметрам. После наступления сна подготавливали операционное поле и область катетеризации сосудов шеи. Затем животное транспортировали на операционный стол и закрепляли в положении «на спине» для последующей интубации трахеи, установки центрального артериального и венозного катетеров. Эксперимент выполняли в условиях эндотрахеального наркоза севофлюраном и миорелаксации (рокурония бромид). Искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) проводили с помощью наркозно-дыхательного аппарата FabiusPlus (Draeger, ФРГ) с положительным давлением на вдохе (20–30 см вод. ст.) и на выдохе (5–8 см вод. ст.) с дыхательным объемом 8 мл/кг с частотой 12–14 дыханий в минуту. Параметры жизнедеятельности фиксировали с помощью монитора типа IntelliVue MP70 (Philips, Нидерланды). Во время экспериментов проводили мониторинг инвазивного

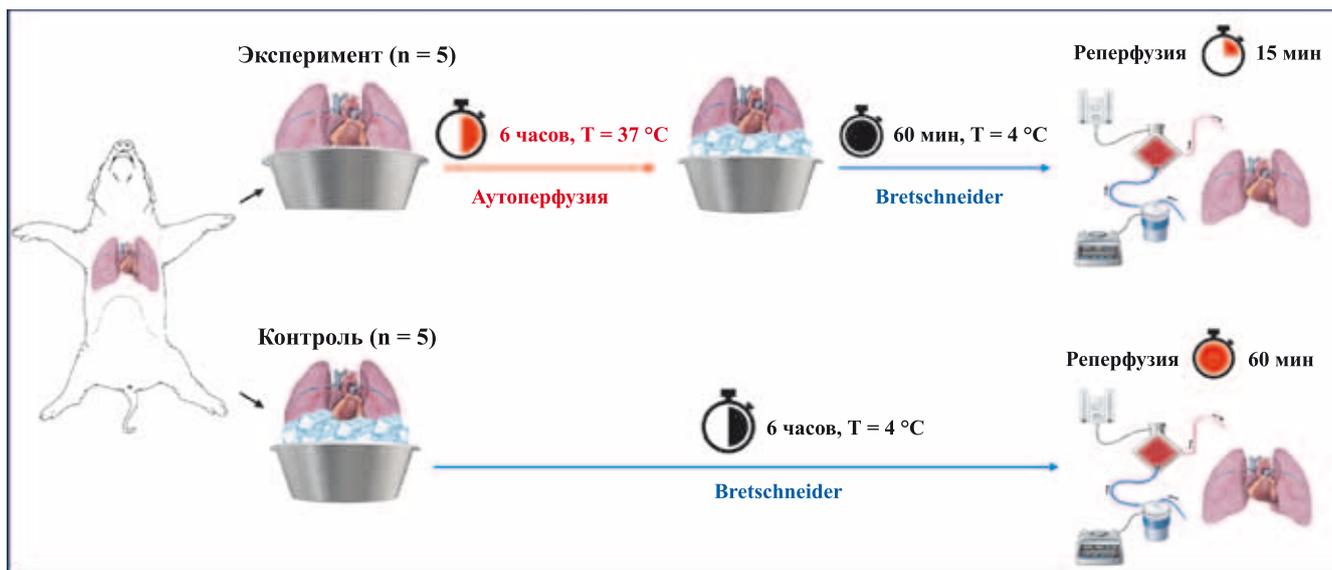


Рис. 1. Дизайн исследования

Fig. 1. Study design

артериального давления в полостях сердца и магистральных сосудах, нарушений ритма сердца (электрокардиография), температуры органокомплекса. Анализ крови проводили с помощью автоматического гематологического анализатора ABL 800 FLEX (Radiometer, Дания) согласно рекомендациям производителя. Параметры центральной гемодинамики исследовали путем катетеризации правых отделов сердца катетером Свана–Ганса, а также с помощью портативной многофункциональной ультразвуковой системы Philips CX50 (Philips Ultrasound, USA) с ЭКГ-синхронизацией. Коронарное сосудистое сопротивление (CVR) рассчитывали по формуле:

$$СКР = \frac{иАДср - иАДППср}{КК \times 100 \text{ г}},$$

где иАДср – среднее давление в корне аорты; иАДППср – среднее давление в правом предсердии; КК – коронарный кровоток.

