

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-4-189-200

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НОВОГО КОМБИНИРОВАННОГО РАСТВОРА НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАНА-40 НА МОДЕЛИ МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.В. Грудинин¹, В.К. Богданов¹, И.В. Пашков¹, О.Ю. Есипова¹, А.П. Кулешов¹,
Н.П. Можейко¹, Е.А. Волкова¹, С.В. Готье^{1, 2}

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Актуальность. Существующий дефицит донорских органов остается нерешенной проблемой в области трансплантологии. Особенно остро это ощущается в таком прогрессивном направлении, как трансплантация легких. Применение перфузионных технологий позволило значительно расширить возможности развития экстракорпоральных систем для реабилитации донорских органов, но до сих пор остается актуальным поиск оптимальных перфузионных и консервирующих растворов. **Цель:** оценить эффективность разработанного раствора для консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии легких (EVLP), а также провести сравнительный анализ с официальным раствором для процедуры EVLP. **Материалы и методы.** Проведены экспериментальные исследования на моделях мелких животных. Все животные были разделены на 2 группы: контрольную и экспериментальную. Этапы исследования состояли из эксплантации донорских легких, статического гипотермического хранения, *ex vivo* перфузии донорских легких и ортотопической трансплантации левого легкого. Консервация донорских легких проводилась в экспериментальной группе опытным раствором, в группе контроля – Perfadex Plus (XVIVO, Швеция). Период статического гипотермического хранения составлял 10 часов. После *ex vivo* перфузии выполнялась ортотопическая трансплантация левого легкого, период наблюдения составлял 2 часа, после чего выполняли забор проб крови и участков трансплантированного легкого для морфологического исследования. По завершении эксперимента животное выводилось из эксперимента посредством обескровливания. **Результаты.** Респираторный индекс под конец перфузии был статистически значимо выше в экспериментальной группе и составил 434 мм рт. ст. против 394 мм рт. ст. в группе контроля. Показатели легочного сосудистого сопротивления в обеих группах имели динамику к снижению, что является хорошим прогностическим признаком эффективности перфузионных агентов. Легочное сосудистое сопротивление в экспериментальной группе было ниже и составляло 36 дин·с/см⁻⁵ против 89 дин·с/см⁻⁵ в контрольной группе. **Заключение.** Разработанный комбинированный раствор на основе декстрана-40 показал свою эффективность как консервирующий агент для статического гипотермического хранения и как перфузионный раствор для EVLP.

Ключевые слова: трансплантация легких, *ex vivo* перфузия легких, консервирующий раствор, перфузионный раствор.

Для корреспонденции: Грудинин Никита Владимирович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (903) 805-63-58. E-mail: Zbigneve.religa@mail.ru

Corresponding author: Nikita Grudin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (903) 805-63-58. E-mail: Zbigneve.religa@mail.ru

EXPERIMENTAL STUDY OF A NEW DEXTRAN-40-BASED COMBINED SOLUTION ON A SMALL LABORATORY ANIMAL MODEL

N.V. Grudin¹, V.K. Bogdanov¹, I.V. Pashkov¹, O.Yu. Esipova¹, A.P. Kuleshov¹,
N.P. Mozheiko¹, E.A. Volkova¹, S.V. Gautier^{1, 2}

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Background. Organ shortage remains an unsolved issue in the field of transplantology. It is particularly severe in such a progressive area as lung transplantation. The creation of extracorporeal systems for rehabilitation of donor organs has been made possible by perfusion techniques; however, the search for the best perfusion and preservation solutions remains important. **Objective:** to evaluate the efficacy of the developed solution for preservation and normothermic *ex vivo* lung perfusion (EVLP), as well as to conduct a comparative analysis with the standard perfusion solution for EVLP. **Materials and methods.** Experimental studies on small animal models were conducted. All animals were divided into 2 groups – control and experimental. The study stages consisted of: procurement of donor lungs, static cold storage, EVLP and orthotopic left lung transplantation. In the experimental group, the lungs were preserved using an experimental solution, while in the control group, they were preserved in PERFADEX[®] Plus (XVIVO, Sweden). Static cold storage lasted for 10 hours. Orthotopic left lung transplantation was performed after EVLP. The follow-up period was 2 hours, after which blood samples and sections of the transplanted lung were taken for morphological examination. Upon completion of the experiment, the animal was removed from the experiment by exsanguination. **Results.** Respiratory index at the end of perfusion was statistically significantly higher in the experimental group (434 mmHg) than that of the control group (394 mmHg). Pulmonary vascular resistance (PVR) in both groups had a downward trend, which is a good prognostic sign of the efficacy of perfusion agents. PVR was lower in the experimental group compared to the control group – 36 versus 89 dynes/sec/cm⁻⁵. **Conclusion.** The developed combined dextran-40-based solution showed its effectiveness as a preservation agent for static cold storage and as a perfusion solution for EVLP.

Keywords: lung transplantation, ex vivo lung perfusion, preservative solutions, perfusion solution.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из самых эффективных методов лечения пациентов с терминальной стадией заболеваний респираторной системы является трансплантация легких. Доступность данного метода ограничена дефицитом донорских органов [1, 2]. Благодаря расширению критериев увеличивается пул донорских органов для трансплантации, однако использование скомпрометированных органов сопряжено с рисками развития первичной дисфункции трансплантата [3, 4].

Процедура нормотермической *ex vivo* перфузии легких (EVLP) позволяет объективно оценить скомпрометированные донорские легкие, считавшиеся ранее не пригодными для трансплантации. Помимо оценки донорского органа в условиях EVLP возможно пролонгировать время консервации, что обеспечивает ряд логистических и организационных преимуществ. Кроме того, в последние годы EVLP показала себя как терапевтическая платформа для восстановления донорских легких. К настоящему времени имеющийся клинический опыт уже продемонстрировал безопасность и целесообразность трансплантации органов после процедуры EVLP, по-

казав сопоставимую выживаемость с донорскими легкими, трансплантированными после традиционного статического гипотермического хранения [5–7].

Успех метода EVLP основан на фундаментальных исследованиях профессора Стига Стина, который провел первую успешную однолегочную трансплантацию после предварительной *ex vivo* перфузии [8]. Успех перфузии был обусловлен разработанным перфузионным раствором на основе альбумина человека (Steen Solution[™]). Одним из основных компонентов раствора Стина является человеческий сывороточный альбумин, который поддерживает физиологически значимое коллоидно-осмотическое давление, минимизируя повреждение легких [9]. Наличие в составе раствора декстрана-40 позволяет снизить негативное воздействие лейкоцитов на эндотелий сосудов [10]. Несмотря на положительные свойства раствора во время EVLP, легкие неизбежно сталкиваются с ишемически-реперфузионным повреждением (ИРП). ИРП характеризуется острыми воспалительными реакциями и повышением оксидативного стресса, что в свою очередь способствует развитию первичной дисфункции трансплантата в раннем послеоперационном периоде [11–13]. Хорошо из-

вестно, что уровень провоспалительных цитокинов в перфузате и тканях значительно увеличивается со временем даже в ходе проведения перфузий [14, 15]. Длительность перфузии напрямую влияет на степень и выраженность повреждений трансплантата легких [16, 17].

