

# ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ



УЧРЕДИТЕЛЬ: ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ  
ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ  
«РОССИЙСКОЕ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»

2019. Том XXI. № 4

Научно-практический журнал основан в 1999 г.  
Регистр. № 018616

**Главный редактор – С.В. Готье** (Москва, Россия),  
академик РАН, д. м. н., профессор

**Заместитель главного редактора – О.П. Шевченко**  
(Москва, Россия), д. м. н., профессор

**Научный редактор – Б.Л. Миронков**  
(Москва, Россия), д. м. н., профессор.  
E-mail: mironkov@rambler.ru

**Ответственный секретарь – Д.А. Великий** (Москва,  
Россия), к. м. н. E-mail: dim\_vel@mail.ru

**Ответственный секретарь – Я.Л. Поз** (Москва,  
Россия), к. м. н. E-mail: dr.poz@list.ru

**Заведующая редакцией – Е.В. Яновская** (Москва,  
Россия). E-mail: yanov05@list.ru

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**С.А. Борзенко** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**Д.А. Гранов** (Санкт-Петербург, Россия) –  
академик РАН, д. м. н., профессор

**Ф. Дельмонико** (Бостон, США) – профессор

**В.М. Захаревич** (Москва, Россия) – д. м. н.

**Г.П. Иткин** (Москва, Россия) – д. б. н., профессор

**П. Каличинский** (Варшава, Польша) – профессор

**Я. Лерут** (Брюссель, Бельгия) – профессор

**Ж. Массард** (Страсбург, Франция) – профессор

**И.А. Милосердов** (Москва, Россия) – к. м. н.

**М.Г. Минина** (Москва, Россия) – д. м. н.

**Ю.П. Островский** (Минск, Беларусь) – академик НАНБ,  
д. м. н., профессор

**Ки Донг Пак** (Сеул, Южная Корея) – профессор

**Д.В. Перлин** (Волгоград, Россия) – д. м. н., профессор

**В.Н. Попцов** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**О.Н. Резник** (Санкт-Петербург, Россия) – д. м. н.,  
профессор

**Р.Ш. Сaitгареев** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**В.И. Севастьянов** (Москва, Россия) – д. б. н., профессор

**О.М. Цирульников** (Москва, Россия) – д. м. н.,  
профессор

**А.В. Чжао** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**А.О. Шевченко** (Москва, Россия) –  
член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор

# VESTNIK TRANSPLANTOLOGII I ISKUSSTVENNYKH ORGANOV RUSSIAN JOURNAL OF TRANSPLANTOLOGY AND ARTIFICIAL ORGANS

THE OFFICIAL JOURNAL OF ALL-RUSSIAN PUBLIC  
ORGANIZATION OF TRANSPLANTOLOGISTS  
«RUSSIAN TRANSPLANT SOCIETY»

2019. Vol. XXI. № 4

Scientific and Practical Journal was founded in 1999  
Reg. № 018616

**Editor-in-Chief – S.V. Gautier** (Moscow, Russia), MD, PhD,  
professor, member of Russian Academy of Sciences

**Deputy Chief Editor – O.P. Shevchenko** (Moscow,  
Russia), MD, PhD, professor

**Scientific Editor – B.L. Mironkov**, MD, PhD, professor.  
E-mail: mironkov@rambler.ru

**Executive Editor – D.A. Velikiy** (Moscow, Russia),  
MD, PhD. E-mail: dim\_vel@mail.ru

**Executive Editor – I.L. Poz** (Moscow, Russia), MD, PhD.  
E-mail: dr.poz@list.ru

**Managing Editor – E.V. Yanovskaya** (Moscow, Russia).  
E-mail: yanov05@list.ru

## EDITORIAL BOARD

**C.A. Borzenok** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**D.A. Granov** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD, professor,  
member of Russian Academy of Sciences

**F. Delmonico** (Boston, USA) – MD, FACS, professor

**V.M. Zakharevich** (Moscow, Russia) – MD, PhD

**G.P. Itkin** (Moscow, Russia) – PhD, professor

**P.J. Kaliciński** (Warsaw, Poland) – MD, PhD, professor

**J. Lerut** (Brussels, Belgium) – MD, PhD, FACS

**G. Massard** (Strasbourg, France) – MD, PhD, professor

**I.A. Miloserdov** (Moscow, Russia) – MD, PhD

**M.G. Minina** (Moscow, Russia) – MD, PhD

**Yu.P. Ostrovsky** (Minsk, Belarus) – MD, PhD, professor,  
member of National Academy of Sciences of Belarus

**Ki Dong Park** (Seoul, South Korea) – MD, PhD, professor

**D.V. Perlin** (Volgograd, Russia) – MD, PhD, professor

**V.N. Poptsov** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**O.N. Reznik** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD,  
professor

**R.Sh. Saitgareev** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**V.I. Sevastianov** (Moscow, Russia) – PhD, professor

**O.M. Tsirolnikova** (Moscow, Russia) – MD, PhD,  
professor

**A.V. Chzhao** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**A.O. Shevchenko** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor,  
corresponding member of Russian Academy of Sciences

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

**С.Ф. Багненко** (Санкт-Петербург, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**А.А. Баранов** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**Л.С. Барбараш** (Кемерово, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**Е.В. Брызгалина** (Москва, Россия) – к. ф. н.

**А.В. Васильев** (Москва, Россия) – член-корреспондент РАН, д. б. н., профессор

**А.В. Ватазин** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**Э.И. Гальперин** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**Г. Данович** (Лос-Анджелес, США) – профессор

**М.Г. Иткин** (Филадельфия, США) – профессор

**А.М. Караськов** (Новосибирск, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**В.А. Порханов** (Краснодар, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**Л.М. Рошаль** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**О.О. Руммо** (Минск, Беларусь) – член-корреспондент НАНБ, д. м. н., профессор

**Г.Т. Сухих** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**В.А. Ткачук** (Москва, Россия) – академик РАН, д. б. н., профессор

**Н.А. Томилина** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор

**М.Ш. Хубутия** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**В.П. Чехонин** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**А.Г. Чучалин** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**Е.В. Шлякто** (Санкт-Петербург, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор

**П.К. Яблонский** (Санкт-Петербург, Россия) – д. м. н., профессор

Журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» включен ВАК РФ в перечень российских рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы результаты диссертационных работ

Журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» индексируется в Scopus и размещен на платформе Web of Science Core Collection: Emerging Science Citation Index

## EDITORIAL COUNCIL

**S.F. Bagnenko** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**A.A. Baranov** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**L.S. Barbarash** (Kemerovo, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**E.V. Bryzgalina** (Moscow, Russia) – PhD in Philosophy

**A.V. Vasiliev** (Moscow, Russia) – PhD, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences

**A.V. Vatazin** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**E. I. Galperin** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**G. Danovich** (Los Angeles, USA) – MD, PhD, professor

**M.G. Itkin** (Philadelphia, USA) – MD, professor

**A.M. Karaskov** (Novosibirsk, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**V.A. Porkhanov** (Krasnodar, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**L.M. Roshal** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**O.O. Rummo** (Minsk, Belarus) – MD, PhD, professor, corresponding member of National Academy of Sciences of Belarus

**G.T. Sukhikh** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**V.A. Tkachuk** (Moscow, Russia) – PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**N.A. Tomilina** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor

**M.Sh. Khubutiya** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**V.P. Chehonin** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**A.G. Tchuchalin** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**E.V. Shliakhto** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences

**P.K. Yablonsky** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD, professor

«Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs» is included in the list of leading peer-reviewed scientific publication editions, produced in the Russian Federation and is recommended for publication of primary results of dissertation research

«Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs» is indexed in Scopus and in the Emerging Science Citation Index of the Web of Science Core Collection

ISSN 1995-1191

### Адрес для корреспонденции:

Россия, 123182, Москва, ул. Шукшинская, 1  
Тел./факс +7 (499) 193 87 62  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)  
Интернет-сайт журнала: <http://journal.transpl.ru>  
Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>

### Address for correspondence:

1, Shchukinskaya st., Moscow 123182, Russia  
Tel./Fax +7 (499) 193 87 62  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)  
Journal's web site: <http://journal.transpl.ru>  
Scientific eLibrary: <http://elibrary.ru>

# СОДЕРЖАНИЕ

## СТРАНИЦА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Национальный трансплантационный регистр:  
от рекомендаций ВОЗ к государственной системе  
учета донорских органов, доноров и реципиентов  
*С.В. Готье*

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

Трансплантация сердца у реципиентов с исходной  
легочной гипертензией: 9-летний опыт НМИЦ  
имени В.А. Алмазова

*М.А. Симоненко, Г.В. Николаев, К.Н. Маликов,  
П.А. Федотов, Ю.В. Сазонова, М.А. Борцова, В.Е. Рубинчик,  
А.О. Маричев, А.Е. Баутин, М.Ю. Ситникова, М.Л. Гордеев,  
М.А. Карпенко*

Оценка продолжительности жизни реципиентов  
сердца с трансмиссивным атеросклерозом  
коронарных артерий

*С.А. Саховский, Н.Н. Колоскова, Д.А. Изотов, Е.А. Спирина,  
А.Ю. Гончарова, В.М. Лучкин, Б.Л. Миронков*

Злокачественные новообразования внепеченочной  
локализации после трансплантации печени:  
опыт одного трансплантационного центра

*О.А. Герасимова, В.В. Боровик, Ф.К. Жеребцов, Д.А. Гранов*

Выбывание из листа ожидания кандидатов  
на трансплантацию печени (делистинг) вследствие  
рекомпенсации хронических заболеваний печени –  
характеристика пациентов и предикторы делистинга  
в проспективном исследовании

*В.Л. Коробка, В.Д. Пасечников, Е.С. Пак, М.Ю. Кострыкин,  
А.В. Ткачев, Н.И. Балин, Р.Е. Громыко, Р.В. Коробка,  
А.М. Шаповалов, А.М. Бабиева, А.В. Микутин,  
В.С. Агабекян*

Особенности морфологии биоптатов печени доноров  
старше 60 лет

*И.М. Ильинский, Н.П. Можейко, Д.В. Воронов, М.Г. Минина,  
О.М. Цирульников*

## ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ

Оптимизация конвекционного потока при онлайн  
гемодиализации

*А.Г. Строков, Я.Л. Поз*

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Сравнительный анализ секреторной способности  
островков Лангерганса, культивированных  
с биополимерным коллагенсодержащим гидрогелем  
и тканеспецифическим матриксом

*Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, А.С. Пономарева,  
Е.А. Немец, Ю.Б. Басок, Г.Н. Бубенцова, В.А. Сургученко,  
В.И. Севастьянов*

Оценка эффективности комбинированного  
лечения ишемической болезни сердца –  
аортокоронарное шунтирование, трансплантация  
аутологических мононуклеаров костного мозга:  
результаты рандомизированного, слепого, плацебо  
контролируемого исследования

*В.В. Комок, Н.С. Буненков, С.А. Белый, В.М. Пизин,  
В.М. Кондратьев, А.В. Дулаев, А.Е. Кобак, Т.С. Максимова,  
И.П. Сергиенко, Е.В. Парусова, Л.А. Смирнова,  
Е.В. Бабенко, Б.В. Афанасьев, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава*

Перспективы использования триблок-сополимеров  
SIBS в кардиохирургии: *in vitro* и *in vivo* исследование  
в сравнении с ePTFE

*М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко, П.А. Никишев, С.В. Костюк,  
Л.В. Антонова, Т.Н. Акемтьева, Т.В. Глушкова,  
Е.Г. Великанова, Д.К. Шишкова, Е.О. Кривкина,  
К.Ю. Клышников, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараш*

# CONTENTS

## EDITORIAL

- 5 National transplantation register:  
From WHO recommendations to the state accounting  
system of donor organs, donors and recipients  
*S.V. Gautier*

## ORGAN TRANSPLANTATION

- 7 Heart transplantation in recipients with initial pulmonary  
hypertension: 9 years of experience in Almazov National  
Medical Research Centre  
*M.A. Simonenko, G.V. Nikolaev, K.N. Malikov, P.A. Fedotov,  
Yu.V. Sazonova, M.A. Bortsova, V.E. Rubinchik, A.O. Marichev,  
A.E. Bautin, M.Yu. Sitnikova, M.L. Gordeev, M.A. Karpenko*

- 14 Survival of heart recipients with donor-transmitted  
coronary atherosclerosis  
*S.A. Sakhovsky, N.N. Koloskova, D.A. Izotov, E.A. Spirina,  
A.Yu. Goncharova, V.M. Luchkin, B.L. Mironkov*

- 20 Malignant neoplasms of extrahepatic localization  
after liver transplantation: experience of a single  
transplant center  
*O.A. Gerasimova, V.V. Borovik, F.K. Zhrebtsov, D.A. Granov*

- 26 Liver transplant candidates delisting due  
to recompensation of chronic liver diseases – candidates  
characteristics with delisting predictors: a prospective  
study  
*V.L. Korobka, V.D. Pasechnikov, E.S. Pak, M.Yu. Kostyrykin,  
A.V. Tkachev, N.I. Balin, R.E. Gromyko, R.V. Korobka,  
A.M. Shapovalov, A.M. Babieva, A.B. Mikutin, V.S. Agabekyan*

- 36 Specificity of the morphology of biopsy specimens liver  
donors over 60 years  
*I.M. Iljinsky, N.P. Mozheyko, D.V. Voronov, M.G. Minina,  
O.M. Tsirulnikova*

## ARTIFICIAL ORGANS

- 41 Optimization of convective flux in online  
haemodiafiltration  
*A.G. Strokov, I.L. Poz*

## REGENERATIVE MEDICINE AND CELL TECHNOLOGIES

- 45 Comparative analysis of secretory capacity  
of Langerhans islets cultured with biopolymer collagen-  
containing hydrogel and tissue-specific matrix  
*N.V. Baranova, L.A. Kirsanova, A.S. Ponomareva, E.A. Nemets,  
Y.B. Basok, G.N. Bubentsova, V.A. Surguchenko, V.I. Sevastianov*

- 54 Evaluation of effectiveness of combined treatment  
of coronary heart disease – coronary artery bypass  
grafting, transplantation of autologous bone  
marrow mononuclear cells: a randomized, blind  
placebo-controlled study  
*V.V. Komok, N.S. Bunenkov, S.A. Belyi, V.M. Pizin,  
V.M. Kondratev, A.V. Dulaev, A.E. Kobak, T.S. Maksimova,  
I.P. Sergienko, E.V. Parusova, L.A. Smirnova, E.V. Babenko,  
B.V. Afanasev, A.S. Nemkov, G.G. Khubulava*

- 67 The use of SIBS triblock copolymers in cardiac surgery:  
*in vitro* and *in vivo* studies in comparison with ePTFE  
*M.A. Rezvova, E.A. Ovcharenko, P.A. Nikishev, S.V. Kostyuk,  
L.V. Antonova, T.N. Akent'eva, T.V. Glushkova, Y.G. Velikanova,  
D.K. Shishkova, E.O. Krivkina, K.Yu. Klyshnikov,  
Yu.A. Kudryavtseva, L.S. Barbarash*

Разработка методики получения дермального внеклеточного матрикса  
*А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, К.И. Мелконян, Я.А. Юцкевич, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, И.М. Быков, А.Н. Редько, В.А. Порханов, С.Н. Алексеенко*

Интерлейкин IL-1 $\beta$  стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека *in vitro*

*Д.С. Барановский, А.В. Ляндуп, М.В. Балясин, И.Д. Клабуков, О.А. Красильникова, М.Е. Крашенинников, В.Д. Паршин*

Экспериментальная ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции трахеи, созданной на основе заселенного мезенхимальными и эпителиальными клетками девитализированного матрикса

*М.В. Балясин, Д.С. Барановский, А.Г. Демченко, А.Л. Файзуллин, О.А. Красильникова, И.Д. Клабуков, М.Е. Крашенинников, А.В. Ляндуп, В.Д. Паршин*

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Новые тенденции в исследовании острого повреждения почек после трансплантации печени  
*И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*

Внутрисосудистая визуализация атеросклеротических бляшек у больных с кардиоренальным синдромом: возможности оптической когерентной томографии  
*А.В. Созыккин, О.П. Шевченко, Я.А. Наумов, А.Г. Строков, В.П. Васильева, А.О. Шевченко*

Модификация кислотного иона в составе диализирующей жидкости  
*Я.Л. Поз, А.Г. Строков*

Перспективы применения сперматогонимальных стволовых клеток при лечении мужской infertility  
*Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая, В.И. Севастьянов*

Современное состояние проблемы и результаты *ex vivo* перфузии донорских сердец  
*М.О. Жульков, А.В. Фомичев, С.А. Альсов, Е.Н. Кливер, А.М. Чернявский*

## ИСТОРИЧЕСКИЕ И ГУМАНИТАРНЫЕ АСПЕКТЫ

С.С. Брюхоненко – основоположник технологии искусственного кровообращения (философско-методологический и социокультурный контекст)  
*А.Я. Иванюшкин, О.Н. Резник, О.В. Попова*

Роль альтруизма и эмпатии в отношении к донорству органов у медсестер в отделениях интенсивной терапии в Казвине: перекрестное исследование  
*Yekefallah Leili, Dehghankar Leila, Taherkhani Mahnaz, Ranjbaran Mehdi*

## ИНФОРМАЦИЯ

О подготовке научных медицинских кадров в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России

Требования к публикациям

Перечень материалов, опубликованных в 2019 году в журнале «Вестник трансплантологии и искусственных органов»

81 Development of methods for obtaining dermal extracellular matrix  
*A.S. Sotnichenko, I.V. Gilevich, K.I. Melkonian, Ya.A. Yutskevich, A.V. Karakulev, S.B. Bogdanov, I.M. Bykov, A.N. Redko, V.A. Porhanov, S.N. Alekseenko*

88 Interleukin IL-1 $\beta$  stimulates cartilage scaffold revitalization *in vitro* with human nasal chondrocytes  
*D.S. Baranovskii, A.V. Lyundup, M.V. Balyasin, I.D. Klabukov, O.A. Krasilnikova, M.E. Krasheninnikov, V.D. Parshin*

96 Experimental orthotopic implantation of the tissue-engineered graft of trachea based on devitalized scaffold seeded with mesenchymal and epithelial cells  
*M.V. Balyasin, D.S. Baranovskii, A.G. Demchenko, A.L. Fayzullin, O.A. Krasilnikova, I.D. Klabukov, M.E. Krasheninnikov, A.V. Lyundup, V.D. Parshin*

## LITERATURE REVIEWS

108 Novel trends in the research of acute kidney injury after liver transplantation  
*I.M. Iljinsky, O.M. Tsurulnikova*

121 Intravascular imaging of atherosclerotic plaques in patients with cardiorenal syndrome: possibilities of optical coherence tomography  
*A.V. Sozykin, O.P. Shevchenko, Ya.A. Naumov, A.G. Strokov, V.P. Vasilieva, A.O. Shevchenko*

129 An acid ion modification in the dialysis fluid  
*Ya.L. Poz, A.G. Strokov*

134 Prospects for application of spermatogonial stem cells in the treatment of male infertility  
*N.N. Skaletsky, G.N. Skaletskaya, V.I. Sevastianov*

143 Current state of the problem and results of *ex vivo* perfusion of donor hearts  
*M.O. Zhulkov, A.V. Fomichev, S.A. Alsov, E.N. Cleaver, A.M. Chernyavsky*

## HISTORICAL AND HUMANITARIAN ASPECTS

147 S.S. Bryukhonenko – the founder of cardiopulmonary bypass (philosophical, methodological and sociocultural context)  
*A.Ya. Ivanyushkin, O.N. Reznik, O.V. Popova*

155 The role of Altruism and Empathy in anticipating the Attitude toward Organ Donation among Nurses in Intensive Care Units of Qazvin: A Cross-Sectional Study  
*Yekefallah Leili, Dehghankar Leila, Taherkhani Mahnaz, Ranjbaran Mehdi*

## INFORMATION

163 On scientific and medical personnel training at V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

164 Instructions to authors

168 List of articles, published in 2019 in «Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs»

# НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ РЕГИСТР: ОТ РЕКОМЕНДАЦИЙ ВОЗ К ГОСУДАРСТВЕННОЙ СИСТЕМЕ УЧЕТА ДОНОРСКИХ ОРГАНОВ, ДОНОРОВ И РЕЦИПИЕНТОВ

# NATIONAL TRANSPLANTATION REGISTER: FROM WHO RECOMMENDATIONS TO THE STATE ACCOUNTING SYSTEM OF DONOR ORGANS, DONORS AND RECIPIENTS

*Закон Российской Федерации от 22 декабря 1992 года № 4180-1 «О трансплантации органов и(или) тканей человека» определил условия и порядок трансплантации органов и(или) тканей, опираясь на современные достижения науки и медицинской практики, а также учитывая руководящие принципы Всемирной организации здравоохранения по трансплантации человеческих клеток, тканей и органов.*



*The law of the Russian Federation of December 22, 1992 No. 4180-1 “About transplantation of organs and (or) human tissues” defined the conditions and procedure for transplantation of organs and (or) tissues, based on modern achievements of science and medical practice, and also taking into account the guidelines of the World Health Organization transplantation of human cells, tissues and organs.*

*Сложившаяся к настоящему времени государственная система учета донорских органов и тканей человека, доноров и реципиентов осуществляется согласно Федеральному закону от 13.07.2015 года № 271-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации». Порядок учета сформулирован в приказе Минздрава России от 8 июня 2016 г. № 355н «Об утверждении порядка учета донорских органов и тканей человека, доноров органов и тканей, пациентов (реципиентов), форм медицинской документации и формы статистической отчетности...».*

*В нашем журнале ежегодно публикуются сообщения трансплантационного Регистра Российского трансплантологического общества (РТО). Трансплантационный ре-*

*The current state system of registration of donor organs and human tissues, donors and recipients is implemented in accordance with Federal Law of July 13, 2015 No. 271 “On Amending the Federal Law “On the basics of protecting the health of citizens in the Russian Federation”. The accounting procedure is formulated in the order of the Ministry of Health of Russia dated June 8, 2016 No. 355n “On approval of the accounting procedure for donor organs and human tissues, organ and tissue donors, patients (recipients), medical documentation forms and statistical reporting forms...”*

*Our journal annually publishes messages from the transplant registry of the Russian Transplant Society (RTS). The RTS transplant registry has existed for more than 10 years. The need for it*

*гистр РТО существует более 10 лет. Потребность в нем возникла давно, и год от года она возрастала по мере развития донорства и трансплантации органов в стране, с расширением географии трансплантационных программ и увеличением числа центров трансплантации. Созданию регистра способствовали консолидация медицинского сообщества трансплантологов в Российское трансплантологическое общество (октябрь 2008 г.), а также объединение ведущих трансплантологов страны под эгидой профильной комиссии по трансплантологии Минздрава России (май 2009 г.).*

*Данные Регистра РТО предоставляются в международные регистры: International Registry of Organ Donation and Transplantation (IRODaT); Registry of the European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association, ERA – EDTA Registry; Registries of the International Society for Heart and Lung Transplantation – ISHLT Registries.*

*С 2016 г. Регистр РТО используется в качестве инструмента контроля качества и полноты сбора данных в информационной системе учета донорских органов и тканей человека, доноров и реципиентов.*

*Таким образом, формирование существующего современного Национального трансплантационного регистра явилось результатом поступательного движения от рекомендаций ВОЗ к государственной системе учета донорских органов, доноров и реципиентов.*

*С уважением  
академик РАН С.В. Готье*



*arose long ago, and from year to year it increased with the development of organ donation and organ transplantation, with the expansion of the geography of transplantation programs and an increase in the number of transplantation centers. The creation of the register was facilitated by the consolidation of the medical community of transplantologists into the Russian Transplantology Society (October 2008), as well as the union of the country's leading transplantologists under the auspices of the relevant transplantology commission of the Russian Ministry of Health (May 2009).*

*The RTS Register data is provided to the international registries: International Registry of Organ Donation and Transplantation (IRODaT); Registry of the European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association, ERA – EDTA Registry; Registries of the International Society for Heart and Lung Transplantation – ISHLT Registries.*

*Since 2016, the RTS Register has been used as a tool for quality control and completeness of data collection in the information system for recording donor organs and human tissues, donors and recipients.*

*Thus, the formation of the existing modern National Transplantation Register was the result of a progressive movement from WHO recommendations to the state system of registration of donor organs, donors and recipients.*

*Sincerely  
Academician of the RAS, S.V. Gautier*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-7-13

# ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕРДЦА У РЕЦИПИЕНТОВ С ИСХОДНОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ: 9-ЛЕТНИЙ ОПЫТ НМИЦ ИМЕНИ В.А. АЛМАЗОВА

М.А. Симоненко, Г.В. Николаев, К.Н. Маликов, П.А. Федотов, Ю.В. Сазонова,  
М.А. Борцова, В.Е. Рубинчик, А.О. Маричев, А.Е. Баутин, М.Ю. Ситникова,  
М.Л. Гордеев, М.А. Карпенко

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова»  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Цель.** Оценить влияние исходной легочной гипертензии (ЛГ) на ранние и отдаленные результаты после трансплантации сердца (ТС). **Материалы и методы.** С января 2010-го по декабрь 2018 г. было выполнено 112 ТС. По результатам катетеризации правых отделов сердца все реципиенты были разделены на 2 группы: 1-я группа – с ЛГ ( $n = 76$ ; среднее давление в легочной артерии (ДЛА)  $\geq 25$  мм рт. ст.), 2-я группа – без ЛГ ( $n = 36$ ; ср. ДЛА  $< 25$  мм рт. ст.). Средний возраст пациентов 1-й группы составил  $46,4 \pm 14,9$  года, исходное легочное сосудистое сопротивление (ЛСС) –  $3,5 \pm 1,5$  ед. Вуда, ЛСС после теста на реверсию (оксид азота – 80 ppm, илопрост 20 мкг) –  $2,8 \pm 1,0$  ед. Вуда, систолическое ДЛА (ДЛАС) –  $50,1 \pm 13,4$  мм рт. ст. Средний возраст во 2-й группе был  $47,3 \pm 12,2$  года, ЛСС –  $2,1 \pm 0,8$  ед. Вуда, ДЛАС –  $27,4 \pm 5,3$  мм рт. ст. Проведена оценка в динамике показателей раннего послеоперационного периода (длительность ИВЛ, применение вазодилататоров и инотропной поддержки и длительность нахождения в отделении реанимации (ОР), 30-дневная летальность) и отдаленных результатов (ЭхоКГ) после ТС. **Результаты.** Восемь пациентам (11%) из 1-й группы и одному (3%) из 2-й группы ввиду развившейся после ТС острой правожелудочковой сердечной недостаточности (ПЖ СН) была установлена система ЭКМО по вено-артериальной методике. Наличие ЛГ не повлияло на длительность нахождения реципиентов на ИВЛ, проведения инотропной поддержки и сроки пребывания пациентов в ОР. Терапия левосименданом в раннем послеоперационном периоде чаще проводилась в 1-й группе ( $n = 29$ ) по сравнению со 2-й группой ( $n = 6$ ) (Хи-квадрат = 0,048), также как и ингаляции оксида азота (1-я группа – 54; 2-я группа – 7), Хи-квадрат  $p = 0,003$ ). Использование силденафила после ТС было сравнимо в обеих группах (Хи-квадрат  $p = 0,048$ ). В ранние сроки после ТС умерло 14 пациентов, 30-дневная летальность была сопоставима в обеих группах (Хи-квадрат –  $p = 0,12$ ). Через 6 месяцев после ТС в группах не было выявлено различия в уровне ДЛАС ( $p = 0,21$ ) и ЛСС ( $p = 0,07$ ). **Заключение.** У пациентов с исходной ЛГ после ТС отмечается более тяжелый ранний послеоперационный период, в том числе большая частота развития ПЖ СН с необходимостью имплантации ЭКМО. Уровень ЛСС более 3,5 ед. Вуда не является пороговым значением для выполнения ТС. У пациентов с исходной ЛСС более 3,5 ед. Вуда после ТС достигаются сопоставимые результаты по сравнению с больными без исходной ЛГ, что позволяет рассматривать таких пациентов для включения в ЛОТС. Летальность в течение 30 дней и длительность нахождения на ИВЛ после ТС у пациентов с исходной ЛГ и без нее не отличались. Вне зависимости от исходного уровня ДЛАС и ЛСС у всех пациентов после ТС происходит улучшение этих показателей. Через 6 месяцев после ТС у больных вне зависимости от наличия исходной ЛГ не было выявлено различия в уровне ДЛАС и ЛСС.

*Ключевые слова:* трансплантация сердца, сердечная недостаточность, легочная гипертензия, давление в легочной артерии, легочное сосудистое сопротивление, вазодилататоры.

**Для корреспонденции:** Симоненко Мария Андреевна. Адрес: 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2.  
Тел. (921) 952-43-55. E-mail: dr.maria.simonenko@gmail.com, simonenko\_ma@almazovcentre.ru

**For correspondence:** Simonenko Maria Andreevna. Address: 2, Akkuratova str., Saint-Petersburg, 197341, Russian Federation.  
Tel. (921) 952-43-55. E-mail: dr.maria.simonenko@gmail.com, simonenko\_ma@almazovcentre.ru

# HEART TRANSPLANTATION IN RECIPIENTS WITH INITIAL PULMONARY HYPERTENSION: 9 YEARS OF EXPERIENCE IN ALMAZOV NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTRE

M.A. Simonenko, G.V. Nikolaev, K.N. Malikov, P.A. Fedotov, Yu.V. Sazonova, M.A. Bortsova, V.E. Rubinchik, A.O. Marichev, A.E. Bautin, M.Yu. Sitnikova, M.L. Gordeev, M.A. Karpenko

Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russian Federation

**Aim:** to estimate the impact of initial pulmonary hypertension (PHT) on early and long-term outcomes after heart transplantation (HTx). **Materials and methods.** Between January 2010 and December 2018 we performed 112 HTx. Recipients were separated into 2 groups according to right heart catheterization results: 1<sup>st</sup> group – patients with PHT (n = 76; mean PAP  $\geq 25$  mm Hg) and 2<sup>nd</sup> group – without PHT (n = 36; mean PAP  $< 25$  mm Hg). Mean age of recipients in 1<sup>st</sup> group was  $46,4 \pm 14,9$  year-old, pulmonary vascular resistance (PVR) –  $3,5 \pm 1,5$  WU, PVR after reduction test (NO 80 ppm, Iloprost 20 mkg) –  $2,8 \pm 1,0$  WU, pulmonary artery systolic pressure (PASP) –  $50,1 \pm 13,4$  mm Hg. Mean age of recipients in 2<sup>nd</sup> group was  $47,3 \pm 12,2$  year-old, PVR –  $2,1 \pm 0,8$  WU, PASP –  $27,4 \pm 5,3$  mm Hg. Outcomes were estimated by the early-term (duration on ventilator and inotrope support, vasodilator indications, time in ICU, mortality) and long-term (TTE data) post-transplant results. **Results.** After HTx 8 patients (11%) from 1<sup>st</sup> group and 1 (3%) – from 2<sup>nd</sup> group due to right heart failure (RHF) were implanted ECMO. There was no impact of pre-transplant PHT on the duration of ventilator support, duration of inotropic support and time spent in ICU. Levosimendan treatment was successfully used in 29 patients from 1<sup>st</sup> group and in 6 – from 2<sup>nd</sup> group (chi-square test = 0,048), the same as nitric oxide – 61 (n = 54 from 1<sup>st</sup> group, chi-square test = 0,003). During 6 months after HTx the frequency of Sildenafil use between groups was comparable (chi-square test = 0,048). During early post-transplant follow-up 14 patients died, 30-day mortality was comparable between the groups (chi-square test – p = 0,12). Six months after HTx the level of PASP ( $34,2 \pm 7,1$  vs.  $33,8 \pm 4,8$  mm Hg, p = 0,21) and PVR ( $1,8 \pm 0,6$  vs.  $1,5 \pm 0,4$  WU, p = 0,07) did not differ between groups. **Conclusion.** Time in ICU of patients with PHT is complicated and has a higher risk of RHF that can require ECMO. The level of PVR more than 3,5 WU is not limiting for performing HTx. After HTx patients with initial PVR more than 3,5 WU shows comparable results with those who did not have PHT what allows consider them for including in HTx waiting list. In addition, 30-day in patient mortality and duration of ventilator support did not differ between recipients with or without PHT prior HTx. In dynamic after HTx all patients with reversible PHT prior surgery showed decreasing of PASP and PVR. In 6 months after HTx there was no difference of PASP and PVR between patients from both groups.

*Key words:* heart transplantation, heart failure, pulmonary hypertension, pulmonary artery systolic pressure, pulmonary vascular resistance, vasodilators.

## ВВЕДЕНИЕ

Выбор лечебной тактики у пациентов с тяжелой сердечной патологией и сопутствующей легочной гипертензией (ЛГ) остается одной из нерешенных проблем отбора потенциальных реципиентов на трансплантацию сердца (ТС). Согласно рекомендациям Европейского сообщества кардиологов (European Society of Cardiology, ESC), ЛГ считается среднее давление в легочной артерии (ДЛА)  $\geq 25$  мм рт. ст. [1]. С. Roldaan предлагает разделение легочной гипертензии на 3 группы: легкая (ДЛА систолическое (ДЛАС) 35–45 мм рт. ст.), умеренная (ДЛАС 46–60 мм рт. ст.), тяжелая (ДЛАС более 60 мм рт. ст.) [2]. В литературе не существует однозначного мнения, позволяющего определить противопоказания к ТС при наличии у

пациента ЛГ. G.F. Delgado et al. и M.C. Deng et al. считают 2,5 ед. Вуда предельным значением легочно-сосудистого сопротивления (ЛСС) при постановке в лист ожидания ТС (ЛЮТС) [3, 4]. Ross et al. полагают, что ДЛАС более 50 мм рт. ст. и ЛСС более 3–4 ед. Вуда, измеренные после фармакологического теста, должны рассматриваться как противопоказание к проведению ТС [5]. По мнению J. Kettner et al., тяжелая ЛГ (ДЛАС  $> 50$  мм рт. ст.) больше не является противопоказанием к ТС [6]. Согласно S. Klotz et al., реципиенты с обратимой ЛГ до ТС могут быть сопоставимы с больными без ЛГ, так как, несмотря на высокий риск осложнений, в отдаленном периоде не было выявлено значимого влияния на выживаемость [7].

Наличие ЛГ увеличивает риск развития острой правожелудочковой недостаточности (ПЖ СН) в первые сутки после пересадки, что нередко требует использования устройств вспомогательного кровообращения – аппаратов экстракорпоральной мембранной оксигенации (ЭКМО), применения левосимендана и связано с развитием тяжелых осложнений [8, 9]. Так, в исследовании Mogollon et al., посвященном анализу 39 трансплантаций сердца у реципиентов с ЛГ (причем у 30,8% пациентов среднее ДЛА превышало 35 мм рт. ст.), было выявлено увеличение ранней послеоперационной летальности до 50% [10]. По результатам S. Klotz et al. в течение 30 дней после ТС проявления ПЖ СН развились у 64% реципиентов с ЛГ, в то время как этот показатель у больных без ЛГ составил только 27% [7]. Однако в работе Z. Zeng et al. значимого различия частоты смертности в группах с ЛГ и без исходной ЛГ выявлено не было [11]. В исследовании S. Klotz et al. у большинства пациентов наблюдалась обратимость ЛГ после ТС [12]. При этом не наблюдалось статистически значимой разницы выживаемости как среди группы пациентов с ЛГ, так и без исходной ЛГ [12, 13]. E. Gude et al. показали, что реципиенты, у которых ДЛА среднее было более 20 мм рт. ст., через год после ТС имели более низкую выживаемость, чем больные со средним ДЛА меньше 20 мм рт. ст. [14]. В настоящее время нет единого мнения о пороговых значениях выраженности ЛГ для отбора на ТС.

По результатам В. Lindelow et al., начиная с раннего посттрансплантационного периода у пациентов с ЛГ была отмечена быстрая положительная динамика – уменьшение ДЛА – без проведения иной сопутствующей терапии [15]. После проведения ТС у пациентов наблюдалась нормализация всех показателей (снижение ДЛА, ЛСС) [16]. Кроме того, результаты ТС у больных с ЛГ показывают разные подходы и отсутствие единого отношения к пограничным значениям данных показателей при отборе для ТС. Разные исследования показывают неоднозначность влияния исходной ЛГ на течение раннего посттрансплантационного периода и летальность. Таким образом, вопросы, связанные с отбором и ведением больных с сопутствующей ЛГ после ТС, требуют дальнейшего изучения. Целью данной работы было оценить влияние исходной ЛГ на ранние и отдаленные результаты после ТС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В период с января 2010-го по декабрь 2018 г. выполнено 112 ортотопических ТС по бикавальной методике, 82 мужчинам и 30 женщинам, средний возраст реципиентов был  $46,7 \pm 14,0$  года. До ТС фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) со-

ставляла  $22,3 \pm 10,1\%$ . Причинами развития ХСН были: ишемическая болезнь сердца – 49% ( $n = 55$ ), дилатационная кардиомиопатия – 28% ( $n = 31$ ), некомпактный миокард – 8% ( $n = 9$ ), аритмогенная дисплазия правого желудочка – 3,6% ( $n = 4$ ), врожденный порок сердца (ВПС) – 3,6% ( $n = 4$ ), хроническая ревматическая болезнь сердца – 2,7% ( $n = 3$ ), гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – 2,7% ( $n = 3$ ), саркоидоз сердца – 0,9% ( $n = 1$ ), амилоидоз сердца – 0,9% ( $n = 1$ ) и рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) – 0,9% ( $n = 1$ ). До ТС 13 реципиентам были имплантированы устройства механической поддержки кровообращения (МПК): система экстракорпоральной мембранной оксигенации ( $n = 6$ ), бивентрикулярная МПК Berlin Heart EXCOR ( $n = 8$ ). У данной группы пациентов были признаки ХСН III–IV ФК (ФВ ЛЖ по Симпсону от 8 до 29%, TAPSE менее 10 мм), явления полиорганной недостаточности (ПОН).

Всем больным до ТС проводилась катетеризация правых камер сердца с целью оценки уровня ЛСС, показателей центральной гемодинамики. Пациенты были разделены на 2 группы: 1-я группа – с наличием легочной гипертензии (ДЛА среднее  $\geq 25$  мм рт. ст.), 2-я группа – без легочной гипертензии (ДЛА среднее  $< 25$  мм рт. ст.). В 1-й группе у 47% ( $n = 36$ ) пациентов выполнялся тест на обратимость ЛГ с ингаляцией оксида азота (80 ppm) или илопроста 20 мкг [17].

Средний возраст больных в 1-й группе ( $n = 76$ ) составил  $46,4 \pm 14,9$  года, значение ЛСС –  $3,5 \pm 1,5$  (от 1,25 до 8,30) ед. Вуда, значение ЛСС после теста на обратимость –  $2,8 \pm 1,0$  (от 0,7 до 5,0) ед. Вуда, ДЛАС –  $50 \pm 13$  (от 27 до 97) мм рт. ст. У 6 пациентов из 1-й группы, которым была имплантирована МПК Berlin Heart EXCOR в качестве моста к ТС, средний возраст – от 19 до 39 лет, значение ЛСС – от 2,9 до 4,5 ед. Вуда, значение ЛСС после теста на обратимость – от 2,5 до 4,6 ед. Вуда, ДЛАС – от 42 до 58 мм рт. ст. Во 2-й группе ( $n = 36$ ) средний возраст был  $47,3 \pm 12,2$  года, ЛСС –  $2,1 \pm 0,8$  (от 0,8 до 3,7) ед. Вуда, ДЛАС –  $27,4 \pm 5,3$  (от 14 до 36) мм рт. ст. Возраст пациентов между 2 группами не отличался ( $p = 0,096$ ). Уровень давления заклинивания в легочной артерии (ДЗЛА) в 1-й группе –  $20,7 \pm 6,8$  (от 4 до 32) мм рт. ст. (в том числе у реципиентов с МПК Berlin Heart EXCOR – от 19 до 28 мм рт. ст.), во 2-й группе –  $11,1 \pm 4,4$  (от 3 до 20) мм рт. ст. ( $p = 0,023$ ).

Также 23 пациентам до ТС из 1-й группы проводилась терапия левосименданом [18] и 4 – силденафилом, у 20 из них на момент операции сохранялась ЛГ. Из сопутствующих заболеваний необходимо отметить наличие хронической обструктивной болезни легких у 15 пациентов, перенесенной тромбоэмболии легочной артерии в анамнезе – у 33.

Ближайшие результаты оценивали по длительности инотропной поддержки, искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и нахождения в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), частоте летальных исходов, необходимости применения левосимендана, силденафила или ингаляций оксида азота. Инотропной поддержкой после ТС считали применение дофамина, добутамина и эпинефрина. Вазопрессорная поддержка проводилась норэпинефрином.

Для оценки отдаленных результатов через 6 месяцев после ТС выполняли трансторакальную эхокардиографию (ЭхоКГ). Для расчета ЛСС применялась формула  $10 \times (V_{\max} \times Th/VTI_{RVOT}) + 0,16$ , для расчета ДЗЛА – по S.P. Nagueh  $1,24 \times E/E_m + 1,9$  [19]. Также по ЭхоКГ оценивалось наличие регургитации трикуспидального (ТрК) и митрального (МК) клапанов.

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы SPSS 21.0RU. В случаях нормального распределения показателей статистическую значимость различий между группами оценивали с применением метода Стьюдента, а данные представлены в виде «среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (M  $\pm$  SD)». При распределении, отличном от нормального, для оценки различий использовали непараметрический метод Манна–Уитни, данные представлены в виде медиан (Me) [25-й; 75-й процентиль]. При описании групп менее 20 пациентов данные были представлены в виде медианы, минимальных и максимальных значений признака. Для оценки различий в качественных параметрах использовали точный критерий Фишера. Критерием статистической значимости полученных выводов считали  $p < 0,05$ . Данное исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской декларации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранний послеоперационный период у всех пациентов протекал с проявлениями сердечно-сосудистой недостаточности по бивентрикулярному типу. Значимого отличия в длительности нахождения пациентов на инотропной поддержке в раннем послеоперационном периоде не было отмечено (5 [4; 10] и 5 [3; 7] суток, U-критерий Манна–Уитни  $p = 0,21$ ). Наличие ЛГ не повлияло на длительность нахождения реципиентов на ИВЛ после проведения пересадки сердца (1 [1; 2] и 1 [1; 2] сутки, U-критерий Манна–Уитни  $p = 0,8$ ). Восемью пациентам (11%) из 1-й группы и одному (3%) пациенту из 2-й группы ввиду развившейся после ТС острой ПЖ СН были установлены системы ЭКМО по вено-артериальной методике. Также трем больным (4%) из 1-й группы и одному (3%) из 2-й группы вследствие развития

трикуспидальной недостаточности (ТН) 4-й степени после ТС была выполнена пластика ТрК по Батиста. У 2 реципиентов из 1-й группы имела место ранняя дисфункция сердечного трансплантата, во 2-й группе такого осложнения не наблюдалось. При эндомиокардиальной биопсии у пациентов с пластикой ТрК признаков отторжений в течение первого месяца наблюдения не было.

Результаты исследования показали, что количество пациентов с осложненным периодом после ТС, находившихся более 10 суток в ОРИТ, оказалось больше в 1-й группе (39%,  $n = 30$ ), чем во 2-й (19%,  $n = 7$ ), Хи-квадрат  $p = 0,04$ . При сравнении общей длительности нахождения в ОРИТ между двумя группами статистически значимых различий не выявлено (8 [6; 13] и 7 [6; 10] суток соответственно,  $p = 0,18$ ).

Вместе с тем в раннем послеоперационном периоде терапия левосименданом чаще проводилась в 1-й группе ( $n = 29$ ) по сравнению со 2-й ( $n = 6$ ), Хи-квадрат  $p = 0,048$ . Также значимо большее число больных из 1-й группы ( $n = 54$ ) получали ингаляции оксида азота по сравнению со 2-й группой ( $n = 7$ ), Хи-квадрат  $p = 0,003$ . Использование силденафила с раннего послеоперационного периода до 6 месяцев после трансплантации было сравнимо в обеих группах: в 1-й – 25 пациентов, во 2-й – 6 пациентов, Хи-квадрат = 0,048.

В ранние сроки после ТС в исследуемой популяции умерло 14 пациентов, 30-дневная летальность была сопоставима в обеих группах: 1-я группа – 12 (15%) пациентов, 2-я – 2 (6%) пациента, Хи-квадрат  $p = 0,12$ . Отличием 1-й группы было то, что в течение 1 месяца после ТС пять реципиентов умерло на фоне установленной по поводу острой ПЖ СН ЭКМО.

Через 6 месяцев после ТС в группах не было выявлено различия в уровне ДЛАС ( $34,2 \pm 7,1$  и  $33,8 \pm 4,8$  мм рт. ст.,  $p = 0,21$ ) и ЛСС ( $1,8 \pm 0,6$  и  $1,5 \pm 0,4$  ед. Вуда,  $p = 0,07$ ). В 1-й группе произошло снижение ДЛАС у всех пациентов после проведения ТС ( $48,3 \pm 12,5$  и  $34,0 \pm 7,0$  мм рт. ст. соответственно,  $p < 0,001$ ). При этом у 32% ( $n = 24$ ) из 1-й группы через 6 месяцев после ТС сохранялась ЛГ (ДЛАС  $40,4 \pm 4,8$  мм рт. ст.). Через 6 месяцев после ТС у пациентов из 1-й группы произошло снижение уровня ЛСС ( $3,7 \pm 1,4$  и  $1,8 \pm 0,5$  ед. Вуда соответственно,  $p < 0,001$ ). В том числе положительная динамика была выявлена у реципиентов, которые до ТС находились на МПК Berlin Heart EXCOR: ДЛАС с 50 (от 42 до 58) мм рт. ст. до 36 (от 29 до 38) мм рт. ст.; ЛСС с 4,1 (от 2,9 до 4,50) до 2,1 (от 1,9 до 3,4) ед. Вуда. Через 6 месяцев после ТС у пациентов из 2-й группы данных за развитие ЛГ получено не было, показатели ДЛА систолического и ЛСС были в пределах нормы.

Через 6 месяцев уровень ДЗЛА после ТС в обеих группах значимо не отличался ( $12,4 \pm 6,1$  и  $11,1 \pm 4,7$  мм рт. ст. соответственно,  $p = 0,27$ ), однако в 1-й группе отмечено значимое снижение этого показателя по сравнению с уровнем ДЗЛА до ТС ( $17,0 \pm 7,9$  и  $11,5 \pm 5,3$  мм рт. ст. соответственно,  $p < 0,001$ ).

Через 6 месяцев после ТС встречаемость и тяжесть митральной недостаточности (МН) и ТН были сопоставимы. Так, МН регистрировалась у четверти пациентов в обеих группах: 26% (16 из 61) в 1-й группе, 21% (7 из 34) во 2-й группе, Хи-квадрат  $p = 0,64$ , а ТН у большей части пациентов: 64% (39 из 61) в 1-й группе, 65% (19 из 34) во 2-й группе, Хи-квадрат  $p = 0,44$ . Частота МН 2–4-й степени в 1-й группе составила 31% (5 из 16), во 2-й – 29% (2 из 7) и ТН 2–4-й ст.: в 1-й группе – 36% (14 из 39), во 2-й – 32% (6 из 19), Хи-квадрат  $p = 0,75$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

Необратимая ЛГ на фоне фармакологического лечения является противопоказанием к ТС в связи с высоким риском постоперационной ПЖ СН [6, 8]. Опыт ТС в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ показал, что риск развития осложнений в раннем посттрансплантационном периоде выше у реципиентов с исходной ЛГ. Согласно единичным исследованиям, несмотря на высокий риск ПЖ СН, наличие исходной ЛГ не влияет на выживаемость в отдаленном периоде после ТС [7, 12], что соответствует результатам, полученным нашим Центром. По нашим результатам, уровень ЛСС более 3,5 ед. Вуда не является противопоказанием для выполнения пересадки сердца. Более того, посттрансплантационные результаты у данных пациентов сопоставимы с результатами больных без исходной ЛГ.

При этом наличие исходной ЛГ увеличивает риск развития острой ПЖ СН у больных в раннем послеоперационном периоде после ТС [15, 20]. Применение оксида азота и других вазодилаторов периоперационно может быть эффективно для снижения риска появления ПЖСН после ТС [12, 21]. Развитие ТР – одно из наиболее частых осложнений после ТС [20], что может быть вызвано различными факторами. При этом в некоторых исследованиях указывается на то, что развитие ТН связано с прогрессией клеточного отторжения [20, 22]. В нашем исследовании только 4 пациентам из 89 потребовалась пластика ТрК, гистологических признаков отторжения в раннем послеоперационном периоде у них не было. Нарастание ТН в отдаленном периоде наблюдения может быть связано с риском повреждения клапана при выполнении эндомикардиальных биопсий, что требует дальнейшего исследования.

Развитие ЛГ в отдаленном периоде после ТС ассоциировано со снижением выживаемости [14, 23]. Согласно В. Lindelow et al., у всех пациентов после ТС происходит снижение ЛСС [15]. В свою очередь, Gude et al. утверждают, что развитие ПЖ СН и повышение ЛСС в сроки через 6 месяцев, 2 и 3 года после ТС являются прогностически неблагоприятными факторами [14]. S. Klotz et al. утверждают, что пациенты с обратимой ЛГ имеют схожие результаты с больными без ЛГ [12]. Более того, наличие у пациентов комбинированной (прекапиллярной и посткапиллярной) ЛГ до ТС ассоциировано с сохранением повышенного ЛСС через 1 год после операции [24]. По результатам ретроспективной оценки наших результатов у 32% ( $n = 24$ ) пациентов с исходной ЛГ, несмотря на положительную динамику, через 6 месяцев после ТС уровень ДЛА систолического был выше 35 мм рт. ст.

Применение силденафила, левосимендана и оксида азота у пациентов с ХСН способствует снижению ДЛА и ЛСС [25, 26], при этом недостаточно изучены возможности применения вазодилаторов после ТС. Ретроспективная оценка результатов нашего Центра показала, что применение различных тактик лечения пациентов с ЛГ (левосимендан, силденафил, оксид азота) эффективно в раннем посттрансплантационном периоде.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. У пациентов с исходной ЛГ после ТС отмечается более тяжелый ранний послеоперационный период, в том числе большая частота развития ПЖ СН с необходимостью имплантации ЭКМО.
2. Уровень ЛСС более 3,5 ед. Вуда не является противопоказанием для выполнения пересадки сердца. У пациентов с исходной ЛСС более 3,5 ед. Вуда после ТС достигаются сопоставимые результаты по сравнению с больными без исходной ЛГ, что позволяет рассматривать таких пациентов для включения в ЛОТС.
3. Вместе с тем летальность в течение 30 дней и длительность нахождения на ИВЛ после ТС у пациентов с исходной ЛГ и без нее не отличались.
4. Вне зависимости от исходного уровня ДЛА систолического и ЛСС у всех пациентов после ТС происходит значимое улучшение этих показателей.
5. Через 6 месяцев после ТС у больных вне зависимости от наличия исходной ЛГ не было выявлено различия в уровне ДЛА систолического и ЛСС.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A et al. 2015 ESC/ERC Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension, European Society of Cardiology / European Respiratory Society. *Eur Heart J*. 2016; 37: 67–119. doi: 10.1093/eurheartj/ehv317.
- Roldan C. The ultimate echo guide. Lippincott Williams and Wilkins, 2005. PMID: PMC2650657.
- Delgado JF, Gomez-Sanchez MA, Saenz de la Calzada C, Sanchez V, Escribano SV, Hernandez-Afonso et al. Impact of mild pulmonary hypertension on mortality and pulmonary artery pressure profile after heart transplantation. *Journal of Heart Lung Transplantation*. 2001; 20: 942–948. PMID: 11557188. doi: 10.1016/s1053-2498(01)00286-8.
- Deng MC, Gradaus R, Hammel D, Weyand M., Gunther F, Kerber S et al. Heart Transplant candidates at high risk can be identified at the time of initial evaluation. *Transplant International*. 1996; 9 (1): 38–45. PMID: 8748409. doi: 10.1007/bf00336810.
- Ross H, Hendry P, Dipchand A, Giannetti N, Hirsch G, Isaac D et al. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference on cardiac transplantation. *Canadian Journal of Cardiology*. 2003; 19: 620–654. PMID: PMC2706756.
- Kettner A, Dorazilova Z, Netuka I, Maly J, Al-hiti H, Melenovsky V et al. Is severe pulmonary hypertension a contraindication for orthotopic heart transplantation? Not any more. *Physiol Res*. 2011; 60 (5): 769–775. PMID: 21812520.
- Klotz S, Wenzelburger F, Stypmann J, Welp H, Drees G, Schmid C et al. Reversible pulmonary hypertension in heart transplant candidates: to transplant or not to transplant. *The annals of thoracic surgery*. 2006; 82 (5): 1770–1773. doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.05.114.
- Hill NS, Roberts KR, Preston IR. Postoperative Pulmonary Hypertension: Etiology and Treatment of a Dangerous Complication. *Respiratory Care*. 2009; 54 (7): 958–968. PMID: 19558745.
- Follath F, Cleland JG, Just H, Papp JG, Scholz H, Peuhkurinen K et al. Efficacy and safety of intravenous levosimendan compared with dobutamine in severe low-output heart failure (the LIDO study): a randomized double-blind trial. *Lancet*. 2002; 360 (9328): 196–202. PMID: 12133653.
- Mogollon Jimenez MV, Escoresca Prtega AM, Cabeza Letran ML, Hinojosa Perez R, Galle EL, Sobrino Marquez JM et al. Correlation of Echocardiographic and Hemodynamic Parameters in Pulmonary Hypertension Assessment Prior to Heart Transplantation. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 3023–3024. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.09.044.
- Zeng Z, Jiang Z, Wang CS, Luo H, Huang YF, Jin XH. Preoperative Evaluation Improves the Outcome in Heart Transplant Recipients With Pulmonary Hypertension – Retrospective Analysis of 106 Cases. *Transplantation Proceedings by ELSEVIER*. 2010; 42: 3708–3710. doi: 10.1016/j.transproceed.2010.08.067.
- Klotz S, Deng MC, Hanafy D, Schmid C, Stypmann J, Schmidt C et al. Reversible pulmonary hypertension in heart transplant candidates – pretransplant evaluation and outcome after orthotopic heart transplantation. *The European Journal of Heart Failure*. 2003; 5: 645–653. doi: 10.1016/S1388-9842(03)00059-X.
- Drakos SG, Kfour AG, Gilbert EM, Horne BD, Long JW, Strangham JC et al. Effect of reversible pulmonary hypertension on outcomes after heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2007; 26 (4): 319–323. doi: 10.1016/j.healun.2007.01.012.
- Gude E, Simonsen S, Geiran OR, Fiane AE, Gullestad L, Arora S et al. Pulmonary hypertension in heart transplantation: Discrepant prognostic impact of pre-operative compared with 1-year post-operative right heart hemodynamics. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2010; 29 (2): 216–223. doi: 10.1016/j.healun.2009.08.021.
- Lindelow B, Andersson B, Waagstein F, Bergh CH. High and low pulmonary vascular resistance in heart transplant candidates. A 5-year follow-up after heart transplantation shows continuous reduction in resistance and no difference in complication rate. *European Heart Journal*. 1999; 20: 148–156. PMID: 10099912.
- Kitamura S, Nakatani T, Kato T, Yanase M, Kobayashi J, Nakajima H et al. Hemodynamic and Echocardiographic Evaluation of Orthotopic Heart Transplantation with the modified bicaval anastomosis technique. *Circulation Journal*. 2009; 73 (7): 1235–1239. PMID: 19398842. doi: 10.1253/circj.cj-08-1098.
- Баутин АЕ, Яковлев АС, Заяшников СВ, Тауханов ДМ, Маричев АО, Федотов ПА и др. Сравнение гемодинамических эффектов ингаляционного илопроста и оксида азота при назначении пациентам с выраженной систолической дисфункцией левого желудочка. *Российский кардиологический журнал*. 2017; 12 (152): 97–103. doi: 10.15829/1560-4071-2017-12-97-103. Bautin AE, Yakovlev AS, Zayashnikov SV, Tashkhanov DM, Marichev AO, Fedotov PA et al. Comparison of hemodynamic effects of inhalatory iloprost and nitro oxide in patients with severe left ventricle dysfunction. *Russ J Cardiol*. 2017, 12 (152): 97–103. doi: 10.15829/1560-4071-2017-12-97-103.
- Борцова МА, Баутин АЕ, Яковлев АС, Федотов ПА, Сазонова ЮВ, Маричев АО и др. О возможности повышения информативности диагностики необратимой легочной гипертензии у кандидатов на трансплантацию сердца. *Альманах клинической медицины*. 2019; 47 (3): 212–220. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-030. Bortsova MA, Bautin AE, Yakovlev AS, Fedotov PA, Sazonova YuV, Marichev AO et al. On the possibility to increase sensitivity of diagnostic tests for fixed pulmonary hypertension in heart transplant candidates. *Almanac of Clinical Medicine*. 2019; 47 (3): 212–220. doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-030.

19. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, Hua L, Handschumacher MD, Chandrasekaran K et al. Guidelines for the Echocardiographic Assessment of the Right Heart in Adults: A report from the American society of echocardiography. Endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *Journal American Society of Echocardiology*. 2010; 23: 685–713. PMID: 20620859. doi: 10.1016/j.echo.2010.05.010.
20. Wong RC, Abrahams Z, Hanna M, Pangrace J, Gonzalez-Stawinski G, Starling R et al. Tricuspid Regurgitation after Cardiac Transplantation: An Old Problem Revisited. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2008; 27 (3): 247–252. doi: 10.1016/j.healun.2007.12.011.
21. Barst RJ, Galle N, Naelje R, Simonneau G, Jeffs R, Arneson C et al. Long-term outcome in pulmonary arterial hypertension patients treated with subcutaneous treprostinil. *European Respiratory Journal*. 2006; 28: 1195–1203. doi: 10.1183/09031936.06.00044406.
22. Шемакин СЮ, Халилулин ТА, Федосеева АА. Недостаточность трикуспидального клапана после ортотопической трансплантации сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2009; 11 (2): 21–24. Shetakin SY, Khalilulin TA, Fedoseeva AA. Tricuspid valve dysfunction after orthotopic heart transplantation. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2009; 11 (2): 21–34.
23. Mogollon MV, Galle EL, Perez RH, Aviles AH, Sobrino Marquez JM, Rodriguez NR et al. Prognosis after Heart Transplant in Patients with Pulmonary Hypertension Secondary to Cardiopathy. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40: 3031–3033. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.09.051.
24. Ghio S, Crimi G, Pica S, Temporelli PL, Boffini M, Rinaldi M et al. Persistent abnormalities in pulmonary arterial compliance after heart transplantation in patients with combined post-capillary and pre-capillary pulmonary hypertension. *Plos One*. 2017; 13 (12): 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0188383.
25. Al-Hiti H, Melenovsky V, Syrovatka P, Kettner J, Malek I, Kautzner J. Sildenafil is more selective pulmonary vasodilator than Prostaglandin E1 in Patients with Pulmonary Hypertension Due to Heart Failure. *Physiol Res*. 2011; 60: 303–308. ISSN 1802-9973.
26. Seferian A, Simonneau G. Therapies for pulmonary arterial hypertension: where are we today, where do we go tomorrow? *European Respiratory Revision*. 2013; 22: 217–226. doi: 10.1183/09059180.00001713.

*Статья поступила в редакцию 1.11.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 1.11.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-14-19

## ОЦЕНКА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ РЕЦИПИЕНТОВ СЕРДЦА С ТРАНСМИССИВНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ

С.А. Саховский, Н.Н. Колоскова, Д.А. Изотов, Е.А. Спирина, А.Ю. Гончарова, В.М. Лучкин, Б.Л. Миронков

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

**Введение.** Радикальным методом лечения хронической застойной сердечной недостаточности признается трансплантация сердца (ТС). Одним из путей снижения дефицита донорских органов стало расширение критериев отбора доноров в пользу изъятия сердца у доноров более старшего возраста, что явилось одной из причин увеличения риска выявления трансмиссивного атеросклероза коронарных артерий трансплантата (ТАКАТ). Остается мало изученным влияние эндоваскулярной коррекции ТАКАТ на послеоперационную выживаемость реципиентов сердца. **Цель работы:** оценить выживаемость реципиентов сердца с трансмиссивным атеросклерозом. **Материалы и методы.** Выполнена оценка продолжительности жизни 518 реципиентов сердца, которым в течение первой недели после ТС выполняли коронарографию. При выявлении гемодинамически значимого стенозирования коронарных артерий выполняли чрескожное коронарное вмешательство (ЧКВ) в плановом порядке. Средний возраст реципиентов составил  $46,92 \pm 1$  год (от 10 до 72 лет). Мужчин было 90%. Исходный статус реципиентов по UNOS распределился следующим образом: UNOS 1a – 217 человек, UNOS 1b – 89 и UNOS 2 – 212. По результатам коронароангиографии сформированы две группы. В группу 1 входили пациенты с признаками ТАКАТ, группа 2 была контрольной (без ТАКАТ). Первая группа была разделена на 2 подгруппы – подгруппа с признаками ТАКАТ, но без гемодинамически значимого поражения (без ЧКВ), и подгруппа с ТАКАТ, где выполнено ЧКВ (ЧКВ). **Результаты исследования.** Возраст реципиентов в группах ТАКАТ и без ТАКАТ не различался и составлял  $47,54 \pm 1,01$  и  $46,64 \pm 0,64$  года соответственно. Возраст доноров был больше в группе ТАКАТ ( $50,2 \pm 0,7$  года) по сравнению группой сравнения ( $41 \pm 0,5$  года) ( $p = 0,0005$ ). Выживаемость в группе сравнения составила в среднем  $58,25 \pm 1,17$  месяца, а в группе ТАКАТ –  $53,16 \pm 0,36$  месяца ( $p = 0,033$ ). Различия в продолжительности жизни пациентов, которым было выполнено ЧКВ ( $51,18 \pm 2,9$  месяца), и пациентов группы сравнения ( $58,25 \pm 1,17$  месяцев) не было статистически достоверным ( $p = 0,88$ ). В группе, где в трансплантате присутствовали признаки атеросклеротических изменений коронарных артерий, причина смерти мозга доноров в результате нарушения мозгового кровообращения встречалась чаще, чем в группе сравнения. **Заключение.** Риск ТАКАТ ассоциирован с возрастом донора и смертью мозга донора от сосудистых причин. Эндоваскулярная коррекция атеросклеротического поражения коронарных артерий позволяет нивелировать влияние стенозирования венечных артерий трансплантата на отдаленный результат операции ТС.

*Ключевые слова:* трансплантация сердца, трансмиссивный атеросклероз пересаженного сердца, чрескожные коронарные вмешательства.

**Для корреспонденции:** Саховский Степан Анатольевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (915) 166-56-54. E-mail: milifolium@gmail.com

**For correspondence:** Sakhovsky Stepan Anatolievich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (915) 166-56-54. E-mail: milifolium@gmail.com

# SURVIVAL OF HEART RECIPIENTS WITH DONOR-TRANSMITTED CORONARY ATHEROSCLEROSIS

S.A. Sakhovsky, N.N. Koloskova, D.A. Izotov, E.A. Spirina, A.Yu. Goncharova, V.M. Luchkin, B.L. Mironkov

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Introduction.** The cardiac transplantation is the radical treatment method of the chronic heart failure. One of the ways to minimize the donor organs deficit was a selection criterion enlargement and heart removal from elderly donors that became one of the causes increasing the risk of native coronary atherosclerosis. The influence of the endovascular correction at heart recipients' postoperative survival is still explored sufficiently. **Aim:** to estimate the survival of heart recipients with native coronary atherosclerosis. **Materials and methods.** The life expectancy of 518 cardiac recipients who underwent coronarography during the first week after cardiac transplantation was evaluated. When hemodynamically significant stenosis of the coronary arteries was detected, percutaneous coronary intervention (PCI) was performed as planned. The average age of the recipients was  $46.92 \pm 1$  year (from 10 to 72 years). The 90% of them were men. The initial recipients' status of UNOS was rank as follows: UNOS 1a – 217 people, UNOS 1b – 89 people and UNOS 2 – 212 people. Based on the results of coronary angiography, two groups were formed. First group included patients with signs of initial coronary atherosclerosis; second group was the control group (without the initial coronary atherosclerosis). The first group was divided into two subgroups – a subgroup with signs of initial coronary atherosclerosis, but without hemodynamically significant lesions (without PCI), and a subgroup with initial coronary atherosclerosis, where PCI was performed (PCI). **Results.** The age of the recipients in the initial coronary atherosclerosis and without initial coronary atherosclerosis groups had no difference and was  $47.54 \pm 1.01$  and  $46.64 \pm 0.64$  years, respectively. Donors were older in the initial coronary atherosclerosis group ( $50.2 \pm 0.7$  years) than in the comparison group ( $41 \pm 0.5$  years) ( $p = 0.0005$ ). The survival in the comparison group averaged  $58.25 \pm 1.17$  months, and in the initial coronary atherosclerosis group was  $53.16 \pm 0.36$  months ( $p = 0.033$ ). The difference in the life expectancy of patients who underwent PCI ( $51.18 \pm 2.9$  months) and the comparison group ( $58.25 \pm 1.17$  months) was not statistically significant ( $p = 0.88$ ). In the group where the graft showed signs of atherosclerotic changes in the coronary arteries, the cause of donors' brains death as a result of cerebrovascular accident occurred more often than in the comparison group. **Conclusion.** Endovascular correction of atherosclerotic lesions of the coronary arteries allows to reduce the effect of stenosis of the coronary arteries of the transplant on the long-term result of the heart transplantation.

*Key words:* heart transplantation, donor-transmitted coronary atherosclerosis, percutaneous coronary intervention.

## ВВЕДЕНИЕ

Единственным радикальным методом лечения хронической застойной сердечной недостаточности является трансплантация сердца (ТС) [1, 2]. Однако данный метод лечения ограничен дефицитом донорского материала [3], что требует поиска оптимизации подходов к лечению ТС. В последнее время одним из решений проблемы нехватки донорских органов стало расширение критериев отбора доноров [4, 5]. Данные изменения позволили проводить изъятие сердца у доноров более старшего возраста, что стало причиной увеличения риска трансмиссии атеросклероза от доноров к реципиентам [6]. Прижизненная предтрансплантационная диагностика атеросклероза у потенциальных доноров не всегда возможна. Некоторые центры выполняют ТС уже с ранее выявленным у потенциального сердечного донора атеросклеротическим поражением коронарных

артерий путем предварительного выполнения коронароангиографии, внутрисосудистого ультразвукового исследования (ВСУЗИ). При таких условиях ТС требует одномоментной реваскуляризации миокарда путем коронарного шунтирования (КШ) или отсроченного чрескожного коронарного вмешательства [7–9]. Однако в большинстве случаев ТАКАТ требует коррекции уже в посттрансплантационном периоде. Предпочтительным методом реваскуляризации считается выполнение ЧКВ. Актуальным вопросом остается оценка прогноза выживаемости у таких пациентов после коррекции ТАКАТ.

**Цель работы:** оценить выживаемость реципиентов сердца с трансмиссивным атеросклерозом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведен ретроспективный анализ 518 ангиограмм реципиентов сердца, проходивших лечение в

ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России в период с 2013-го по 2018 год. Представлены результаты наблюдения за реципиентами сердца, которым в течение недели после ТС выполняли коронарографию, при выявлении гемодинамически значимого поражения в течение первого месяца выполняли эндоваскулярную реваскуляризацию. Возраст исследуемых составлял от 10 до 72 лет (ср.  $46,92 \pm 1$ ), 90% были мужчины. Исходный статус реципиентов по UNOS составлял: UNOS 1a – 217 чел., UNOS 1b – 89 и UNOS 2 – 212. Все пациенты были выделены в две группы: в 1-ю группу входили пациенты, у которых, по данным ангиографии коронарных артерий, присутствовали признаки трансмиссии атеросклероза от доноров, 2-я группа была контрольной (без признаков атеросклероза коронарных артерий трансплантата). Первая группа была разделена на 2 подгруппы – это подгруппа с признаками ТАКАТ, но без гемодинамически значимого поражения, и подгруппа с ТАКАТ, где атеросклеротическое поражение коронарных артерий было гемодинамически значимым и потребовало чрескожного коронарного вмешательства. Все пациенты проходили стандартное обследование, которое включало ЭКГ, ЭхоКГ. ЭКГ включало 12-канальную регистрацию потенциалов сердца на аппарате «Megasart» фирмы «Siemens» (Германия). ЭхоКГ проводили на аппарате «VIVID 9» фирмы «GE» (США). Обследование включало выполнение двухмерной ЭхоКГ для определения объемных характеристик левого желудочка по формуле «площадь–длина» (КДО ЛЖ и КСО ЛЖ) с вычислением ФИ ЛЖ. Определяли величину давления в легочной артерии методом доплерографии. Степень регургитации на митральном клапане (МК) оценивали в баллах от 0 до 3. Коронарную ангиографию (КГ) выполняли по методике M. Judkins на аппаратах AxiomArtis (Siemens, Германия) и ALLURA XPER (Phillips, Нидерланды). ЧКВ выполняли бедренным доступом, с использованием стандартных доз гепарина (5000 ЕД) и стентированием пораженных сегментов артерий. Во всех случаях стремились выполнить полную реваскуляризацию, как правило, в течение одной процедуры. Стенозы более 70% в основных ветвях (диаметр артерии не менее 2,5 мм) устраняли во всех случаях. Также помимо оценки реципиентов были проанализированы пол, возраст, причины

смерти доноров сердца. Данные исследования обрботали методами параметрической статистики с помощью программы Microsoft Excel и IBM SPSS Statistics версии 22 В исследовании приведены средние арифметические величины показателей и стандартные ошибки среднего значения. Достоверность отличий оценивали критериями для непараметрических переменных: критерий Уилкоксона для парных сравнений зависимых переменных и Манна–Уитни (U-критерий) для сравнения независимых переменных. Анализ выживаемости проводили с помощью метода Каплана–Майера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Средний возраст реципиентов в группах с ТАКАТ и без ТАКАТ не отличался и составлял  $47,54 \pm 1,011$  и  $46,64 \pm 0,640$  года соответственно. Исходный статус по UNOS в разных группах представлен в табл. 1.

Донорами сердца в обеих группах в 75% случаев являлись мужчины. Возраст доноров достоверно был больше в группе с ТАКАТ по сравнению с контрольной группой и составлял соответственно в среднем  $50,2 \pm 0,7$  и  $41 \pm 0,5$  года ( $p = 0,0005$ ). Следует отметить, что в группе, где у реципиентов присутствовал атеросклероз, смертность доноров от нарушения мозгового кровообращения была больше на 15%, что может указывать на системные атеросклеротические процессы. Характеристика доноров в группах представлена в табл. 2.

Выживаемость в группах достоверно не отличалась и составляла в группе с ТАКАТ  $26,54 \pm 0,945$  месяца и в группе сравнения  $29,47 \pm 0,95$  месяца. Выживаемость по Каплану–Майеру в группах представлена на рис. 1.

Была рассмотрена возможность влияния исходного статуса реципиента по UNOS на выживаемость в посттрансплантационном периоде. Выживаемость в зависимости от исходно статуса по UNOS представлена на рис. 2.

При анализе подгрупп реципиентов в группе с ТАКАТ было выявлено достоверное различие среднего возраста донора, которое было больше в подгруппе пациентов, которым выполняли эндоваскулярную реваскуляризацию. Все остальные исследуемые характеристики доноров не различались (табл. 3).

Таблица 1

**Исходный статус пациентов по UNOS**  
**Initial status of patients by UNOS**

Параметр	Подгр. ЧКВ, n = 65	Подгр. ТАКАТ, без ЧКВ, n = 101	Гр. сравнения, n = 352	Гр. ТАКАТ, n = 166
UNOS 1a	31 (47,5%)	47 (46,5%)	139 (39,5%)	78 (47%)
UNOS 1b	9 (14%)	19 (19%)	61 (17%)	28 (17%)
UNOS 2	25 (38,5%)	35 (34,5%)	152 (43,5%)	60 (36%)

Таблица 2

**Основные параметры состояния доноров в исследуемых группах**  
**The main parameters of the state of donors in the study groups**

Параметр		Гр. сравнения, n = 352	ТАКАТ, n = 166	p
Возраст донора, лет		41,40 ± 0,593	50,20 ± 0,714	0,0005
Пол доноров	Муж.	270 (77%)	126 (76%)	0,525
	Жен.	82 (23%)	33 (20%)	0,525
	Неизвестен	0 (0%)	7 (4%)	0,525
Смерть мозга донора ОНМК		214 (61%)	126 (76%)	0,029

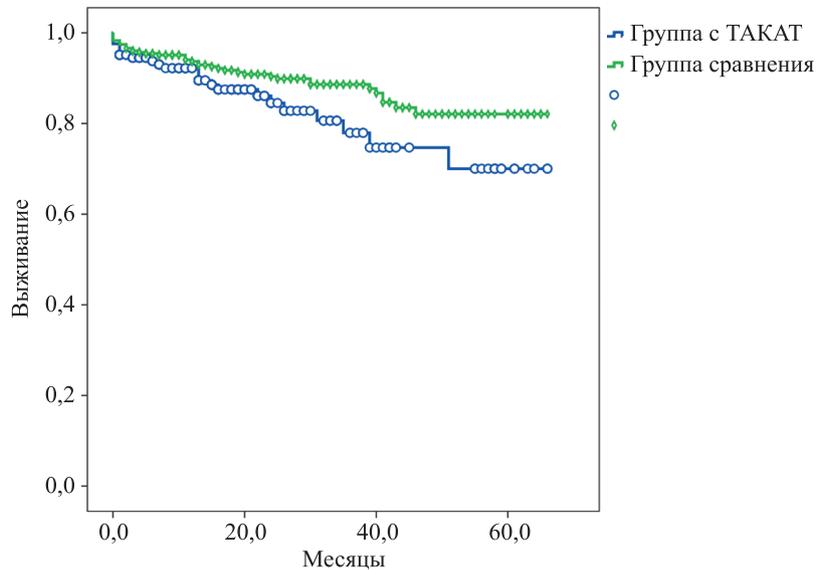


Рис. 1. Кривые выживаемости Каплана–Майера пациентов после трансплантации сердца

Fig. 1. Kaplan–Mayer survival curves of patients after heart transplantation

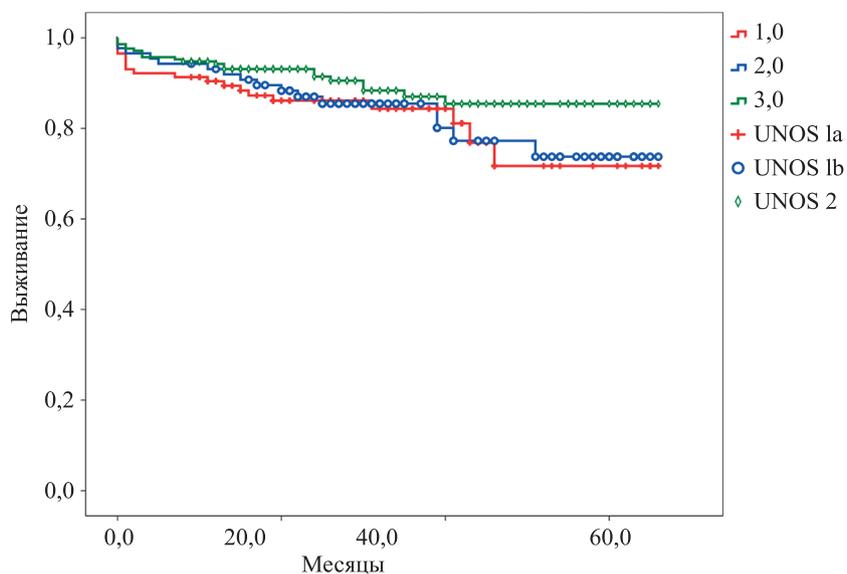


Рис. 2. Кривые Каплана–Майера пациентов после трансплантации сердца в зависимости от исходного статуса реципиента по UNOS

Fig. 2. Kaplan–Mayer survival curves of patients after heart transplantation, depending on the initial status of the recipient for UNOS

Таблица 3

**Характеристика доноров в подгруппах пациентов с наличием ТАКАТ**

**Characteristics of donors in subgroups of patients with DCA**

Параметр		Подгруппы ТАКАТ		p
		ЧКВ, n = 65	Без ЧКВ, n = 101	
Возраст донора, лет		52,65 ± 0,932	48,67 ± 0,976	0,011
Пол доноров	Муж.	53 (81,5%)	73 (72,1%)	0,525
	Жен.	10 (15%)	23 (23%)	0,525
	Неизвестен	2 (3,5%)	5 (4,9%)	0,525
Смерть донора ОНМК		50 (77%)	76 (75%)	0,029

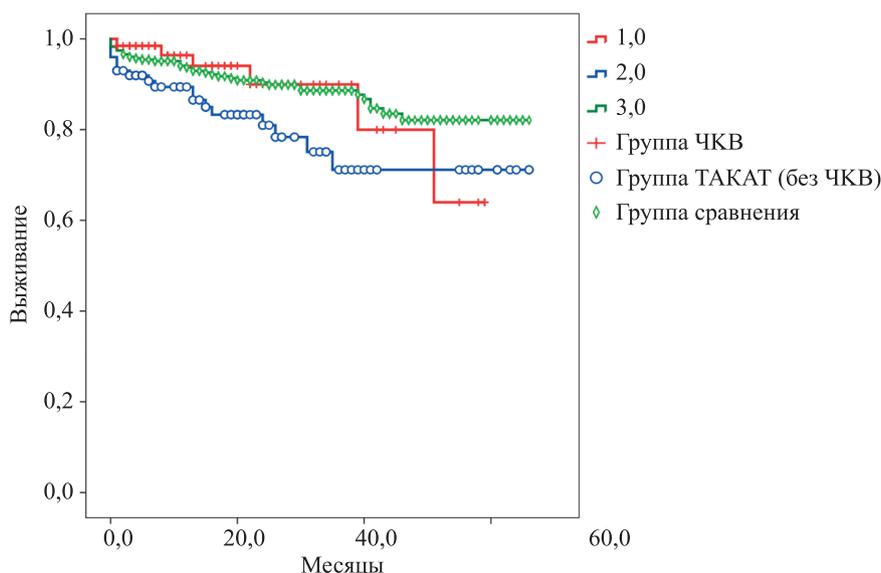


Рис. 3. Кривые Каплана–Майера пациентов после трансплантации сердца

Fig. 3. Kaplan–Mayer survival curves of patients after heart transplantation

При анализе выживаемости в подгруппе ТАКАТ группа ЧКВ демонстрировала лучшую выживаемость. Кривые выживаемости в подгруппах представлены на рис. 3.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Представленные данные показывают, что увеличение возраста донора увеличивает риск наличия у него атеросклероза и дальнейшей его трансмиссии реципиенту сердца. Мозговая смерть донора от сосудистых причин может косвенно указывать на наличие генерализованных атеросклеротических процессов в организме. Трансплантация сердца, выполненная реципиентам в статусе UNOS 2, прогностически более благоприятна для дальнейшего выживания, чем реципиентам в статусе UNOS 1.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES**

1. Либби П, Боноу РО, Манн ДЛ, Зайнс ДП. Болезни сердца по Браунвальду. Руководство по сердечно-сосудистой медицине. М.: Логосфера, 2013; 3: 1753. Libbi P, Bonou RO, Mann DL, Zayps DP. Bolezni serdtsa po Braunval'du. Rukovodstvo po serdechno-sosudistoy meditsine. M.: Logosfera, 2013; 3: 1753.
2. Hunt SA, Haddad F. The changing face of heart transplantation. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52: 587–598.
3. Готье СВ, Хомяков СМ. Оценка потребности населения в трансплантации органов, донорского ресурса и планирование эффективной сети медицинских организаций (центров трансплантации). *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2013; 15 (3): 11–24. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2013-3-11-24>. Gautier SV, Khomyakov SM. Otsenka potrebnosti naseleniya v transplantatsii organov, donorskogo resursa i planirovanie effektivnoy seti meditsinskikh organizatsiy (tsentrov transplantatsii). *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2013; 15 (3): 11–24. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2013-3-11-24>.