### Хирургическая техника эксперимента

Эксплантацию работающего сердечно-легочного комплекса (СЛК) выполняли через срединную стернотомию. Изоляцию СЛК начинали с удаления перикарда и мобилизации верхней полой вены (ВПВ), затем выделяли брахиоцефальный ствол (БЦС), левую подключичную артерию (ЛПКА), нижнюю полую вену (НПВ). Трахею осторожно отделяли от пищевода, используя электрокоагулятор, добываясь гемостаза. После введения гепарина (3 мг/кг массы тела) ЛПКА перевязывали максимально дистально, через культю артерии устанавливали интродьюсер для измерения иАД в корне аорты и проведения диагностических катетеров. Затем лигировали и пересекали БЦС, в культю артерии устанавливали артериальную канюлю 18 Fr, которую соединяли с артериальным резервуаром. После пережатия нисходящей грудной аорты на уровне перешейка открывали артериальную магистраль и начинали забор артериальной крови в резервуар. После стабилизации уровня крови и артериального давления в бедренную вену вводили 1–1,5 литра раствора Рингера. После этого перевязывали и пересекали полые вены, трахею пересекали и повторно интубировали трубкой с манжетой. Функционирующий СЛК окончательно отделяли от окружающих тканей, переносили в контейнер с теплым физиологическим раствором (38 °С), пережимали артериальную магистраль и продолжали наблюдение в течение 6 часов (рис. 2).

На всем протяжении аутоперфузии производили непрерывную инфузию 5% раствора кальция хлорида (3–5 мл/ч) и 10% глюкозы (5–10 мл/ч) для поддержания уровня в крови в референтном интервале. Через 6 часов нормотермической аутоперфузии СЛК выполняли кардиоплегию введением в корень аорты 2 литров раствора Кустодиола® (Custodiol®,

Германия, НТК). Затем СЛК хранили в растворе Кустодиола® при температуре 4 °С в течение 1 часа. По прошествии этого времени сердце перфузировали в течение 15–20 минут с использованием аппарата искусственного кровообращения, заполненного собственной кровью животного. В случае необходимости проводили электрическую дефибрилляцию. После согревания и восстановления сердечной деятельности СЛК наполняли кровью, изолировали и проводили ультразвуковое исследование.

Образцы тканей для гистологического исследования иссекали из верхушечной части левого желудочка сердца и средней доли левого и правого легких, фиксировали в 10% нейтральном формалине, после фиксации обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин с помощью диспенсера с нагревающей и охлаждающей платами. Из парафиновых блоков на микротоме Microm HM 550 (Thermo Scientific, Уолтем, США) приготавливали гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Перед окраской проводили депарафинацию срезов по 10–15 минут в двух порциях чистого ксилола, с последующим удалением его в трех порциях спирта нисходящей крепости (абсолютный – 70°) до дистиллированной воды. Гистологические срезы окрашивали по стандартным методикам: гематоксилином и эозином, по методу Ван Гизона с комбинированной докраской эластических волокон орсеином, а также проводили PAS реакцию. Поляризационно-микроскопическое исследование миокарда проводили на микроскопе Axio Scope.A1 («Zeiss», Германия), снабженного анализатором и поляризатором, фотокамерами AxioCam HRm и AxioCam HRc («Zeiss», Германия) и программным обеспечением ZEN blue («Zeiss», Германия).