Нет полного понимания патофизиологических процессов, происходящих во время EVLP, а существующие перфузионные растворы продолжают модифицироваться по своему составу и добавлению новых адьювантов. Учитывая вышеизложенное, был разработан комбинированный раствор для консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии. В отличие от оригинального раствора Стина разработанный раствор в качестве основы содержит декстран-40 и модифицированный электролитный состав.

Целью данного исследования было оценить эффективность экспериментального раствора в сравнении с оригинальным раствором Steen Solution™, который широко используется в клинической практике во всем мире и считается «золотым стандартом» для проведения EVLP.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были проведены экспериментальные исследования на моделях мелких животных, а именно на самцах крыс линии Wistar массой 250–300 г.

Этапы проведения серии экспериментов:

- эксплантация донорских легких;
- статическое гипотермическое хранение;
- *ex vivo* перфузия донорских легких;
- ортотопическая трансплантация левого легкого.

Консервация донорских легких проводилась в экспериментальной группе опытным раствором, в группе контроля в качестве консервирующего агента выступал Perfadex Plus. Во всех случаях период статического гипотермического хранения составлял 10 часов.

Все животные были разделены на две равные группы – доноры ($n = 30$) и реципиенты ($n = 30$). В свою очередь, животные-доноры были разделены на 2 группы:

- 1-я группа – EVLP с применением опытного раствора ($n = 15$);
- 2-я группа – EVLP раствором Steen Solution™ ($n = 15$).

После *ex vivo* перфузии выполнялась ортотопическая трансплантация левого легкого, период наблюдения составлял 2 часа, после чего выполняли забор проб крови и участков трансплантированного легкого для морфологического исследования.

Процедура эксплантации донорских легких

Животного-донора помещали в специальную наркотическую камеру, где с использованием испарителя для

изофлурана (RWD R5835, Китай) в потоке 1 л/мин и концентрации 5 об/% выполняли седацию крысы. Контроль глубины анестезии проводили путем оценки реакции на болевой импульс и частоты дыхательных движений. Интубацию трахеи проводили в/в катетером 14 G, интубационную трубку соединяли с контуром аппарата ИВЛ SAR-830/AP Ventilator (CWE, США), а искусственную вентиляцию легких инициировали 100% кислородом в специально подобранных параметрах: ЧД – 85/мин, $V_{\text{дых}}$ – 1,2 мл, $V_{\text{пот}}$ – 700 мл/мин, P_{peak} – 8 см вод. ст., РЕЕР – 3 см вод. ст., поток изофлурана 3,5 об/%. Выполняли срединную стернотомию. После диссекции тканей легких и прикорневых структур вводили гепарин 500 ЕД путем пункции верхушки правого желудочка. Спустя 3 минуты экспозиции выполняли забор цельной донорской крови у крысы-донора в объеме 12 мл в гепаринизированный шприц. Далее в правый желудочек устанавливали канюлю 2,0/2,5 мм и продвигали в просвет легочной артерии, в левый желудочек сердца вводили металлическую угловую канюлю диаметром 2 мм с целью адекватного дренажа перфузата. Консервацию донорских легких осуществляли посредством антеградной перфузии раствором Perfadex Plus с температурой 4 °С и объемом 20 мл через шприц-дозатор со скоростью 200 мл/ч (3,3 мл/мин) и временем экспозиции 6 минут [18].

Во время проведения консервации изменяли параметры искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом: ЧД – 40/мин, $V_{\text{дых}}$ – 1,5 мл, $V_{\text{пот}}$ – 300 мл/мин, P_{peak} – 6 см вод. ст., РЕЕР – 3 см вод. ст. После проведения консервации трансплантата диафрагму и верхнюю полую вену, связки легких и плевру пересекали, трахею сепарировали от пищевода. После полной мобилизации легких в просвет трахеи вводили пластиковую канюлю 14 G для последующей вентиляции в условиях EVLP. После завершения эксплантации трансплантат легких помещали в стерильную емкость, заполненную 30 мл раствора Perfadex Plus для статического гипотермического хранения в течение 10 часов.

Процедура нормотермической *ex vivo* перфузии

В экспериментальной группе перфузионный контур заполняли 10 мл опытного раствора на основе декстрана-40 и 12 мл цельной донорской крови. В контрольной группе экстракорпоральный контур заполнялся 20 мл раствора Steen Solution. Во всех группах к раствору добавляли следующие адьюванты: глюкоза 40% – 4 Ед, NaHCO_3 4,8% – 2 Ед, вазпростан – 10 мкг, инсулин Р – 3 Ед, метилпреднизолон – 20 мг, цефазолин – 0,5 мг/мл, гепарин – 300 ЕД. По достижении температуры раствора 25 °С во время непрерывной рециркуляции проводили контрольный

анализ перфузата с целью определения кислотно-основных и электролитных показателей, а также концентрации глюкозы.

Для деаэрации заполнение трансплантата выполняли ретроградно при скорости 1 мл/мин через канюлю в левом предсердии пассивно водным столбом до появления раствора в канюле легочной артерии. Далее насос останавливали, перфузионную магистраль соединяли с канюлей в легочной артерии. Начальную объемную скорость перфузии устанавливали на уровне 1,2 мл/мин, или 15% от целевой скорости перфузии. Расчет должной 100% скорости перфузии проводили на основе предполагаемой массы трансплантата легких, рассчитываемой по формуле (1):

$$V = 0,0053 \times m - 0,48, \quad (1)$$

где m – масса животного, г.

Был выполнен расчет 6 мл/мин/г предполагаемой массы трансплантата легких [18, 19].

Искусственную вентиляцию трансплантата легких инициировали спустя 15 минут после начала нормотермической машинной перфузии и достижения температуры 33 °С. С учетом времени регистрации параметров перфузии рассчитывали сосудистое сопротивление в легких.

Анализ газового и электролитного составов перфузата проводили до инициации перфузии трансплантата, и далее через каждые 15 минут. Пробы отбирали одновременно из двух участков перфузионного контура – оттекающий перфузат из левого предсердия и циркулирующий – из порта после оксигенатора. Сравнение двух полученных показателей концентрации кислорода и углекислого газа позволяли сделать вывод об эффективности перфузии и функциональном статусе трансплантата. При достижении 120 минут выполняли контрольное исследование газового и ионного составов перфузионного раствора, останавливали машинную перфузию, ИВЛ продолжали. Для дальнейшей консервации в легочную артерию через перфузор подавали опытный раствор на основе декстрана-40 температурой 4 °С и объемом 20 мл со скоростью 200 мл/ч.