4. Prieto D, Correia P, Baptista M, Antunes MJ. Outcome after heart transplantation from older donor age: expanding the donor pool. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015; 47: 672–678.
5. Khush KK, Menza R, Nguyen J et al. Donor predictors of allograft use and recipients outcomes after heart transplantation. *Circulation Heart failure.* 2013; 6: 300–309.
6. Миронков БЛ, Честухин ВВ, Саитгареев РШ, Захаревич ВМ, Поццов ВН, Кормер АЯ и др. Трансмиссивный атеросклероз коронарных артерий трансплантата. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; 16 (3): 31–38. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2014-3-31-38>. Mironkov BL, Chestukhin VV, Saitgareev RSh, Zakharevich VM, Poptsov VN, Kormer AY a i dr. Transmissivnyy ateroskleroz koronarnykh arteriy transplantata. *Vestnik transplan-*
7. Laks H, Gates RN, Ardehali A et al. Orthotopic heart transplantation and concurrent coronary bypass. *J Heart Lung Transplant.* 1993; 12: 810–815.
8. Abid Q, Parry G, Forty J et al. Concurrent coronary grafting of the donor heart with left internal mammary artery: 10-year experience. *J Heart Lung Transplant.* 2002; 21: 812–814.
9. Rabago G, Martin-Trenor A, Lopez Coronaro JL et al. Coronary angioplasty and stenting following heart transplantation with older donor: Is this a rational approach? *Eur J Cardiothorac Surg.* 1998; 13: 209–211.

Статья поступила в редакцию 3.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 3.10.2019

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.  
**Подписной индекс** нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**



Ф. СП-1	<p><b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ</p>	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;"><b>80248</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">(индекс издания)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">количество комплектов</td> </tr> </table>	<b>80248</b>	(индекс издания)	количество комплектов																					
<b>80248</b>																										
(индекс издания)																										
количество комплектов																										
на 2020 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> </tr> <tr> <td> </td><td> </td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда																										
(почтовый индекс) (адрес)																										
Кому																										
(фамилия, инициалы)																										
-----																										
Ф. СП-1	<p><b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ</p>	<p>ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА на журнал</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;"><b>80248</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">(индекс издания)</td> </tr> </table>	<b>80248</b>	(индекс издания)																						
<b>80248</b>																										
(индекс издания)																										
на 2020 год по месяцам																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th> </tr> <tr> <td> </td><td> </td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда																										
(почтовый индекс) (адрес)																										
Кому																										
(фамилия, инициалы)																										

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-20-25

## ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ ВНЕПЕЧЕНОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ: ОПЫТ ОДНОГО ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ЦЕНТРА

О.А. Герасимова<sup>1, 2</sup>, В.В. Боровик<sup>1</sup>, Ф.К. Жеребцов<sup>1</sup>, Д.А. Гранов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Цель:** оценить частоту возникновения злокачественных новообразований (ЗНО) *de novo* после трансплантации печени (ТП) и сравнить с показателями среди населения России в целом. **Материалы и методы.** В исследование были включены 182 пациента, которые наблюдались не менее 6 месяцев после ТП и не имели злокачественных новообразований внепеченочной локализации до ТП. Все данные проанализированы ретроспективно. Статистическая обработка результатов проведена в программе Statistica for Windows v.10. **Результаты.** Частота ЗНО составила 5,5% (10 из 182 пациентов). Средний срок от пересадки до постановки диагноза новообразования *de novo* составил 47,8 месяца (от 8 до 144 месяцев). Среди пациентов были 3 мужчины и 7 женщин. Типы опухолей *de novo* включали опухоль пищеварительной системы (2 из 10), гематологические (3 из 10), рак кожи – меланому (1 из 10), урологическую (1 из 10), гинекологические (2 из 10) и рак корня языка (1 из 10). 5 пациентов (50,0%) умерли, смертность была выше, чем у других пациентов с ТП ( $Z = -2,6$ ;  $p = 0,009$ ). Среднее время наблюдения после выявления новообразований составило 18,8 мес. Заболеваемость злокачественными новообразованиями после ТП была в 10 раз выше, чем среди населения РФ в целом. Не было обнаружено существенных различий в частоте позднего острого отторжения между 10 пациентами с ЗНО и другими 172 пациентами ( $Z = 0,18$ ,  $p = 0,8$ ). Среди выживших пациентов иммуносупрессия представлена (2 больных с лимфомами) монотерапией такролимусом, у 3 – эверолимусом. **Заключение.** Частота злокачественных новообразований внепеченочной локализации после ТП значительно выше, чем в популяции в целом. Чтобы снизить частоту новообразований в будущем, пациенты должны проходить регулярный скрининг; следует назначать блокаторы пролиферативного сигнала, хотя их эффективность требует дальнейшего изучения.

*Ключевые слова:* трансплантация печени, *de novo* злокачественные новообразования, такролимус, эверолимус.

## MALIGNANT NEOPLASMS OF EXTRAHEPATIC LOCALIZATION AFTER LIVER TRANSPLANTATION: EXPERIENCE OF A SINGLE TRANSPLANT CENTER

О.А. Герасимова<sup>1, 2</sup>, В.В. Боровик<sup>1</sup>, Ф.К. Жеребцов<sup>1</sup>, Д.А. Гранов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> А.М. Гранов Russian Science Centre of Radiology and Surgical Technologies of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Saint-Petersburg State University, St-Petersburg, Russian Federation

**Aim:** to evaluate the incidence of *de novo* cancer after liver transplantation (LT) and compare with those among the general Russian population. **Materials and methods.** A total of 182 patients who had a minimum follow-up time of 6 months after LT were enrolled in the study and had no malignancy at last time before LT. All data have analyzed retrospectively. Statistical processing of the results carried out in the program Statistica for Windows v.10.

**Для корреспонденции:** Герасимова Ольга Анатольевна. Адрес: 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 70. Тел. (812) 439-66-40. E-mail: ren321@mail.ru

**For correspondence:** Gerasimova Olga Anatolievna. Address: 70, Leningradskaya str., p. Pesochnyy, St-Petersburg, 197758, Russian Federation.

Tel. (812) 439-66-40. E-mail: ren321@mail.ru

**Results.** The incidence rate of *de novo* malignancy was 5.5% (10 in 182 patients). The median elapsed time from transplant to the diagnosis of *de novo* malignancy was 47.8 months (range, 8 to 144 months). The patients were 3 male and 7 female. The types of *de novo* tumors included digestive system tumor (2 in 10), hematologic malignant tumor (3 in 10), skin cancer – melanoma (1 in 10), urologic neoplasm (1 in 10), and tongue radix cancer (1 in 10), gynecological tumors (2 in 105). 5 patients (50.0%) died, mortality was more higher than other LT patients ( $Z = -2.6$ ;  $p = 0,009$ ). Median time of follow-up after detection neoplasms was 18.8 months. The incidence of malignancy following LT was 10 folds higher than the general Russian population. No significant differences were found in the frequency of late acute rejection between 10 examined patients and other 172 patients ( $Z = 0.18$ ,  $p = 0.8$ ). Among surviving patients 2 pts with lymphomas have a monotherapy by tacrolimus, 3 – based by everolimus. **Conclusion.** The frequency *de novo* cancer of extrahepatic localization after LT is significantly higher than in the population as a whole. To reduce the incidence of neoplasms in the future, patients should be screened; proliferative signal blockers (m-TOR) should be prescribed.

*Key words:* liver transplantation, *de novo* cancer, tacrolimus, everolimus.

## ВВЕДЕНИЕ

За последние десятилетия трансплантация печени (ТП) стала доступным способом лечения терминальной печеночной недостаточности [1]. Развитие хирургических технологий, прогресс в иммуносупрессивной терапии и оптимизация наблюдения за пациентами привели к улучшению результатов выживаемости. В большинстве трансплантационных центров 1-летняя выживаемость после трансплантации печени составляет 91% и выше [1, 2]. Увеличение продолжительности жизни больных с трансплантатом печени повлекло за собой увеличение частоты сердечно-сосудистых заболеваний и злокачественных новообразований (ЗНО) внепеченочной локализации [3, 4]. Очевидно, что риск развития ЗНО внепеченочной локализации у реципиентов солидных органов в 3–7 раз выше, чем в общей популяции, из-за онкогенных эффектов длительной иммуносупрессии [5–7], кумулятивная частота составляет 3–5% к трем годам и 11–20% к десяти годам после ОТП [1]. D. Collett с соавторами сообщают, что частота развития злокачественных новообразований *de novo* через 10 лет после ТП достигает 10% [8].

В настоящем ретроспективном исследовании авторы проанализировали частоту возникновения ЗНО внепеченочной локализации *de novo* после трансплантации печени, типы и факторы риска их развития.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В анализ включили данные 182 пациентов, которым была проведена трансплантация печени в клинике РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова в период 1998–2017 гг. Все наблюдались амбулаторно не менее 6 месяцев и не имели злокачественных новообразований внепеченочной локализации до пересадки. Трансплантаты печени были получены от посмертных доноров. После ТП применяли индукционную терапию базиликсимабом (симулект) и стандартную схему иммуносупрессивной терапии (ИСТ): ингибиторы кальциневрина (ИКН) (циклоsporин/такроли-

мус), кортикостероиды и микофеноловая кислота. Блокаторы пролиферативного сигнала (эверолимус) назначали больным с гепатоцеллюлярным раком, а также при развитии нефротоксичности ИКН. После выписки пациенты наблюдались ежемесячно в течение первого года и далее с интервалами 2–3 месяца. В каждый амбулаторный визит проводили клинико-лабораторное обследование с определением основных показателей функционального состояния печени, комплексное УЗИ органов брюшной полости, а МСКТ грудной и брюшной полостей, ФГДС, МРТ – 1 раз в год при диспансерном наблюдении и по показаниям. Концентрация ИКН в отдаленном периоде для такролимуса – 3–5 нг/мл, для циклоспорина в точке C0 – 100–150 нг/мл.

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе Statistica for Windows v.10. Использовали методы дискриптивной и непараметрической статистики, для оценки межгрупповых различий применили коэффициент Манна–Уитни, достоверными считали данные с  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У 10 из 182 больных, включенных в анализ, выявили ЗНО внепеченочной локализации после ТП. Из 10 больных было 7 женщин, 3 мужчины, средний возраст при ТП был  $46,1 \pm 9,4$  года на этапе диагностики ЗНО составил  $51 \pm 10$  лет. Срок выявления ЗНО после ТП – от 8 до 144 мес. (средний 47,8 мес., медиана 36 мес.). Средний срок наблюдения с момента диагностики ЗНО составил 18,8 мес. Частота развития ЗНО составила 5,5% от числа всех больных, выписанных на амбулаторный этап и переживших 6 месяцев после ТП. Чаще других обнаруживали посттрансплантационные лимфолифферативные заболевания (ПТЛПЗ) – 3 пациента (30%), иные локализации ЗНО: карциноид 12-перстной кишки – 1 (10%), аденокарцинома желудка – 1 (10%), рак шейки матки (РШМ) – 1 (10%), аденокарцинома матки – 1 (10%), меланома кожи – 1 (10%), рак корня языка – 1 (10%), почечно-клеточный рак – 1 (10%).

Из 10 реципиентов у 7 (70%) проведены операции, 3 из которых были радикальными, остальные носили циторедуктивный или диагностический характер. Стойкая ремиссия достигнута у 3 больных, оперированных по поводу аденокарциномы матки, почечно-клеточного рака, меланомы кожи, и в 2 случаях сочетанного лечения лимфомы. Лечение неходжкинской лимфомы после хирургического вмешательства осуществляли по схеме полихимиотерапии (ПХТ) R-СНОР. На время ПХТ модифицировали схему ИСТ, сохраняя только такролимус в минимальной концентрации, не более 3 нг/мл. В настоящее время у 1 больной продолжительность ремиссии составляет 5 лет, 1 больная в ремиссии 12 мес., имея удовлетворительную функцию трансплантата печени на фоне монотерапии такролимусом пролонгированного действия (табл.). Один пациент отказался от лечения и погиб от прогрессирования лимфомы. Носительство вируса Эпштейна–Барр, который считается предиктором развития лимфом, выявлено у 2 больных из 3.

В раннем послеоперационном периоде умерли 2 больных от инфекционных осложнений: после резекции желудка, выполненной по поводу низкодифференцированного аденогенного рака тела желудка, и после паллиативной операции резекции 12-перстной кишки на фоне канцероматоза брюшины. Одна больная умерла от прогрессирования РШМ через год после верификации диагноза (Т3М1N0) и сочетанного лучевого лечения и химиотерапии; один больной умер от ОНМК (геморрагический инсульт) после успешного лучевого лечения рака корня языка (табл.). Таким образом, из 10 больных с ЗНО внепеченочной локализации умерли 5 пациентов (50%). По сравнению с группой больных без ЗНО летальность в исследуемой малочисленной группе была существенно выше ( $Z = -2,6$ ,  $p = 0,009$ ).

Больным после выявления ЗНО модифицировали схему иммуносупрессии, назначая блокатор пролиферативного сигнала эверолимус без ущерба для функции трансплантата печени. Исключение составили 2 больных с лимфомами, поскольку рекомендаций по применению эверолимуса у таких больных нет, есть данные клинических исследований [9].

Не было получено достоверных различий в частоте выявленных эпизодов позднего отторжения, а соответственно, с влиянием болюсного введения кортикостероидов, у больных с ЗНО по сравнению с остальными пациентами ( $Z = 0,18$ ,  $p = 0,8$ ).

Средний срок наблюдения в группе из 10 человек с момента выявления ЗНО составил 18,8 мес., но группа немногочисленная, а расчет включил в себя и данные от погибших в раннем периоде после не радикальных оперативных вмешательств, выполненных в поздней стадии заболевания.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что ЗНО внепеченочной локализации у пациентов, перенесших трансплантацию печени, встречаются чаще, чем в общей популяции [10–13]. По данным различных центров, частота возникновения злокачественных новообразований варьирует от 2,6 до 26% [14–16]. Частота развития ЗНО *de novo* составляет от 3 до 5% через 1–3 года после трансплантации печени и от 11 до 20% через 10 лет [1, 2, 16]. Наиболее частыми злокачественными новообразованиями после трансплантации печени являются рак кожи, рак легкого, ПТЛПЗ и саркома Капоши [6, 8].

Согласно данным Министерства здравоохранения РФ, заболеваемость раком в России составила в 2018 г. 425,4 новых случая на 100 000 населения [17]. По данным нашего центра, частота ЗНО внепеченочной локализации *de novo* у пациентов после ТП оказалась выше примерно в 10 раз, чем в общей популяции населения РФ, составив 5,5%.

Различными исследователями установлены основные факторы риска развития ЗНО после ТП. К ним относятся пожилой возраст, употребление алкоголя, курение, онкогенные вирусы, чрезмерная инсоляция и длительная иммуносупрессивная терапия [2, 5, 18, 19]. Кроме того, иммуносупрессивная терапия способствует угнетению иммунного контроля и снижению устойчивости к некоторым онкогенным вирусам [18, 20, 21]. В исследуемой группе пациентов, так же, как и в подобном турецком исследовании [22], средний возраст реципиентов на этапе выявления ЗНО оказался более 50 лет, что является потенциальным фактором риска их развития. В отличие от данных других исследователей мы не выявили среди всей группы трансплантированных больных рака легких. Вероятно, это связано с тем, что в наблюдаемой популяции больных больше женщин, курильщики составляют не более 20% всех амбулаторных пациентов.

Рак кожи, который является одним из наиболее часто встречающихся типов злокачественных новообразований, возникающих после пересадки солидных органов, наблюдался только у 1 пациента (10%) в нашей популяции, был обнаружен после травмы пигментного невуса и радикально прооперирован.

Хроническое употребление алкоголя и длительный стаж курения табака присутствовали только у 1 пациента (10%), у которого развился рак корня языка, его подвергли конформному облучению с хорошим клиническим эффектом, но погиб больной от геморрагического инсульта через 6 мес. от начала лечения.

В нашей группе доминировали ПТЛПЗ (30%), результаты лечения которых можно считать удовлетворительными, поскольку в 2 случаях достигнута длительная ремиссия, к сожалению, один больной от-

Таблица

**Демографические характеристики больных с ЗНО после ТП  
Demography characteristics of the patients with *de novo* cancer after LT**

№	Пол	Возраст, лет	Диагноз	ИСТ	Тип ЗНО	Стадия	Лечение	Срок ремиссии, мес.	Срок наблюдения, лет	ИСТ при ЗНО	Статус
1	ж	59,8	Поликистозная болезнь	СуА	Плоскоклеточный рак почки	T1aN0M0	Хирургическое	78	21,1	EVL	Жива
2	ж	52,2	Первичный билиарный холангит	TAC + MPA	Карциноид 12-п. кишки	T4NxM1	Хирургическое	0	0,9	TAC	Умерла
3	м	34,6	Неуточненный цирроз печени	СуА	Лимфома селезенки	–	Отказ от лечения	0	3,2	СуА	Умер
4	м	57,5	ХВГС	TAC + MPA	Аденокарцинома желудка	T2NxM0	Хирургическое	0	3,1	EVL	Умер
5	ж	48,5	Синдром Бадда–Киари	TAC	Аденокарцинома матки	T1aNxM0	Хирургическое	64	13,4	EVL + TAC	Жива
6	ж	45,5	Неуточненный цирроз печени	TAC + MPA	Рак шейки матки	T3bNxM0	Лучевая, химиотерапия	0	9,9	EVL + TAC	Умерла
7	м	65,2	Неуточненный цирроз печени	TAC + MPA	Меланома кожи	T1N0M0	Хирургическое	24	8,5	EVL	Жив
8	м	53,8	ХВГС	EVL + TAC	Рак корня языка	T4N1M1	Лучевая терапия	6	1,6	EVL	Умер
9	ж	56,5	ХВГС	TAC	Неходжкинская лимфома	II	Хирургическое, химиотерапия	56	8	TAC	Жива
10	ж	34,9	Ретрансплантация	TAC	Неходжкинская лимфома	IVA	Хирургическое, химиотерапия	12	6,4	TAC	Жива

*Примечание.* ИСТ – иммуносупрессивная терапия; ХВГС – хронический вирусный гепатит С.

*Note.* ИСТ – immunosuppressive therapy; ХВГС – chronic viral hepatitis С.

казался от лечения, проживая в отдаленном от центра трансплантации регионе, погиб от прогрессирования заболевания.

Иммуносупрессия у больных была представлена такролимусом (8 пациентов) и циклоспорином (2 больных). В раннем послеоперационном периоде пульс-терапия отторжения метилпреднизолоном проводилась у 3 больных. В нашей серии препараты антитимоцитарного иммуноглобулина, с которыми связывают более частое развитие ПТЛПЗ [23], не применяли. Ни у одного из больных не было гипериммуносупрессии в течение периода амбулаторного наблюдения, концентрация ИКН контролировалась регулярно и не превышала уровень 3–5 нг/мл для такролимуса, 100–150 нг/мл для циклоспорина в период более 12 мес. после ТП. С учетом возможного триггерного воздействия вируса Эпштейна–Барр для ПТЛПЗ, возможно, целесообразен предоперационный скрининг и последующий молекулярно-генетический мониторинг этой инфекции, данных для обязательной превентивной профилактики пока недостаточно [24].

Благодаря развитию трансплантационных технологий продолжительность жизни больных с пересаженной печенью увеличивается, происходит естественное постарение популяции реципиентов, риски развития ЗНО, таким образом, возрастают [25]. Пациенты должны быть информированы о подобных рисках. Поскольку рак кожи, головы и шеи, легких и лимфатической системы часто наблюдается после трансплантации [5, 6, 26, 27], больные из группы риска могут нуждаться в более частых амбулаторных визитах, возможно, превентивном назначении блокаторов пролиферативного сигнала после выписки из трансплантационного центра.

На использование блокаторов пролиферативного сигнала с целью профилактики рецидивов или метастазирования ЗНО возлагали определенные надежды [5] в связи с их способностью подавлять неоангиогенез, но данные литературных источников противоречивы и касаются в основном реципиентов почечных трансплантатов [28–31]. Тем не менее все больные с впервые выявленным ЗНО получали эверолимус в средней суточной дозе 3,5 мг, концентрацию в крови поддерживали на уровне не менее 5–8 нг/мл, увеличение концентрации приводило к развитию серьезных побочных эффектов. Несмотря на его применение, в некоторых случаях отмечалось прогрессирование заболевания, очевидно, связанное с поздней диагностикой ЗНО, возможно, с недостаточной дозой препарата. Вопрос об уменьшении инцидентов ЗНО после ТП на фоне приема эверолимуса в сочетании с низкими дозами такролимуса требует дальнейшего изучения [32].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно данным настоящего анализа, частота ЗНО внепеченочной локализации после ТП значительно выше, чем в популяции в целом. Чтобы снизить частоту развития ЗНО в дальнейшем, следует учитывать факторы риска, проводить скрининг онкопатологии, стремиться к регулярным амбулаторным визитам и полноценному инструментальному обследованию таких больных, при выявлении новообразования все же назначать блокаторы пролиферативного сигнала.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантация печени. Национальные клинические рекомендации. 2016 г. [http://transpl.ru/files/rto/transpl\\_pecheni.pdf](http://transpl.ru/files/rto/transpl_pecheni.pdf). Transplantaciya pecheni. Nacional'nye klinicheskie rekomendacii. 2016 g.
2. Liu ZN, Wang WT, Yan LN. Liver Surgery Group. *De novo* malignancies after liver transplantation with 14 cases at a single center. *Transplant Proc.* 2015; 47 (8): 2483–2487. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.08.008.
3. Pruthi J, Medkiff KA, Esrason KT, Donovan JA, Yoshida EM, Erb SR et al. Analysis of causes of death in liver transplant recipients who survived more than 3 years. *Liver Transpl.* 2001; 7 (9): 811–815. doi: 10.1053/jlts.2001.27084.
4. Fung JJ, Jain A, Kwak EJ, Kusne S, Dvorchik I, Eghtesad B. *De novo* malignancies after liver transplantation: a major cause of late death. *Liver Transpl.* 2001; 7 (11 Suppl 1): 109–118. doi: 10.1053/jlts.2001.28645.
5. Pillai AA. Management of *de novo* malignancies after liver transplantation. *Transplant Rev (Orlando).* 2015; 29 (1): 38–41. doi: 10.1016/j.ttre.2014.11.002.
6. Engels EA, Pfeiffer RM, Fraumeni JF Jr, Kasiske BL, Israni AK, Snyder JJ et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA.* 2011; 306 (17): 1891–1901. doi: 10.1001/jama.2011.1592.
7. Herrero JI. *De novo* malignancies following liver transplantation: impact and recommendations. *Liver Transpl.* 2009; 15, Suppl 2: 90–94. doi: 10.1002/lt.21898.
8. Collett D, Mumford L, Banner NR, Neuberger J, Watson C. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant.* 2010; 10 (8): 1889–1896. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03181.x.
9. Witzig TE, Tobinai K, Rigacci L, Ikeda T, Vanazzi A, Hino M et al. Adjuvant everolimus in high-risk diffuse large B-cell lymphoma: final results from the PILLAR-2 randomized phase III trial. *Ann Oncol.* 2011; 29 (3): 707–714. doi: 10.1093/annonc/mdx764.
10. Herrero JI, Lorenzo M, Quiroga J, Sangro B, Pardo F, Rotellar F et al. *De novo* neoplasia after liver transplantation: an analysis of risk factors and influence on sur-

- vival. *Liver Transpl.* 2005; 11 (1): 89–97. doi: 10.1002/lt.20319.
11. Aberg F, Pukkala E, Hockerstedt K, Sankila R, Isoniemi H. Risk of malignant neoplasms after liver transplantation: a population-based study. *Liver Transpl.* 2008; 14 (10): 1428–1436. doi: 10.1002/lt.21475.
  12. Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation.* 2005; 80 (2 Suppl): 254–264. doi: 10.1097/01.tp.0000186382.81130.ba.
  13. Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl.* 1998; 147–158. PMID: 10503093.
  14. Adami J, Gäbel H, Lindelöf B, Ekström K, Rydh B, Glimelius B et al. Cancer risk following organ transplantation: a nationwide cohort study in Sweden. *Br J Cancer.* 2003; 89 (7): 1221–1227. doi: 10.1038/sj.bjc.6601219.
  15. Saigal S, Norris S, Muiesan P, Rela M, Heaton N, O'Grady J. Evidence of differential risk for posttransplantation malignancy based on pretransplantation cause in patients undergoing liver transplantation. *Liver Transpl.* 2002; 8 (5): 482–487. doi: 10.3748/wjg.v20.i20.617010.
  16. Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Sanchez W, Gores GJ. Long-term probability of and mortality from *de novo* malignancy after liver transplantation. *Gastroenterology.* 2009; 137 (6): 2010–2017. doi: 10.1053/j.gastro.2009.08.070.
  17. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году (ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2019. 236 с. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii v 2018 godu (red. A.D. Kaprina, V.V. Starinskogo, G.V. Petrovoj). М.: MNI OI im. P.A. Gercena – filial FGBU «NMIC radiologii» Minzdrava Rossii, 2019. 236 s.
  18. Xiol X, Guardiola J, Menendez S, Lama C, Figueras J, Marcoval J et al. Risk factors for development of *de novo* neoplasia after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2001; 7 (11): 971–975. doi: 10.4254/wjh.v7.i7.942.
  19. Burra P, Shalaby S, Zanetto A. Long-term care of transplant recipients: *de novo* neoplasms after liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2018; 23 (2): 187–195. doi: 10.1097/MOT.0000000000000499.
  20. Finkenstedt A, Graziadei IW, Oberaigner W, Hilbe W, Nachbaur K, Mark W et al. Extensive surveillance promotes early diagnosis and improved survival of *de novo* malignancies in liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009; 9 (10): 2355–2361. doi: 10.4254/wjh.v8.i12.533.
  21. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21 (2): 137–148. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017.
  22. Egeci T, Unek T, Ozbilgin M, Agalar C, Derici S, Akarsu M et al. *De novo* malignancies after liver transplantation: a single institution experience. *Exp Clin Transplant.* 2019; 17 (1): 74–78. doi: 10.6002/ect.2017.0111.
  23. Hertig A, Zuckermann A. Rabbit antithymocyte globulin induction and risk of posttransplant lymphoproliferative disease in adult and pediatric solid organ transplantation: An update. *Transpl Immunol.* 2015; 32 (3): 179–187. doi: 10.1016/j.trim.2015.04.003.
  24. Allen UD, Preiksaitis JK. Post-transplant lymphoproliferative disorders, Epstein–Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant.* 2019; 23: e13652. doi: 10.1111/ctr.13652. [Epub ahead of print].
  25. Doycheva I, Amer S, Watt KD. *De novo* malignancies after transplantation: risk and surveillance strategies. *Med Clin North Am.* 2016; 100 (3): 551–567. doi: 10.1016/j.mcna.2016.01.006.
  26. Euvrard S, Kaniakakis J. Skin cancers after liver transplantation: what to do? *J Hepatol.* 2006; 44 (1): 27–32. doi: https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.10.010.
  27. Belloni-Fortina A, Piaserico S, Bordignon M, Gambato M, Senzolo M, Russo FP et al. Skin cancer and other cutaneous disorders in liver transplant recipients. *Acta Derm Venereol.* 2012; 92: 411–415. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8753.
  28. Mathew T, Kreis H, Friend P. Two-year incidence of malignancy in sirolimus-treated renal transplant recipients: results from five multicenter studies. *Clin Transplant.* 2004; 18 (4): 446–449. doi: 10.1001/jamadermatol.2015.5548.
  29. Flechner SM, Glyda M, Cockfield S, Grinyó J, Legendre Ch, Russ G et al. The ORION study: comparison of two sirolimus-based regimens versus tacrolimus and mycophenolate mofetil in renal allograft recipients. *Am J Transplant.* 2011; 11 (8): 1633–1644. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03573.x.
  30. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC et al. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2009; 87 (2): 233–242. doi: 10.1186/2047-1440-2-S1-S3.
  31. Alberu J, Pascoe MD, Campistol JM, Schena FP, Rial Mdel C, Polinsky M et al. Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Lower malignancy rates in renal allograft recipients converted to sirolimus-based, calcineurin inhibitor-free immunotherapy: 24-month results from the CONVERT trial. *Transplantation.* 2011; 92 (3): 303–310. doi: 10.1097/TP.0b013e3182247ae2.
  32. De Simone P, Carrai P, Coletti L, Ghinolfi D, Petrucci S, Precisi A et al. Everolimus vs mycophenolate mofetil in combination with tacrolimus: a propensity score-matched analysis in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2018; 50 (10): 3615–3620. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.07.011.

Статья поступила в редакцию 29.08.2019 г.

The article was submitted to the journal on 29.08.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-26-35

## ВЫБЫВАНИЕ ИЗ ЛИСТА ОЖИДАНИЯ КАНДИДАТОВ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ПЕЧЕНИ (ДЕЛИСТИНГ) ВСЛЕДСТВИЕ РЕКОМПЕНСАЦИИ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ – ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ И ПРЕДИКТОРЫ ДЕЛИСТИНГА В ПРОСПЕКТИВНОМ ИССЛЕДОВАНИИ

В.Л. Коробка<sup>1, 2</sup>, В.Д. Пасечников<sup>1, 3</sup>, Е.С. Пак<sup>1, 2</sup>, М.Ю. Кострыкин<sup>1</sup>, А.В. Ткачев<sup>1, 2</sup>, Н.И. Балин<sup>1</sup>, Р.Е. Громыко<sup>1</sup>, Р.В. Коробка<sup>1</sup>, А.М. Шаповалов<sup>1</sup>, А.М. Бабиева<sup>1</sup>, А.В. Микутин<sup>1</sup>, В.С. Агабекян<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГБУ Ростовской области «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация

**Цель.** Определить факторы, предсказывающие развитие рекомпенсации (предикторы) с последующим делистингом, на момент включения пациентов в лист ожидания трансплантации печени. **Материалы и методы.** Проведено проспективное исследование по типу «случай–контроль». В когорту «случай» вошли 19 взрослых пациентов с декомпенсированными заболеваниями печени различной этиологии, включенных в лист ожидания трансплантации печени и в последующем выбывших из него вследствие рекомпенсации. Когорту «контроль» составили пациенты (n = 61) с декомпенсированными заболеваниями печени, включенные в тот же период времени в лист ожидания, умершие в период декомпенсации. **Результаты.** Для определения независимых предикторов делистинга вследствие рекомпенсации использовалась логистическая регрессионная модель. Значимыми предикторами рекомпенсации стали параметры альбумина плазмы крови и лейкоцитов крови при включении в лист ожидания (p = 0,024 и p = 0,019 соответственно). Предсказательная ценность выявленных предикторов была подтверждена с помощью ROC-анализа (Receiver Operating Characteristic). Площадь под ROC-кривой (Area Under Curve – AUC) для концентрации альбумина оказалась равной 0,938 [95% доверительный интервал (ДИ) 0,882–0,995; p < 0,001]. AUC ROC для количества лейкоцитов оказалась равной 0,924 [95% ДИ 0,865–0,982; p < 0,001]. Отношение шансов для исхода рекомпенсации, при условии если количество лейкоцитов при включении в лист ожидания  $\geq 3,1 \times 10^9/\text{л}$ , оказалось равным 14,639 (95% ДИ 2,16–99,12). Отношение шансов для исхода рекомпенсации, при условии если концентрация альбумина плазмы крови при включении в лист ожидания  $\geq 39,1$  г/л, оказалось равным 3,06 (95% ДИ 1,58–5,95). **Заключение.** Исследование показало возможность обратимости повреждений печени после прекращения действия факторов, вызывающих ее декомпенсацию. Независимыми предикторами развития рекомпенсации и последующего делистинга пациентов оказались количество лейкоцитов крови  $\geq 3,1 \times 10^9/\text{л}$  и концентрация альбумина плазмы крови  $\geq 39,1$  г/л на момент включения пациентов в лист ожидания трансплантации печени.

*Ключевые слова:* лист ожидания трансплантации печени, делистинг вследствие рекомпенсации функции печени, предикторы делистинга.

**Для корреспонденции:** Пасечников Виктор Дмитриевич. Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Авиационная, 21. Тел. (9624) 47-75-13. E-mail: pasetchnikov@mail.ru

**For correspondence:** Pasetchnikov Victor Dmitrievich. Address: 21, Aviationsnaya str., Stavropol, 355017, Russian Federation. Tel. (9624) 47-75-13. E-mail: pasetchnikov@mail.ru

# LIVER TRANSPLANT CANDIDATES DELISTING DUE TO RECOMPENSATION OF CHRONIC LIVER DISEASES – CANDIDATES CHARACTERISTICS WITH DELISTING PREDICTORS: A PROSPECTIVE STUDY

V.L. Korobka<sup>1, 2</sup>, V.D. Pasechnikov<sup>1, 3</sup>, E.S. Pak<sup>1, 2</sup>, M.Yu. Kostykin<sup>1</sup>, A.V. Tkachev<sup>1, 2</sup>, N.I. Balin<sup>1</sup>, R.E. Gromyko<sup>1</sup>, R.V. Korobka<sup>1</sup>, A.M. Shapovalov<sup>1</sup>, A.M. Babieva<sup>1</sup>, A.B. Mikutin<sup>1</sup>, V.S. Agabekyan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Rostov Regional Clinical Hospital, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>2</sup> Rostov State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Rostov-on-Don, Russian Federation

<sup>3</sup> Stavropol State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Stavropol, Russian Federation

**Aim:** to identify, at the listing stage, the predictive factors, which could be associated with recompensation followed by patient's delisting. **Materials and methods.** We performed a prospective case-control study. The «case» cohort included nineteen adult patients who initially were wait-listed for decompensated chronic liver disease, but later were delisted due to recompensation. Sixty one patients who were listed during the same period for decompensation and died on waiting list were chosen as controls. **Results.** A logistic regression model was used to determine independent predictive factors with delisting following recompensation. Plasma albumin concentration and blood leukocyte count at listing have become significant predictors of recompensation ( $p = 0.024$  and  $p = 0.019$ , respectively). ROC (Receiver Operating Characteristic) curve analysis was performed to compare the predictability of blood leukocyte count and plasma albumin concentration. Area under the curve (AUC) for plasma albumin concentration was 0.938 [95% confidence interval (CI) 0.882–0.995,  $p < 0.001$ ]. AUC for the blood leukocyte count was 0.924 [95% CI 0.865–0.982,  $p < 0.001$ ]. The odds ratio for the recompensation outcome, if the blood leukocyte count at listing was  $\geq 3.1 \times 10^9/L$ , was 14.639 (95% CI 2.16–99.12). The odds ratio for the recompensation outcome, if the plasma albumin concentration at listing was  $\geq 39.1$  g/L, was 3.06 (95% CI 1.58–5.95). **Conclusion.** The study showed the likelihood of reversibility of liver damage after the cessation of the factors causing its decompensation. Independent predictors of recompensation and subsequent delisting of patients were the blood leukocyte count of  $\geq 3.1 \times 10^9/L$  and the concentration of albumin in the blood plasma of  $\geq 39.1$  g/L at the time of listing.

*Key words:* waiting list for liver transplantation, delisting due to recompensation of liver function, predictors of delisting.

## ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени (ТП) является единственным методом, обуславливающим повышение выживаемости пациентов с терминальной стадией заболевания печени, в тех случаях, когда все остальные методы лечения являются безуспешными [1, 2]. Успех ТП обусловлен отсутствием альтернативной терапии и хорошими показателями выживаемости пациентов в посттрансплантационном периоде (90 и 80% в первый год и в течение 5 лет соответственно) [3]. Важной составляющей частью процедуры ТП является отбор больных с включением их в лист ожидания (ЛО). После включения кандидатов на ТП в ЛО специалистами проводится мониторинг соматического статуса и динамический клинико-лабораторный контроль, осуществляется патогенетическая и/или симптоматическая терапия, а в случае развития угрожающих жизни осложнений – хирургическое лечение [3, 4]. Лист ожидания ТП может включать

три основных типа пациентов [1, 2]. Первую группу больных составляют пациенты с острой печеночной недостаточностью, включающиеся в большинстве европейских центров в так называемый сверхнеотложный лист ожидания ТП. Эти пациенты имеют приоритет над всеми остальными реципиентами печени, и получают трансплантат в течение нескольких часов или дней [5]. Вторую группу пациентов, включенных в лист ожидания ТП, составляют больные с декомпенсированным циррозом печени (ЦП). Сроки проведения ТП определяются показателем индекса MELD (Model for End Stage Liver Diseases). Приоритет получают пациенты с очень высоким индексом MELD, у которых сроки ТП исчисляются от нескольких дней до нескольких недель. Сроки проведения ТП пациентам со средней выраженностью или низким уровнем индекса MELD варьируют от нескольких месяцев до нескольких лет (1). Третью группу пациентов, находящихся в листе ожидания

печени, составляют пациенты с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) на фоне компенсированного ЦП.

Дефицит донорских органов является лимитирующим фактором развития ТП в различных странах, и в мире в целом [6], что, в свою очередь, способствует смертности пациентов, находящихся в ЛО, или критическому ухудшению функции печени, что предопределяет негативные последствия как в периоперационном периоде, так и в отдаленные сроки [7].

Тем не менее улучшение функции печени и развитие рекомпенсации происходит время от времени в повседневной клинической практике, даже в среде больных, включенных в ЛО [8]. В частности, изменение парадигмы декомпенсации печени и развитие рекомпенсации стало возможным после внедрения в клиническую практику современных противовирусных средств. Использование препаратов с прямым противовирусным действием (ППВД) у пациентов с HCV-циррозом, ожидающих ТП, показало значительное клиническое улучшение, обусловившее делистинг [9–11]. Анализ больных с алкогольной болезнью печени (АБП), включенных в ЛО, позволил выделить предикторы рекомпенсации. Так, показатели MELD  $<20$  и сывороточного альбумина  $\geq 32$  г/л при включении в ЛО являются предикторами развития рекомпенсации больных АБП и их последующего делистинга [12].

В этой связи целью работы стало определение факторов, предсказывающих развитие рекомпенсации (предикторов) с последующим делистингом, при включении пациентов в лист ожидания трансплантации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период с 2015-го по 2019 г. в ЛО включены 198 пациентов – кандидатов на ТП. Из этого количества 39 пациентам выполнена ортотопическая ТП (ОТП). Нами проведен анализ данных, полученных в ходе проспективного исследования 80 пациентов – кандидатов на ТП, наблюдавшихся в Центре хирургии и координации донорства Ростовской областной клинической больницы. Исследование проводилось по типу «случай–контроль». В когорту «случай» вошли 19 взрослых пациентов с декомпенсированными заболеваниями печени различной этиологии, включенных в ЛО и в последующем выбывших из него вследствие рекомпенсации. Когорту «контроль» составили пациенты ( $n = 61$ ) с декомпенсированными заболеваниями печени, включенные в тот же период времени в ЛО, умершие в период декомпенсации. Критерии исключения из исследования: выраженная легочно-сердечная патология; продолжение приема алкоголя на момент исследования; гепатоцеллюлярная карцинома; пациенты, включенные в ЛО вследствие декомпенсации и подвергшиеся делистингу вследствие причин, иных, чем рекомпенсация;

пациенты, включенные в ЛО по причинам, иным, чем декомпенсация (рецидивирующий холангит при первичном склерозирующем холангите); пациенты, включенные в ЛО по поводу распространенного тромбоза воротной вены и ее магистральных притоков, синдрома Бадда–Хиари, синдрома синусоидальной обструкции, поликистоза печени, амилоидоза; пациенты, включенные в ЛО для ретрансплантации, или с предшествующими трансплантациями других органов; пациенты с острой печеночной недостаточностью.

Демографические и клинические данные были получены из непрерывно обновляющейся электронной базы данных Центра хирургии и координации донорства Ростовской областной клинической больницы.

При включении в ЛО, а также у всех пациентов при развитии рекомпенсации рассчитывались оригинальный и усовершенствованный индексы: MELD [13, 14] и MELD-Na [15] и индекс коморбидности Charlson [16].

Исследование было одобрено Этическим комитетом при Ростовской областной клинической больнице. Первичной конечной точкой исследования стала идентификация факторов при включении в ЛО, которые ассоциировались с последующим делистингом пациентов вследствие рекомпенсации, т. е. определение предикторов возможной рекомпенсации.

Основанием для включения в ЛО пациентов с декомпенсацией функции печени являлись: безуспешность всех предшествующих терапевтических мероприятий, развитие асцита или печеночного гидроторакса, указание на купирование антибиотиками спонтанного бактериального перитонита, наличие желтухи, наличие печеночной энцефалопатии (ПЭ) и/или варикозных кровотечений ЖКТ, индекс MELD  $\geq 16$ . У всех больных с АБП, включенных в ЛО, абстиненция сохранялась как минимум в течение 3 месяцев, что подтверждалось заключениями наркологов и психиатров.

Клинический диагноз рекомпенсации больных, включенных в ЛО вследствие декомпенсации функции печени, основывался на отсутствии асцита, «печеночного» гидроторакса, периферических отеков, несмотря на прекращение приема диуретиков, отсутствие печеночной энцефалопатии и необходимости ее профилактической терапии, снижение индекса MELD  $<15$ . Все пациенты, достигшие рекомпенсации, наблюдались в течение 6 месяцев для подтверждения устойчивого «статуса рекомпенсации», который подтверждался осмотрами специалистов с последующим принятием решения о делистинге.

Всем больным, включенным в ЛО, проводились клинические исследования крови и мочи, биохимические исследования, исследования параметров гемостаза. Проводился скрининг и диагностика HBV- и

НСV-инфекции. Больным выполняли эластографию и биопсию печени. У части больных выполнялся анализ асцитической жидкости.

Больным обеих когорт с НCV- и HBV-инфекцией проводилась противовирусная терапия, включающая препараты прямого противовирусного действия (НСV) и нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (HBV). У больных с аутоиммунными заболеваниями терапия включала иммуносупрессанты, глюкокортикостероиды. Всем больным проводилась патогенетическая терапия неселективными  $\beta$ -блокаторами, мочегонными средствами. Больным с ПЭ назначались внутривенные введения L-орнитин-L-аспартата, в комбинации с пероральным приемом лактулозы и рифаксимины. У части больных использовалась экстракорпоральная гемокоррекция (плазмасорбция и продленная вено-венозная гемодиализация).

У части пациентов обеих когорт по поводу рецидивных варикозных кровотечений проводились операции: трансъюгулярное портосистемное шунтирование (TIPS) и азиго-портальное разобщение (АПР, патент РФ № 2412657) по оригинальной методике [17].

Статистический анализ данных был проведен с использованием программы IBM SPSS Statistics версия 21. Для проверки нормальности распределения полученных данных использовался критерий Колмогорова–Смирнова. Данные выборок с нормальным распределением представлены средними арифметическими величинами (M) и стандартным отклонением (SD, standard deviation) с определением 95% доверительного интервала (ДИ). Статистическая значимость различий между сравниваемыми параметрами в случае нормального распределения определялась по t-критерию Стьюдента. В случае отсутствия нормального распределения данных использовали непараметрические критерии: Уилкоксона для парных сравнений зависимых переменных, Манна–Уитни (U-критерий), Хи-квадрат Пирсона – для сравнения независимых переменных. Количественные показатели в выборках с распределением, отличным от нормального, представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (интервал между 25-м и 75-м процентилями). Для качественных данных рассчитывали частоты и доли (%). Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при условии вероятности ошибки менее 0,05 ( $p < 0,05$ ). Для определения предикторов рекомпенсации использовали регрессионный анализ (логистическую регрессию). Рассчитывали отношение шансов для значимых предикторов исхода рекомпенсации с определением 95% ДИ. Для оценки качества построенных регрессионных моделей (предсказательная способность модели) строили ROC-кривые (Receiver Operating Characteristic

и вычисляли площадь под кривой AUC (Area Under Curve). В качестве нулевой гипотезы принималось утверждение, что AUC ROC не отличается от величины 0,5 [18]. Для оценки выживаемости использовался метод Каплана–Мейера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика больных в группе «случай» (рекомпенсация)

Группу пациентов с рекомпенсацией составили 10 мужчин (52,63%) и 9 женщин (47,37%) со средним возрастом на момент включения в ЛО –  $48,4 \pm 10,3$  года. ИМТ при включении в ЛО составил  $25,5 \pm 3,3$  кг/м<sup>2</sup>. Среднее пребывание в ЛО составило  $31,7 \pm 12,1$  дня. Индекс MELD-Na на момент включения больных в ЛО в 21,1% случаев был менее 20 пунктов, в 63,2% случаев равнялся 20 пунктам, и в 15,7% случаев – от 21 до 30 пунктов. Гепаторенальный синдром (ГРС) диагностирован у 21,05% пациентов. Диагноз явной ПЭ установлен в 84,21% случаев, скрытой ПЭ – в 15,69% случаев. По этиологии больные с терминальной стадией заболевания печени распределились следующим образом: ЦП в исходе хронического гепатита С – 9 пациентов (47,37%), ЦП в исходе АБП – 5 пациентов (26,33%), первичный билиарный цирроз (ПБЦ) – 1 пациент (5,26%), перекрест ПБЦ и аутоиммунного гепатита (АИГ) – 1 пациент (5,26%), криптогенный ЦП – 3 больных (15,79%). У 11 больных ЦП (57,89%) установлен класс С, а у 8 больных (42,11) – класс В по классификации Чайлда–Пью. Индекс коморбидности Charlson составил  $9,05 \pm 2,48$  пункта.

В 57,9% случаев больным этой группы проводилась этиологическая терапия, в 89,5% случаев больные получали неселективные  $\beta$ -адреноблокаторы, в 100% случаев пациенты получали мочегонные средства и терапию ПЭ (внутривенные введения L-орнитин-L-аспартата, в комбинации с пероральным приемом лактулозы и рифаксимины). В дополнение к медикаментозной терапии пациентам проведено азиго-портальное разобщение по оригинальной методике в 31,6% случаев, однократное эндоскопическое лигирование вен пищевода – в 10,5% случаев, и экстракорпоральная гемокоррекция (комбинация методов плазмасорбции и продленной вено-венозной гемодиализации) – в 5,3% случаев.

### Характеристика больных в группе «контроль» (смертельный исход при развитии декомпенсации функции печени)

Группу пациентов со смертельным исходом составили 36 мужчин (59,02%) и 25 женщин (41,98%) со средним возрастом на момент включения в ЛО –  $48,2 \pm 11,3$  года. ИМТ при включении в ЛО составил

25,3 ± 6,6 кг/м<sup>2</sup>. Среднее пребывание в ЛО – 9,8 ± 8,4 дня. Индекс MELD-Na <18 на момент включения больных в ЛО был в 3,3% случаев, MELD-Na 19–25 – в 42,6% случаев, MELD-Na 26–35 – в 34,4% случаев, MELD-Na >35 – в 19,7%. Гепаторенальный синдром (ГРС) диагностирован у 65,6% пациентов. Диагноз явной ПЭ установлен в 95,1% случаев, скрытой ПЭ – в 4,9% случаев. По этиологии больные с терминальной стадией заболевания печени распределились следующим образом: ЦП в исходе хронического гепатита В – 2 пациента (3,3%), ЦП в исходе хронического гепатита В+D – 2 пациента (3,3%), ЦП в исходе хронического гепатита С – 17 пациентов (27,8%), ЦП в исходе АБП – 16 пациентов (26,2%), первичный билиарный цирроз (ПБЦ) – 5 пациентов (8,2%), АИГ – 2 пациента (3,3%), первичный склерозирующий холангит – 5 пациентов (8,2%), криптогенный ЦП – 9 больных (14,7%). У 60 больных с ЦП (98,4%) установлен класс С, а у 1 больного (1,6%) – класс В по классификации Чайлда–Пью. Индекс коморбидности Charlson составил 9,11 ± 2,66 пункта.

В 31,2% случаев больным этой группы проводилась этиологическая терапия, в 91,9% случаев больные получали неселективные β-адреноблокаторы, в 100% случаев пациенты получали мочегонные средства и терапию ПЭ (внутривенные введения L-орнитин-L-аспартата, в комбинации с пероральным приемом лактулозы и рифаксимины). В дополнение к медикаментозной терапии пациентам проведено азиго-портальное разобщение по оригинальной методике в 4,92% случаев, TIPS – в 4,92%, однократное эндоскопическое лигирование вен пищевода – в 13,11% случаев. Лапароцентез выполнялся 30 пациентам (49,18% случаев).

### Сравнение показателей в группах «случай» и «контроль»

При проверке распределения полученных данных с использованием критерия Колмогорова–Смирнова нормальному распределению соответствовали

показатели возраста пациентов, количества лейкоцитов и тромбоцитов на момент включения в ЛО, концентрация альбумина на момент включения в ЛО, индексы MELD, MELD-Na, Charlson, которые анализировались с помощью параметрической статистики. Все остальные показатели (степень ПЭ, активность щелочной фосфатазы, концентрации Na, креатинина и билирубина на момент включения в ЛО, МНО и ИМТ на момент включения в ЛО) не соответствовали нормальному распределению, для их анализа использовались непараметрические методы статистики (критерий Манна–Уитни – U-критерий, Хи-квадрат).

В табл. 1 и 2 представлены данные демографических, клинических, лабораторных показателей, индексов (ИМТ, коморбидности, MELD, MELD-Na) в группах больных с рекомпенсацией (n = 19) и умерших в период пребывания в ЛО (n = 61).

Показатели пациентов с исходами (рекомпенсация/смертный исход) были подвергнуты регрессионному анализу (логистическая регрессия). Значимыми предикторами рекомпенсации стали параметры альбумина плазмы крови и лейкоцитов крови при включении в ЛО (p = 0,024 и p = 0,019 соответственно).

Отношение шансов (ОШ) для исхода рекомпенсации (делистинг) при условии, если количество лейкоцитов при включении в ЛО  $\geq 3,1 \times 10^9/\text{л}$ , оказалось равным 14,639; 95% ДИ 2,16–99,12. ОШ для исхода рекомпенсация (делистинг) при условии, если концентрация альбумина плазмы крови при включении в ЛО  $\geq 39,1$  г/л, оказалось равным 3,06 (95% ДИ 1,58–5,95).

Были рассчитаны AUC для показателей концентрации альбумина и количества лейкоцитов при включении пациентов в ЛО, построены кривые ROC для этих показателей (рис. 1). AUC ROC для концентрации альбумина оказалась равной 0,938 [95% ДИ 0,882–0,995; p < 0,001]. AUC ROC для количества лейкоцитов оказалась равной 0,924 [95% ДИ 0,865–0,982; p < 0,001].

Проведен анализ развития рекомпенсации пациентов с использованием метода Каплана–Мейера.

Таблица 1

### Сравнительная характеристика показателей пациентов с рекомпенсацией (делистинг) и умерших в период пребывания в ЛО (нормальное распределение)

#### Comparative characteristics of parameters of patients with recompensation (delisting) and deaths in the period of stay on the waiting list – listing (normal distribution)

Показатель	Рекомпенсация (n = 19) M ± SD	Умершие (n = 61) M ± SD	p value
Возраст	48,42 ± 10,32	48,23 ± 11,26	0,57
Лейкоциты на момент включения в ЛО, $\times 10^9/\text{л}$	3,66 ± 0,38	2,55 ± 0,68	0,026
Тромбоциты на момент включения в ЛО, $\times 10^9/\text{л}$	84,37 ± 31,31	53,02 ± 33,37	0,912
Альбумин плазмы на момент включения в ЛО, г/л	39,21 ± 3,36	27,74 ± 6,33	0,015
MELD на момент включения в ЛО	15,73 ± 3,56	25,12 ± 8,43	<0,001
MELD-Na на момент включения в ЛО	15,77 ± 3,55	25,45 ± 8,44	<0,001
Индекс Charlson на момент включения в ЛО	9,05 ± 2,48	9,11 ± 2,67	0,864

Таблица 2

**Сравнительная характеристика показателей пациентов с рекомпенсацией (делистинг) и умерших в период пребывания в ЛО (отсутствие нормального распределения полученных результатов)**

**Comparative characteristics of parameters of patients with recompensation (delisting) and deaths in the period of stay on the waiting list – listing (lack of normal distribution)**

Показатель	Рекомпенсация (n = 19) Медиана (25-й – 75-й процентиль) или количество (%)	Умершие (n = 61) Медиана (25-й – 75-й процентиль) или количество (%)	p value
Мужской пол	10 (52,6%)	36 (59%)	0,623
Степень ПЭ	2 (2-2)	3 (2-3)	<0,001
Щелочная фосфатаза на момент включения в ЛО, ед/л	265,0 (180,0–300,0)	389,0 (296,5–500,5)	0,001
Na на момент включения в ЛО, ммоль/л	139,0 (138,0–141,0)	136,0 (135,5–138,5)	0,001
МНО на момент включения в ЛО	1,4 (1,3–1,5)	1,8 (1,6–2,35)	<0,001
Креатинин на момент включения в ЛО, мкмоль/л	114,0 (86,0–120,0)	148,0 (111,5–202,5)	<0,001
Билирубин на момент включения в ЛО, мкмоль/л	49,0 (38,0–72,0)	82,0 (55,0–142,5)	0,001
ИМТ на момент включения в ЛО, кг/м <sup>2</sup>	24,8 (23,6–28,3)	24,5 (20,6–27,9)	0,459

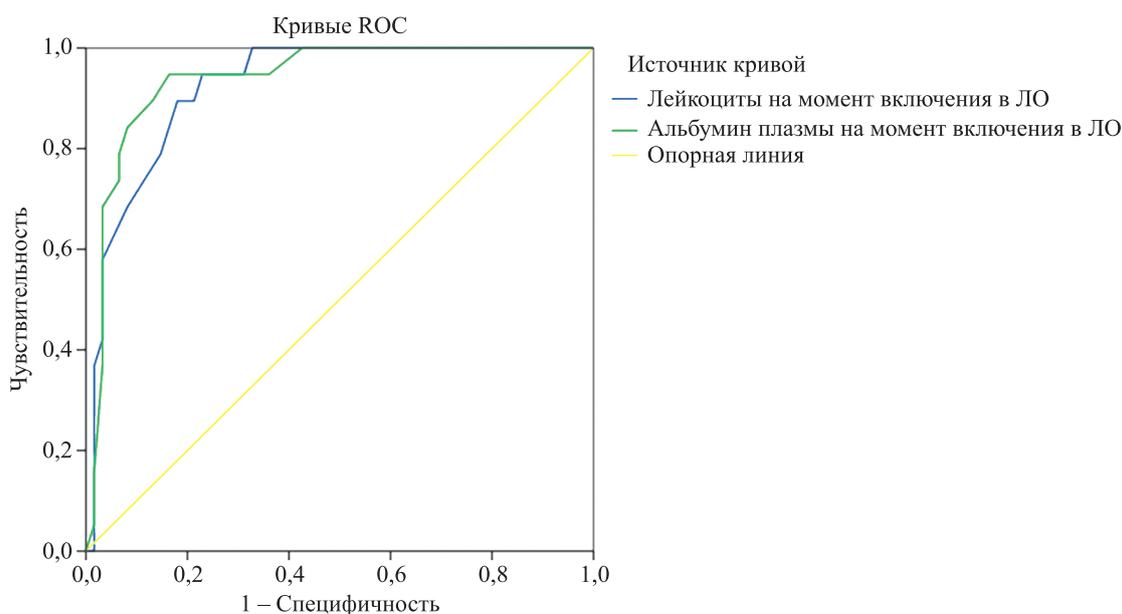


Рис. 1. ROC-кривая для уровней лейкоцитов и альбумина в крови у пациентов на момент включения в лист ожидания как предикторов развития рекомпенсации

Fig. 1. ROC curve for leukocyte and albumin levels in the blood of patients at the time of inclusion on the waiting list as predictors of the development of recompensation

Функция дожития по созданной модели отождествлялась с развитием рекомпенсации в определенные сроки для конкретных пациентов. На рис. 2 показано время ожидания развития рекомпенсации для пациентов (период от включения в ЛО до развития рекомпенсации и делистинга).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Нами показано, что группе больных с развившейся рекомпенсацией функции печени на момент

включения пациентов в ЛО показатели количества лейкоцитов, концентрации альбумина в плазме крови, Na в крови оказались значительно выше, чем в группе умерших пациентов с декомпенсацией. Показатели МНО, степени ПЭ, щелочной фосфатазы, креатинина, билирубина, индексов MELD и MELD-Na в группе больных с рекомпенсацией на момент включения больных в ЛО также были значительно ниже аналогичных показателей в группе умерших больных в стадии декомпенсации.

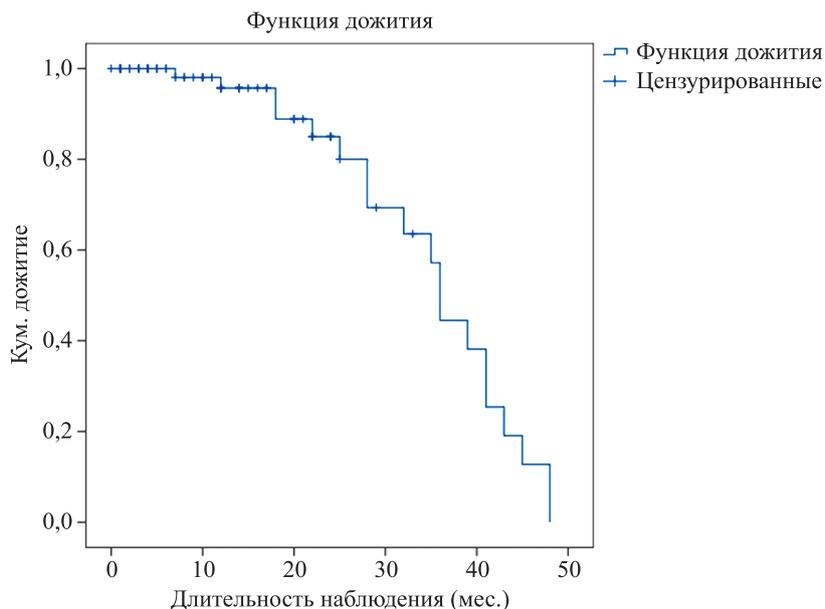


Рис. 2. Время ожидания развития рекомпенсации (функция дожития) в анализе выживаемости Каплана–Мейера

Fig. 2. The waiting time for the development of recompensation (survival function) in the analysis of the survival rate of Kaplan–Meier

Развитие рекомпенсации у больных с ЦП различной этиологии связывают с рядом вероятных факторов. Доказано снижение уровня фиброза и портальной гипертензии после успешного проведения противовирусной терапии HCV-ассоциированного ЦП [18–21]. В частности, установлено значимое снижение градиента HPVG (hepatic venous pressure gradient) после достижения устойчивого вирусологического ответа в результате проведения противовирусной терапии HCV у больных с декомпенсированным ЦП и портальной гипертензией [20, 21]. В многоцентровом Европейском исследовании было показано, что рекомпенсация вследствие противовирусной терапии обусловила делистинг пациентов (19,2% случаев), которые ранее были включены в ЛО по причине декомпенсированного ЦП в исходе хронического гепатита С [22]. Авторы сделали важный вывод, что лечение больных, включенных в ЛО, прямыми противовирусными средствами до проведения трансплантации, обуславливая рекомпенсацию и делистинг, позволяет значимо снизить количество ТП, что немаловажно в условиях дефицита органа и высокой распространенности HCV-ассоциированных заболеваний печени.

В другом исследовании показано, что в 30,9% случаев у больных с успешной противовирусной терапией HCV-ассоциированного декомпенсированного ЦП развивается рекомпенсация с последующим делистингом [23]. Однако через 2 года после делистинга 4 пациента повторно включены в ЛО (релистинг). В одном случае у больного развилась ГЦК, в трех – произошло развитие асцита.

В результате проведения противовирусной терапии у больных HBV-инфекцией был продемонстрирован потенциал для обратного развития не только компенсированного, но и декомпенсированного ЦП [24–26]. Jang et al. [27] установлено, что противовирусная терапия кандидатов на ТП с HBV-ассоциированным декомпенсированным ЦП обусловила рекомпенсацию с последующим делистингом примерно у трети пациентов.

Пациенты – кандидаты на ТП с ЦП, обусловленным развитием ожирения и прогрессии неалкогольного стеатогепатита (НАСГ), подверглись бариатрической хирургии [28]. У 33,3% пациентов развилась регрессия заболевания с последующим делистингом. Однако в последующем, при увеличении длительности наблюдения до 7 лет, авторы отметили развитие саркопении и малнутриции в 71,4% случаев у пациентов с делистингом.

Aravinthan et al. [12] установлено, что из 77 пациентов – кандидатов на ТП, у которых развилась рекомпенсация с последующим делистингом, в 61% случаев была АБП, в 16% случаев – HCV-ассоциированный ЦП, в 5% случаев АБП / HCV-ассоциированный ЦП. У остальных пациентов рекомпенсация с последующим делистингом в 4% случаев была ассоциирована с HBV-индуцированным ЦП, в 5% случаев – с АИГ, в 4% случаев – с НАСГ, в 1% случаев – с ПСХ, в 1% случаев – с криптогенным ЦП, в 3% случаев – с саркоидозом. В качестве вероятных факторов, обусловивших развитие рекомпенсации пациентов, авторы этого исследования называют

наложение TIPS, противовирусную терапию HCV и HBV-инфекции, лечение АИГ азатиоприном [12].

В нашем исследовании вероятными факторами развития рекомпенсации с последующим делистингом пациентов является успешная противовирусная терапия HCV-ассоциированного ЦП, терапия иммуносупрессантами аутоиммунных заболеваний печени, терапия ПЭ, назначение мочегонных средств и неселективных  $\beta$ -блокаторов. К вероятным факторам следует также отнести наложение TIPS, проведение азигопортального разобщения по оригинальной методике, эндоскопического лигирования вен пищевода.

С помощью логистической регрессии нами установлено, что количество лейкоцитов и концентрация альбумина при включении пациентов в ЛО являются независимыми предикторами рекомпенсации заболевания и делистинга пациентов. Данная модель обладает высокой предсказательной способностью, чувствительностью и специфичностью, о чем свидетельствовали показатели AUC для обеих независимых переменных (0,924 и 0,938 соответственно) и ROC-кривые.

Можно предположить, что снижение количества лейкоцитов у больных ЦП связано с портальной гипертензией. Так, увеличение селезенки у больных ЦП часто сопровождается развитием гиперспленизма – основной причины цитопении и тромбоцитопении [29]. Точные эффекторные механизмы, ассоциируемые со спленомегалией и гиперспленизмом, остаются неясными. Тем не менее в качестве наиболее вероятных причин этих феноменов называют нарушение гемодинамики вследствие портальной гипертензии, повреждение ткани селезенки и высвобождение сигнальных молекул, индуцированных воспалением [30, 31]. Развитие рекомпенсации, как показывают наши данные, ассоциируется со значимым различием между концентрацией лейкоцитов в сравниваемых группах при включении пациентов в ЛО, что, вероятно, отражает меньшую выраженность гиперспленизма, и соответственно – портальной гипертензии. Это предположение подтверждается расчетом ОШ, показавшим, что у больных с количеством лейкоцитов  $\geq 3,1 \times 10^9/\text{л}$  на момент включения пациентов в ЛО вероятность развития рекомпенсации (делистинга) увеличивается в 14,639 раза.

По нашим данным, вторым независимым предиктором развития рекомпенсации с последующим делистингом стала концентрация альбумина в плазме крови на момент включения пациентов в ЛО. Belli et al. [22] в многоцентровом Европейском исследовании установлено, что предикторами рекомпенсации пациентов с HCV-ассоциированным ЦП вследствие успешной противовирусной терапии стали индекс MELD и концентрация альбумина в сыворотке крови на момент включения пациентов

в ЛО. Aravinthan et al. [12] показали, что у больных с АБП (декомпенсированным ЦП) оба эти показателя на момент включения пациентов в ЛО оказались независимыми предикторами развития рекомпенсации и последующего делистинга.

Гипоальбуминемия является независимым фактором риска для смертности пациентов как маркер мальнутриции [32–34], а увеличение концентрации альбумина в плазме крови – предиктором рекомпенсации пациентов [12, 22]. Мы показали, рассчитав ОШ, что у больных с концентрацией альбумина  $\geq 39,1$  г/л на момент включения пациентов в ЛО вероятность развития рекомпенсации (делистинга) увеличивается в 3,06 раза.

Мы установили, что на момент включения пациентов в ЛО показатели MELD и MELD-Na были значительно ниже в группе больных с наступившей рекомпенсацией, чем в группе пациентов, умерших по причине декомпенсации. Низкие показатели MELD при включении пациентов в ЛО увеличивали вероятность развития рекомпенсации, а высокие показатели MELD, напротив, были негативными предикторами для больных с декомпенсированным HCV-циррозом, получавших противовирусную терапию, и декомпенсированным ЦП алкогольной этиологии [12, 22].

Рекомпенсация больных с декомпенсированными заболеваниями является клиническим заключением, не соответствующим понятию «выздоровление». Существуют различные точки зрения специалистов на дефиниции этого состояния: «рекомпенсация», «доступ к трансплантации», «избегание дополнительных осложнений» и др. [36]. Регрессия фиброза после элиминации вируса HCV является длительным, но возможным доказанным процессом [37, 38]. Однако, несмотря на эрадикацию вируса HCV, фиброз может не только не регрессировать, но и прогрессировать. Возможно, это связано с тем обстоятельством, что весьма трудно найти грань между «точками возврата и невозврата», особенно если принять во внимание тот факт, что элиминация факторов повреждения печени (эрадикация вируса HCV, абстиненция в случае АБП) не приводят к нормализации изменений сосудистой сети у больных ЦП [36].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование показало, что обратимость повреждений печени (рекомпенсация) после прекращения действия факторов, вызывающих ее декомпенсацию, является вероятным процессом. Следует подчеркнуть, что понятие «рекомпенсация» является клиническим заключением, не являющимся синонимом понятия «выздоровление», требующим от врача постоянного наблюдения за пациентами и принятия решения (повторное включение в ЛО – релистинг) в случае ухудшения состояния. Кажется возможным существование «критической точки не-

возврата», после прохождения которой декомпенсация функции печени становится необратимой. При включении в ЛО кандидатов на ТП независимыми предикторами развития рекомпенсации печени и последующего делистинга пациентов являются количество лейкоцитов крови  $\geq 3,1 \times 10^9/\text{л}$  и концентрация альбумина плазмы крови  $\geq 39,1$  г/л.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Samuel D, Coilly A. Management of patients with liver diseases on the waiting list for transplantation: a major impact to the success of liver transplantation. *BMC Med.* 2018; 16: 113.
2. EASL clinical practice guidelines: liver transplantation. *J Hepatol.* 2016; 64: 433–485.
3. Adam R, Karam V, Cailliez V et al. Annual Report of the European Liver Transplant Registry (ELTR) – 50-year evolution of liver transplantation. *Transpl Int.* 2018; 31: 1293–1317.
4. Adam R, Karam V, Delvart V et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol.* 2012; 57: 675–688.
5. Clinical Practice EASL Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol.* 2017; 66: 1047–1081.
6. Toniutto P, Zanetto A, Ferrarese A et al. Current challenges and future directions for liver transplantation. *Liver Int.* 2017; 37: 317–327.
7. Koch DG, Tillman H, Durkalski V et al. Development of a Model to Predict Transplant-free Survival of Patients With Acute Liver Failure. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2016; 14: 1199–1206.
8. Mustian MN, Shelton BA, MacLennan PA et al. Ethnic and Age Disparities in Outcomes Among Liver Transplant Waitlist Candidates. *Transplantation.* 2019; 103: 1425–1432.
9. Bonacci M, Londono MC, Esfuerzo N et al. Antiviral treatment with sofosbuvir and simeprevir in a kidney transplant recipient with HCV-decompensated cirrhosis: viral eradication and removal from the liver transplant waiting list. *Transpl Int.* 2015; 28: 1345–1349.
10. Ruiz I, Feray C, Pawlotsky JM, Hezode C. Patient with decompensated hepatitis C virus-related cirrhosis delisted for liver transplantation after successful sofosbuvir-based treatment. *Liver Transplant.* 2015; 21: 408–409.
11. Belli LS, Berenguer M, Cortesi PA et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. *J Hepatol.* 2016; 65: 524–531.
12. Aravinthan AD, Barbas AS, Doyle AC et al. Characteristics of liver transplant candidates delisted following recompensation and predictors of such delisting in alcohol-related liver disease: a case-control study. *Transpl Int.* 2017; 30: 1140–1149.
13. Wiesner R, Edwards E, Freeman R et al. United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology.* 2003; 124: 91–96.
14. Wiesner R, Lake JR, Freeman RB, Gish RG. Model for end-stage liver disease (MELD) exception guidelines. *Liver Transpl.* 2006; 12 (12 Suppl 3): S85–877.
15. Leise MD, Kim WR, Kremers WK, Larson JJ et al. A revised model for end-stage liver disease optimizes prediction of mortality among patients awaiting liver transplantation. *Gastroenterology.* 2011; 140: 1952–1960.
16. Volk ML, Hernandez JC, Lok AS, Marrero JA. Modified Charlson comorbidity index for predicting survival after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007; 13: 1515–1520.
17. Коробка ВЛ, Шаповалов АМ, Данильчук ОЯ, Коробка РВ. Способ хирургического лечения и профилактики рецидива кровотечений при варикозном расширении вен пищевода и кардиального отдела желудка. Патент РФ № 2412657. *Korobka VL, Shapovalov AM, Danil'chuk OYa, Korobka RV. Sposob khirurgicheskogo lecheniya i profilaktiki retsidiva krovotечений pri varikoznom rasshirenii ven pishchevoda i kardial'nogo otдела zheludka. Patent RF № 2412657. <http://www.freepatent.ru/images/patents/48/2412657/patent-2412657.pdf>.*
18. George SL, Bacon BR, Brunt EM et al. Clinical, virologic, histologic, and biochemical outcomes after successful HCV therapy: a 5-year follow-up of 150 patients. *Hepatology.* 2009; 49: 729–738.
19. Mallet V, Gilgenkrantz H, Serpaggi J et al. Brief communication: the relationship of regression of cirrhosis to outcome in chronic hepatitis C. *Ann Intern Med.* 2008; 149: 399–403.
20. Roberts S, Gordon A, McLean C et al. Effect of sustained viral response on hepatic venous pressure gradient in hepatitis C-related cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007; 5: 932–937.
21. Afdhal N, Everson GT, Calleja JL et al. Effect of Long-Term Viral Suppression With Sofosbuvir + Ribavirin on Hepatic Venous Pressure Gradient in HCV-Infected Patients With Cirrhosis and Portal Hypertension. 2015 International Liver Congress: 50th Annual Meeting of the European Association of the Study of the Liver (EASL) 2015; Abstract LP13.
22. Belli LS, Berenguer M, Cortesi PA et al. Delisting of liver transplant candidates with chronic hepatitis C after viral eradication: A European study. *J Hepatol.* 2016; 65: 524–531.
23. Perricone G, Duvoux C, Berenguer M et al. Delisting HCV-infected liver transplant candidates who improved after viral eradication: Outcome 2 years after delisting. *Liver Int.* 2018; 38: 2170–2177.
24. Kapoor D, Guptan RC, Wakil SM et al. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol.* 2000; 33: 308–312.
25. Yao FY, Terrault NA, Freise C et al. Lamivudine treatment is beneficial in patients with severely decompensated cirrhosis and actively replicating hepatitis B infection awaiting liver transplantation: a comparative study

- using a matched, untreated cohort. *Hepatology*. 2001; 34: 411–416.
26. Nikolaidis N, Vassiliadis T, Giouleme O et al. Effect of lamivudine treatment in patients with decompensated cirrhosis due to anti-HBe positive / HBeAg negative chronic hepatitis B. *Clin Transplant*. 2005; 19: 321–326.
  27. Shim JH, Lee HC, Kim KM et al. Efficacy of entecavir in treatment-naïve patients with hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol*. 2010; 52: 176–182.
  28. Jang JW, Choi JY, Kim YS, Woo HI, Choi SK, Lee CH et al. Long-term effect of antiviral therapy on disease course after decompensation in patients with hepatitis B virus – related cirrhosis. *Hepatology*. 2015; 61: 1809–1820.
  29. Idriss R, Hasse J, Wu T, Khan F et al. Impact of Prior Bariatric Surgery on Perioperative Liver Transplant Outcomes. *Liver Transpl*. 2019; 25: 217–227.
  30. Bashour FN, Teran JC, Mullen KD. Prevalence of peripheral blood cytopenias (hypersplenism) in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Am J Gastroenterol*. 2000; 95: 2936–2939.
  31. Shah ShA, Hayes PC, Allan PL et al. Measurement of spleen size and its relation to hypersplenism and portal hemodynamics in portal hypertension due to hepatic cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91: 2580–2583.
  32. Li L, Duan M, Chen W et al. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *J Transl Med*. 2017; 15: 111.
  33. Alberino F, Gatta A, Amodio P et al. Nutrition and survival in patients with liver cirrhosis. *Nutrition*. 2001; 17: 445–450.
  34. Myers RP, Tandon P, Ney M et al. Validation of the five-variable Model for End-stage Liver Disease (5vMELD) for prediction of mortality on the liver transplant waiting list. *Liver Int*. 2014; 34: 1176–1183.
  35. Gunsar F, Raimondo ML, Jones S et al. Nutritional status and prognosis in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24: 563–572.
  36. Vinaixa C, Strasser SI, Berenguer M. Disease Reversibility in Patients With Post-Hepatitis C Cirrhosis: Is the Point of No Return the Same Before and After Liver Transplantation? A Review. *Transplantation*. 2017; 101: 916–923.
  37. Poynard T, Moussalli J, Munteanu M et al. Slow regression of liver fibrosis presumed by repeated biomarkers after virological cure in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2013; 59: 675–683.
  38. Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M et al. Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Intern Med*. 2000; 132: 517–524.

*Статья поступила в редакцию 19.08.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 19.08.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-36-40

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОЛОГИИ БИОПТАТОВ ПЕЧЕНИ ДОНОРОВ СТАРШЕ 60 ЛЕТ

И.М. Ильинский<sup>1</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>, Д.В. Воронов<sup>2</sup>, М.Г. Минина<sup>2</sup>,  
О.М. Цирульникова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», Московский координационный центр органного донорства, Москва, Российская Федерация

**Цель** исследования – изучение различий в частоте патологических процессов в биоптатах печени доноров старше 60 лет (I группа) и доноров, признанных в настоящее время «стандартными» по возрасту – 60 лет и младше (II группа). **Материал и методы.** Из общего пула последовательных 300 доноров со смертью мозга было 28 (9,3%) доноров старше 60 лет (от 61 до 73 лет; 19 мужчин и 9 женщин). **Результаты.** Зависимость частоты патологии от пола в обеих группах отсутствовала ( $p > 0,05$ ). У пожилых доноров по сравнению со «стандартными» донорами значимо реже бывает легкая ( $p < 0,05$ ) и значимо чаще тяжелая ( $p < 0,05$ ) степени белковой дистрофии, и имеется только тенденция ( $p > 0,05$ ) к более частой легкой степени жировой дистрофии. Дистрофические процессы являются следствием более тяжелого ишемического повреждения печени пожилых доноров. Ишемическое повреждение печени определяет риск более частых билиарных осложнений, для снижения которых требуется тщательный контроль и поддержание на оптимальном уровне гемодинамики у доноров в отделении реанимации. По другим морфологическим параметрам печень доноров старше 60 лет значимо не отличается ( $p > 0,05$ ) от печени доноров 60 лет и младше. **Заключение.** Для расширения донорского пула рекомендуется снять возрастные ограничения при подборе печени для трансплантации, максимально используя донорский потенциал.

*Ключевые слова:* пожилые доноры печени, «стандартные» доноры печени, белковая дистрофия гепатоцитов, жировой гепатоз, фиброз печени.

## SPECIFICITY OF THE MORPHOLOGY OF BIOPSY SPECIMENS LIVER DONORS OVER 60 YEARS

I.M. Iljinsky<sup>1</sup>, N.P. Mozheyko<sup>1</sup>, D.V. Voronov<sup>2</sup>, M.G. Minina<sup>2</sup>,  
O.M. Tsiurulnikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Moscow State Municipal Hospital named after S.P. Botkin, Moscow coordinating center of organ donation, Moscow, Russian Federation

**The aim** of the study was to study the differences in the frequency of pathological processes in the liver biopsy specimens of donors older than 60 years (group I) and donors currently recognized as «standard» by age – 60 years and younger (group II). **Materials and methods.** Of the total pool of 300 consecutive donors with brain death, there were 28 (9.3%) donors over 60 years of age (from 61 to 73 years; 19 men and 9 women). **Results.** There was no incidence of pathology in donors depending on their sex ( $p > 0.05$ ). In elderly donors, compared to «standard» donors, significantly less easy ( $p < 0.05$ ) and were significantly more severe ( $p < 0.05$ ) degree of protein degeneration, and there is only a tendency ( $p > 0.05$ ) to more frequent mild fatty degeneration. Dystrophy processes are a consequence of more severe ischemic damage to the liver of elderly donors. Ischemic liver damage determines the risk of more frequent biliary complications, which require careful monitoring and maintenance at the optimal

**Для корреспонденции:** Ильинский Игорь Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (999) 877-60-95. E-mail: iiljinsky@mail.ru

**For correspondence:** Iljinsky Igor Mihajlovich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Tel. (999) 877-60-95. E-mail: iiljinsky@mail.ru

level of hemodynamics in donors in the intensive care unit. According to other morphological parameters, the liver of donors older than 60 years does not differ significantly ( $p > 0.05$ ) from the liver of donors 60 years and younger. **Conclusion.** To expand the donor pool, it should be recommended to remove age restrictions in the selection of liver for transplantation, maximizing the donor potential.