Для приготовления экстрактов ткань миокарда левого желудочка взвешивали, измельчали с добавлением 1 мл PBS и хранили при –70 °С. Исследуемые образцы гомогенизировали с помощью гомогенизатора тканей низкотемпературного (–40 °С) KZ-III-FP (Servicebio Technology Co., Ухань, Китай) со стальными шариками 3 мм×2/4 мм×1 в соответствии с рекомендациями производителя. Тканевые остатки удаляли центрифугированием при 16 100 g в течение 5 минут. Содержание эндотелиального фактора роста (VEGF – от англ. – *vascular endothelial growth factor*) и NO в тканевых экстрактах нормировали на концентрацию белка в каждом отдельном образце. Для определения VEGF («Вектор-БЕСТ», Новосибирск, Россия) в экстрактах тканей левого желудочка сердца использовали коммерчески доступные ИФА-наборы. Наборы применялись в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию NO оценивали путем измерения уровней нитрита как стабильного конечного продукта с использованием реактива Грисса (Sigma-Aldrich, Дармштадт, Герма-

ния) в соответствии с инструкциями производителя. К 50 мкл экстрактов тканей добавляли 50 мкл реактива Грисса в 96-луночный планшет. Поглощение при 492 нм измеряли с помощью устройства для считывания микропланшетов (Stat FAX-2100, Awareness Technology Inc., США), а концентрации нитритов оценивали с использованием стандартной калибровочной кривой. Тропонин I определяли в сыворотке крови методом хемилюминесцентного иммуноанализа реактивами ARCHITECT STAT Troponin-I с использованием анализатора Architect I 2000sr (Abbott, США). Для определения концентрации тропонина T, белка, связывающего жирные кислоты (H-FABP – *от англ. – fatty-acid-binding proteins*), E-селектина (SelE) и P-селектина (SelP) использовали сыворотку крови, полученную путем центрифугирования в течение 20 мин при 1000 g, которую сохраняли в аликвотах при –80 °С до момента постановки исследования. Данные анализы определяли сэндвич-методом ИФА (Cloud-Clone Corp., Китай) с использованием коммерчески доступных ИФА-наборов, специфичных для антигенов свиней.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для составления представления о выборке применяли методы описательной статистики. Достоверность различий между сравниваемыми группами (p) для непрерывных данных рассчитывали с использованием непараметрических критериев Манна – Уитни в независимых группах и Уилкоксона в зависимых. Уровень значимости между сравниваемыми группами считали достоверным при  $p < 0,05$ , что соответствует критериям, принятым в медико-биологических исследованиях.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Во всех экспериментах реперфузию сердечного трансплантата проводили с помощью аппарата искусственного кровообращения при одинаковых параметрах перфузии (300–350 мл/мин), однако к 15-й минуте во всех сердцах контрольной группы наблюдали значительное повышение давления и сопротивления в корне аорты (табл. 1).