Ортотопическая трансплантация левого легкого

Легкое имплантировали с использованием kuff-метода с целью сокращения времени тепловой ишемии трансплантата и уменьшения влияния на результаты эксперимента хирургической техники [20]. Основная идея методики заключалась в использовании манжет, изготовленных из внутривенных катетеров, для фиксации сосудов трансплантата и их имплантации в сосуды реципиента. Для имплантации бронхов использовали катетеры 14 G, для легочной артерии – 16 G, для легочной вены – 14–16 G в зависимости от диаметра сосуда [21, 22]. Чтобы снизить

тепловую ишемию и обеспечить охлаждение в момент установки манжет, трансплантат обрабатывали консервирующим раствором на основе декстрана-40 при температуре 4 °С. Трансплантат подвешивали за корень легкого и позиционировали с помощью гибкого держателя. Последовательно сосуды донорского легкого проводили через манжету, сосудистый край загибали на тело манжеты и фиксировали шовной лигатурой Prolene 7/0. Бронхиальную манжету имплантировали аналогично. Эта процедура занимала в среднем 30 минут. После вводной анестезии и начала искусственной вентиляции животного-реципиента позиционировали на операционном столе, на правом боку, и выполняли торакотомию в 5-м межреберье с резекцией 4-го ребра [23, 24]. Сосудистые структуры легкого мобилизовали, затем на корень легкого накладывали сосудистый зажим, после чего легкое удалялось. Для предотвращения перекручивания сосудистых анастомозов в первую очередь имплантировали левый главный бронх. Для удобства имплантации манжет легочную артерию и вены вскрывали в поперечном направлении, после чего манжеты имплантировались и фиксировались лигатурой. По завершении анастомозов открывали сосудистый зажим и начинали реперфузию трансплантата. Период наблюдения составлял 2 часа, после чего селективно из легочной артерии и легочных вен забирали кровь для газового анализа.

Морфологическое исследование

По завершении перфузии образцы паренхимы правых легких были фиксированы в 10% нейтральном забуференном растворе формальдегида (рН 7,4) в течение 24 часов. Через 2 часа после трансплантации образцы паренхимы левых легких также прошли процедуру фиксации в 10% формальдегиде. Для закрепления материала в парафиновые блоки использовали изопропиловый спирт и петролейный эфир. Затем парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Микроскопический анализ проводился при помощи светового микроскопа Leica DM 750 (Leica, Германия) с использованием окуляра 10 и объективов 4, 10, 40 и 100. Фотографии полученных срезов были сделаны с фотокамеры ICC50 (Leica, Германия). Образцы оценивали на предмет тромбоза сосудов, кровоизлияний, развития интерстициального и альвеолярного отеков, а также клеточной инфильтрации.

Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием лицензионной программы SAS Enterprise Guide 9.4. Все показатели проверялись на соответствие нормальному распределению (критерии Колмогорова, Шапиро–Уилка). В случае нор-

мального распределения применялись методы параметрической статистики. В случае распределения, отличающегося от нормального, – методы непараметрической статистики. Сравнение групп по показателям (индекс оксигенации, легочное сосудистое сопротивление, давление в легочной артерии, лактат, глюкоза, буферные основания, пиковое давление на вдохе) выполнялось с использованием теста Краскела–Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Диаграммы размаха были построены в программе SAS Enterprise Guide 9.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведение экспериментального исследования сопровождалось двумя ключевыми этапами – нормотермической машинной перфузией донорских легких *ex vivo* и ортотопической трансплантацией левого донорского легкого животному-реципиенту. На протяжении всей процедуры перфузии регистрировались основные показатели функционального статуса донорских легких в двух группах – индекс оксигенации (ИО) (рис. 1), давление в легочной артерии (ДЛА) и периферическое сосудистое сопротивление (ПСС). Сравнение показателей выполнялось с помощью теста Краскелла–Уоллиса, различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Индекс оксигенации – основной показатель, отражающий газотранспортную функцию донорских

легких во время процедуры перфузии, а его нижнее допустимое значение составляет 350. В результате проведенного исследования отмечались высокие показатели ИО. Так, в контрольной группе в начале процедуры медиана значений ИО составила 498,5 [460; 537], а в группе сравнения медиана показателей индекса оксигенации составила 518 [483; 553], статистическая значимость различий не определялась ($p > 0,05$). На протяжении всего времени проведения процедуры *ex vivo* соотношение PaO_2/FiO_2 в двух группах было сопоставимо, но в заключительном исследовании отмечалось значительное увеличение ИО в исследуемой группе. Так, в группе с применением Steen Solution медиана индекса оксигенации составила 394,4 [373; 416] против медианы показателя в группе с использованием опытного раствора – 434,7 [422; 447] при $p < 0,0001$, различия были статистически значимы.

Несмотря на то что во время нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo* значения объемной скорости перфузии в двух группах были идентичны, значения ДЛА отличались (рис. 2).

В контрольной группе начальные показатели ДЛА были в пределах допустимых пределов в 15 мм рт. ст., а медиана составила 9,07 [7,7; 10,4] мм рт. ст. На протяжении всей процедуры в данной группе колебания значений ДЛА были незначительны, и в исходе составили 8,47 [7,2; 9,8] мм рт. ст. В иссле-

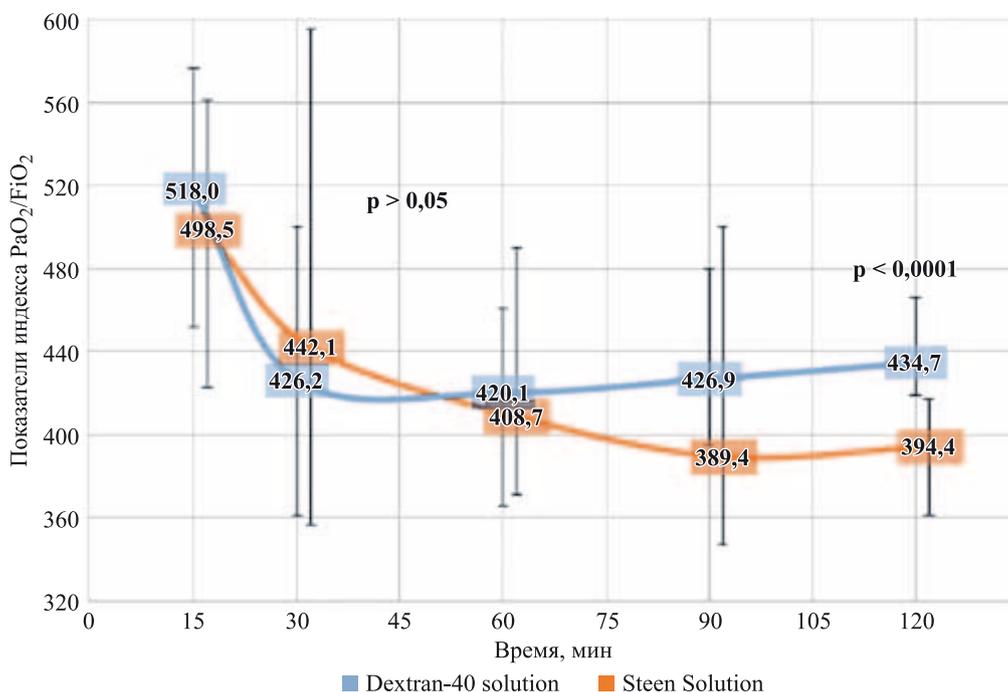


Рис. 1. Динамика показателей индекса оксигенации во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 1. Dynamics of oxygenation index during EVLP. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

дуемой же группе медиана показателей ДЛА имела выраженную тенденцию к снижению – от 4,45 [3,3; 5,6] до 3,4 [2,9; 3,9] мм рт. ст. к концу процедуры, – демонстрируя статистически значимые различия. Данная особенность являлась ключевой при вычислении показателей ПСС, которые были объективным отражением податливости сосудистого русла донорских легких во время перфузии *ex vivo* (рис. 3).