*Keywords: elderly liver donors, «standard» liver donors, protein dystrophy of hepatocytes, fatty hepatitis, liver fibrosis.*

Трансплантация печени (ТП) является безальтернативным методом лечения пациентов, страдающих терминальной стадией острых или хронических заболеваний печени. Однако во всем мире отмечается отсутствие достаточного количества донорских органов для выполнения этих операций. Многие пациенты, находящиеся в листе ожидания, не доживают до ТП. Поэтому стали искать дополнительные источники увеличения пула доноров, среди которых трансплантация доли печени (трансплантации части печени живого донора и трансплантация сплит-печени) в определенной степени помогают преодолеть дефицит донорских органов [1]. Кроме того, одним из путей увеличения количества ТП является использование органов от доноров с расширенными критериями. К донорам с расширенными критериями относят умерших лиц старше 60 лет, больных вирусным гепатитом С, с длительностью холодовой ишемии более 12 часов, доноров с небыющим сердцем, с гипернатриемией, макровезикулярным стеатозом свыше 30%. В последние годы к наиболее обсуждаемым вопросам относится целесообразность использования для трансплантации печени пожилых доноров [2].

Как известно, патогистологическая оценка перед трансплантацией является эффективным, точным и надежным инструментом для оценки качества печени посмертных доноров. Предтрансплантационные биопсии имеют большое значение при отборе донорской печени для трансплантации, особенно в случаях использования доноров с расширенными критериями, и должны проводиться чаще во избежание ненужной потери органов, пригодных для трансплантации, и трансплантации неподходящих органов [3].

Целью настоящего исследования является изучение различий в частоте патологических процессов в биоптатах печени доноров старше 60 лет (I группа) и у доноров, признанных в настоящее время «стандартными» по возрасту – 60 лет и младше (II группа).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проанализированы карты донора и выполнено гистологическое исследование инцизионных биоптатов печени 300 последовательных доноров со смертью головного мозга. Биопсии выполняли до холодовой консервации печени.

Биоптаты донорской печени фиксировали в 10% забуференном формалине при pH 6,8–7, обезвожи-

вали в спиртах восходящей крепости и заливали в парафиновые блоки. На микротоме фирмы Leica RM 2145 готовили срезы толщиной 4–5 мкм. После депарафинизации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, а также трихромом по Массону. Гистологические препараты изучали с помощью микроскопа Leica DM6000 B. Оценивали степень белковой дистрофии гепатоцитов, жирового гепатоза, фиброза и воспаления печени.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 7.0 и электронных таблиц Excel. Результаты обрабатывали с использованием критерия Стьюдента и критерия  $\chi^2$ . Достоверность различий принимали при критерии  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашем исследовании из общего пула последовательных 300 доноров со смертью мозга было 28 (9,3%) доноров старше 60 лет (19 мужчин и 9 женщин), в возрасте от 61 до 73 лет (I группа). Контрольная (II) группа включала 272 донора (196 мужчин и 76 женщин) в возрасте от 18 до 60 лет. Зависимость частоты патологии от пола в обеих группах отсутствовала ( $p > 0,05$ ).

Выраженность ишемического повреждения печени оценивали по степени белковой дистрофии гепатоцитов у пожилых (I группа,  $n = 28$ ) и у «стандартных» (II группа,  $n = 272$ ) доноров (рис. 1).

При легкой (I) степени в гепатоцитах наблюдали преимущественно зернистую дистрофию. В дольках печени встречались только небольшие участки гидрорической дистрофии. Такая степень потенциально обратимой белковой дистрофии была в пяти (17,9%) биоптатах пожилых доноров и в 109 (40,1%) биоптатах «стандартных» доноров, т. е. легкую степень повреждения печени достоверно чаще ( $p < 0,05$ ) наблюдали во II группе доноров. При умеренной (II) степени в гепатоцитах была преимущественно гидрорическая дистрофия, но встречались и небольшие очаги баллонной дистрофии (I группа:  $n = 6$ ; 21,4% и II группа:  $n = 73$ ; 26,8%). Частота умеренной (II) степени белковой дистрофии в обеих группах достоверно не различалась ( $p > 0,05$ ). При тяжелой (III) степени во всех гепатоцитах одинаково часто наблюдали гидрорическую и баллонную дистрофию (I группа:  $n = 17$ ; 60,7% и II группа:  $n = 90$ ; 33,1%). Такую тяжелую степень белковой дистрофии досто-

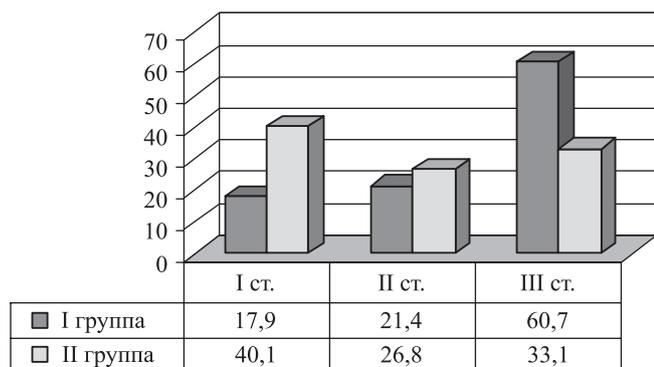


Рис. 1. Сравнительная частота различных степеней белковой дистрофии в биоптатах печени пожилых (I группа) и «стандартных» (II группа) доноров

Fig. 1. Comparative frequency of different degrees of protein dystrophy of hepatocytes in liver biopsies of elderly (group I) and «standard» (group II) donors

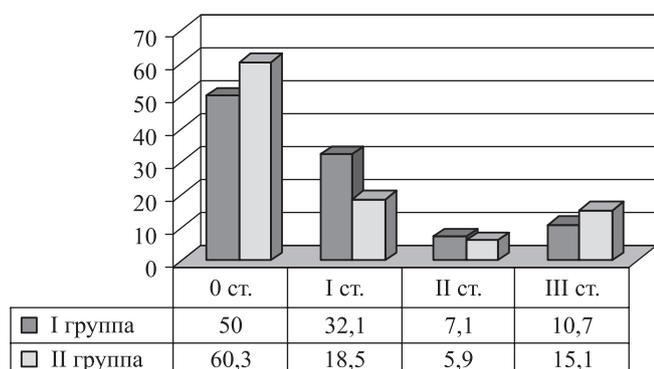


Рис. 2. Сравнительная частота различных степеней жирового гепатоза в биоптатах печени пожилых (I группа) и «стандартных» (II группа) доноров

Fig. 2. Comparative frequency of different degrees of fatty hepatosis in biopsies of elderly (group I) and «standard» (group II) donors

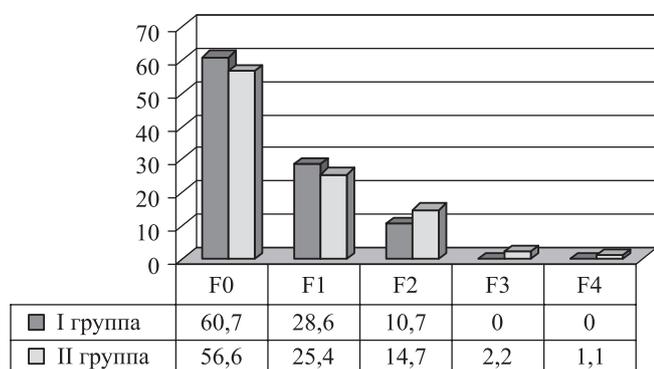


Рис. 3. Сравнительная частота различной степени фиброза в биоптатах печени пожилых (I группа) и «стандартных» доноров (II группа)

Fig. 3. Comparative frequency of different degree of fibrosis in liver biopsies of elderly (group I) and «standard» donors (group II)

верно чаще ( $p < 0,05$ ) наблюдали в I группе доноров. Таким образом, у возрастных доноров по сравнению со «стандартными» донорами достоверно реже бывает легкая (I) степень, но чаще тяжелая (III) степень белковой дистрофии печени.

Жировой гепатоз в соответствии с общепринятой классификацией мы подразделяли на четыре степени. Нулевая (0) степень – жировой гепатоз отсутствует при отсутствии или наличии жировой дистрофии до 5% гепатоцитов. Легкая (I) степень жирового гепатоза – жировая дистрофия более 5%, но не более 33% гепатоцитов с жировой дистрофией. Умеренная (II) степень жирового гепатоза – жировая дистрофия более 33%, но не более 66% гепатоцитов с жировой дистрофией. Тяжелая (III) степень жирового гепатоза – более 66% гепатоцитов с жировой дистрофией.

На рис. 2 представлена сравнительная частота различных степеней жирового гепатоза в биоптатах печени возрастных (I группа) и «стандартных» (II группа) доноров.

Жировой гепатоз реже отсутствовал у доноров I группы ( $n = 14$ ; 50,0%), чем во II группе ( $n = 164$ ; 60,3%). Напротив, I и II степени жирового гепатоза чаще были у возрастных (I степень:  $n = 9$ ; 32,1%. II степень:  $n = 2$ ; 7,1%), а не у «стандартных» доноров (I степень:  $n = 51$ ; 18,5%. II степень:  $n = 16$ ; 5,9%). III степень жирового гепатоза встречалась чаще в молодой ( $n = 41$ ; 15,1%), а не в пожилой ( $n = 3$ ; 10,7%) группе доноров. Однако все эти различия недостоверны ( $p > 0,05$ ).

Степень фиброза оценивали по шкале METAVIR: F0 – фиброз отсутствует, F1 – фиброз портальных трактов без септ, F2 – фиброз портальных трактов с единичными септами, F3 – фиброз портальных трактов и многочисленные септы без цирроза, F4 – цирроз печени.

На рис. 3 представлена сравнительная частота различных степеней фиброза в биоптатах печени у возрастных (I группа) и «стандартных» (II группа) доноров. Фиброз печени отсутствовал более чем в половине наблюдений, как у возрастных ( $n = 17$ ; 60,7%), так и у «стандартных» ( $n = 154$ ; 56,6%) доноров. Степень фиброза F1 в I группе была обнаружена в восьми (28,6%) биоптатах, а во II группе – в 69 (25,4%) биоптатах. Степень фиброза F2 была выявлена соответственно в трех (10,7%) и в 40 (14,7%) биоптатах. Тяжелые степени фиброза (F3 и F4) у пожилых доноров отсутствовали, а у «стандартных» доноров встречались редко (F3:  $n = 6$ ; 2,2%. F4:  $n = 3$ ; 1,1%). Различия при отсутствии или наличии фиброза в группах недостоверны ( $p > 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего ретроспективного исследования биоптатов 300 последовательных донорских печеней показали, что легкая степень (условная «нор-

ма») в печени возрастных доноров встречается реже ( $p < 0,05$ ), а тяжелая степень белковой дистрофии гепатоцитов – достоверно чаще ( $p < 0,05$ ), чем в печени «стандартных» доноров. Таковую же тенденцию наблюдали в отношении легкой степени жирового гепатоза, хотя эти различия недостоверны ( $p > 0,05$ ).

Оба этих патологических признака, по нашему мнению, являются проявлением ишемического повреждения печени и связаны с нестабильной гемодинамикой у возрастных доноров, у которых, как правило, патология сердечно-сосудистой системы бывает чаще и тяжелее, чем у молодых доноров [4, 5]. Именно более тяжелое ишемическое повреждение печени пожилых доноров является одной из основных причин более частых билиарных осложнений [6–8], хотя выживаемость трансплантатов и пациентов значимо не различаются [6–10]. Поэтому основной задачей для улучшения результатов ТП от пожилых доноров является снижение ишемического повреждения донорской печени. Можно согласиться с мнением Ghinolfi et al. [11], что, возможно, в будущем одним из путей станет нормотермическая машинная перфузия *ex situ*, которая может свести к минимуму ишемическое и реперфузионное повреждение донорской печени. Авторы исследовали 10 пациентов, которым была выполнена первичная ТП от доноров 70 лет и старше после нормотермической машинной перфузии. В качестве контроля служили пациенты с аналогичными характеристиками, но донорская печень была после холодовой консервации. Электронная микроскопия показала снижение объемной плотности митохондрий и стеатоза и увеличение объемной плотности аутофагических вакуолей в печени после нормотермической машинной перфузии по сравнению с холодовой консервацией ( $p < 0,001$ ). Таким образом, это исследование показало, что использование нормотермической машинной перфузии *ex situ* печени доноров 70 лет и старше снижало ишемическое и реперфузионное повреждение по морфологическим признакам, но клиническую пользу этого метода предстоит еще доказать.

В нашем исследовании отсутствовали статистически значимые отличия частоты различных степеней жирового гепатоза и фиброза в зависимости от возраста доноров ( $p > 0,05$ ). В литературе приведены свидетельства того, что при фиброзе донорской печени после ее трансплантации фиброз не прогрессирует или даже происходит его регрессия. Так, после ТП (101 пациент) с легким и умеренным фиброзом (F1 и F2) у 40% больных степень патологии не прогрессировала, а у 30% наблюдали уменьшение степени фиброза. При наблюдении в среднем в течение 71 месяца у 63 пациентов (63%) сохранялась функция трансплантатов, у шести (6%) была выполнена ретрансплантация печени, а 35 больных погибли. Выживаемость трансплантатов составила 82 и 69% че-

рез один год и пять лет соответственно. Установлено, что различия в выживаемости трансплантатов не являются статистически значимыми в зависимости от степени фиброза печени: пятилетняя выживаемость трансплантата (73% при F1 и 62% при F2,  $p = 0,24$ ). Кроме того, группу больных, которым трансплантировали печень с фиброзом, сравнили с контрольной группой, состоящей из 208 последовательных пациентов, которым трансплантировали печень без фиброза. Пятилетняя выживаемость трансплантата достоверно не отличалась между группами (69% в группе с фиброзом против 75% в группе без фиброза печени,  $p = 0,19$ ). Пятилетняя выживаемость пациентов также статистически не отличалась между группами (выживаемость 73% в группе с фиброзом против 79% в группе без фиброза печени,  $p = 0,2$ ). У пациентов с HCV различия пятилетней выживаемости трансплантатов также не были статистически значимыми: 60% в группе с фиброзом против 70% в группе без фиброза ( $p = 0,22$ ). Это исследование показало, что после пересадки донорской печени с легкой и умеренной степенями фиброза можно достичь приемлемых долгосрочных результатов операции [12].

Итак, наше исследование показало, что, за исключением более тяжелого ишемического повреждения печени пожилых доноров, значимые различия в морфологии печени пожилых и «стандартных» доноров отсутствуют. При отсутствии заболеваний печени она в отличие от сердца и почек сохраняет биологическую молодость, независимо от хронологического возраста донора. В этом плане также представляют большой интерес данные гериатрии о неоднородности процесса старения – чем выше хронологический возраст индивида, тем меньше он соответствует его биологическому возрасту. Гериатрические параметры могут быть использованы при отборе доноров с большим хронологическим возрастом, но с меньшим биологическим возрастом [13]. Использование хронологически старых, но биологически молодых доноров печени позволит расширить донорский пул и снизить смертность в листах ожидания [14].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пожилых доноров (старше 60 лет) по сравнению со «стандартными» по возрасту (до 60 лет) донорами значимо реже бывает легкая ( $p < 0,05$ ) и значимо чаще тяжелая ( $p < 0,05$ ) степень белковой дистрофии и имеется только тенденция ( $p > 0,05$ ) к более частой легкой степени жировой дистрофии. Дистрофические процессы являются следствием более тяжелого ишемического повреждения печени пожилых доноров, у которых чаще встречается и тяжелее протекает патология сердечно-сосудистой системы. Ишемическое повреждение печени определяет более частые билиарные осложнения. Для снижения тяжести ише-

мического повреждения печени у пожилых доноров и уменьшения риска билиарных осложнений требуется тщательный контроль и поддержание на оптимальном уровне гемодинамики у доноров в отделении реанимации. По морфологическим параметрам печень доноров старше 60 лет при отсутствии ее врожденных или приобретенных заболеваний значимо не отличается ( $p > 0,05$ ) от печени доноров 60 лет и младше. Для расширения донорского пула следует рекомендовать снять возрастные ограничения при отборе печени для трансплантации, максимально реализуя донорский потенциал.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Цирульникова О.М. Клиническая трансплантология: задачи, возможности, принципы. *Очерки клинической трансплантологии*. Под ред. С.В. Готье. М., 2009: 13–26. *Gautier SV, Tsiurulnikova OM. Clinical transplantology: tasks, scopes, principles. Essays on clinical Transplantology*. Edited by S.V. Gautier. M., 2009: 13–26.
2. Готье СВ, Корнилов МН, Милосердов ИА, Минина МГ, Круглов ДН, Зубенко СИ. Трансплантация печени от доноров старше 60 лет. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 6–12. *Gautier SV, Kornilov MN, Miloserdov IA, Minina MG, Kruglov DN, Zubenko SI. Liver transplantation from sexagenarian and older. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 6–12. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-1-6-12>.
3. Flechtenmacher C, Schirmacher P, Schemmer P. Donor liver histology – a valuable tool in graft selection. *Langenbecks Arch Surg*. 2015; 400: 551–557.
4. Ghinolfi D, De Simone P, Lai Q, Pezzati D, Coletti L et al. Risk analysis of ischemic-type biliary lesions after liver transplant using octogenarian donors. *Liver Transpl*. 2016; 22: 588–598. doi: 10.1002/lt.24401.
5. Ghinolfi D, Pezzati D, Rreka E, Balzano E, Catalano G et al. Nonagenarian Grafts for Liver Transplantation. *Liver Transpl*. 2019 Jun 5. doi: 10.1002/lt.25580.
6. Moosburner S, Ritschl PV, Wiering L, Gassner JMGV, Öllinger R et al. High donor age for liver transplantation: Tackling organ scarcity in Germany. *Chirurg*. 2019 Feb 1. doi: 10.1007/s00104-019-0801-z.
7. Domagala P, Takagi K, Ijzermans JN, Polak WG. Grafts from selected deceased donors over 80-years old can safely expand the number of liver transplants: A systematic review and meta-analysis. *Transplant Rev (Orlando)*. 2019 Jul 2. pii: S0955-470X(19)30018-7. doi: 10.1016/j.trre.2019.06.004.
8. Thorsen T, Aandahl EM, Bennet W, Olausson M, Ericzon BG et al. Transplantation With Livers From Deceased Donors Older Than 75 Years. *Transplantation*. 2015; 99: 2534–2542.
9. Westerkamp AC, Korkmaz KS, Bottema JT, Ringers J, Polak WG et al. Elderly donor liver grafts are not associated with a higher incidence of biliary complications after liver transplantation: results of a national multicenter study. *Clin Transplant*. 2015 Jul; 29 (7): 636–643. doi: 10.1111/ctr.12569.
10. Chapman WC, Vachharajani N, Collins KM, Garonzik-Wang J, Park Y et al. Donor Age-Based Analysis of Liver Transplantation Outcomes: Short- and Long-Term Outcomes Are Similar Regardless of Donor Age. *J Am Coll Surg*. 2015 Jul; 221 (1): 59–69. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.01.061.
11. Ghinolfi D, Rreka E, De Tata V, Franzini M, Pezzati D et al. Pilot, Open, Randomized, Prospective Trial for Normothermic Machine Perfusion Evaluation in Liver Transplantation From Older Donors. *Liver Transpl*. 2019 2 Mar; 25 (3): 436–449. doi: 10.1002/lt.25362.
12. Wadhera V, Harimoto N, Lubezky N, Gomatos I, Facciuto M et al. The impact of donor liver allograft fibrosis on patients undergoing liver transplantation. *Clin Transplant*. 2018 Mar; 32 (3): e13187. doi: 10.1111/ctr.13187.
13. Lai JC, Covinsky K, Feng S. The octogenarian donor: can the liver be «younger than stated age»? *Am J Transplant*. 2014 Sep; 14 (9): 1962–1963. doi: 10.1111/ajt.12844.
14. Boer JD, Koopman JJE, Metselaar HJ, Braat AE, Blok JJ. Liver transplantation with geriatric liver allografts: the current situation in Eurotransplant. *Transplant International*. 2017; 30 (4): 432–433.

*Статья поступила в редакцию 5.09.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 5.09.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-41-44

## ОПТИМИЗАЦИЯ КОНВЕКЦИОННОГО ПОТОКА ПРИ ОНЛАЙН ГЕМОДИАФИЛЬТРАЦИИ

А.Г. Строков, Я.Л. Поз

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

**Цель:** изучить зависимость величины конвекционного потока при онлайн гемодиализации (олГДФ) от способа управления ультрафильтрацией и индивидуальных особенностей пациентов. **Материалы и методы.** В исследование были включены 36 пациентов (20 мужчин и 16 женщин), находящихся на лечении программным гемодиализом. Управление скоростью замещения проводилось в ручном режиме на основании показателей трансмембранного давления (ТМД). В ряде случаев использовались аппараты с блоком автоматического управления скоростью фильтрации (СФ) AutoSub plus. Фиксировались СФ, ТМД, скорость кровотока (СК), удельная скорость фильтрации (УСФ, мл/мин/мм рт. ст.<sup>-1</sup>). **Результаты.** Максимальная УСФ у различных пациентов колебалась в пределах 0,51–0,80 мл/мин/мм рт. ст.<sup>-1</sup>, среднее значение составило  $0,62 \pm 0,07$  мл/мин/мм рт. ст.<sup>-1</sup>. Была отмечена значимая корреляция УСФ с уровнем гемоглобина ( $r = -0,55$ ). В течение процедуры отмечалось снижение УСФ (в среднем – на  $23 \pm 4\%$ ). На величину УСФ оказывала существенное влияние СК ( $r = 0,70$ ). Максимальная УСФ достигалась при ТМД 140–220 мм рт. ст., при ТМД свыше 250 мм рт. ст. отмечалось падение УСФ, и для дальнейшего прироста СФ требовалось увеличение скорости кровотока. При серийных наблюдениях была отмечена индивидуальная стабильность УСФ, колебания у конкретного пациента не превышали 10%. Объем замещения за сеанс ГДФ составил  $18,0 \pm 3,3$  л, соотношение СФ/СК  $24,7 \pm 5,2\%$ , при этом у 17 из 36 пациентов не был достигнут объем замещения 21 л. Применение автоматической системы регулировки СФ позволяло увеличить объем замещения (ОЗ) на 12–18%. **Заключение.** Достижение максимального конвекционного объема при олГДФ требует индивидуализации параметров лечения. Применение автоматического управления СФ позволяет обеспечить максимально возможный конвекционный поток.

*Ключевые слова:* онлайн гемодиализация, удельная скорость фильтрации, объем замещения.

## OPTIMIZATION OF CONVECTIVE FLUX IN ONLINE HAEMODIAFILTRATION

A.G. Strokov, I.L. Poz

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Aim.** To evaluate the dependence of convective flow on the ultrafiltration control method and patients individual characteristics during online-hemodiafiltration (olHDF). **Materials and methods.** The study included 36 stable dialysis patients (20 male and 16 female). The substitution rate was conducted manually based on transmembrane pressure (TMP). In some cases filtration rate (FR) automatic control unit AutoSub plus were used. The FR, TMP, Qb, specific filtration rate (CFR) were recorded. **Results.** The maximum CFR in various patients ranged from 0.51 to 0.80 ml/min/mm Hg<sup>-1</sup>, the average value was  $0.62 \pm 0.07$  ml/min/mm Hg<sup>-1</sup>. A significant correlation of CFR with hemoglobin level was noted ( $r = -0.55$ ). A decrease in CFR was noted during HDF session (on average – by  $23 \pm 4\%$ ). The SCF was significantly affected by Qb ( $r = 0.70$ ). The maximum CFR was achieved with TMP 140–220 mm Hg. A decrease in CFR was noted with TMP over 250 mm Hg, an increase in Qb was required for further rise in FR. Individual stability of the CFR was noted during serial observations, the fluctuations in individual patient not exceeded 10%. Replacement volume for HDF session was  $18.0 \pm 3.3$  L, the FR/Qb ratio was  $24.7 \pm 5.2\%$ . Substitution volume of 21 L was not achieved in 17 of 36 patients. Use of automatic FR

**Для корреспонденции:** Поз Яков Львович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (499) 158-22-33. E-mail: dr.poz@list.ru

**For correspondence:** Poz Iakov L'vovich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Tel. (499) 158-22-33. E-mail: dr.poz@list.ru

adjustment system allowed increasing substitution volume by 12–18%. **Conclusion.** Achieving maximum substitution volume with oHDF requires the individualization of treatment parameters. Use of automatic control of FR allowed the highest possible convection flow.

*Key words:* online hemodiafiltration, specific filtration rate, substitution volume.

ОлГДФ – методика, аккумулирующая все современные технологические достижения, многими исследователями считается «золотым стандартом» гемодиализной заместительной почечной терапии [1]. Основным преимуществом олГДФ с точки зрения более полной коррекции уремии является возможность активного трансмембранного переноса веществ со значительной молекулярной массой при создании высокоскоростного фильтрационного потока молекул воды из контура крови в контур диализата. При известном для данной мембраны и заведомо высоком коэффициенте просеивания по отношению к данному веществу объем фильтрации, достигнутый за сеанс лечения, может рассматриваться в качестве суррогатного показателя эффективности лечения в отношении элиминации данного вещества [2]. Так, современные диализные мембраны, применяющиеся при олГДФ, имеют коэффициент просеивания для  $\beta_2$ -микроглобулина (11 800 Да) не ниже 0,6. Предположение, что более значимое выведение средних и высокомолекулярных уремических субстанций должно положительно сказаться на результатах программного гемодиализа, получило подтверждение в последних исследованиях. При этом было показано, что улучшение показателей выживаемости отмечается при достижении высокого фильтрационного объема – свыше 20 литров за сеанс лечения [3]. В реальной клинической практике обеспечение столь высокой скорости ультрафильтрации зачастую сопряжено с рядом трудностей, обусловленных как параметрами проведения процедуры, так и особенностями пациента [4].

Целью данного исследования явилось изучение зависимости величины конвекционного потока от способа управления ультрафильтрацией и индивидуальных особенностей пациентов.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 36 пациентов (20 мужчин и 16 женщин) в возрасте от 21 до 82, в среднем – 59,6 года, находящихся на лечении программным гемодиализом не менее 6 месяцев. Сосудистым доступом у 29 пациентов служили артериовенозная фистула или сосудистый протез, у 7 – двухпросветный туннелированный катетер. Сеансы олГДФ длительностью 4 часа проводились на аппаратах Fresenius 4008 и 5008 и гемодиафильтрах FX60 и FX80 (Fresenius Medical Care, ФРГ) при фиксированной скорости потока диализирующей жидкости

500 мл/мин и постдилюционном направлении введения субституата. Управление скоростью замещения проводилось в ручном режиме на основании показателей ТМД. При этом фиксировались СФ, ТМД и актуальная СК. В ходе сеансов лечения мы также исследовали показатель УСФ, соотносящий величину фильтрационного потока (СФ, мл/мин) и актуальное трансмембранное давление (ТМД, мм рт. ст.). В ряде случаев использовались системы автоматического управления потоком диализата с коэффициентом 1,5 по отношению к СК и блок автоматического управления СФ AutoSub plus, действие которого основано на постоянном измерении величины пульсации давления в воздушной ловушке венозной магистрали, в составе диализных машин серии 5008. Статистическая обработка данных проводилась при помощи электронной таблицы Microsoft Office Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При фиксированной продолжительности сеанса лечения, равной 4 часам, и средней СК =  $322,5 \pm 27,1$  мл/мин величина УСФ в своих максимальных значениях у различных пациентов колебалась в пределах  $0,51–0,80$  мл/мин/мм рт. ст.<sup>-1</sup>, среднее значение составило  $0,62 \pm 0,07$  мл/мин/мм рт. ст.<sup>-1</sup>. Была отмечена значимая корреляция УСФ с уровнем гемоглобина ( $r = -0,55$ ), в то время как зависимости УСФ от значений протеинемии, альбуминемии, гликемии и общего холестерина выявлено не было. В течение сеансов лечения отмечалось снижение УСФ (в среднем – на  $23 \pm 4\%$ ), что можно объяснить как системной гемоконцентрацией на фоне снижения объема циркулирующей крови, так и уплотнением на поверхности диализной мембраны вторичной белковой мембраны, активно формирующейся именно при высокой скорости фильтрации [2]. Из параметров процедуры на величину УСФ оказывала существенное влияние СК ( $r = 0,70$ ).

Максимальные значения УСФ достигались в ранге величин ТМД 140–220 мм рт. ст. Дальнейшее увеличение скорости фильтрации, и соответственно, величины ТМД приводило к экспоненциальному падению величины УСФ (рис.).

При ТМД свыше 250 мм рт. ст. падение величины УСФ становилось особенно заметным и дальнейшее увеличение СФ часто приводило к возникновению тревог по ТМД. В такой ситуации для восстановления СФ требовалось увеличение СК.

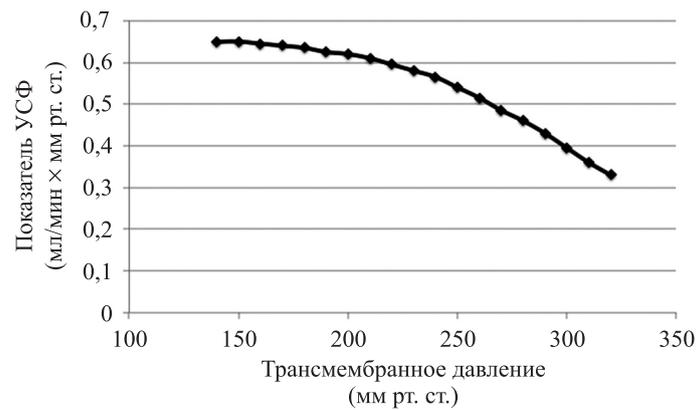


Рис. Зависимость показателя УСФ от величины ТМД в ходе сеанса олГДФ при прогрессивном увеличении СФ

Fig. The CSF dependence on TMP in course of olHDF session during FR progressive increase

При серийных наблюдениях была отмечена индивидуальная стабильность УСФ, колебания от сеанса к сеансу у конкретного пациента не превышали 10%. Объем замещения за сеанс ГДФ в среднем составил  $18,0 \pm 3,3$  л, фильтрационная фракция (соотношение СФ/СК) –  $24,7 \pm 5,2\%$ , при этом у 17 из 36 пациентов в ходе ГДФ не был достигнут объем замещения 21 л. Данное наблюдение можно объяснить в первую очередь тем обстоятельством, что в данной группе пациентов не имелось резервов для увеличения скорости кровотока. Применение автоматической системы регуляции СФ на основе измерения вязкости крови позволяло увеличить общий конвекционный объем на 12–18%, при этом УСФ не отмечалась ниже 0,4 и не отмечалось возникновения тревог по ТМД. В то же время у четырех из двенадцати пациентов, у которых была применена данная система, пороговый объем замещения за сеанс лечения достигнут не был из-за невозможности увеличения СК.

Согласно данным современных исследований, объем замещения, достигаемый в ходе сеанса ГДФ, является ключевым фактором, обеспечивающим улучшение конечных результатов программного диализа [2]. Пороговым значением на сегодняшний день считается объем, равный 21 л без учета объема ультрафильтрации, направленной на устранение междиализной гипергидратации [3]. В рутинной клинической практике достижение столь высокой СФ требует применения напряженных режимов проведения лечения, в том числе создания высокого градиента трансмембранного давления [4]. Известно, что проведение ГДФ с высокими значениями ТМД увеличивает количество тревог, требующих вмешательства медперсонала [5], кроме того, в подобной ситуации значимо возрастает просеивание высокомолекулярных веществ, в том числе альбумина [6]. Хотя рядом авторов выведение альбумина рассматривается как положительный фактор, способствующий удалению связанных с белком уремических

токсинов [7], значимые потери альбумина могут снижать его плазменную концентрацию. Показатель УСФ наряду с величиной ТМД помогает оценить напряженность конвекционного потока и избежать чрезмерной гемоконцентрации в экстракорпоральном контуре и значимого просеивания альбумина. Основной резерв для обеспечения адекватного (или максимального для данного пациента и данной продолжительности сеанса ГДФ) объема замещения без применения экстремальных режимов фильтрации и, соответственно, значимого падения УСФ – увеличение скорости кровотока. Четкое, осмысленное управление СФ становится все более актуальной задачей, учитывая перманентную тенденцию к увеличению гидравлической проницаемости и коэффициентов просеивания высокомолекулярных веществ мембран, применяющихся в широкой клинической практике. В этой связи многообещающим представляется совершенствование и широкое внедрение систем автоматической регуляции скорости замещения, позволяющих не только увеличить достигаемый за сеанс лечения объем, но и обеспечить стабильное, не требующее вмешательства персонала течение процедуры.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достижение максимального конвекционного объема при ГДФ требует индивидуализации прескрипции лечения. При этом оптимально проведение фильтрации в наиболее производительном ранге трансмембранного давления до 250 мм рт. ст. Основным ограничением суммарного объема замещения при ГДФ является невозможность обеспечения адекватной скорости кровотока.

Применение современных систем автоматического управления скоростью фильтрации позволяет в режиме реального времени обеспечить максимально возможный в конкретных условиях конвекционный поток без возникновения эпизодов чрезмерно

высокого ТМД и остановок экстракорпорального кровотока.

Определение объемов замещения, необходимых для пациентов разного пола и возраста, с различными антропометрическими и клиническими данными, а также влияние напряженных режимов фильтрации на результаты лечения требуют дальнейших исследований.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Mostovaya IM, Blankestijn PJ, Bots ML, Covic A, Davenport A, Grooteman MP. et al. EUDIAL1 – an official ERA-EDTA Working Group. Clinical evidence on hemodiafiltration: a systematic review and a meta-analysis. *Semin Dial.* 2014; 27: 119–127. doi: 10.1111/sdi.12200.
2. Tattersall JE, Ward RA. EUDIAL group. Online haemodiafiltration: definition, dose quantification and safety revisited. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 542–550. doi: 10.1093/ndt/gfs530.
3. Maduell F, Moreso F, Pons M, Ramos R, Mora-Macià J, Carreras J. et al. ESHOL Study Group. High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24: 487–497. doi: 10.1681/ASN.2012080875.
4. Kim YW, Park S. Confronting practical problems for initiation of on-line hemodiafiltration therapy. *Electrolyte Blood Press.* 2016; 14: 1–4. 10.5049/EBP.2016.14.1.1.
5. Gayraud N, Ficheux A, Duranton F, Guzman C, Szwarc I, Vetromile F et al. Consequences of increasing convection onto patient care and protein removal in hemodialysis. *PLoS One.* 2017; 12 (2): e0171179. doi: 10.1371/journal.pone.0171179.
6. Fournier A, Birmele B, Francois M, Prat L, Halimi JM. Factors associated with albumin loss in post-dilution hemodiafiltration. *Int J Artif Organs.* 2015; 38: 76–82. doi: 10.5301/ijao.5000389.
7. Nagai K, Tsuchida K, Ishihara N, Minagawa N, Ichi-en G, Yamada S. et al. Implications of albumin leakage for survival in maintenance hemodialysis patients: a 7-year observational study. *Ther Apher Dial.* 2017; 21: 378–386. doi: 10.1111/1744-9987.12526.

*Статья поступила в редакцию 4.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 4.10.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-45-53

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОРНОЙ СПОСОБНОСТИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА, КУЛЬТИВИРОВАННЫХ С БИОПОЛИМЕРНЫМ КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИМ ГИДРОГЕЛЕМ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ МАТРИКСОМ

*Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, А.С. Пономарева, Е.А. Немец, Ю.Б. Басок, Г.Н. Бубенцова, В.А. Сургученко, В.И. Севастьянов*

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

**Введение.** Созданию биомедицинского клеточного продукта – биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) – препятствуют проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности функционально активных изолированных островков Лангерганса (ОЛ). Сохранению структуры и функции изолированных ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo* могут способствовать как биополимерные, так и тканеспецифические матриксы. Наиболее предпочтительные для клеток тканеспецифические матриксы могут быть получены в результате децеллюляризации поджелудочной железы (ДПЖ-матрикс). **Цель.** Провести сравнительный анализ секреторной функции изолированных ОЛ крысы, культивированных в присутствии биополимерного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) и тканеспецифического ДПЖ-матрикса соответственно. **Материалы и методы.** ОЛ из ПЖ крысы выделяли, используя классическую коллагеназную технику с некоторыми модификациями. ОЛ культивировали в присутствии БМКГ- и тканеспецифического матрикса в стандартных условиях. Тканеспецифический ДПЖ-матрикс получали в результате децеллюляризации ПЖ крысы. ДПЖ-матрикс был исследован на цитотоксичность, присутствие ДНК и подвергнут морфологическому изучению. Секреторную функцию ОЛ исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Результаты.** Было показано, что секреторная функция островков, культивированных в присутствии БМКГ- и ДПЖ-матрикса, значительно выше, чем в монокультуре островков. Выявлено преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса при создании биоинженерной конструкции ПЖ по сравнению с БМКГ-матриksom. **Заключение.** БМКГ и тканеспецифический ДПЖ-матриксы способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных ОЛ, но и пролонгированию их секреторной способности в течение 10 дней, по сравнению с монокультурой ОЛ.

*Ключевые слова:* островки Лангерганса, биополимерный гидрогель, децеллюляризованная поджелудочная железа, матрикс, культивирование, секреция инсулина.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF SECRETORY CAPACITY OF LANGERHANS ISLETS CULTURED WITH BIOPOLYMER COLLAGEN-CONTAINING HYDROGEL AND TISSUE-SPECIFIC MATRIX

*N.V. Baranova, L.A. Kirsanova, A.S. Ponomareva, E.A. Nemets, Y.B. Basok, G.N. Bubentsova, V.A. Surguchenko, V.I. Sevastianov*

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

**Introduction.** The creation of a biomedical cell product – a bioengineered construct of the pancreas – is hampered by problems associated with maintaining the viability of isolated islets of Langerhans (OL). Both biopolymer

**Для корреспонденции:** Баранова Наталья Владимировна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex.ru

**For correspondence:** Baranova Natalya Vladimirovna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex.ru

and tissue-specific matrices can contribute to the preservation of the structure and function of isolated OL *in vitro* and *in vivo*. The most preferred tissue-specific matrices for cells can be obtained as a result of pancreatic decellularization (DP matrix). **Aim:** comparative analysis of the secretory function of rat isolated OL cultured with biopolymer collagen-containing hydrogel (BMCH) and tissue-specific DP matrix, respectively. **Materials and methods.** OL was isolated using classical collagenase technique with some modifications. OL was cultured in the presence of BMCH- and tissue-specific matrix under standard conditions. Tissue-specific DP matrix was obtained by decellularization of rat pancreas. The DP matrix was examined for cytotoxicity, DNA presence and subjected to morphological study. The secretory function of OL was studied by enzyme immunoassay (ELISA). **Results.** It has been shown that the secretory function of islets cultured in the presence of BMCH- and DP matrix is significantly higher than in the islets monoculture. Identified the advantage of tissue-specific DP matrix when creating bioengineered constructs of the pancreas compared to BMCH matrix. **Conclusion.** BMCH and tissue-specific DP matrices contribute not only to the preservation of the viability of isolated OL, but also to the prolongation of their secretory ability for 10 days, compared to the monoculture OL.

*Key words:* islets of Langerhans, biopolymer hydrogel, decellularized pancreas, matrix, cultivation, insulin secretion.

## ВВЕДЕНИЕ

Созданию биомедицинского клеточного продукта – биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) препятствуют проблемы, связанные с поддержанием жизнеспособности функционально активных изолированных островков Лангерганса (ОЛ) [1, 2]. Известно, что в процессе изоляции ОЛ утрачивают васкуляризацию, иннервацию, а также лишаются связей с внеклеточным матриксом (ВКМ), играющим значимую роль в регуляции множества аспектов физиологии островков, включая выживаемость, пролиферацию и секрецию инсулина [3, 4]. Сохранению структуры и функции изолированных ОЛ в условиях *in vitro* и *in vivo* могут способствовать матриксы-биомиметики ВКМ, обладающие свойствами, характерными для нативного микроокружения поджелудочной железы [5–7]. К биомиметикам, моделирующим состав ВКМ, относится и биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс) – многокомпонентный продукт из природных соединений, в состав которого входят пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины, уроновые кислоты, а также биологически активные вещества ВКМ, включая факторы роста, необходимые для жизнедеятельности клеток [8].

Известно, что при инкубации с коллагенсодержащими матриксами изолированные ОЛ длительное время сохраняют целостность, жизнеспособность и секреторную функцию по сравнению с монокультурами ОЛ [9, 10]. Ранее нами было показано, что культивирование изолированных ОЛ крысы с БМКГ-матриksom способствует сохранению жизнеспособности и характерной структуры ОЛ *in vitro* в течение 14 суток [11].

При всех своих достоинствах резорбируемые матриксы из биополимерных материалов не обладают тканевой специфичностью. В последние годы интенсивно начались разработки биоинженерных

конструкций на основе тканеспецифических матриксов, изготовленных из децеллюляризованных тканей с сохранением структурных, биохимических и биомеханических свойств нативного ВКМ с последующей рецеллюляризацией клеточными компонентами [12, 13]. При разработке протоколов децеллюляризации ПЖ важно учитывать сохранение ее архитектоники и микроциркуляторного русла при максимально полном удалении клеточного материала, в том числе ДНК, для минимизации иммунного ответа при имплантации биоинженерной конструкции ПЖ и с минимальным повреждением компонентов ВКМ [14, 15]. Присутствие в децеллюляризованном матриксе ПЖ (ДПЖ-матрикс) нативных компонентов ВКМ, таких как структурные белки (различные типы коллагена, эластин, фибронектин и ламинин), гликопротеины и факторы клеточной адгезии, позволяет создать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток и практически полностью имитировать ВКМ [16]. Трехмерная структура ВКМ определяет топографическое расположение эндокринных клеток ПЖ, что также влияет на выживаемость и секреторную активность ОЛ [17]. Показано, что островки, культивированные в присутствии ДПЖ-матрикса, увеличивали секрецию инсулина по сравнению с изолированными ОЛ в монокультуре [18].

**Цель** нашей работы заключалась в проведении сравнительного анализа секреторной активности изолированных ОЛ крысы, культивированных с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем и тканеспецифическим матриксом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах породы Wistar (180–220 г), полученных из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино». Акклиматизацию и содержание лабо-

раторных животных осуществляли в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 2. «Требования к обращению с животными».

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» от 1973 г. и правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986).

### Гидрогелевый миметик ВКМ

В качестве гидрогелевого миметика ВКМ была выбрана инъекционная форма БМКГ-матрикса из линейного ряда композиции *Сфера*<sup>®</sup>ГЕЛЬ (АО «БИОМИР сервис», Россия), предназначенная для применения в клеточных технологиях со следующими характеристиками: средний размер микрочастиц –  $145,79 \pm 0,09$  мкм; модуль упругости –  $1170 \pm 12$  Па; модуль вязкости –  $62,9 \pm 7,9$  Па; набухаемость – не ниже  $86,6 \pm 3,0$  масс. %; время резорбции – до 9 месяцев. Ранее проведенные исследования продемонстрировали, что данный БМКГ-матрикс является оптимальным для создания клеточно- и тканеинженерных конструкций [19].

### Тканеспецифический ВКМ

В качестве тканеспецифического ВКМ был выбран матрикс, полученный из децеллюляризованной ткани ПЖ крысы (ДПЖ-матрикс).

Для децеллюляризации использовали субтотально удаленную ПЖ крысы, измельченную вручную с помощью глазных ножниц до размера фрагментов не более  $1 \times 1 \times 2$  мм. Фрагменты ПЖ обрабатывали при комнатной температуре в условиях непрерывного перемешивания (ротационная система MultiBio RS-24, скорость 5 оборотов/мин) последовательно в 0,1% растворе додецилсульфата натрия (SDS) на дистиллированной воде в течение 3 часов, в 0,1% растворе SDS на 1N NaCl в течение 3 часов и в 0,1% растворе SDS на фосфатно-солевом буфере (PBS, pH = 7,35) в течение 18 часов. На конечной стадии получения ДПЖ-матрикса децеллюляризованные фрагменты панкреатической ткани отмывали от остатков поверхностно-активных агентов в течение 72 часов в трех сменах PBS, содержащего антибиотик/антимикотик. Смену раствора осуществляли один раз в сутки. Образцы ДПЖ-матрикса (фрагменты ДПЖ в PBS) вносили в криопробирки, замораживали и подвергали  $\gamma$ -стерилизации (1,5 Мрад). Стерильный ДПЖ-матрикс хранили при температуре 4–6 °С и не-

посредственно перед экспериментом дополнительно измельчали до среднего размера микрофрагментов  $500 \pm 45$  мкм для уменьшения степени микрогетерогенности.

### Морфологическое исследование ДПЖ-матрикса

Для морфологического исследования образцы ДПЖ-матрикса фиксировали в 10% забуференном формалине, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси хлороформа и этанола, хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные на микротоме RM2245 (Leica, Германия), депарафинировали, регидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином, на общий коллаген (метод Массона), на эластические волокна (метод Унны–Тенцера), а также проводили флюоресцентное окрашивание DAPI для качественного определения ядерного материала в ДПЖ-матриксе.

### Количественное определение ДНК в ДПЖ-матриксе

Для определения степени иммуногенности децеллюляризованного материала по остаточному количеству ядерного материала в ДПЖ-матриксе проводили выделение и флюоресцентное окрашивание ДНК [20].

Выделение ДНК из образцов ДПЖ-матрикса проводили с помощью набора DNeasyBlood&TissueKit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для количественного определения ДНК согласно протоколу использовали флюоресцентный краситель<sup>™</sup> PicogreenQuant-iT (Invitrogen, США), действие которого активировалось излучением с длиной волны 480 нм. Полученная термоэлектронная эмиссия анализировалась на ридере для микропланшетов Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага  $\lambda$  (Invitrogen, США) в диапазоне 0,0–1000 нг/мл.

### Исследование ДПЖ-матрикса на цитотоксичность

Цитотоксичность образцов ДПЖ-матрикса *in vitro* оценивали методом прямого контакта в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*» на культуре фибробластов мыши линии L929. Отрицательным контрольным образцом служила культуральная среда с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone, США). В качестве

положительного контрольного образца использовали стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях. Визуально культуру оценивали с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Метаболическую активность фибробластов после контакта с образцами матрикса оценивали через 24 ч с помощью витального красителя prestoBlue™ CellViabilityReagent (Invitrogen™, США) согласно протоколу производителя. Изменение оптической плотности регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением SparkControl™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде «среднее значение ± среднее квадратичное отклонение». Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## **Изоляция и идентификация островков Лангерганса**

Процедуру выделения ОЛ из ПЖ половозрелой крысы ( $n = 6$ ) проводили на основе классических протоколов с использованием коллагеназы [21, 22] с некоторыми модификациями [11].

Идентификацию островков осуществляли, проводя окрашивание дитизином. Краситель избирательно окрашивал ОЛ, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными [22]. Ресуспендированные изолированные ОЛ в дальнейшем использовали в эксперименте.

## **Культивирование ОЛ в присутствии БМКГ- и ДПЖ-матрикса**

Свежевыделенные ОЛ ресуспендировали в среде DMEM/F12 (1:1) с 10% содержанием ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 1 М Нерес и 50 мг/мл гентамицина и приблизительно равное количество островков ( $n = 300 \pm 25$ ) вносили в три культуральных флакона 25 см<sup>2</sup>. Островки, культивированные без добавления матрикса (культуральный флакон 1), служили контролем. В культуральные флаконы 2 и 3 вносили 0,2–0,3 мл тщательно ресуспендированного БМКГ-матрикса (опытная группа I) и 0,2–0,3 мл суспензии ДПЖ-матрикса со средним размером микрофрагментов  $500 \pm 45$  мкм (опытная группа II) соответственно.

Инкубацию всех культуральных систем проводили в стандартных условиях при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Мониторинг и фотосъемку культивируемых островков проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Япония),

оснащенного цифровой фотокамерой. Смену культуральной среды осуществляли на сроках 1, 2, 3, 6, 8 и 10 суток с целью отбора проб для последующего исследования на содержание инсулина.

## **Метод иммуноферментного анализа для определения содержания инсулина в культуральной среде**

Перед определением содержания в пробах инсулина из культуральных флаконов на указанных сроках инкубации удалялась ростовая среда и заменялась свежей питательной средой. Через 1 час инкубации в прежних условиях (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) отбирали пробы ростовой среды и замораживали (–23 °С) для последующего исследования [23].

Для определения базальной концентрации инсулина в культуральной среде использовали набор для иммуноферментного анализа (ИФА) Rat Insulin ELISA Kit (Thermo scientific, США), действующего по принципу твердофазного сэндвич-метода, согласно инструкции производителя. В данном варианте ИФА используется пара антител, специфичных к пространственно удаленным эпитопам исследуемого антигена, что позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности при определении антигена (инсулина).

Оптическую плотность измеряли, используя микропланшетный ридер Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением SparkControl™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 450 и 550 нм для учета оптических дефектов микропланшета.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Результаты количественного метода ИФА рассчитывали по линейной калибровочной кривой. Все результаты представлены в виде «среднее значение ± среднее квадратичное отклонение». Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Морфологическое исследование ДПЖ-матрикса**

Предварительное морфологическое исследование подтвердило классическую картину строения ПЖ крысы без признаков ишемического повреждения (рис. 1). Образцы децеллюляризованной ПЖ, использованные в эксперименте, демонстрировали в целом сохранность архитектоники стромы и были представлены ажурной волокнистой структурой, напоминающей ячеистую сеть. Сохранившиеся клетки и отдельные клеточные ядра в образцах не обнаруживались. Специфическое окрашивание с DAPI подтверждало отсутствие клеточных ядер и фрагментов ядерного материала в матриксе, тем

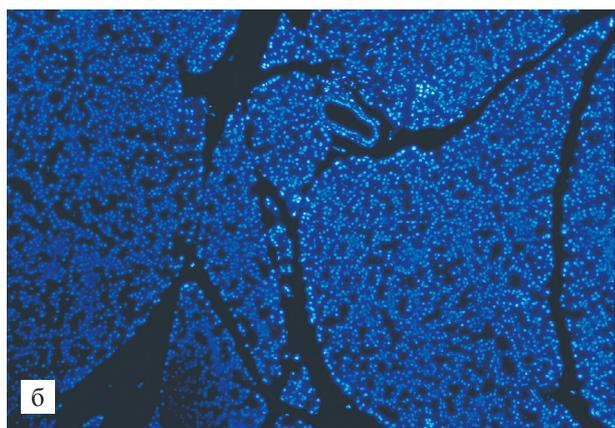
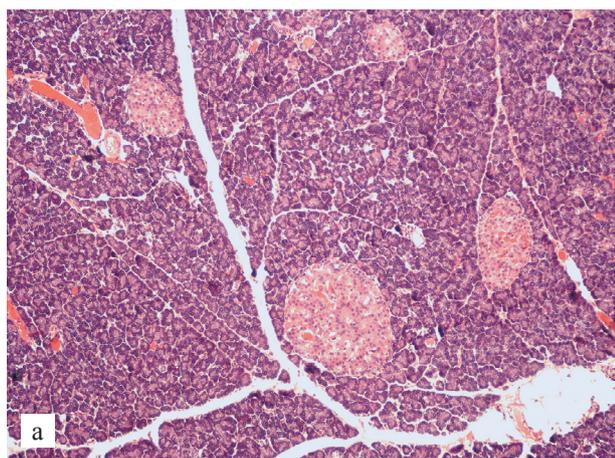


Рис. 1. Гистологическая картина поджелудочной железы крысы: а – гематоксилин и эозин; б – флюоресцентное окрашивание клеточных ядер с DAPI.  $\times 100$

Fig. 1. Histological structure of rat pancreas: a – H&E staining; б – nuclear DAPI staining.  $\times 100$

самым свидетельствуя об эффективности проведенной процедуры децеллюляризации панкреатической ткани (рис. 2, а). Окрашивание образцов по методу Массона позволяло визуализировать коллагеновые волокна в составе полученного матрикса (рис. 2, б), а окрашивание орсеином выявляло также наличие и эластических волокон, что свидетельствовало о сохранности основных фибриллярных белков матрикса (рис. 2, в).

### Количественное определение ДНК в ДПЖ-матриксе

Количественный анализ нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы показал, что матрикс децеллюляризованной ПЖ по сравнению с исходной тканью был в значительной степени ( $p < 0,05$ ) очищен от ДНК (табл. 1).

Таким образом, в результате децеллюляризации в ткани сохранилось не более 0,1 % ДНК, что свидетельствовало о высокой эффективности децеллюляризации, и соответственно, низкой иммуногенности полученного матрикса (рис. 3).

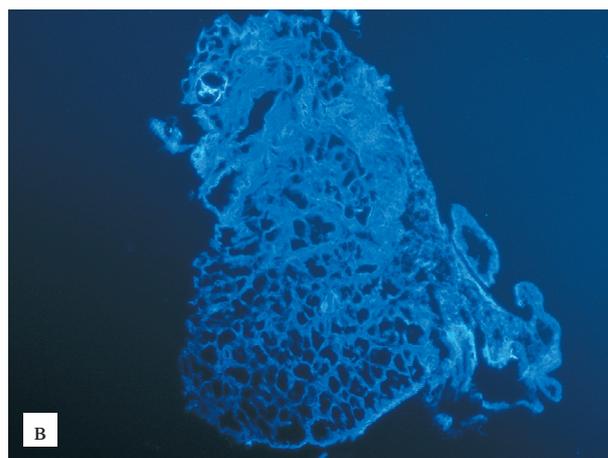
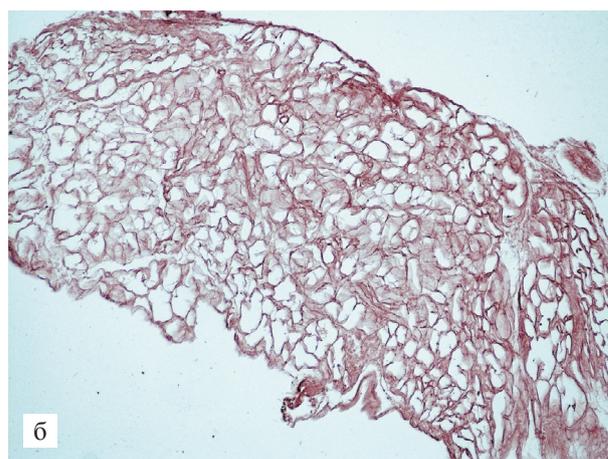
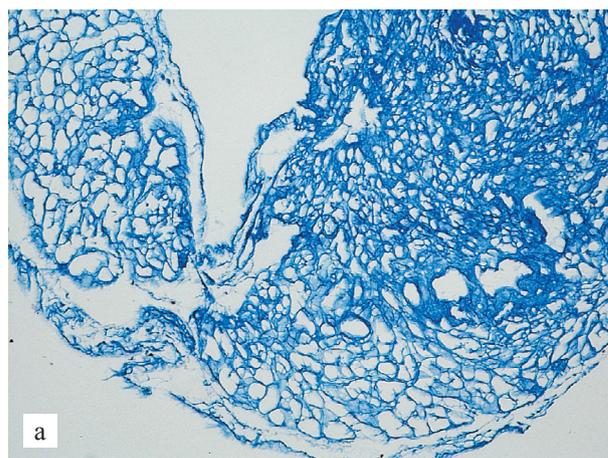


Рис. 2. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы крысы (ДПЖ-матрикс): а – окрашивание на общий коллаген по методу Массона демонстрирует полное отсутствие клеток и сохранность коллагеновых волокон матрикса; б – окрашивание по методу Унны–Тенцера выявляет наличие эластических волокон в матриксе; в – флюоресцентное окрашивание матрикса с DAPI подтверждает отсутствие клеточных ядер в ДПЖ-матриксе.  $\times 200$

Fig. 2. Histological structure of decellularized rat pancreas (DP matrix): а – Masson's trichrome staining demonstrated complete absence of cells and preservation of collagen fibres; б – Unna-Tentser's staining revealed preservation of elastic fibres; в – nuclear DAPI staining confirmed absence of nuclear material in DP matrix.  $\times 200$

Таблица 1

**Количественное содержание ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы**  
**Quantitative content DNA in native and decellularized rat pancreatic tissue**

Образец ткани ПЖ крысы	ДНК, нг Среднее значение ± стандартная ошибка
Нативная ПЖ крысы	1354,8 ± 168,7
Децеллюляризованная ПЖ крысы	1,3 ± 0,3

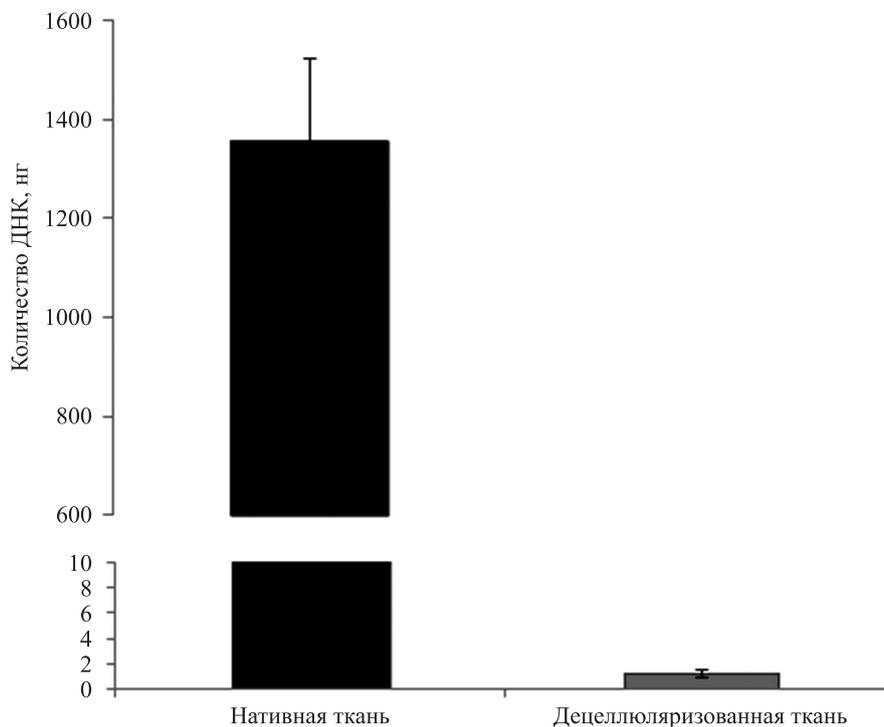


Рис. 3. Сравнительный анализ количественного содержания ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ крысы

Fig. 3. Quantification DNA in native and decellularized rat pancreatic tissue

**Цитотоксичность ДПЖ-матрикса**

Анализ результатов проводился согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с образцами (n = 3) ДПЖ матрикса.

В табл. 2 представлены значения, характеризующие пролиферативную активность фибробластов L929 относительно отрицательного контроля (степень реакции 0). После контакта с образцами ДПЖ-матрикса пролиферативная активность фибробластов относительно отрицательного контроля осталась выше 90% (степень реакции 0), что показало отсут-

ствие цитотоксического действия образцов данного матрикса. Положительный контроль в данном эксперименте продемонстрировал резкую цитотоксичность (степень реакции 4).

**Морфофункциональные свойства ОЛ при инкубации с БМКГ- и ДПЖ-матриксами**

Полученные ОЛ имели округлую или овальную форму и сохраняли целостность, что свидетельство-

Таблица 2

**Результаты исследования на цитотоксичность ДПЖ-матрикса**  
**Results of DP matrix cytotoxicity study**

№ образца	Наименование образца	% пролиферирующих клеток относительно отрицательного контроля	Степень ответной реакции клеток
1	ДПЖ-матрикс	96,25 ± 1,69	0
2	Положительный контроль	7,84 ± 2,34	4

вало о том, что в процессе выделения макроструктура ОЛ не пострадала (рис. 4).

Через сутки культивирования значимых морфологических изменений в монокультуре ОЛ (контрольная группа) не выявлялось. Однако после трех суток обнаруживались первые признаки деструкции: в некоторых островках появлялись полости, а поверхность их становилась бугристой. На рубеже шести суток культивирования большая часть контрольных островков претерпевала фрагментацию.

В опытной группе I значительная часть островков через сутки культивирования проявляла адгезивные свойства и прикреплялась к поверхности БМКГ-матрикса, в то время как остальные островки продолжали флотировать (рис. 5). Такая картина практически не менялась на протяжении всего срока наблюдения (10 суток). При этом ОЛ были визуально сохранены.

В отличие от первой опытной группы островки, культивированные с ДПЖ-матриksom (опытная группа II), не проявляли адгезивных качеств, и находясь в непосредственной близости с матриksom, оставались интактными вплоть до 5 суток инкубации. В дальнейшем не менее половины культивированных ОЛ осаждались на поверхность ДПЖ-матрикса (рис. 6). В течение всего срока наблюдения, так же как и в первой опытной группе, выраженных признаков деструкции островков не обнаруживалось.

### Секреторная функция ОЛ при инкубации с БМКГ- и ДПЖ-матриксами

Через 24 часа культивирования отмечалось, что концентрация инсулина в I и II опытных группах была выше на 26,2% ( $258,4 \pm 9,7 \mu\text{IU/mL}$ ) и на 48,7% ( $304,9 \pm 12,2 \mu\text{IU/mL}$ ) по сравнению с контрольной группой ( $205,1 \pm 11,5 \mu\text{IU/mL}$ ), на третьи сутки инкубации – на 62,1% ( $149,0 \pm 12,3 \mu\text{IU/mL}$ ) и 102,9% ( $186,5 \pm 10,9 \mu\text{IU/mL}$ ) соответственно по сравнению с контрольной группой ( $91,9 \pm 7,8 \mu\text{IU/mL}$ ) (табл. 3).

Таблица 3

Сравнительный анализ содержания инсулина в опытных группах относительно контрольной группы (монокультура ОЛ), %

Comparative analysis of insulin in experimental groups relative to the control group (OL monoculture), %

Сутки	ОЛ + БМКГ (I опытная группа)	ОЛ + ДПЖ (II опытная группа)
1	$26,2 \pm 3,8$	$48,7 \pm 4,0$
2	$31,6 \pm 6,2$	$71,6 \pm 5,7$
3	$62,1 \pm 8,3$	$102,9 \pm 5,8$
6	$249,6 \pm 10,4$	$373,6 \pm 6,9$

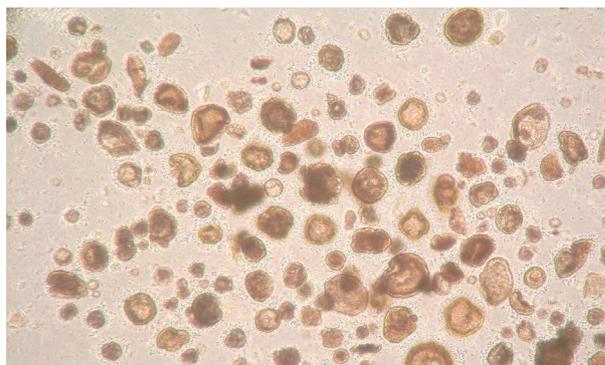


Рис. 4. Изолированные островки Лангерганса, инвертированный микроскоп.  $\times 200$

Fig. 4. Isolated Langerhans islets, inverted microscope.  $\times 200$

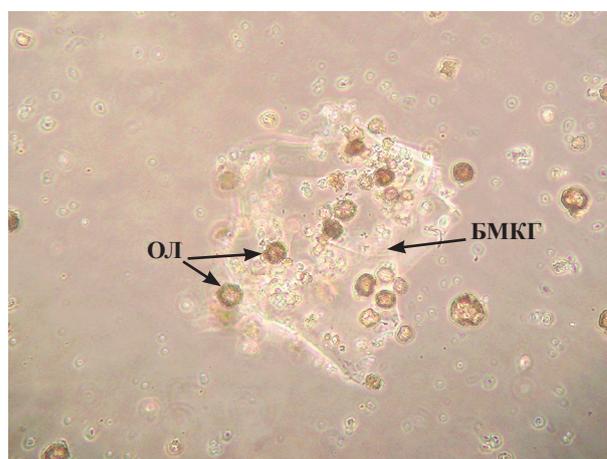


Рис. 5. Островки Лангерганса, культивируемые с БМКГ, 7 суток инкубации, инвертированный микроскоп.  $\times 100$

Fig. 5. Langerhans islets cultivated with BMCH, 7 days, inverted microscope.  $\times 100$

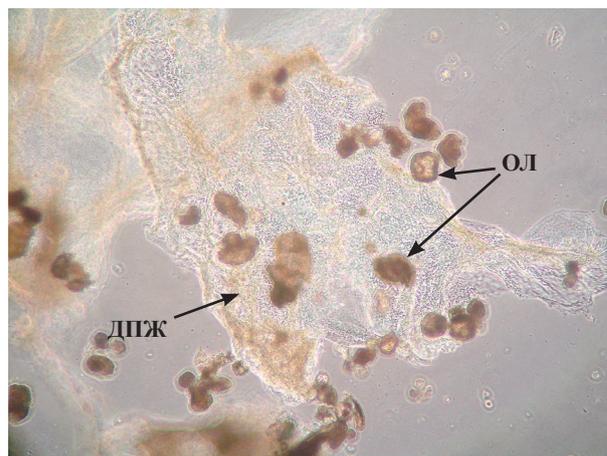


Рис. 6. Островки Лангерганса, культивируемые с ДПЖ-матриksom, 7 суток инкубации, инвертированный микроскоп.  $\times 100$

Fig. 6. Langerhans islets cultivated with decellular rat pancreas (DP matrix), 7 days, inverted microscope.  $\times 100$

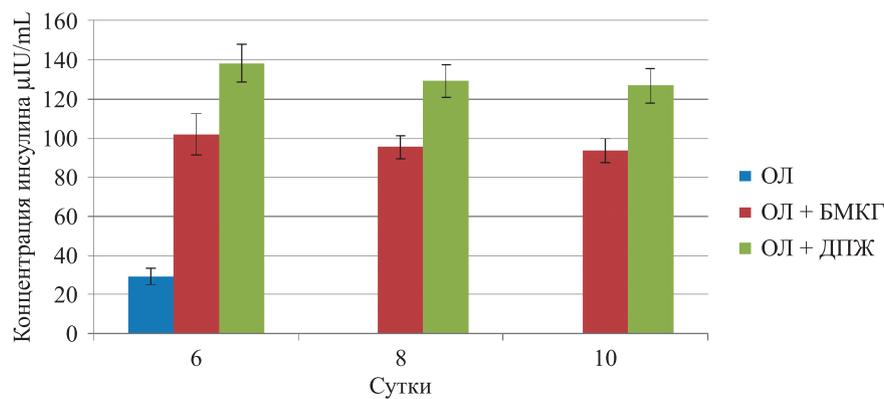


Рис. 7. Сравнительный анализ концентрации инсулина в контрольной (монокультура ОЛ) и опытных (ОЛ, культивируемые с БМКГ- и с ДПЖ-матриксами соответственно) группах

Fig. 7. Quantification insulin in the control (monoculture OL) and experimental (OL, cultured with BMCH and DP matrix respectively) groups

Выявленное различие в концентрации гормона в контрольной и опытных группах на этих сроках можно объяснить позитивным влиянием матрикса на функциональную способность ОЛ. На шестые сутки культивирования наблюдали еще более значимую разницу между концентрациями инсулина в I и II опытных группах ( $102,1 \pm 10,6$  и  $138,3 \pm 9,6$   $\mu\text{IU/mL}$  соответственно) и контролем ( $29,2 \pm 4,1$   $\mu\text{IU/mL}$ ). Это коррелирует с морфологическими данными о деструктивных изменениях, происходящих в островках после трех суток суспензионного культивирования. На 8–10-е сутки инкубации в контрольной группе сохранившиеся островки не обнаруживались, по этой причине исследовать культуральную среду представлялось неактуальным. В то же время в указанные сроки в опытных группах концентрация инсулина практически оставалась неизменной: I группа –  $93,7 \pm 6,2$   $\mu\text{IU/mL}$ , II группа –  $126,9 \pm 8,9$   $\mu\text{IU/mL}$ , при этом уровень секреции инсулина во II группе (ОЛ в присутствии тканеспецифического ДПЖ-матрикса) был на 35,5% выше, чем в I группе (ОЛ в присутствии БМКГ-матрикса) (рис. 7). Несмотря на то что концентрация инсулина, выраженная в абсолютных значениях, с увеличением срока культивирования снижалась, положительная тенденция влияния матрикса (БМКГ и ДПЖ) на секреторную функцию островков в процентном отношении сохранялась на протяжении всего срока наблюдения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БМКГ- и тканеспецифический ДПЖ-матрикса способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных ОЛ, но и пролонгированию их секреторной способности в течение 10 дней по сравнению с монокультурой ОЛ. В условиях проведенных экспериментов показано преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса

для создания биоинженерной конструкции ПЖ по сравнению с БМКГ-матриксами.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumar N, Joisher H, Ganguly A. Polymeric scaffolds for pancreatic tissue engineering: a review. *Rev Diabet Stud.* 2018 Winter; 14 (4): 334–353. doi: 10.1900/RDS.2017.14.334.
2. Lemos NE, de Almeida Brondani L, Dieter C, Rheinheimer J, Boucas AP, BauermannLeitao C et al. Use of additives, scaffolds and extracellular matrix components for improvement of human pancreatic islet outcomes *in vitro*: a systematic review. *Islets.* 2017 Sep 3; 9 (5): 73–86. doi: 10.1080/19382014.2017.1335842.
3. Llacua LA, Faas MM, de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia.* 2018 Jun; 61 (6): 1261–1272. doi: 10.1007/s00125-017-4524-8.
4. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplantation.* 2009; 18 (1): 1–12. doi: 10.3727/096368909788237195.
5. Fisher SA, Tam RY, Shoichet MS. Tissue mimetics: engineered hydrogel matrices provide biomimetic environments for cell growth. *Tissue Engineering.* 2014; Part A, 20 (5, 6): 895–898. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0765.
6. Coronel M, Stabler C. Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24: 900–908. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.004.
7. Jiang K, Chaimov D, Patel SN, Liang JP, Wiggins SC, Samojlik MM et al. 3-D physiometric extracellular matrix hydrogels provide a supportive microenvironment for rodent and human islet culture. *Biomaterial.* 2019 Apr; 198: 37–48. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.08.057.

8. Перова НВ, Севастьянов ВИ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплант. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 111–116. Perova NV, Sevastianov VI. Sfero®GEL – inyecktsionniy biodegradiruyemiy implant. *Prakticheskaya meditsina*. 2014; 8 (84): 111–116.
9. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A et al. Lung-derived microscaffolds facilitate diabetes reversal after mouse and human intraperitoneal islet transplantation. *PLoS One*. 2016 May 26; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053.
10. Szebeni GJ, Tancos Z, Feher LZ, Alfoldi R, Kobolak J, Dinnyes A, Puskas LG. Real architecture for 3D Tissue (RAFT) culture system improves viability and maintains insulin and glucagon production of mouse pancreatic islet cells. *Cytotechnology*. 2017; 69 (2): 359–369. doi: 10.1007/s10616-017-0067-6.
11. Баранова НВ, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Севастьянов ВИ. Микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель как матрикс для изолированных островков Лангерганса поджелудочной железы крысы. *Гены и клетки. Материалы III Национального конгресса по регенеративной медицине*. 2017; XII (3): 38–39. Baranova NV, Kirsanova LA, Bubentsova GN, Sevastianov VI. Microstructured collagen-containing hydrogel as matrix for isolated islets of rat pancreas. *Genes and Cells. Materials of the 3rd National congress on regenerative medicine*. 2017, XII (3): 38–39.
12. Rana D, Zreigat H, Benkirane-Jessel N, Ramakrishna S, Ramalingam M. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Apr; 11 (4): 942–965. doi: 10.1002/term.2061.
13. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine neopancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017 Feb 2; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
14. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3 D culture of MIN-6 cells on decellularized pancreatic scaffold: *in vitro* and *in vivo* study. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 432645. doi: 10.1155/2015/432645.
15. Keane TJ, Londono R, Turner NJ, Badylak SF. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials*. 2012 Feb; 33 (6): 1771–1781. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011/10/054.
16. Smink AM, de Vos P. Therapeutic strategies for modulating the extracellular matrix to improve pancreatic islet function and survival after transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018 May 19; 18 (7): 39. doi: 10.1007/s11892-018-1014-4.
17. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, Orlando G. Extracellular matrix scaffold technology for bioartificial pancreas engineering: state of the art and future challenges. *J Diab Sci Technol*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
18. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling J, Pareta R, Mack D, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013 July; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
19. Севастьянов ВИ, Шагидулин МЮ, Скалецкий НН, Перова НВ, Довжик ИА, Готье СВ. Доклинические исследования безопасности и эффективности биомедицинских клеточных продуктов для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов. Под ред. ак. В.А. Ткачука. М., 2017: 187–255. Sevastianov VI, Shagidulin MYu, Skaletskiy NN, Dovzhik IA, Gautier SV. Preclinical studies of safety and efficacy of biomedical cell products for regeneration of articular cartilage, liver and pancreas. Guidelines for preclinical studies of biomedical cell products. Edited by ac. V.A. Tkachuk. M., 2017: 187–255.
20. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
21. London NJ, Swift SM, Clayton HA. Isolation, culture and functional evaluation of islets of Langerhans. *Diabetes Metab*. 1998 Jun; 24 (3): 200–207. PMID: 9690051.
22. Pang X, Xue W, Feng X, Tian X, Teng Y, Ding X et al. Experimental studies on islets isolation, purification and function in rats. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Nov 15; 8 (11): 20932–20938. PMID: 26885021.
23. Sigmundsson K, Ojala JRM, Ohman MK, Osterholm AM, Moreno-Moral A, Domogatskaya A et al. Culturing functional pancreatic islets on 65-laminins and curative transplantation to diabetic mice. *Matrix Biol*. 2018 Sep; 70: 5–19. doi: 10.1016/j.matbio.2018.03.018.

Статья поступила в редакцию 21.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 21.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-54-66

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА – АОРТОКОРОНАРНОЕ ШУНТИРОВАНИЕ, ТРАНСПЛАНТАЦИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА: РЕЗУЛЬТАТЫ РАНДОМИЗИРОВАННОГО, СЛЕПОГО, ПЛАЦЕБО КОНТРОЛИРУЕМОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

*В.В. Комок, Н.С. Буненков, С.А. Белый, В.М. Пизин, В.М. Кондратьев, А.В. Дулаев, А.Е. Кобак, Т.С. Максимова, И.П. Сергиенко, Е.В. Парусова, Л.А. Смирнова, Е.В. Бабенко, Б.В. Афанасьев, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава*

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Введение.** Несмотря на несомненные успехи в лечении пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), пока не удастся добиться существенного снижения смертности при данном заболевании. Учитывая это, в настоящий момент повсеместно ведутся работы в отношении исследования новых методик с целью увеличить эффективность уже существующих стандартов. Одной из таких перспективных методик является клеточная/регенеративная терапия аутологичными моноклеарами костного мозга (АМНКМ). Однако несмотря на то что АМНКМ исследуются на протяжении более 10 лет, к настоящему моменту не получено однозначных данных по ряду вопросов. **Цель.** Провести оценку результатов трансплантации АМНКМ при выполнении операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) в комбинированном лечении ИБС. **Материалы и методы.** Проанализированы данные 408 пациентов, поступивших в клинику с 2013-го по 2016 г. для планового хирургического лечения ИБС. В работу включено 117 человек согласно дизайну исследования. Проведена рандомизация в 3 группы: группа 0 – операция АКШ и интрамиокардиальное введение 0,9% раствора NaCl – контрольная группа, группа 1 – операция АКШ и интрамиокардиальное введение АМНКМ, группа 2 – операция АКШ, интрамиокардиальное и внутривенное введение АМНКМ. Через 12 месяцев выполнена оценка динамики – функционального класса стенокардии напряжения и сердечной недостаточности, ЭхоКГ, speckle tracking (оценка степени деформации миокарда), тредмил-теста, теста с 6-минутной ходьбой, суточного мониторирования ЭКГ, опросников качества жизни, коронарографии. Качественные показатели рассчитаны при помощи критериев Пирсона ( $\chi^2$ ) и Фишера. Количественные показатели – критерии Краскела–Уоллиса и Вилкоксона. Для выявления определенных факторов тяжести и исследования однородности данных – факторный анализ. Для исследования ведущих характеристик, определяющих дифференцировку между группами, проведен дискриминантный анализ. Для анализа дисперсии с учетом различных факторов использовали модель дисперсионного анализа для зависимых выборок – Repeated Measures ANOVA. **Результаты.** В группах наблюдения повсеместно отмечено улучшение как систолической, так и диастолической функции миокарда. Тест с 6-минутной ходьбой показал статистически значимый прирост в группах 1 и 2 по сравнению с контролем: группа 0 –  $315,06 \pm 17,6$  ( $433,54 \pm 20,6$ ), группа 1 –  $319,8 \pm 24,5$  ( $524,4 \pm 28,7$ ), группа 2 –  $329,9 \pm 25,3$  ( $452,7 \pm 29,7$ ) метра. Отмечено значимое уменьшение функционального класса стенокардии напряжения в группах 1 и 2 по сравнению с контрольной группой. Процент функционирующих коронарных шунтов через 12 месяцев наблюдения составил 87,6% в группе 0, в группах 1 и 2 это соотношение составило 96,2% и 97,3% соответственно. Выявлены предикторы общей эффективности: курение, исходная диастолическая дисфункция миокарда, фракция выброса левого желудочка. **Заключение.** Трансплантация АМНКМ в дополнение к хирургическому лечению ИБС позволяет улучшить сократительную способность миокарда, увеличить толерантность к физическим нагрузкам, увеличить продолжительность функционирования коронарных шунтов в срок

**Для корреспонденции:** Комок Владимир Владимирович. Адрес: 196084, Санкт-Петербург, ул. Смоленская, д. 1, кв. 38. Тел. (904) 632-19-00. E-mail: vladimir\_komok@mail.ru

**For correspondence:** Komok Vladimir Vladimirovich. Address: 1-38, Smolenskaya str., St. Petersburg, 196084, Russian Federation. Tel. (904) 632-19-00. E-mail: vladimir\_komok@mail.ru

наблюдения 12 месяцев. Проведенное исследование показало необходимость проведения этапных аналитических расчетов с целью возможной коррекции дальнейшего выполнения работы.

*Ключевые слова:* клиническое исследование, аортокоронарное шунтирование, реваскуляризация, реперфузионное повреждение, ишемическая болезнь сердца, speckle tracking, диастолическая дисфункция, сердечная недостаточность, аутологичные мононуклеары костного мозга, интрамиокардиальное введение.

## EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF COMBINED TREATMENT OF CORONARY HEART DISEASE – CORONARY ARTERY BYPASS GRAFTING, TRANSPLANTATION OF AUTOLOGOUS BONE MARROW MONONUCLEAR CELLS: A RANDOMIZED, BLIND PLACEBO-CONTROLLED STUDY

*V.V. Komok, N.S. Bunenkov, S.A. Belyi, V.M. Pizin, V.M. Kondratev, A.V. Dulaev, A.E. Kobak, T.S. Maksimova, I.P. Sergienko, E.V. Parusova, L.A. Smirnova, E.V. Babenko, B.V. Afanasev, A.S. Nemkov, G.G. Khubulava*

Academician I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

**Introduction.** Despite the undoubted success in treating patients with coronary heart disease (CHD), it is not yet possible to achieve a significant reduction in mortality in this disease. Taking this in account, at present, studies is being done everywhere on the search of new methods in order to increase the efficiency of existing standards. One of such promising techniques is cellular/regenerative therapy with autologous bone marrow mononuclear cells (AMNCM). However, despite the fact, that AMNCMs have been studied for more than 10 years, clear data, on a number of questions, have not been received, yet. **Aim:** to evaluate the results of AMNCM transplantation during the performance of aorto-coronary bypass surgery (CABG) in the combined treatment of coronary artery disease. **Materials and methods.** The data of 408 patients, admitted to the clinic from 2013 to 2016 years, for planned surgical treatment of coronary artery disease were analyzed. In work enrolled 117 patients, according to the design of the study. Patients were randomized in 3 groups: group 0 – CABG operation and intramyocardial injection of 0.9% NaCl solution, group 1 – CABG operation and intramyocardial injection of AMNCM, group 2 – CABG operation and intramyocardial and intragraft injection of AMNCM. After 12 months an assessment of the dynamic was made – functional class of angina pectoris and heart failure, echocardiography, speckle tracking, treadmill test, 6-minute walk test, daily ECG monitoring, quality of life questionnaires, coronary angiography. Qualitative indicators were calculated using Pearson ( $\chi^2$ ), and Fisher criteria. Quantitative indicators were calculated using criteria Kruskal–Wallis and Wilcoxon. A factor analysis to identify certain severity factors and study data homogeneity was applied. To study the leading characteristics that determine the differentiation between groups, discriminant analysis was chosen. For analysis of variance, taking into account various factors, the model of variance for dependent samples Repeated Measures ANOVA was used. **Results.** In the observation groups, improvement in both systolic and diastolic myocardial function was universally noted. Test with a 6-minute walk showed a statistically significant increase in groups 1 and 2 as compared with the control: group 0 –  $315,06 \pm 17,6$  ( $433,54 \pm 20,6$ ), group 1 –  $319,8 \pm 24,5$  ( $524,4 \pm 28,7$ ), group 2 –  $329,9 \pm 25,3$  ( $452,7 \pm 29,7$ ) meters. A significant decrease in the functional class of angina pectoris in groups 1 and 2 as compared with the control group. The percentage of functioning coronary shunts after 12 months of follow-up was 87,6% in group 0, in groups 1 and 2 this ratio was 96,2% and 97,3% respectively. Predictors of overall effectiveness were identified: smoking, initial diastolic myocardial dysfunction, ejection fraction of the left ventricle. **Conclusion.** AMNCM transplantation, in addition to the surgical treatment of coronary heart disease, can improve myocardial contractility, increase exercise tolerance, and increase the duration of functioning of coronary shunts at the follow-up period of 12 months. The study showed the need for stage-by-stage analytical calculations with the aim of possible correction of further work.

*Key words:* clinical trial, coronary artery bypass grafting, revascularization, reperfusion injury, ischemic heart disease, speckle tracking, diastolic myocardial dysfunction, diastolic heart failure, bone marrow stem cells, intramyocardial injection.

## ВВЕДЕНИЕ

По данным ГНИЦ профилактической медицины, 10 миллионов трудоспособного населения России страдают ишемической болезнью сердца (ИБС), более трети из них имеют стабильную стенокардию. Экономические потери в результате подобной заболеваемости только за 2016 год превысили 2,7 трлн рублей и составили 3,2% от ВВП стран. В структуре ущерба среди всех болезней системы кровообращения ИБС удерживает первое место (свыше 1 трлн рублей) [1].

Экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) прогнозируется дальнейший рост сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности, как в развитых, так и развивающихся странах, обусловленный старением населения и особенностями образа жизни.

Несмотря на несомненные успехи в лечении пациентов с ИБС благодаря современным достижениям рациональной фармакотерапии, разработке и внедрению различных методик восстановления коронарного кровотока – шунтирования, ангиопластики и стентирования коронарных артерий, – пока не удается добиться существенного снижения смертности при данном заболевании.

Согласно статистическим данным, к 2030 году общая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) составит около 23,3 млн человек. Для сравнения: в 2002 году этот показатель составил 16,7 млн [2].

The American Heart Association, в свою очередь, на основе проведенного анализа смертности приводит следующие данные: более 2150 американцев умирают от ССЗ ежедневно, при этом в среднем 1 летальный исход приходится на каждые 40 секунд. Обращает на себя внимание, что около 155 тыс. человек, которые умерли от данного вида патологии в 2011 году, были в возрасте менее 65 лет [3].

В Российской Федерации ССЗ являются ведущей причиной смерти населения (вклад в общую смертность составляет 57%). И этот показатель в России является одним из самых высоких в мире. Данный вид патологии – наиболее частая причина госпитализаций и потерь трудоспособности населения РФ.

Учитывая указанные данные, в целях борьбы с возрастными патологиями в конце XX века в экономически развитых странах были запущены инновационные программы, направленные на развитие приоритетных исследований и практических разработок по регенеративной медицине как одной из перспективных методик для улучшения эффективности уже существующих стандартов.

Столь высокий интерес к регенеративной терапии обусловлен тем, что стволовые клетки стимулируют процессы неоангиогенеза. Подобные процедуры

позволяют улучшить перфузию миокарда, степень локальной и глобальной сократимости, препятствуют ремоделированию миокарда и процессам апоптоза клеток [4–10].

В отношении аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга получены те же результаты [11–14].

Однако, несмотря на то что АМНКМ исследуются на протяжении более 10 лет, к настоящему моменту не получено однозначных данных по ряду вопросов: тип клеточного материала, способы трансплантации, объем вводимого клеточного материала, общая безопасность и эффективность.

Указанные вопросы стимулируют исследователей к новым работам [15–16].

В рамках рандомизированного, слепого, плацебо контролируемого исследования TAMIS (Transplantation of Autologous bone marrow Mononuclear cells in the combined treatment of coronary heart disease), ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02059512) была выполнена комплексная оценка безопасности, эффективности и прогнозируемого результата в комбинированном лечении ишемической болезни сердца (ИБС) при сочетании операции аортокоронарного шунтирования (АКШ) и трансплантации АМНКМ у пациентов с коронарной и сердечной недостаточностью (фракция выброса левого желудочка в референсных значениях).

Исследование проведено после одобрения этического комитета ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (протокол № 147 от 26.02.2013 г.). Работа завершена в рамках государственного задания ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, грант по теме: «Совершенствование методов хирургического лечения ИБС с применением клеточных технологий. Платформа «Кардиология и ангиология» (115091630053).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

За период проведения исследования с 2013-го по 2016 год проанализированы данные 408 пациентов, поступивших в клинику НИИ хирургии и неотложной медицины ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» Минздрава России для плановой операции АКШ в условиях искусственного кровообращения (ИК) и имеющих, по данным ангиографического исследования, 3 и более ветвей стенозированных коронарных артерий. В исследование вошли 117 человек, соответствующих критериям включения: мужчины и женщины от 18 до 80 лет, наличие стенокардии напряжения III–IV функционального класса, подписание информированного добровольного согласия. Критерии исключения: непереносимость гепарина и гидроксиэтилкрахмала (HES), наличие патологии щитовидной железы (гипотиреоз, гипертиреоз), сопутствующая патология с прогнозируемой продолжительностью жизни до 3 лет, инфекционные

заболевания, одновременное участие в другом исследовании, отказ пациента от участия в исследовании. Рандомизация выполнена, согласно таблице случайных чисел, в следующие группы: группа 0 (46 человек) – группа контроля – выполнение операции АКШ и интрамиокардиальное введение 0,9% раствора NaCl; группа 1 (34 человека) – выполнение АКШ и интрамиокардиальное введение АМНКМ. Группа 2 (37 человек) – АКШ, интрамиокардиальное и внутришунтовое введение АМНКМ (рис. 1).

Окончательный объем полученного материала рассчитан на выборке пациентов, составивших 37 в группе 0, в группах 1 и 2 – 25 и 23 соответственно. Остальные пациенты, включенные в исследование, на момент контрольного обследования чувствовали себя удовлетворительно, но по различным причинам объективные данные по их клиническому состоянию получены не были. Они были исключены из окончательного статистического анализа.

Для оценки безопасности, эффективности, прогнозирования результатов трансплантации АМНКМ в сочетании с АКШ в условиях ИК проведен анализ ряда параметров (табл. 1). Анализ динамики указан-

ных переменных выполнен в установленные дизайном исследования сроки.

Исходно пациенты в группах наблюдения по основным параметрам сравнимы (табл. 2).

Базовое обследование пациента для включения в исследование соответствовало стандартному объему (лабораторному, инструментальному) перед операцией АКШ в условиях ИК.

Риск неблагоприятного исхода предстоящего оперативного вмешательства оценивался согласно шкале EuroScore II.

Все пациенты получали адекватную медикаментозную терапию согласно международным рекомендациям в зависимости от индивидуальной клинической ситуации. Коррекция проводилась по мере необходимости на протяжении периода госпитализации.

Эхокардиография (ЭхоКГ) проводилась на аппарате GE Vivid 7 по стандартной методике.

Структурные показатели, полученные в результате исследования, рассчитаны согласно рекомендациям ASE и EAE 2015 [17].

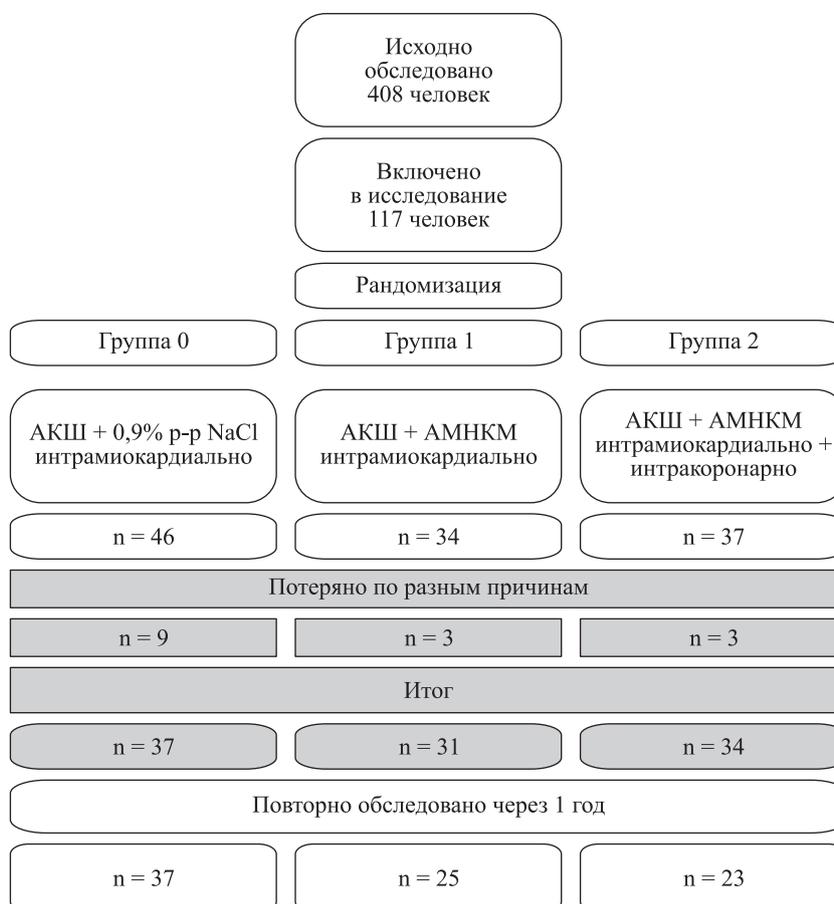


Рис. 1. Дизайн исследования TAMIS (Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in the Combined Treatment of Coronary Heart Disease)

Fig. 1. Study design TAMIS (Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in the Combined Treatment of Coronary Heart Disease)

Таблица 1

**Разделы клинического исследования**  
**Clinical study sections**

I. Оценка безопасности дополнительной трансплантации АМНКМ	II. Оценка эффективности	III. Прогнозирование результатов лечения (влияние ряда параметров)
1. Оценка риска неблагоприятного исхода предстоящего оперативного вмешательства согласно шкале EuroScore II. 2. Оценка интраоперационных показателей АВС; Hb, Ht, K+ по окончании ИК и по окончании операции. 3. Восстановление сердечного ритма по завершении основного этапа операции (дефибрилляция / самостоятельное восстановление). 4. Время искусственного кровообращения (ИК). 5. Время аноксии. 6. Объем отделяемого по дренажам в 1-е и 2-е сутки послеоперационного периода. 7. Уровень КФК МВ, миоглобина, тропонина I в 1-е и 3-и сутки послеоперационного периода. 8. Данные ЭхоКГ на 7–14-е сутки послеоперационного периода (оценка сократительной способности миокарда – наличие дополнительных зон гипо-, акинезии по сравнению с исходными данными). 9. Частота послеоперационных осложнений (гидроторакс, гидроперикард, нарушения ритма). 10. Длительность пребывания в реанимационном отделении. 11. Длительность пребывания в стационаре (койко-день).	1. Оценка систолической и диастолической функции миокарда (ЭхоКГ). 2. Оценка данных нагрузочных тестов: тредмил-теста, суточного мониторирования ЭКГ. 3. Оценка данных теста с 6-минутной ходьбой (6MWD). 4. Оценка функционального класса стенокардии напряжения и сердечной недостаточности по NYHA. 5. Оценка качества жизни (Миннесотский опросник, Сизлский опросник, опросник SF-36). 6. Пройдяемость шунтов через 12 месяцев после проведенного лечения (ангиографическое исследование). 7. Оценка состояния миокарда (до и после лечения) AFI 2D Strain, speckle tracking. 8. Зависимость и продолжительность положительного клинического эффекта от объема введенного клеточного материала.	1. Возраст. 2. Пол. 3. Индекс массы тела. 4. Сахарный диабет. 5. Курение. 6. Семейный анамнез сердечно-сосудистых событий. 7. Длительность анамнеза ИБС. 8. Уровень общего холестерина и его фракций. 9. Уровень лейкоцитоза и СРБ (исходно и динамика снижения в послеоперационном периоде). 10. Уровень креатинина. 11. Наличие/отсутствие экстракардиальной артериопатии. 12. Введение АМНКМ интрамиокардиально или внутрикороноарно. 13. Оценка костного мозга: количество ядросодержащих клеток, CD34+, CD133+.

*Примечание.* АМНКМ – аутологичные мононуклеары костного мозга; АВС – активированное время свертывания; Hb – гемоглобин; Ht – гематокрит; КФК МВ – креатинфосфокиназа, МВ-фракция; ИБС – ишемическая болезнь сердца; СРБ – С-реактивный белок.

*Note.* АМНКМ – autologous bone marrow mononuclear cells; АВС – active clotting time; Hb – hemoglobin; Ht – hematocrit; КФК МВ – creatin phosphokinase, МВ fraction; ИБС – ischemic heart disease; СРБ – C-reactive protein.

Таблица 2

**Базовые характеристики пациентов в группах наблюдения**  
**Basic characteristics of patients in observation groups**

	Группа 0 (n = 37)		Группа 1 (n = 25)		Группа 2 (n = 23)		p
Возраст (лет)	61 ± 8	45–79	61,7 ± 6,8	47–73	59,5 ± 5,4	51–70	0,44
Пол (м/ж)	6/31		4/21		3/20		
ИМТ (кг/м <sup>2</sup> )	28,6 ± 3,59	21,1–34,8	28,05 ± 4,46	22,9–44,8	28,09 ± 3,57	22,5–35,4	0,46
СД	6	16,22%	5	20%	4	17,39%	0,93
ГБ (ст.)							
2	1	2,70%	0	0	0	0	0,52
3	36	97,30%	25	100%	23	100%	
АГ (ст.)							
0	2	5,41%	3	12%	2	8,70%	0,82
1	6	16,22%	5	20%	5	21,74%	
2	14	37,84%	11	44%	7	30,43%	
3	15	40,54%	6	24%	9	39,13%	

	Группа 0 (n = 37)		Группа 1 (n = 25)		Группа 2 (n = 23)		р
Периферическая артериопатия	11	29,73%	4	16%	6	26,09%	0,46
ОИМ до							0,13
1	14	37,84%	17	68%	9	39,13%	
2	4	10,81%	3	12%	6	26,09%	
3	2	5,41%	1	4%	1	4,35%	
Курение	7	18,92%	2	8%	4	17,39%	0,78
Семейный анамнез ССЗ	19	51%	11	44%	10	43,48%	0,78
Дебют ИБС (мес.)	71,9 ± 70,9	6–300	62,9 ± 79,2	5–240	76,9 ± 59,4	6–240	0,11
до 5 лет	23	62,2%	16	64%	12	52,2%	
6–10 лет	8	21,6%	4	16%	8	34,8%	
>10 лет	6	16,2%	5	20%	3	13,04%	
ФК стенокардии напряжения							0,85
3	32	86,49%	23	92%	21	91,30%	
4	3	8,11%	2	8%	1	4,35%	
безболевого	1	2,70%	0	0	1	4,35%	
ФК СН NYHA							0,24
2	29	78,38%	24	96%	21	91,30%	
3	3	8,11%	0	0	0	0	
ОХ (ммоль/л)	4,49 ± 1,08	2,6–6,46	4,5 ± 1,24	3,05–7,69	4,6 ± 1,49	2,3–8,3	0,99
ЛПОНП (ммоль/л)	0,96 ± 0,35	0,41–1,65	0,94 ± 0,5	0,44–1,92	0,77 ± 0,3	0,26–1,34	0,30
ЛПВП (ммоль/л)	2,7 ± 0,89	1,34–4,44	2,58 ± 1,05	1,35–4,4	2,7 ± 1,26	0,76–5,63	0,90
ЛПНП (ммоль/л)	0,98 ± 0,31	0,62–1,73	1,16 ± 0,37	0,65–1,63	1,13 ± 0,29	0,56–1,58	0,20
ТГ (ммоль/л)	2,04 ± 0,68	0,84 ± 3,59	1,69 ± 0,72	0,82–3,35	1,63 ± 0,62	0,57–2,92	0,07
КА	4,07 ± 1,32	2,1–6	3,27 ± 1,9	1,4–7,1	4,5 ± 5,2	1,3–24,4	0,3
Креатинин (мкмоль/л)	0,09 ± 0,02	0,06–0,1	0,09 ± 0,02	0,06–0,15	0,08 ± 0,02	0,06–0,1	0,05
СРБ (мг/л)	5,9 ± 11,07	1–59,3	2,56 ± 1,96	0,7–7,7	5,3 ± 5,38	1–24,4	0,06
СКФ (мл/мин) СКД-ЕРІ	79,89 ± 15,8	49–116	77,6 ± 16,03	42–111	84,2 ± 17,26	49–127	0,05
EuroScoreII	1,3 ± 0,68	0,7–3,6	1,07 ± 0,47	0,55–2,54	1,02 ± 0,4	0,5–1,85	0,24
Нитраты (принимали)	21	56,76%	11	44%	10	43,48%	0,49
Диуретики	5	13,51%	10	40%	3	13,04%	0,07
иАПФ	18	48,65%	9	36%	16	69,57%	0,06
aReAG	5	13,51%	3	12%	4	17,39%	0,86
β-блокаторы	35	94,59%	20	80%	23	100,00%	0,05
антагонисты СА	5	13,51%	6	24%	4	17,39%	0,57
Антиагреганты	18	48,65%	12	48%	9	39,13%	0,75
Статины	27	72,97%	16	64%	15	65,22%	0,7
Антикоагулянты	6	16,22	0	0	2	8,7%	0,1

*Примечание.* ИМТ – индекс массы тела; СД – сахарный диабет; ГБ – гипертоническая болезнь; АГ – артериальная гипертензия; ОИМ – острый инфаркт миокарда; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ИБС – стенокардия напряжения; ФК – функциональный класс; СН – сердечная недостаточность; ОХ – общий холестерин; ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ТГ – триглицериды; КА – коэффициент атерогенности; СРБ – С-реактивный белок; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; иАПФ – ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента; aReAG – антагонисты рецепторов к ангиотензину; антагонисты СА – антагонисты кальциевых каналов.

*Note.* ИМТ – body mass index; СД – diabetes; ГБ – hypertensive disease; АГ – arterial hypertension; ОИМ – acute myocardial infarction; ССЗ – cardiovascular disease; ИБС – angina pectoris; ФК – functional class; СН – heart failure; ОХ – total cholesterol; ЛПОНП – very low density lipoproteins; ЛПВП – high density lipoproteins; ЛПНП – low density lipoproteins; ТГ – triglycerides; КА – atherogenic coefficient; СРБ – C-reactive protein; СКФ – glomerular filtration rate; иАПФ – angiotensin converting enzyme inhibitors; aReAG – angiotensin receptor antagonists; antagonists CA – calcium channel antagonists.

Линейные и объемные показатели левого желудочка ЛЖ рассчитывались с учетом индекса массы тела (ИМТ), то есть учитывались индексы указанных параметров.

Параметры оценки диастолической функции ЛЖ: скорость трансмитрального потока (пик E / пик A) и их соотношение, время замедления пика E (DT), время изоволюметрического расслабления ЛЖ (IVRT).

Дополнительная оценка региональной систолической функции ЛЖ была проведена с помощью приложения автоматического создания функциональных изображений (AFI) на основе функции 2D Strain, осуществляющего расчет деформации ткани миокарда путем отслеживания деформации по двухмерным изображениям. После программной обработки результат был получен в виде 6 секторов (17-сегментная схема), на которой показана максимальная систолическая продольная деформация в условных цветах и числовых значениях, данные о глобальной деформации для каждой проекции и средние значения глобальной деформации для всего ЛЖ. Динамика указанных показателей: исходно при включении пациента в исследование, на 7–14-е сутки послеоперационного периода, через 12 месяцев после проведенного исследования.

Выполнение тредмил-теста было направлено на определение толерантности к физической нагрузке, на выявление клинических и электрокардиографических признаков ишемии миокарда. Пациенту задавалась физическая нагрузка (бегущая дорожка), которая постепенно ступенчато увеличивалась в соответствии с протоколом R. Bruce.

Параллельно регистрировались показатели работы сердца (давление, пульс, электрокардиограмма) и изменения их в зависимости от нагрузки.

Тест с 6-минутной ходьбой (6MWT) выполнен по стандартной методике.

Ангиографическое исследование (коронарография) проводилось под местной (S. Lidocaine / S. Novocain 0,5% – 30,0 мл) и внутривенной анестезией (S. Propofol 1% – 200 мл) по методике Сельдингера. Оценка состояния коронарных артерий проводилась в стандартных позициях.

Для оценки тяжести поражения коронарных артерий использовалась шкала SYNTAX Score. На основании суммирования баллов указанной шкалы проведена оценка стратификации риска: группа низкого риска – 0–22 балла, группа промежуточного риска – 23–32 балла, группа высокого риска – >32 баллов.

Оценка параметров качества жизни проведена с использованием специализированных опросников: SF-36, Миннесотский опросник, Сизтлский опросник.

Операция АКШ выполнена согласно стандартной методике в объеме согласно решению Heart Team.

Экسفудия костного мозга производилась в условиях операционной, в положении пациента лежа на спине, под общей анестезией до кожного разреза из грудины, в объеме 140 мл в пакеты для консервации крови «TERUFLEX 450/400» (Terumo). В качестве стабилизатора использовался раствор гепарина 5000 Ед на 100 мл 0,9% раствора NaCl. Таким образом, в одном шприце на 7 мл костного мозга прихо-

дилось 3 мл 0,9% раствора NaCl и 150 Ед гепарина (15 Ед/мл).

Выделение мононуклеарной фракции осуществляли путем осаждения в градиенте плотности гидроксипропилоксилкрахмала.

С помощью плазмэкстрактора выполнялось последовательное удаление жировых включений, плазмы, эритроцитов.

Перед трансплантацией осуществлялась дополнительная фильтрация мононуклеарной фракции при помощи стандартной системы для переливания крови и кровозаменителей с нейлоновым жидкостным микрофильтром с минимально возможным диаметром ячейки 200 мкм.

Оценка клеточного состава мононуклеарной фракции производилась с помощью цитофлуориметрии в условиях специализированной лаборатории.

Внутришунтовое введение АМНКМ проводилось после наложения дистальных анастомозов по 5 мл на 1 шунт, экспозиция 15 минут.

Интрамиокардиальная трансплантация осуществлялась трансэпикардially по 0,2 мл на 1 см<sup>2</sup>, 1 мл 5 точек, всего 10 точек в бассейне кровоснабжения левой коронарной артерии от проксимальных до дистальных участков.

Для интрамиокардиального введения как АМНКМ, так и 0,9% раствора NaCl использовался инсулиновый шприц BD Micro-Fine Plus 0,30 mm (30G) × 8 mm.

Полученные данные обработаны с помощью программы STATISTICA for Windows (версия 7.0). Расчеты произведены с учетом исключения пропусков, которые не учитывались при формировании выводов.

Для определения метода статистической обработки получаемых данных первоначально произведена оценка распределения (нормальное/ненормальное). Методы непараметрической статистики были применены для анализа данных, имеющих распределение, отличное от нормального.

Качественные показатели рассчитаны при помощи критериев Пирсона ( $\chi^2$ ) и Фишера.

Количественные показатели проанализированы критериями Краскела–Уоллиса и Вилкоксона.

Для выявления определенных факторов тяжести и исследования однородности данных – факторный анализ.

Дискриминантный анализ применен для исследования ведущих характеристик, определяющих дифференцировку между группами.

Для анализа дисперсии с учетом различных факторов использовалась модель дисперсионного анализа для зависимых выборок – Repeated Measures ANOVA.

Для оценки статистической достоверности получаемых выводов использовалась величина  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### I. Оценка безопасности дополнительной трансплантации АМНКМ

Трансплантация АМНКМ в сочетании с операцией АКШ в условиях ИК у пациентов с коронарной и сердечной недостаточностью является безопасной методикой [18].

### II. Оценка эффективности

Параметры систолической и диастолической функции миокарда, состояние клапанного аппарата по данным ЭхоКГ через 12 месяцев после проведенного лечения были сопоставимы и не имели статистически достоверных различий.

Схожие данные получены при анализе показателей диастолической функции ЛЖ.

Данные тредмил-теста в динамике имели общую тенденцию к улучшению в группах наблюдения без статистически достоверных различий между груп-

пами наблюдения ( $p = 0,7$ ). Ишемические изменения зарегистрированы в 2 случаях группы 0.

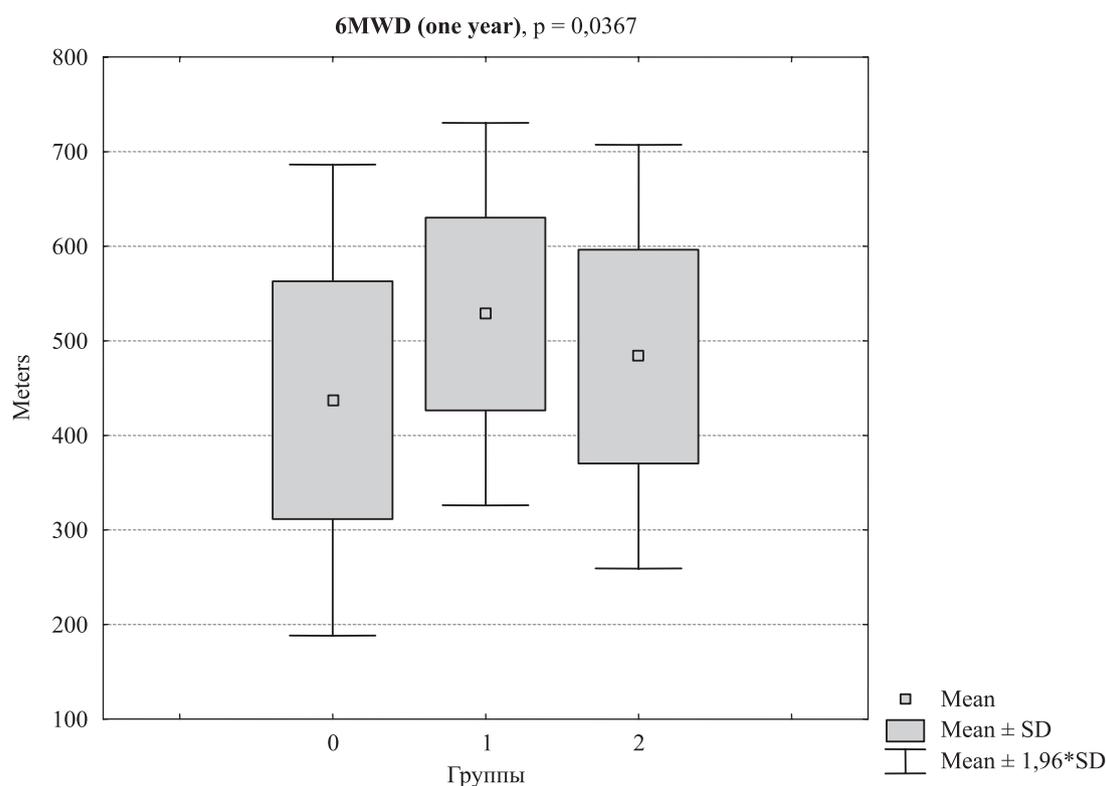
6MWD показал значимую динамику прироста количества пройденных метров в группах 1 и 2 по сравнению с группой 0 ( $p = 0,03$ ) (рис. 2).

При контрольном обследовании данные суточного мониторирования ЭКГ показали наличие ишемических изменений в 2 случаях из группы 0. Нарушений ритма в группах наблюдения отмечено не было.

Функциональные тесты через 12 месяцев отметили II функциональный класс стенокардии напряжения в 8 случаях только в группе 0 ( $p = 0,001$ ).

Рецидив стенокардии напряжения отмечен у 8 пациентов из группы 0. Среднее значение срока рецидива составило  $6,5 \pm 2,9$  (1–11) мес.

Отмечено уменьшение функционального класса сердечной недостаточности (диастолической) в группах наблюдения без значимых различий ( $p = 0,13$ ).



Группа	Исходно		Через 1 год	
	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range
Группа 0	315,06 ± 17,6	279,9–350,2	433,54 ± 20,6	392,2–474,9
Группа 1	319,8 ± 24,5	270,8–368,8	524,4 ± 28,7	466,8–581,9
Группа 2	329,9 ± 25,3	279,4–380,5	452,7 ± 29,7	393,3–512,1

Рис. 2. Динамика количества пройденных метров по данным теста с 6-минутной ходьбой (6MWD) в группах наблюдения

\* – ср. знач ± St. Dev./интервал

Fig. 2. The dynamic of the number of meters walked according to the 6-minute walk test (6MWD) in the observation groups

\* – Everage value ± St. Dev./interval

Улучшение параметров качества жизни в группах наблюдения, по данным опросников SF-36, Сиэтлского и Миннесотского, без значимых различий.

Процент функционирующих коронарных шунтов через 12 месяцев наблюдения составил 87,6% (исходно 113 наложенных шунтов в динамике 99) в группе 0, в группе 1 это соотношение составило 96,2% (79 и 76) и в группе 2 – 97,3% (75 и 73) ( $p = 0,048$ ).

При наличии неработающих коронарных шунтов, регистрации изменений ишемического характера по данным нагрузочных тестов, а также при наличии симптоматики стенокардии напряжения как минимум II функционального класса выполнено стентирование нативных коронарных артерий. В группе 0 – в 5 случаях (13,5%), в группе 1 – в одном случае (4%) ( $p = 0,38$ ).

Показатели speckle tracking не имели достоверных отличий в группах наблюдения в контрольные точки обследования.

### III. Прогнозирование результатов лечения (влияние ряда параметров)

Анализ показал, что курение оказывает значимое влияние на результаты теста 6MWD, а именно на дефицит пройденных метров в группах наблюдения ( $p = 0,048$ ).

Также отмечено влияние исходной ФВ ЛЖ на динамику показателей 6MWD и сочетанное влияние исходной ФВ ЛЖ и давления в легочной артерии на динамику показателей 6MWD.

Клеточный состав полученной моноклеарной фракции не имел статистически достоверных различий в группах наблюдения (табл. 3).

При сравнении методик трансплантации АМНКМ интрамиокардиально и/или внутрикоронарно не было получено статистически достоверных различий между группами.

### ОБСУЖДЕНИЕ

TAMIS (Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells in the Combined Treatment of Coronary Heart Disease) – это одноцентровое, рандомизированное,

слепое, плацебо контролируемое исследование. Целью исследования было оценить безопасность, эффективность, влияние различных факторов на общий эффект трансплантируемых АМНКМ при хирургическом лечении ИБС. Данная работа была проведена после многолетних исследований в области клеточной/регенеративной медицины. Основой для разработки дизайна послужили ранее выполненные исследования в группах пациентов при лечении хронической ИБС, как изолированно, так и в сочетании с хирургическим лечением (ангиопластика и стентирование, АКШ), а также при лечении острого инфаркта миокарда (ОИМ) [19–23].

Положительные результаты получены в отдельной группе наблюдения пациентов с тяжелой систолической СН (дилатационная кардиомиопатия) [24].

Предварительные расчеты указали на необходимую мощность исследования.

Анализ литературных данных указал на ряд параметров, являющихся интегральными для работы подобного типа. В частности, частота встречаемости осложнений при подобных операциях варьирует:  $30 \pm 10\%$ . Согласно

$$n_1 = kn_2, n_2 = \frac{(z_\alpha + z_\beta)^2}{(\varepsilon - \delta)^2} \left[ \frac{p_1(1 - p_1)}{k} + p_2(1 - p_2) \right]$$

Обозначим через  $n_1$  объем выборки,  $n_2$  – объем выборки в контроле. В тестовой группе наблюдений в  $k = 2/3$  раза больше. Разность тестовой и контрольной частот  $\varepsilon = p_1 - p_2$  [25].

Соответственно, при  $p_1 = 0,2, p_2 = 0,4, \delta = 0,1$ , и получаем  $n_1 = 49,5, n_2 = 33$ . На практике размер контрольной группы равнялся 36, двух тестовых  $25 + 25 = 50$ .

Нулевая гипотеза состоит в том, что частота осложнений в тестовой выборке не превышает частоты в контрольной выборке с пределом эквивалентности  $\delta$ , то есть  $H_0: p_1 < p_2 + \delta$ . Меньше может быть сколько угодно. Альтернативная гипотеза означает, что частота осложнений в тестовой выборке значительно выше контрольной. Соответственно, указанные статистические показатели обладают достоверностью.

Таблица 3

#### Клеточный состав моноклеарной фракции по данным проточной цитофлуориметрии

#### The cell composition of the mononuclear fraction according to flow cytometry

	Группа 1 n = 25		Группа 2 n = 23	
Общий цитоз ( $10^8/л$ )*	20,3 ± 8,9	1–84,5	6,8 ± 3,2	2–12
(%)*	21,04 ± 2,9	16,09–28	20,0 ± 2,7	15–25
CD34+ (%)*	1,16 ± 0,22	0,9–1,57	1,18 ± 0,34	0,8–1,7
CD133+ (%)*	0,4 ± 0,08	0,3–0,5	0,38 ± 1,14	0,2–0,7

\* – ср. знач ± St. Dev./интервал.

\* – Everage value ± St. Dev./interval.

Общие результаты данной работы указали на увеличение эффективности комбинированного лечения ИБС путем сочетания трансплантации АМНКМ и АКШ в условиях ИК. Кроме того, были выявлены общие предикторы неблагоприятного исхода, которые ранее не рассматривались в качестве таковых.

Статистический анализ обозначил отсутствие значимых различий в данных ЭхоКГ, как в отношении систолической, так и в отношении диастолической функции миокарда. Была отмечена общая тенденция к улучшению данных показателей в более значимой степени в группах 1 и 2 без статистически достоверной значимости в сравнении с группой контроля.

В отношении указанных параметров при трансплантации клеточного материала и ранее получали отсутствие значимых различий в сравнении с контрольной группой [26–29].

Учитывая это, в дизайн исследования с целью повышения качества получаемых данных была включена тканевая доплерография (speckle tracking). Метод показал значительное изменение локальной сократительной способности миокарда на 7–14-е сутки (в среднем 10-е сутки) послеоперационного периода. Указанные изменения сопровождались снижением фракции выброса ЛЖ (ФВ ЛЖ), увеличением линейных и объемных показателей ЛЖ (рис. 3).

Однако проведенный дискриминантный анализ показал отсутствие значимости в указанных изменениях.

Параллельно не было отмечено значимого увеличения маркеров повреждения миокарда (тропо-

нин I, КФК МВ, миоглобин), а данные ЭКГ носили неспецифический характер. Через 12 месяцев при контрольном обследовании speckle tracking ЭхоКГ подтверждала улучшение в зонах реваскуляризации. Статистически достоверных различий в ее параметрах также получено не было.

Данную закономерность связали непосредственно с хирургическим вмешательством в условиях ИК и реперфузией ранее ишемизированных сегментов миокарда (зоны гибернации и станнинга). Различный объем указанных сегментов, особенности индивидуального анатомического строения коронарных артерий, а также различия в хирургической реваскуляризации могли привести к получению незначимых результатов в данных ЭхоКГ.

Этапный анализ получаемых результатов отметил возможность включения диастолической дисфункции ЛЖ как одного из факторов, влияющих на результаты лечения – функциональную состоятельность коронарных шунтов (табл. 4).

При контрольном обследовании в группе 0 диастолическая дисфункция ЛЖ была сохранена в 78,9% случаев, в группе 1 и 2 – в 43,7 и 20% соответственно. При этом у 9 пациентов из 13 с нефункционирующими коронарными шунтами отмечено сохранение диастолической дисфункции миокарда ЛЖ, то есть у 69,2% ( $p = 0,04$ ).

Итоговые результаты подтвердили влияние диастолической дисфункции левого желудочка на продолжительность функционирования коронарных шунтов вне зависимости от типа операции.

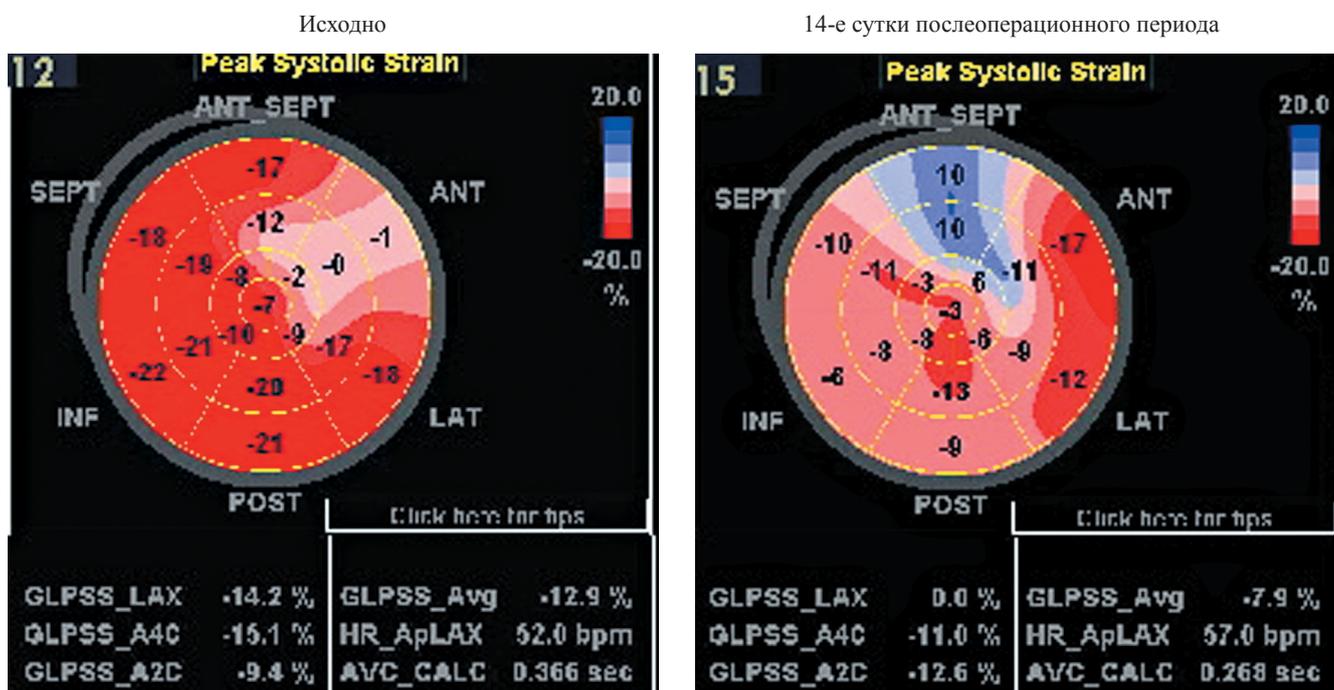


Рис. 3. Динамика speckle tracking ЭхоКГ (исходно и на 14-е сутки послеоперационного периода)

Fig. 3. Dynamic of speckle tracking ECHO CG (initially and on the 14<sup>th</sup> day of the postoperative period)

Таблица 4

**Влияние наличия диастолической дисфункции миокарда по данным ЭхоКГ на функциональную состоятельность коронарных шунтов после операции АКШ**

**The influence of the presense of the diastolic myocardial dysfunction according to ECHO CG on the functional viability of coronary shunts after CABG surgery**

	Группа 0	Группа 1	Группа 2
Исходное кол-во пациентов с диастолической дисфункцией ЛЖ (n)	19	16	15
Наличие диастолической дисфункции ЛЖ через 1 год наблюдения (n)	15 (78,9%)	7 (43,7%)	3 (20%)
Кол-во пациентов с нефункционирующими шунтами / при наличии диастолической дисфункции ЛЖ через 1 год наблюдения (n)	10/8	1/0	2/1

В данном случае влияние диастолической дисфункции ЛЖ, по сути, на интегральный показатель – функциональную состоятельность коронарных шунтов – объяснили увеличением эластичности, уменьшением жесткости миокарда, уменьшением количества ишемизированных сегментов, увеличением фракции выброса ЛЖ.

В ранее проведенных исследованиях по использованию АМНКМ указывали на улучшение диастолической функции миокарда [30–31], но ни в одном исследовании не была отмечена взаимосвязь с функциональной состоятельностью коронарных шунтов.

Оценка качества жизни проведена всесторонне с помощью опросников: SF-36, Миннесотский, Ситлский. Основная цель использования всех указанных опросников – получение достоверных и всесторонних результатов. Проведенный статистический анализ не показал значимых различий в группах наблюдения. Результаты связали с возможной ошибкой подобострастия. Данное предположение было сделано, учитывая, что всем пациентам дано указание строго соблюдать предписанные рекомендации (образ жизни, медикаментозная терапия, частота динамического и контрольного обследования) на всех этапах проведения работы. В случае отклонения от данных рекомендаций пациенты предупреждались об исключении из дальнейшего исследования.

Вероятно, для получения адекватных данных в отношении параметров качества жизни необходимо было выделить пациентов, ответивших на терапию (респондеров) и не ответивших (нереспондеров).

Анализ клеточного субстрата и анализ способа введения АМНКМ также не показал статистически достоверных преимуществ. Данные результаты связали с недостаточной выборкой, необходимой для расчета указанных различий. Кроме того, срок наблюдения 12 месяцев, установленный дизайном нашего исследования, был определен как недостаточный для получения информации по значимому различию в эффективности той или иной методики доставки клеточного материала.

Скорее всего, отсутствие статистически достоверных различий в данных, которые ранее подтверждали значимое влияние АМНКМ на общую эффективность

проводимого лечения, связано с небольшой выборкой, не позволяющей выявить малые, но все-таки значимые различия. Кроме того, учитывая проведение данного исследования как рандомизированного, была проведена значимая селективная выборка с целью формирования максимально равнозначных групп. Возможно, при проведении ранее выполненных исследований критерии отбора были мягче. Несмотря на вероятно малую выборку, тем не менее, были получены результаты, ранее не отраженные ни в одном исследовании, что, в свою очередь, имеет более значимые последствия для проведения последующих исследований в данном разделе научной медицины.

## ВЫВОДЫ

Трансплантация АМНКМ в дополнение к операции АКШ позволяет увеличить общую эффективность комбинированного лечения ИБС. В результате проведенного исследования отмечено, что в группах наблюдения с дополнительной трансплантацией указанного вида клеточного материала получена достоверная разница по сравнению с контрольной группой в отношении увеличения толерантности к физическим нагрузкам (6MWD), уменьшения функционального класса стенокардии напряжения, функциональной состоятельности коронарных шунтов. Проведенное исследование показало необходимость проведения этапных аналитических расчетов с целью возможной коррекции дальнейшего выполнения работы.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Kontsevaya AV, Drapkina OM, Balanova YA et al.* Economic burden of cardiovascular diseases in the Russian Federation in 2016. *Ration Pharmacother Cardiol.* 2018; 14 (2): 156–166.
2. *Mathers CD, Loncar D.* Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *Plos Med.* 2006; 3 (11): 442.

3. *Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS.* Heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2015 Jan 27; 131 (4): 329–322.
4. *Баранов АА, Денисов ИИ, Чучалин АГ.* Руководство по первичной медико-санитарной помощи. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006: 549–550. *Baranov AA, Denisov IN, Chuchalin AG.* Rukovodstvo po pervichnoy mediko-sanitarnoy pomoshchi. M.: GEOTAR-Media, 2006: 549–550.
5. *Alvares-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al.* Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; 425: 968–973.
6. *Anversa P, Leri A, Kajstura J.* Cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47: 1769–1777.
7. *Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al.* Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004; 428 (6983): 668–673.
8. *Behbahan IS, Keating A, Gale RP.* Bone Marrow Therapies for Chronic Heart Disease. *Stem Cells.* 2015 Nov; 33 (11): 3212–3227.
9. *Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 12313–12318.
10. *Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001; 410: 701–705.
11. *Kaminski A, Steinhoff G.* Current status of intramyocardial bone marrow stem cell transplantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2008; 20: 119–125.
12. *Patel AN, Geffner L, Vina RF et al.* Surgical treatment for congestive heart failure with autologous stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005. 130: 1631–1639.
13. *Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al.* Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet.* 2003; 361: 45–46.
14. *Zhao Q, Sun Y, Xia L et al.* Randomized study of mononuclear bone marrow cell transplantation in patients with coronary surgery. *Ann Thorac Surg.* 2008; 86: 1833–1840.
15. *Laguna G, Stefano S, Maroto L et al.* Effect of direct intramyocardial autologous stem cell grafting in the subacute phase after myocardial infarction. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2018 Apr; 59 (2): 259–267. doi: 10.23736/S0021-9509.17.10126-6.
16. *Kurazumi H, Fujita A, Nakamura T.* Short- and long-term outcomes of intramyocardial implantation of autologous bone marrow-derived cells for the treatment of ischaemic heart disease. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2017 Mar 1; 24 (3): 329–334. doi: 10.1093/icvts/ivw412.
17. *Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V et al.* Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2015 Mar; 16 (3): 233–270. doi: 10.1093/ehjci/jev014.
18. *Комок ВВ, Буненков НС, Белый СА и др.* Оценка безопасности трансплантации аутологичных мононуклеаров костного мозга в комбинированном лечении ишемической болезни сердца. Результаты рандомизированного, слепого, плацебо контролируемого исследования (TAMIS). *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2019; 21 (2): 112–120. *Комок ВВ, Буненков НС, Белый СА и др.* Otsenka bezopasnosti transplantatsii autologichnykh mononuklearov kostnogo mozga v kombinirovannom lechenii ishemicheskoy bolezni serdtsa. Rezul'taty randomizirovannogo, slepogo, platsebo kontroliruемого issledovaniya (TAMIS). *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2019; 21 (2): 112–120. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-2-112-120>.
19. *Бурнос СН, Немков АС, Белый СА и др.* Фракция выброса и размеры левого желудочка сердца после интракоронарного введения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга у больных ишемической болезнью сердца со сниженной фракцией выброса. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова.* 2011; 170 (4): 16–19. *Burnos SN, Nemkov AS, Belyu SA i dr.* Fraktsiya vybrosa i razmery levogo zheludochka serdtsa posle intrakoronarnogo vvedeniya autologichnykh mononuklearykh kletok kostnogo mozga u bol'nykh ishemicheskoy boleznyu serdtsa so snizhennoy fraktsiey vybrosa. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova.* 2011; 170 (4): 16–19.
20. *Немков АС, Белый СА, Нестерук ЮА и др.* Качество жизни у больных ишемической болезнью сердца после применения клеточной терапии. *Вестник хирургии имени И.И. Грекова.* 2012; 171 (1): 16–20. *Nemkov AS, Belyu SA, Nesteruk YuA i dr.* Kachestvo zhizni u bol'nykh ishemicheskoy boleznyu serdtsa posle primeneniya kletochnoy terapii. *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova.* 2012; 171 (1): 16–20.
21. *Нестерук ЮА, Немков АС, Белый СА.* Оценка динамики кровоснабжения и метаболизма миокарда после интракоронарного введения аутологичных мононуклеаров костного мозга. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2014; 13 № 3 (51): 23–30. *Nesteruk YuA, Nemkov AS, Belyu SA.* Otsenka dinamiki krovosnabzheniya i metabolizma miokarda posle intrakoronarnogo vvedeniya autologichnykh mononuklearov kostnogo mozga. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya.* 2014; 13 № 3 (51): 23–30.
22. *Немков АС, Белый СА, Комок ВВ и др.* Имплантация аутологичных мононуклеаров костного мозга как первый этап комплексного хирургического лечения ишемической болезни сердца в сочетании с аортокоронарным шунтированием (клиническое многолетнее наблюдение). *Вестник хирургии имени И.И. Грекова.* 2015; 174 (6): 85–88. *Nemkov AS, Belyu SA, Komok VV i dr.* Implantatsiya autologichnykh mononuklearov kostnogo mozga kak pervyy etap kompleksnogo khirurgicheskogo lecheniya ishemicheskoy bolezni serdtsa v sochetanii s aortokoronarnym shuntirovaniem (klinicheskoe

- mnogoletnee nablyudenie). *Vestnik khirurgii imeni I.I. Grekova*. 2015; 174 (6): 85–88.
23. Nemkov A, Belyu S, Komok V et al. Correction of coronary endothelial dysfunction is a possible accessory mechanism for cellular therapy of the heart. *Cellular Therapy and Transplantation*. 2016. June; 5 (2). P. 33–39.
24. Белый СА, Лукашенко ВИ, Комок ВВ, Хубулава ГГ. Клеточная терапия в комплексном лечении пациента с дилатационной кардиомиопатией. Клиническое наблюдение. *Кардиология*. 2019; 59 (4S). Belyi SA, Lukashenko VI, Komok VV, Khubulava GG. Kletochnaya terapiya v kompleksnom lechenii patsienta s dilatatsionnoy kardiomiopatiey. Klinicheskoe nablyudenie. *Kardiologiya*. 2019; 59 (4S). doi: 10.18087/cardio.2555.
25. Sample Size Calculation in Clinical Research. Eds. Shein Chung Chow. 2008 by Taylor and Francis Group, LLC.
26. Hendriks M, Hensen K, Clijsters C et al. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation*. 2006; 114: I101e7.
27. Perin EC, Silva GV, Henry TD et al. A randomized study of transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells and cell function analysis in ischemic heart failure (FOCUS-HF). *Am Heart J*. 2011; 161: 1078e87.e3.
28. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ et al. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA*. 2012; 307: 1717e26.
29. Perin EC, Silva GV, Zheng Y et al. Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. *Am Heart J*. 2012; 163: 415e21. 21 e1.
30. Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *European Heart Journal*. 2006; 27: 929–935. doi: 10.1093/eurheartj/ehi817.
31. Yao K, Huang R, Qian J et al. Administration of intracoronary bone marrow mononuclear cells on chronic myocardial infarction improves diastolic function. *Heart*. 2008 Sep; 94 (9): 1147–1153. doi: 10.1136/hrt.2007.137919.

Статья поступила в редакцию 26.08.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 26.08.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-67-80

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТРИБЛОК-СОПОЛИМЕРОВ SIBS В КАРДИОХИРУРГИИ: *IN VITRO* И *IN VIVO* ИССЛЕДОВАНИЕ В СРАВНЕНИИ С ePTFE

М.А. Резцова<sup>1</sup>, Е.А. Овчаренко<sup>1</sup>, П.А. Никушев<sup>2, 3</sup>, С.В. Костюк<sup>2-4</sup>, Л.В. Антонова<sup>1</sup>, Т.Н. Акентьева<sup>1</sup>, Т.В. Глушкова<sup>1</sup>, Е.Г. Великанова<sup>1</sup>, Д.К. Шишкова<sup>1</sup>, Е.О. Кривкина<sup>1</sup>, К.Ю. Клышников<sup>1</sup>, Ю.А. Кудрявцева<sup>1</sup>, Л.С. Барбараи<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская Федерация

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup> Химический факультет Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

<sup>4</sup> Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Протезирование клапанов сердца полимерными конструкциями лепесткового типа в перспективе позволит решить проблемы существующих клапанных заменителей – механических и биологических. **Целью** настоящей работы является комплексная оценка свойств гемосовместимости полимерных материалов на основе синтезированного методом контролируемой катионной полимеризации триблок-сополимера стирола и изобутилена (SIBS) в сравнении с используемым в клинической практике политетрафторэтиленом (ePTFE). **Материалы и методы.** Пленки на основе SIBS изготавливали методом полива из раствора полимера; оценку биосовместимости *in vitro* проводили с использованием клеточных культур, определяя жизнеспособность клеток, клеточную адгезию и пролиферацию; склонность материалов к кальцификации определяли методом ускоренной кальцификации *in vitro*; оценку биосовместимости *in vivo* проводили путем подкожной имплантации образцов крысам; гемосовместимость определяли *ex vivo* по результатам оценки степени гемолиза, агрегации и адгезии тромбоцитов. **Результаты.** Молекулярная масса синтезированного полимера составила 33 000 г/моль с показателем полидисперсности 1,3. При изучении клеточной адгезии не выявлено достоверных отличий ( $p = 0,20$ ) свойств полимера SIBS (588 кл/мм<sup>2</sup>) от свойств культурального пластика (732 кл/мм<sup>2</sup>), адгезия клеток для материала ePTFE составила 212 кл/мм<sup>2</sup>. Процент мертвых клеток на образцах SIBS, ePTFE составил соответственно 4,40 и 4,72% ( $p = 0,93$ ), для культурального пластика – 1,16% ( $p < 0,05$ ). Пролиферация клеток на поверхности ePTFE (0,10%) оказалась значимо ниже ( $p < 0,05$ ) тех же параметров для SIBS и культурального пластика (62,04 и 44,00%). Результаты имплантации (60 дней) показали формирование фиброзных капсул со средними толщинами 42 мкм (ePTFE) и 58 мкм (SIBS). Содержание кальция в эксплантированных образцах составило: 0,39 мг/г (SIBS), 1,25 мг/г (ePTFE) и 93,79 мг/г (GA-ксеноперикард) ( $p < 0,05$ ). Уровень гемолиза эритроцитов крови после контакта с SIBS составил 0,35%, ePTFE – 0,40%, что ниже положительного контроля ( $p < 0,05$ ). Максимум агрегации тромбоцитов интактной обогащенной тромбоцитами плазмы крови составил 8,60%, контактировавшей с полимером SIBS – 18,11%, ePTFE – 22,74%. **Заключение.** Исследуемый полимер SIBS при сравнении свойств гемосовместимости не уступает ePTFE и может быть использован в качестве основы при разработке полимерного протеза клапана сердца.

**Ключевые слова:** полимерный протез клапана сердца, поли(стирол-блок-полиизобутилен-блок-стирол), политетрафторэтилен, гемосовместимость.

**Для корреспонденции:** Резцова Мария Александровна. Адрес: 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (913) 079-61-40. E-mail: rezvovamaria@mail.ru

**For correspondence:** Rezvova Maria Alexandrovna. Address: 6, Sosnoviy blvd, 650002, Kemerovo, Russian Federation. Tel. (913) 079-61-40. E-mail: rezvovamaria@mail.ru

# THE USE OF SIBS TRIBLOCK COPOLYMERS IN CARDIAC SURGERY: *IN VITRO* AND *IN VIVO* STUDIES IN COMPARISON WITH ePTFE

M.A. Rezvova<sup>1</sup>, E.A. Ovcharenko<sup>1</sup>, P.A. Nikishev<sup>2, 3</sup>, S.V. Kostyuk<sup>2, 3, 4</sup>, L.V. Antonova<sup>1</sup>, T.N. Akent'eva<sup>1</sup>, T.V. Glushkova<sup>1</sup>, Y.G. Velikanova<sup>1</sup>, D.K. Shishkova<sup>1</sup>, E.O. Krivkina<sup>1</sup>, K.Yu. Klyshnikov<sup>1</sup>, Yu.A. Kudryavtseva<sup>1</sup>, L.S. Barbarash<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup> Faculty of chemistry of the Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

<sup>4</sup> Institute of Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Prosthetics of heart valves by polymer has the potential to solve the problems of existing valve device – mechanical and biological. **Aim:** to investigate of styrene-isobutylene triblock copolymer (SIBS) biocompatibility synthesized by the controlled cation polymerization method in comparison with the polytetrafluoroethylene (ePTFE) used in clinical practice. **Materials and methods.** SIBS-based films were prepared by casting from a polymer solution; a biocompatibility assessment *in vitro* was performed using cell cultures, determining cell viability, cell adhesion, and proliferation; the resistance of materials to calcification was determined by the method of calcification *in vitro*; an *in vivo* biocompatibility assessment was performed by subcutaneous implantation of the samples to rats; hemocompatibility was determined *ex vivo* by evaluation of the degree of hemolysis, aggregation and platelet adhesion. **Results.** The molecular weight of the synthesized polymer was 33,000 g/mol with a polydispersity index of 1.3. In the study of cell adhesion, there was no significant difference ( $p = 0.20$ ) in the properties of the SIBS polymer (588 cells/mm<sup>2</sup>) from the properties of the culture plastics (732 cells/mm<sup>2</sup>), the cell adhesion for the ePTFE material was 212 cells/mm<sup>2</sup>. The percentage of dead cells on SIBS, ePTFE samples, respectively, was 4.40% and 4.72% ( $p = 0.93$ ), for culture plastic – 1.16% ( $p < 0.05$ ). The cell proliferation on the ePTFE surface (0.10%) was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than for SIBS and culture plastics (62.04% and 44.00%). Implantation results (60 days) showed the formation of fibrous capsules with average thicknesses: 42  $\mu\text{m}$  (ePTFE), 58  $\mu\text{m}$  (SIBS). The calcium content of the explanted samples was 0.39 mg/g (SIBS), 1.25 mg/g (ePTFE) and 93.79 mg/g (GA-xenopericardium) ( $p < 0.05$ ). The hemolysis level of blood red blood cells after contact with SIBS was 0.35%, ePTFE 0.40%, which is below the positive control ( $p < 0.05$ ). The maximum platelet aggregation by intact platelet-enriched plasma was 8.60%, which was in contact with the SIBS polymer – 18.11%, and ePTFE – 22.74%. **Conclusion.** The polymer SIBS when comparing the biocompatibility properties is not inferior to ePTFE and has the potential for use in the development of polymeric prosthetic heart valves new generation.

**Keywords:** heart valve prosthesis, poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene), polytetrafluoroethylene, hemocompatibility.

## ВВЕДЕНИЕ

Основным способом коррекции клапанных пороков в настоящее время является протезирование клапанов сердца. При этом ключевыми требованиями, предъявляемыми к данному типу изделий, являются эффективность функционирования, долговечность без необходимости антикоагулянтной терапии в сочетании с возможностью имплантации пациентам различных возрастных групп [1, 2]. Протезы клапанов сердца – механические с ригидным створчатым аппаратом и биологические на основе ксеноматериалов – используются в клинической практике в течение нескольких десятилетий. В то же время оба типа протезов имеют недостатки: первые – высокую тромбогенность, вторые – огра-

ниченную долговечность в результате деградации ксеноткани [1, 2]. Однако увеличение числа пациентов молодого возраста и продолжительности жизни населения сегодня требуют изменения парадигмы технологии клапанных конструкций и связанных с ними материалов. Створчатый аппарат лепесткового типа на основе эластомерных полимеров имеет перспективы успешного применения в клинической практике и может позволить решить проблему долговечности биопротезов (реоперации), исключить необходимость перманентного приема антикоагулянтов, требующихся при имплантации механических клапанных устройств, и обеспечить гемодинамику, сопоставимую с физиологичной [3]. Возможность проектирования створчатого аппарата с заданной структурой и свойствами – еще одно преимущество

изделий на основе синтетических материалов [4, 5]. Кроме того, биостабильные полимерные матрицы привлекательны для использования в тканевой инженерии клапанов сердца [6].

Несмотря на значительное число работ, посвященных поиску подходящих материалов, полимерные клапаны по-прежнему ограниченно используются в клинической практике ввиду высокой степени нестабильности термопластичных эластомеров [7] и связанных с их применением процессов тромбообразования и кальцификации [8]. По этой причине поиск эффективной комбинации свойств биостабильности и гемосовместимости представляет актуальную задачу на пути отождествления полимерного клапана с клинической реальностью. Начиная с 1950-х годов были предприняты попытки использования в качестве основы створчатого аппарата ряда полимеров: полиуретанов [9], силиконов [10], трехмерно-сшитого поливинилового спирта [11], политетрафторэтилена (PTFE и ePTFE) [12, 5], POSS-PCU нанокомпозита [13], триблок-сополимеров стирола и изобутилена (SIBSs) [14] и др., в то же время идеального решения до сих пор не найдено.

Блок-сополимеры на основе стирола и изобутилена представляют особый интерес ввиду их высокой гемосовместимости и биостабильности [15], возможности регулирования свойств за счет вариации длины и структуры полимерных звеньев, относительной легкости процессов их обработки посредством экструзии или литьевого формования, а также значительному опыту использования в медицине [16]. Так, SIBS30 (содержание стирола 30%) производства Innovia является основой современных кардиохирургических стентов, демонстрируя высокую биосовместимость [17]. При этом низкие физико-механические характеристики чистого SIBS30, а также экспериментальные данные о процессах тромбообразования [18] потребовали поиска новых модификаций триблок-сополимера с целью разработки на его основе протеза клапана сердца лепесткового типа, в частности, поверхностного модифицирования и создания композитов с армирующими сетями из более прочных полимеров [19, 20].

В настоящей статье описан процесс синтеза модельного полимера SIBS методом контролируемой катионной полимеризации, исследование свойств гемосовместимости *in vitro* и *in vivo*. Комплексный подход к оценке свойств гемосовместимости представленных полимерных материалов на основе SIBS применяется впервые и особенно важен для адекватного прогнозирования потенциала использования исследуемых полимеров в клапанных конструкциях.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Синтез полимера группы SIBS

Стабилизированный стирол («Sigma-Aldrich», США, >99%) обрабатывали 10% раствором KOH, затем промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили CaCl<sub>2</sub> и дважды перегоняли над CaH<sub>2</sub> при пониженном давлении. Хлористый метилен и *n*-гексан («Экос-1», Россия, х. ч.) обрабатывали концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, раствором соды, дистиллированной водой до нейтральной реакции, сушили CaCl<sub>2</sub>, дважды кипятили и перегоняли над CaH<sub>2</sub>. Четыреххлористый титан («Sigma-Aldrich», США, 99,9%) перегоняли над медной стружкой при пониженном давлении. Изобутилен («Sigma-Aldrich», США, >99%) осушали, пропуская через колонку, заполненную хлоридом кальция. 2,6-ди(трет-бутил)пиридин («Sigma-Aldrich», США, 97%), дикумиловый спирт («Aldrich», США, 97%) использовали без предварительной очистки.

Полимеризацию проводили в трехгорлой колбе, предварительно отвакуумированной и заполненной аргоном. В колбу вносили инициатор – свежеприготовленный дикумилхлорид (0,095 ммоль) по методике Kaszas [21]. Затем растворяли в смеси «гексан : хлористый метилен = 3 : 2» и добавляли 0,20 ммоль 2,6-ди(трет-бутил)пиридина, охлаждали до минус 60 °С в спиртовой бане и вносили охлажденный до минус 60 °С изобутилен (34 ммоль). Концентрация мономера составляла 1,0 М. Далее температуру понижали до минус 80 °С и вносили 1,9 ммоль четыреххлористого титана (20-кратный избыток) для начала полимеризации.

Через 25 минут от начала полимеризации вносили 9,2 ммоль предварительно охлажденного стирола (2,0 М раствор в смеси «гексан : хлористый метилен = 3 : 2»). Через 50 минут от начала реакцию останавливали внесением 2 мл охлажденного метанола. Полученный образец дважды осаждали в 10-кратный избыток охлажденного этанола. Осажденный образец отделяли центрифугированием, промывали небольшим количеством этанола и сушили в вакууме при 55–60 °С/2 мм рт. ст. до прекращения изменения массы.

### Гель-проникающая хроматография

Молекулярно-массовые характеристики полученных блок-сополимеров, эффективность блокообразования определяли методом гель-проникающей хроматографии на приборе Ultimate 3000, снабженным предколонкой PLgel (7,5×50 мм, размер частиц 5 мкм), колонкой PLgel MIXED-C (7,5×300 мм, размер частиц 5 мкм) с рефрактометрическим и УФ-детекторами (Thermo Fisher Scientific, Германия). В качестве растворителя использовали тетрагидрофуран, скорость элюирования составила 1 мл/мин при тем-

пературе колонки 30 °С. Значение среднечисловой молекулярной массы ( $M_n$ ) и полидисперсности ( $M_w/M_n$ ) полимеров рассчитывали с использованием программного пакета Chromeleon 7.0 (Thermo Scientific Dionex, Германия) по кривым элюирования, основываясь на калибровочных зависимостях, полученных с применением полистирольных стандартов (Agilent EasiCal) с  $M_w/M_n \leq 1,05$ .

### Изготовление полимерных пленок

Полимерные пленки были получены методом полива из раствора полимера в хлороформе (в соотношении 1,6 г вещества на 8 мл растворителя) на стеклянную поверхность. Площадь полученных образцов составила 21 см<sup>2</sup>. Формирование пленок проводили при температуре 25 °С в течение одного часа и затем при нагревании до 35 °С в течение трех часов при атмосферном давлении и влажности воздуха 50%. Дополнительно образцы высушивали с использованием вакуумной сушилки настольной FREEZONE 2.5 (LABCONCO, USA) при температуре –40 °С и давлении <0,133 мбар.

### Оценка цитотоксичности *in vitro* с использованием клеточных культур

Эксперимент проведен с использованием клеточной линии Ea.hy 926 – гибридомы эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и клеток карциномы легкого человека (клетки предоставлены доктором Cora-Jean S. Edgell, University of North Carolina, USA), что позволяет клеточной линии воспроизводить основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток микрососудов человека. В качестве группы сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве контроля – культуральный пластик.

Стерильные образцы ( $n = 3$  для каждой группы; стерилизация этиленоксидом) с помощью 0,6% раствора агарозы (Helicon, Россия) фиксировали на дно стерильных 24-луночных культуральных планшетов. На полимерные образцы вносили по  $2,0 \times 10^5$  клеток и культивировали в течение 5 суток в среде DME/F12 (Sigma Aldrich, США), содержащей 1% HEPES буфера (Hyclone, США), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Sigma Aldrich, США), 1% L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В, Нурохanthine-Aminopterin-Thymidine (НАТ) (Sigma Aldrich, США) при температуре 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Смену среды проводили 1 раз в 2 дня. Абсолютное количество клеток на 1 мм<sup>2</sup> поверхности и относительное содержание погибших клеток оценивали с помощью флюоресцентной микроскопии (Axio Observer Z1, Carl Zeiss, Германия). С этой целью за 30 мин до микроскопического

исследования добавляли ядерные флюоресцентные красители Hoechst 33342 (Molecular Probes, США) в количестве 2 мкг/мл и бромистый этидий (EtBr) (AppliChem, Испания) в концентрации 0,03 мг/мл (оранжевое окрашивание ядер погибших клеток). Для подготовки образцов к микроскопии их отделяли от агарозы и переносили в стерильный 24-луночный планшет клетками вниз. Подсчет количества клеток проводился в 5 различных полях зрения при увеличении  $\times 200$  с последующим пересчетом на 1 мм<sup>2</sup> изучаемой поверхности. Относительное количество погибших клеток определяли из расчета соотношения абсолютного количества погибших клеток на 1 мм<sup>2</sup> поверхности к абсолютному количеству клеток на 1 мм<sup>2</sup>.

Оценка клеточной пролиферации проведена на стерильных образцах ( $n = 3$  для каждой группы) с использованием набора для изучения пролиферации Click-iT Plus EdU Imaging Kits (Molecular probes, США): ядра всех клеток окрашиваются ядерным красителем DAPI в синий цвет, а ядра пролиферирующих клеток окрашиваются флюоресцентным красителем Alexa Fluor 488 в зеленый цвет. Когда идет синтез ДНК, тимидин встраивается в ДНК, и обладая сродством с Alexa Fluor 488, позволяет избирательно детектировать синтезируемую ДНК, что выражается в зеленой флюоресценции ядер. Флюоресцентная микроскопия была выполнена на лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss, Германия). Относительное количество пролиферирующих клеток определяли из расчета соотношения абсолютного количества пролиферирующих клеток на 1 мм<sup>2</sup> поверхности к абсолютному количеству клеток на 1 мм<sup>2</sup> поверхности.

### Определение кальцификации *in vitro*

Устойчивость к кальцификации определяли методом ускоренной кальцификации *in vitro*. Образцы размером 5×5 мм ( $n = 5$  для каждой группы) помещали в 2 мл раствора на основе питательной среды DMEM (Sigma, США) и сыворотки альбумина (FBS, Sigma, США), содержащего CaCl<sub>2</sub> и Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, и выдерживали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37 °С и концентрации углекислого газа 5%. Степень кальцификации оценивали после третьей и шестой недели инкубации. В качестве группы сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве положительного контроля был выбран ксеноперикард крупного рогатого скота (КРС), консервированный по стандартной методике глутаровым альдегидом (GA) (ЗАО «НеоКор», Россия). Криосрезы биоматериала и полимерных образцов окрашивали на присутствие кальция ализариновым красным С («Реахим», Россия) и анализировали с

использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

## Оценка биосовместимости *in vivo*

### Ответная реакция ткани

Исследование воспалительной реакции и кальцификации *in vivo* проводили путем подкожной имплантации образцов размером 5×5 мм крысам-самцам субпопуляции Wistar (вес 55–70 г) на срок наблюдения 2 недели (оценка ответной реакции тканей,  $n = 5$ ) и 2 месяца (оценка ответной реакции тканей,  $n = 5$ , степени кальцификации,  $n = 5$ ). После окончания эксперимента часть образцов пленок биоптировали вместе с окружающими тканями, фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина («Мини-Мед», Россия) с последующим заключением в парафин («Биовитрум», Россия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином («Биовитрум», Россия), по Ван-Гизону смесью кислого фуксина и пикриновой кислоты («Биовитрум», Россия) и ализариновым красным С («Реахим», Россия), изучали на световом микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия).

Анализ воспалительной реакции проводили согласно ISO 10993-6:2016 с применением полуколичественной системы оценки, для чего осуществляли подсчет количества очагов неоваскуляризации в пяти полях зрения для каждого животного при увеличении ×400. Ответную реакцию также оценивали исходя из толщины фиброзной капсулы (среднее значение 10 равномерно распределенных измерений ширины капсул, взятых по всей плотной ткани, ближайшей к имплантату), жирового инфильтрата и количества лимфатических узлов.

### Кальцификация *in vivo*

Другую часть образцов с целью оценки количественного содержания кальция подвергали гидролизу, для чего помещали в 0,5 мл 50% хлорной кислоты и выдерживали при 150 °С до получения прозрачного раствора (ePTFE гидролизу не подвергался, при этом в раствор переходили сформировавшиеся в процессе эксперимента кальцификаты). Остывшие пробы разбавляли дистиллированной водой и оценивали содержание кальция методом оптико-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на спектрометре iCAP 6500 DUO (Thermo Scientific, США).

В качестве групп сравнения был использован материал сосудистого протеза из ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США), в качестве положительного контроля – ксеноперикард КРС, консервированный по стандартной методике глутаровым альдегидом (GA) (ЗАО «НеоКор», Россия).

## Оценка гемосовместимости *in vitro*

### Степень гемолиза

Исследование выполнено в соответствии с требованиями стандарта ISO 10993-4:2017. Для оценки степени гемолиза эритроцитов использовали свежую донорскую кровь с добавлением 3,8% раствора цитрата натрия в соотношении 1 : 9 (цитрат : кровь). Исследуемые образцы размером 25 см<sup>2</sup> ( $n = 5$  для каждого типа материала) помещали в бюксы, добавляли по 10 мл физиологического раствора и ставили в термостат при 37 °С на 120 мин. В качестве отрицательного и положительного контролей для оценки степени гемолиза эритроцитов были использованы физиологический раствор и дистиллированная вода соответственно. После этого в каждый бюкс добавляли по 200 мкл цитратной крови, перемешивали и вновь выдерживали в термостате при 37 °С в течение 60 мин. После инкубации производили отбор раствора из бюксов в пробирки с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 2800 об/мин для осаждения эритроцитов. Измерение оптической плотности полученных растворов проводили при длине волны 545 нм на спектрофотометре GENESYS 6 (Thermo Scientific, США).

Степень гемолиза ( $H$ ) в % определяли по формуле:

$$H = \frac{D_t - D_{ne}}{D_{pe} - D_{ne}} \times 100\%,$$

где  $D_t$  – оптическая плотность пробы, инкубируемой с исследуемым полимером;  $D_{ne}$  – оптическая плотность положительного контроля;  $D_{pe}$  – оптическая плотность пробы после 100% гемолиза.

За полное отсутствие гемолиза принимали среднее арифметическое значение показателя оптической плотности при измерении положительного контроля (физиологического раствора с цитратной кровью), за 100% гемолиз принимали среднее арифметическое значение оптической плотности прибора при измерении дистиллированной воды с цитратной кровью. Группами сравнения служили ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США) и Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

### Агрегация тромбоцитов

Исследование выполнено в соответствии со стандартом ISO 10993-4:2017. Для исследования использовали свежую донорскую кровь с добавлением цитрата натрия 3,8%, в соотношении 1 : 9 (цитрат : кровь). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) цитратную кровь центрифугировали при температуре 25 °С в течение 10 минут при 1000 об/мин. Бедную тромбоцитами плазму (БТП) получали центрифугированием цитратной крови в течение 20 минут при комнатной температуре и при скорости вращения 4000 об/мин, которую

использовали для калибровки прибора. В качестве контроля была использована интактная обогащенная тромбоцитами плазма. В качестве группы сравнения высоких показателей агрегации тромбоцитов крови использовали Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

Измерения проводили без индукторов агрегации в спонтанном режиме. В настоящем исследовании использовали полуавтоматический 4-канальный анализатор агрегации тромбоцитов (фотометр) «АРАСТ 4004» (LABiТес, Германия). Для инициации спонтанной агрегации в цитратной крови производили восстановление уровня ионов  $Ca^{2+}$ , в качестве реагента использовали приготовленный раствор  $CaCl_2$  с молярной концентрацией 0,25 М. Соотношение пробы и реагента составило 250 мкл ОТП + 25 мкл  $CaCl_2$ . Время контакта исследуемых образцов с ОТП составило 3 минуты.

### Адгезия тромбоцитов

Для исследования использовали обогащенную тромбоцитами плазму, полученную из свежей цитратной донорской крови центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Группами сравнения служили ePTFE марки Gore-tex (Gore & Associates, Inc, США) и Polyethylene (LDPE) ERM – EC590 (Merck, Германия).

Образцы размером 1 см<sup>2</sup> инкубировали с 500 мкл ОТП при 37 °С в течение 2 ч, затем осторожно промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) для удаления неадсорбированных компонентов плазмы. После образцы фиксировали в 2% растворе глутаральдегида, приготовленного на 0,1 М фосфатном буфере в течение 6 ч. Далее производили обезвоживание образцов в серии спиртов восходящей концентрации (50, 75, 95 и 100%) в течение 15 минут в каждом. Оценку степени адгезии тромбоцитов осуществляли с помощью сканирующего электронного

микроскопа S3400N (Hitachi, Япония). Адгезивную способность поверхности материалов оценивали в 8 полях зрения, выбранных случайным образом, как индекс деформации тромбоцитов, который рассчитывали по формуле:

Индекс деформации = (число тромбоцитов степени I × 1 + число тромбоцитов степени II × 2 + число тромбоцитов степени III × 3 + число тромбоцитов степени IV × 4 + число тромбоцитов степени V × 5) / общее количество тромбоцитов (табл. 1).

### Статистическая обработка

Обработку количественных данных осуществляли общепринятыми методами статистики при помощи пакета прикладной программы для обработки медицинской и биологической информации «STATISTICA 6.0» (StatSoft, Inc., USA). Характер распределения в выборках оценивали при помощи критерия Колмогорова–Смирнова. В группах наблюдали распределение, отличное от нормального ( $p < 0,01$ ), в связи с чем все данные представлены как медианы (М) и квартили (25 и 75%). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни, достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Синтез полимера SIBS

Поли(стирол-блок-изобутилен-блок-стирол), полученный по методу последовательного внесения мономеров в контролируемой катионной полимеризации, характеризуется среднечисловой молекулярной массой в 33 000 г/моль и показателем полидисперсности 1,3. Структура полимера подтверждена данными гель-проникающей хроматографии.

#### Оценка цитотоксичности *in vitro* с использованием клеточных культур

При изучении клеточной адгезии (рис. 1) не выявлено достоверных отличий ( $p = 0,20$ ) свойств полимера SIBS (588 кл/мм<sup>2</sup>) от свойств культурального пластика (732 кл/мм<sup>2</sup>), который считается «золотым стандартом» для клеточной адгезии *in vitro*, при этом абсолютное количество адгезированных клеток для материала ePTFE (212 кл/мм<sup>2</sup>) оказалось в 3 раза меньше, чем для полимера SIBS ( $p < 0,001$ ).