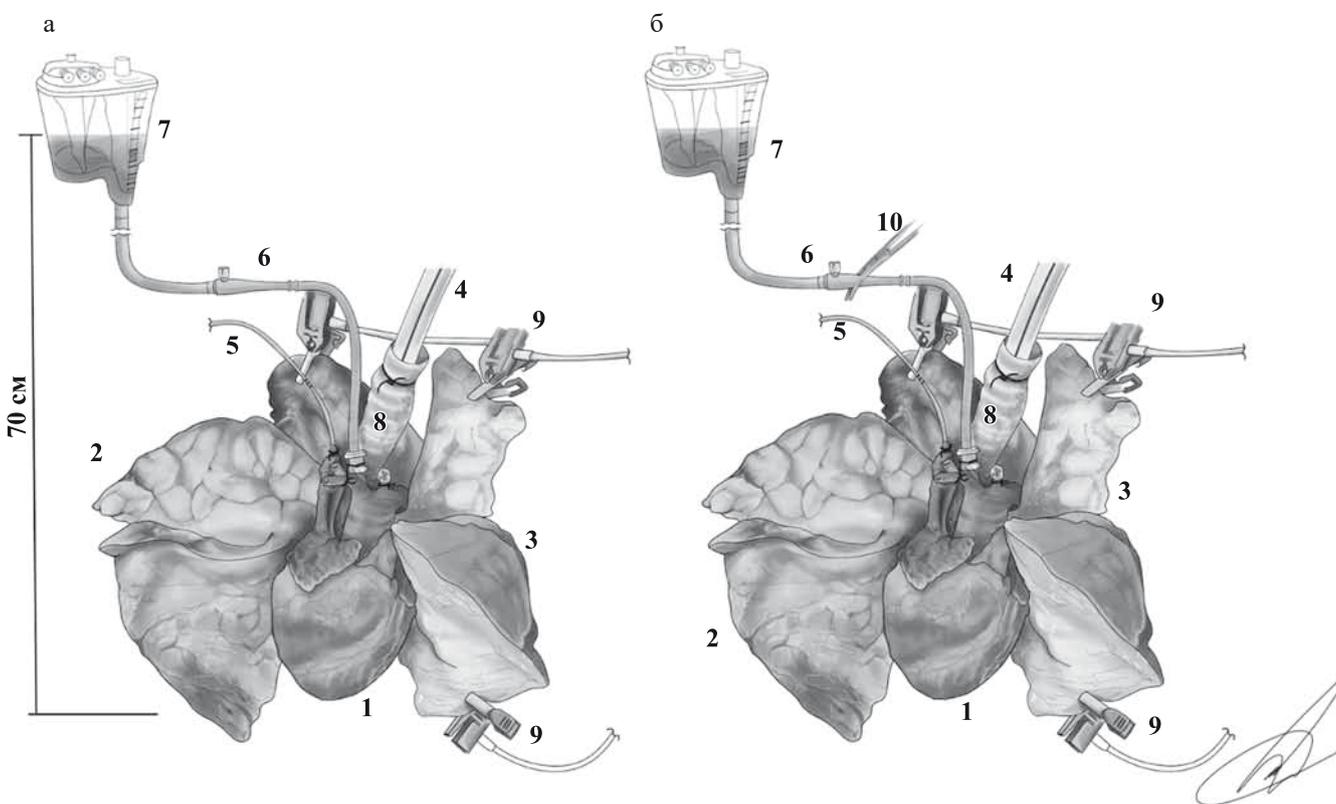


Рис. 2. Схема изолированного сердечно-легочного комплекса: а – этап эксфузии крови в резервуар и подготовка к переносу комплекса в контейнер; б – этап окончательной гемодинамической изоляции рСЛК; 1 – сердце; 2 – правое легкое; 3 – левое легкое; 4 – интубационная трубка; 5 – катетер Свана–Ганса; 6 – артериальная канюля; 7 – резервуар с кровью; 8 – трахея; 9 – электроды электрокардиографа; 10 – зажим

Fig. 2. Diagram of the isolated cardiopulmonary complex: а – stage of blood exsufflation into the reservoir and preparation for transfer of the complex into a container; б – stage of final hemodynamic isolation of the cardiopulmonary complex; 1 – heart; 2 – right lung; 3 – left lung; 4 – intubation tube; 5 – Swan–Ganz catheter; 6 – arterial cannula; 7 – blood tank; 8 – trachea; 9 – electrocardiograph electrodes; 10 – clamp

При этом во всех экспериментах контрольной группы восстановление сердечного ритма требовало проведения многократной электрической дефибриляции (до 10 разрядов) с последующей электрокардиостимуляцией. Время реперфузии, необходимое для отлучения СЛК от искусственного кровообращения с возможностью самостоятельно поддерживать уровень артериального давления в корне аорты не ниже 60 мм рт. ст., составило 87 [67; 102] мин и 19 [17,5; 22,5] мин ( $p < 0,05$ ) в контрольной и экспериментальной группах соответственно.

Степень ишемии и эффективность методики кондиционирования определяли по уровню лактата, тропонина I, тропонина T и белка, связывающего жирные кислоты (H-FABP) в крови, оттекающей

от коронарного синуса (табл. 2). В группе контроля наблюдалось статистически значимое повышение уровня лактата, тропонина I и тропонина T после этапа реперфузии и восстановления самостоятельной работы сердечного трансплантата по сравнению с группой аутоперфузии (табл. 2).