В контрольной группе медиана значений ПСС в начале процедуры регистрировалась на уровне 604,3 [515; 693] дин·с/см⁻⁵, в то время как в исследуемой группе медиана показателя не превышала 297,8 [223; 373] дин·с/см⁻⁵, а различия были статистически значимы. Несмотря на выразительную тенденцию к снижению значений ПСС в двух группах, в исходе нормотермической перфузии в группе с применением опытного раствора на основе декстрана-40 медиана показателей сосудистого сопротивления была ниже, чем в группе с использованием перфузионного агента Steen Solution – 35,8 [31; 41] и 89,1 [75; 103] дин·с/см⁻⁵ соответственно (p < 0,0001).

На протяжении всей процедуры перфузии регистрировалась динамика изменения концентрации лактата (рис. 4).

Динамика показателей лактата, безусловно, имела тенденцию прироста, поскольку отсутствовал механизм утилизации данного метаболита. Несмотря на отсутствие достоверных различий в показателях во

временных точках 60 и 90 минут, отмечались низкие диапазоны колебаний медианы значений лактата, а максимальные показатели были значительно ниже в группе опытного раствора в конечной точке измерения 7,5 [7,2; 7,6] ммоль/л против 7,87 [7,8; 8,5] ммоль/л в группе с использованием раствора Steen Solution.

После проведения нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo* выполнялась ортотопическая трансплантация левого легкого. В течение периода всего наблюдения (120 минут) дважды выполнялась оценка ИО (рис. 5) и лактата (рис. 6) с целью оценки функционального статуса трансплантата.

После имплантации донорского легкого показатели индекса оксигенации в группе с применением опытного раствора на основе декстрана-40 в качестве перфузионного агента были значительно выше и превышали пороговые значения в 350. В группе с применением во время EVLP раствора Steen Solution ИО был низким и находился на пограничных значениях, а медиана показателя спустя 2 часа наблюдения составляла 122 [113; 131], в группе с использованием опытного раствора медиана была на уровне 364 [353; 375] при p = 0,000.

Лактат, как маркер ишемически-реперфузионного повреждения, не превышал предельно допустимых значений в 10 ммоль/л, однако был достоверно выше в группе, где нормотермическая машинная перфу-

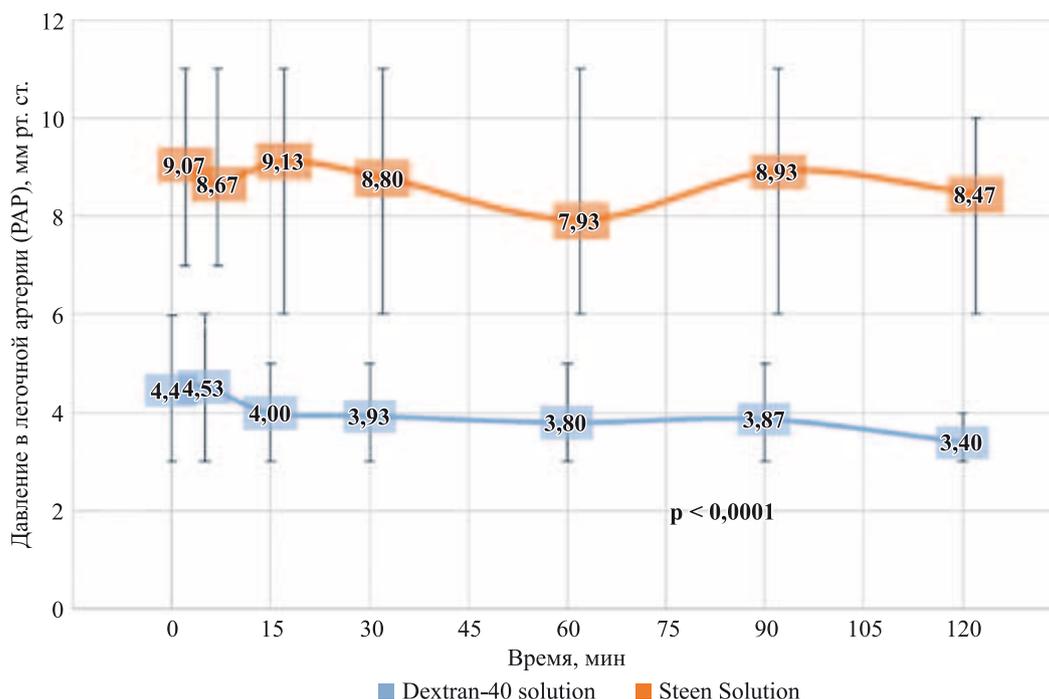


Рис. 2. Динамика значений давления в легочной артерии во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 2. Dynamics of pulmonary artery pressure during EVLP. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

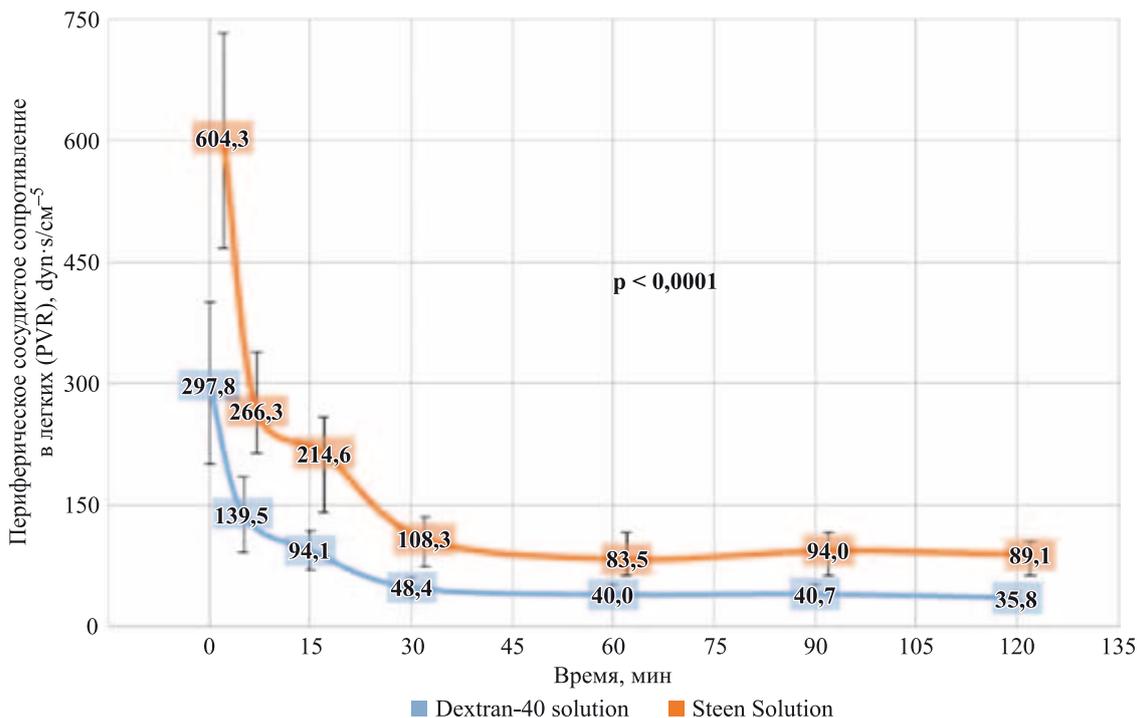


Рис. 3. Динамика показателей периферического сосудистого сопротивления во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 3. Dynamics of peripheral vascular resistance during EVLP. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