Относительное количество жизнеспособных клеток Ea.hy 926 на разных полимерных образцах (рис. 1, б) достоверно не различалось ( $p = 0,56$ ). Соответственно, такая же ситуация складывалась и с относительным количеством мертвых клеток. На исследуемых полимерных образцах (SIBS, ePTFE) число мертвых клеток не различалось между собой ( $p =$

Таблица 1

Степени деформации тромбоцитов  
The platelet activation levels

Степень	Характеристика
I	Тромбоцит дискообразной формы, без деформации
II	Тромбоцит увеличен в размере с зачатками псевдоподий в виде выпячиваний (начальная стадия деформации)
III	Тромбоцит значительно увеличен в размере, неправильной формы, с ярко выраженными псевдоподиями, тромбоциты скапливаются
IV	Распластывание тромбоцита, цитоплазма распространяется между псевдоподиями
V	Тромбоцит в виде пятна с гранулами, за счет распространения цитоплазмы псевдоподии не могут быть идентифицированы

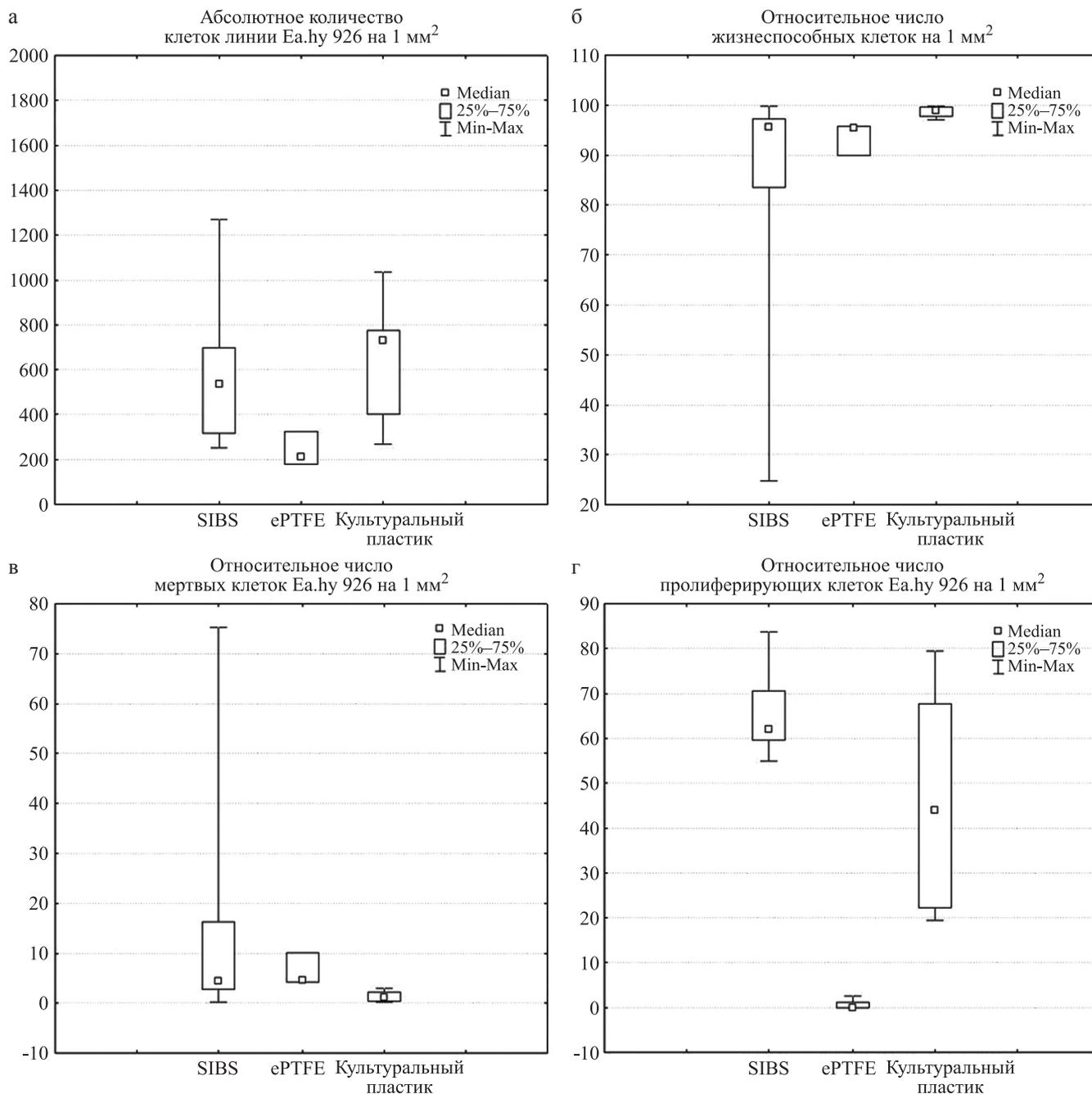


Рис. 1. Абсолютное количество клеток (а), относительное количество живых клеток (б), относительное количество мертвых клеток (в), относительное количество пролиферирующих клеток (г) Ea.hy 926 на различных полимерных поверхностях через 5 суток культивирования

Fig. 1. The absolute number of cells (a), the relative number of living cells (б), the relative number of dead cells (в), the relative amount of proliferating cells (г) Ea.hy 926 on different polymeric surfaces after 5 days of cultivation

0,93) и составило соответственно 4,40 и 4,72%, в то же время для культурального пластика данный параметр имел значение 1,16%, что оказалось в 4 раза ниже (рис. 1, в), чем на поверхностях материалов SIBS и ePTFE ( $p < 0,05$ ).

Однако крайне низкая пролиферация клеток на поверхности ePTFE (0,10%) доказала невозможность клеточной адгезии и пролиферации на данном материале (рис. 1, г). Как видно из рис. 2, максимальная

пролиферативная активность клеток линии Ea.hy 926 выявлена на поверхности полимера SIBS (62,04%), что оказалось в 1,4 раза выше, чем на культуральном пластике (44,00%), ( $p < 0,05$ ).

### Определение кальцификации *in vitro*

В результате исследования была обнаружена резистентность к кальцификации полимерных материалов SIBS, ePTFE (рис. 3, б, в) в условиях *in vitro*

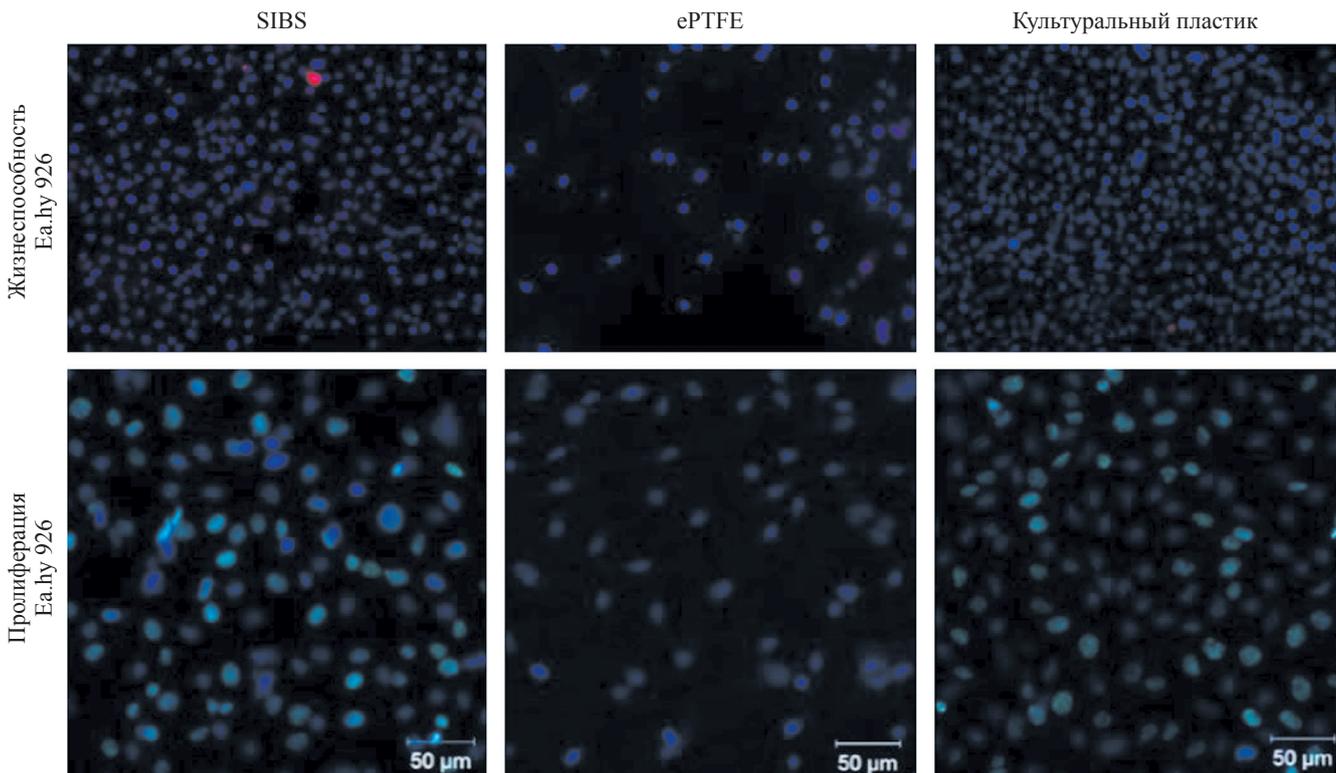


Рис. 2. Флюоресцентная микроскопия матриц с клетками. ×200

Fig. 2. Fluorescence microscopy of matrices with cells. ×200

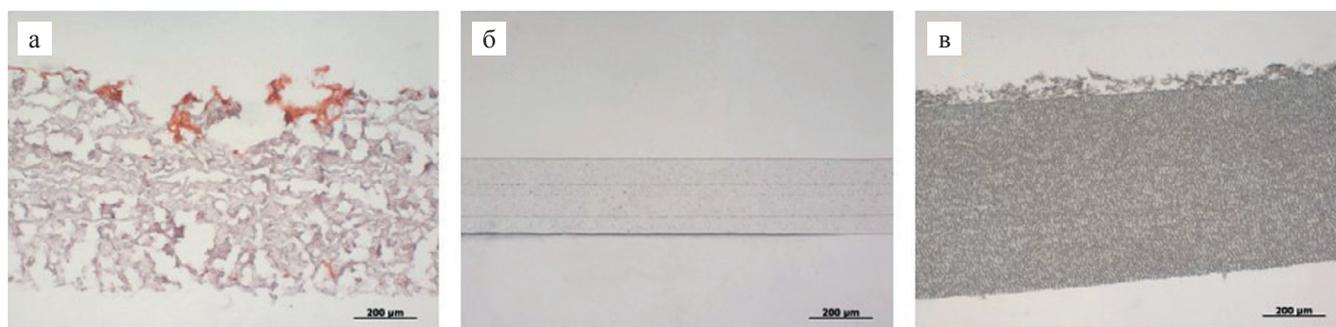


Рис. 3. Световая микроскопия, тест на кальцификацию *in vitro*, 6 недель инкубации; образцы материалов: GA-консервированный перикард крупного рогатого скота (а), SIBS (б), ePTFE (в). ×100

Fig. 3. Light microscopy, *in vitro* calcification test, 6 weeks of incubation; samples of materials: GA-preserved bovine pericardium (а), SIBS (б), ePTFE (в). ×100

теста, в отличие от образцов биологической ткани, минерализация которых наступала уже к 3-й неделе инкубации и становилась чуть более выраженной к 6-й неделе (рис. 3, а).

### Оценка биосовместимости *in vivo*

#### Ответная реакция ткани

После 14 дней имплантации была обнаружена умеренная макрофагальная реакция ткани на имплантированные материалы, отсутствие гигантских клеток, что демонстрирует хорошую биосовместимость исследуемых полимеров (рис. 4, а–в). Присутствие лимфатических узлов в окружающей имплан-

таты ткани было отмечено для всех типов полимеров, что указывает на течение воспалительного процесса, при этом для образца SIBS наблюдали минимальное количество. Гистологические исследования показали формирование рыхлой волокнистой ткани, предшествующей образованию соединительно-тканной капсулы, охватывающей полимерные образцы со средней толщиной 69 мкм (ePTFE), 50 мкм (GA-ксеноперикард) и 98 мкм (SIBS). При этом в случае биологических образцов наблюдали жировой инфильтрат, связанный с коллагеновыми волокнами. Степень неоваскуляризации была сравнимой для всех типов материалов – минимальная капиллярная пролифера-

ция, 1–3 очага неоваскуляризации с фибробластными структурами в поле зрения (ув.  $\times 400$ ). В случае биологических образцов и ePTFE (за счет его пористой структуры) была отмечена клеточная инфильтрация, особенно активная для GA-ксеноперикарда.

Долгосрочная имплантация (60 дней) привела к образованию плотной соединительно-тканной капсулы, представленной коллагеновыми волокнами, со средней толщиной 42 мкм для ePTFE и 58 мкм для SIBS (рис. 4, д, е). В случае GA-ксеноперикарда капсула четко не визуализировалась ввиду активного воспалительного процесса, причиной которого явилась значительная кальцификация. Присутствие гигантских клеток инородного тела после двух месяцев имплантации было отмечено для полимерного образца ePTFE и GA-ксеноперикарда, в случае SIBS гигантских клеток инородного тела обнаружено не было.

С позиции полуколичественной оценки (ISO 10993-6:2016), основанной на анализе показателей ответной реакции ткани (неоваскуляризация, фиброз, жировой инфильтрат), полимер SIBS можно отнести к биосовместимым относительно образцов сравнения (ePTFE, консервированный ксеноперикард, использующиеся сегодня в клинической практике протезирования клапанов сердца).

#### Кальцификация *in vivo*

Еще одним критерием биосовместимости является степень кальцификации материала в условиях контакта со средой организма. Гистологические исследования показали активную кальцификацию GA-ксеноперикарда (рис. 4, ж). Присутствие кальцификатов в случае ePTFE было обнаружено на поверхности полимерного образца (рис. 4, и). Точечные участки кристаллического кальция отмечены в толще

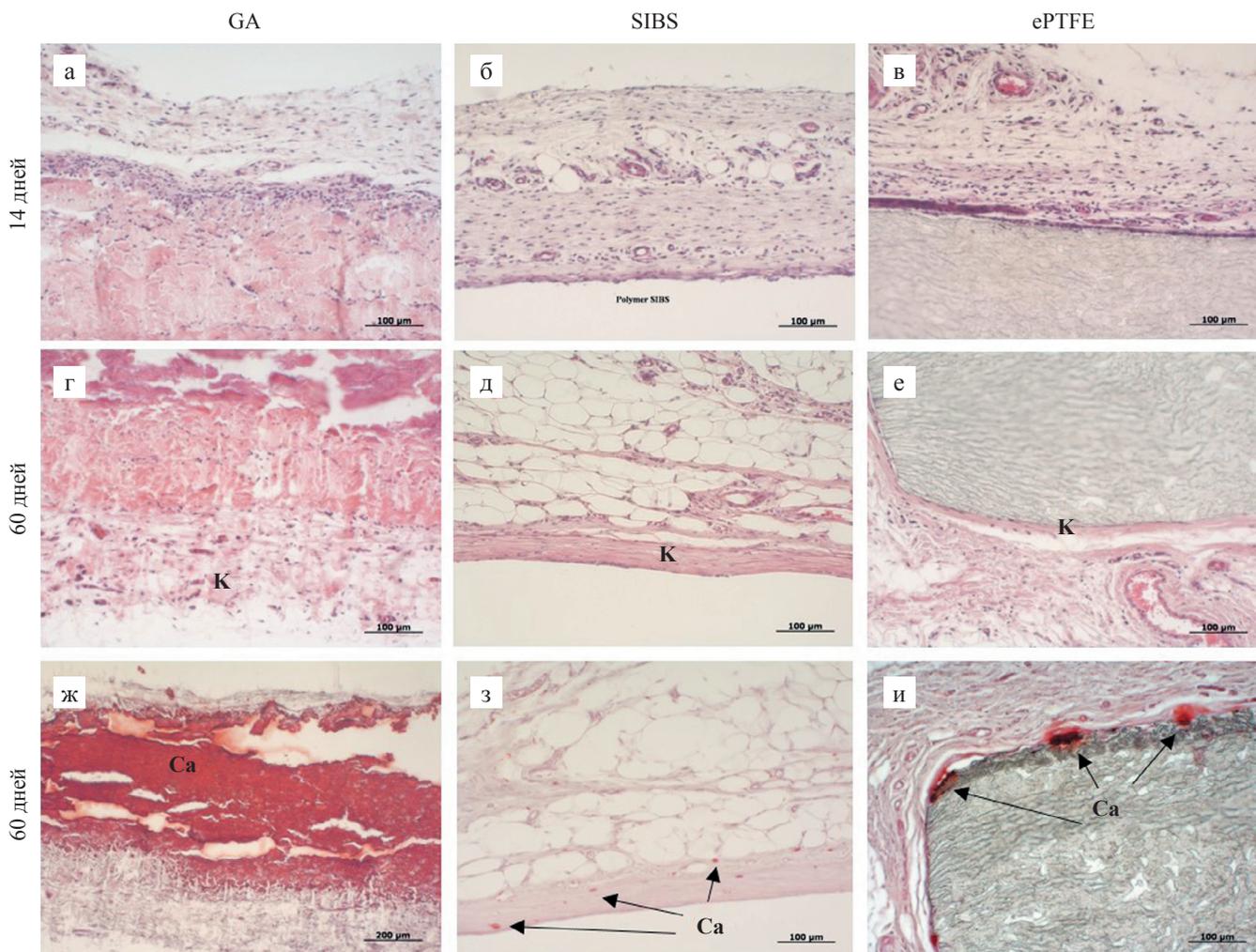


Рис. 4. Гистологические срезы полимерных матриц GA-ксеноперикарда (а, г, ж), SIBS (б, д, з), ePTFE (в, е, и), после имплантации крысам на срок 2 недели (а, б, в), 2 месяца (г, д, е). Окраска гематоксилин-эозином (а–е), ализариновым красным С (ж–и).  $\times 200$

Fig. 4. Histological sections of GA-xenopericardium (a, г, ж), SIBS (б, д, з), ePTFE (в, е, и), after implantation to rats for 2 weeks (a, б, в), 2 months (г, д, е). Staining with hematoxylin-eosin (a–e), coloring with alizarin red C (ж–и).  $\times 200$

соединительно-тканной капсулы, образованной вокруг SIBS.

Результаты количественной оценки показали статистически значимые различия в содержании кальция образцов SIBS и ePTFE ( $p < 0,05$ ). Также обнаружено значимое увеличение количества кальция в образцах GA-ксеноперикарда ( $p < 0,05$ ). Полное описание результатов представлено в табл. 2.

Таблица 2  
Количество кальция в образцах (мг/г)  
Calcium content in the samples (mg/g)

	Min	25%	Me	75%	Max
SIBS	0,23	0,23	<b>0,39</b>	0,51	0,55
ePTFE	0,49	0,53	<b>1,25</b>	2,70	2,95
GA-ксеноперикард	1,77	2,57	<b>93,79</b>	155,30	159,80

## Оценка гемосовместимости *in vitro*

### Степень гемолиза

Результаты проведенного исследования показали отсутствие отрицательного влияния полимера SIBS на клеточную мембрану эритроцитов. Так, уровень гемолиза эритроцитов крови после контакта с SIBS составил 0,35% (min: 0,03; max: 0,60; 25%: 0,11; 75%: 0,40), что статистически меньше в сравнении с отрицательным контролем ( $p < 0,05$ ).

При оценке степени лизиса эритроцитов после контакта с полимером на основе ePTFE уровень гемолиза составил 0,40% (min: 0,11; max: 2,40; 25%: 0,31; 75%: 0,67), что также статистически значимо ниже по сравнению с положительным контролем ( $p < 0,05$ ). Уровень гемолиза эритроцитов после контакта с полиэтиленом составил 1,82% (min: 1,16; max: 2,30; 25%: 1,41; 75%: 2,10). При сравнении двух групп полимеров (SIBS и ePTFE) между собой по степени выраженности гемолиза достоверных различий выявлено не было ( $p = 0,57$ ). При сравнении двух групп полимеров (SIBS и ePTFE) с полиэтиленом были получены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ).

### Агрегация тромбоцитов

Максимум агрегации тромбоцитов интактной обогащенной тромбоцитами плазмы составил 8,60% (min: 7,79%; max: 15,91%; 25%: 8,02; 75%: 10,12%). При этом образцы обогащенной тромбоцитами плазмы, контактировавшие с полиэтиленом, показали степень агрегации тромбоцитов на уровне 73,40% (min: 67,73%; max: 82,74%; 25%: 72,35; 75%: 78,99%). При оценке степени агрегации тромбоцитов после контакта с полимерами SIBS и ePTFE были получены следующие результаты: максимум агрегации после контакта с полимером SIBS составил 18,11% (min: 16,40%; max: 23,78%; 25%: 16,66; 75%: 20,42%); максимум агрегации тромбоцитов после контакта

с ePTFE – 22,74% (min: 18,6%; max: 28,56%; 25%: 22,45; 75%: 24,52%), что статистически значимо ниже максимума агрегации, индуцированного полиэтиленом ( $p < 0,05$ ).

### Адгезия тромбоцитов

Тромбоциты, адгезированные на поверхности, были выявлены для всех исследуемых материалов (рис. 5). Стоит отметить, что на одном из образцов SIBS отмечены отдельные участки с нехарактерным скоплением тромбоцитов III типа, расположенные направленно в центральной части образца.

При подсчете индекса деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимеров, были получены следующие показатели: индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полиэтилена, был равен 3,61 (min: 2,0; max: 4,25; 25%: 2,82; 75%: 4,0). Для полиэтилена были более свойственны тромбоциты IV типа, что составило 61,29% от общего количества адгезированных тромбоцитов. Индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимера SIBS, составил 3,25 (min: 2,1; max: 4,0; 25%: 3,06; 75%: 3,69). На поверхности SIBS были обнаружены тромбоциты преимущественно II–III типа, что в процентном соотношении от общего количества адгезированных тромбоцитов составляет 61,63 и 8,4% соответственно. Индекс деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности ePTFE, составил 3,76 (min: 3,0; max: 4,09; 25%: 3,29; 75%: 3,96). Для поверхности ePTFE были более свойственны тромбоциты III и IV типа, что составляет 41,54 и 26,76% соответственно.

При сравнении индексов деформации тромбоцитов, адгезированных на поверхности полимеров SIBS и ePTFE, с полиэтиленом статистически значимых различий не было выявлено ( $p = 0,54$  и  $p = 0,72$  соответственно).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Широкое применение в медицинской практике сегодня находят сополимеры и композиты благодаря своим уникальным свойствам, основанным на способности сочетать структурные фрагменты различной функциональности. В частности, блок-сополимеры стирола и изобутилена обладают термопластичностью, высокой прочностью, устойчивы к гидролитическому, окислительному и ферментативному воздействию ввиду линейной природы углеродной цепи с чередующимися вторичными и четвертичными атомами углерода, а также биологической инертности боковых групп (рис. 6) [15].

Оценка цитотоксичности пленок на основе синтезированного методом контролируемой катионной полимеризации модельного полимера группы SIBS показала его высокую гемосовместимость. Пролифе-

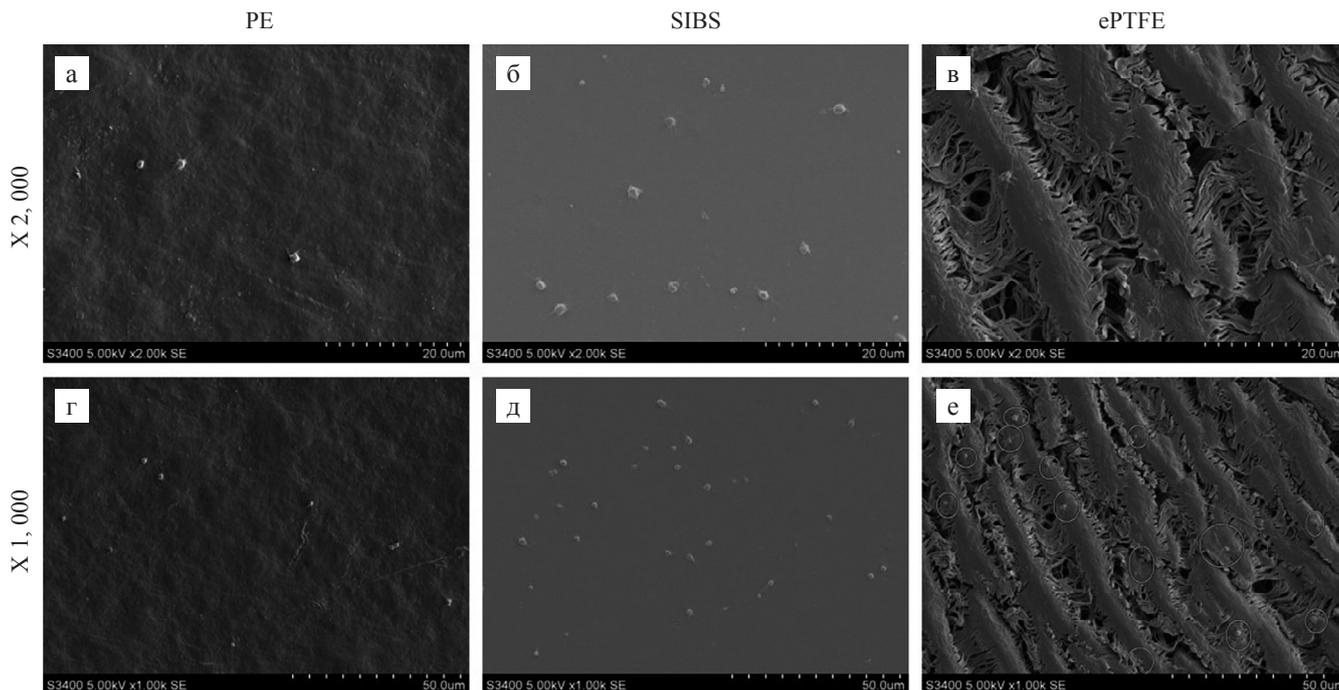


Рис. 5. Изображения СЭМ адгезии тромбоцитов на поверхности полимерных матриц из полиэтилена (а, г), SIBS (б, д) и ePTFE (в, е)

Fig. 5. SEM images of platelet adhesion on the surface of polymer matrices of polyethylene (а, г), SIBS (б, д) and ePTFE (в, е)

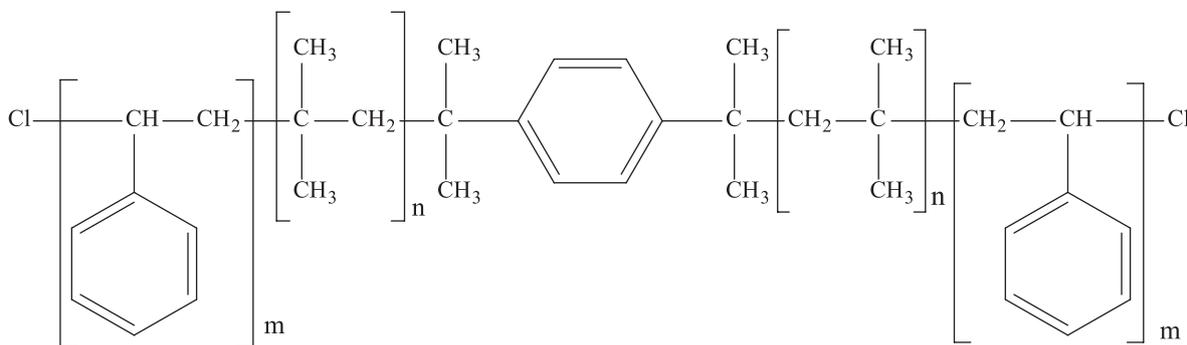


Рис. 6. Структурная формула поли(стирол-блок-полиизобутилен-блок-стирол)а

Fig. 6. The structural formula of poly(styrene-block-polyisobutylene-block-styrene)

ративный потенциал может дополнить картину функциональной активности клеток в случае проведения краткосрочных экспериментов, в которых полная динамика по изменению клеточной жизнеспособности не всегда успевает достичь своего максимума. В проведенных экспериментах была показана низкая способность к клеточной адгезии поверхности материала ePTFE, что коррелирует с результатами других исследований [22]. Способность к клеточной адгезии и пролиферации важна в тканевой инженерии клапанов сердца [6]. Учитывая полученные в ходе эксперимента результаты, можно сделать вывод о том, что полимер группы SIBS имеет большую способность к спонтанной эндотелизации и большой

потенциал при разработке тканеинженерных конструкций, чем ePTFE.

Имплантация любого инородного материала неизбежно сопровождается ответной реакцией организма, при этом формирование устойчивой соединительно-тканной (фиброзной) капсулы свидетельствует о завершении воспалительного процесса. Толщина фиброзной капсулы характеризует степень биосовместимости исследуемого материала и для образца SIBS после 60 дней эксперимента оказалась незначительно больше, чем аналогичное значение для образца ePTFE, что сопоставимо с результатами других экспериментов [17]. Образование соединительной ткани на створчатом аппарате имплантируемого протеза создает защитный барьер, отделяя

синтетический материал имплантата от среды организма, в то же время данный процесс необходим для образования плотного соединения с корнем аорты с целью предотвращения паравальвулярной регургитации и надежной фиксации имплантата. Гигантские клетки инородного тела, отмеченные для эксплантационных образцов ePTFE и GA-ксеноперикарда, способны секретировать активные формы кислорода и другие химические агенты, потенциально приводящие к окислительному повреждению и разрушению имплантированных устройств [23], при этом для материала SIBS клеток данного типа после 60 дней эксперимента обнаружено не было. Вероятнее всего, биосовместимость SIBS связана с тем, что наружная часть полимера (10 нм) представлена полиизобутиленовым блоком, в то время как полистирольные блоки расположены внутри полимерного образца и не находятся в непосредственном контакте с биологическими тканями [24].

Основной причиной аортального стеноза нативных клапанов и биопротезов является кальцификация – инициирование и рост кристаллов фосфата кальция, необходимых для костной ткани, в нетипичных локациях. Полимеры в отличие от ксеноматериалов не содержат богатый фосфором клеточный мусор и разрушенный коллаген, которые могут провоцировать минерализацию, вследствие чего более резистентны к данному процессу. На основании полученных в ходе *in vitro* эксперимента результатов можно судить об отсутствии провоцирующих образование кристаллических форм кальция характеристик исследуемых полимеров. При этом активная кальцификация GA-ксеноперикарда подтверждает данные проведенных ранее исследований [25].

Склонность к кальцификации исследуемых материалов также была оценена на модели *in vivo* при имплантации крысам. Результаты количественного содержания кальция для GA-ксеноперикарда, выбранного в качестве положительного контроля, соответствуют литературным данным [26] и значимо превышают те же значения для исследуемых полимеров. Выделяют два механизма минерализации, возникающей в результате контакта со средой организма синтетического материала: зарождение кальций-фосфатных кристаллов на поверхности или на границе раздела соединительно-тканной капсулы и имплантата; и кальцификацию биологической ткани, сформированной вокруг имплантата [27]. В случае материала группы сравнения, ePTFE, наблюдали первый тип минерализации: кальцификаты располагались на поверхности образца; в то время, как в случае материала SIBS кальций обнаружен в фиброзной капсуле. Резистентность к кальцификации полимера SIBS оказалась значимо выше по сравнению с ePTFE по результатам количественной оценки, что свидетельствует о возможности применения SIBS

в качестве основы синтетического протеза клапана сердца. В литературе также присутствуют сведения о склонности материалов из ePTFE к минерализации в клинических экспериментах [8]. Большая склонность ePTFE к кальцификации может быть обусловлена пористой структурой его поверхности, в результате чего происходит накопление клеточных элементов и вновь сформированного внеклеточного матрикса.

При оценке степени гемолиза эритроцитов, индуцированного поверхностью полимера SIBS, было выявлено отсутствие токсического действия полимера на форменные элементы крови (эритроциты). Также полимер ePTFE, который выступал в качестве группы сравнения, не вызывал разрушения клеточной мембраны эритроцитов. При этом уровень гемолиза эритроцитов после контакта с полиэтиленом составил 1,82%, что свидетельствует о его склонности к тромбообразованию. Согласно результатам оценки гемолиза эритроцитов, исследуемые полимеры SIBS и ePTFE можно считать гемосовместимыми, поскольку уровень гемолиза эритроцитов после контакта с поверхностью полимеров SIBS и ePTFE не превышал 0,4% при допустимых показателях степени гемолиза до 2% [28]. Полученные нами данные согласуются с результатами зарубежных авторов [29].

Адгезия тромбоцитов происходит в результате разной заряженности их поверхности и поверхности контактирующих с кровью материалов и является начальным этапом формирования тромба, однако одной адгезии недостаточно для запуска каскада тромбогенных реакций. Только активированные тромбоциты способны выделять в кровь вещества, способные привести к необратимой агрегации. Адгезия тромбоцитов, имеющих правильную круглую форму, которые еще не деформировались, не несет тромбогенной опасности, поскольку адсорбция тромбоцитов I степени является обратимой и их можно легко вернуть в кровоток [30]. Полученные нами результаты по оценке адгезионных свойств показали, что тромбоциты адгезируются на все полимеры, независимо от их вида. Возможно, это связано с разностью потенциалов поверхности полимеров и тромбоцитов [31].

В результате исследования влияния поверхности полимеров на степень агрегации тромбоцитов было выявлено, что полимеры SIBS и ePTFE не вызывают повышения агрегации тромбоцитов крови, в отличие от полиэтилена. На основании полученных данных о высокой степени агрегации крови после контакта с полиэтиленом можно предположить, что данный полимер содержит низкомолекулярные примеси, которые оказывают раздражающее действие на тромбоциты крови, что, в свою очередь, приводит к их активации и высвобождению индукторов агрегации, в то время как SIBS и ePTFE подобных примесей не содержат.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезированный модельный полимер группы SIBS при сравнении свойств гемосовместимости не уступает используемому в настоящее время в клинической практике в качестве материала для протезирования клапанов сердца ePTFE. При этом эксперименты по определению степени кальцификации, клеточной адгезии и пролиферации продемонстрировали преимущества исследуемого полимера группы SIBS. Таким образом, можно сделать вывод о потенциале материала SIBS при разработке полимерных протезов клапанов сердца нового поколения. При этом дополнительное модифицирование поверхности полимерного материала с целью увеличения гидрофильности позволит снизить его адгезионные свойства. Повышение гемосовместимости модельного полимера возможно также за счет модифицирования различными веществами с антитромботическим действием, в частности гепарином.

*Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2015-0011 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов», а также при поддержке субсидии по программе 5-100.*

*This study was supported by the Complex Program of Basic Research under the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the Basic Research Topic of Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases No 0546-2015-0011 «Pathogenetic basis for the development of cardiovascular implants from biocompatible materials using patient-oriented approach, mathematical modeling, tissue engineering, and genomic predictors», also the study was supported by 5-100 program.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Manji RA, Ekser B, Menkis AH, Cooper DKC. Bioprosthetic heart valves of the future. *Xenotransplantation*. 2014; 21 (1): 1–10. doi: 10.1111/xen.12080. PMID: PMC4890621.
2. Jaffer IH, Whitlock RP. A mechanical heart valve is the best choice. *Heart Asia*. 2016; 8 (1): 62–64. doi: 10.1136/heartasia-2015-010660. PMID: PMC4898622.
3. Chambers J. Prosthetic heart valves. *Int J Clin Pract*. 2014; 68 (10): 1227–1230. doi: 10.1111/ijcp.12309. PMID: 24423099.
4. Smith M, Cantwell WJ, Guan Z, Tsoupanos S, Theobald MD, Nurick GN et al. The quasi-static and blast response of steel lattice structures. *Journal of Sandwich Structures and Materials*. 2011; 13 (4): 479–501. doi: 10.1177/1099636210388983.
5. Hawreliak JA, Lind J, Maddox B, Barham M, Messner M, Barton N et al. Dynamic Behavior of Engineered Lattice Materials. *Sci Rep*. 2016; 6: 28094. doi: 10.1038/srep28094. PubMed PMID: 27321697. PubMed Central PMCID: PMC4913358.
6. Hasan A, Ragaert K, Swieszkowski W, Selimovic S, Paul A, Camci-Unal G et al. Biomechanical properties of native and tissue engineered heart valve constructs. *Journal of Biomechanics*. 2014; 47: 1949–1963. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.09.023.
7. Базылев ВВ, Воеводин АБ, Раджабов ДА, Россейкин ЕВ. Первый опыт транспикальной имплантации протеза аортального клапана «МедИнж». *Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания»*. 2016; 17 (6): 141. Bazylev VV, Voevodin AB, Radzhabov DA, Rossejkin EV. Pervyj opyt transapikal'noj implantacii proteza aortal'nogo klapana «MedInzh». *Bulleten' NCCSSH im. A.N. Bakuleva RAMN «Serdechno-sosudistye zabolevanija»*. 2016; 17 (6): 141.
8. Bezuidenhout D, Zilla P. Flexible leaflet polymeric heart valves. *Cardiovasc Card Ther Devices*. 2014; 15: 93–129.
9. Daebritz SH, Fausten B, Hermanns B, Franke A, Schroeder J, Groetzner J et al. New flexible polymeric heart valve prostheses for the mitral and aortic positions. *Heart Surg Forum*. 2004; 7 (5): 525–532. PMID: 15799940. doi: 10.1532/HSF98.20041083.
10. Chetta GE, Lloyd JR. The design, fabrication and evaluation prosthetic heart valve. *J Biomech Eng*. 1980; 102: 34–41. PMID: 7382451.
11. Jiang H, Campbell G, Boughner D, Wand WK, Quantz M. Design and manufacture of a polyvinyl alcohol (PVA) cryogel tri-leaflet heart valve prosthesis. *Medical Engineering & Physics*. 2004; 26: 269–277. PMID: 15121052. doi: 10.1016/j.medengphy.2003.10.007.
12. Quintessenza JA, Jacobs JP, Chai PJ, Morell VO, Lindberg H. Polytetrafluoroethylene bicuspid pulmonary valve implantation: experience with 126 patients. *World J Pediatr Congenit Heart Surg*. 2010; 1 (1): 20–27. PMID: 23804719. doi: 10.1177/2150135110361509.
13. Kidane AG, Burriesci G, Edirisinghe M, Ghanbari H, Bonhoeffer P et al. A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets. *Acta Biomaterialia*. 2009; 5: 2409–2417. PMID: 19497802. doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.025.
14. Claiborne TE, Sheriff J, Kuetting M, Steinseifer U, Slepian MJ, Bluestein DJ. In vitro evaluation of a novel hemodynamically optimized trileaflet polymeric prosthetic heart valve. *Biomech Eng*. 2013; 135 (2): 021021. PMID: 23445066. PMID: PMC5413125. doi: 10.1115/1.4023235.

15. Strickler F, Richard R, McFadden S, Lindquist J, Schwarz MC, Faust R et al. *In vivo* and *in vitro* characterization of poly(styrene-*b*-isobutylene-*b*-styrene) copolymer stent coatings for biostability, vascular compatibility and mechanical integrity. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Feb; 92 (2): 773–782. doi: 10.1002/jbm.a.32418.
16. Pinchuk L, Wilson GJ, Barry JJ, Schoepfoerster RT, Parel JM, Kennedy JP. Medical applications of poly(styrene-block-isobutylene-block-styrene) («SIBS»). *Biomaterials*. 2008; 29 (4): 448–460. PMID: 17980425. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.041.
17. Fray ME, Prowans P, Puskas JE, Altsta V. Biocompatibility and Fatigue Properties of Polystyrene-Polyisobutylene-Polystyrene, an Emerging Thermoplastic Elastomeric Biomaterial. *Biomacromolecules*. 2006, 7, 844–850.
18. Wang Q, McGoron AJ, Bianco R, Kato Y, Pinchuk L, Schoepfoerster RT. *In vivo* assessment of a novel polymer (SIBS) trileaflet heart valve. *J Heart Valve Dis*. 2010; 19: 499–505. PMID: 20845899.
19. Duraiswamy N, Choksi TD, Pinchuk L, Schoepfoerster RT. A phospholipid-modified polystyrene-polyisobutylene-polystyrene (SIBS) triblock polymer for enhanced hemocompatibility and potential use in artificial heart valves. *J Biomater Appl*. 2009; 23 (4): 367–379. doi: 10.1177/0885328208093854.
20. Claiborne TE, Slepian MJ, Hossainy S, Bluestein D. Polymeric trileaflet prosthetic heart valves: evolution and path to clinical reality. *Expert Rev Med Devices*. 2012; 9 (6): 577–594. doi: 10.1586/erd.12.51. PMID: 23249154. PMID: PMC3570260.
21. Kaszas G, Puskas JE, Kennedy JP, Hager WG, *Polym J*. Sci. Part A: Polym. Chem. 1991, 29, 427–435. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pola.1991.080290316>.
22. Lu S, Zhang P, Sun X, Gong F, Yang S, Shen L et al. Synthetic ePTFE grafts coated with an anti-CD133 antibody-functionalized heparin/collagen multilayer with rapid *in vivo* endothelialization properties. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Aug 14; 5 (15): 7360–7369. doi: 10.1021/am401706w.
23. Wiggins MJ, Wilkoff B, Anderson JM, Hiltner A. Biodegradation of polyether polyurethane inner insulation in bipolar pacemaker leads. *J Biomed Mater Res*. 2001; 58: 302–307.
24. Knoll A, Magerle R, Krausch G. Tapping Mode Atomic Force Microscopy on Polymers: Where Is the True Sample Surface? *Macromolecules*. 2001, 34, 4159–4165.
25. Bracaglia LG, Yu L, Hibino N, Fisher JP. Reinforced pericardium as a hybrid material for cardiovascular applications. *Tissue Eng Part A*. 2014 Nov; 20 (21–22): 2807–2816. doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0516.
26. Jee KS, Kim YS, Park KD, Kim YH. A novel chemical modification of bioprosthetic tissues using L-arginine. *Biomaterials*. 2003 Sep; 24 (20): 3409–3416.
27. Hilbert S, Ferrans V, Tomita Y, Eidbo E, Jones M. Evaluation of explanted polyurethane trileaflet cardiac valve prostheses. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1987. 94 (3): 419–429.
28. Corvo MF, Dugan SW, Werth MS, Stevenson CM, Summers SA, Pohl DR et al. Cadaret Analytica AutoStart 150 mL Burette. *NAMSA*. 2008: 8.
29. Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017 Jun; 11 (6): 1701–1709. doi: 10.1002/term.2064.
30. Xia Ye, Ze Wang, Xianghua Zhang, Ming Zhou, Lan Cai. Hemocompatibility research on the micro-structure surface of a bionic heart valve. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2014; 24: 2361–2369.
31. Thevenot P, Hu W, Tang L. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Curr Top Med Chem*. 2008; 8 (4): 270–280.

Статья поступила в редакцию 13.09.2018 г.  
The article was submitted to the journal on 13.09.2018

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-81-87

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

*A.S. Sotnichenko<sup>1</sup>, I.V. Gilevich<sup>2</sup>, K.I. Melkonian<sup>1</sup>, Ya.A. Yutskevich<sup>1</sup>, A.V. Karakulev<sup>2</sup>, S.B. Bogdanov<sup>2</sup>, I.M. Bykov<sup>1</sup>, A.N. Redko<sup>1</sup>, V.A. Porhanov<sup>2</sup>, S.N. Alekseenko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация

<sup>2</sup> БУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница № 1 имени С.В. Очаповского» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Российская Федерация

Несмотря на достижения современной хирургии в лечении повреждений кожных покровов, актуальным остается поиск новых методов для более быстрого и эффективного заживления ран. Тканевая инженерия, несомненно, представляет интерес для разработки таких технологий. **Цель** данной работы состояла в определении оптимального протокола получения децеллюляризованного дермального матрикса для последующей разработки тканеинженерной кожи. **Материалы и методы.** Экспериментальным животным был 1 поросенок породы Ландрас. После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы толщиной 0,3 см. В работе рассматривалось 2 протокола децеллюляризации: протокол № 1 на основе применения тритон X100 и дезоксихолата, протокол № 2 только на основе дезоксихолата. Всего циклов обработки по 2 протоколам было 5. Ацеллюлярные матриксы после обработки были исследованы следующим образом: гистологический анализ, количественное определение содержания ДНК. Далее была проведена статическая рецеллюляризация матриксов фибробластами дермы свиньи. После чего матриксы были исследованы на цитотоксичность с помощью ХТТ-теста и теста на дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток. **Результаты.** Проведенный сравнительный анализ двух протоколов децеллюляризации дермы свиной кожи показал, что оба протокола эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом сохраняется архитектура межклеточного вещества неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов на основе анализа жизнеспособности клеток по данным ХТТ-теста и адгезии клеток к матриксу преимущества демонстрирует матрикс, обработанный по протоколу № 1. **Заключение.** В настоящем исследовании был отмечен протокол децеллюляризации на основе тритон X100 и дезоксихолата. Полученные результаты являются первым этапом для дальнейшей разработки тканеинженерной кожи.

*Ключевые слова:* регенеративная медицина, кожа, децеллюляризация, тканеинженерная конструкция.

## DEVELOPMENT OF METHODS FOR OBTAINING DERMAL EXTRACELLULAR MATRIX

*A.S. Sotnichenko<sup>1</sup>, I.V. Gilevich<sup>2</sup>, K.I. Melkonian<sup>1</sup>, Ya.A. Yutskevich<sup>1</sup>, A.V. Karakulev<sup>2</sup>, S.B. Bogdanov<sup>2</sup>, I.M. Bykov<sup>1</sup>, A.N. Redko<sup>1</sup>, V.A. Porhanov<sup>2</sup>, S.N. Alekseenko<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Kuban State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute – S.V. Ochapovskiy Regional Clinical Hospital № 1, Ministry of Health of the Krasnodar region, Krasnodar, Russian Federation

Despite the achievements of modern surgery in the treatment of cutaneous injuries, the search for new methods for faster and more effective wound healing remains topical. Tissue engineering is undoubtedly of interest for the development of such technologies. **Aim:** to determine the optimal protocol for obtaining a decellularized dermal

**Для корреспонденции:** Сотниченко Александр Сергеевич. Адрес: 350063, Краснодар, ул. Седина, д. 4. Тел. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru

**For correspondence:** Sotnichenko Alexander Sergeevich. Address: 4, Sedin str., Krasnodar, 350063, Russian Federation. Tel. (962) 85-18-237. E-mail: alex24.88@mail.ru

matrix for the subsequent development of tissue-engineered skin. **Materials and methods.** The experimental animal was 1 pig of the Landrace breed. After skin pretreatment with a dermatome, the samples were taken of a thickness of 0.3 cm. Two decellularization protocols were examined: protocol No. 1 based on the using of Triton X-100 and deoxycholate, protocol No. 2 only based on deoxycholate. Total processing cycles for 2 protocols were 5. The acellular matrices after treatment were examined with: histological analysis, quantitative determination of DNA content. Further, static matrix recellularization of porcine dermis fibroblasts was carried out. After that, the matrices were assessed for cytotoxicity using an XTT test and a test for the differential staining of living and dead cells. **Results.** The comparative analysis of two protocols for decellularization of porcine dermis showed that both protocols effectively remove cells and nuclear material, while maintaining the architectonic of the intercellular substance intact, since fibrous structures are not destroyed. But when analysed the biocompatibility of matrices on the basis of cell viability analysis according to the XTT test and cell adhesion to the matrix, the matrix processed according to protocol No. 1 demonstrates the advantages. **Conclusion.** In this study, a decellularization protocol based on Triton X-100 and deoxycholate was noted. The results are the first stage for the further development of tissue-engineered skin.

*Key words: regenerative medicine кожа, децеллюляризация, тканеинженерная конструкция.*

## ВВЕДЕНИЕ

Кожа является самым большим органом в организме и выполняет ряд важных функций, прежде всего барьерную, иммунную, сенсорную, обладает способностью к саморегуляции и рядом других особенностей [1]. Потеря целостности кожных покровов из-за травм или болезней может привести к острому физиологическому дисбалансу и в конечном итоге к значительной инвалидности или даже смерти [2].

Повреждения кожных покровов разнообразны и могут возникать из-за ожогов, травм или быть обусловлены трофическими нарушениями вследствие венозной гипертензии, артериальной недостаточности, сахарным диабетом и другими причинами, приводящими к изъязвлениям кожи. Ряд наследственных заболеваний, связанных с нарушением структурных белков эпидермиса или дермы, также могут вызывать развитие обширных кожных ран и хронических эрозий [3].

Как правило, при повреждении кожи происходит ряд сложных биохимических процессов, направленных на заживление раны. В поверхностных ранах, где дефекты ограничены эпидермисом или верхним дермальным слоем, необходима регенерация только эпидермиса, что приводит к быстрому заживлению и минимальному риску образования рубцов. Тем не менее в ранах, проникающих глубже дермального слоя, с отслоением кожи или подкожно-жировой клетчаткой, осложнения, такие как инфекция, развиваются чаще, и рубцы, как правило, остаются даже после полного заживления раны. Длительность процесса заживления ран в действительности имеет тенденцию варьировать у разных людей и зависит от различной степени тяжести повреждения [4].

Терапевтические вмешательства по восстановлению кожных покровов и функций кожи являются важным долгосрочным направлением как традиционной, так и трансляционной медицины, в которой в последние годы был отмечен ряд ключевых дости-

жений и клинических преимуществ [3]. Выбор подходящей стратегии заживления ран имеет решающее значение для успешного их закрытия. От данного выбора зависит скорость заживления раневой поверхности, вероятность наступления осложнений и образования рубцов. В настоящее время используются различные методы для закрытия раневых дефектов. В качестве покрытий раневых поверхностей применяют трупные аллотрансплантаты, ксенотрансплантаты, синтетические материалы. Золотым стандартом лечения большинства кожных ран остается аутодермопластика.

Благодаря интеграции инженерных дисциплин с биологическими науками в настоящее время активно развивается регенеративная медицина [5]. Рассматриваются возможности применения клеточных технологий, дополнительных биологических факторов, которые направлены на стимуляцию регенерации ткани. Проводятся экспериментальные работы по созданию тканеинженерной полноценной кожи [6]. Такие разработки интересны, и несомненно, могут оказаться полезными, особенно в тех случаях, когда имеется значительный дефицит кожных покровов и невозможно выполнить аутодермопластику.

Тканеинженерный подход к созданию искусственных органов включает в себя использование внеклеточных матриксов, стволовых клеток и биологически активных веществ. Одним из методов получения матриксов является децеллюляризация нативной ткани или органа. Выбор оптимального способа получения внеклеточного матрикса является одной из главных задач в тканевой инженерии. В своей работе мы проводили сравнительный анализ 2 протоколов получения ацеллюлярного дермального матрикса для последующего создания тканеинженерной кожи.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты проводили в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экс-

периментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1972 г.) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), после одобрения протоколов исследования локальным этическим комитетом, в ЦНИЛ, лаборатории фундаментальных исследований в области регенеративной медицины на базе Кубанского государственного медицинского университета. Забор образцов нативной дермы производили в стерильных условиях операционной при виварии. Экспериментальным животным был 1 поросенок породы Ландрас (возраст 12 недель, масса 22 кг). После предварительной обработки кожи дерматомом забирали образцы дермы толщиной 0,3 см.

### **Децеллюляризация дермального матрикса с последующей оценкой качества каркаса**

Для децеллюляризации дермы нами были предложены 2 различных протокола воздействия. На первом этапе образцы размером 2×1×0,3 см замораживали при температуре –80 °С, далее следовала обработка раствором Трипсина–Версена (1:1, «Биолот», Россия) в термошейкере-инкубаторе при температуре +37 °С в течение 18 часов. На следующем этапе следовала обработка матрикса растворами детергентов на вращающейся платформе при 170 об/мин. Для протокола № 1 было использовано чередование 1% раствора тритона X100 (Sigma-Aldrich, США) и 4% раствора дезоксихолата натрия (Sigma-Aldrich, США) в комбинации с 0,002 М Na<sub>2</sub>-ЭДТА, по 2 часа воздействия каждый. Количество циклов обработки – 5. Обработка детергентами в протоколе № 2 состояла только из 4% раствора дезоксихолата натрия в комбинации с 0,002 М Na<sub>2</sub>-ЭДТА в течение 4 часов, количество циклов также было равным 5. После каждого цикла воздействия матрикса промывали в деионизированной воде в течение 30 минут. Финальный этап обработки по обоим протоколам состоял из воздействия свиной панкреатической ДНКазы I (Sigma-Aldrich, США, 2000 ЕД растворили в 200 мл фосфатно-солевого буфера Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) в течение 4 часов в термошейкере-инкубаторе при температуре +37 °С.

Полученные образцы нативной и децеллюляризированной дермы фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине, дегидратировали и заключали в парафин по стандартной методике. С помощью микротомы получали срезы толщиной 4 мкм. Для общегистологической оценки препаратов проводили окраску срезов гематоксилином и эозином (Sigma-Aldrich, США). Клеточные ядра визуализировали с использованием флуорофора (4',6'-диамидино-2-фенилиндола) DAPI (Sigma-Aldrich, США). Изучение

микропрепаратов проводили на микроскопе Olympus CX 41 (Япония).

Количественное определение содержания ДНК выполняли на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., США) с использованием набора реагентов (Dneasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Швеция) по протоколу фирмы-изготовителя.

### **Рецеллюляризация дермального матрикса с последующей оценкой биосовместимости с клетками *in vitro***

Для оценки биосовместимости, способности клеток к адгезии к дермальному матриксу использовали статический метод рецеллюляризации дермальными фибробластами, выделенными и культивированными из дермы свиньи. Для выделения клеток из дермы был использован стандартный ферментативный протокол на основе 0,1% раствора коллагеназы. Клетки культивировали с использованием полной питательной среды, состоящей из раствора DMEM (Gibco), 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco) и 1% раствора антибиотика-антимикотика (Gibco), в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. После достижения конfluence до 80% клетки были пассированы с помощью раствора Трипсина («Биолот», Россия) и продолжали культивировать до 2-го пассажа. Затем полученное количество клеток было использовано для проведения ХТТ-теста и теста на дифференциальное окрашивание живых и мертвых клеток. Рабочий раствор ХТТ реагента готовили в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Cell proliferation assay ХТТ, AphliChem GmbH, Германия). Вначале образцы децеллюляризованных дермальных матриксов размером 0,3×0,3 см укладывали в 96-луночную планшете, затем засеивали образцы суспензией фибробластов из расчета 25 000 клеток на каркас при помощи пипетора. После 72 ч культивирования в каждую лунку добавляли 200 мкл рабочего раствора ХТТ, время инкубации составляло 4 ч. В качестве положительного контроля были взяты клетки, свободно культивируемые в планшете. Результаты оценивали при помощи многофункционального ридера FilterMax F5 (Molecular Devices, США) в стандартных условиях при длинах волн 450 нм по предустановленным протоколам фирмы – производителя прибора.

Для визуальной оценки способности матриксов поддерживать клеточный рост и их цитотоксичность проводили при статическом засеивании фибробластами децеллюляризованных каркасов дермы дифференциальное окрашивание живых и погибших клеток с использованием набора LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, США) с кальцеином АМ и гомодимером этидия согласно инструкции производителя. Изучение микропрепаратов

проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus IX 51 (Япония).

### Статистический анализ

Статистическая обработка полученного материала произведена с использованием пакета программ MS Excel, v6.0, GraphPadPrism version 6.04 (источник [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Результаты исследований оценены с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал рассчитывался по таблице распределения Стьюдента. Достоверными признавались различия при значениях  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения децеллюляризации дермы нами был выбран детергент-энзиматический метод, который позволяет наиболее полным образом удалять клетки из тканей, но в то же время щадящий по отношению к белкам волокон внеклеточного матрикса. Различие в составе протоколов было продиктовано нашим желанием сократить время воздействия дезоксихолата натрия на ткани и оценить разницу в эффекте воздействия на ткани в сравнении с протоколом, в котором использован более мягкий по своему действию на внеклеточный матрикс детергент тритон X100. Вначале отработки протоколов одним из реагентов выбора на подготовительном этапе был раствор додецил сульфата натрия. Однако высокая концентрация вещества, необходимая для разрушения клеток сосочкового слоя дермы, оказывала значительное повреждающее воздействие на волокна внеклеточного матрикса. Невозможность полностью элиминировать действующий раствор из матрикса приводила к значительно худшему росту клеток на нем и к их гибели. Полученные данные заставили нас отказаться от дальнейшего применения раствора

додецил сульфата натрия, что соответствовало данной литературе [7].

Также на подготовительном этапе мы столкнулись с тем, что дерма, взятая одновременно с эпидермисом, хуже поддается децеллюляризации. Возможно, это связано со сложностью проникновения детергентов сквозь толстый эпителиальный слой и, несомненно, плотную базальную мембрану [8]. Решением возникшей сложности децеллюляризации кожи стало применение раствора Трипсина–Версена, который, по данным литературы, эффективно воздействует именно на клетки плоского эпителия, удаляя их, а также разрыхляет саму дерму, делая ее более восприимчивой к воздействию детергентов.

Окрашивание гематоксилином и эозином, проводимое нами после каждого цикла обработки детергентами, показало, что сохранные клетки и клеточные ядра в матриксе отсутствовали уже после 2-го цикла обработки в протоколе № 1 и после 1-го цикла обработки в протоколе № 2. Однако большое количество базофильно окрашенных нитей матрикса, присутствовавших в срезах, и высокое количественное содержание ДНК в тканях продиктовали необходимость увеличения количества циклов обработки до 5 в обоих случаях (рис. 1).

Окраска ядерного материала препаратов с помощью флуорофора DAPI подтвердила указанную тенденцию. В нативной дерме клеточные ядра активно флуоресцировали и были выявлены в большом количестве. В децеллюляризованных образцах обнаружили лишь незначительную аутофлуоресценцию волокон внеклеточного матрикса после проведения пятого цикла обработки (данные не представлены).

Определение остаточного содержания ДНК – важный этап оценки полученного матрикса после проведенной децеллюляризации. От наличия ДНК

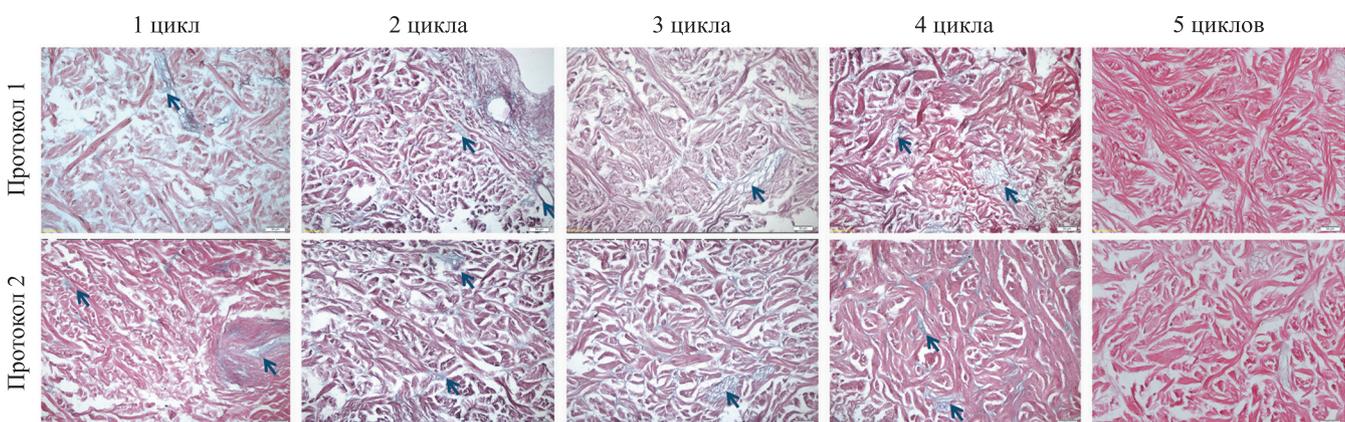


Рис. 1. Гистологический анализ. Динамика последовательных изменений структуры внеклеточного матрикса в течение децеллюляризации. Стрелками отмечены базофильно окрашенные тяжи, содержащие остаточный ядерный материал.  $\times 200$

Fig. 1. Histological analysis. Dynamics of successive changes in the structure of the extracellular matrix during decellularization. Pointers indicate basophilically colored bands containing residual nuclear material.  $\times 200$

зависит развитие неблагоприятных реакций со стороны организма реципиента, поскольку многие децеллюляризованные ткани получают из ксено- и аллогенных источников и есть опасения, что эта ДНК может быть включена в клетки реципиента. Количественный анализ показал, что содержание ДНК в децеллюляризованной дерме после 5-го цикла обработки снижалось до 19,8% (65,4 нг/мг ткани) и 12,1% (40,1 нг/мг ткани) по протоколу № 1 и № 2 соответственно в сравнении с количеством ДНК в нативной дерме (330,4 нг/мг ткани). Полученные результаты свидетельствовали об эффективности децеллюляризации, после которой матрикс был в значительной степени ( $p = 0,0011$ ) очищен от ядерного материала (рис. 2).

После того как были учтены основные критерии оценки эффективности проведения децеллюляризации, предложенные в литературе [9], необходимым условием для выбора оптимального протокола явилась оценка влияния получаемого матрикса на клетки после рецеллюляризации. Важность данного этапа состоит в том, что он позволяет отобрать тот матрикс, который будет наилучшим образом способствовать адгезии и пролиферации клеток и в то же время будет наименее токсичным для тканей ввиду возможного сохранения остаточных количеств детергентов.

ХТТ-тест, проведенный после статической рецеллюляризации матриксов, выявил в обоих опытных образцах живые, метаболически активные клетки. Однако жизнеспособность клеток оказалась выше на матриксе, децеллюляризованном по протоколу

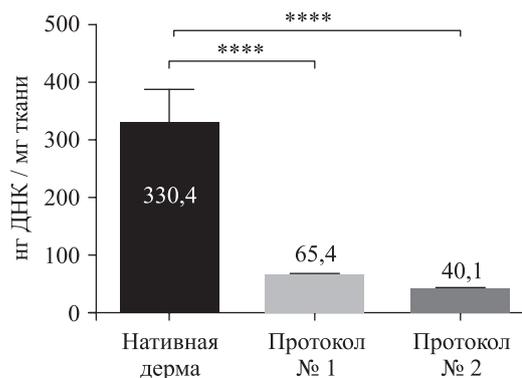


Рис. 2. Количественный анализ содержания ДНК в нативной и децеллюляризованной дерме свиньи

Fig. 2. Quantitative analysis of the DNA content in the native and decellularized porcine dermis

№ 1, в отличие от протокола № 2, где жизнеспособность была статистически ниже ( $p < 0,005$ ).

При сравнении образцов из опытных и контрольной групп обнаружено, что результаты ХТТ-теста в лунках, засеянных только клетками, отличаются от опытных и значительно их превосходят ( $p < 0,001$ ), что объясняется условиями эксперимента и доказанной способностью клеток легко прикрепляться к пластику. В целом при сравнении всех групп по результатам ХТТ-теста было установлено, что полученные матриксы по протоколам № 1 и № 2, засеянные клетками, являются биосовместимыми и не являются цитотоксичными (рис. 3).

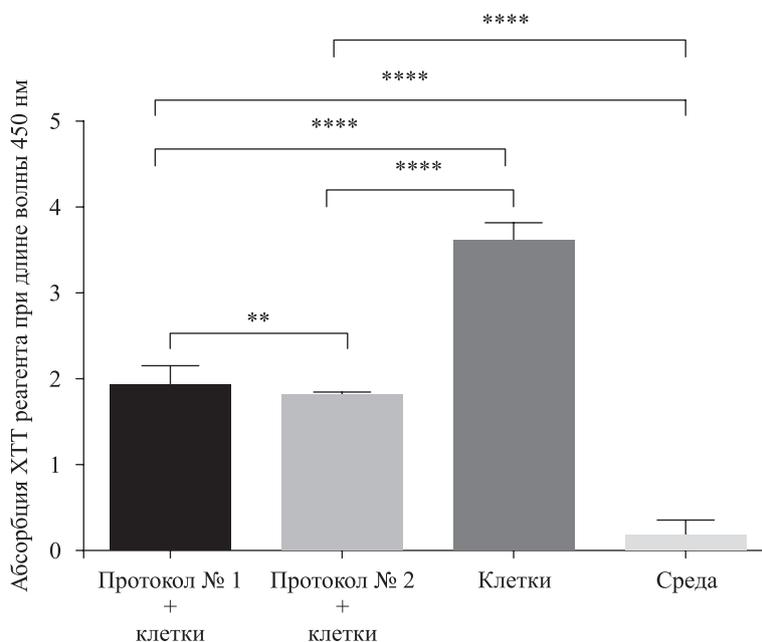


Рис. 3. Результаты цитотоксических тестов биологических каркасов дермы свиньи. Оптическая плотность при проведении ХТТ-теста

Fig. 3. Results of cytotoxic tests of biological matrix of porcine dermis. Optical density during the XTT test

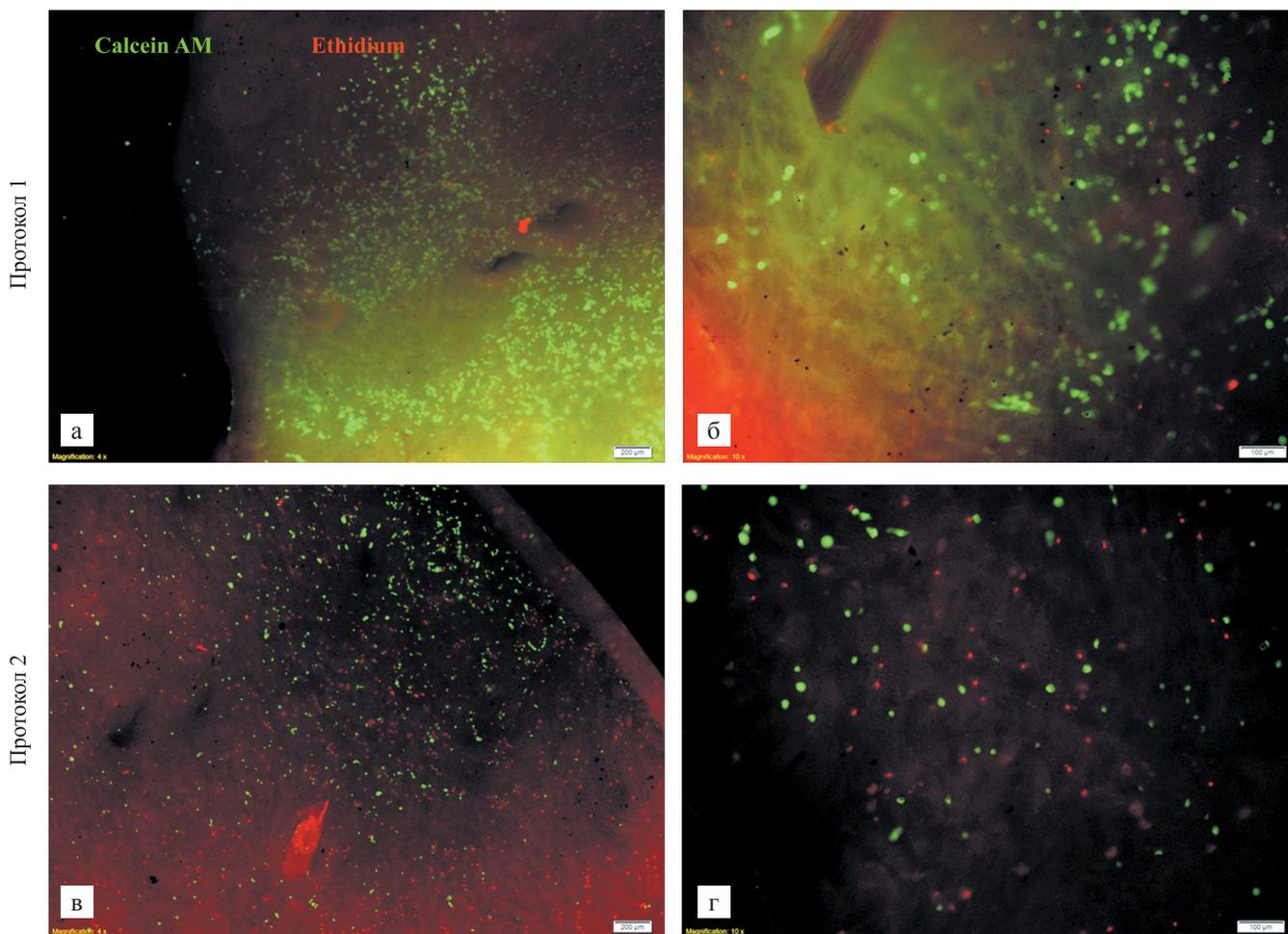


Рис. 4. Оценка жизнеспособности фибробластов, заселенных на децеллюляризованные каркасы дермы свиньи. Живые клетки – положительное окрашивание кальцеином АМ (зеленые), погибшие – положительное окрашивание гомодимером этидия (красные). а, в –  $\times 40$ ; б, г –  $\times 100$

Fig. 4. Evaluation of the viability of fibroblasts settled on decellularized matrix of porcine dermis. Living cells – positive calcein AM (green) staining, dead ones – positive ethidium homodimer (red) staining. а, в –  $\times 40$ ; б, г –  $\times 100$

Дифференциальное выявление живых (флюоресценция с кальцеином) и мертвых (флюоресценция с гомодимером этидия) клеток, основанное на активном транспорте кальцеина внутрь живых клеток и пассивном транспорте гомодимера этидия внутрь мертвых клеток, позволило дополнительно визуализировать живые клетки во время статичной рецеллюляризации каркаса (рис. 4). Было установлено, что культивированные клетки сохраняли свою жизнеспособность на обоих полученных матриксах в течение 72 часов. Показано, что  $80 \pm 10\%$  клеток оставались жизнеспособными на матриксе № 1 и  $55 \pm 10\%$  на матриксе № 2. Также обращало на себя внимание формирование монослоя из живых клеток при культивировании на матриксе, полученном по протоколу № 1. Данные результаты показали не только способность клеток к адгезии, но и низкую цитотоксичность получаемых каркасов. Разницу в результатах мы связываем с двукратным различием по времени

обработки раствором дезоксихолата натрия, и как следствие, меньшим его остаточным содержанием в матриксе при выполнении протокола № 1.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ двух протоколов децеллюляризации дермы свиной кожи показал, что оба протокола эффективно удаляют клетки и ядерный материал, при этом сохраняется архитектура межклеточного вещества неповрежденной, так как не происходит разрушения волокнистых структур. Но при оценке биосовместимости матриксов на основе анализа жизнеспособности клеток и их адгезии к матриксу преимущества демонстрирует матрикс, обработанный по протоколу № 1, что заставило нас отметить более перспективным для последующего изучения именно протокол на основе применения Тритон X100 и дезоксихолата, считая, что Тритон X100 является более мягким детергентом для децеллюляризации.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск оптимального протокола децеллюляризации ткани является основополагающим в тканевой инженерии, что продиктовано прежде всего получением такого матрикса, который бы максимально соответствовал нативному внеклеточному матриксу, был биосовместим на всех уровнях и активно функционален. В настоящей работе определение способа децеллюляризации и начальных характеристик полученного матрикса является первым этапом для дальнейшей разработки тканеинженерной кожи.

*Работа выполнена при поддержке комплексной НИР «Клеточные механизмы регенерации интра-торакальных органов и тканей. Разработка тканеинженерных конструкций с использованием биологических и синтетических каркасов».*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K. Skin tissue engineering – *in vivo* and *in vitro* applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2011; 63 (4–5): 352–366.
2. Clark RA, Ghosh K, Tonnesen MG. Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; 127 (5): 1018–1029. doi: 10.1038/sj.jid.5700715.
3. Petrof G, Abdul-Wahab A, McGrath JA. Cell therapy in dermatology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014; 4 (6): a015156.
4. You HJ, Han SK. Cell therapy for wound healing. *Journal of Korean medical science*, 2014; 29 (3): 311–319.
5. Wu SC, Marston W, Armstrong DG. Wound care: the role of advanced wound healing technologies. *Journal of vascular surgery* 2010; 52 (3): 59S–66S.
6. Sha H, Fu X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. *Journal of Controlled Release* 2010; 142 (2): 149–159.
7. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010; 31 (33): 8626–8633.
8. Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004; 25 (13): 2679–2686.
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011; 32 (12): 3233–3243.

*Статья поступила в редакцию 28.06.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 28.06.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-88-95

## ИНТЕРЛЕЙКИН IL-1 $\beta$ СТИМУЛИРУЕТ РЕВИТАЛИЗАЦИЮ ХРЯЩЕВОГО МАТРИКСА НАЗАЛЬНЫМИ ХОНДРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Д.С. Барановский<sup>1</sup>, А.В. Люндун<sup>2</sup>, М.В. Балясин<sup>2</sup>, И.Д. Клабуков<sup>2</sup>, О.А. Красильникова<sup>2</sup>, М.Е. Крашенинников<sup>2</sup>, В.Д. Паршин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Университетский госпиталь Базеля, Базель, Швейцария

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Ревитализация децеллюляризованных или девитализированных матриксов для тканевой инженерии трахеи, как правило, предполагает заселение матрикса-носителя на основе донорской хрящевой ткани аутологичными клетками реципиента или аллогенными клетками в условиях длительного культивирования. **Цель работы** – изучить эффективность колонизации девитализированных матриксов на основе естественной хрящевой ткани трахеи человека назальными хондроцитами человека при добавлении к питательной среде провоспалительного цитокина Интерлейкин-1-бета (IL-1 $\beta$ ). **Материалы и методы.** Матрикс-носители для тканевой инженерии трахеи получали на основе естественной хрящевой ткани трахеи человека методом девитализации и лазерного травления. Ревитализацию матриксов проводили путем заселения назальных хондроцитов человека. Гистологическое исследование проводили после окрашивания гематоксилином и сафранином-О с дальнейшей микроскопией на световом микроскопе Nikon Eclipse L200. Рентгеновская микротомография выполнялась на аппарате Phoenix nanotom m. Электронная микроскопия проводилась на установке Nova NanoSEM 230. **Результаты.** Выявлено статистически значимое увеличение интенсивности колонизации назальными хондроцитами ( $p = 0,0008$ ) и стимулирование их миграционной активности ( $p < 0,0001$ ) в присутствии IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольными группами. **Выводы.** Добавление провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в концентрации 1 мкг/мл к питательной среде способствует объемному заселению девитализированного хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека, позволяя создавать высокоревитализированные материалы для тканевой инженерии трахеи.

*Ключевые слова:* витализация, воспаление, интерлейкин-1-бета (ИЛ-1 $\beta$ ), клетки, лазерное травление, ревитализация, тканевая инженерия, физиологическая совместимость, хондроциты, хрящевой матрикс.

## INTERLEUKIN IL-1 $\beta$ STIMULATES CARTILAGE SCAFFOLD REVITALIZATION *IN VITRO* WITH HUMAN NASAL CHONDROCYTES

D.S. Baranovskii<sup>1</sup>, A.V. Lyundun<sup>2</sup>, M.V. Balyasin<sup>2</sup>, I.D. Klabukov<sup>2</sup>, O.A. Krasilnikova<sup>2</sup>, M.E. Krashennnikov<sup>2</sup>, V.D. Parshin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> University Hospital Basel, Basel, Switzerland

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

Revitalization of decellularized or devitalized scaffolds for trachea tissue engineering normally involves a seeding of autologous cells of recipient or allogeneic cells on the scaffold. **Aim:** aimed to investigate the capability of human nasal chondrocytes for colonization of devitalized scaffolds, based on the native human tracheal cartilage, with the proinflammatory stimulation by adding of Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ) to the culture medium. **Materials and methods.** Scaffolds for trachea tissue-engineering were generated from native human tracheal cartilage by

**Для корреспонденции:** Барановский Денис Станиславович. Адрес: 4031 Швейцария, Базель, Спиталштрассе, д. 21. Тел. +41 77 997 0292. E-mail: denis.baranovskii@usb.ch

**For correspondence:** Baranovskii Denis Stanislavovich. Address: Spitalstrasse 21, 4031 Basel, Switzerland. Тел. +41 77 997 0292. E-mail: denis.baranovskii@usb.ch

devitalization and laser-engraving. For the purpose of scaffold-revitalization a cell-seeding with human nasal chondrocytes was performed. Following histological examination was done with Hematoxylin & Safranin-O stainings and light microscopy. X-ray microtomography and scanning electron microscopy were performed additionally. **Results.** Statistically significant increase in the colonization rate ( $p = 0.0008$ ) with nasal chondrocytes and stimulation of their migration activity ( $p < 0.0001$ ) in the presence of IL-1 $\beta$  compared to the control group were confirmed. **Conclusion.** Presence of the inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  (1  $\mu\text{g/ml}$ ) in the culture medium enhances volume seeding of devitalized cartilage scaffold with human nasal chondrocytes, allowing to create high-revitalized materials for trachea tissue engineering.

*Key words: vitalization, inflammation, Interleukin-1-beta (IL-1 $\beta$ ), cultured cells, laser etching, revitalization, tissue engineering, physiological relevance, chondrocytes, cartilage scaffold.*

## ВВЕДЕНИЕ

Получение тканеинженерных конструкций предполагает ревитализацию децеллюляризированных матриксов-носителей перед имплантацией посредством заселения прекультивированными клетками [1, 2]. Имобилизация аутологичных клеток реципиента на матрикс дополнительно снижает его иммуногенность и повышает биосовместимость.

Существуют различные способы стимулирования миграции клеток в объем матрикса-носителя, среди которых использование хемоаттрактантов и молекул клеточной адгезии в различных концентрациях и градиентах, а также динамическое культивирование в условиях биореакторов [3, 4]. При этом реакции организма в ответ на имплантацию будут оказывать влияние на жизнеспособность и дифференцировку клеток, необходимую для созревания физиологически совместимой хрящевой ткани [5].

Асептическая воспалительная реакция, известная как хирургическое воспаление, сопутствует любому хирургическому вмешательству [6], а сама область имплантации готовых тканеинженерных конструкций, как правило, представлена воспаленными тканями пораженного органа реципиента. При этом влияние факторов и продуктов воспалительной реакции на поведение заселенных клеток после имплантации такой конструкции сложно предсказуемо и остается малоизученной областью, что делает перспективным исследование влияния провоспалительных цитокинов на процесс колонизации матриксов *in vitro*.

Для моделирования воспаления в условиях *in vitro* может применяться добавление в среду различных провоспалительных факторов, таких как интерлейкины, факторы некроза опухоли и интерфероны. Известно, что Интерлейкин-1-бета (IL-1 $\beta$ ) подавляет пролиферацию суставных хондроцитов кролика [7]. Также IL-1 $\beta$  участвует в клеточной регуляции хондроцитов, стимулируя пролиферацию и подавляя дифференцировку [8]. Показано влияние IL-1 $\beta$  на хондрогенез ММСК КМ [9], регуляцию компонентов цитоскелета хондроцитов [10] и защитные физиологические реакции хондроцитов при механическом стимулировании в присутствии IL-1 $\beta$  [11], что пред-

полагало наличие у IL-1 $\beta$  эффектов, способствующих колонизации матрикса хондроцитами [12].

В настоящее время установлено, что естественная концентрация IL-1 $\beta$  в физиологических жидкостях человека составляет до 200–300 нг/мл [13], а при воспалительных процессах вследствие имплантации экзогенных материалов ее значение в межтканевой жидкости увеличивается до 750 нг/мл и более в зависимости от места имплантации и индивидуальных особенностей реципиента [13, 14]. Поэтому в качестве модельной среды было принято решение использовать раствор IL-1 $\beta$  в концентрации 1 мкг/мл, принятой физиологически релевантной активному воспалительному процессу в месте имплантации.