Сохранность синтетической эндотелиальной функции исследовали путем оценки уровня вазорелаксирующего эндотелиального фактора (NO), эндотелиального фактора роста (VEGF), селективных группы E и P (табл. 3).

В ходе исследования было показано, что после 6-часовой консервации раствором Кустодиола® уровень NO был ниже, чем в группе нормотермической аутоперфузии (378,5 и 542,1 мкмоль/мл соответ-

Таблица 1

**Основные параметры гемодинамики**  
**Main hemodynamic parameters**

Параметр	Контрольная (n = 5)		Экспериментальная (n = 5)		
	До консервации	После реперфузии	T1	T6	После реперфузии
СВ, л/мин	0,83 [0,74; 1,86]	0,37* [0,23; 0,37]	0,84 [0,78; 0,94]	0,57 [0,26; 0,88]	0,63# [0,37; 0,8]
ЧСС, уд/мин	96 [86; 105]	100 (ЭКС)	87 [78; 96]	98 [83; 116]	100 (ЭКС)
иАД, мм рт. ст.	110 [75; 130]	162* [158; 210]	115 [65; 134]	112 [57; 128]	108 [84; 137]
СКР, мм рт. ст.·мин/мл/100 г	5,4 [4,2; 7,6]	13,9* [9,6; 15,8]	6,3 [5,3; 8,7]	7,1 [6,1; 10,3]	8,8# [5,3; 10,7]

*Примечание.* Данные представлены как Ме [Q1; Q3]. СВ – сердечный выброс; ЧСС – частота сердечных сокращений; иАД – инвазивное артериальное давление (корень аорты); СКР – сопротивление коронарного русла; T1 – 1-й час аутоперфузии; T6 – 6-й час аутоперфузии; \* –  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; # –  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля после реперфузии.

*Note.* Data are presented as Me [Q1; Q3]. СВ – cardiac output; ЧСС – heart rate; иАД – invasive arterial blood pressure (aortic root); СКР – coronary vascular resistance; T1 – 1st hour of autoperfusion; T6 – 6th hour of autoperfusion; \* –  $p < 0.05$  compared with baseline (before preservation); # –  $p < 0.05$  compared with control group after reperfusion.

Таблица 2

**Маркеры ишемии миокарда**  
**Myocardial ischemic markers**

Показатель	Контрольная (n = 5)		Экспериментальная (n = 5)		
	До консервации	После реперфузии	T1	T6	После реперфузии
Лактат, ммоль/л	3,3 [2,2; 4,5]	11,8* [10,1; 13,5]	5,8 [5,1; 6,7]	5,3 [4,7; 5,9]	7,1# [6,3; 8,4]
Тропонин I, нмоль/л	175,84 [57,7; 309,9]	317 803,98* [44 509,9; 500 000,0]	144,8 [87,5; 187,7]	–	126 069*# [42 437,5; 141 583,1]
Тропонин T, нмоль/л	0	988* [648; 1815,5]	0	442* [86,3; 881]	104,5*# [55,3; 344,3]
H-FABP, пг/мл	0,2 [0,02; 1,1]	2,1* [0,1; 2,1]	0	0	0

*Примечание.* Данные представлены как Ме [Q1; Q3]; H-FABP – белок, связывающий жирные кислоты; T1 – 1-й час аутоперфузии; T6 – 6-й час аутоперфузии; \* –  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; # –  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля после реперфузии.

*Note.* Data are presented as Me [Q1; Q3]; H-FABP – heart-type fatty acid-binding protein; T1 – 1st hour of autoperfusion; T6 – 6th hour of autoperfusion; \* –  $p < 0.05$  vs baseline (before preservation); # –  $p < 0.05$  vs control group after reperfusion.