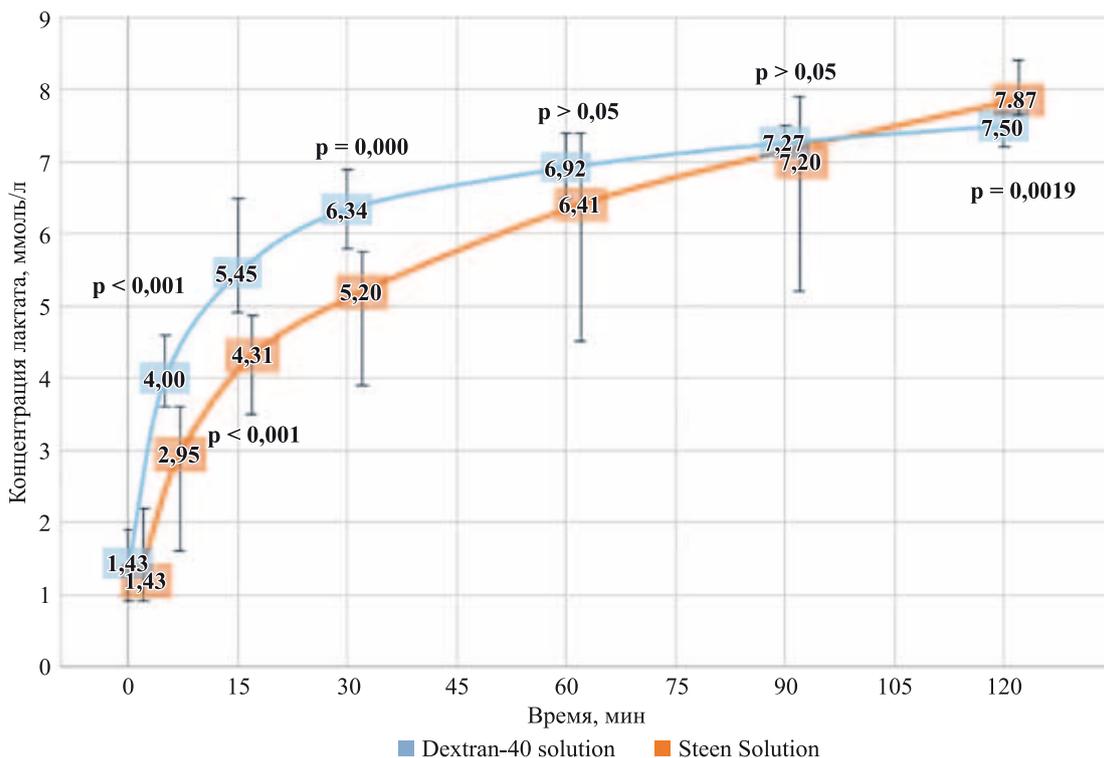


Рис. 4. Динамика изменения концентрации лактата во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 4. Dynamics of changes in lactate levels during EVLP. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

зия донорских легких проводилась с применением раствора Steen Solution – медиана значений лактата в контрольной группе после 120 минут наблюдения составила 8 [7; 9] ммоль/л, а в исследуемой группе с использованием опытного раствора медиана показателей регистрировалась на уровне 6 [5; 6] ммоль/л, что в совокупности с показателями индекса оксигенации свидетельствовало о сниженном функцио-

нальном статусе донорского легкого, различия были статистически значимы ($p = 0,043$).

Результаты морфологических исследований после процедуры EVLP

Оценка гистологических образцов проводилась при увеличении $\times 100$ (рис. 7, а) и увеличении $\times 200$ (рис. 7, б) по всей площади образца в каждом случае.

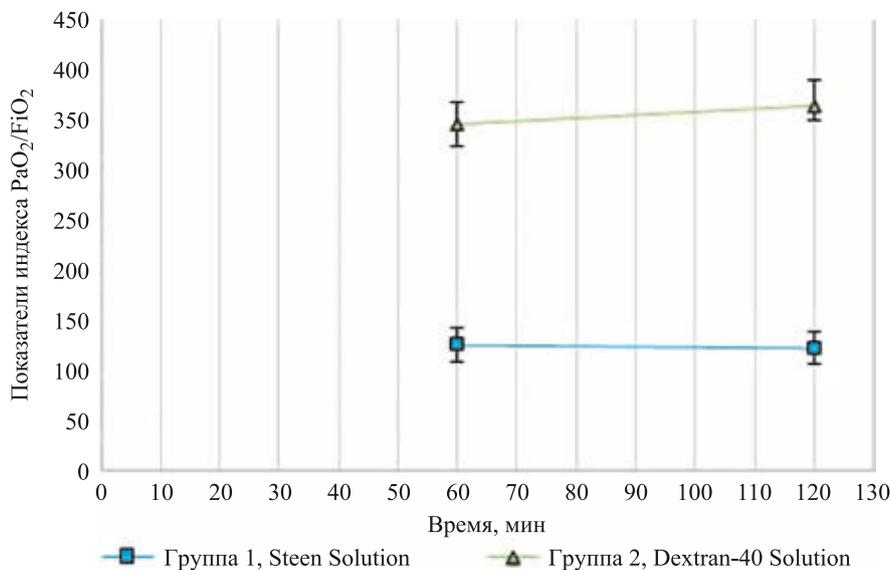


Рис. 5. Динамика показателей индекса оксигенации после трансплантации. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 5. Dynamics of oxygenation index after transplantation. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

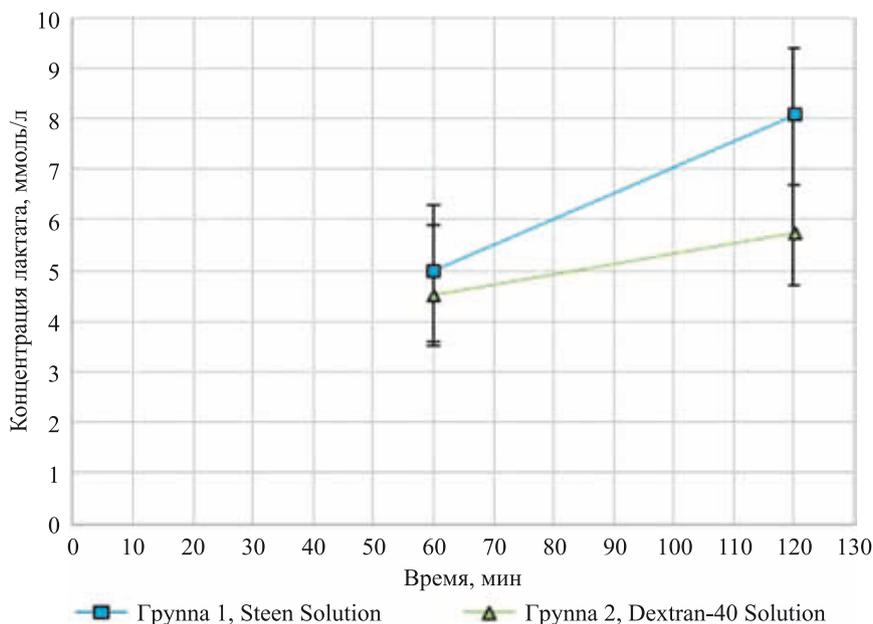


Рис. 6. Динамика изменения концентрации лактата после трансплантации. Показатели представлены в виде медианы, вертикальными линиями обозначен интерквартильный размах, p – статистическая значимость

Fig. 6. Dynamics of changes in lactate levels after transplantation. The indices are presented as median, vertical lines indicate interquartile range, p is statistical significance

После завершения перфузии, которая длилась 120 минут, фрагменты исследуемых легких были взяты для проведения оценки морфологического материала. Были обнаружены единичные участки разрывов альвеолярно-капиллярной мембраны, но при этом сохранялась целостность легочной паренхимы. При микроскопическом исследовании срезов были отмечены расправленные альвеолы. Отека не было обнаружено. Небольшие утолщения были зафиксированы в альвеолярных пространствах и в перибронховаскулярной ткани.