**Целью** исследования являлось изучение эффективности колонизации девитализированных матриксов назальными хондроцитами при добавлении IL-1 $\beta$  в физиологически релевантной воспалению концентрации к питательной среде при ревитализации матрикса в статической культуре *in vitro*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Соблюдение этических требований

Забор материала донорских тканей производился в соответствии с протоколом научного исследования, одобренного комитетом по этике Сеченовского университета (решение № 07-15 от 15.07.2015 г.).

### Получение матрикса трахеи на основе естественной хрящевой ткани человека

В качестве матрикса использовалась нативная хрящевая ткань человека, подвергнутая девитализации с использованием трех циклов замораживания–оттаивания и лазерного травления с формированием слепых лунок диаметром 150–200 мкм и глубиной до 300 мкм. Лазерное травление образцов материала размерами 2 × 4 мм и толщиной 1 мм использовалось для обеспечения объемной колонизации.

С целью девитализации нативной ткани трахею кадаверного донора в условиях ламинарного шкафа отделяли от окружающих тканей, помещали в стерильный раствор PBS комнатной температуры и

замораживали в течение 15 минут в жидком азоте. После заморозки образец размораживали в водяной бане при 37,5 °С в течение 30 минут. Раствор PBS после цикла удаляли, 3 раза промывали стерильным раствором и снова помещали в пробирку с PBS. Затем циклы замораживания–оттаивания повторялись еще 2 раза, после чего девитализированные хрящи отделялись от перихондриума и нарезались пластинками толщиной не более 1 мм.

Далее выполняли лазерное травление хрящевых тканей на CO<sub>2</sub>-лазере BD-01 с длиной волны 10,6 мкм. Результатом лазерного травления стало образование слепых лунок диаметром 150–200 мкм, глубиной до 300 мкм и плотностью около 4 лунок на 1 мм<sup>2</sup>. Полученные образцы 3 раза промывали холодным стерильным раствором PBS и отправляли на стерилизацию гамма-излучением изотопами иридия-192 с поглощенной дозой 1,3 кГр.

### **Выделение и культивирование хондроцитов для ревитализации матрикса**

В качестве источника хондроцитов для получения первичной культуры использовалась хрящевая часть перегородки носа человека. Полученный образец хряща назосептальной перегородки проверяли на бактериальную и грибковую контаминацию, и затем подвергали ферментации раствором Collagenase Type II 0,15% в течение 12 часов при температуре 37 °С с 5% CO<sub>2</sub>. После этого ферментированный хрящ фильтровали с помощью стерильного ситечка с размером пор 100 мкм и центрифугировали фильтрат в течение 4 минут при 1300 об/мин. Подсчитывали клетки в полученной суспензии хондроцитов, помещали в культуральную посуду и культивировали в течение 21 дня до получения первого пассажа при 37 °С 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 5% FBS, TGF и FGF-2, меняя среду каждый третий день. Далее назальные хондроциты первого пассажа криоконсервировали и сохраняли в криобанке при температуре –196 °С.

### **Ревитализация матриксов назальными хондроцитами человека**

Для ревитализации матриксов использовали назальные хондроциты человека второго пассажа, культивированные из предварительно криоконсервированных клеток первого пассажа. Экспансия клеток выполнялась в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и добавлением 5% FBS, TGF и FGF-2 при 37 °С 5% CO<sub>2</sub>, с заменой среды каждый третий день.

Матрикссы, подлежащие ревитализации (n = 6), выкладывали на полупроницаемые мембраны планшетов Transwell (Corning, США) и заселяли клетками из расчета 0,25 млн назальных хондроцитов на 1 мм<sup>2</sup> поверхности матрикса. Все ревитализированные таким образом образцы культивировали в условиях инкубатора при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. В качестве питательной среды использовалась полная среда DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и добавлением 5% FBS, инсулина и аскорбиновой кислоты.

По истечении первых суток культивирования все образцы разделяли на контрольную (n = 3) и экспериментальную (n = 3) группы. Условия культивирования образцов контрольной группы оставались неизменными до конца эксперимента. Для образцов экспериментальной группы было применено добавление провоспалительного цитокина человеческого рекомбинантного интерлейкина IL-1β (Sigma, арт. SRP3083) в концентрации 1 мкг/мл к питательной среде. Все образцы извлекали для гистологического исследования по истечении последующих 6 суток культивирования.

### **Гистологические исследования и рентгеновская микротомография**

Гистологическое исследование выполняли после консервации всех образцов в растворе формальдегида 4% в течение 24 часов, дегидратации восходящими концентрациями этанола и проведения парафинизации с использованием стандартного протокола. Срезы толщиной 5 мкм последовательно окрашивали гематоксилином и сафранином-О для визуализации состояния межклеточного вещества и заселенных клеток. Сафранин-О окрашивает гликозаминогликаны хрящевой ткани в красно-оранжевые тона, позволяя качественно оценить насыщенность ими хрящевой ткани по интенсивности окраски [15].

Для сравнительной качественной и количественной оценки ревитализации матрикса нами была разработана оригинальная четырехбалльная шкала (табл.), основанная на принципах Бернской шкалы (Bern score) для оценки пеллет-культур хрящевых клеток [16].

Используя оригинальную шкалу для независимой оценки трех областей на каждый образец, оценивали степень колонизации лунок и степень деструкции микроархитектоники матрикса при миграции клеток в толщу матрикса за пределы лунок.

Гистологические исследования выполняли на базе Института хирургических исследований Университетского госпиталя Базеля с использованием микротомов (Thermo Fisher Scientific, США), светового микроскопа Nikon Eclipse L200 (Nikon, Япония).

**Оригинальная четырехбалльная шкала для количественной оценки  
ревитализации матриксов**

**The original four-point scale for quantitative evaluation  
of scaffold revitalization**

Категория	Оценка
<b>А. Колонизация лунок</b>	
Полное отсутствие клеток или единичные клетки	0
Пристеночная колонизация	1
Многослойная колонизация с сохранением свободного пространства в лунках	2
Тотальная колонизация (нет видимого пространства в лунках)	3
<b>Б. Миграция клеток</b>	
Форма и границы поры отчетливо прослеживаются с сохранением расстояния между лунками	0
Единичные локальные слияния лунок	1
Множественные слияния лунок	2
Полное слияние лунок (границы отдельных лунок не прослеживаются)	3

Поверхностную колонизацию образцов назальными хондроцитами оценивали с помощью сканирующей электронной микроскопии с напылением золота на аппарате Nova NanoSEM 230 (FEI, США).

Рентгеновские микротомографии тканеинженерных конструкций для оценки сохранности лунок в трехмерной структуре образца после ревитализации получали на аппарате Phoenix nanotom m (General Electric, США).

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили, используя ранговый U-критерий Манна–Уитни при помощи компьютерной программы GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Сканирующая электронная микроскопия образцов хрящевой ткани трахеи после выполнения лазерного травления и ревитализации позволила визуализировать плотное покрытие поверхности образцов клетками назальных хондроцитов, а также рыхлое межклеточное вещество, синтезированное *de novo* (рис. 1).

Микрокомпьютерная томография матриксов-носителей после ревитализации позволила идентифицировать расположение и подтвердить сохранность лунок в структуре образцов контрольной группы, однако разрешающая способность микротомографа оказалась недостаточной для визуализации клеток. Наиболее информативным было признано гистологическое исследование, обнаружившее высокую степень колонизации лунок. Сопоставление результатов гистологического исследования и микрокомпьютер-

ной томографии для образцов контрольной группы приведено на рис. 2.

Показано, что воздействие IL-1 $\beta$  в ходе ревитализации приводило к более плотной и интенсивной колонизации лунок. Вместе с тем миграция клеток за пределы лунок вглубь матрикса приводила к выраженному слиянию лунок и каналов и в конечном счете к разрушению микроархитектоники тканеинженерной конструкции (рис. 3).

Результаты количественной оценки интенсивности колонизации матрикса и миграции клеток за пределы лунок по оригинальной четырехбалльной шкале для структурированных образцов экспериментальной (при воздействии IL-1 $\beta$ ) и контрольной группы после заселения назальными хондроцитами приведены на рис. 4.

Показаны статистически значимые различия интенсивности колонизации назальными хондроцитами ( $p = 0,0008$ ) и их миграции за пределы лунок ( $p < 0,0001$ ) в присутствии IL-1 $\beta$  по сравнению с контрольными группами.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее наши экспериментальные исследования показали, что повышение плотности заселения до 0,5 млн клеток на 1 мм<sup>2</sup> не приводит к увеличению плотности колонизации лунок, но увеличивает количество клеток, остающихся на поверхности образца. Вместе с тем более низкая плотность заселения не позволяет колонизировать все имеющиеся лунки в отведенный промежуток времени (до 7 суток). Кроме того, использование динамического культивирования в условиях биореактора не всегда позволяет добиться объемного заселения материала *in vitro*.

Нами показано, что появление провоспалительного цитокина в культуральной среде позволяет повысить плотность ревитализации матрикса-носителя,

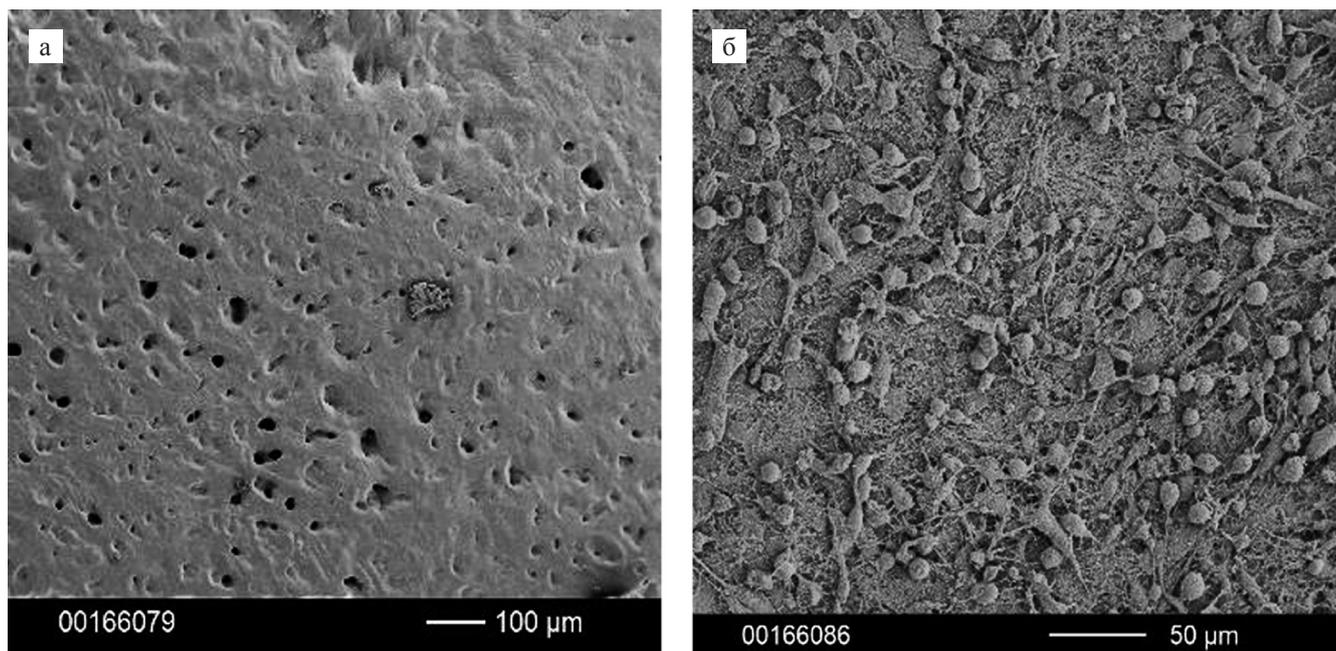


Рис. 1. Высокоплотный матрикс-носитель (девитализированная хрящевая ткань трахеи) до выполнения лазерного травления: а – девитализированный матрикс, визуализируются пустые лакуны на поверхности хрящевой ткани, окруженные плотным, преимущественно интактным матриксом; б – матрикс после выполнения лазерного травления, ревитализированный путем заселения назальными хондроцитами, которые плотно заселяют поверхность материала. Сканирующая электронная микроскопия

Fig. 1. High-density scaffold prior to laser engraving: a – devitalized scaffold: empty lacunas surrounded by high-dense extracellular matrix are visible on the cartilage surface, б – laser-engraved scaffold revitalized by nasal chondrocytes, densely colonizing the surface of the material. Scanning electron microscopy

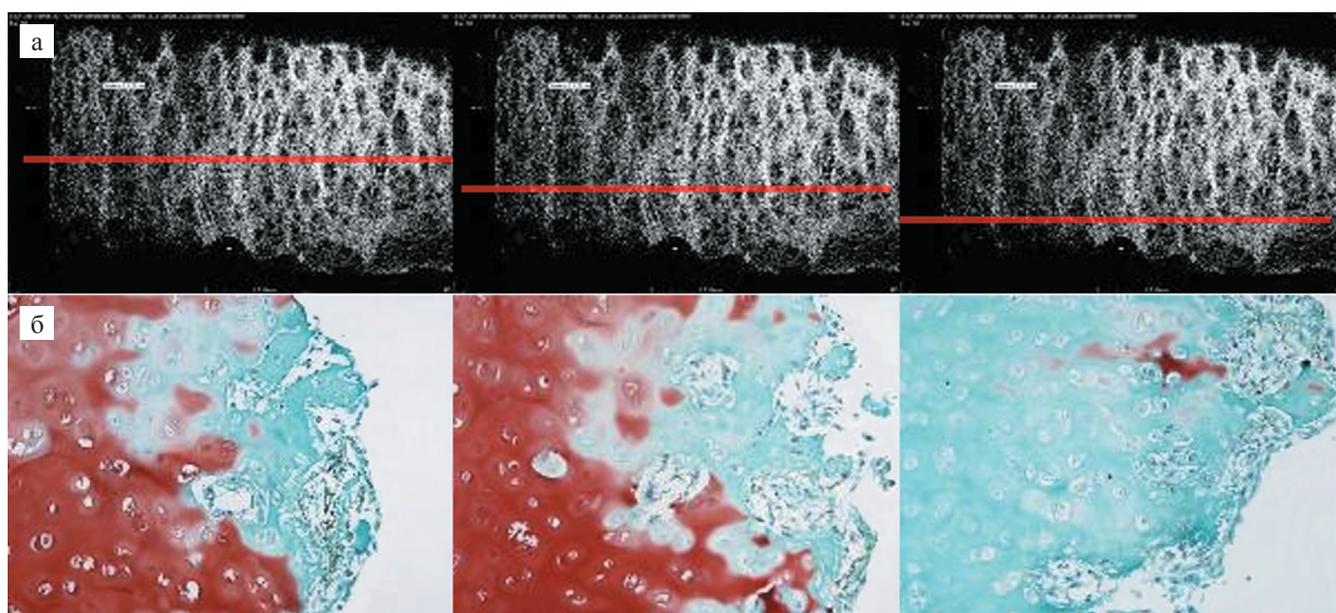


Рис. 2. Тканеинженерная конструкция, полученная в результате заселения матрикса, подвергнутого лазерному травлению, назальными хондроцитами человека: а – тканеинженерная конструкция, рентгеновская микротомография, красным показаны уровни поперечных срезов; б – гистологическое исследование поперечных срезов (перпендикулярно плоскости травления). Окраска: сафранин-О и гематоксилин. Световая микроскопия, ×100

Fig. 2. Tissue-engineered graft generated by revitalization of the laser engraved tracheal cartilage with human nasal chondrocytes: a – tissue engineered graft, X-ray microtomography, red lines showing the cross-section levels; б – histological examination of transects (perpendicular to the direction of engraving). Safranin-O & Hematoxylin staining. Light microscopy, ×100

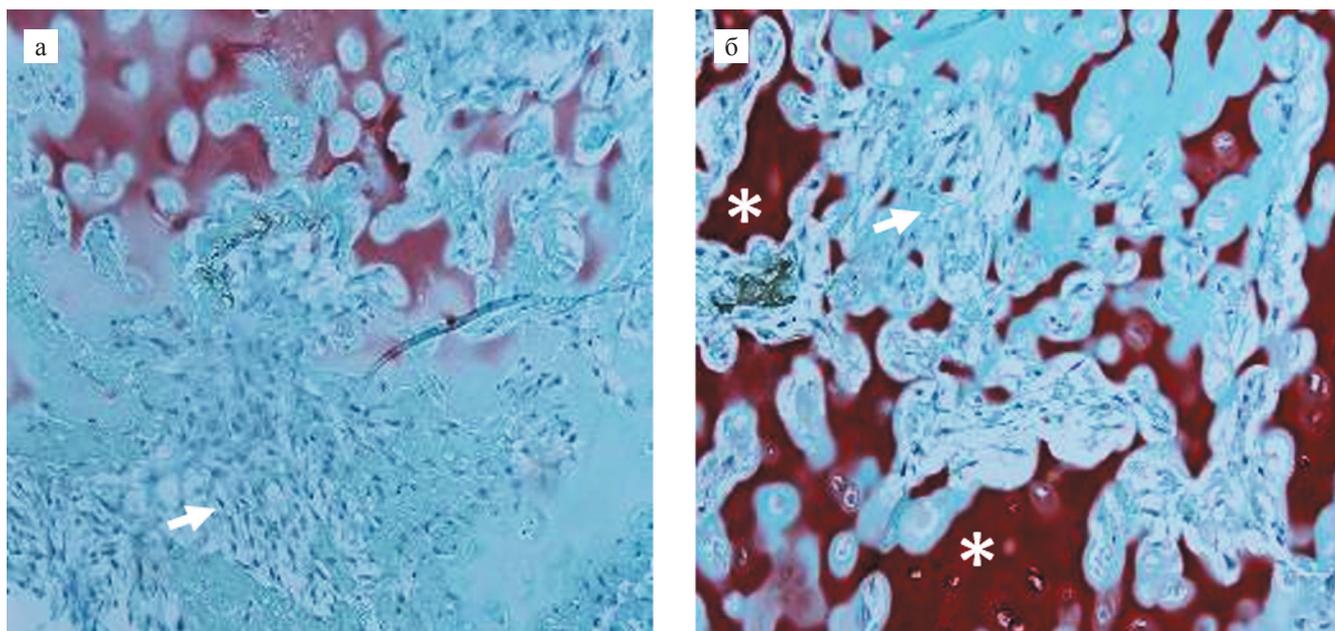


Рис. 3. Тканеинженерная конструкция, полученная в результате заселения матрикса, подвергнутого лазерному травлению, назальными хондроцитами человека при непрерывном воздействии IL-1 $\beta$ : область хрящевого матрикса отмечена звездочками, заселенные назальные хондроциты отмечены стрелками. Гистологическое исследование поперечных срезов (перпендикулярно плоскости травления). Окраска: сафранин-О и гематоксилин. Световая микроскопия,  $\times 100$

Fig. 3. Tissue-engineered graft obtained by revitalization of the laser engraved scaffold with human nasal chondrocytes under continuous exposure to IL-1 $\beta$  in the culture medium: the cartilage scaffold marked by asterisks, the nasal chondrocytes marked by arrows. Histological study of transverse sections (perpendicular to the direction of the engraving). Safranin-O & Hematoxylin staining. Light microscopy,  $\times 100$

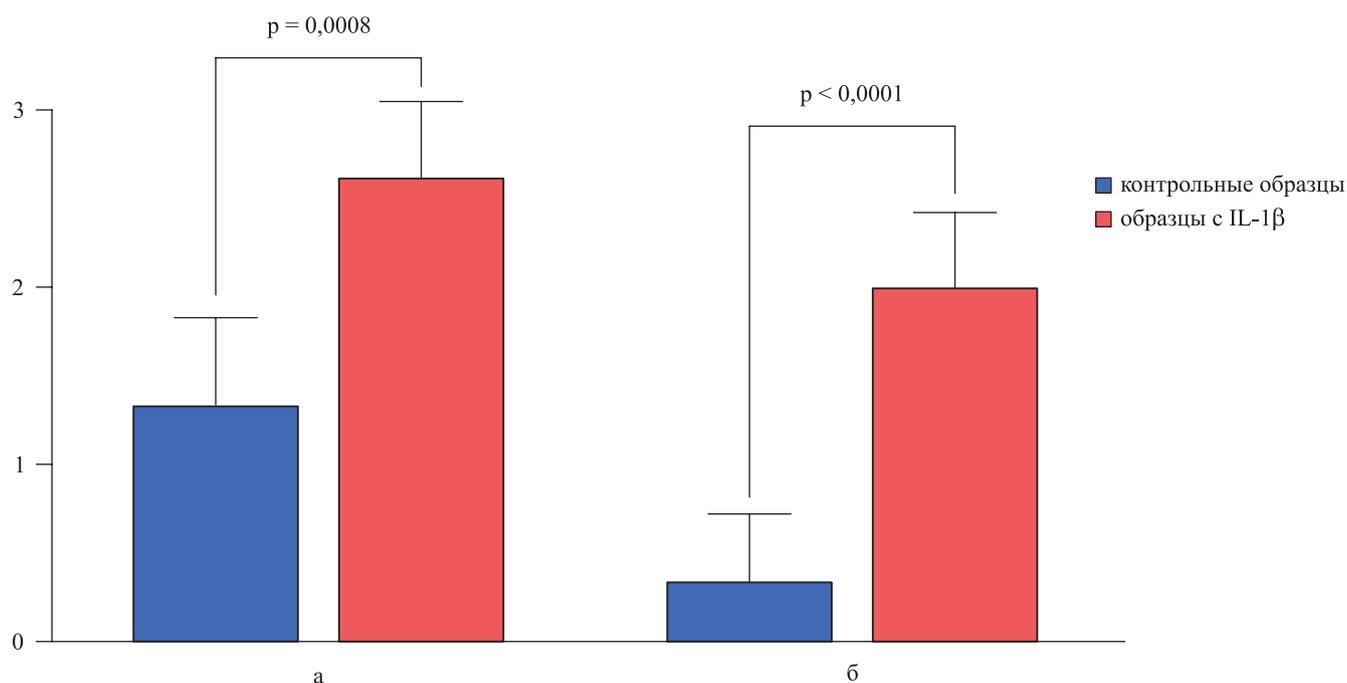


Рис. 4. Оценка значений интенсивности колонизации матрикса назальными хондроцитами человека (а) и миграции назальных хондроцитов за пределы лунок (б) в контрольных условиях и в присутствии IL-1 $\beta$ . Данные представлены в виде «среднее  $\pm$  стандартное отклонение»

Fig. 4. Assessment of the values of intensity of scaffold colonization with human nasal chondrocytes (a) and migration of nasal chondrocytes outside the lacunae (b) under control conditions and in the presence of IL-1 $\beta$ . Values are means  $\pm$  SD

оказывая, тем не менее, неоднозначное влияние на качество формируемой тканеинженерной конструкции. Добавление IL-1 $\beta$  качественно улучшает колонизацию лунок матрикса хондроцитами, увеличивает плотность заселения конструкции клетками реципиента, в том числе и за счет усиленной миграции клеток в толщу межклеточного вещества, что хорошо соотносится с литературными данными об участии IL-1 $\beta$  в регуляции процессов клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза [17, 18]. Можно предположить, что хронический асептический пролиферативный (продуктивный) воспалительный процесс в области имплантации ревитализированной тканеинженерной конструкции также будет дополнительно способствовать колонизации матрикса предварительно внедренными клетками реципиента. При этом гистологические исследования демонстрируют частичное или практически полное разрушение микроархитектоники матрикса при его колонизации под действием IL-1 $\beta$ : стираются границы отдельных лунок, снижается объем межклеточного вещества. Последнее может негативно сказаться на механических характеристиках тканеинженерной конструкции. Данный эффект может быть обусловлен усилением синтеза металлопротеиназ хондроцитами под действием IL-1 $\beta$  [19]. Сравнительные исследования механических характеристик готовой конструкции могут являться предметом дальнейших исследований.

Таким образом, была показана возможность эффективной ревитализации матриксов, подвергнутых лазерному травлению, с колонизацией лунок матрикса назальными хондроцитами человека при сохранении основного объема исходного межклеточного вещества хрящевой ткани. Было доказано, что добавление провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  к культуральной среде стимулирует колонизацию матрикса-носителя хондроцитами, что является одним из необходимых условий получения полноценных ревитализированных материалов, предназначенных для тканевой инженерии трахеи.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление провоспалительного цитокина IL-1 $\beta$  в физиологически релевантной воспалению концентрации 1 мкг/мл к полной питательной среде DMEM с высоким содержанием глюкозы – 4,5 г/л, 5% FBS, инсулином и аскорбиновой кислотой способствует объемному заселению назальными хондроцитами девитализированного матрикса на основе хрящевой ткани трахеи, но вместе с тем может являться причиной нарушения сложной микроархитектоники естественного межклеточного вещества хрящевой ткани. Стимулирование заселения клетками нативного матрикса может использоваться для получения

высокоэффективных ревитализированных материалов для тканевой инженерии трахеи.

*Настоящая работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии Минобрнауки РФ № 14.614.21.0001 (ID RFMEFI61417X0001) с использованием оборудования ЦКП «Регенеративная медицина» (ID 310020) и УНУ (506197).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Барановский ДС, Демченко АГ, Оганесян РВ, Лебедев ГВ, Берсенева ДА, Балясин МВ и др. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72 (4): 254–260. Baranovsky DS, Demchenko AG, Oganesyans RV, Lebedev GV, Berseneva DA, Balyasin MV et al. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue-engineered constructs. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2017; 72 (4): 254–260. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15690/vramn723.
2. Кувяда ЕВ, Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гуменюк ИС, Гилевич ИВ, Поляков ИС и др. Опыт перфузионной рецеллюляризации биологического каркаса легких крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18 (1): 38–44. Kuevda EV, Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gumenyuk IS, Gilevich IV, Polyakov IS et al. Experience of perfusion recellularization of biological lung scaffold in rats. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2016; 18 (1): 38–44. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-1-38-44.
3. Люндуп АВ, Демченко АГ, Тенчурин ТХ, Крашенинников МЕ, Клабуков ИД, Шепелев АД и др. Повышение эффективности заселения биодеградируемых матриксов стромальными и эпителиальными клетками при динамическом культивировании. *Гены и клетки*. 2016; 11 (3): 102–107. Lyundup AV, Demchenko AG, Tenchurin TH, Krasheninnikov ME, Klabukov ID, Shepelev AD et al. Improving the seeding effectiveness of stromal and epithelial cell cultures in biodegradable matrices by dynamic cultivation. *Genes and Cells*. 2016; 11 (3): 102–107. [In Russ, English abstract].
4. Bourguin PE, Gaudiello E, Pippenger B, Jaquiere C, Klein T, Pigeot S et al. Engineered extracellular matrices as biomaterials of tunable composition and function. *Adv Funct Mater*. 2017; 27 (7): 1605486. doi: 10.1002/adfm.201605486.
5. Lammi MJ, Piltti J, Prittinen J, Qu C. Challenges in Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage with Correct Cellular Colonization and Extracellular Matrix As-

- sembly. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (9): 2700. doi: 10.3390/ijms19092700.
6. Smajic J, Tupkovic LR, Husic S, Avdagic SS, Hodzic S, Imamovic S. Systemic inflammatory response syndrome in surgical patients. *Med Arch.* 2018; 72 (2): 116–119. doi: 10.5455/medarh.2018.72.116-119.
  7. Iwamoto M, Koike T, Nakashima K, Sato K, Kato Y. Interleukin 1: a regulator of chondrocyte proliferation. *Immunol Lett.* 1989; 21 (2): 153–156. doi: 10.1016/0165-2478(89)90052-7.
  8. Simsa-Maziel S, Monsonogo-Ornan E. Interleukin-1 $\beta$  promotes proliferation and inhibits differentiation of chondrocytes through a mechanism involving down-regulation of FGFR-3 and p21. *Endocrinology.* 2012; 153 (5): 2296–2310. doi: 10.1210/en.2011-1756.
  9. Mumme M, Scotti C, Papadimitropoulos A, Todorov A, Hoffmann W, Bocelli-Tyndall C et al. Interleukin-1 $\beta$  modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater.* 2012; 24: 224–236. doi: 10.22203/eCM.v024a16.
  10. Joos H, Albrecht W, Laufer S, Reichel H, Brenner RE. IL-1 $\beta$  regulates FHL2 and other cytoskeleton-related genes in human chondrocytes. *Mol Med.* 2008; 14 (3–4): 150–159. doi: 10.2119/2007-00118.Joos.
  11. Chowdhury TT, Appleby RN, Salter DM, Bader DA, Lee DA. Integrin-mediated mechanotransduction in IL-1 $\beta$  stimulated chondrocytes. *Biomech Model Mechanobiol.* 2006; 5 (2–3): 192. doi: 10.1007/s10237-006-0032-3.
  12. Bader DL, Salter DM, Chowdhury TT. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. *Arthritis.* 2011; 2011: 979032. doi: 10.1155/2011/979032
  13. Preiss DS, Meyle J. Interleukin-1 $\beta$  concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol.* 1994; 65 (5): 423–428. doi: 10.1902/jop.1994.65.5.423.
  14. Bielemann AM, Marcello-Machado RM, Leite FRM, Martinho FC, Chagas-Júnior OL, Del Bel Cury AA et al. Comparison between inflammation-related markers in peri-implant crevicular fluid and clinical parameters during osseointegration in edentulous jaws. *Clin Oral Investig.* 2018; 22 (1): 531–543. doi: 10.1007/s00784-017-2169-0.
  15. Lillie RD. HJ Conn's Biological Stains. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1977.
  16. Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'Driscoll S et al. Visual Histological Grading System for the Evaluation of *in vitro*-Generated Neocartilage. *Tissue Eng.* 2006; 12 (8): 2141–2149. doi: 10.1089/ten.2006.12.2141.
  17. Akanji OO, Sakthithasan P, Salter DM, Chowdhury TT. Dynamic compression alters NF $\kappa$ B activation and I $\kappa$ B- $\alpha$  expression in IL-1 $\beta$ -stimulated chondrocyte/agarose constructs. *Inflamm Res.* 2010; 59 (1): 41–52. doi: 10.1007/s00011-009-0068-9.
  18. Smith DW, Gardiner BS, Zhang L, Grodzinsky AJ. Cartilage Tissue Homeostasis. *Articular Cartilage Dynamics.* Singapore: Springer; 2019: 65–243. doi: 10.1007/978-981-13-1474-2\_2.
  19. Goldring MB, Birkhead JR, Suen LF, Yamin R, Mizuno S, Glowacki J et al. Interleukin-1 beta-modulated gene expression in immortalized human chondrocytes. *J Clin Invest.* 1994; 94 (6): 2307–2316. doi: 10.1172/JCI117595.

Статья поступила в редакцию 11.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 11.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-96-107

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОРТОТОПИЧЕСКАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ТРАХЕИ, СОЗДАННОЙ НА ОСНОВЕ ЗАСЕЛЕННОГО МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЕВИТАЛИЗИРОВАННОГО МАТРИКСА

М.В. Балясин<sup>1</sup>, Д.С. Барановский<sup>2</sup>, А.Г. Демченко<sup>1</sup>, А.Л. Файзуллин<sup>1</sup>,  
О.А. Красильникова<sup>1</sup>, И.Д. Клабуков<sup>1</sup>, М.Е. Крашенинников<sup>1</sup>, А.В. Люндун<sup>1</sup>,  
В.Д. Паршин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Университетский госпиталь Базеля, Базель, Швейцария

**Цель.** Изучить жизнеспособность тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе девитализированного трахеального матрикса (ДТМ), заселенного мезенхимальными стромальными и эпителиальными клетками, на модели оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей у кроликов. Оценить потенциал ТИК к поддержанию стабильного просвета трахеи в области имплантации. **Материалы и методы.** Получены сингенные мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) и сингенные эпителиоциты легкого кролика. Морфологию и фенотип культуры МСК КМ подтверждали иммунофлюоресцентным окрашиванием на маркеры CD90 и CD271. Клетки легочного эпителия, полученные методом энзиматической обработки измельченной ткани легкого кролика, были окрашены на характерные для эпителиальных клеток маркеры СКРan, СК8/18 и СК14. Девитализация донорской трахеи проведена тремя последовательными циклами замораживания–оттаивания. Двухслойное заселение ДТМ клетками выполнено в условиях статичного и динамического культивирования. Проведена ортотопическая имплантация ТИК на место дефекта переднебоковой стенки трахеи кролика, сформированного в результате резекции трахеи на протяжении четырех колец. Оценка результатов выполнена методами компьютерной томографии, гистологического и иммуногистохимического анализов. **Результаты.** Получен имплантат ТИК на основе ДТМ с двухслойным заселением клеточными культурами МСК КМ и эпителиоцитов кролика. Через 3 мес. после имплантации отмечалось приживление ТИК, стенозирования стенки трахеи не наблюдалось, однако отмечалось незначительное сужение просвета в области имплантации. На 6-й мес. после имплантации жизнеспособность тканеинженерной конструкции подтверждалась гистологическим методом. Показана эпителизация и васкуляризация стенки трахеи, отсутствие признаков гнойного воспаления и асептического некроза. Определена причина небольшого сужения просвета трахеи – хроническое воспаление, вызванное раздражением слизистой шовным материалом. **Заключение.** Получена модель для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей. Разработанная ТИК на основе ДТМ, двухслойно заселенного эпителиоцитами легкого и МСК КМ, была успешно применена для замещения непротяженных дефектов трахеи в эксперименте *in vivo*. Минимальная тканевая реакция на ТИК трахеи была обусловлена биосовместимостью имплантата.

**Ключевые слова:** девитализация, имплантат, клеточная терапия, тканевая инженерия, тканевая терапия, торакальная хирургия, трансплантат, трахея.

**Для корреспонденции:** Балясин Максим Витальевич. Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 1.  
Тел. (999) 772-58-69. E-mail: max160203@gmail.com

**For correspondence:** Balyasin Maksim Vitalievich. Address: 8/1, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russian Federation.  
Тел. (999) 772-58-69. E-mail: max160203@gmail.com

# EXPERIMENTAL ORTHOTOPIC IMPLANTATION OF THE TISSUE-ENGINEERED GRAFT OF TRACHEA BASED ON DEVITALIZED SCAFFOLD SEEDED WITH MESENCHYMAL AND EPITHELIAL CELLS

M.V. Balyasin<sup>1</sup>, D.S. Baranovskii<sup>2</sup>, A.G. Demchenko<sup>1</sup>, A.L. Fayzullin<sup>1</sup>, O.A. Krasilnikova<sup>1</sup>, I.D. Klabukov<sup>1</sup>, M.E. Krashenninikov<sup>1</sup>, A.V. Lyundup<sup>1</sup>, V.D. Parshin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (Sechenovsky University), Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> University Hospital Basel, Basel, Switzerland

**Aim.** To study the viability of the tissue-engineered graft (TEG) based on the devitalized tracheal scaffold (DTS), seeded by mesenchymal stromal and epithelial cells in the experiment on rabbits with the assessment of the cytocompatibility and biocompatibility *in vivo*. **Materials and methods.** Syngeneic mesenchymal bone marrow stromal cells (BMSCs) and lung epithelial cells of rabbit were obtained. Morphology and phenotype of the BMSCs culture were confirmed by immunofluorescent staining on CD90 and CD271 markers. Pulmonary epithelium cells obtained by enzymatic treatment of shredded lung tissue of rabbit were stained with CKPan, CK8/18 and CK14 markers of epithelial cells. The donor trachea was devitalized in three freeze-thawing cycles. Double-layer cell seeding of DTS was performed under static and dynamic culturing. Orthotopic implantation of TEG was performed at the site of the anterolateral wall defect in the rabbit trachea formed as a result of tracheal resection over four rings. The results were evaluated by computed tomography, histological and immunohistochemical analyses. **Results.** TEG implant based on DTS with two-layer cell cultures of rabbit BMSCs and epithelial cells was obtained. Three months after the implantation, TEG engraftment was observed, no tracheal wall stenosis was observed, but a slight narrowing of the lumen in the implantation area was observed. Viability of the tissue-engineered graft was confirmed by histological method 6 months after implantation. Epithelialization and vascularization of the tracheal wall, absence of signs of purulent inflammation and aseptic necrosis were shown. Small narrowing of the tracheal lumen was caused by chronic inflammation produced by irritation of the mucous suture material. **Conclusion.** The new model for evaluating the viability of a tissue engineering implant during critical airway defect closure was obtained. Two-layer vitalization of DTS with lung epithelial cells and BMSCs allows to create a tissue engineered structure for replacement of non-long tracheal defects in the experiment *in vivo*. The use of the tracheal tissue-engineered graft for orthotopic implantation showed a biocompatibility with minimal tissue reaction.

*Key words:* devitalization, implant, cell- and tissue-based therapy, tissue engineering, thoracic surgery, transplant, trachea.

## ВВЕДЕНИЕ

Хронические стенозы трахеи, обусловленные онкологическими и неонкологическими процессами, при большом распространении обычно трудно поддаются лечению. Частота стенозирующих трахеальных повреждений составляет до 1% от всех интубаций [1] и достигает 20–25% при длительных интубациях [2]. Эндоскопическое стентирование пористыми эндопротезами не решает проблему по причине прорастания сетчатой структуры стента собственными тканями пациента или образования краевых рестенозов. Радикальные хирургические операции по типу циркулярной резекции пораженного участка органа имеют существенные ограничения, например, по протяженности дефекта, а также несут высокий риск осложнений [3]. Наиболее перспективным методом лечения подобных дефектов может стать использование тканеинженерных кон-

струкций (ТИК). Однако клиническое использование тканеинженерных конструкций трахеи на сегодняшний день сопровождается множеством проблем, такими как необходимость обеспечения достаточного кровоснабжения, формирования респираторного эпителия и препятствование размягчению трахеальной стенки [4, 5].

В настоящее время в эксперименте получен бесклеточный матрикс хряща трахеи при комбинированном воздействии детергентов и ДНКазы I [6], проведена рецеллюляризация дыхательных путей заселением мезенхимальных стромальных клеток (МСК) [7], установлено стимулирующее влияние МСК костного мозга (МСК КМ) на эпителизацию и формирование хрящевой ткани [8], а совокупность данных методов использовалась для получения ТИК трахеи.

В исследовании Go et al. (2010) оценивалось влияние эпителиальных клеток и хондроцитов, полученных в ходе дифференцировки из МСК, на эффективность ТИК при регенерации дыхательных путей у свиней [9]. Матрикса были получены методом детергентно-ферментативной децеллюляризации аллогенной трахеи. Аутологичные МСК были получены из костного мозга и дифференцированы в хондроциты. Аутологичные эпителиальные клетки были выделены из слизистой оболочки трахеи. Оба типа клеток высевали на матрикс с помощью двухкамерного биореактора при динамическом культивировании. Проводилось замещение участка трахеи длиной 6 см имплантацией ТИК. Показано, что заселение матрикса эпителием и полученными из МСК хондроцитами приводит к регенерации тканей трахеальной стенки.

В работе Jungebluth et al. (2012) исследовалась ТИК на основе децеллюляризованной трахеи свиньи, заселенной аутологичными мононуклеарными клетками из костного мозга с внешней стороны и эпителиальными клетками из биопсии слизистой оболочки полости рта с внутренней стороны [10]. Полученные конструкции были имплантированы свиньям в 6-см дефект трахеи. Через 60 сут после имплантации не наблюдалось различий механических свойств в сравнении с нативной тканью, а внутренняя поверхность трахеи была выстлана эпителием, и при этом не было выявлено признаков отторжения имплантата или выраженного воспалительного ответа.

В работе Shin et al. (2015) для восстановления дефекта трахеи кролика использовали ТИК на основе МСК КМ и матрикса, сформированного из измельченного децеллюляризованного суставного хряща свиньи [11]. Гистологическое исследование показало, что хрящ был образован с минимальным воспалением или грануляцией ткани.

Однако ранее не проводилась оценка в эксперименте *in vivo* жизнеспособности ТИК на основе девитализированной трахеальной стенки с большим остаточным содержанием экзогенных маркеров при заселении такого матрикса комбинацией из двух типов клеток. Кроме того, в литературе отсутствует описание использования полноценной экспериментальной модели для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей, которая бы позволяла делать выводы о биологической и физиологической совместимости и стабильности использованной конструкции.

**Цель.** Изучить жизнеспособность тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе девитализированного трахеального матрикса (ДТМ), заселенного мезенхимальными стромальными и эпителиальными клетками, на модели оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии крити-

ческого дефекта дыхательных путей у кроликов. Оценить потенциал ТИК к поддержанию стабильного просвета трахеи в области имплантации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Лабораторные животные

Экспериментальные работы выполнены на линейных кроликах породы «Серый великан» ( $n = 3$ ) с исходной массой тела 3,5–4,5 кг в возрасте 0,5–1 год, выращенных в питомнике Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России (пос. Светлые Горы, МО). Животных содержали в условиях Центрального вивария Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России при свободном доступе к пище и воде.

Все манипуляции с лабораторными животными были одобрены Локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России и выполнялись с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (2005 г.), и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010 г.

### Получение культуры МСК КМ

МСК КМ получали в соответствии с протоколом, применяемым в ЦКП «Регенеративная медицина» Сеченовского университета. Сингенные МСК кролика выделяли из костного мозга, который получали путем перфузии бедренной кости. Аспират костного мозга помещали в стерильную пробирку, содержащую 50 ЕД/мл гепарина и 0,25 мг/л гентамицина в PBS, и доставляли в лабораторию при температуре +20–24 °С. Выделение клеток и работу с ними проводили в чистой зоне 5-го класса по ISO. Аспират костного мозга объемом 10 мл был помещен в центрифужную пробирку и осажден при 350 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 20 мл лизирующего буфера (114 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7,5 мМ  $\text{KHCO}_3$ , 0,1 мМ EDTA) в течение 3–5 мин. Затем повторно центрифугировали, клеточный осадок ресуспендировали в питательной среде для культивирования МСК КМ на основе питательной среды DMEM/F12 (Invitrogen, США), содержащей 10% FBS (Invitrogen, США), 0,4 мкМ инсулина, 20 нг/мл bFGF, 10 нМ дексаметазона, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Суспензию клеток высевали в количестве  $1,0\text{--}1,5 \times 10^6$  кл/мл в культуральные флаконы и помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор с концентрацией  $\text{CO}_2$  5%, атмосферного воздуха 95% при температуре +37 °С и с повышенной влажностью. Замену культуральной

среды производили каждые 72 ч. При достижении 90% конfluenceности клетки отмывали раствором DPBS без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , затем снимали с культурального пластика раствором TrypLe (Invitrogen, США), центрифугировали при 350 g в течение 5 мин, отбирали супернатант, осадок ресуспендировали в питательной среде и помещали  $\frac{1}{3}$  клеточной суспензии на новую культуральную посуду.

### Получение культуры эпителиальных клеток

Сингенные эпителиальные клетки выделяли из нативного легкого кролика. Легкое отмывали от компонентов крови методом длительной перфузии малого круга кровообращения физиологическим раствором с непрерывной подачей последнего в правый желудочек сердца кролика-донора с помощью роликового насоса. Очищенная ткань легкого осветлялась, приобретая белую окраску. Легкое мобилизовалось, отделялось от окружающих тканей и после пересечения магистральных сосудов помещалось в контейнер с транспортной средой, состоящей из DMEM/F12 с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и доставлялось в лабораторию при температуре +20...24 °С. В условиях чистой зоны легкие измельчали на кусочки объемом  $4 \pm 2 \text{ мм}^3$  и обрабатывали раствором диспазы в концентрации 5 ед/мл на протяжении 45 мин при +37 °С. Полученную суспензию фильтровали через сито 70 мкм для отделения фрагментов легочной ткани от клеточной взвеси. Фильтрат центрифугировали при 1200 об/мин и ресуспендировали осадок полной питательной средой KSFM (Invitrogen, США) с саплементом Keratinocytes Supplements (Invitrogen, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Полученную суспензию высевали на дно 24-луночного культурального планшета, предварительно покрытого коллагеном I типа. Культивирование клеток проводили в условиях  $\text{CO}_2$ -инкубатора с заменой культуральной среды каждые 72 ч.

### Оценка фенотипа МСК КМ и эпителия трахеи

Получение культур МСК КМ и эпителия трахеи кролика подтверждали с помощью иммуофлюоресцентного анализа с использованием антител: CD90, CD271, CDH, SOX2, COL1, Vimentin для МСК КМ и СК8/18, СК14, СКPan для эпителия соответственно. Для этого МСК КМ первого пассажа и эпителии трахеи нулевого пассажа трижды отмывали в PBS и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в PBS (рН 7,4) в течение 10 мин при 25 °С. Далее клетки трижды отмывали в PBS с 0,05% Tween 20 (PBS-T) по

5 мин, пермеабелизировали с помощью метанола при -20 °С и блокировали неспецифическое связывание антител раствором 2% BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела в разведении 1:100 anti-CDH, anti-COL2, anti-CD90, anti-SOX2, anti-Vimentin для культуры МСК и anti-СК8/18, anti-СК14, anti-СКPan для культуры эпителиальных клеток трахеи в растворе 2% BSA в PBS-T и инкубировали в течение 12 ч при +4 °С. Затем клетки трижды отмывали в PBS по 5 мин и наносили вторичные поликлональные антитела в разведении 1:500, конъюгированные с биотином к первичным антителам CD90, CD271, SOX2, СКPan, разведенные в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 60 мин при +25 °С. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам, конъюгированным с биотином; вторичные поликлональные антитела Alexa Fluor 594 к первичным антителам CDH, Vimentin и биотинилированные антитела к CD90, CD271, SOX2, СКPan, СК-8/18, СК-14. В качестве отрицательного контроля вторичных антител к исследуемым культурам не добавляли первичные антитела. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +25 °С в темноте. Клетки отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл.

### Девитализация трахеи кролика

В качестве нативного материала для получения бесклеточного матрикса носителя применяли образец трахеи кролика-донора, выделенный на протяжении от второго кольца трахеи до бифуркации. Под девитализацией понимали гибель живых клеток в ткани при сохранении в материале клеточного содержимого и межклеточного матрикса. Перед проведением девитализации образец трахеи очищали от окружающих тканей и промывали буфером PBS для удаления сгустков крови. Затем образец помещали в пробирку с буфером PBS и замораживали в течение 15 мин в жидком азоте. После заморозки образцы размораживали в водяной бане при +37 °С в течение 30 мин, проводили замену буфера PBS и затем дважды повторяли циклы замораживания-оттаивания. Процесс девитализации завершался промыванием образцов трахеи в 70% растворе этилового спирта в течение 1,5 ч. Затем образцы помещали в PBS с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина на 72 ч при +4 °С с целью удаления остаточных количеств этилового спирта и предотвращения возможности контаминации.

## Оценка качества девитализации матрикса

Для качественной оценки девитализации образцы ДТМ фиксировали в 10% растворе формалина в PBS, отмывали проточной водой в течение часа, дегидратировали (Microm STR 120) и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу. С блоков делали срезы толщиной 4 мкм (Microm HM 355s), помещали на непокрытые предметные стекла. Затем срезы адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином, дегидратировали и просветляли в ксилоле (Microm HMS 70). Срезы заключали под покровные стекла в синтетической монтирующей среде. Полученные препараты оцифровывали при помощи автоматической установки Pannogamic DESK, затем проводили морфологическое исследование.

## Оценка цитотоксичности ДТМ

Оценку цитотоксичности ДТМ проводили экстракционным методом на культуре МСК КМ кролика. Экстракты ДТМ кролика получали следующим способом: образцы ДТМ кролика с площадью поверхности 3 см<sup>2</sup> помещали в 1 мл питательной среды для МСК КМ и инкубировали в течение 72 ч при +37 °С. МСК КМ четвертого пассажа засеивали в 96-луночный планшет в концентрации  $5 \times 10^3$  клеток/лунка и культивировали в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Подсчет клеток проводили на автоматическом приборе подсчета клеток Countess II FL Automated Cell Counter. Через 24 ч к клеткам добавляли полученные экстракты ДТМ, раститровывая экстракт шесть раз методом последовательных разведений ( $n = 3$ ) в питательной среде для МСК КМ, и культивировали в течение 48 ч.

Оценку цитотоксичности экстрактов ДТМ проводили методом оценки метаболической активности клеток с применением реагента PrestoBlue [12]. Для проведения теста на цитотоксичность после 48 ч культивирования проводили смену питательной среды на 90 мкл/лунка HBSS с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> с добавлением реагента 10 мкл/лунка PrestoBlue и инкубировали в течение 30 мин в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора. Затем для остановки реакции добавляли раствор SDS до финальной концентрации в лунке 1%. Измерение поглощения проводили при длине волны 540 нм с референсом 630 нм на планшетном фотометре Multiskan FC. В качестве контроля использовали МСК КМ в питательной среде без добавок экстракта ( $n = 3$ ). Фоновое значение учитывали добавлением реагента в HBSS с Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> ( $n = 3$ ).

## Создание ТИК методом заселения клеточных культур

Получение ТИК проводили с помощью последовательного заселения мезенхимальными клетками всей поверхности образцов ДТМ кролика и эпителиальными клетками внутренней поверхности ДТМ. Для этого на поверхность образцов трахеи заселяли МСК КМ кролика второго пассажа при вращении 3–4 об/мин в течение 48 ч в концентрации 0,25 млн клеток в 10 мкл среды для культивирования МСК КМ на 1 мм<sup>2</sup> поверхности ДТМ. Затем, за 24 ч до имплантации, внутреннюю поверхность ТИК заселяли эпителиальными клетками трахеи кролика первого пассажа в концентрации  $60 \times 10^3$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали статичным методом в полной питательной среде KSFМ.

## Оценка жизнеспособности клеток, заселенных на ДТМ

Для определения жизнеспособности МСК КМ, заселенных на поверхность ДТМ, проводили конфокальную микроскопию с окраской клеток флуоресцентными красителями по методу Live/Dead. Для этого заселенные на ДТМ клетки окрашивали в инкубаторе растворами кальцеина-АМ и этидиума гомодимера в течение 20 мин в питательной среде для культивирования МСК КМ. Визуализацию проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710 с объективом Plan-Apochromat 10x/0.45 M27.

## Проведение ортотопической имплантации ТИК

Хирургические операции проводили в асептических условиях под комбинированной анестезией (внутримышечное введение комбинации препаратов «Ксила» в дозе 0,1 мл/кг и «Золетил-100» в дозе 0,1 мл/кг, дополненное локальной анестезией операционного поля раствором новокаина 0,5%). Для ортотопической имплантации ТИК получали доступ к шейному отделу трахеи через продольный разрез по средней линии шеи протяженностью до 1 см и разделением мышц и фасций шеи тупым и острым путем. Тупым путем мобилизовывались передняя и боковые стенки трахеи. Переднебоковую стенку трахеи резецировали на протяжении четырех колец ниже второго кольца трахеи с формированием окна. Размеры ТИК корректировали интраоперационно под размер дефекта, фиксировали в области имплантации инертным нерезорбируемым материалом «Пролен 6-0» с закрытием дефекта переднебоковой стенки, проверяли герметичность шва трахеи, послойно ушивали рану. За животным проводили наблюдение до выхода из наркоза и в течение 5 сут

после операции проводили антибиотикотерапию и вводили «Кетанов» (30 мг/мл) в дозе 0,5 мл в сут.

### Мультиспиральная компьютерная томография

Через 3 мес. после имплантации ТИК для промежуточной оценки приживления ТИК и просвета трахеи в области имплантации животным проводили мультиспиральную компьютерную томографию (КТ) под седацией (внутримышечное введение растворов тилетамина и золазепам). КТ проводили на томографе Siemens Magnetom Verio и получали изображения в формате DICOM. Для наглядной оценки состояния дыхательных путей и просвета трахеи создавали 3D-модель дыхательных путей в формате STL при помощи метода волюметрического сегментирования в программе 3D Slicer.

### Морфологический анализ

Животных выводили из эксперимента спустя 6 мес. препаратом «Ксила» (1,0 мл на 1 кг массы тела животного). Аутопсийный материал забирали в границах интактной трахеи, отступая не менее 5 мм от краев имплантата. Трахея с участком ТИК извлекалась и разрезалась на две части вдоль, в сагиттальной проекции.

Для морфологической оценки результатов проведенной имплантации ТИК образцы трахеи фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формалина в течение 24 ч, проводили через гистологическую проводку и заключали в парафиновые блоки по стандартному протоколу. Срезы толщиной 4 мкм (Microm HM 355s) помещали на предметные стекла и стекла, покрытые поли-L-лизин, а затем адгезировали при +56 °С в течение 30 мин. Полученные срезы депарафинизировали, окрашивали гематоксилином и эозином и заключали под покровные стекла в монтирующей среде (Shandon-Mount). Полученные препараты оцифровывали при помощи автоматической установки Pannogamic DESK, затем проводили морфологическое исследование.

Срезы, покрытые поли-L-лизин, подготавливали к иммунофлюоресцентному окрашиванию для дополнительного подтверждения эпителизации ТИК. Для этого вначале проводили депарафинизацию, затем проводили демаскировку антигена в Tris-EDTA (pH 10.0) буфере в микроволновой печи при мощности 100 W в течение 10 минут, охлаждали до комнатной температуры и отмывали в PBS. Проводили блокировку неспецифического связывания антител раствором 2% BSA в PBS-T в течение 20 мин при +25 °С. Раствор удаляли и наносили первичные моноклональные антитела anti-CDH, anti-СКPan, anti-Ki67 в растворе 2% BSA в PBS-T и инкубировали в течение

12 ч при +4 °С. Затем клетки трижды отмывали в PBS по 5 мин и наносили вторичные поликлональные антитела, конъюгированные с биотином к первичным антителам CDH, СКPan, разведенные в PBS-T с добавлением 2% BSA. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +3 °С. Клетки снова отмывали PBS трижды по 5 мин и наносили в PBS-T с добавлением 2% BSA: стрептавидин-Alexa Fluor 488 ко вторичным поликлональным антителам, конъюгированным с биотином; вторичные поликлональные антитела Alexa Fluor 594 к первичным антителам Ki67. В качестве отрицательного контроля использовали срезы без добавления первичных антител. Инкубацию проводили в течение 30 мин при +32 °С. Срезы отмывали PBS трижды по 5 мин. Ядра окрашивали Hoechst-33342 в концентрации 1 мкг/мл. Препараты заключали под покровное стекло в 80% глицерине в PBS. Микроскопию проводили при помощи флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TE-2000.

### Статистическая обработка результатов

Статистический анализ проводили в GraphPad Prism версии 8.0 с проверкой на Гауссовское распределение тестом Шапиро–Уилка и Д'Агостино–Пирсона. Различия между контрольной группой без добавления экстракта и исследуемыми разведениями проверяли однофакторным дисперсионным анализом One-way ANOVA с апостериорным тестом Даннета. Достоверность различий считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Фенотипирование первичной культуры клеток

При окрашивании МСК КМ иммунофлюоресцентным методом было показано, что по клеточной морфологии клетки были крупные, распластаные, фибробластоподобные. Клетки экспрессировали поверхностные маркеры CD90 и CD271, одновременное наличие которых характерно для МСК. Также клетки экспрессировали коллаген II типа, что необходимо для синтеза внеклеточного матрикса, в особенности хрящевой ткани.

Клетки легкого по морфологии были маленького размера, с большим количеством межклеточных контактов, плотно располагались на пластике. Все клетки экспрессировали белок цитоскелета – общий цитокератин (СКPan), основной маркер эпителиальных клеток. При этом в культуре не наблюдалось клеток СКPan-негативных и Vimentin-положительных, что говорит о чистоте полученной культуры от фибробластоподобных клеток. Также клетки окрашивались на цитокератины СК8/18 и СК14, что подтверждало эпителиальный фенотип [13].

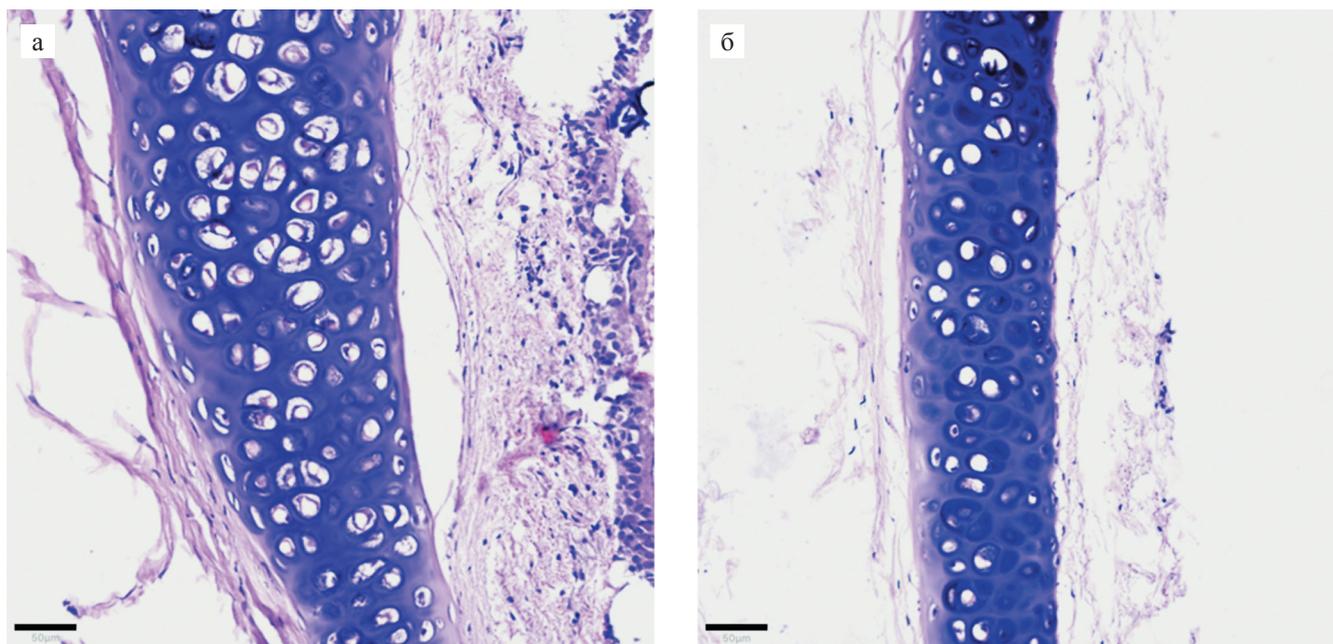


Рис. 1. Образец хрящевой ткани трахеи после выполнения девитализации: а – ткань нативной трахеи; б – ДТМ. Окраска гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок 50 мкм.  $\times 100$

Fig. 1. Tracheal cartilage sample after devitalization: а – native tracheal tissue; б – devitalized tracheal scaffold. Hematoxylin-eosin staining. The scale bar is 50  $\mu\text{m}$ .  $\times 100$

### Девитализация трахеальной ткани

ДТМ сравнивали с нативной тканью трахеи гистологическим методом и окраской гематоксилином и эозином (рис. 1). На рис. 1, б, представлена ткань хрящевого кольца трахеи, вокруг которого видны разрушенные ткани перихондрия, подслизистой оболочки и эпителия, что видно в сравнении с нативной тканью (рис. 1, а). Структура хрящевой ткани при этом сохранена. В глубине ткани наблюдаются оставшиеся хондроциты в лакунах. Архитектоника хрящевой ткани изменений не претерпела, что означает сохранение ее механической прочности.

### Цитотоксичность ДТМ и жизнеспособность заселенных клеток

Клеточная активность МСК КМ после добавления экстракта ДТМ в сравнении с контрольной группой составила  $144,3 \pm 3,8\%$  ( $p < 0,05$ ).

Путем витализации ДТМ создана ТИК трахеи с полностью заселенными на поверхности МСК КМ, при этом большинство составляли окрашенные кальцеинном-АМ жизнеспособные клетки.

### Приживление ТИК после имплантации

Для промежуточной оценки ранозаживления и состояния просвета трахеи на 3-й мес. после имплантации была проведена КТ под общей анестезией. Набор срезов был преобразован в объемное изображение, с

которого получены снимки в трех плоскостях: сверху (рис. 2, а), сбоку (рис. 2, б) и спереди (рис. 2, в).

Отмечено небольшое сужение в области имплантации – не более  $\frac{1}{3}$  просвета, что видно выше и ниже зеленой линии (плоскости срезов фотографий) на рис. 2, а. Для того чтобы полностью оценить величину сужения относительно всего просвета трахеи, была создана объемная модель, область сегментации показана зеленым на рис. 2, в.

На рис. 3 представлена рассчитанная модель дыхательных путей, которая включает в себя мягкие ткани глотки и носоглотки кролика, гортань, трахею до бифуркации, бронхи и мягкие ткани легких.

На рис. 3, г, показана зона имплантации, при этом видно, что присутствует незначительное сужение просвета. В области имплантации стенозирования не наблюдалось.

### Морфологический анализ

В зонах имплантации ТИК не было выявлено ни гранулярных лейкоцитов, ни лимфоцитов, что показало отсутствие признаков гнойного воспаления или асептического некроза вокруг материала ТИК (рис. 4, а и в). Это свидетельствует об отсутствии развития осложнений у животного в ходе эксперимента, связанных с тканевой реакцией на имплантат и развитием инфекционных заболеваний дыхательных путей.

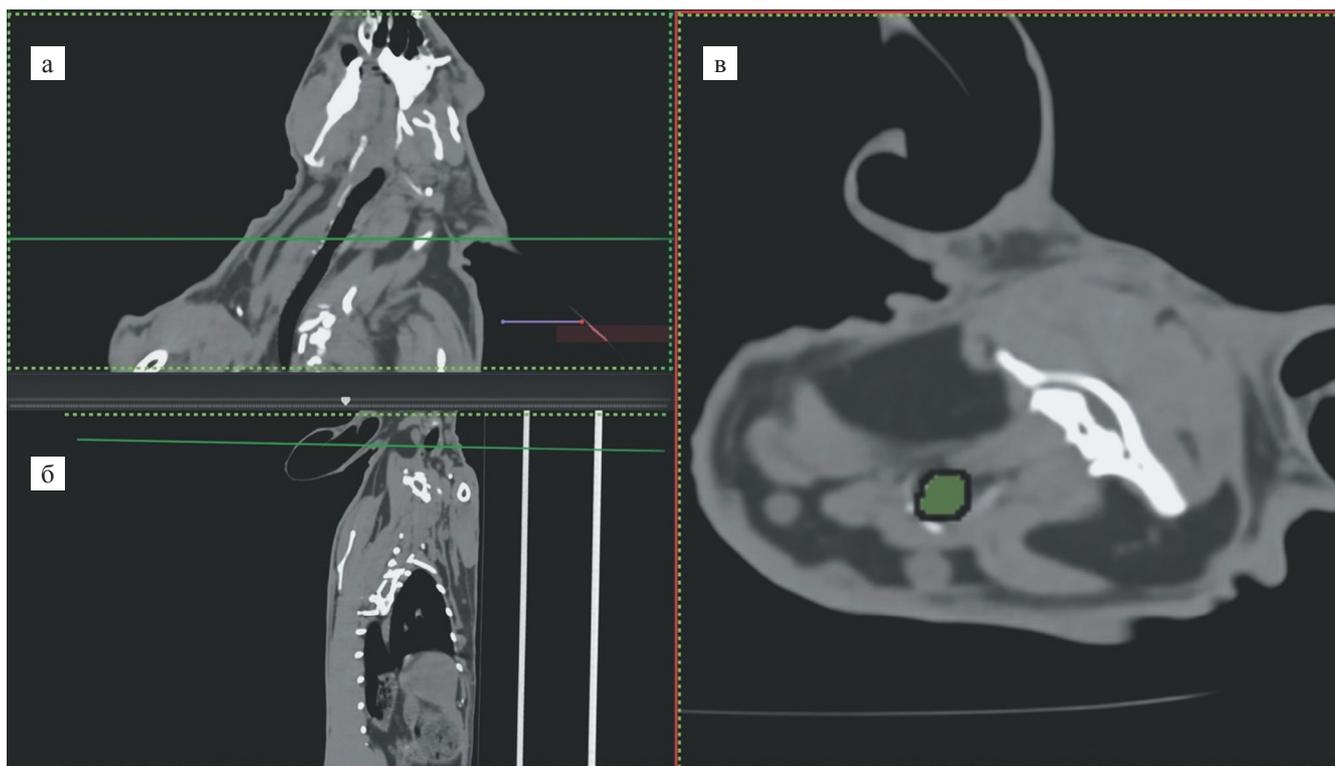


Рис. 2. КТ шеи и грудной клетки кролика, плоскости изображений: а – сверху, б – сбоку и в – спереди. Зеленая линия (а, б) – плоскость среза изображений. Зеленая область (в) – область автоматической сегментации дыхательных путей

Fig. 2. CT scan of the rabbit neck and thorax, the image planes: а – from above, б – from the side and в – from the front. The green line (а, б) – is the image cut-off plane. The green area (в) – the area of automatic segmentation of the respiratory tract

Была установлена причина сужения просвета, выявленного на 3-й мес. при помощи КТ. С правой стороны трахеи (рис. 4, а) развилась хроническая воспалительная реакция вокруг шовного материала, которая привела к частичному разрушению имплантата в этой области, замещению соединительной тканью и гипертрофии эпителиального слоя с повышением содержания бокаловидных клеток, продуцирующих слизь. Это хорошо видно на задней стенке трахеи (рис. 4, б), где эпителий стал утолщен и образовались полипы. С противоположной стороны относительно разреза участок воспаления уменьшился в размерах, из чего следует, что реакция на шовный материал имела локальный характер. Ткань на удалении от описанного шовного материала имела нормальную морфологию. Как видно на рис. 4, г, эпителий на имплантате не был гиперплазирован; ткани трахеи и имплантата срослись, наблюдались два ряда хрящевых колец: крупные – нативные, более мелкие – участки ТИК. Подслизистый слой был представлен разнонаправленными пучками коллагеновых волокон, которые окружали участки резорбции хрящевых структур имплантата, разрушаемых макрофагами.

На рис. 5 приведены результаты иммунофлюоресцентного окрашивания на СКРan (рис. 5, а–в),

белки межклеточных взаимодействий – кадгерин (CDH) (рис. 5, г), маркер клеточной пролиферации Ki-67 (рис. 5, а и б).

Участок ТИК без признаков воспаления от шовного материала представлен на рис. 5, а. Видно, что эпителий имеет нормальную морфологию, при этом пролиферирующие клетки (Ki-67) находятся преимущественно в подслизистом слое. В области воспаления (рис. 5, б) Ki-67 положительные клетки наблюдаются как в подслизистом, так и эпителиальном слое, что говорит о постоянной пролиферации клеток. Эпителий в зоне воспаления также гипертрофирован, что видно по рис. 5, в и г.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка качества получения биологически и физиологически совместимых матриксов для создания ТИК основана на проведении экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. При девитализации нативной трахеи большая часть клеток из объема трахеального матрикса была удалена нами в циклах замораживания–оттаивания, что, по всей видимости, благоприятно сказалось на снижении иммунного ответа на имплантат. При этом если ранее для получения девитализированного матрикса ТИК использовались протоколы с 5-кратными циклами заморажи-

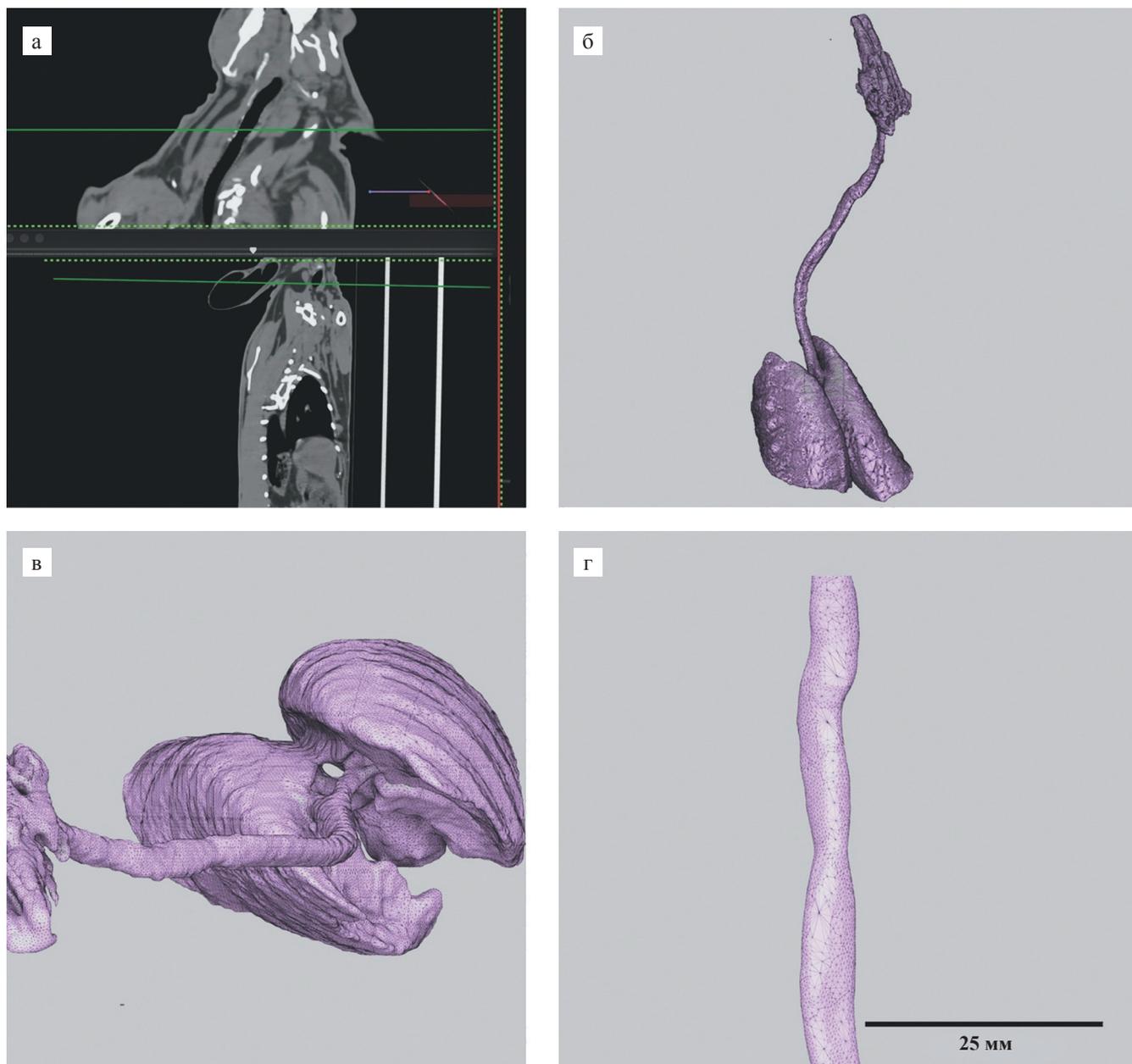


Рис. 3. Модель дыхательных путей кролика: а – МСКТ-снимок области имплантации ТИК; б–в – общий вид модели дыхательных путей; г – модель просвета трахеи в области имплантации

Fig. 3. The rabbit respiratory tract model: а – CT scan of the tissue-engineered graft implantation area; б–в – general view of the respiratory tract model; г – tracheal lumen model in the area of implantation

вания–оттаивания [14, 15], то использование нами 3-кратного цикла также оказалось пригодно для получения ДТМ. При этом метод продемонстрировал удовлетворительные результаты витализации ДТМ с заведомо высоким уровнем присутствия в материале сохранившихся после циклов замораживания–оттаивания сингенных клеток. Соответственно, данный метод девитализации может быть пригоден для получения матриц ТИК.

Отработанные ранее методы эффективного заселения матриц ТИК в режимах статичного и динамического культивирования [16] показали свою

пригодность для создания ТИК трахеи с двухслойным клеточным покрытием.

Нами была предложена и отработана модель для оценки жизнеспособности тканеинженерного имплантата при закрытии критического дефекта дыхательных путей с использованием методов МСКТ, гистологии и иммуногистохимии.

По отсутствию нейтрофилов и эозинофилов в зонах эпителия и подслизистого слоя окружающих ТИК тканей можно сделать вывод, что имплантат не обладал токсическим воздействием на ткань реципиента. По отсутствию хронической воспалительной

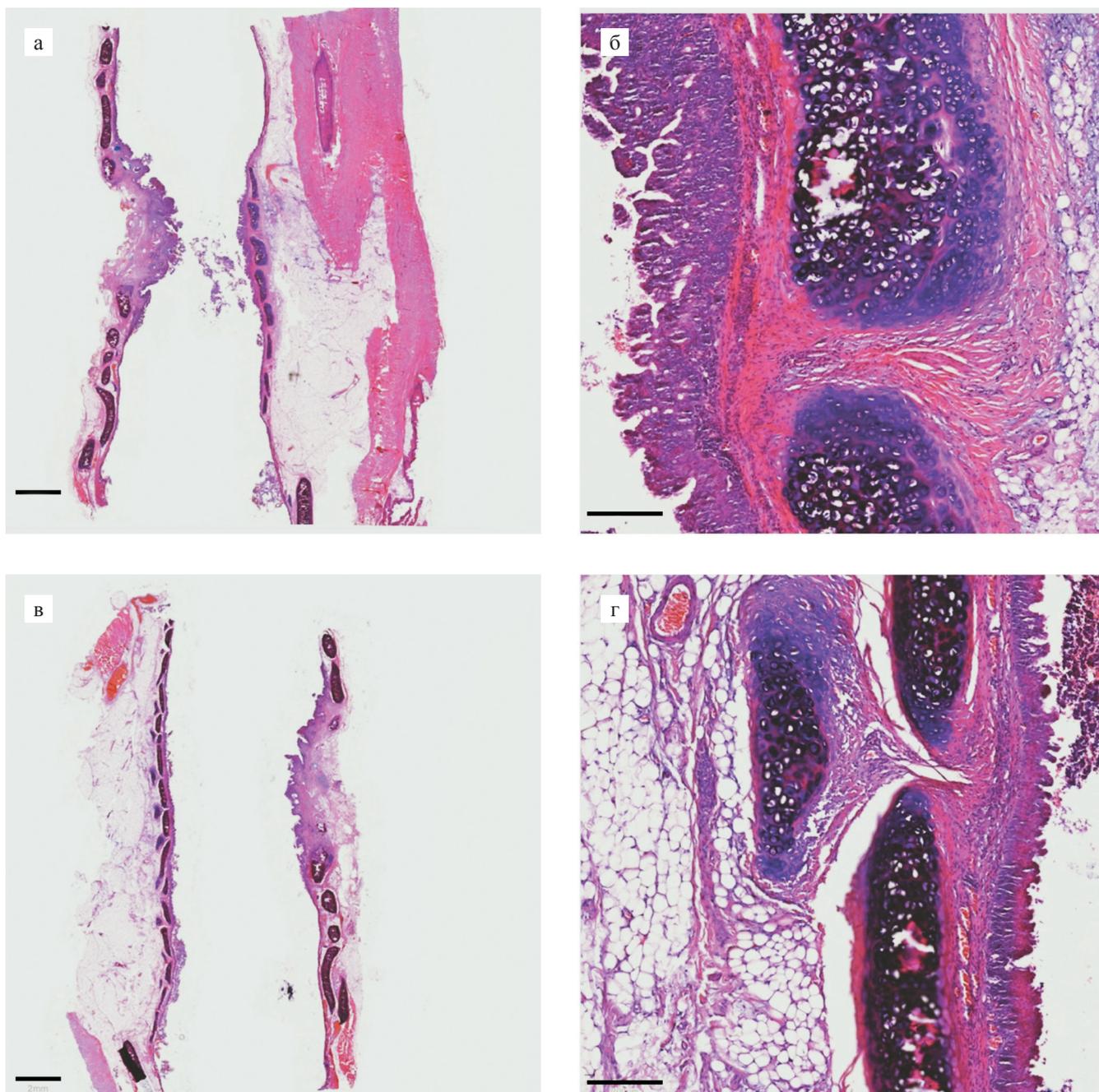


Рис. 4. Образец ткани трахеи кролика на 6-й месяц после имплантации конструкции, окраска гематоксилином–эозином: а, в – обзорное изображение тканей трахеи с двух сторон относительно разреза, масштабный отрезок 2 мм; б, г – участки слизистой оболочки на удалении от очага воспаления, масштабный отрезок 200 мкм

Fig. 4. Sample of rabbit trachea tissue at 6 months after the graft implantation, hematoxylin-eosin staining: а, в – overview of tracheal tissues from two sides relative to the incision, the scale bar is 2 mm; б, г – areas of the mucous membrane at a distance from the source of inflammation, the scale bar is 200 μm

реакции можно сделать вывод, что специфический иммунный ответ на ТИК также не развивался. В подслизистом слое наблюдалось большое количество сосудов и капилляров, что говорит о хорошей васкуляризации конструкции.