Таблица 3

**Результаты исследования экстрактов миокарда левого желудочка сердца**  
**Results of the study of myocardial extracts from the left ventricle of the heart**

Показатель	Контрольная (n = 5)		Экспериментальная (n = 5)		
	До консервации	После реперфузии	T1	T6	После реперфузии
NO, $\mu\text{M}/\text{мл}$	524,3 [335,1; 733,2]	378,5* [226,4; 539,7]	626,8 [566,5; 1288,5]	593,1 [442,8; 1003,8]	542,1# [377,6; 853,2]
VEGF, пг/мл	701,8 [397,3; 1034,2]	978,1 [732,8; 1265,7]	742,3 [464,2; 1152,1]	789,3 [465,2; 1115,1]	777,8 [407,6; 1140,8]
SelE, нг/мл	0,3 [0,05; 2,3]	4,4* [0,3; 8,1]	0	0,2 [0,1; 0,4]	0,2# [0,05; 0,2]
SelP, нг/мл	1,8 [0,9; 2,6]	5,6* [2,8; 9,1]	1,3 [0,8; 1,8]	1,6 [1,1; 2,1]	2,4# [1,2; 3,2]

*Примечание.* Данные представлены как Me [Q1; Q3]; NO – эндотелиальный релаксирующий фактор; VEGF – эндотелиальный фактор роста; SelE – селектин E; SelP – селектин P; T1 – 1-й час аутоперфузии; T6 – 6-й час аутоперфузии; \* –  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; # –  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля.

*Note.* Data are presented as Me [Q1; Q3]; NO – endothelium-derived relaxing factor; VEGF – vascular endothelial growth factor; SelE – selectin E; SelP – selectin P; T1 – 1st hour of autoperfusion; T6 – 6th hour of autoperfusion; \* –  $p < 0.05$  vs baseline (before preservation); # –  $p < 0.05$  vs control group after reperfusion.

ственно,  $p < 0,05$ ), а концентрация молекул адгезии (селектины E/P) значительно выше по сравнению с группой аутоперфузии (4,4 нг/мл против 0,2 нг/мл для селектина E и 5,6 нг/мл против 2,4 нг/мл для селектина P соответственно,  $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Реперфузионное повреждение миокарда, по большому счету, является ятрогенным явлением. На сегодняшний день четко установлена причинно-следственная связь между степенью эндотелиальной травмы и постишемической сократительной дисфункцией трансплантата сердца [10]. Несмотря на то что фармакохолодовая кардиоплегия является стандартом консервации донорских органов, уже через четыре часа функция трансплантата может быть скомпрометирована, особенно у органов от доноров старшей возрастной группы [11]. Этот способ консервации органов является наибольшим фактором риска развития первичной дисфункции аллотрансплантата и смерти [12].

Несмотря на множество положительных сторон активной аппаратной тепловой перфузии *ex vivo*, за последние десятилетия данная технология не стала рутинной в большинстве трансплантологических центров. Главная причина – высокая стоимость подобных систем, которая препятствует их широкому внедрению в клиническую практику [13]. Вместе с тем были получены убедительные данные превосходства нормотермической аутоперфузии как метода пролонгированного нормотермического кондиционирования сердца *ex vivo* перед статической фармакохолодовой консервацией трансплантата [14]. В отличие от методов аппаратной перфузии проведение аутоперфузии донорского сердца позволяет обеспечивать

оптимальные условия доставки кислорода и макроэргов в трансплантате, а сохранение вазомоторной ауторегуляции коронарного кровотока – не подвергать эндотелиальный слой избыточному сдвиговому напряжению [15].

Недавние исследования продемонстрировали, что реперфузионное повреждение включает в себя различные элементы воспалительной реакции и что лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие играет в них центральную роль [16]. Первоначальное взаимодействие лейкоцитов и эндотелия запускает следующий патофизиологический этап реперфузионного повреждения – адгезию и миграцию нейтрофилов через эндотелий. В результате нейтрофилы оказываются в непосредственной близости от кардиомиоцитов и могут высвободить множество цитотоксических факторов, приводящих к некрозу миоцитов. Начальный процесс адгезии лейкоцитов к эндотелию начинается с роллинга по поверхности эндотелия, опосредованного высвобождением молекул адгезии [17]. В проведенном исследовании было показано, что 6-часовая консервация сердечного трансплантата раствором Кустодиола® приводит к значительному росту концентрации P-селектина по сравнению с нормотермическим кондиционированием в условиях аутоперфузии. Исследование P-селектина представляет большой интерес, поскольку его экспрессия, как предполагается, играет важную роль в роллинге и адгезии лейкоцитов к эндотелию трансплантата [18].