Результаты морфологических исследований после трансплантации

Оценка гистологических образцов проводилась при увеличении $\times 100$ (рис. 8, а) и увеличении $\times 200$ (рис. 8, б) по всей площади образца в каждом случае.

После проведения процедуры ортотопической трансплантации левого легкого было также проведено морфологическое исследование легких. В большинстве срезов была обнаружена нормальная структура легочной паренхимы. Практически во всех срезах наблюдали хорошо расправленные альвеолы, паренхима легких также была без дефек-

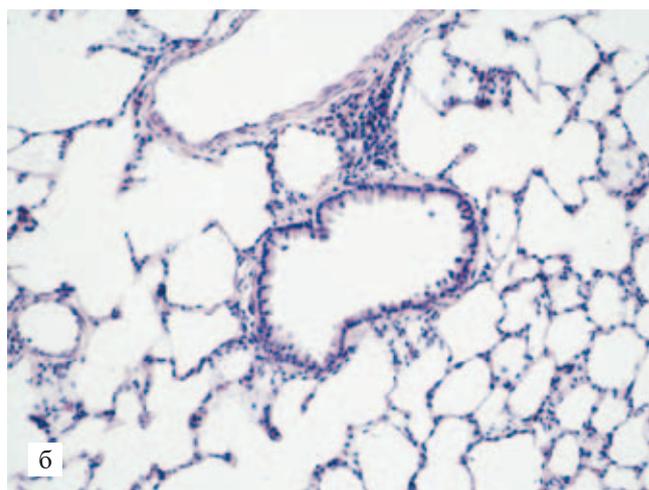
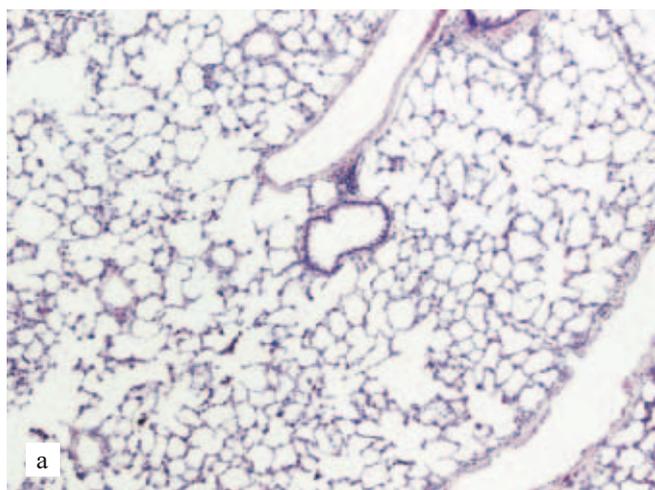


Рис. 7. Результаты морфологических исследований: а – гистологическая картина паренхимы донорского правого легкого спустя 120 минут EVLP, $\times 100$; б – гистологическая картина паренхимы донорского правого легкого спустя 120 минут EVLP, $\times 200$

Fig. 7. Results of morphologic studies: а – histologic picture of donor right lung parenchyma after 120 minutes of EVLP, $100\times$; б – histologic picture of donor right lung parenchyma after 120 minutes of EVLP, $200\times$

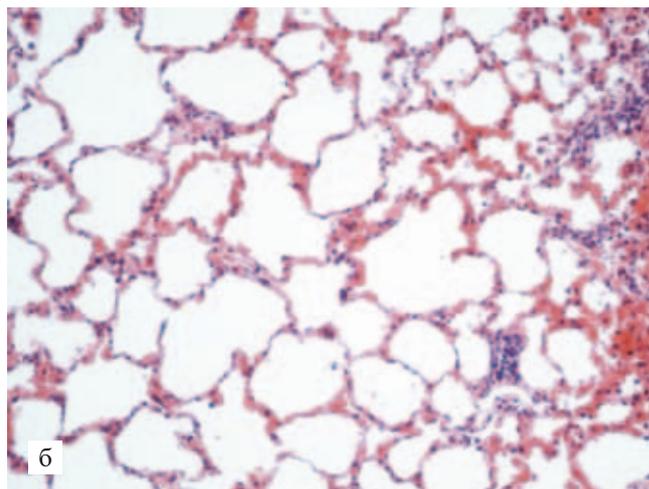
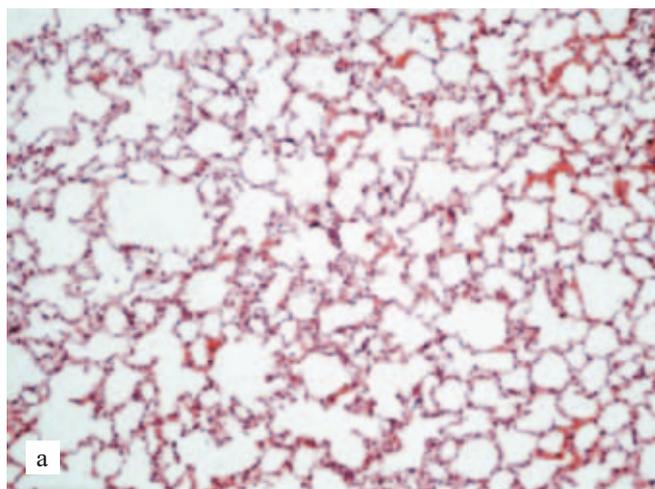


Рис. 8. Результаты морфологических исследований: а – гистологическая картина паренхимы донорского левого легкого спустя 24 часа после трансплантации, $\times 100$; б – гистологическая картина паренхимы донорского левого легкого спустя 24 часа после трансплантации, $\times 200$

Fig. 8. Results of morphologic studies: а – histologic picture of donor left lung parenchyma 24 hours after transplantation, $100\times$; б – histologic picture of donor left lung parenchyma 24 hours after transplantation, $200\times$

тов. На отдельных сегментах легких встречались микроателектатические зоны. Небольшие утолщения были зафиксированы в альвеолярных пространствах и в перибронховаскулярной ткани. Было отмечено полнокровие сосудов микроциркуляторного русла, а также отдельные участки мелкоочаговой интраальвеолярной геморрагии. Обнаружены незначительные очаговые отеки межальвеолярных перегородок. Представленная морфологическая картина в обеих группах соответствует физиологическим изменениям в трансплантате легких во время EVLP с последующей трансплантацией и не расценивается как патологическая.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время EVLP является неотъемлемой частью программ трансплантации легких во всем мире. До сих пор EVLP использовалась в основном для оценки качества субоптимальных донорских органов, однако она имеет еще больший потенциал для использования в активном лечении и восстановлении функциональных возможностей донорских легких. Одним из важнейших элементов концепции EVLP является перфузионный раствор, позволяющий проводить перфузию изолированных легких без развития отека. На сегодняшний день коммерчески доступным является буферный раствор на основе альбумина человека (Steen Solution TM). В ряде клинических исследований доказана его высокая эффективность при проведении EVLP с использованием различных протоколов и продолжительности перфузии. Примечательно, что раствор Стина может использоваться как с добавлением донорской крови, так и без клеточного компонента. В ряде исследований описываются как положительные, так и отрицательные стороны добавления эритроцитарной массы [25]. Несмотря на широкое клиническое применение раствора Стина, множество научных коллективов разрабатывают собственные растворы для перфузии.