На основании полученных результатов гистологического исследования ТИК и окружающих имплантат тканей можно сделать вывод, что созданная конс-

струкция жизнеспособна, хорошо эпителизируется, васкуляризируется и интегрируется в структуру трахеи реципиента, несмотря на развитие осложнения, связанного с воспалением из-за шовного материала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание и оценка *in vitro* и *in vivo* в хирургическом эксперименте тканеинженерной конструкции на

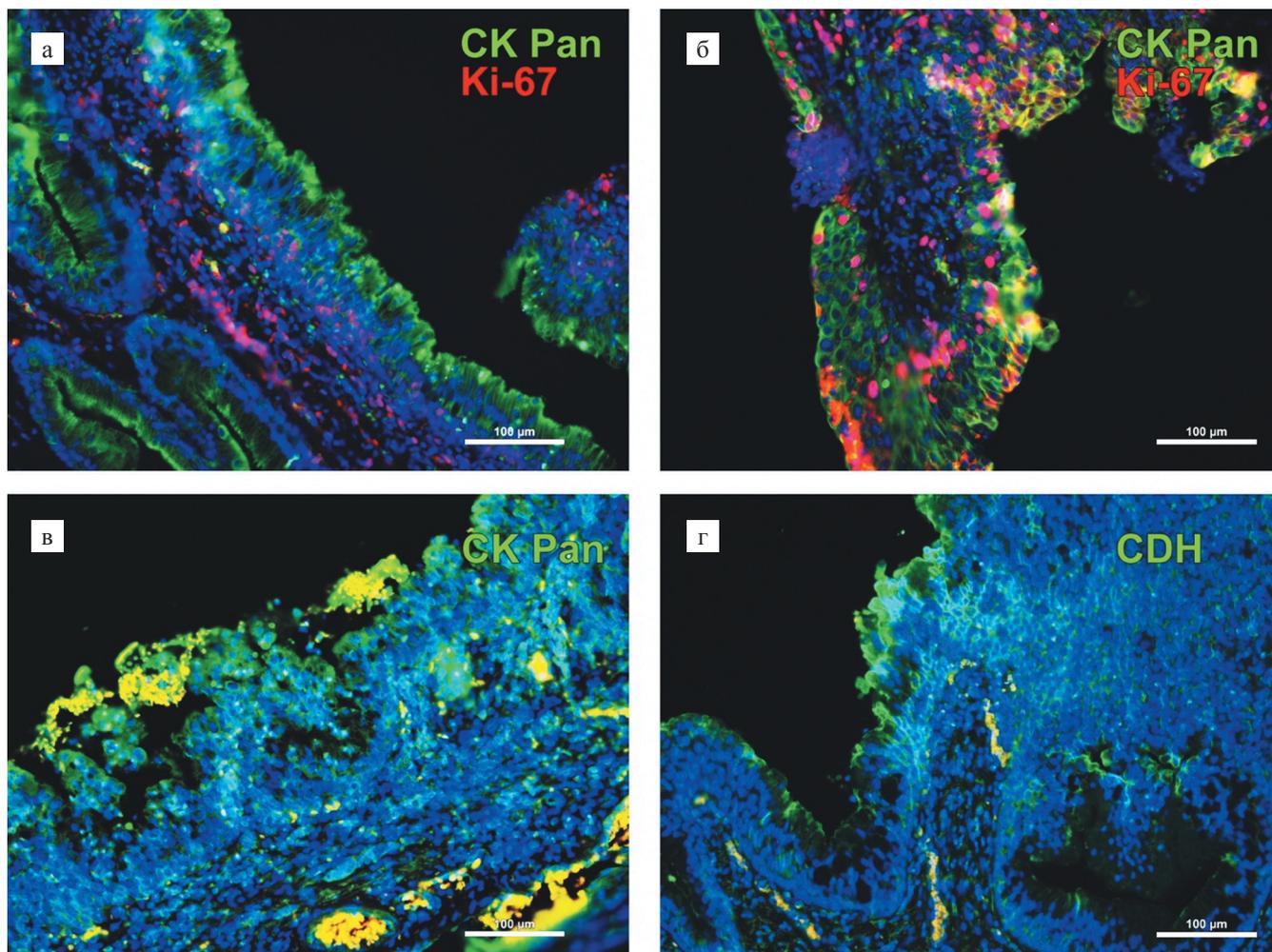


Рис. 5. Стенка кроличьей трахеи в зоне имплантации. Иммунофлюоресцентная окраска клеточных ядер Hoechst 33342 (голубая флюоресценция). Масштабный отрезок 100 мкм. ×200

Fig. 5. The wall of the rabbit trachea in the implantation area. Immunofluorescent staining of cell nuclei for Hoechst 33342 (blue fluorescence). The scale bar is 100 μm. ×200

основе девитализированного трахеального матрикса кролика, заселенного мезенхимальными стромальными клетками костного мозга и эпителиальными клетками, подтвердили цитологическую и биологическую совместимость конструкции. Минимальное сужение трахеи в области имплантации при отсутствии стенозирования свидетельствует о способности ТИК к поддержанию постоянного просвета трахеи реципиента. Целесообразным является продолжение исследований по совершенствованию биологически и физиологически совместимой тканеинженерной трахеи на основе сохранившего тканевую микроархитектонику девитализированного трахеального матрикса.

*Настоящая работа выполнена при поддержке соглашения о субсидии Минобрнауки РФ № 14.614.21.0001 (ID RFMEFI61417X0001) с использованием оборудования ЦКП «Регенеративная*

*медицина» (ID 310020)/УНУ (506197) и помощи исследованию по программе «5-100» Сеченовского университета.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES**

1. Barbetakis N, Samanidis G, Paliouras D, Lafaras C, Bischiniotis T, Tsilikas C. Intraoperative tracheal reconstruction with bovine pericardial patch following iatrogenic rupture. *Patient Saf Surg.* 2008; 2 (1): 4. doi: 10.1186/1754-9493-2-4.
2. Голуб ИЕ, Пинский СБ, Нетесин ЕС. Постинтубационные повреждения трахеи. *Сибирский медицинский журнал.* 2009; 87 (4): 124–128. Golub IE, Pinsky SB, Netesin ES. Postintubational damage of trachea. *The Siberian Medical Journal.* 2009; 87 (4): 124–128. [In Russ].

3. Соколович АГ, Деринг ЕВ, Хорошилов ИА. Несостоятельность анастомоза после циркулярной резекции трахеи и ее профилактика. *Сибирское медицинское обозрение*. 2006; 40 (3): 17–20. Sokolovich AG, Dering EV, Horoshilov IA. Inefficiency and prophylaxis of anastomosis after circular resection of trachea. *Siberian Medical Review*. 2006; 40 (3): 17–20. [In Russ, English abstract].
4. Паршин ВД, Люндуп АВ, Тарабрин ЕА, Паршин ВВ. Отдаленный результат трансплантации трахеи: успех и нерешенные проблемы. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (11): 11–19. Parshin VD, Lyundup AV, Tarabrin EA, Parshin VV. Long-term outcomes of tracheal transplantation: success and unsolved problems. *Khirurgiia. J. im. N.I. Pirogova*. 2018; (11): 11–19. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17116/hirurgiia201811111.
5. Law JX, Liao LL, Aminuddin BS, Ruszymah BH. Tissue-engineered trachea: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016; 91: 55–63. doi: 10.1016/j.ijporl.2016.10.012.
6. Барановский ДС, Демченко АГ, Оганесян РВ, Лебедев ГВ, Берсенева ДА, Балясин МВ и др. Получение бесклеточного матрикса хряща трахеи для тканеинженерных конструкций. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72 (4): 254–260. Baranovsky DS, Demchenko AG, Oganesyans RV, Lebedev GV, Berseneva DA, Balyasin MV et al. Acellular tracheal cartilaginous scaffold producing for tissue-engineered constructs. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2017; 72 (4): 254–260. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15690/vramn723.
7. Кувяда ЕВ, Губарева ЕА, Сотниченко АС, Гуменюк ИС, Гилевич ИВ, Поляков ИС и др. Опыт перфузионной рецеллюляризации биологического каркаса легких крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2016; 18 (1): 38–44. Kuvyada EV, Gubareva EA, Sotnichenko AS, Gumenyuk IS, Gilevich IV, Polyakov IS et al. Experience of perfusion recellularization of biological lung scaffold in rats. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2016; 18 (1): 38–44. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2016-1-38-44.
8. Seguin A, Vaccari S, Holder-Espinasse M, Bruneval P, Carpentier A, Taylor DA et al. Tracheal regeneration: evidence of bone marrow mesenchymal stem cell involvement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013; 145 (5): 1297–1304. doi: 10.1016/j.jtcvs.2012.09.079.
9. Go T, Jungebluth P, Baiguero S, Asnaghi A, Martorell J, Ostertag H et al. Both epithelial cells and mesenchymal stem cell-derived chondrocytes contribute to the survival of tissue-engineered airway transplants in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139 (2): 437–443. doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.10.002.
10. Jungebluth P, Bader A, Baiguera S, Möller S, Jaus M, Lim ML et al. The concept of *in vivo* airway tissue engineering. *Biomaterials*. 2012; 33 (17): 4319–4326. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.016.
11. Shin YS, Choi JW, Park JK, Kim YS, Yang SS, Min BH et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using mesenchymal stem cells seeded on a porcine cartilage powder scaffold. *Ann Biomed Eng*. 2015; 43 (4): 1003–1013. doi: 10.1007/s10439-014-1126-1.
12. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. *J Immunol Methods*. 1997; 204 (2): 205–208. doi: 10.1016/S0022-1759(97)00043-4.
13. Jetten AM, George MA, Smits HL, Vollberg TM. Keratin 13 expression is linked to squamous differentiation in rabbit tracheal epithelial cells and down-regulated by retinoic acid. *Exp Cell Res*. 1989; 182 (2): 622–634. doi: 10.1016/0014-4827(89)90264-4.
14. Roth SP, Glauche SM, Plenge A, Erbe I, Heller S, Burk J. Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue—a pilot study. *BMC biotechnology*. 2017; 17 (1): 13. doi: 10.1186/s12896-017-0329-6.
15. Chang CH, Chen CC, Liao CH, Lin FH, Hsu YM, Fang HW. Human acellular cartilage matrix powders as a biological scaffold for cartilage tissue engineering with synovium-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102 (7): 2248–2257. doi: 10.1002/jbm.a.34897.
16. Люндуп АВ, Демченко АГ, Тенчурин ТХ, Крашенинников МЕ, Клабуков ИД, Шепелев АД и др. Повышение эффективности заселения биодеградируемых матриц стромальными и эпителиальными клетками при динамическом культивировании. *Гены и клетки*. 2016; 11 (3): 102–107. Lyundup AV, Demchenko AG, Tenchurin TH, Krasheninnikov ME, Klubukov ID, Shepelev AD et al. Improving the seeding effectiveness of stromal and epithelial cell cultures in biodegradable matrices by dynamic cultivation. *Genes and Cells*. 2016; 11 (3): 102–107. [In Russ, English abstract].

Статья поступила в редакцию 14.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 14.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-108-120

## НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ИССЛЕДОВАНИИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

*И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*

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

Проблема острого повреждения почек (ОПП) после трансплантации печени (ТП) является актуальной и остается в центре внимания многих исследователей. Этиология ОПП многофакторная, но главным является ишемическое и реперфузионное повреждение печеночного трансплантата. Развитию ОПП способствуют многочисленные дооперационные, интраоперационные и послеоперационные факторы риска. Использование стандартных классификаций AKIN, RIFLE и KDIGO способствовало улучшению диагностики ОПП после ТП. Однако определение уровня креатинина в сыворотке крови позволяет диагностировать ОПП только в поздние сроки развития этого синдрома. Поэтому в настоящее время исследования проводят по поиску путей ранней диагностики ОПП с помощью биомаркеров. Переход на молекулярный уровень не только повышает точность, но и обеспечивает раннюю диагностику ОПП. В настоящее время наиболее изучены диагностические возможности липокалина, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой (NGAL). До настоящего времени не известны меры профилактики ОПП после ТП, а лечение этого синдрома нельзя признать удовлетворительным. Даже легкая форма ОПП после ТП может привести к летальному исходу, а при тяжелой форме, при которой используют заместительную почечную терапию, является риском смерти в реанимации. Более чем у половины пациентов с ОПП развивается хроническая болезнь почек, требующая проведения хронического гемодиализа.

*Ключевые слова:* острое повреждение почек, трансплантация печени, факторы риска, предикторы, биомаркеры.

## NOVEL TRENDS IN THE RESEARCH OF ACUTE KIDNEY INJURY AFTER LIVER TRANSPLANTATION

*I.M. Iljinsky, O.M. Tsurulnikova*

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

The problem of acute kidney injury (AKI) after liver transplantation (LT) is actual and remains the focus of many researchers. The etiology of AKI is multifactorial, but the main one is ischemic and reperfusion damage to LT. Multiple preoperative, intraoperative and postoperative risk factors contribute to the development of AKI. The use of standard classifications AKIN, RIFLE and KDIGO contributed to the improvement of AKI diagnosis after LT. However, the determination of creatinine in serum essence-the throat of blood enables the diagnosis of AKI only in the later stages of the development of this syndrome. Therefore, research is currently being conducted to find ways of early diagnosis of AKI using biomarkers. The transition to the molecular level increases not only the accuracy, but also provides early diagnosis of AKI. Currently, the diagnostic capabilities of lipocalin associated with neutrophil gelatinase (NGAL) have been studied the most. To date, measures to prevent AKI after LT are not known, and the treatment of this syndrome can not be considered satisfactory. Even a mild form of AKI after LT can be fatal, and in severe form, in which renal replacement therapy is used, there is a risk of death in intensive care. More than half of patients with AKI develop chronic kidney disease requiring chronic hemodialysis.

*Key words:* acute kidney injury, liver transplantation, risk factors, predictors, biomarkers.

**Для корреспонденции:** Ильинский Игорь Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (999) 877-60-95. E-mail: iiljinsky@mail.ru

**For correspondence:** Iljinsky Igor Mihajlovich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (999) 877-60-95. E-mail: iiljinsky@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Острое повреждение почек (ОПП) остается актуальной проблемой современной медицины и касается как тяжелых терапевтических, так и хирургических пациентов. Особенно высок риск развития этого синдрома у пациентов с сердечно-сосудистой патологией и сепсисом. При острой декомпенсированной сердечной недостаточности ОПП возникает в пределах 40% госпитализированных пациентов. По прогнозу в ближайшем будущем с увеличением числа пациентов с сердечной недостаточностью распространенность ОПП также возрастет [1, 2]. У тяжелых больных сепсис является ведущей причиной ОПП. В связи с различиями в характеристике пациентов, патофизиологии и исходе выделяют септическое ОПП как отдельный клинический синдром, отличный от несептического ОПП [3]. У 40% пациентов, подвергшихся хирургическим вмешательствам, развивается ОПП после операций на сердце (18,7%), общей хирургии (13,2%), торакальной хирургии (12,0%) [1, 2, 4, 5].

Проблема ОПП не обошла стороной трансплантологию. После пересадки непечечных солидных органов у большинства больных развивается острое снижение функции почек [1, 2]. Кроме того, у некоторых пациентов развивается терминальная стадия почечной недостаточности, требующая заместительной почечной терапии, а у многих пациентов – хроническая болезнь почек. Частота ОПП варьирует в зависимости от трансплантируемого органа. Острое повреждение почек после трансплантации непечечных солидных органов приводит к более длительному пребыванию в стационаре, более высокой стоимости лечения, к повышенному риску смерти, более частому развитию хронической болезни почек *de novo* [6, 7]. Острое повреждение почек является распространенным и тяжелым осложнением также после трансплантации печени (ТП) [8–12]. Оно чаще наблюдается при использовании печени от асистолических доноров и обычно развивается в ранние сроки после ТП – от шести часов до конца первых суток после реперфузии [13]. Позднее начало ОПП наблюдается у меньшего числа пациентов [14]. Острое повреждение почек развивается после ТП не только от посмертных, но и от живых доноров [15–17]. После ТП от живых доноров потребность в послеоперационной заместительной почечной терапии возникает у 6,3% пациентов (34/538) [15]. Это осложнение реже встречается у пациентов после ТП (29%), чем у больных после абдоминальных хирургических операций (47%), но необходимость в проведении заместительной почечной терапии у пациентов после ТП выше, чем у пациентов после абдоминальных операций (71 и 53% пациентов соответственно) [1, 2].

## ЧАСТОТА ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

С момента начала использования в 2002 году модели терминальной стадии заболевания печени (MELD), в которой введено определение уровня сывороточного креатинина, значительно увеличилась частота диагностики нарушений функции почек среди потенциальных реципиентов печени. В результате этого также увеличилась частота одновременной трансплантации печени и почек. Решение о проведении совместной трансплантации печени и почки является трудным и должно быть строго сбалансированным. Тяжесть и длительность почечной дисфункции до ТП, гепатит С, сахарный диабет и другие факторы риска заболевания почек ассоциированы с повышенным риском развития посттрансплантационной почечной недостаточности. Тем не менее в настоящее время отсутствуют клинические данные, которые бы точно предсказывали восстановление почек после ТП [18].

Частота ОПП после ТП колеблется от 17 до 94% [7], а по данным E.A.J. Hoste et al. [19], распространенность ОПП варьирует от 1 до 66%. В табл. 1 приведены сведения о встречаемости ОПП после ТП в исследованиях других авторов. Частота ОПП после ТП колеблется от 3,97% [20] до 65% [21]. Такой широкий диапазон в частоте ОПП можно объяснить не только популяционными различиями, но и неиспользованием авторами стандартизованных критериев классификации ОПП. Этиология и частота ОПП также различаются между странами с высоким и низким уровнем дохода. В странах с высоким уровнем дохода заболеваемость ОПП ниже, чем в странах с низким и средним уровнем дохода, где загрязненная вода и эндемические заболевания, такие как малярия, способствуют высокому уровню ОПП. Исходы ОПП аналогичны или более тяжелы у пациентов с низким доходом. Позднее распознавание ОПП препятствует их выздоровлению и приводит к высокой смертности [19].

Острое повреждение почек часто наблюдается не только после ТП от доноров с расширенными критериями, но и от «стандартных» доноров и может привести к хронической болезни почек и /или смерти пациентов [22].

I.G. Jun et al. [23] ретроспективно проанализировали данные 1617 пациентов, перенесших трансплантацию доли печени от живых доноров, из них 271 пациенту была пересажена АВ0-несовместимая донорская печень. Частота ОПП была значительно выше после ТП при АВ0-несовместимости, чем при АВ0-совместимости (67,0% против 48,2%;  $p < 0,001$ ). Кроме того, пребывание в отделении интенсивной терапии ( $p = 0,01$ ) было значительно продлено, но не было достоверных различий в смертности ( $p = 0,74$ ), недостаточности трансплантата ( $p = 0,32$ ) и

Таблица 1

**Частота острого почечного повреждения после трансплантации печени**  
**The frequency of acute kidney injury after liver transplantation**

Авторы	Год публикации	Страна публикации	Частота ОПП в %	Примечания
A.G. Barreto et al. [14]	2015	Бразилия	46,7	
I.A. Hilmi et al. [25]	2015	США	52	
M.H. Park et al. [15]	2015	Ю. Корея	27,3	Живые доноры печени
P. Wiesen et al. [26]	2016	Бельгия	58,3	
M. Hamada et al. [27]	2017	Япония	46,2	ТП детям
E.C. de Ataide [28]	2017	Бразилия	46,84	
T. Mizota et al. [17]	2017	Япония	30,7	Живые доноры печени
Z.Q. Zhou et al. [29]	2017	Китай	40,8	
Y. Zongyi et al. [20]	2017	Китай	3,97	
I. Jocmans et al. [13]	2017	Бельгия	26	
M.S. Chae et al. [16]	2017	Ю. Корея	22,7	Живые доноры печени
E. Trinh et al. [7]	2017	Канада	56,6	
Y. Cheng et al. [30]	2018	Китай	64,2	
M. Kalisvaart et al. [21]	2018	Нидерланды	65	Асистолические доноры печени
C. Pulitano et al. [31]	2018	Австралия	32	

послеоперационном диализе ( $p = 0,74$ ) между двумя группами пациентов. Низкий уровень гемоглобина и длительность операции были независимыми факторами риска ОПП после АВ0-несовместимой ТП [23].

Метаанализ баз данных (MEDLINE, EMBASE и Cochrane Databases) с момента их образования до декабря 2018 года включительно показал, что после ТП частота ОПП и тяжелого ОПП, требующего проведения заместительной почечной терапии, составляют 40,8 и 7,0% соответственно. Имеется достоверная связь ОПП с повышенной смертностью пациентов и недостаточностью трансплантированной печени. Частота ОПП после ТП остается стабильной в течение последних десяти лет исследования [24].

## ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Острое повреждение почек – синдром с различной этиологией и с различными патофизиологическими процессами, приводящими к снижению их функции [1–3, 32]. При этом синдроме помимо задержки удаления продуктов жизнедеятельности, нарушения электролитного гомеостаза и изменения концентрации лекарственных средств индуцируется генерализованная воспалительная реакция, поражающая многие внутренние органы [19].

По мнению большинства исследователей, этиология ОПП у пациентов после ТП многофакторная [1, 2, 19]. Отмечают причинную взаимосвязь с воздействием высокого уровня токсичных свободных радикалов, ишемией почек при гемодинамической нестабильности, воздействием терминальной стадии заболевания печени на почки и инфекционными осложнениями после ТП. Кроме того, ОПП связывают с тяжестью заболевания нативной печени по MELD

[30], дисфункцией почек до ТП, качеством донорской печени, периоперационными факторами, в частности, нефротоксичностью ингибиторов кальциневрина [11].

Один из главных этиологических факторов ОПП при ТП – ишемическое и реперфузионное повреждение трансплантата [11, 13, 33]. M. Kalisvaart et al. [21] изучали влияние длительности тепловой ишемии на развитие ОПП у 368 реципиентов, получивших печень от асистолических доноров. Тяжесть ОПП достоверно усиливалась с увеличением продолжительности времени тепловой ишемии: от 61 минуты у реципиентов без ОПП до 69 минут у реципиентов с наиболее тяжелой формой ОПП ( $p < 0,001$ ). Продолжительность времени тепловой ишемии в идеале не должна превышать 60 минут, увеличение этого времени ведет к усилению тяжести ОПП после ТП. Известно, что холодовая консервация донорских органов вносит вклад в усиление ишемического повреждения. Однако M. Kalisvaart et al. [21] не выявили связи между длительностью холодовой ишемии и тяжестью ОПП.

Этиологическим фактором ОПП может быть сосудистая патология. W. Beaubien-Souligny et al. [34] представили редкое наблюдение, в котором причиной ОПП после ТП был стеноз нижней полой вены. У 25-летнего мужчины с циррозом печени, вызванным склерозирующим холангитом и аутоиммунным гепатитом, через месяц после ТП развилось тяжелое ОПП в сочетании с рецидивирующим асцитом и отеком нижних конечностей. Ультразвуковое исследование выявило стеноз нижней полой вены. После ангиопластики с установкой стента наступило быстрое улучшение функции почек.

Патогенез ОПП остается до конца неясным [11]. В патогенезе ОПП при ишемическом и реперфузионном повреждении трансплантированной печени I. Jochmans et al. [13] выделяют четыре составляющие. Во-первых, основную роль играет системный воспалительный ответ с активацией клеток Купфера, которые начинают выделять циркулирующие воспалительные и провоспалительные цитокины, а также факторы транскрипции. Повышение уровня фактора некроза опухоли  $\alpha$  и других интерлейкинов нарушает регуляцию молекул эндотелиальной адгезии в отдаленных органах, в частности в почках, и при этом в них происходит инфильтрация лейкоцитами и повышение проницаемости стенок сосудов. Активированные нейтрофилы выделяют ферменты и цитокины в субэндотелиальное пространство, непосредственно вызывая травму почек и инфильтрацию моноцитами и макрофагами. Во-вторых, ишемическое и реперфузионное повреждение ТП приводит к увеличению апоптоза эндотелия, что дополнительно способствует лейкоцитарной инфильтрации стенок сосудов. В-третьих, оксидативный стресс ТП и активные формы кислорода также вносят свой вклад в повреждение почек. В-четвертых, повреждение актина цитоскелета эпителия канальцев и эндотелиальных клеток сосудов почек может привести к усилению апоптоза. По мнению I. Jochmans et al. [13], снижение степени ишемического и реперфузионного повреждения ТП, например, путем использования технологии машинной перфузии, может не только улучшить функцию трансплантата, но и ограничить его влияние на почки и уменьшить частоту ОПП.

## МОРФОЛОГИЯ ПРИ ОСТРОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПОЧЕК

Морфология почек при их остром повреждении изучена плохо, так как биопсии не выполняют у этой категории пациентов. При исследовании аутопсийного материала при ОПП имеют место различные степени дистрофии и некроза эпителиоцитов канальцев почек, вплоть до острого канальцевого некроза. Капилляры гломерул малокровны, со спавшимися просветами.

## ФАКТОРЫ РИСКА ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

В исследовании P. Wiesen et al. [26] при однофакторном анализе тяжесть почечной дисфункции коррелировала с наличием асцита и наличием бактериальной инфекции до операции, дооперационным уровнем билирубина, мочевины и креатинина, применением вазопрессоров, потребностью в послеоперационной искусственной вентиляции легких, с послеоперационным уровнем билирубина, мочевины, аспаратаминотрансферазы, гемоглобина и по-

требностью в переливании крови. Многофакторный анализ показал, что индекс массы тела ( $p = 0,004$ ), предоперационный уровень креатинина ( $p < 0,0001$ ), использование вазопрессоров ( $p = 0,0002$ ), максимальный послеоперационный уровень билирубина ( $p = 0,044$ ) и минимальный послеоперационный уровень гемоглобина ( $p = 0,0005$ ) были независимыми прогностическими факторами развития ОПП в ранние сроки после ТП. При многофакторном анализе ни донорский статус, ни уровень аспаратаминотрансферазы не оказывали существенного влияния на раннюю послеоперационную почечную дисфункцию [26].

В другом исследовании однофакторный анализ показал, что дооперационные факторы (индекс массы тела, сахарный диабет, С-реактивный белок), интраоперационные (переливание эритроцитов в упаковке, фуросемид и содержание кислорода в гепатической фазе, через пять минут и один час после реперфузии трансплантата и при закрытии брюшной полости) и постоперационные факторы (тяжелый постреперфузионный синдром) были значимыми факторами риска ОПП. Многофакторный анализ показал, что содержание кислорода через пять минут после реперфузии трансплантата, индекс массы тела и введение фуросемида были независимо связаны с послеоперационным ОПП. Таким образом, послеоперационное ОПП было независимо связано с содержанием кислорода через пять минут после реперфузии трансплантата, индексом массы тела и введением фуросемида [16].

При многофакторном анализе после ТП от живого донора независимыми факторами риска развития ОПП были: индекс массы тела более  $27,5 \text{ кг/м}^2$ ; альбумин сыворотки крови менее  $3,5 \text{ мг/дл}$ ; оценка по шкале MELD более 20; время операции свыше 600 минут; время тепловой ишемии более 40 мин; постреперфузионный синдром; средний уровень глюкозы крови выше  $150 \text{ мг/дл}$  в день операции; потребность в криопреципитате более 6 ЕД; потеря крови свыше  $60 \text{ мл/кг}$  массы тела; использование ингибитора кальциневрина без комбинации с микофенолата мофетиллом [15]. По мнению этих авторов, для снижения частоты развития послеоперационного ОПП следует снижать дозировку ингибитора кальциневрина при совместном применении с микофенолатом мофетила.

Повышенный дооперационный уровень общего билирубина и интраоперационная кровопотеря, а также длительная госпитализация были независимо связаны с риском развития ОПП после ТП детям [27].

Недавно было показано, что повышенное поступление фосфата в сыворотку крови связано с повышенным риском развития ОПП на всех этапах пребывания пациентов в стационаре [35].

Как видно из приведенных выше нескольких публикаций последних лет, в развитии ОПП принимают участие многочисленные дооперационные, интраоперационные и послеоперационные факторы риска. Остановимся более подробно на факторах риска ОПП на каждом из этих этапов.

### Дооперационные факторы риска у реципиента

Наибольшее количество факторов риска развития ОПП после ТП существует до операции. В публикациях делается акцент на различные факторы. Исследование Н. Aksu Erdost et al. [36] показало, что при MELD более 20 баллов у реципиента повышается риск ОПП после ТП. Вирусный гепатит у реципиента, время тепловой ишемии донорской печени и высокий уровень лактата в сыворотке крови до ТП оказались факторами риска ОПП в исследовании А. G. Barreto et al. [14]. Кроме того, факторами, предрасполагающими к ОПП, являются: женский пол, масса тела более 100 кг, неалкогольный стеатогепатит, тяжесть заболевания нативной печени [25]. Дисфункция почек после ТП превалирует у пациентов с декомпенсированным циррозом нативной печени [37]. В исследовании Н. P. Chen et al. [9] наиболее значимым фактором риска ОПП после ТП оказались цереброваскулярные заболевания до операции.

Важным фактором, предрасполагающим к ОПП, является сахарный диабет, существовавший до ТП [25]. После ТП прогрессирование повреждения почек до терминальной стадии почечной недостаточности было особенно выражено при наличии у пациентов сахарного диабета [38]. Авторы полагают, что сахарный диабет можно рассматривать в качестве критерия при принятии решений относительно симультанной трансплантации печени и почек. С каждым годом количество таких операций увеличивается как при хронической болезни почек, так и при ОПП [39]. Только в исследовании О. Kominisci et al. [40] не было найдено влияния гипергликемии (содержание глюкозы в крови выше 200 мг/дл) на повышение риска развития ОПП, послеоперационных инфекций или смертности пациентов после ТП.

К независимым и достоверным ( $p < 0,05$ ) факторам риска развития ОПП относят также высокий уровень предоперационного креатинина в плазме крови и длительный период лечения дофамином [20]. Острое повреждение почек ассоциируют с высоким индексом массы тела, низким объемом выделяемой мочи [29], низким уровнем сывороточного альбумина и повышенным уровнем прямого билирубина, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы [41].

Воспалительные и противовоспалительные цитокины играют значимую роль в развитии ОПП. Ис-

ходя из этого было предпринято исследование роли генных полиморфизмов цитокинов в ухудшении состояния почек после ТП. Установлено, что генотип IL4-33 T/T достоверно ассоциирован с более высокой частотой ОПП по сравнению с двумя другими генотипами ( $p = 0,03$ ). Поэтому генотип IL4-33 T/T может быть одним из факторов риска ОПП после ТП [42].

### Донорские факторы риска

Независимым и достоверным ( $p < 0,05$ ) фактором риска развития ОПП после ТП признают тепловую и холодовую ишемию донорской печени, степень которой увеличивается при использовании органов от доноров высокого риска, особенно от асистолических доноров [20]. В исследовании М. В. Doyle et al. [43] было проведено изучение частоты ОПП в зависимости от характера донорской печени – от донора с кардиальной смертью или со смертью головного мозга. Несмотря на то что доноры печени с кардиальной смертью были моложе доноров со смертью мозга ( $p < 0,0001$ ) и у них был ниже MELD ( $p = 0,03$ ), ОПП встречалась чаще (16,3% реципиентов нуждались в диализе – против 4,1% реципиентов,  $p = 0,01$ ).

Возникновение ОПП не зависит непосредственно от использования для трансплантации печени от доноров высокого риска (асистолические доноры или доноры старше 65 лет), а связано со степенью тяжести ее ишемического и реперфузионного повреждения [13, 25]. J. Rolleg и M. Glanemann [44] обращают внимание на то, что для уменьшения вероятности развития ОПП при ТП необходима минимизация тепловой и холодовой ишемии донорской печени.

Определение того, у каких кандидатов на ТП с тяжелым повреждением почек будет полное восстановление функции почек только после одной ТП, затруднено. Н. L. Laskey et al. [45] установили, что у таких реципиентов полное восстановление функции почек было при среднем времени тепловой ишемии донорской печени 31 минута (24–46 мин), а отсутствовало их восстановление при длительности тепловой ишемии 39 мин (34–49 мин;  $p = 0,02$ ). Каждая минута увеличения времени тепловой ишемии повышала риск недостаточного восстановления почек после ТП на 8–9%.

### Интраоперационные факторы риска

Гемодинамическая нестабильность во время ТП имеет решающее значение в развитии ОПП и заслуживает пристального внимания. Тяжелая гипотензия, даже в течение менее 10 минут, была достоверно связана с развитием тяжелой формы этого осложнения [17].

Однофакторный анализ показал, что интраоперационные факторы (переливание эритроцитов, фуросемид и содержание кислорода в агепатической

фазе, через пять минут и один час после реперфузии трансплантата и при закрытии брюшной полости) были значимыми факторами риска ОПП [16].

Во время ТП независимым и достоверным ( $p < 0,05$ ) фактором риска развития ОПП является большой объем кровопотери [20], и соответственно, объем перелитой крови и/или ее компонентов (эритроцитов, свежезамороженной плазмы) [25, 30, 36]. По мнению Н. Aksu Erdost et al. [36], нормализация уровня гемоглобина без переливания компонентов крови может предотвратить ОПП.

Полагают, что переливание крови является фактором риска ОПП, только если его проводят в больших объемах [13, 30]. Кроме того, переливание длительно хранившихся эритроцитов значительно повышает риск послеоперационного ОПП у пациентов после ТП. В одном из исследований [46] пациенты, которым выполнена ТП, были разделены на две группы. Первая группа – пациенты, которым переливали эритроциты, хранившиеся менее 14 дней, и вторая группа – пациенты, у которых были использованы эритроциты, хранившиеся 14 дней или более. Послеоперационное ОПП наблюдали у 40,5% пациентов первой группы и у 65,1% – второй ( $p < 0,01$ ). Частота тяжелого ОПП после ТП была значительно выше, а продолжительность пребывания в реанимации значительно дольше во второй группе пациентов [46]. Риск развития ОПП возрастает при длительности операции более 480 минут [29].

У пациентов после ТП прогрессирование повреждения почек до терминальной стадии почечной недостаточности было особенно выражено при скорости клубочковой фильтрации менее 60 мл/мин во время операции [47]. По данным I.A. Hilmi et al. [25], наличие тяжелой нестабильной гемодинамики при реперфузии не влияет на частоту ОПП после ТП. Напротив, J. Roller и M. Glanemann [44] подчеркивают необходимость поддержания адекватного артериального давления во время реперфузии для уменьшения вероятности развития ОПП при ТП.

Недавно было установлено, что такие показатели, как повышенный исходный уровень центрального венозного давления (CVP), повышенный исходный уровень конечного диастолического объема правого желудочка (RVEDV) после индукционной анестезии и снижение смешанной венозной сатурации кислородом ( $SvO_2$ ) во время агепатической фазы при ТП, являются факторами риска развития послеоперационного ОПП [48]. Интраоперационная олигурия в сочетании со снижением смешанной венозной сатурации кислородом ( $SvO_2$ ) является более точным предиктором ОПП после ТП, чем только один из этих показателей [48].

## Постоперационные факторы риска

Независимыми и достоверными ( $p < 0,05$ ) факторами риска развития ОПП после ТП являются нефротоксичность ингибиторов кальциневрина, а также послеоперационные инфекции [20]. Развитию ОПП способствуют неоптимальная функция трансплантационной печени [29, 49] и использование вазопрессоров [29]. Пик повышения аспаратаминотрансферазы через шесть часов после реперфузии был единственным независимым фактором риска ОПП. Раннюю дисфункцию ТП чаще наблюдали у больных с ОПП [13]. К факторам риска развития ОПП в послеоперационном периоде относят также высокий дооперационный балл MELD и цирроз нативной печени [30]. Исследование S. Yoo et al. [50] показало, что повышенная периоперационная вариабельность уровня глюкозы в сыворотке крови, но не гипергликемия, независимо связана с повышенным риском ОПП у пациентов после ТП.

## ДИАГНОСТИКА ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Использование стандартных классификаций для диагностики и стратификации ОПП способствовало повышению выявляемости данного синдрома в клинической практике и эпидемиологических исследованиях [5]. R. Saragata et al. [51] указывают на постепенные изменения в понятии ОПП и подчеркивают необходимость использования стандартизованного определения в последующих исследованиях. Классификации ОПП по критериям AKIN, RIFLE и KDIGO позволяют оценить тяжесть дисфункции почек у пациентов после ТП [52].

Критерии RIFLE и KDIGO идентифицируют больше случаев ОПП, чем критерии AKIN (RIFLE – 84,2%, KDIGO – 87,5%, AKIN – 72,8%,  $p < 0,001$ ), хотя прогнозирование внутрибольничной летальности было аналогично при применении этих трех классификаций. У септических пациентов ОПП, диагностированное только на основании снижения уровня диуреза, было лучшим предиктором госпитальной смертности, чем ОПП, определяемое либо уровнем креатинина сыворотки крови (SCr), либо SCr и объемом диуреза ( $p < 0,001$ ), что свидетельствует о диагностической и прогностической значимости показателя диуреза при сепсисе у пациентов с ОПП [53]. Другие авторы также отмечали преимущество классификаций RIFLE и KDIGO в сравнении с классификацией AKIN при диагностике ОПП у тяжелых пациентов [1, 2, 54]. Большинство же авторов отдают предпочтение классификации KDIGO в диагностике ОПП и прогнозировании госпитальной летальности [55–58].

Острое повреждение почек диагностируют при увеличении в сыворотке крови креатинина на 50%

или более от его предоперационного исходного уровня. Первая стадия ОПП характеризуется 0,3 мг/дл сывороточного креатинина или повышением его уровня после ТП на 50%, вторая стадия – двукратным увеличением и третья стадия – трехкратным увеличением уровня креатинина в сыворотке крови [59]. Определение содержания креатинина в сыворотке крови является чувствительным и специфичным методом в диагностике и классификации ОПП после ТП [37].

Включение олигурии, которая часто встречается после ТП, в качестве диагностического критерия ОПП резко увеличило частоту этого осложнения. Олигурия без повышения сывороточного креатинина достоверно была связана с неблагоприятным послеоперационным исходом [60].

Постреперфузионный синдром, который отражает тяжелое ишемическое и реперфузионное повреждение, является предиктором ОПП после ТП от доноров со смертью мозга [22]. В то же время единственным достоверным предиктором ишемического и реперфузионного повреждения ТП является повышение уровня аспаратаминотрансферазы в плазме крови. Поэтому повышение уровня этого фермента в плазме крови следует рассматривать и как предиктор ОПП [13, 33].

### НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Новым трендом в ранней диагностике различных заболеваний, в том числе у пациентов после трансплантации солидных органов, является поиск и изучение для этой цели различных биомаркеров [61, 62]. Хотя уровень креатинина в сыворотке крови пока остается «золотым стандартом» оценки функции почек, этот тест имеет низкую специфичность и чувствительность для *ранней диагностики* ОПП [63]. Поэтому, а также в связи с тем, что современная терапия ОПП оставляет желать лучшего, в настоящее время внимание исследователей акцентируется не на методах лечения, а на профилактике и раннем

выявлении ОПП у тяжелых пациентов, в том числе и у больных после ТП [64, 65]. Новые биомаркеры для прогнозирования или ранней диагностики ОПП потенциально могут повысить возможности лечения этого осложнения у больных после ТП [66]. Переход с клинического и биохимического уровней на молекулярный уровень, в частности на определение биомаркеров повреждения почечных канальцев, не только повышает точность, но и обеспечивает раннюю диагностику ОПП [67].

Диагностические возможности липокалина, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой (NGAL), и биомаркера останковки клеточного цикла G1 были подтверждены в большом количестве клинических исследований кардиохирургических больных (B. Wu et al., 2019) [63]. Для предсказания ОПП после ТП также было предложено определять NGAL (A.C.Y. Yeung et al., 2018) [68].

Определение содержания сывороточного и мочевого системного фактора ингибирования миграции макрофагов (MIF) и NGAL использовали в качестве ранних предикторов развития тяжелого ОПП после ТП у 45 пациентов (средний возраст  $55 \pm 8$  лет). Из них у 19 пациентов (38%) в течение 48 часов после реперфузии развилось тяжелое ОПП. В конце операции ТП сывороточный MIF был предиктором тяжелого ОПП ( $p = 0,03$ ), тогда как мочевого MIF, сывороточный и мочевого NGAL были неинформативными. В первые послеоперационные сутки уровни сывороточного MIF ( $p = 0,006$ ), мочевого MIF ( $p = 0,03$ ) и мочевого NGAL ( $p = 0,02$ ) прогнозировали тяжелое ОПП, в то время как сывороточный NGAL был непоказателен [69]. M.A. Kandil et al. [70] также считают, что уровень NGAL в сыворотке крови не является предиктором ОПП. Тем не менее A.C.Y. Yeung et al. [68] считают необходимым проведение дальнейших исследований для стандартизации метода определения NGAL и подтверждения его клинической полезности. Это было осуществлено в одном из недавних исследований [71], которое показало, что концентрация NGAL в цельной крови при поступлении в реанимацию является хорошим стратификатором тяжести ОПП у тяжелых пациентов (табл. 2). Однако у септических пациентов концентрация NGAL более высокая независимо от наличия или отсутствия ОПП: в среднем 481 (247–687) мкг/л у септических пациентов и 623,5 (361–798) мкг/л при септическом шоке.

Гиперурикемия часто встречается после пересадки органов и относится к независимому предиктору почечной недостаточности. Гиперурикемия может сопровождать снижение функции почек у этой категории пациентов [38, 47]. Кроме того, у пациентов после ТП гиперурикемия является независимым предиктором летальности, особенно пациентов с расчетной скоростью клубочковой фильтрации ниже 60, и

Таблица 2

**Концентрация NGAL в цельной крови у тяжелых пациентов в зависимости от стадии ОПП по классификации KDIGO [71]**  
**Whole blood NGAL level in critically ill patients depending on AKI stage according to KDIGO scale**

Стадия ОПП	Средняя концентрация NGAL, мкг/л	Пределы вариации концентрации NGAL, мкг/л
0	78	60–187
1	263	89–314
2	484	333–708
3	623	231–911

предиктором повышения в два раза уровня креатинина у пациентов с сахарным диабетом. Лечение гиперурикемии приводит к улучшению функции почек у пациентов с трансплантированной печенью [38].

В качестве биомаркеров раннего выявления ОПП в различных клинических ситуациях было предложено определять в моче концентрацию тканевого ингибитора металлопротеиназы-2 (TIMP-2) и связывающего белок инсулиноподобного фактора роста-7 (IGFBP-7) [72]. Они были признаны во многих странах Европы и в США в качестве теста при оценке риска ОПП у больных после серьезных операций, при гемодинамической нестабильности или сепсисе [73]. Однако эти биомаркеры оказались неэффективны для прогнозирования ОПП после ТП, и их не следует рекомендовать для использования в клинической практике [74].

C. Pulitano et al. [31] провели проспективное исследование потенциальной связи между экспрессией генов, сывороточными медиаторами и началом ОПП после ТП. В биоптатах ТП после реперфузии у больных с ОПП по сравнению с больными без повреждения почек была более высокая экспрессия нескольких генов, участвующих в ишемическом и реперфузионном повреждении. Изменения экспрессии генов ET-1, интерлейкина (IL) 18 и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) были ассоциированы с пиковым значением креатинина. У пациентов с острым повреждением почек в сыворотке крови в первые сутки после операции также были достоверно более высокие уровни ET-1, IL18 и TNF- $\alpha$ . Многофакторный анализ показал, что уровни ET-1 и IL18 в сыворотке крови являются независимыми предикторами ОПП [31].

В качестве предиктора ОПП у больных после ТП пытались использовать определение содержания D-допахромной таумеразы в сыворотке крови до операции. Однако этот биомаркер оказался полезен только в качестве предиктора исхода операции, но не развития ОПП [75].

## МЕРЫ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЕ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

До сих пор отсутствуют способы профилактики ОПП после ТП [11]. Использование непрерывной вено-венозной гемофильтрации во время ТП пациентам, нуждавшимся в заместительной почечной терапии до операции, не уменьшает сроки пребывания в реанимации и в стационаре, но повышает их выживаемость [76]. В другом большом ретроспективном исследовании было продемонстрировано, что использование вено-венозного шунтирования во время ТП связано со значительно более низкой частотой ОПП после операции у пациентов, у которых до ТП была нарушена функция почек, но им не

требовалось проведения заместительной почечной терапии [77].

С целью снижения риска ОПП необходимо поддержание достаточного содержания кислорода сразу после реперфузии трансплантата у пациентов, перенесших ТП, путем тщательного проведения искусственной вентиляции легких и переливания крови [16]. Таргетирование периоперационной целенаправленной терапии снижает риск ОПП [78]. Авторы полагают, что системная доставка кислорода с помощью жидкостей и инотропных препаратов является лучшим способом увеличения перфузии почек и оксигенации у пациентов высокого риска, подвергшихся тяжелым операциям.

Анализ литературы, опубликованной в последние годы, показал отсутствие существенных прорывов в лечении ОПП. Раннее вмешательство при этом грозном осложнении имеет как краткосрочный, так и долгосрочный положительный эффект. Лечение ОПП, как правило, проводят в реанимационном отделении. В первую очередь оно направлено на предотвращение или ликвидацию отека легких и гиперкалиемии. На сегодняшний день заместительная почечная терапия остается «золотым стандартом» для лечения тяжелого ОПП, хотя идеальные сроки и методика применения этой терапии остаются под вопросом [79]. Дискутируется вопрос об использовании петлевых диуретиков, которые широко применяются в неотложной и интенсивной медицине, у пациентов с ОПП при сохраненной эволемиа [80].

## ИСХОДЫ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

Исход ОПП после ТП бывает различным – от полного выздоровления до смерти пациентов. Острое повреждение почек вызывает серьезные затруднения при ведении этих пациентов, влияет на исходы операции и является независимым фактором риска летального исхода [9, 14, 81]. У больных с ОПП требуется значительно дольше проводить искусственную вентиляцию легких [14], у них более длительное пребывание в реанимационном отделении и стационаре [9], а также встречается большое количество осложнений, таких как частые послеоперационные кровотечения, инфекции (бактериемия, пневмония) [9] и раннее развитие дисфункции ТП [31] со снижением ее выживаемости в течение первых нескольких месяцев [25]. Даже легкая или транзиторная форма ОПП после ТП может привести к серьезным осложнениям, длительному пребыванию в отделении интенсивной терапии и в клинике, а также к росту заболеваемости и смертности [13, 25, 59].

В одном из исследований было показано, что за период с 2002-го по 2013 год прослеживался рост количества пациентов после ТП с тяжелым ОПП, требующим проведения программного гемодиализа [12].

Предиктором потребности в гемодиализе является высокий балл MELD-Na (равный или выше 22) [14].

Тяжелая форма ОПП с необходимостью заместительной терапии является известным фактором риска смерти в реанимации [25]. Из 177 пациентов, которым была выполнена ТП, 35 пациентам (19%) в раннем посттрансплантационном периоде потребовалась заместительная почечная терапия. Средний возраст пациентов составил  $31,1 \pm 20,0$  года. Оценка по MELD составляла  $16,7 \pm 12,3$  балла. Госпитальная летальность пациентов с ОПП, которым была проведена заместительная почечная терапия, составила 23,3%, а 40% пациентов остались на гемодиализе [82].

Ишемическое и реперфузионное повреждение ответственно за возникновение постреперфузионного синдрома, который является первым проявлением тяжелой степени ОПП [22] и который влияет на заболеваемость и смертность пациентов после ТП [83–85]. Развитие умеренного или тяжелого ишемического и реперфузионного повреждения трансплантированной печени совместно с ОПП оказывает наибольшее негативное влияние на результаты лечения этих пациентов. Выживание пациентов с двумя этими осложнениями в течение первых 90 дней после операции составляло 89%, а у пациентов без этих осложнений или только с одним из них – 100% [33].

Поздняя выживаемость пациентов при ОПП после ТП, по данным различных клиник, колеблется в широких пределах. Одно- и пятилетняя кумулятивная выживаемость в группе больных с ОПП составила 33,95 и 25,24% соответственно по сравнению с 86,34 и 70,05% в группе пациентов без ОПП ( $p < 0,001$ ) [20]. В другом исследовании выживаемость пациентов через один год после операции составила 90% у пациентов с ОПП против 98% у пациентов без этого осложнения [13].

Более чем у половины и даже у большинства пациентов с ОПП развивается хроническая болезнь почек. Риск смерти возрастает экспоненциально при скорости клубочковой фильтрации менее 30 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> [12, 14, 22]. Частота хронических заболеваний почек *de novo* и потребность в диализе через три месяца и один год после трансплантации печени были значительно выше среди пациентов, у которых наблюдали ОПП [25]. Это осложнение признают также важным фактором риска возникновения *de novo* хронической болезни почек и в более отдаленные сроки после операции [31, 85].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то что ОПП после ТП встречается реже, чем у тяжелых терапевтических и хирургических пациентов, в том числе и после пересадки других солидных органов, актуальность этой проблемы сохраняется до настоящего времени и остается

в центре внимания многих исследователей. Частота ОПП после ТП колеблется в широких пределах. Этиология ОПП многофакторная, но главным из них является ишемическое и реперфузионное повреждение ТП. При тяжелой степени ОПП наблюдается острый канальцевый некроз. Развитию ОПП способствуют многочисленные дооперационные, интраоперационные и послеоперационные факторы риска. Использование стандартных классификаций AKIN, RIFLE и в большей степени KDIGO способствовало улучшению диагностики ОПП после ТП. Однако определение уровня креатинина в сыворотке крови позволяет диагностировать ОПП только в поздние сроки развития этого синдрома и не удовлетворяет запросы клиники. Поэтому в настоящее время исследования проводят по поиску путей ранней диагностики ОПП с помощью биомаркеров. Переход на молекулярный уровень, в частности, на определение биомаркеров повреждения почечных канальцев, не только повышает точность, но и обеспечивает раннюю диагностику ОПП. В настоящее время наиболее изучены диагностические возможности липокалина, ассоциированного с нейтрофильной желатиназой (NGAL). До настоящего времени не известны меры профилактики ОПП после ТП, а лечение этого синдрома нельзя признать удовлетворительным. Даже легкая форма ОПП после ТП может привести к летальному исходу, а при тяжелой форме, при которой используют заместительную почечную терапию, является риском смерти в реанимации. Более чем у половины пациентов с ОПП развивается хроническая болезнь почек, требующая проведения хронического гемодиализа.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Gameiro J, Fonseca JA, Jorge S, Lopes JA. Acute Kidney Injury Definition and Diagnosis: A Narrative Review. *J Clin Med*. 2018 Sep 28; 7 (10). pii: E307. doi: 10.3390/jcm7100307.
2. Gameiro J, Fonseca JA, Neves M, Jorge S, Lopes JA. Acute kidney injury in major abdominal surgery: incidence, risk factors, pathogenesis and outcomes. *Ann Intensive Care*. 2018 Feb 9; 8 (1): 22. doi: 10.1186/s13613-018-0369-7.
3. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C, Wald R, Martensson J et al. Acute kidney injury in sepsis. *Intensive Care Med*. 2017; 43: 816–828. doi: 10.1007/s00134-017-4755-7.
4. Grams ME, Sang Y, Coresh J, Ballew S, Matsushita K et al. Acute kidney injury after major surgery: A retrospective analysis of veteran's health administration data. *Am J Kidney Dis*. 2016; 67: 872–880. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.07.022.

5. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, Goldstein SL, Siew ED et al. Acute kidney disease and renal recovery: Consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 workgroup. *Nat Rev Nephrol.* 2017; 13: 241–257. doi: 10.1038/nrneph.2017.2.
6. Rossi AP, Vella JP. Acute Kidney Disease After Liver and Heart Transplantation. *Transplantation.* 2016 Mar; 100 (3): 506–414. doi: 10.1097/TP.0000000000000916.
7. Trinh E, Alam A, Tchervenkov J, Cantarovich M. Impact of acute kidney injury following liver transplantation on long-term outcomes. *Clin Transplant.* 2017 Jan; 31 (1). doi: 10.1111/ctr.12863.
8. Мойсюк ЛЯ, Понцов ВН, Мойсюк ЯГ. Ранняя дисфункция трансплантата и острое повреждение почек после трансплантации печени: определения, факторы риска и клиническое значение. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2012; 14 (4): 93–102. Moysyuk LY, Poptsov VN, Moysyuk YG. Early allograft dysfunction and acute kidney injury after liver transplantation: definitions, risk factors and clinical significance. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2012; 14 (4): 93–102. (In Russ.) Doi. org/10.15825/1995-1191-2012-4-93-102.
9. Chen HP, Tsai YF, Lin JR, Liu FC, Yu HP. Incidence and Outcomes of Acute Renal Failure Following Liver Transplantation: A Population-Based Cohort Study. *Medicine (Baltimore).* 2015 Dec; 94 (52): e2320. doi: 10.1097/MD.0000000000002320.
10. Naik P, Premsagar B, Mallikarjuna M. Acute renal failure in liver transplant patients: Indian study. *Indian J Clin Biochem.* 2015 Jan; 30 (1): 94–98. doi: 10.1007/s12291-013-0410-4.
11. De Haan JE, Hoorn EJ, de Geus HRH. Acute kidney injury after liver transplantation: Recent insights and future perspectives. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017 Apr; 31 (2): 161–169. doi: 10.1016/j.bpg.2017.03.004.
12. Nadkarni GN, Chauhan K, Patel A, Saha A, Poojary P et al. Temporal trends of dialysis requiring acute kidney injury after orthotopic cardiac and liver transplant hospitalizations. *BMC Nephrol.* 2017 Jul 19; 18 (1): 244. doi: 10.1186/s12882-017-0657-8.
13. Jochmans I, Meurisse N, Neyrinck A, Verhaegen M, Monbaliu D, Pirenne J. Hepatic ischemia/reperfusion injury associates with acute kidney injury in liver transplantation: Prospective cohort study. *Liver Transpl.* 2017 May; 23 (5): 634–644. doi: 10.1002/lt.24728.
14. Barreto AG, Daher EF, Silva Junior GB, Garcia JH, Magalhães CB et al. Risk factors for acute kidney injury and 30-day mortality after liver transplantation. *Ann Hepatol.* 2015 Sep–Oct; 14 (5): 688–694.
15. Park MH, Shim HS, Kim WH, Kim HJ, Kim DJ et al. Clinical Risk Scoring Models for Prediction of Acute Kidney Injury after Living Donor Liver Transplantation: A Retrospective Observational Study. *PLoS One.* 2015 Aug 24; 10 (8): e0136230. doi: 10.1371/journal.pone.0136230.
16. Chae MS, Lee N, Park DH, Lee J, Jung HS et al. Influence of oxygen content immediately after graft reperfusion on occurrence of postoperative acute kidney injury in living donor liver transplantation. *Medicine (Baltimore).* 2017 Aug; 96 (31): e7626. doi: 10.1097/MD.00000000000007626.
17. Mizota T, Hamada M, Matsukawa S, Seo H, Tanaka T, Segawa H. Relationship Between Intraoperative Hypotension and Acute Kidney Injury After Living Donor Liver Transplantation: A Retrospective Analysis. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2017 Apr; 31 (2): 582–589. doi: 10.1053/j.jvca.2016.12.002.
18. Parajuli S, Foley D, Djamali A, Mandelbrot D. Renal Function and Transplantation in Liver Disease. *Transplantation.* 2015 Sep; 99 (9): 1756–1764. doi: 10.1097/TP.0000000000000820.
19. Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, Zarbock A, Palevsky PM et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2018; 14: 607–625. doi: 10.1038/s41581-018-0052-0.
20. Zongyi Y, Baifeng L, Funian Z, Hao L, Xin W. Risk factors of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation in China. *Sci Rep.* 2017 Jan 30; 7: 41555. doi: 10.1038/srep41555.
21. Kalisvaart M, Schlegel A, Umbro I, de Haan JE, Scaleira I et al. The Impact of Combined Warm Ischemia Time on Development of Acute Kidney Injury in Donation After Circulatory Death Liver Transplantation: Stay Within the Golden Hour. *Transplantation.* 2018 May; 102 (5): 783–793. doi: 10.1097/TP.0000000000002085.
22. Kalisvaart M, de Haan JE, Hesselink DA, Polak WG, Hansen BE et al. The postreperfusion syndrome is associated with acute kidney injury following donation after brain death liver transplantation. *Transpl Int.* 2017 Jul; 30 (7): 660–669. doi: 10.1111/tri.12891.
23. Jun IG, Lee B, Kim SO, Shin WJ, Bang JY et al. Comparison of acute kidney injury between AB0-compatible and AB0-incompatible living donor liver transplantation: A propensity matching analysis. *Liver Transpl.* 2016 Dec; 22 (12): 1656–1665. doi: 10.1002/lt.24634.
24. Thongprayoon C, Kaewput W, Thamcharoen N, Bathini T, Watthanasuntorn K5 et al. Incidence and Impact of Acute Kidney Injury after Liver Transplantation: A Meta-Analysis. *J Clin Med.* 2019 Mar 17; 8 (3). pii: E372. doi: 10.3390/jcm8030372.
25. Hilmi IA, Damian D, Al-Khafaji A et al. Acute kidney injury following orthotopic liver transplantation: incidence, risk factors, and effects on patient and graft outcomes. *Br J Anaesth.* 2015 Jun; 114 (6): 919–926. doi: 10.1093/bja/aeu556.
26. Wiesen P, Massion PB, Joris J, Detry O, Damas P. Incidence and risk factors for early renal dysfunction after liver transplantation. *World J Transplant.* 2016 Mar 24; 6 (1): 220–232. doi: 10.5500/wjt.v6.i1.220.
27. Hamada M, Matsukawa S, Shimizu S, Kai S, Mizota T. Acute kidney injury after pediatric liver transplantation: incidence, risk factors, and association with outcome. *J Anesth.* 2017 Oct; 31 (5): 758–763. doi: 10.1007/s00540-017-2395-2.
28. De Ataide EC, Perales SR, Bortoto JB, Peres MAO, Filho FC et al. Immunomodulation, Acute Renal Failure, and Complications of Basiliximab Use After Liver Transplantation: Analysis of 114 Patients and Literature

- Review. *Transplant Proc.* 2017 May; 49 (4): 852–857. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.01.047.
29. Zhou ZQ, Fan LC, Zhao X, Xia W, Luo AL et al. Risk factors for acute kidney injury after orthotopic liver transplantation: A single-center data analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2017 Dec; 37 (6): 861–863. doi: 10.1007/s11596-017-1818-5.
30. Cheng Y, Wei GQ, Cai QC, Jiang Y, Wu AP. Prognostic Value of Model for End-Stage Liver Disease Incorporating with Serum Sodium Score for Development of Acute Kidney Injury after Liver Transplantation. *Chin Med J (Engl).* 2018 Jun 5; 131 (11): 1314–1320. doi: 10.4103/0366-6999.232798.
31. Pulitano C, Ho P, Verran D, Sandroussi C, Joseph D et al. Molecular profiling of postreperfusion milieu determines acute kidney injury after liver transplantation: A prospective study. *Liver Transpl.* 2018 Jul; 24 (7): 922–931. doi: 10.1002/lt.25178.
32. Mehta RL, Burdmann EA, Cerdá J, Feehally J, Finkelstein F et al. Recognition and management of acute kidney injury in the International Society of Nephrology 0 by 25 Global Snapshot: a multinational cross-sectional study. *Lancet.* 2016 May 14; 387 (10032): 2017–2025. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30240-9.
33. Rahman S, Davidson BR, Mallett SV. Early acute kidney injury after liver transplantation: Predisposing factors and clinical implications. *World J Hepatol.* 2017 Jun 28; 9 (18): 823–832. doi: 10.4254/wjh.v9.i18.823.
34. Beaubien-Souligny W, Pepin MN, Legault L, Cailhier JF, Ethier J et al. Acute Kidney Injury Due to Inferior Vena Cava Stenosis After Liver Transplantation: A Case Report About the Importance of Hepatic Vein Doppler Ultrasound and Clinical Assessment. *Can J Kidney Health Dis.* 2018 Oct 3; 5: 2054358118801012. doi: 10.1177/2054358118801012.
35. Thongprayoon C, Cheungpasitporn W, Mao MA, Sakhuja A, Erickson SB. Admission hyperphosphatemia increases the risk of acute kidney injury in hospitalized patients. *J Nephrol.* 2018 Apr; 31 (2): 241–247. doi: 10.1007/s40620-017-0442-6.
36. Aksu Erdost H, Ozkardesler S, Ocmen E, Avkan-Oguz V, Akan M et al. Acute Renal Injury Evaluation After Liver Transplantation: With RIFLE Criteria. *Transplant Proc.* 2015 Jun; 47 (5): 1482–487. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.04.065.
37. Lu HY, Ning XY, Chen YQ, Han SJ, Chi P et al. Predictive Value of Serum Creatinine, Blood Urea Nitrogen, Uric Acid, and  $\beta$ 2-Microglobulin in the Evaluation of Acute Kidney Injury after Orthotopic Liver Transplantation. *Chin Med J (Engl).* 2018 May 5; 131 (9): 1059–1066. doi: 10.4103/0366-6999.230726.
38. Longenecker JC, Waheed S, Bandak G, Murakami CA, McMahon BA et al. Hyperuricemia after orthotopic liver transplantation: divergent associations with progression of renal disease, incident end-stage renal disease, and mortality. *BMC Nephrol.* 2017 Mar 27; 18 (1): 103. doi: 10.1186/s12882-017-0518-5.
39. Asch WS, Bia MJ. New Organ Allocation System for Combined Liver-Kidney Transplants and the Availability of Kidneys for Transplant to Patients with Stage 4–5 CKD. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017; 12: 848–852. doi: 10.2215/CJN.08480816.
40. Komurcu O, Camkiran Firat A, Kaplan S, Torgay A, Pirat A et al. Postoperative effects of intraoperative hyperglycemia in liver transplant patients. *Exp Clin Transplant.* 2015 Apr; 13 Suppl 1: 335–339.
41. Gomes Junior RM, Cezar LC, Meneses GC, Silva Junior GBD, Garcia JHP, Daher EF. Preoperative risk factors acute kidney injury after liver transplantation: results from a cross-sectional study in northeast of Brazil. *Arq Gastroenterol.* 2018 Jan-Mar; 55 (1): 18–22. doi: 10.1590/S0004-2803.201800000-03.
42. Kamei H, Onishi Y, Nakamura T, Ishigami M, Hamajima N. Role of cytokine gene polymorphisms in acute and chronic kidney disease following liver transplantation. *Hepatol Int.* 2016 Jul; 10 (4): 665–672. doi: 10.1007/s12072-016-9721-x.
43. Doyle MB, Collins K, Vachharajani N, Lowell JA, Shenoy S et al. Outcomes Using Grafts from Donors after Cardiac Death. *J Am Coll Surg.* 2015; 221: 142–152. Doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.03.053.
44. Roller J, Glanemann M. Keep the pressure! Correlation of hemodynamic instability after reperfusion and severity of acute kidney injury following liver transplantation. *Transpl Int.* 2017 Jul; 30 (7): 658–659. doi: 10.1111/tri.12948.
45. Laskey HL, Schomaker N, Hung KW, Asrani SK, Jennings L et al. Predicting renal recovery after liver transplant with severe pretransplant subacute kidney injury: The impact of warm ischemia time. *Liver Transpl.* 2016 Aug; 22 (8): 1085–1091. doi: 10.1002/lt.24488.
46. Wang Y, Li Q, Ma T, Liu X3, Wang B et al. Transfusion of Older Red Blood Cells Increases the Risk of Acute Kidney Injury After Orthotopic Liver Transplantation: A Propensity Score Analysis. *Anesth Analg.* 2018 Jul; 127 (1): 202–209. doi: 10.1213/ANE.0000000000002437.
47. Longenecker JC, Estrella MM, Segev DL, Atta MG. Patterns of Kidney Function Before and After Orthotopic Liver Transplant: Associations With Length of Hospital Stay, Progression to End-Stage Renal Disease, and Mortality. *Transplantation.* 2015 Dec; 99 (12): 2556–2564. doi: 10.1097/TP.0000000000000767.
48. Kim WH, Oh HW, Yang SM, Yu JH, Lee HC et al. Intraoperative Hemodynamic Parameters and Acute Kidney Injury After Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation.* 2019 Jan 30. doi: 10.1097/TP.0000000000002584.
49. Wadei HM, Lee DD, Croome KP, Mai L, Leonard D et al. Early Allograft Dysfunction Is Associated With Higher Risk of Renal Nonrecovery After Liver Transplantation. *Transplant Direct.* 2018 Mar 14; 4 (4): e352. doi: 10.1097/TXD.0000000000000771.
50. Yoo S, Lee HJ, Lee H, Ryu HG. Association Between Perioperative Hyperglycemia or Glucose Variability and Postoperative Acute Kidney Injury After Liver Transplantation: A Retrospective Observational Study. *Anesth Analg.* 2017 Jan; 124 (1): 35–41. doi: 10.1213/ANE.0000000000001632.
51. Caragata R, Wyssusek KH, Kruger P. Acute kidney injury following liver transplantation: a systema-

- tic review of published predictive models. *Anaesth Intensive Care*. 2016 Mar; 44 (2): 251–261. doi: 10.1177/0310057X1604400212.
52. Erdost HA, Ozkardesler S, Akan M, Iyilikci L, Unek T et al. Comparison of the RIFLE, AKIN, and KDIGO Diagnostic Classifications for Acute Renal Injury in Patients Undergoing Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2016 Jul-Aug; 48 (6): 2112–2118. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.03.044.
  53. Pereira M, Rodrigues N, Godinho I, Gameiro J, Neves M et al. Acute kidney injury in patients with severe sepsis or septic shock: A comparison between the «Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, End-stage kidney disease» (RIFLE), Acute Kidney Injury Network (AKIN) and Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) classifications. *Clin Kidney J*. 2017; 10: 332–340. doi: 10.1093/ckj/sfw107.
  54. Koeze J, Keus F, Dieperink W, van der Horst ICC, Zijlstra JG, van Meurs M. Incidence, timing and outcome of AKI in critically ill patients varies with the definition used and the addition of urine output criteria. *BMC Nephrol*. 2017; 18: 70. doi: 10.1186/s12882-017-0487-8.
  55. Pan HC, Chien YS, Jenq CC, Tsai MH, Fan PC, Chang CH. Acute kidney injury classification for critically ill cirrhotic patients: A comparison of the KDIGO, AKIN, and RIFLE classifications. *Sci Rep*. 2016; 6: 23022. doi: 10.1038/srep23022.
  56. Wu HC, Lee LC, Wang WJ. Incidence and mortality of postoperative acute kidney injury in non-dialysis patients: Comparison between the AKIN and KDIGO criteria. *Ren Fail*. 2016; 38: 330–339. doi: 10.3109/0886022X.2015.1128790.
  57. Zhou J, Liu Y, Tang Y, Liu F, Zhang L et al. A comparison of RIFLE, AKIN, KDIGO, and Cys-C criteria for the definition of acute kidney injury in critically ill patients. *Int Urol Nephrol*. 2016; 48: 125–132. doi: 10.1007/s11255-015-1150-6.
  58. Tsai TY, Chien H, Tsai FC, Pan HC, Yang HY et al. Comparison of RIFLE, AKIN, and KDIGO classifications for assessing prognosis of patients on extracorporeal membrane oxygenation. *J Formos Med Assoc*. 2017; 116: 844–851. doi: 10.1016/j.jfma.2017.08.004.
  59. Wong F. The evolving concept of acute kidney injury in patients with cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015 Dec; 12 (12): 711–719. doi: 10.1038/nrgastro.2015.174.
  60. Mizota T, Minamisawa S, Imanaka Y, Fukuda K. Oliguria without serum creatinine increase after living donor liver transplantation is associated with adverse post-operative outcomes. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2016 Aug; 60 (7): 874–881. doi: 10.1111/aas.12722.
  61. Шевченко ОП, Стаханова ЕА, Гичкун ОЕ, Курабекова РМ, Муминов ИИ, Шевченко АО. Мультиплексный анализ биомаркеров неоангиогенеза и воспаления у реципиентов сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17 (1): 12–17. Shevchenko OP, Stakhanova EA, Gichkun OE, Kurabekova RM, Muminov II, Shevchenko AO. Multiplex analysis of biomarkers of neoangiogenesis and inflammation in heart transplant recipients. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2015; 17 (1): 12–17. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-1-12-17>.
  62. Курабекова РМ, Цирульникова ОМ, Гичкун ОЕ, Пашкова ИЕ, Олефиренко ГА, Шевченко ОП. Диагностическая эффективность трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF-β1) при подборе индивидуальной дозы такролимуса у детей – реципиентов печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (4): 38–43. Kurabekova RM, Tsiroulnikova OM, Gichkun OE, Pashkova IE, Olefirenko GA, Shevchenko OP. Diagnostic effectiveness of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) at adjustment of tacrolimus individual dose in pediatric liver recipients. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (4): 38–43. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-4-38-43>.
  63. Wu B, Chen J, Yang Y. Biomarkers of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery: A Narrative Review. *Biomed Res Int*. 2019 Jun 27; 2019: 7298635. doi: 10.1155/2019/7298635.
  64. Parikh CR, Moledina DG, Coca SG, Thiessen-Philbrook HR, Garg AX. Application of new acute kidney injury biomarkers in human randomized controlled trials. *Kidney Int*. 2016 Jun; 89 (6): 1372–1379. doi: 10.1016/j.kint.2016.02.027. Epub 2016 Apr 23.
  65. Lee HC, Yoon SB, Yang SM, Kim WH, Ryu HG et al. Prediction of Acute Kidney Injury after Liver Transplantation: Machine Learning Approaches vs. Logistic Regression Model. *J Clin Med*. 2018 Nov 8; 7 (11). pii: E428. doi: 10.3390/jcm7110428.
  66. Küllmar M, Meersch M. Perioperative acute kidney injury. *Anaesthetist*. 2019 Apr; 68 (4): 194–201. doi: 10.1007/s00101-019-0556-4.
  67. Husain-Syed F, Ronco C. The odyssey of risk stratification in acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2018 doi: 10.1038/s41581-018-0053-z.
  68. Yeung ACY, Morozov A, Robertson FP, Fuller BJ, Davidson BR. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in predicting acute kidney injury following orthotopic liver transplantation: A systematic review. *Int J Surg*. 2018 Sep 28; 59: 48–54. doi: 10.1016/j.ijsu.2018.09.003.
  69. Baron-Stefaniak J, Schiefer J, Miller EJ, Berlakovich GA, Baron DM, Faybik P. Comparison of macrophage migration inhibitory factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin-2 to predict acute kidney injury after liver transplantation: An observational pilot study. *PLoS One*. 2017; 12: e0183162. doi: 10.1371/journal.pone.0183162.
  70. Kandil MA, Abouelenain KM, Alsebaey A, Rashed HS, Afifi MH et al. Impact of terlipressin infusion during and after live donor liver transplantation on incidence of acute kidney injury and neutrophil gelatinase-associated lipocalin serum levels: A randomized controlled trial. *Clin Transplant*. 2017 Aug; 31 (8). doi: 10.1111/ctr.13019.
  71. Cuartero M, Betbesé AJ, Núñez K, Baldirà J, Ordóñez-Llanos J. Does Whole-Blood Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Stratify Acute Kidney Injury in

- Critically Ill Patients? *Dis Markers*. 2019 May 2; 2019: 8480925. doi: 10.1155/2019/8480925.
72. Göcze I, Jauch D, Götz M, Kennedy P, Jung B et al. Biomarker-guided Intervention to Prevent Acute Kidney Injury After Major Surgery: The Prospective Randomized BigpAK Study. *Ann Surg*. 2018 Jun; 267 (6): 1013–1020. doi: 10.1097/SLA.0000000000002485.
73. Guzzi LM, Bergler T, Binnall B, Engelman DT, Forni L et al. Clinical use of [TIMP-2] × [IGFBP7] biomarker testing to assess risk of acute kidney injury in critical care: guidance from an expert panel. *Crit Care*. 2019 Jun 20; 23 (1): 225. doi: 10.1186/s13054-019-2504-8.
74. Schiefer J, Lichtenegger P, Berlakovich GA, Plöchl W, Krenn CG et al. Urinary [TIMP-2] × [IGFBP-7] for predicting acute kidney injury in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *BMC Nephrol*. 2019 Jul 17; 20 (1): 269. doi: 10.1186/s12882-019-1456-1.
75. Baron-Stefaniak J, Schiefer J, Lichtenegger P, Miller EJ, Berlakovich GA et al. D-dopachrome tautomerase predicts outcome but not the development of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. *HPB (Oxford)*. 2018 Sep 22. pii: S1365-182X(18)33938-8. doi: 10.1016/j.hpb.2018.08.008.
76. LaMattina JC, Kelly PJ, Hanish SI, Ottmann SE, Powell JM et al. Intraoperative Continuous Venovenous Hemofiltration Facilitates Surgery in Liver Transplant Patients With Acute Renal Failure. *Transplant Proc*. 2015 Jul-Aug; 47 (6): 1901–1904. doi: 10.1016/j.transproceed.2015.05.005.
77. Sun K, Hong F, Wang Y, Agopian VG, Yan M et al. Venovenous Bypass Is Associated With a Lower Incidence of Acute Kidney Injury After Liver Transplantation in Patients With Compromised Pretransplant Renal Function. *Anesth Analg*. 2017 Nov; 125 (5): 1463–1470. doi: 10.1213/ANE.0000000000002311.
78. Giglio M, Dalfino L, Puntillo F, Brienza N. Hemodynamic goal-directed therapy and postoperative kidney injury: an updated meta-analysis with trial sequential analysis. *Crit Care*. 2019 Jun 26; 23 (1): 232. doi: 10.1186/s13054-019-2516-4.
79. Meersch M, Volmering S, Zarbock A. Prevention of acute kidney injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017 Sep; 31 (3): 361–370. doi: 10.1016/j.bpa.2017.08.002.
80. Patschan D, Patschan S, Buschmann I, Ritter O. Loop Diuretics in Acute Kidney Injury Prevention, Therapy, and Risk Stratification. *Kidney Blood Press Res*. 2019 Jul 30: 1–8. doi: 10.1159/000501315.
81. Thomas ME, Blaine C, Dawnay A, Devonald MA, Ftouh S et al. The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int*. 2015 Jan; 87 (1): 62–73. doi: 10.1038/ki.2014.328.
82. Ayhan A, Ersoy Z, Ulas A, Zeyneloglu P, Pirat A, Haberal M. Incidence and Patient Outcomes in Renal Replacement Therapy After Orthotopic Liver Transplant. *Exp Clin Transplant*. 2017 Feb; 15 (Suppl 1): 258–260. doi: 10.6002/ect.mesot2016.P126.
83. Siniscalchi A, Gamberini L, Laici C, Bardi T, Ercolani G et al. Post reperfusion syndrome during liver transplantation: From pathophysiology to therapy and preventive strategies. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 28; 22 (4): 1551–1569. doi: 10.3748/wjg.v22.i4.1551.
84. Siniscalchi A, Gamberini L, Bardi T, Laici C, Ravaioli M et al. Post-reperfusion syndrome during orthotopic liver transplantation, which definition best predicts postoperative graft failure and recipient mortality? *J Crit Care*. 2017 Oct; 41: 156–160. doi: 10.1016/j.jcrc.2017.05.020.
85. Umbro I, Tinti F, Scalera I, Evison F, Gunson B et al. Mitterhofer AP Acute kidney injury and post-reperfusion syndrome in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2016 Nov 14; 22 (42): 9314–9323. doi: 10.3748/wjg.v22.i42.9314.

Статья поступила в редакцию 12.08.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 12.08.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-121-128

## ВНУТРИСОСУДИСТАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШЕК У БОЛЬНЫХ С КАРДИОРЕНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ: ВОЗМОЖНОСТИ ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ

*А.В. Созыкин<sup>1, 3</sup>, О.П. Шевченко<sup>1</sup>, Я.А. Наумов<sup>1, 3</sup>, А.Г. Строков<sup>2</sup>, В.П. Васильева<sup>1, 3</sup>,  
А.О. Шевченко<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУЗ «Центральная клиническая больница Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

В настоящее время трансплантация почек и применение гемодиализа являются основными методами лечения терминальной почечной недостаточности. При этом главной проблемой при лечении указанной категории пациентов остается высокая смертность, в структуре которой первое место занимают сердечно-сосудистые заболевания. Показано, что у пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек, находящихся на гемодиализе, риск смертности от сердечно-сосудистых заболеваний до 20 раз выше, чем в популяции соответствующего пола и возраста. Указанные данные обусловили целесообразность выделения кардиоренальных взаимоотношений в единый кардиоренальный синдром (КРС). В связи с вышеуказанным особую значимость приобретают методы внутрисосудистой визуализации поражений коронарного русла, в частности оптическая когерентная томография (ОКТ). В настоящем обзоре представлен анализ опубликованных к настоящему времени данных об особенностях и возможностях ОКТ у больных с КРС.

*Ключевые слова:* кардиоренальный синдром, оптическая когерентная томография, внутрисосудистая визуализация.

## INTRAVASCULAR IMAGING OF ATHEROSCLEROTIC PLAQUES IN PATIENTS WITH CARDIORENAL SYNDROME: POSSIBILITIES OF OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY

*A.V. Sozykin<sup>1, 3</sup>, O.P. Shevchenko<sup>1</sup>, Ya.A. Naumov<sup>1, 3</sup>, A.G. Strokov<sup>2</sup>, V.P. Vasilieva<sup>1, 3</sup>,  
A.O. Shevchenko<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Central Clinical Hospital of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation

Currently, kidney transplantation and the use of hemodialysis are the main methods of treatment of end-stage renal disease. The main problem in the treatment of this category of patients remains high mortality, in the structure of which the first place is occupied by cardiovascular diseases. It is known that cardiovascular mortality risk in patients with hemodialysis-dependent end-stage chronic kidney disease up to 20 times higher than in the sex- and age-matched general population. These data determined isolating of cardiorenal relationships into a cardiorenal syndrome (CRS). It must be confessed that methods of intravascular visualization, particularly optical coherence

**Для корреспонденции:** Наумов Ярослав Анатольевич. Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1. Тел. (915) 164-37-80. E-mail: yaroslavnaumov14@yandex.ru

**For correspondence:** Naumov Yaroslav Anatol'evich. Address: 1, Ostrovitianova str., Moscow, 117997, Russian Federation. Tel. (915) 164-37-80. E-mail: yaroslavnaumov14@yandex.ru

tomography (OCT), are extremely important in diagnostic of coronary artery lesions. This review is devoted to analysis of the published data of the features and capabilities of OCT in patients with the CRS.

*Key words: cardiorenal syndrome, optical coherence tomography, intravascular imaging.*

Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной заболеваемости и смертности у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП). При этом риск смертности возрастает по мере прогрессирования снижения скорости клубочковой фильтрации (СКФ): у пациентов с терминальной стадией ХБП, находящихся на гемодиализе, риск смертности от сердечно-сосудистых заболеваний до 20 раз выше, чем в популяции соответствующего пола и возраста [1]. Тесная взаимосвязь механизмов регуляции и функционирования сердца и почек и нарушений функции того и другого органа послужили основанием выделения кардиоренальных взаимоотношений в единый синдром. Согласно определению Ronco et al. (2008 г.), кардиоренальный синдром – это одновременное нарушение функции сердца и почек, при котором острое или хроническое повреждение одного органа может вызвать острое или хроническое повреждение другого органа [2].

В структуре заболеваемости и смертности больных с кардиоренальным синдромом ведущее место принадлежит ишемической болезни сердца (ИБС). Показано, что ХБП – фактор риска развития острого коронарного синдрома (ОКС) [3].

При аутопсии и прижизненной визуализации методом компьютерной томографии и внутрисосудистого ультразвукового исследования (ВСУЗИ) показана достоверная связь между хронической болезнью почек и тяжестью ишемической болезни сердца и кальцификацией атеросклеротических бляшек в коронарных артериях.

Оптическая когерентная томография позволяет визуализировать атеросклеротические бляшки в коронарных артериях с более высоким разрешением; лучше, чем при ВСУЗИ, определяется пенетрация кальцием. Однако применение ОКТ у пациентов с ХБП ограничено из-за потребности в дополнительном использовании контрастных средств, необходимых для создания оптически прозрачной среды.

В настоящем обзоре представлен анализ опубликованных к настоящему времени данных об особенностях и возможностях ОКТ у больных с КРС. В качестве иллюстраций приведены собственные примеры визуализации атеросклеротического поражения коронарных артерий [4].