Еще одной причиной интереса к изучению экспрессии молекул адгезии и эндотелиальной функции является высокая частота развития васкулопатии трансплантата и отсутствие эффективного лечения данного осложнения. Предыдущие отчеты показали,

что степень утолщения артериальной интимы коррелирует с интенсивностью эндотелиальной экспрессии Р-селектина и молекул сосудистой клеточной адгезии-1 в модели хронического отторжения аллотрансплантата сердца крыс [19]. Введение антител против Р-селектина во время реперфузии уменьшало размер инфаркта, снижало адгезию лейкоцитов к коронарному эндотелию и способствовало сохранению эндотелия [20]. Особый интерес представляют исследования, в которых было показано, что экспрессия Р-селектина активировалась, когда изолированные сердца подвергались непрерывной перфузии перфузатом на основе крови [10]. Эти данные позволяют предположить, что выброс Р-селектина может быть не только признаком ишемии и реперфузии (где реперфузия, по-видимому, действует как быстрый триггер для усиления экспрессии Р-селектина), но и общим следствием непрерывной перфузии через контур экстракорпорального кровообращения, при том что ранее было показано, что перфузия сердца крысы кристаллоидным раствором без контура циркуляции не приводит к повышению концентрации Р-селектина [19]. Нами также было обнаружено увеличение экспрессии Р-селектина в группе аутоперфузии после этапа восстановления сердечной деятельности с использованием экстракорпорального контура кровообращения. Однако несмотря на двукратное увеличение концентрации Р-селектина после реперфузии по сравнению с исходными значениями, данные изменения были статистически не значимыми ( $p > 0,05$ ). Аналогичные данные были получены и при исследовании экспрессии Е-селектина. Концентрация Е-селектина статистически значимо увеличивалась в группе контроля, что, по-видимому, указывает на значительную степень эндотелиального реперфузионного повреждения в контрольной группе по сравнению с группой аутоперфузии.

Еще одним маркером ишемического повреждения миокарда является белок, связывающий жирные кислоты (Н-FABP), участвующий в клеточном метаболизме жирных кислот за счет обратимого связывания и транспорта длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот от клеточных мембран в митохондрии. Уровень Н-FABP в плазме начинает повышаться в течение 1 часа после ишемии миокарда, достигает максимума через 4–6 часов и возвращается к исходному уровню примерно через 24 часа [7]. В проведенном исследовании в контрольной группе наблюдается статистически значимое повышение концентрации Н-FABP по сравнению с группой аутоперфузии. Повышение же Н-FABP в группе аутоперфузии не наблюдалось даже спустя 6 часов кондиционирования сердца *ex vivo*, холодной ишемии в течение 60 минут и этапа реперфузии, что позволяет предположить высокую эффективность аутоперфузии как метода пролонгированной

защиты донорского сердца. Аналогичные результаты были получены и при исследовании концентрации лактата, тропонина I и T в оттекающей от коронарного синуса крови, что доказывает недостаточную эффективность раствора Кустодиола® при проведении пролонгированной (6 часов) консервации сердечного трансплантата. Однако изучение прогностической ценности маркеров повреждения миокарда и эндотелиальной дисфункции в определении функционального исхода трансплантации требует проведения дополнительных исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение длительной нормотермической аутоперфузии сердечного трансплантата в отличие от статической фармакохолодовой консервации раствором Кустодиола® позволяет сохранить физиологические условия функционирования коронарного эндотелия и синтез эндотелиоцитами регулирующих агентов, и следовательно, уменьшить степень ишемически-реперфузионного повреждения. Полученные данные позволяют предположить высокий потенциал данного способа длительного кондиционирования сердечного трансплантата в предупреждении развития васкулопатии.