Разработка новых растворов связана с поиском наиболее оптимального раствора для перфузии легких. Один из немаловажных аспектов проведения поисковых исследований заключается в высокой стоимости Steen SolutionTM, и как следствие, нерентабельности процедуры EVLP. Высокая себестоимость процедуры нормотермической *ex vivo* перфузии легких в значительной степени сдерживает повсеместное использование данного метода оценки и реабилитации донорских легких. В данном исследовании была показана эффективность нового комбинированного раствора на основе декстрана-40. Главным преимуществом является возможность использования предложенного раствора и как консервирующего агента для статического гипотермического хранения, и как перфузионного раствора для EVLP.

В исследовании проведена оценка эффективности экспериментального раствора на крысиной модели EVLP с последующей однопочечной трансплантацией. Период статического гипотермического хранения продолжительностью 12 часов был выбран как соответствующий клинической практике с целью моделирования донорства с расширенными критериями.

В большинстве трансляционных исследований в области *ex vivo* перфузии проводятся преимущественно на моделях свиньи [26].

Различные экспериментальные модели с использованием крупных животных сопряжены с высокими затратами на содержание и сложной логистикой. Одним из способов решения данной проблемы является использование мелких лабораторных животных в качестве экспериментальной модели. Однако подобные исследования, несмотря на экономическую привлекательность, связаны с техническими сложностями при проведении перфузии. На сегодняшний день коммерчески доступна только одна система для EVLP у крыс, разработанная компанией Harvard Apparatus. Многие исследовательские коллективы под конкретные задачи исследований, посвященные перфузии легких, моделируют собственные стенды с целью снижения затрат на расходные материалы [27]. Наше исследование проводилось на собственном разработанном малообъемном стенде с объемом заполнения всего 25 мл в сравнении с зарубежными аналогами, где первичный объем заполнения составляет от 150 мл [28–31]. Проведение перфузии легких с использованием стенда позволило в полной мере провести анализ свойств экспериментального раствора, так как в качестве основного адьюванта требовалось добавление крови. Использование экспериментальных платформ с объемом заполнения контура более 50 мл затрудняет использование донорской крови, что значительно ограничивает возможности подобных устройств.

В результате проведенного исследования респираторный индекс под конец перфузии были статистически значимо выше в экспериментальной группе, и составил 434 мм рт. ст. против 394 мм рт. ст. в группе контроля. Несмотря на более высокие значения респираторного индекса в экспериментальной группе, обе группы превысили минимальное пороговое значение в 350 мм рт. ст., что говорит об эффективности перфузии. Показатели легочного сосудистого сопротивления в обеих группах имели динамику к снижению, что является хорошим прогностическим признаком эффективности перфузионных агентов. ЛСС в экспериментальной группе было достоверно ниже и составляло $36 \text{ дин} \cdot \text{с}/\text{см}^5$ против $89 \text{ дин} \cdot \text{с}/\text{см}^5$ в контрольной группе. По данным морфологии отмечалось сохранение архитектоники паренхимы, отмечались единичные участки нейтрофильной инфильтрации. Участки разрывов альвеолярно-капил-

лярной мембраны встречались в единичных срезах. В обеих группах отмечалось незначительное утолщение альвеолярных воздушных пространств и перибронховаскулярной соединительной ткани. Все эти показатели говорят о положительных свойствах разработанного раствора в сравнении с оригинальным раствором Steen Solution™. Возможность использования разработанного раствора для консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии дает явные преимущества перед зарубежным аналогом. В проведенном исследовании отмечается восстановление функции легких после продолжительного гипотермического хранения, что убедительно отражается на росте респираторного индекса, снижении легочного сосудистого сопротивления во время перфузии.

ВЫВОДЫ

Разработанный комбинированный раствор на основе декстрана-40 показал свою эффективность как консервирующий агент для статического гипотермического хранения и как перфузионный раствор для EVLP. Использование малообъемного стенда для экспериментальных исследований на модели крысы позволяет проводить анализ функции трансплантата легких более эффективно и снижает затраты на расходные материалы. Донорские легкие, консервируемые и перфузируемые опытным раствором, показали лучшие значения респираторного индекса, более низкое легочное сосудистое сопротивление по сравнению с оригинальным раствором Steen Solution™, что свидетельствует о его эффективности. Восстановление функции легких после продолжительного гипотермического хранения подтверждается ростом респираторного индекса и снижением легочного сосудистого сопротивления во время перфузии, что говорит об адекватной и безопасной консервации трансплантата. Таким образом, разработанный комбинированный раствор на основе декстрана-40 обещает быть эффективной альтернативой для консервации и *ex vivo* перфузии донорских легких в сравнении с существующими зарубежными аналогами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. NHS Blood and Transplant: annual activity report; 2022. Available at: <https://www.odt.nhs.uk/statistics-and-reports/organ-specific-reports/>.
2. Ojo AO, Heinrichs D, Emond JC, McGowan JJ, Guidinger MK, Delmonico FL, Metzger RA. Organ donation and utilization in the USA. *Am J Transplant*. 2004; 4 (9): 27–37. doi: 10.1111/j.1600-6135.2004.00396.x.
3. Mulligan MJ, Sanchez PG, Evans CF, Wang Y, Kon ZN, Rajagopal K et al. The use of extended criteria donors decreases one-year survival in high-risk lung recipients: a review of the United Network of Organ Sharing Database. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2016; 152 (3): 891–898.e2. doi: 10.1016/j.jtcvs.2016.03.096.
4. Botha P, Trivedi D, Weir CJ, Searl CP, Corris PA, Dark JH, Schueler SV. Extended donor criteria in lung transplantation: impact on organ allocation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006; 131 (5): 1154–1160. doi: 10.1016/j.jtcvs.2005.12.037.
5. Valenza F, Rosso L, Coppola S, Froio S, Palleschi A, Tosi D et al. *Ex vivo* lung perfusion to improve donor lung function and increase the number of organs available for transplantation. *Transpl Int*. 2014; 27 (6): 553–561. doi: 10.1111/tri.12295.
6. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W et al. Normothermic *ex vivo* lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med*. 2011; 364 (15): 1431–1440. doi: 10.1056/NEJMoa1014597.
7. Sanchez PG, Chan EG, Davis RD, Hartwig M, Machuca T, Whitson B et al. Normothermic *ex vivo* lung perfusion (novel) as an assessment of extended criteria donor lungs: a prospective multi-center clinical trial. *J Heart Lung Transplant*. 2022; 41 (4): S40–S41. doi: 10.1016/j.healun.2022.01.092.
8. Steen S, Sjöberg T, Pierre L, Liao Q, Eriksson L, Algotsson L. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet*. 2001; 357 (9259): 825–829. doi: 10.1016/s0140-6736(00)04195-7.
9. Levitt DG, Levitt MD. Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements. *Int J Gen Med*. 2016; 9: 229–255. doi: 10.2147/ijgm.S102819.
10. Termeer CC, Weiss JM, Schöpf E, Vanscheidt W, Simon JC. The low molecular weight Dextran 40 inhibits the adhesion of T lymphocytes to endothelial cells. *Clin Exp Immunol*. 1998; 114 (3): 422–426. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00729.x.
11. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016; 21 (3): 246–252. doi: 10.1097/mot.0000000000000304.
12. Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, Rubacha M, Fischer S, Anraku M et al. Technique for prolonged normothermic *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2008; 27 (12): 1319–1325. doi: 10.1016/j.healun.2008.09.003.
13. Cypel M, Rubacha M, Yeung J, Hirayama S, Torbicki K, Madonik M et al. Normothermic *ex vivo* perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. *Am J Transplant*. 2009; 9 (10): 2262–2269. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02775.x.
14. Andreasson ASI, Borthwick LA, Gillespie C, Jiwa K, Scott J, Henderson P et al. The role of interleukin-1 β as a predictive biomarker and potential therapeutic target during clinical *ex vivo* lung perfusion. *J Heart Lung Transplant*. 2017; 36 (9): 985–995. doi: 10.1016/j.healun.2017.05.012.
15. Kakishita T, Oto T, Hori S, Miyoshi K, Otani S, Yamamoto S et al. Suppression of inflammatory cytokines during *ex vivo* lung perfusion with an adsorbent membrane. *Ann*