*Исследование выполнено в рамках проекта № 23-25-10013 (Соглашение № 23-25-10013 от 20.04.2023 г. с РФФ, Соглашение № р-52 от 03.04.2023 г. с Министерством науки и инновационной политики НСО).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Fiol B, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report – 1999. *J Heart Lung Transplant.* 1999 Jul; 18 (7): 611–626.
2. Stoica SC, Goddard M, Large SR. The endothelium in clinical cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2002 Mar; 73 (3): 1002–1008.
3. Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G 3rd, Lefer AM. Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation.* 1990 Oct; 82 (4): 1402–1412.
4. Kupatt C, Habazettl H, Zahler S, Weber C, Becker BF, Messmer K, Gerlach E. ACE-inhibition prevents post-ischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 1997 Dec; 36 (3): 386–395.
5. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res.* 1993 Feb; 72 (2): 403–412.

6. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Jun 1; 88 (11): 4651–4655.
7. Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol*. 1991 Feb; 112 (4): 749–759.
8. Boyle EM Jr, Pohlman TH, Cornejo CJ, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1996 Dec; 62 (6): 1868–1875.
9. Forbess JM, Hiramatsu T, Nomura F, Miura T, Farrington GK, Sokolowski K et al. Anti-CD11b monoclonal antibody improves myocardial function after six hours of hypothermic storage. *Ann Thorac Surg*. 1995 Nov; 60 (5): 1238–1244.
10. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*. 1991 Apr; 5 (7): 2029–2034.
11. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2010 Aug; 29 (8): 914–956.
12. Banner NR, Thomas HL, Curnow E, Hussey JC, Rogers CA, Bonser RS et al. The importance of cold and warm cardiac ischemia for survival after heart transplantation. *Transplantation*. 2008 Aug 27; 86 (4): 542–547.
13. Pettit SJ, Petrie MC. Transplantation of Hearts Donated After Circulatory-Determined Death. *Circ Heart Fail*. 2019 Apr; 12 (4): e005991.
14. Таркова АР, Зыков ИС, Жульков МО, Протопопов АВ, Смирнов ЯМ, Макаев АГ и др. Нормотермическая аутоперфузия сердечно-легочного комплекса *ex vivo*: оценка функционального статуса и метаболизма. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (4): 150–159. Tarkova AR, Zykov IS, Zhulkov MO, Protopopov AV, Smirnov YaM, Makaev AG et al. Normothermic *ex vivo* heart and lung autoperfusion: assessment of functional status and metabolism. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (4): 150–159.
15. Жульков МО, Таркова АР, Зыков ИС, Макаев АГ, Протопопов АВ, Муртазалыев МН и др. Длительная нормотермическая аутоперфузия сердечно-легочного комплекса *ex vivo* как метод эффективного кондиционирования трансплантата: экспериментальное исследование. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2023; 27 (4): 33–42. Zhulkov MO, Tarkova AR, Zykov IS, Makaev AG, Protopopov AV, Murtazaliyev MN et al. Long-term normothermic autoperfusion of the cardiopulmonary complex *ex vivo* as a method of effective graft conditioning: an experimental study. *Circulatory pathology and cardiac surgery*. 2023; 27 (4): 33–42.
16. Zhou M, Yu Y, Luo X, Wang J, Lan X, Liu P et al. Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Therapeutics from a Mitochondria-Centric Perspective. *Cardiology*. 2021; 146 (6): 781–792.
17. Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*. 1995; 64: 113–139.
18. Cell adhesion molecules: selectins and integrins – PubMed [Electronic resource]. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10647744/> (accessed: 18.01.2024).
19. Koskinen PK, Lemström KB. Adhesion molecule P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation*. 1997 Jan 7; 95 (1): 191–196.
20. Weyrich AS, Ma XY, Lefer DJ, Albertine KH, Lefer AM. *In vivo* neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest*. 1993 Jun; 91 (6): 2620–2629.

Статья поступила в редакцию 02.03.2024 г.  
The article was submitted to the journal on 02.03.2024