- Thorac Surg.* 2010; 89 (6): 1773–1779. doi: 10.1016/j.athoracsur.2010.02.077.
16. Erasmus ME, Fernhout MH, Elstrodt JM, Rakhorst G. Normothermic *ex vivo* lung perfusion of non-heart-beating donor lungs in pigs: from pretransplant function analysis towards a 6-h machine preservation. *Transpl Int.* 2006; 19 (7): 589–593. doi: 10.1111/j.1432-2277.2006.00318.x.
 17. Brandes H, Albes JM, Conzelmann A, Wehrmann M, Ziemer G. Comparison of pulsatile and nonpulsatile perfusion of the lung in an extracorporeal large animal model. *Eur Surg Res.* 2002; 34 (4): 321–329. doi: 10.1159/000063067.
 18. Van Zanden JE, Leuvenink HGD, Verschuuren EAM, Erasmus ME, Hottenrott MC. A translational rat model for *ex vivo* lung perfusion of pre-injured lungs after brain death. *PLoS One.* 2021; 16 (12): e0260705. doi: 10.1371/journal.pone.0260705.
 19. Noda K, Shigemura N, Tanaka Y, Bhama JK, D’Cunha J, Luketich JD, Bermudez CA. Successful prolonged *ex vivo* lung perfusion for graft preservation in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014; 45 (3): e54–e60. doi: 10.1093/ejcts/ezt598.
 20. Wang W, Qian J, Zhu M, Wang Y, Pan Y. Normothermic *ex vivo* lung perfusion outperforms conventional cold preservation in a deceased rat lung. *Ann Transl Med.* 2022; 10 (2): 99. doi: 10.21037/atm-22-42.
 21. Ohsumi A, Kanou T, Ali A, Guan Z, Hwang DM, Waddell TK et al. A Method for Translational Rat *Ex vivo* Lung Perfusion Experimentation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020; 319 (1): L61–L70. doi: 10.1152/ajplung.00256.2019.
 22. Tian D, Shiya H, Sato M, Nakajima J. Rat lung transplantation model: modifications of the cuff technique. *Ann Transl Med.* 2020; 8 (6): 407. doi: 10.21037/atm.2020.02.46.
 23. Rajab TK. Anastomotic techniques for rat lung transplantation. *World J Transplant.* 2018; 8 (2): 38–43. doi: 10.5500/wjt.v8.i2.38.
 24. Jin X, Kaes J, Van Slambrouck J, Inci I, Arni S, Geudens V et al. A Comprehensive Review on the Surgical Aspect of Lung Transplant Models in Mice and Rats. *Cells.* 2022; 11 (3): 480. doi: 10.3390/cells11030480.
 25. Roman M, Gjorgjimajkoska O, Neil D, Nair S, Colah S, Parmar J, Tsui S. Comparison between cellular and acellular perfusates for *ex vivo* lung perfusion in a porcine model. *J Heart Lung Transplant.* 2015; 34 (7): 978–987. doi: 10.1016/j.healun.2015.03.023.
 26. Pan X, Yang J, Fu S, Zhao H. Application of *ex vivo* lung perfusion (EVLVP) in lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2018; 10 (7): 4637–4642. doi: 10.21037/jtd.2018.07.95.
 27. Bassani GA, Lonati C, Brambilla D, Rapido F, Valenza F, Gatti S. *Ex Vivo* Lung Perfusion in the Rat: Detailed Procedure and Videos. *PLoS One.* 2016; 11 (12): e0167898. doi: 10.1371/journal.pone.0167898.
 28. Есипова ОЮ, Богданов ВК, Есипов АС, Кулешов АП, Бучнев АС, Волкова ЕА и др. Разработка нового малообъемного оксигенатора и создание гидродинамического стенда для *ex vivo* перфузии легких на мелких животных. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2023; 25 (3): 106–112. Esipova OYu, Bogdanov VK, Esipov AS, Kuleshov AP, Buchnev AS, Volkova EA et al. Development of a new low-volume oxygenator and creation of a hydrodynamic test bench for *ex vivo* lung perfusion in small animals. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2023; 25 (3): 106–112. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-106-112>.
 29. Есипова ОЮ, Бучнев АС, Дробышев АА, Кулешов АП, Грудинин НВ, Богданов ВК. Оценка производительности трансфера кислорода малогабаритного мембранного оксигенатора. *Медицинская техника.* 2023; 4: 21–25. Esipova OYu, Buchnev AS, Drobyshev AA, Kuleshov AP, Grudinin NV, Bogdanov VK. Evaluation of oxygen transfer performance of a small-size membrane oxygenator. *Medical technics.* 2023; 4: 21–25.
 30. Esipova OYu, Buchnev AS, Drobyshev AA, Kuleshov AP, Grudinin NV, Bogdanov VK. Evaluation of the oxygen transfer performance of a small membrane oxygenator. *Biomedical Engineering.* 2023; 57: 260–264. <https://doi.org/10.1007/s10527-023-10311-w>.
 31. Есипова ОЮ, Кулешов АП, Богданов ВК, Есипов АС, Волкова ЕА, Грудинин НВ. Разработка малообъемного стенда для проведения процедуры изолированной *ex vivo* перфузии легких мелких животных. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2024; 26 (3): 176–182. Esipova OYu, Kuleshov AP, Bogdanov VK, Esipov AS, Volkova EA, Grudinin NV. Development of a low-volume stand for the procedure of isolated *ex vivo* perfusion of the lungs of small animals. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2024; 26 (3): 176–182. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2024-3-176-182>.

Статья поступила в редакцию 29.08.2024 г.
The article was submitted to the journal on 29.08.2024