Оптическая когерентная томография – это метод внутрисосудистой визуализации, в основе которого лежит принцип отражения лучей инфракрасного диапазона от структур стенки сосуда [5, 6]. ОКТ была разработана в конце 80-х – начале 90-х годов XX века [7]. В начале 2000-х появились исследо-

вания, показавшие, что ОКТ является безопасным диагностическим методом и по эффективности не уступает ВСУЗИ [8], что привело к увеличению количества исследований, проводимых с помощью ОКТ и необходимости унификации методик анализа изображений. В 2010 г. была опубликована первая часть обзорного документа по методологии, терминологии и клиническому использованию ОКТ, подготовленная международной группой экспертов [9]. В документе освещались физические принципы ОКТ, методика получения ОКТ-изображений, безопасность и эффективность ОКТ, были представлены данные о нормальной морфологии коронарных артерий, оценке атеросклеротического поражения коронарных артерий, проведен анализ некоторых противоречивых аспектов, а также преимуществ и недостатков ОКТ по сравнению с ВСУЗИ. В 2012 г. опубликована вторая часть обзорного документа, которая была посвящена уточнению некоторых вопросов, не освещенных в первой части, а также описанию методики установки стентов под контролем ОКТ [10]. В 2018 г. была опубликована первая часть согласительного документа Европейской ассоциации по чрескожным коронарным вмешательствам (ЧКВ), в котором проанализированы преимущества и недостатки ВСУЗИ и ОКТ, приведена имеющаяся доказательная база для применения внутрисосудистых методов визуализации, подробно описана техника проведения вмешательств, получения и анализа изображений, а также показания и противопоказания для проведения ВСУЗИ и ОКТ [11]. Вероятно, будет опубликована и вторая часть согласительного документа, поскольку ОКТ сейчас активно развивается и позволяет оценивать многие параметры морфологии коронарных артерий до и после установки стентов и скаффолдов. Считается, что из всех существующих в настоящее время методик внутрисосудистой визуализации (спектроскопия в ближней инфракрасной области, near-infrared spectroscopy – NIRS, ВСУЗИ, ВСУЗИ с виртуальной гистологией, iMAP-ВСУЗИ) ОКТ обладает наибольшей диагностической ценностью [4].

Одна из основных проблем при кардиоренальном синдроме – высокая смертность от сердечно-сосудистых заболеваний, в структуре которой первое место занимает ИБС [12, 13]. Вышеуказанные факты обосновывают применение ОКТ при КРС для обнаружения уязвимых бляшек, которые склонны к нарушению целостности покрышки, приводящему к тромбозу, и как следствие – к ОКС. Желательно выявлять такие бляшки в стабильном состоянии пациента.

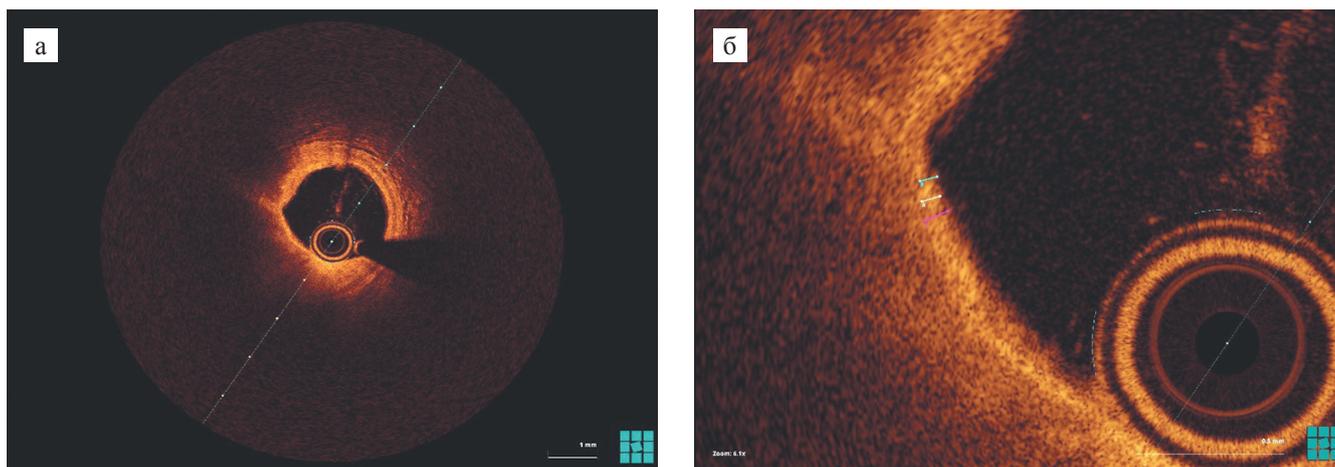


Рис. 1. Атеросклеротическая бляшка с тонкой крышкой (ОКТ): а – между 6 и 11 часами условного циферблата определяется скопление липидов (липиды занимают более 1 квадранта, что позволяет отнести атеросклеротическую бляшку к богатым липидами); б – толщина крышки бляшки в самом тонком месте при трехкратном измерении (60 мкм; 60 мкм; 70 мкм; среднее значение –  $(60 + 60 + 70)/3 = 63,3$  мкм)

Fig. 1. Thin-cap fibroatheroma (OCT): а – lipid pool located at 6–11 o'clock (lipids occupy more than 1 quadrant, what means that this plaque is lipid-rich); б – three times measured thickness of the plaque in the thinnest place (60  $\mu\text{m}$ ; 60  $\mu\text{m}$ ; 70  $\mu\text{m}$ ; average –  $(60 + 60 + 70)/3 = 63.3$   $\mu\text{m}$ )

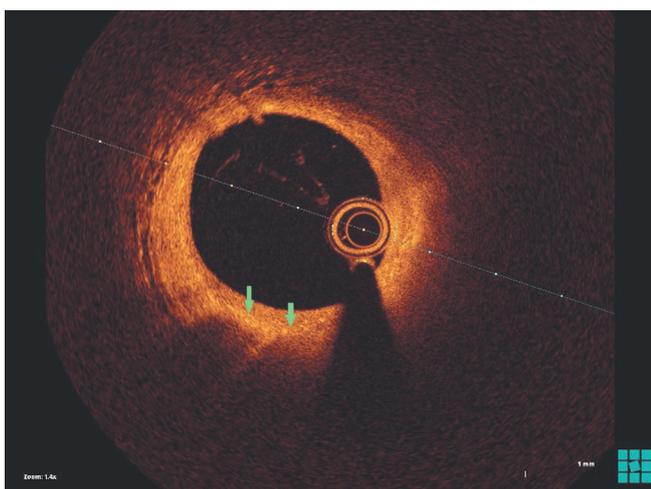


Рис. 2. Скопления макрофагов в атеросклеротической бляшке (ОКТ). Зелеными стрелками отмечены скопления макрофагов: линейные области высокой интенсивности, позади которых видна «тень»

Fig. 2. Cluster of foam cells (OCT), marked by green arrows: linear regions with high intensity with a «shadow» behind

ОКТ – единственный метод внутрисосудистой визуализации, осевое разрешение которого позволяет оценить толщину крышки бляшки (рис. 1, б) [14], на которую может влиять прием статинов [15]. Статины также обладают плейотропным действием, которое проявляется, в частности, в снижении выраженности макрофагального воспаления (рис. 2) [16, 17].

Однако оценки толщины крышки недостаточно для отнесения бляшки к бляшкам с тонкой крышкой, поскольку необходимо оценить также и объем

липидного ядра (рис. 1, а). Xing et al. продемонстрировали, что наличие бляшек, богатых липидами, вдвое увеличивает риск развития неблагоприятных событий [18].

Наличие *vasa vasorum* (рис. 3) и кристаллов холестерина (рис. 4) в бляшке увеличивает вероятность ее разрыва. Чувствительность и специфичность ОКТ по выявлению неоваскуляризации по сравнению с патологоанатомическими данными составляет 52 и 68% соответственно [19]. Nakamura et al. показали, что у пациентов с наличием кристаллов холестерина в бляшках чаще выявляются бляшки, богатые липидами [20]. Dai et al. продемонстрировали, что кристаллы холестерина чаще встречаются у пациентов с ОИМ с подъемом сегмента ST по сравнению с пациентами с ОКС без подъема сегмента ST (50,8 и 34,7% соответственно) [21].

Эрозия бляшки является причиной внезапной сердечной смерти приблизительно в 30–40% случаев [22, 23]. Показано, что эрозии бляшек чаще выявляются у пациентов моложе 50 лет и чаще расположены в левой коронарной артерии (ЛКА). В исследовании была выявлена связь наличия эрозий бляшек с наличием ХБП. Также предложена классификация факторов риска развития эрозии, которая учитывает как клинические данные, так и данные, которые могут быть получены только при помощи ОКТ, такие как наличие тонкой крышки [24].

Одним из механизмов развития ОКС считается наличие кальцинатов (рис. 5). У пациентов даже с начальными признаками ХБП чаще выявляются кальцинаты по сравнению с популяцией в целом. Кальциноз становится все более выраженным по

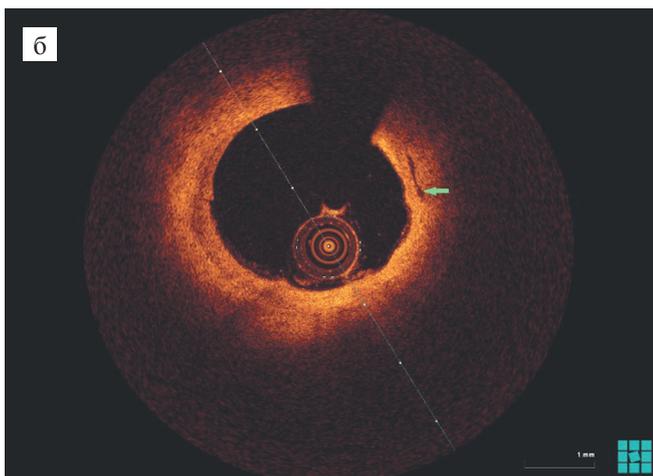
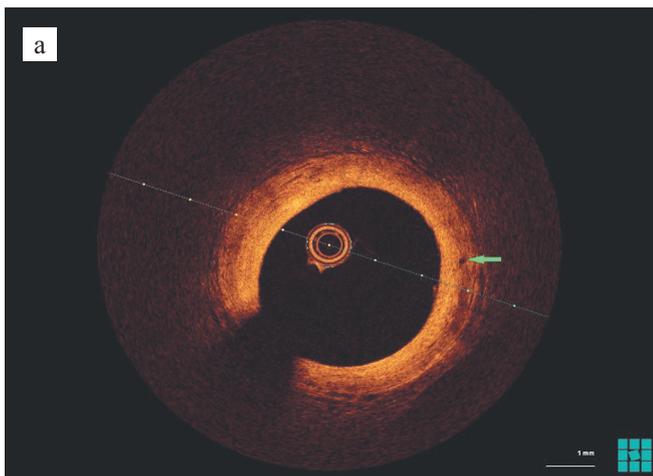


Рис. 3. Микроканалы в атеросклеротической бляшке (отмечены зеленой стрелкой). ОКТ

Fig. 3. Microchannels inside the plaque (marked by green arrow). OCT

мере прогрессирования снижения функции почек, и его наличие независимо ассоциировано с сердечно-сосудистой смертностью. Максимально выраженный кальциноз наблюдается у пациентов с терминальной почечной недостаточностью (ТПН) [25]. Продемонстрировано, что количество кальцинатов, искажающих просвет сосуда, выше у пациентов с ОИМ с подъемом сегмента ST [26].

Исследования по изучению атеросклеротического поражения коронарных артерий у пациентов с ХБП немногочисленны и гетерогенны. Опубликованные к настоящему времени исследования значительно отличаются по методологии и критериям включения пациентов, поэтому результаты этих исследований также имеют отличия [11, 27, 28].

Kato et al. провели исследование морфологических характеристик атеросклеротических бляшек в коронарных артериях с помощью ОКТ среди пациентов с ХБП и без ХБП. Наличие ХБП устанавливалось, если СКФ, рассчитанная по формуле MDRD,

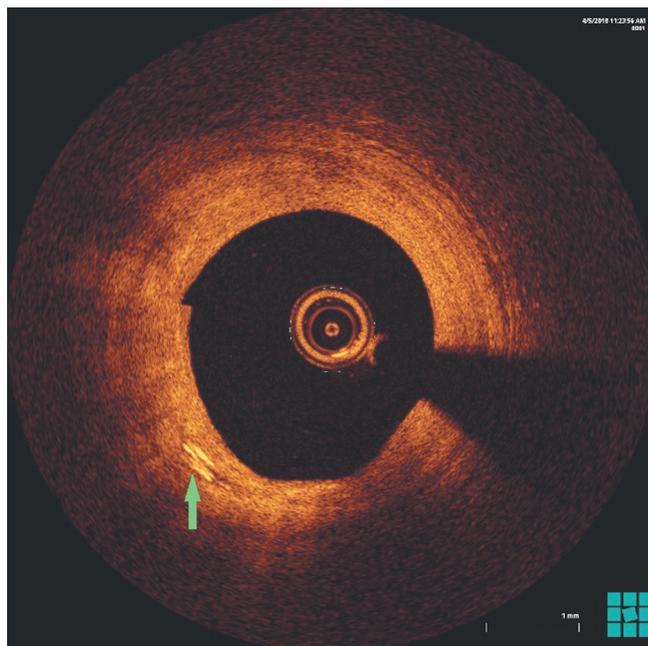


Рис. 4. Кристаллы холестерина в бляшке (отмечены зеленой стрелкой). ОКТ

Fig. 4. Cholesterol crystals inside the plaque (marked by green arrow). OCT

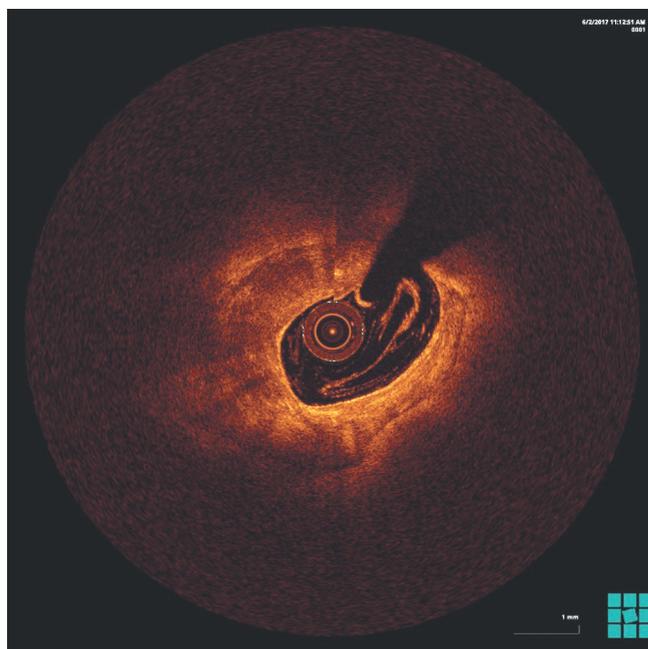


Рис. 5. Кальцинаты в атеросклеротической бляшке (ОКТ). Кальцинаты определяются вдоль всей окружности просвета сосуда (в 4 квадрантах)

Fig. 5. Calcified nodule inside the plaque (OCT). Calcified nodule can be determined along the all circumference of the vessel lumen (4 quadrants)

была  $<60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Если хотя бы на одном из фреймов липидное ядро занимало  $\geq 90^\circ$ , такие бляшки считались бляшками, богатыми липидами. Для

бляшек, богатых липидами, через каждый 1 мм измерялась величина дуги липидного ядра, затем подсчитывалось среднее значение. Кроме того, были измерены длина липидного ядра, липидный индекс (произведение средней величины дуги липидного ядра и длины липидного ядра, мм<sup>2</sup>), толщина покрышки. Авторы также изучали наличие бляшек с тонкой покрышкой (бляшка, богатая липидами, с толщиной покрышки в самом тонком месте <65 мкм), кальцинатов, макрофагов, кристаллов холестерина, микроканалов, бляшек с разрывом и тромбов (с разделением на «белые» и «красные»). Показано, что бляшки у пациентов с ХБП по сравнению с бляшками у пациентов без ХБП имели большую величину дуги липидного ядра, большую длину липидов и больший липидный индекс. Кроме того, у пациентов с ХБП чаще встречались кальцинаты, кристаллы холестерина и разрывы бляшек. Количество бляшек, богатых липидами, бляшек с тонкой покрышкой, макрофагов, микроканалов и тромбов не различалось между группами. Снижение СКФ и наличие СД были независимо связаны с повышением величины липидного индекса [29].

В исследовании Dai et al. снижение функции почек определялось по изменению уровня СКФ. Для расчета использовались уровень креатинина, уровень цистатина С и оба этих показателя. Пациенты были разделены на три группы согласно уровню СКФ: 1-ю группу составили пациенты с СКФ  $\geq 90$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, 2-ю – с СКФ 60–89 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, 3-ю – с СКФ <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. Толщина покрышки различалась во всех группах пациентов. Средняя величина дуги липидного ядра, длина липидного ядра и липидный индекс различались только при сравнении групп 1 и 2, а также групп 1 и 3. Количество бляшек с кристаллами холестерина достоверно различалось только при сравнении групп 1 и 2. Количество бляшек с кальцификацией достоверно различалось только при сравнении групп 1 и 3 [30].

В исследовании Chin et al. получавшим гемодиализ пациентам, которым проводилось ОКТ-исследование, были подобраны пары среди пациентов без ХБП. Отсутствие ХБП устанавливалось при уровне СКФ >60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>, а также отсутствии каких-либо признаков повреждения почек. При анализе «виновных» бляшек основная и контрольная группы пациентов различались по уровню средней и уровню максимальной величины дуги кальцинатов. При анализе «невиновных» бляшек основная и контрольная группы пациентов также различались по уровню средней и уровню максимальной величины дуги кальцинатов. Авторы провели дополнительный анализ основной группы пациентов, разделив последних на терцили по длительности гемодиализа. При анализе «виновных» бляшек подгруппы пациен-

тов различались по уровню средней и максимальной величины дуги кальцинатов и по числу кальцинатов, покрытых тонкой покрышкой, которые определялись как кальцинаты с величиной дуги >30°, покрытые слоем интимы <0,5 мм. При анализе «невиновных» бляшек подгруппы пациентов различались только по уровню средней величины дуги кальцинатов [27].

Sugiyama et al. изучили морфологические характеристики нативных бляшек у пациентов, разделенных на 3 группы согласно СКФ, рассчитанной по формуле, адаптированной для населения Японии: группа без ХБП (СКФ  $\geq 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>), группа с ХБП ( $15 \leq \text{СКФ} < 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) и группа с ТПН (СКФ <15 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup> и/или гемодиализ). Группы с ХБП и без ХБП для подсчета некоторых параметров были объединены в группу «без ТПН». У пациентов с ХБП по сравнению с пациентами без ХБП отмечалась большая величина дуги липидного ядра, большая длина липидов и более высокая частота встречаемости бляшек, богатых липидами. У пациентов с ТПН по сравнению с пациентами без ТПН отмечалась меньшая толщина покрышки бляшки, более высокая частота разрывов бляшек, большая величина дуги кальцинатов и меньшая толщина покрышки над кальцинатами. Возраст, наличие СД и получение гемодиализа, но не СКФ, были независимо связано с наличием кальцинированных бляшек [31].

Minami et al. исследовали 140 «невиновных» бляшек у 84 пациентов с ИБС, получавших статины, которым было проведено два ОКТ-исследования: при первом поступлении и через 6 мес. Критерием ответа на терапию статинами была выбрана площадь истончения покрышки (области с толщиной покрышки менее 200 мкм). Наличие ХБП определялось по уровню СКФ, рассчитанной по формуле MDRD, <60 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>. По сравнению с исходной ОКТ при проведении ОКТ-контроля изменились следующие показатели: уменьшилась площадь истончения покрышки, средняя величина дуги липидного ядра, максимальная величина дуги липидного ядра, длина липидного ядра, липидный индекс, величина стеноза по площади и количество макрофагов; толщина покрышки в самом тонком месте увеличилась. У пациентов с большей площадью истончения покрышки по данным исходной ОКТ отмечалось более значительное снижение площади истончения покрышки при ОКТ-контроле. Более значительное снижение площади истончения покрышки при ОКТ-контроле отмечалось и среди пациентов, ранее не принимавших статины, по сравнению с теми, кто исходно принимал статины. Наличие ХБП являлось неблагоприятным фактором ответа на терапию статинами, а поступление с ОКС во время первой госпитализации – благоприятным [32].

У пациентов с ХБП IV–V стадии чаще выявляются многососудистые поражения и наличие бляшек с повышенной толщиной меди, активированными макрофагами и выраженным кальцинозом [33]. Большинство из указанных факторов может быть выявлено с помощью ОКТ, однако у таких пациентов особенно велик риск развития контраст-индуцированной нефропатии. Для решения указанной проблемы применяют кристаллоидные или коллоидные растворы (либо их смеси) вместо рентгеноконтрастного вещества, что позволяет избежать ухудшения функции почек. Karimi Galouhahi et al. опубликовали клинический случай, когда пациенту с ХБП V стадии (креатинин 4,5 мг/дл (397,8 мкмоль/л), СКФ 13 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>), не получавшему гемодиализ, была успешно произведена ОКТ ЛКА. Оптически прозрачную среду создавали с помощью смеси физиологического и коллоидного растворов. После проведения ОКТ функция почек осталась стабильной [34]. К сожалению, работа Karimi Galouhahi et al. содержит ограниченные сведения об особенностях атеросклеротического поражения коронарных артерий у данного пациента и применявшегося раствора. Azzalini et al. опубликовали подробное описание клинического случая, когда пациенту с СД и ХБП IV стадии (СКФ 16 мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>) была успешно произведена ОКТ ЛКА и диагональной артерии. Оптически прозрачную среду создавали с помощью коллоидного раствора «Декстран 40» со скоростью инфузии 4,0 мл/мин, общее количество введенного раствора составило 14,0 мл. За время госпитализации пациента функция почек оставалась стабильной [35]. Koga et al. опубликовали клинический случай, когда у пациентки, получавшей гемодиализ, визуализировали кальцинированный тромб *in vivo* с помощью ОКТ, ВСУЗИ и ангиоскопии. Авторы не указали, какой раствор применялся для создания оптически прозрачной среды [36]. Ozaki et al. провели исследование 25 стентированных сегментов у 22 пациентов. Каждому пациенту выполнялась ОКТ с применением контрастного вещества и ОКТ с применением смеси декстрана 40 и лактата Рингера. Было продемонстрировано, что число сегментов, доступных для анализа, не различалось между ОКТ с применением контрастного вещества и ОКТ с применением смеси декстрана 40 и лактата Рингера (97,9 и 96,5% соответственно) [37].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение ОКТ у пациентов с нарушением функции почек позволяет точнее оценить морфологию бляшек, выраженность воспаления и «уязвимость» бляшек в целом. ОКТ позволяет четко визуализировать кальциноз и оценить степень его выраженности с высокой точностью. Только ОКТ позволяет увидеть

наличие эрозии бляшки и отличить эрозию от разрыва бляшки, что может иметь значение для определения дальнейшей тактики ведения пациента, а именно целесообразности проведения реваскуляризации и в случае положительного решения – оптимального выбора стента или скаффолда. Имеются серьезные ограничения по применению ОКТ у пациентов с ХБП в связи с угрозой развития контраст-индуцированной нефропатии. Как следствие, необходимо дальнейшее совершенствование техники замещения крови оптически прозрачной средой. Одной из актуальных задач является проведение масштабных многоцентровых исследований с целью уточнения возможности выявления уязвимых атеросклеротических бляшек при рутинном применении ОКТ и возможности снижения риска ОКС, а также влияния на выживаемость пациентов без нежелательных событий как одну из основополагающих целей любого вмешательства.

*Авторы заявляют об отсутствии*

*конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hou F, Jiang J, Chen J, Yu X, Zhou Q, Chen P et al. China collaborative study on dialysis: a multi-centers cohort study on cardiovascular diseases in patients on maintenance dialysis. *BioMed Central nephrology*. 2012 Aug 30; 13: 94. doi: 10.1186/1471-2369-13-94.
2. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive care medicine*. 2008 May; 34 (5): 957–962. doi: 10.1007/s00134-008-1017-8. Epub 2008 Feb 5.
3. Uemura S, Soeda T, Sugawara Y, Ueda T, Watanabe M, Saito Y. Assessment of Coronary Plaque Vulnerability with Optical Coherence Tomography. *Acta Cardiologica Sinica*. 2014 Jan; 30 (1): 1–9.
4. Созыкин АВ, Никитин АЭ, Шлыков АВ, Новикова НА, Кузьмина ИВ, Эртман ВГ и др. Поражение ствола левой коронарной артерии при стабильной ишемической болезни сердца: возможности оптической когерентной томографии в выборе врачебной тактики и оптимизации интервенционного лечения. *Эндоваскулярная хирургия*. 2018; 5 (4): 402–409. Sozykin AV, Nikitin AE, Shlykov AV, Novikova NA, Kuz'mina IV, Ertman VG et al. Left main coronary artery disease: opportunities of optical coherence tomography in the choice of treatment strategy and optimization of percutaneous coronary interventions. *Russian Journal of Endovascular Surgery*. 2018; 5 (4): 402–409. doi: 10.24183/2409-4080-2018-5-4-402-409.
5. Kume T, Uemura S. Current clinical applications of coronary optical coherence tomography. *Cardiovascular intervention and therapeutics*. 2018 Jan; 33 (1): 1–10. doi: 10.1007/s12928-017-0483-8.
6. Suh WM, Seto AH, Margey RJ, Cruz-Gonzalez I, Jang IK. Intravascular detection of the vulnerable plaque. *Circu-*

- lation. *Cardiovascular imaging*. 2011 Mar; 4 (2): 169–178. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.110.958777.
7. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22; 254 (5035): 1178–1181.
  8. Jang IK, Bouma BE, Kang DH, Park SJ, Park SW, Seung KB et al. Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002 Feb 20; 39 (4): 604–609.
  9. Prati F, Regar E, Mintz GS, Arbustini E, Di Mario C, Jang IK et al. Expert's OCT Review Document. Expert review document on methodology, terminology, and clinical applications of optical coherence tomography: physical principles, methodology of image acquisition, and clinical application for assessment of coronary arteries and atherosclerosis. *European heart journal*. 2010 Feb; 31 (4): 401–415. doi: 10.1093/eurheartj/ehp433.
  10. Prati F, Guagliumi G, Mintz GS, Costa M, Regar E, Aka-saka T et al. Expert's OCT Review Document. Expert review document part 2: methodology, terminology and clinical applications of optical coherence tomography for the assessment of interventional procedures. *European heart journal*. 2012 Oct; 33 (20): 2513–2520. doi: 10.1093/eurheartj/ehs095.
  11. Räber L, Mintz GS, Koskinas KC, Johnson TW, Holm NR, Onuma Y et al. ESC Scientific Document Group. Clinical use of intracoronary imaging. Part 1: guidance and optimization of coronary interventions. An expert consensus document of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions. *European heart journal*. 2018 Sep 14; 39 (35): 3281–3300. doi: 10.1093/eurheartj/ehy285.
  12. Sinclair H, Bourantas C, Bagnall A, Mintz GS, Kunadian V. OCT for the identification of vulnerable plaque in acute coronary syndrome. *Journal of the American College of Cardiology cardiovascular imaging*. 2015 Feb; 8 (2): 198–209. doi: 10.1016/j.jcmg.2014.12.005.
  13. Boi A, Jamthikar AD, Saba L, Gupta D, Sharma A, Loi B et al. A survey on coronary atherosclerotic plaque tissue characterization in intravascular optical coherence tomography. *Current atherosclerosis reports*. 2018 May 21; 20 (7): 33. doi: 10.1007/s11883-018-0736-8.
  14. Yonetsu T, Jang IK. Advances in intravascular imaging: new insights into the vulnerable plaque from imaging studies. *Korean circulation journal*. 2018 Jan; 48 (1): 1–15. doi: 10.4070/kcj.2017.0182.
  15. Zheng G, Chen J, Lin C, Huang X, Lin J. Effect of statin therapy on fibrous cap thickness in coronary plaques using optical coherence tomography: a systematic review and meta-analysis. *Journal of interventional cardiology*. 2015 Dec; 28 (6): 514–522. doi: 10.1111/joic.12245.
  16. Komukai K, Kubo T, Kitabata H, Matsuo Y, Ozaki Y, Takarada S et al. Effect of atorvastatin therapy on fibrous cap thickness in coronary atherosclerotic plaque as assessed by optical coherence tomography: the EASY-FIT study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014 Dec 2; 64 (21): 2207–2217. doi: 10.1016/j.jacc.2014.08.045.
  17. Самойленко ВВ, Шевченко ОП, Бурцев ВИ. Применение статинов в периоперационном периоде с позиций доказательной медицины. *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. 2014; 10 (5): 548–553. Samoylenko VV, Shevchenko OP, Burtsev VI. Statins use in the perioperative period according to the evidence-based medicine. *Ration Pharmacother Cardiol*. 2014; 10 (5): 548–553.
  18. Xing L, Higuma T, Wang Z, Aguirre AD, Mizuno K, Takano M et al. Clinical significance of lipid-rich plaque detected by optical coherence tomography: a 4-year follow-up study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2017 May 23; 69 (20): 2502–2513. doi: 10.1016/j.jacc.2017.03.556.
  19. Kume T, Okura H, Yamada R, Koyama T, Fukuhara K, Kawamura A et al. Detection of plaque neovascularization by optical coherence tomography: *ex vivo* feasibility study and *in vivo* observation in patients with angina pectoris. *The Journal of invasive cardiology*. 2016 Jan; 28 (1): 17–22.
  20. Nakamura S, Inami S, Murai K, Takano M, Takano H, Asai K et al. Relationship between cholesterol crystals and culprit lesion characteristics in patients with stable coronary artery disease: an optical coherence tomography study. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2014 Dec; 103 (12): 1015–1021. doi: 10.1007/s00392-014-0748-5.
  21. Dai J, Tian J, Hou J, Xing L, Liu S, Ma L et al. Association between cholesterol crystals and culprit lesion vulnerability in patients with acute coronary syndrome: An optical coherence tomography study. *Atherosclerosis*. 2016 Apr; 247: 111–117. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.02.010.
  22. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bociarelli M, Specchia G et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart*. 1999 Sep; 82 (3): 269–272.
  23. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000 May; 20 (5): 1262–1275. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1262.
  24. Dai J, Xing L, Jia H, Zhu Y, Zhang S, Hu S et al. *In vivo* predictors of plaque erosion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a clinical, angiographical, and intravascular optical coherence tomography study. *European heart journal*. 2018 Jun 7; 39 (22): 2077–2085. doi: 10.1093/eurheartj/ehy101.
  25. Tölle M, Reshetnik A, Schuchardt M, Höhne M, van der Giet M. Arteriosclerosis and vascular calcification: causes, clinical assessment and therapy. *European journal of clinical investigation*. 2015 Sep; 45 (9): 976–985. doi: 10.1111/eci.12493.
  26. Ong DS, Lee JS, Soeda T, Higuma T, Minami Y, Wang Z et al. Coronary calcification and plaque vulnerability: an optical coherence tomographic study. *Circulation. Car-*

- diovascular imaging*. 2016 Jan; 9 (1). pii: e003929. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.115.003929.
27. Chin CY, Matsumura M, Maehara A, Zhang W, Lee CT, Yamamoto MH et al. Coronary plaque characteristics in hemodialysis-dependent patients as assessed by optical coherence tomography. *The American journal of cardiology*. 2017 May 1; 119 (9): 1313–1319. doi: 10.1016/j.amjcard.2017.01.022.
28. Munnur RK, Nerlekar N, Wong DT. Imaging of coronary atherosclerosis in various susceptible groups. *Cardiovascular diagnosis and therapy*. 2016 Aug; 6 (4): 382–395. doi: 10.21037/cdt.2016.03.02.
29. Kato K, Yonetsu T, Jia H, Abtahian F, Vergallo R, Hu S et al. Nonculprit coronary plaque characteristics of chronic kidney disease. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 2013 May 1; 6 (3): 448–456. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.112.000165.
30. Dai J, Xing L, Hou J, Jia H, Hu S, Tian J et al. Chronic kidney disease predicts coronary plaque vulnerability: an optical coherence tomography study. *Coronary artery disease*. 2017 Mar; 28 (2): 135–144. doi: 10.1097/MCA.0000000000000452.
31. Sugiyama T, Kimura S, Ohtani H, Yamakami Y, Kojima K, Sagawa Y et al. Impact of chronic kidney disease stages on atherosclerotic plaque components on optical coherence tomography in patients with coronary artery disease. *Cardiovascular intervention and therapeutics*. 2017 Jul; 32 (3): 216–224. doi: 10.1007/s12928-016-0408-y.
32. Minami Y, Wang Z, Aguirre AD, Ong DS, Kim CJ, Uemura S et al. Clinical predictors for lack of favorable vascular response to statin therapy in patients with coronary artery disease: a serial optical coherence tomography study. *Journal of the American Heart Association*. 2017 Nov 1; 6 (11). pii: e006241. doi: 10.1161/JAHA.117.006241.
33. Aoki J, Ikari Y. Cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Annals of vascular diseases*. 2017 Dec 25; 10 (4): 327–337. doi: 10.3400/avd.ra.17-00051.
34. Karimi Galougahi K, Zalewski A, Leon MB, Karmaliotis D, Ali ZA. Optical coherence tomography-guided percutaneous coronary intervention in pre-terminal chronic kidney disease with no radio-contrast administration. *European heart journal*. 2016 Apr 1; 37 (13): 1059. doi: 10.1093/eurheartj/ehv667.
35. Azzalini L, Mitomo S, Hachinohe D, Regazzoli D, Colombo A. Zero-contrast percutaneous coronary intervention guided by dextran-based optical coherence tomography. *The Canadian journal of cardiology*. 2018 Mar; 34 (3): 342.e1–342.e3. doi: 10.1016/j.cjca.2017.11.008.
36. Koga S, Ikeda S, Nakata T, Kawano H, Abe K, Maemura K. Diverse findings in calcified thrombus between histopathology and *in vivo* imaging including intravascular ultrasound, optical coherence tomography, and angioscopy. *International heart journal*. 2015; 56 (6): 661–663. doi: 10.1536/ihj.15-117.
37. Ozaki Y, Kitabata H, Tsujioka H, Hosokawa S, Kashiwagi M, Ishibashi K et al. Comparison of contrast media and low-molecular-weight dextran for frequency-domain optical coherence tomography. *Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society*. 2012; 76 (4): 922–927.

Статья поступила в редакцию 10.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 10.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-129-133

## МОДИФИКАЦИЯ КИСЛОТНОГО ИОНА В СОСТАВЕ ДИАЛИЗИРУЮЩЕЙ ЖИДКОСТИ

Я.Л. Поз, А.Г. Строков

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

Диализирующая жидкость (ДЖ) помимо основных электролитов – натрия, калия, кальция и магния – содержит буфер, необходимый для коррекции ацидоза. С целью предупреждения преципитации солей кальция и магния в ДЖ добавляется небольшое количество кислоты. В течение многих лет для этой цели использовалась уксусная кислота. Согласно данным ряда исследований, ион ацетата даже в небольшой концентрации может вызывать ряд нежелательных явлений. Это артериальная гипотензия, выработка провоспалительных цитокинов и др. Целью данного обзора литературы является рассмотрение альтернативных кислотных компонентов ДЖ, таких как лимонная, соляная, янтарная кислоты, их преимуществ, возможности и особенностей применения в широкой клинической практике.

*Ключевые слова:* диализирующая жидкость, ацетат, цитрат, гидрохлорид, сукцинат.

## AN ACID ION MODIFICATION IN THE DIALYSIS FLUID

Ya.L. Poz, A.G. Strokov

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Dialysis fluid (DF) contains a buffer for the correction of acidosis in addition to the main electrolytes – sodium, potassium, calcium and magnesium. To prevent calcium and magnesium precipitation, a small amount of acid is added to DF. Traditionally, acetic acid has been used for this purpose. According to a number of studies, an acetate ion, even in small concentrations, can cause a number of adverse events. This is arterial hypotension, the production of pro-inflammatory cytokines, etc. The aim of this review to consider alternative acid components of DF, such as citric, hydrochloric, succinic acids; their advantages, possibilities and features of application in wide clinical practice.

*Key words:* dialysis fluid, acetate, citrate, hydrochloride, succinate.

### ВВЕДЕНИЕ

Во время гемодиализа кровь пациента через мембрану контактирует с диализирующей жидкостью; трансмембранный обмен веществами является основным физическим механизмом, составляющим сущность метода. Диализирующая жидкость (ДЖ) содержит основные электролиты, эквивалентные по концентрациям с плазмой человека, – натрий, калий, кальций и магний (в виде хлоридов), а также буфер, предназначенный для коррекции ацидоза. Поскольку почечная недостаточность характеризуется дефицитом основной буферной системы – бикарбоната, прямое восполнение его дефицита в ходе сеанса лечения является оптимальным, соответственно, ДЖ содержит бикарбонат в концентрации, пре-

вышающей физиологическую (около 32 ммоль/л). Для предотвращения выпадения солей жесткости – карбонатов кальция и магния, а также для приведения показателя pH к физиологическим значениям бикарбонатная ДЖ требует стабилизации. На заре развития гемодиализной техники данная проблема решалась путем насыщения ДЖ углекислотой за счет пропускания через нее углекислого газа (рис. 1).

Из-за технической сложности такого подхода с внедрением программного гемодиализа бикарбонатный буфер ДЖ был заменен на ацетатный. Использование стабильного ацетатного диализата, приготовляемого из однокомпонентного концентрата, существенно упростило техническое осуществление гемодиализа. Однако с клинической точки

**Для корреспонденции:** Строков Александр Григорьевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 158-22-33. E-mail: medick@bk.ru

**For correspondence:** Strokov Alexander Grigor'evich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 158-22-33. E-mail: medick@bk.ru

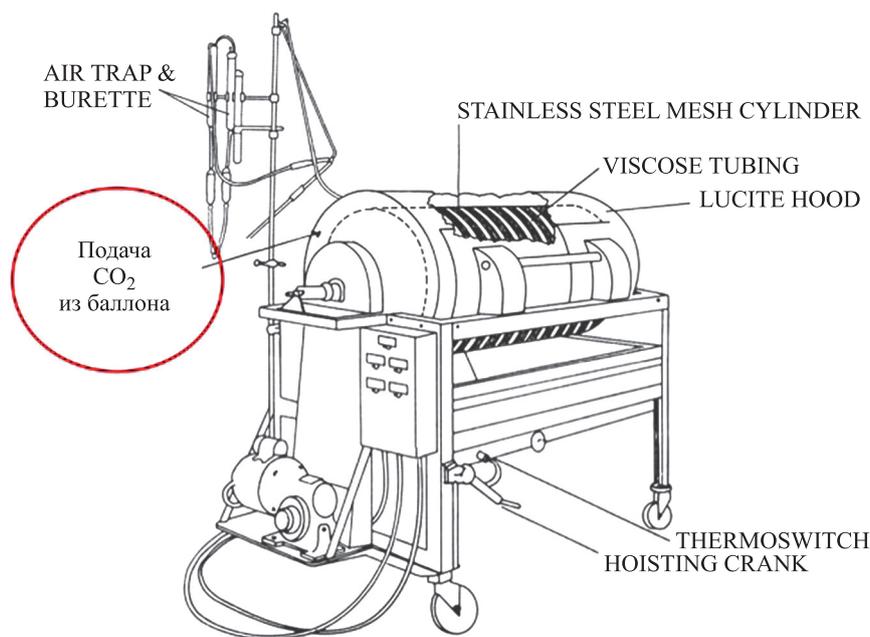


Рис. 1. Стабилизация бикарбонатной диализирующей жидкости углекислым газом в одной из первых систем гемодиализа (искусственная почка Kolff – Brigham, 1948)

Fig. 1. Stabilization of bicarbonate dialysis fluid with carbon dioxide in Kolff – Brigham artificial kidney, 1948

зрения применение ацетатного буфера оказалось неблагоприятным. При отсутствии в ДЖ бикарбоната отмечалось падение его концентрации в плазме пациентов после начала диализа, а отсутствие достаточного напряжения углекислоты в растворе вызывало гипоксемию. Кроме того, высокая ацетатемия, прогрессирующая в ходе гемодиализа, осложнялась многочисленными эпизодами интрадиализной гипотензии, связанной с периферической вазодилатацией [1] и снижением сократимости миокарда. В результате в рутинную практику гемодиализа с 80-х годов XX века стал возвращаться бикарбонатный буфер. Проблема стабилизации ДЖ была решена разделением диализного концентрата на два компо-

нента, один из которых содержал бикарбонат натрия, а во второй добавлялась кислота. При смешивании в пропорциональной системе часть бикарбонатных ионов вступает в реакцию с водородными ионами, что позволяет добиться достаточного напряжения углекислоты и стабилизировать кислотность ДЖ на уровне, предотвращающем преципитацию солей кальция и магния.

### НЕОБХОДИМОЕ ПОЯСНЕНИЕ

Таким образом, с химической точки зрения единственная кислота, долженствующая присутствовать в ДЖ – угольная кислота. Однако вещество это имеет крайне низкую температуру плавления и отличается высочайшей летучестью при атмосферном давлении. Для того чтобы получить в растворе угольную кислоту, необходимо или насытить жидкость углекислым газом (рис. 2, а), или получить углекислоту в химической реакции бикарбоната с протонами, как это и происходит в современных аппаратах для гемодиализа (рис. 2, б).

Именно необходимость доставления водородных ионов в ДЖ обуславливает необходимость добавления в нее той или иной кислоты. Отрицательный же ион в составе кислоты – лишь добавка, с которой приходится мириться, при этом данный ион, в зависимости от его химического состава, может играть как положительную, так и отрицательную роль, попадая в организм пациента.

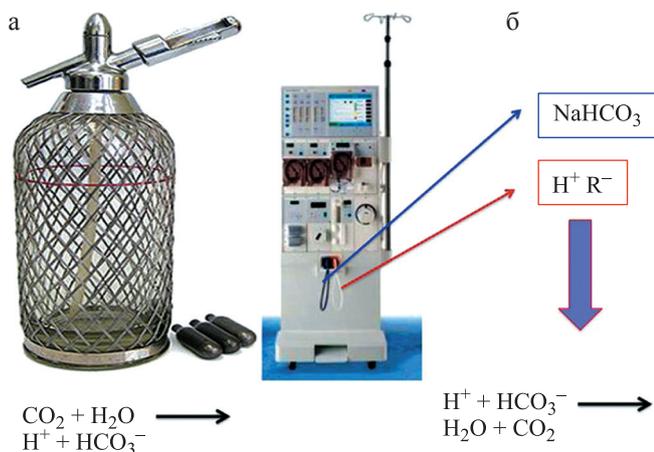


Рис. 2. Способы получения угольной кислоты в растворе

Fig. 2. Carbonic acid producing in solution

## АЦЕТАТНЫЙ ИОН

В сравнении с ацетатной ДЖ содержание ацетатного иона в современном бикарбонатном диализате на порядок ниже и составляет 3–6 ммоль/л в зависимости от способа закисления ДЖ. В организме пациента ацетатный ион метаболизируется в печени и мышцах с образованием эквивалентного количества бикарбоната. Часть ацетатных ионов конъюгируется с коэнзимом А, что требует перехода АТФ в цАМФ. Под воздействием цАМФ происходит выработка NO и вазодилатация. Кроме того, ацетатный ион стимулирует выработку мощного провоспалительного цитокина интерлейкина-1. Четких указаний на клинические последствия влияния следовых количеств ацетата не имеется, однако предполагается, что для определенных категорий пациентов такое влияние небезразлично, что подтверждается результатами некоторых исследований безацетатных методик [2, 3].

## ИОН ХЛОРА

Поскольку все электролиты в составе ДЖ представлены в виде хлоридов, суммарная концентрация ионов хлора весьма высока и составляет около 108 ммоль/л. Поэтому весьма логичным представляется использование для закисления ДЖ соляной кислоты. Увеличение концентрации ионов хлора на 3 ммоль/л не может иметь последствий с точки зрения влияния на организм пациента, в то же время подобная ДЖ не содержит никаких посторонних анионов, в том числе ацетатного иона. В большом наблюдательном исследовании, проведенном во Франции и включившем данные более 15 000 пациентов, было показано улучшение выживаемости у пациентов старше 70 лет, никогда не контактировавших с содержащей ацетатный ион ДЖ [4]. Коллектив отечественных авторов [2] показал, что использование безацетатного бикарбонатного диализата при медленном постоянном диализе у пациентов с острым повреждением почек после кардиохирургических вмешательств позволяло снизить частоту гемодинамических осложнений в 3,8 раза в сравнении со стандартным бикарбонатным диализатом на основе уксусной кислоты. Применение стандартного бикарбонатного диализата было сопряжено с повышением концентрации ацетатного иона в плазме до 12 раз от верхней границы нормы [2].

Широкое внедрение солянокислого концентрата в рутинную практику гемодиализа, очевидно, ограничено техническими сложностями, связанными с агрессивностью соляной кислоты. Тем не менее на сегодняшний день подобные концентраты доступны, в том числе и на отечественном рынке, и можно ожидать увеличения пропорции их использования.

## ЦИТРАТНЫЙ ИОН

Если соляную кислоту в составе ДЖ можно рассматривать как интактную по отношению к метаболическим процессам организма, то при частичном или полном замещении уксусной кислоты в ДЖ кислотой лимонной мы вправе ожидать определенных положительных последствий. При метаболизме, не требующем затрат энергии, 1 ммоль цитрата продуцирует 3 ммоль бикарбоната. При этом метаболизм цитрата адекватен не только при почечной, но и при печеночной недостаточности, что показали исследования цитратной антикоагуляции при лечении больных, находящихся в критических состояниях [5–7]. Положительное влияние цитрата на переносимость физических нагрузок обнаруживалось у здоровых волонтеров [8]. В опытах *in vitro* показано, что цитрат вызывает меньшую активацию комплемента и гранулоцитов в сравнении с ацетатом [9–11], а также снижает выраженность оксидативного стресса [12–14]. Кроме того, с 1914 г. цитрат широко используется в качестве антикоагулянта. Таким образом, при использовании данного иона в составе ДЖ можно закономерно ожидать снижения потребности в антикоагуляции в экстракорпоральном контуре, а также определенной оптимизации метаболических процессов.

В нескольких исследованиях показана возможность редукции доз гепарина при использовании содержащей цитратный ион ДЖ. Так, Sands et al. показали, что снижение дозы гепаринизации на треть при использовании цитратной ДЖ не увеличивает частоты тромбоза экстракорпорального контура и не связано со снижением эффективности диализа [15]. При сравнении безгепаринового диализа с периодической промывкой экстракорпорального контура с диализом, проводимым с цитратной ДЖ, не было отмечено различий в частоте тромботических осложнений [16]. Наиболее обнадеживающие результаты были получены Anioirt et al. При проведении гемодиализации on-line без применения антикоагулянта использование цитратной ДЖ позволило в течение 120 сеансов лечения избежать тромбозов экстракорпорального контура [17]. Умеренный антикоагулянтный эффект цитрата был обнаружен еще в одном исследовании [18]; кроме того, авторы отмечали снижение преддиализных показателей C-реактивного белка и  $\beta_2$ -микроглобулина, отсутствие последиализной гипокальциемии и умеренные концентрации цитратного иона (0,29 ммоль/л при безопасной для регионарной цитратной антикоагуляции концентрации = 0,89 ммоль/л). Снижение концентраций C-реактивного белка и  $\beta_2$ -микроглобулина было отмечено и при использовании цитратной ДЖ для гемодиализации [19]. Kuragano et al. в течение 4 месяцев после перевода 29 пациентов на лечение

диализом с цитратной ДЖ отмечали нормализацию преддиализного уровня бикарбоната у больных с исходно низким его уровнем, снижение потребности в эритропоэстимулирующих препаратах и повышение концентрации альбумина. Все положительные изменения исчезали после возврата пациентов на лечение стандартным диализом с содержащей ацетат ДЖ [20]. Лучшая коррекция КОС при использовании ДЖ на основе лимонной кислоты отмечена в нескольких исследованиях [21–23]. Кроме того, авторы отмечают закономерное снижение последидиализной концентрации ионизированного кальция, и соответственно, определенный рост уровня паратиреоидного гормона. Подобные наблюдения нельзя назвать универсальными, так как в уже упомянутом исследовании Panichi et al. [18], где концентрация кальция в ДЖ составляла 1,5 ммоль/л, гипокальциемия не обнаруживалась. Клинические последствия хелатирующей способности цитрата по отношению к ионам кальция пока не ясны, некоторые авторы высказывают предположение о необходимости пересмотра стандартных концентраций кальция и магния в условиях применения ДЖ на основе лимонной кислоты [21].

### СУКЦИНАТ (ЯНТАРНАЯ КИСЛОТА)

В России в течение нескольких лет промышленно производится кислотный компонент бикарбонатного концентрата, в котором уксусная кислота частично, а в последние годы – полностью замещена янтарной кислотой. При использовании данной прописи концентрата в клинике отмечались снижение преддиализной концентрации натрия и систолического артериального давления наряду с уменьшением междиализной гидратации и выраженности интрадиализной гипотензии; кроме того, наблюдался умеренный рост концентрации гемоглобина. Авторы связывают подобные эффекты с воздействием сукцината на процессы ангиогенеза, что позволяет мобилизовать осмотически неактивные ионы натрия и сделать их доступными для выведения в ходе гемодиализа [24]. К сожалению, опыт использования ДЖ на основе сукцината и публикации на данную тему весьма скудны и ограничены только отечественными источниками.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диализирующая жидкость наряду с диализной мембраной составляют основу системы гемодиализа, определяющую закономерности переноса веществ в ходе сеансов лечения. Однако в то время как изучению свойств диализных мембран и их влиянию на результаты диализной терапии посвящено множество исследований, данные относительно диализной жидкости существенно менее объемны. В определенной степени это можно объяснить широким внедрением

систем централизованной подачи диализных концентратов, при использовании которых клиницисты ограничены, как правило, выбором всего из двух прописей. Тем не менее устранение ацетатного иона из диализата за счет использования соляной кислоты не требует каких-либо изменений существующей практики диализных центров. Учитывая постоянную тенденцию к увеличению возраста и коморбидности диализных пациентов, подобная конверсия представляется весьма актуальной. Отработка показаний к использованию цитратного диализата и определение его оптимального состава требуют дальнейших исследований.

Таким образом, процесс вытеснения ацетатного иона из состава рутинно используемой диализирующей жидкости, начатый с повсеместного отказа от однокомпонентного ацетатного концентрата, продолжается в настоящее время. Для того чтобы сделать это движение более активным и осмысленным, требуется интенсифицировать исследования в данном направлении.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bolasco P, Panichi V, Paletti S, Mancini E. Will there be acetate in dialysis solutions for the foreseeable future? [Article in Italian] *G Ital Nefrol.* 2011; 28 (4): 359–368.
2. Unarokov ZM, Mukhoedova TV, Shuvaeva OV. Comparison of sustained low-efficiency dialysis with acetate-free and acetate-containing bicarbonate dialysate in unstable patients. *Artif Organs.* 2014; 38 (10): 883–888. doi: 10.1111/aor.12251.
3. Pizzarelli F, Cerrai T, Dattolo P, Ferro G. On-line haemodiafiltration with and without acetate. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21 (6): 1648–1651. doi: 10.1093/ndt/gfk093.
4. Mercadal L, Franck JE, Metzger M, Yuan W, Kolko A, Monnet E et al. Improved survival associated with acetate-free haemodialysis in elderly: a registry-based study. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30 (9): 1560–1568. doi: 10.1093/ndt/gfv248.
5. Schultheiß C, Saugel B, Phillip V, Thies P, Noe S, Mayr U et al. Continuous venovenous hemodialysis with regional citrate anticoagulation in patients with liver failure: a prospective observational study. *Crit Care.* 2012; 16 (4): R162. doi: 10.1186/cc11485.
6. Klingele M, Stadler T, Fliser D, Speer T, Groesdonk HV, Raddatz A. Long-term continuous renal replacement therapy and anticoagulation with citrate in critically ill patients with severe liver dysfunction. *Crit Care.* 2017; 21 (1): 294. doi: 10.1186/s13054-017-1870-3.
7. Rodriguez K, Srivaths PR, Tal L, Watson MN, Riley AA, Himes RW et al. Regional citrate anticoagulation for continuous renal replacement therapy in pediatric patients

- with liver failure. *PLoS One*. 2017; 12 (8): e0182134. doi: 10.1371/journal.pone.0182134.
8. Oöpik V, Saaremeets I, Medijainen L, Karelson K, Jansson T, Timpmann S. Effects of sodium citrate ingestion before exercise on endurance performance in well trained college runners. *Br J Sports Med*. 2003; 37 (6): 485–489. doi: 10.1136/bjism.37.6.485
  9. Huang S, Sandholm K, Jonsson N, Nilsson A, Wieslander A, Grundström G et al. Low concentrations of citrate reduce complement and granulocyte activation *in vitro* in human blood. *Clin Kidney J*. 2015; 8 (1): 31–37. doi: 10.1093/ckj/sfu127.
  10. Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. *Trends Mol Med*. 2008; 14 (10): 429–440. doi: 10.1016/j.molmed.2008.08.001.
  11. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE, Lambris JD. The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Mol Immunol*. 2007; 44 (1–3): 82–94. doi: 10.1016/j.molimm.2006.06.020.
  12. Masuda A, Hagiwara S, Tanimoto M, Kodama F, Okumura K, Nohara N et al. Effects of acetate-free citrate dialysate on glycooxidation and lipid peroxidation products in hemodialysis patients. *Nephron Extra*. 2012; 2 (1): 256–268. doi: 10.1159/000342258.
  13. Bryland A, Wieslander A, Carlsson O, Hellmark T, Godaly G. Citrate treatment reduces endothelial death and inflammation under hyperglycaemic conditions. *Diab Vasc Dis Res*. 2012; 9 (1): 42–51. doi: 10.1177/1479164111424297.
  14. Paim BA, Velho JA, Castilho RF, Oliveira HCF, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med*. 2008; 44 (3): 444–51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.10.005
  15. Sands JJ, Kotanko P, Segal JH, Ho CH, Usvat L, Young A et al. Effects of citrate acid concentrate (Citrasate®) on heparin N requirements and hemodialysis adequacy: a multicenter, prospective noninferiority trial. *Blood Purif*. 2012; 33 (1–3): 199–204. doi: 10.1159/000334157.
  16. Cheng YL, Yu AW, Tsang KY, Shah DH, Kjellstrand CM, Wong SM et al. Anticoagulation during haemodialysis using a citrate-enriched dialysate: a feasibility study. *Nephrol Dial Transplant*. 2011; 26 (2): 641–646. doi: 10.1093/ndt/gfq396.
  17. Aniort J, Petitclerc T, Créput C. Safe use of citric acid-based dialysate and heparin removal in postdilution online hemodiafiltration. *Blood Purif*. 2012; 34 (3–4): 336–343. doi: 10.1159/000345342.
  18. Panichi V, Fiaccadori E, Rosati A, Fanelli R, Bernabini G, Scatena A, Pizzarelli F. Post-dilution on line haemodiafiltration with citrate dialysate: first clinical experience in chronic dialysis patients. *Scientific World Journal*. 2013: 703612. doi: 10.1155/2013/703612.
  19. Molina Nuñez M, de Alarcón R, Roca S, Álvarez G, Ros MS, Jimeno C et al. Citrate versus acetate-based dialysate in on-line haemodiafiltration. A prospective crossover study. *Blood Purif*. 2015; 39 (1–3): 181–187. doi: 10.1159/000371569.
  20. Kuragano T, Kida A, Furuta M, Yahiro M, Kitamura R, Otaki Y et al. Effects of acetate-free citrate-containing dialysate on metabolic acidosis, anemia, and malnutrition in hemodialysis patients. *Artif Organs*. 2012; 36 (3): 282–290. doi: 10.1111/j.1525-1594.2011.01349.x.
  21. Schmitz M, Loke O, Fach B, Kalb K, Heering PJ, Meinke D et al. Effects of citrate dialysate in chronic dialysis: a multicentre randomized crossover study. *Nephrol Dial Transplant*. 2016; 31 (8): 1327–1334. doi: 10.1093/ndt/gfv347.
  22. Grundström G, Christensson A, Alquist M, Nilsson LG, Segelmark M. Replacement of acetate with citrate in dialysis fluid: a randomized clinical trial of short term safety and fluid biocompatibility. *BMC Nephrol*. 2013; 14: 216. doi: 10.1186/1471-2369-14-216.
  23. Ortiz Pde S, Ramón MA, Pérez-García R, Prats EC, Cobo PA, Arroyo RA et al. Acute effect of citrate bath on postdialysis alkalaemia. *Nefrologia*. 2015; 35 (2): 164–171. doi: 10.1016/j.nefro.2014.10.001.
  24. Смирнов АВ, Голубев ПВ, Васильев АН, Земченков АЮ, Старосельский КГ. Гемодинамические эффекты содержащего сукцинат диализирующего раствора. *Тер архив*. 2015; 87 (6): 56–61. Smirnov AV, Golubev PV, Vasil'ev AN, Zemchenkov AYU, Starosel'skiy KG. Gemodinamicheskie efekty soderzhashchego suksinat dializiruyushchego rastvora. *Ter arkhiv*. 2015; 87 (6): 56–61. doi: 10.17116/terarkh201587656-61.

Статья поступила в редакцию 17.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 17.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-134-142

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ ЛЕЧЕНИИ МУЖСКОЙ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ

*Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая, В.И. Севастьянов*

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

Сперматогониальные стволовые клетки, которые существуют в семенниках с рождения, являются клетками-предшественниками мужских гамет. Эти клетки не способны продуцировать зрелые сперматозоиды до половой зрелости из-за их зависимости от гормональных стимулов. Эта особенность репродуктивной системы позволяет сохранять фертильность только мужчинам, которые способны производить эякулят. Поэтому при угрозе потери фертильности вследствие применения противоракового лечения стандартным является криоконсервация спермы. Этой возможности лишены неполовозрелые мальчики с онкологическими заболеваниями, которым назначают токсическую для их репродуктивной системы химиотерапию. В настоящем обзоре основное внимание уделяется проблеме получения и сохранения сперматогониальных стволовых клеток для будущей трансплантации с целью восстановления сперматогенеза. Разработка этих методов становится все более актуальной в связи с ростом за последние десятилетия выживаемости детей с онкологическими заболеваниями благодаря улучшению диагностики и эффективности лечения. Восстановление и сохранение фертильности с помощью сперматогониальных стволовых клеток может быть у таких пациентов безальтернативным вариантом.

*Ключевые слова:* сперматогониальные стволовые клетки, фертильность, культивирование клеток.

## PROSPECTS FOR APPLICATION OF SPERMATOGONIAL STEM CELLS IN THE TREATMENT OF MALE INFERTILITY

*N.N. Skaletsky, G.N. Skaletskaya, V.I. Sevastianov*

V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Spermatogonial stem cells, which exist in the testicles since birth, are progenitors cells of male gametes. These cells are not able to produce mature sperm cells before puberty due to their dependency of hormonal stimuli. This peculiarity of the reproductive system limits the preservation of fertility only to males who are able to produce an ejaculate. Therefore, in case of threat of loss of fertility due to the use of anticancer treatment, cryopreservation of sperm is standard. This possibility is denied to deficient boys with cancer, who are prescribed toxic chemotherapy for their reproductive system. This review focuses on the problem of producing and preserving spermatogonial stem cells for the purpose of future transplantation to restore spermatogenesis. The development of these methods is becoming increasingly relevant due to the increase in the survival rate of children with cancer over the past decades due to improved diagnosis and effectiveness of treatment. The restoration and preservation of fertility through the use of spermatogonial stem cells may be an unopposed option in such patients.

*Key words:* spermatogonial stem cells, fertility, cell culture.

### ВВЕДЕНИЕ

Лечение мужского бесплодия является актуальной проблемой, решение которой имеет не только медицинское и психосоциальное значение, но и в

определенной мере способно повлиять на будущее той или иной нации. Правильное понимание патологических процессов, лежащих в основе нарушений фертильности, крайне важно, так как к нарушению

**Для корреспонденции:** Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

**For correspondence:** Skaletskiy Nikolay Nikolaevich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 190-42-66, (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

количественных и качественных параметров спермы приводят различные этиологические факторы и патогенетические механизмы. Согласно статистическим оценкам, более 8% мужчин репродуктивного возраста обращаются за медицинской помощью по поводу бесплодия. Среди половины субфертильных (со сниженной плодовитостью) пар мужской фактор является основной причиной, и примерно у 12% субфертильных мужчин выявляются тяжелые формы олигозооспермии или азооспермии. При олигозооспермии сперматозоиды в сперме мужчины содержатся в меньшем количестве, чем это необходимо для нормального оплодотворения. К снижению количества сперматозоидов в эякуляте могут привести генетические нарушения, воспалительные, эндокринные и инфекционные заболевания, злоупотребление алкоголем и наркотиками, радиация или прием некоторых препаратов с гонадотоксическим побочным эффектом, отравление тяжелыми металлами и углекислым газом. Азооспермия – это отсутствие сперматозоидов в эякуляте. Встречаются два типа данной патологии: обструктивная и необструктивная. При обструктивной азооспермии сперматозоиды не могут попасть в семенную жидкость из-за нарушения проходимости или отсутствия семявыводящих протоков. Поражаться могут также протоки, находящиеся в придатках яичка. К обструкции протоков иногда приводят различные инфекционные и воспалительные заболевания, травмы, варикоцеле или врожденные аномалии строения мочеполовой системы. Необструктивная азооспермия возникает в результате эндокринных и генетических заболеваний, после радиационного облучения, при некоторых нарушениях обмена веществ (сахарный диабет), онкологических заболеваниях. В лечении большинства случаев азооспермии, особенно ее необструктивных форм, генетически обусловленных, могут быть использованы в качестве приоритетных вспомогательные репродуктивные технологии, ставящие своей целью восстановление качественных и количественных параметров спермы или обеспечение процесса созревания сперматозоидов в условиях *ex vivo*. В связи с этим возможность получения зрелых сперматозоидов в необходимом количестве путем манипуляций *in vitro* дает надежду мужчинам с тяжелыми нарушениями сперматогенеза достичь биологического отцовства.

Сперматогониальные стволовые клетки (ССК), которые уже присутствуют при рождении, являются стволовыми клетками семенника [1, 2]. Эти клетки не способны продуцировать зрелые сперматозоиды до половой зрелости, которая наступает на фоне соответствующих гормональных стимулов. Эта биологическая характеристика репродуктивной системы обеспечивает сохранение фертильности только у мужчин, которые способны производить эякулят, потому что стандартной процедурой, как правило,

гарантирующей в будущем реализацию отцовства, является криоконсервация спермы [3–5]. Это возможность становится крайне актуальной у мужчин, подвергшихся токсическому воздействию на их репродуктивную систему химиотерапии и облучения, проводимых по поводу рака, и приводящих к бесплодию [2, 6].

За последние десятилетия показатели выживаемости при онкологических заболеваниях у детей выросли благодаря улучшению диагностики и более эффективному лечению [4]. При этом противораковая терапия зачастую оказывает губительное действие на репродуктивную систему неполовозрелых мальчиков, у которых проведение предварительного консервирования спермы невозможно ввиду ее отсутствия. В настоящее время разрабатываемым вариантом восстановления сперматогенеза после проведения химиотерапии у мальчиков до половой зрелости является криоконсервация ткани семенника для будущего извлечения ССК и их трансплантации. Надежду на успех в этом направлении дают факты восстановления сперматогенеза у животных после трансплантации им ССК [7–11]. Разработка технологии аутологичной трансплантации ССК, способных дифференцироваться в зрелые сперматозоиды, будет иметь большое значение для практической медицины [12]. В результате успешного проведения необходимых исследований по получению, хранению и трансплантации ССК возможность обладать фертильностью станет доступной для неполовозрелых мальчиков с онкологическими заболеваниями [3]. Ниже описываются основы получения (выделения), идентификации и культивирования ССК *in vitro* с целью их пролиферации. Оцениваются перспективы использования ССК для обеспечения фертильности у мальчиков в препубертате.

## ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Как правило, исследования по выделению клеток основываются на их способности к самообновлению [13, 14] и оптимизации процедур, повышающих чистоту получаемых ССК, прежде всего путем недопущения их контаминации другими типами клеток. Как правило, ССК выделяют с помощью ферментативного переваривания, которое обычно включает комбинацию ферментов, таких как коллагеназа, трипсин и ДНКаза [15]. Для получения наиболее чистой популяции ССК были разработаны различные методы, такие как морфологический отбор, связанный с дифференциальным осаждением, отбор внеклеточного матрикса, флюоресцентно-активированная сортировка клеток (FACS) и магнитно-активированная сортировка клеток (MACS).

Селекция ССК с помощью морфологического метода является самой простой и недорогой, однако она имеет самую низкую эффективность [16]. Поскольку этот метод основан на ферментативном выделении клеток с последующим их осаждением в разное время, получающиеся образцы оказываются контаминированными различными типами тестикулярных клеток, такими как клетки Сертоли, клетки Лейдига, миоидные клетки, а также фибробластами [16, 17]. Эти клетки в определенной мере могут выделять факторы роста, гормоны и элементы внеклеточного матрикса и таким образом вмешиваться в самообновление и пролиферацию ССК *in vitro* [17]. Селекция на основе внеклеточного матрикса использует различные внеклеточные белки, такие как ламинин и фибронектин, чтобы стимулировать адгезию ССК. Эти субстраты способны связывать другие компоненты внеклеточного матрикса, и они широко используются в культуре клеток *in vitro* для содействия прикреплению клеток и стимуляции их пролиферации [18]. Поскольку ССК имеют слабый потенциал адгезии, необходимо способствовать их прикреплению путем покрытия субстратами для поддержания их жизнеспособности *in vitro* [18]. Популяция ССК высокой чистоты может быть получена с использованием сортировочных анализов, таких как FACS и MACS. Хотя описанные методы в принципе могут обеспечить клеточную популяцию высокой чистоты, они имеют недостатки из-за ресурсоемкости процедур и технических сложностей, которые нередко приводят к низкой продукции и недостаточной жизнеспособности клеток [15, 18].

Для получения высокочистых клеточных суспензий целесообразно использовать комбинацию различных способов выделения ССК и искать новые методические подходы. Как показал анализ применяемых протоколов, большинство из них предусматривает дифференциальное высевание исходной клеточной суспензии для устранения других типов тестикулярных клеток. Этот метод разделяет клетки в соответствии с их отличительными особенностями прикреплению. Клетки высевают непосредственно в чашки для культуры тканей или чашки с матричным покрытием с использованием желатина, ламинина, фибронектина или коллагена [16, 17]. Недавнее исследование показало эффективное удаление контаминированных клеток и высокой чистоты отбор ССК с использованием двухстадийной очистки. Сначала собранные ССК культивировали на соматических клетках и клетках Сертоли, а после отделения клетки очищали центрифугированием в градиенте плотности бычьего сывороточного альбумина. Этот способ позволил удалить большую часть ненужных клеток, и чистота клеточной суспензии ССК достигла более 91,5% [18].

Учитывая, что основной целью выделения, культивирования и трансплантации ССК является сохранение и восстановление фертильности, а также то, что большинство пациентов, которые получают пользу от трансплантации ССК, в момент биопсии яичек больны раком, необходимо устранить риск повторного введения злокачественных клеток. Достижение высокой чистоты популяций ССК путем определенного сочетания выявленных положительных и отрицательных маркеров отбора следует признать необходимым для исключения злокачественной контаминации (1). Несмотря на это, пока не удалось с достаточной уверенностью идентифицировать комбинацию положительных и отрицательных маркеров для получения чистой суспензии ССК [19]. Однако недавнее исследование показало, что при сочетании CD90 (положительный маркер) и CD45 (отрицательный маркер) суспензия зародышевых клеток оказалась свободной от раковых клеток [12].

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VITRO*

Как и в случае стволовых клеток во многих тканях, доля ССК по сравнению с окружающими соматическими клетками существенно ниже. У мышей ССК, находящиеся в эпителии семенных канальцев, составляют лишь около 0,03% всех клеток семенника [12, 20]. Чтобы получить достаточное для будущей ауто трансплантации количество ССК, нужно искусственно увеличить их массу с учетом того, что объем семенника взрослого мужчины приблизительно в 60 раз больше, чем величина биоптата, взятого у неполовозрелого мальчика. В таблице приведены этапные работы по получению ССК и их трансплантации.

Успешная долгосрочная пролиферация ССК *in vitro* была впервые продемонстрирована у мышей и крыс [21–27]. Показано, что при культивировании количество ССК грызунов может экспоненциально увеличиваться, и они способны сохранять свой биологический потенциал для продуктивного сперматогенеза и восстановления фертильности после пересадки в семенники бесплодных мышей-реципиентов [9, 10, 24–28]. Затем было сообщено о сохранении ССК нечеловеческих приматов путем кратковременного культивирования [29], а несколько групп сообщили как о кратковременном, так и продолжительном культивировании ССК человека, причем как у взрослых мужчин, так и у мальчиков до наступления у них половой зрелости [30–36]. В одном из исследований [30] при культивировании клеток семенников человека в течение 64 дней количество ССК увеличилось более чем в 18 000 раз.

Культуральная система, разработанная для ССК, обычно основана на использовании питательной среды, дополненной гормонами и факторами рос-

Таблица

**Основные достижения в разработке получения ССК *in vitro* с целью их применения для восстановления фертильности**

**Major advances in the development of *in vitro* SSC production for fertility recovery applications**

Год	Авторы	Наиболее значимые исследования	Вид
1971	Huckins	Модель обновления и дифференциации сперматогонии и выявление сперматогониальных стволовых клеток (ССК)	Крыса
1994	Brinster and Avarbock	Первая успешная трансплантация тестикулярных клеток от одной мыши к другой, появление потомства от донора	Мышь
1998	Nagano et al.	Поддержание <i>in vitro</i> ССК в течение 4 месяцев с использованием фидерного слоя из соматических клеток	Мышь
1999	Schlatt et al.	Ксенотрансплантация суспензии тестикулярных клеток, полученных от одного примата, в семенники другого	Обезьяна
2002	Nagano et al.	Первое сообщение об успешной колонизации клеток в мышинных семенниках после ксенотрансплантации человеческих ССК	Человек
2003	Kanatsu-Shinohara et al.	Пролонгированное размножение SSC <i>in vitro</i> с использованием GDNF без иммортализации клеток в культуре	Мышь
2005	Keros et al.	Доказательство успешной криоконсервации биоптатов семенников без снижения их структурной целостности	Человек
2005	Kanatsu-Shinohara et al.	Длительное размножение ССК в среде без сыворотки и фидерного слоя	Мышь
2009	Sadri-Ardekani et al.	Долгосрочное размножение <i>in vitro</i> ССК, полученных из семенников взрослых, с сохранением функциональных возможностей	Человек
2011	Sadri-Ardekani et al.	Долгосрочное размножение ССК, полученных из неполовозрелых семенников, с сохранением их функции	Человек
2012	Hermann et al.	Продуцирование неполовозрелыми макаками, подвергнутыми аутогенной трансплантации ССК, функционально-активной спермы, способной оплодотворять ооциты	Обезьяна
2014	Langenstroth et al.	Разделение соматических и зародышевых клеток для создания культур ССК	Обезьяна
2018	Sharma et al.	Дифференцировка ксенотрансплантированных ССК мартышек в зависимости от пола и фертильности мышей-реципиентов	Обезьяна

та, а также на применении фидерного (питающего) слоя соматических клеток [35]. Ключевым фактором для большинства клеточных культур является эмбриональная сыворотка животных, но она оказалась неблагоприятной для пролиферации ССК [25]. Использовались различные концентрации сыворотки в ростовой среде при культивировании ССК, но ни одна из них не была способна усилить их пролиферацию по сравнению со средой без сыворотки [25]. Для восполнения нехватки гормонов или факторов роста, обеспечиваемых сывороткой, требуется использование очищенных белков и добавок [37]. Некоторые из выявленных факторов роста, необходимых для пролиферации ССК, представляют собой нейротрофический фактор, полученный из линии глиальных клеток (GDNF), и фактор роста фибробластов 2 [14, 26, 38].

Увеличение количества ССК в системе культуры *in vitro* в идеале должно максимально напоминать ситуацию *in vivo* [39]. В условиях *in vivo* существует сложная нишевая среда, где ССК и соматические поддерживающие клетки взаимодействуют для установления необходимой внутриклеточной сигнализации. Был выявлен ряд факторов, которые требуются для

поддержания стволовых клеток. Создание искусственной имитации нишевой среды является весьма непростой задачей, потому что существует множество факторов, которые организуют взаимодействие между ССК и соматическими клетками, и большинство из них недостаточно охарактеризованы. Использование фидерного (питательного) слоя, состоящего из соматических клеток (часто это инактивированные мышинные эмбриональные фибробласты, МЭФ) считается важным для успешного размножения ССК [8, 40]. Рост сперматогоний на фидерном слое может привести к образованию трехмерных агрегатов, называемых кластерами, которые содержат множество типов клеток, включая ССК [41]. С целью увеличения их количества необходимо обеспечить *in vitro* микроокружение, максимально близкое нише ССК в семенниках [13, 39]. Ниша ССК состоит из различных опорных клеток, таких как клетки Сертоли, перитубулярные, миоидные и Лейдига [18]. Однако ферментативная обработка с целью диссоциации ткани и выделения клеток разрушает целостность столь важного микроокружения. Использование фидерного слоя оказывает положительное влияние на поддержание ССК, поскольку содержащиеся в нем клетки

продуцируют факторы роста и цитокины, которые способствуют кондиционированию среды [8, 42–44]. Аналогичным образом фидерный слой (МЭФ) обеспечивает удобную поверхность для присоединения ССК. Как и любой другой тип клеток, они непосредственно зависят от топографии, шероховатости и жесткости субстратов [45, 46]. Применение ряда приемов, улучшающих условия культивирования ССК, позволило обеспечить длительное увеличение пула клеток, полученных из различных штаммов мышей разных возрастных групп. ССК сохраняли недифференцированность в течение 6 месяцев без потери функции и способности к восстановлению нормального сперматогенеза после трансплантации [26]. Однако клиническое применение ССК требует разработки систем культивирования без ксеногенных и фидерных культуральных систем, чтобы избежать патогенной контаминации [47].

### ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В БУДУЩЕМ

С конца 1990-х годов стало возможным восстановление сперматогенеза в моделях на животных. С тех пор достигнут большой прогресс в изучении характерных особенностей сперматогониальных стволовых клеток, возможности поддержания их *in vitro* путем разработки культуральных систем [42, 47, 48].

Для будущего клинического применения человеку культуральная среда предпочтительно не должна содержать сыворотки, полученной от животных из-за возникновения возможных зоонозных или ксенотоксических эффектов. Применение соматических клеток, присутствующих в биоптатах семенников, способствует поддержанию ССК и может позволить обходиться без использования экзогенных клеток, находящихся в фидерном слое. С другой стороны, можно представить, что культивирование в среде, в которой отсутствует сыворотка [49] или некоторые факторы роста [40], может повлиять на функцию ССК и привести к уменьшению их потенциала [44]. Вмешательство в культуральные условия представляет собой «обоюдоострый меч»: с одной стороны, происходит увеличение количества ССК за счет добавления определенных факторов, с другой – возможны нарушения их функциональности из-за этих же добавок. Способность модулировать условия *in vitro*, участвующие в контроле самообновления, в противоположность дифференцировке сперматогониальных стволовых клеток, может привести к продукции функционально-активных гамет *in vitro* [42]. Эта продукция, связанная с методами трансплантации моделей, разработанных на животных, людям, позволит изучать молекулярную и клеточную биологию дифференцировки мужских

зародышевых клеток и даст возможность разрабатывать новые терапевтические стратегии в отношении бесплодия [16, 42].

Возможность восстановления фертильности у мужчин имеет большой потенциал в фундаментальной и прикладной науке [15, 50]. Развитие культуральных методов может дать будущую надежду на сохранение фертильности в случаях без других вариантов, например, у препубертатных пациентов, больных раком. Многие клиники уже криоконсервируют ткань яичек от больных раком мужчин. Однако следует разработать методы для устранения риска повторного введения злокачественных клеток во время трансплантации ССК [2].

Кроме того, различные исследования показали, что ССК способны дифференцироваться в различные типы клеток *in vitro*, такие как кардиомиоциты и нервные клетки. Важно отметить, что эти клетки имеют несколько преимуществ по сравнению с эмбриональными стволовыми клетками, включая отсутствие этических опасений относительно их использования и происхождения, и имеют более низкую частоту туморогенеза и иммунного отторжения. Основываясь на этих предположениях, сперматогониальные стволовые клетки могут быть одним из наиболее перспективных кандидатов для клинических применений в области клеточной терапии [23].

Как уже было указано выше, размер биоптата, который может быть получен из семенников мальчиков в препубертате, относительно мал и может содержать небольшое количество ССК. Количество ССК, которое потребуется для регенерации сперматогенеза и достижения фертильности у человека, пока еще точно не известно, но разумно предположить, что количество ССК должно быть существенно увеличено в культуре перед трансплантацией для обеспечения надежного приживания и результативного сперматогенеза. Каждая группа исследователей, сообщающая о культуре ССК человека, использовала различные методы для выделения клеток и их культивирования, различные питательные среды и матричные субстраты [51, 52], различные наборы факторов роста и различные методы оценки полученных результатов. До недавнего времени ни один метод получения культур человеческих ССК не был независимо тиражирован другой исследовательской группой, и это должно произойти для подтверждения истинного успеха и достижения реального прогресса [19]. Кроме того, в то время как трансплантация ССК с целью регенерации сперматогенеза с использованием функционально-активных сперматозоидов и получения потомства является «золотым стандартом» оценки качества полученных ССК грызунов, не существует эквивалентного анализа ССК человека. Молекулярные маркеры и ксенотрансплантация между людьми и мышами могут быть разумными

суррогатными анализами, но пока нет согласования с научным сообществом, которое бы позволило проводить эксперименты с ССК человека. Возможно, осуществление морфогенеза яичек *de novo* и/или использование децеллюляризованных семенников помогут создать полноценную модель сперматогенеза человека и провести необходимые эксперименты.

В определенной степени обобщая описанные в настоящем обзоре многочисленные исследования, посвященные изучению профилактики и лечения мужской инфертильности, можно показать их в виде небольшой схемы (рис.) и комментария к ней, которые представлены ниже [25].

А. Сперматозоиды, полученные из эякулированной спермы или путем экстракции сперматозоидов (TESE) из семенников инфертильных мужчин, могут быть использованы для достижения беременности путем внутриматочного оплодотворения (IUI), оплодотворения *in vitro* (ЭКО) или ЭКО с интрацитоплазматической инъекцией спермы (ICSI).

В. При невозможности получения сперматозоидов путем биопсии может быть получена ткань яичка, содержащая сперматогониальные стволовые клетки (SSC). Ткань яичка можно переваривать ферментами для получения клеточной суспензии, из которой благодаря культивированию может быть получено значительное количество ССК, которые, в свою очередь, могут быть трансплантированы в семенники пациента. Этот способ способен регенерировать сперматогенез, и возможно, естественную фертильность. Гетерогенные суспензии тестикулярных клеток также обладают потенциалом для морфогенеза яичек *de novo* с семенными канальцами и поляризованным эпителием, окруженным базальной мембраной с зародышевыми клетками внутри и интерстициальными клетками снаружи канальцев. Сперма, генерируемая в «перестроенных» семенниках, может быть использована для оплодотворения яйцеклеток путем ICSI. Интактные ткани семенников от препубертатных животных могут быть ауто- или ксенотранспланти-

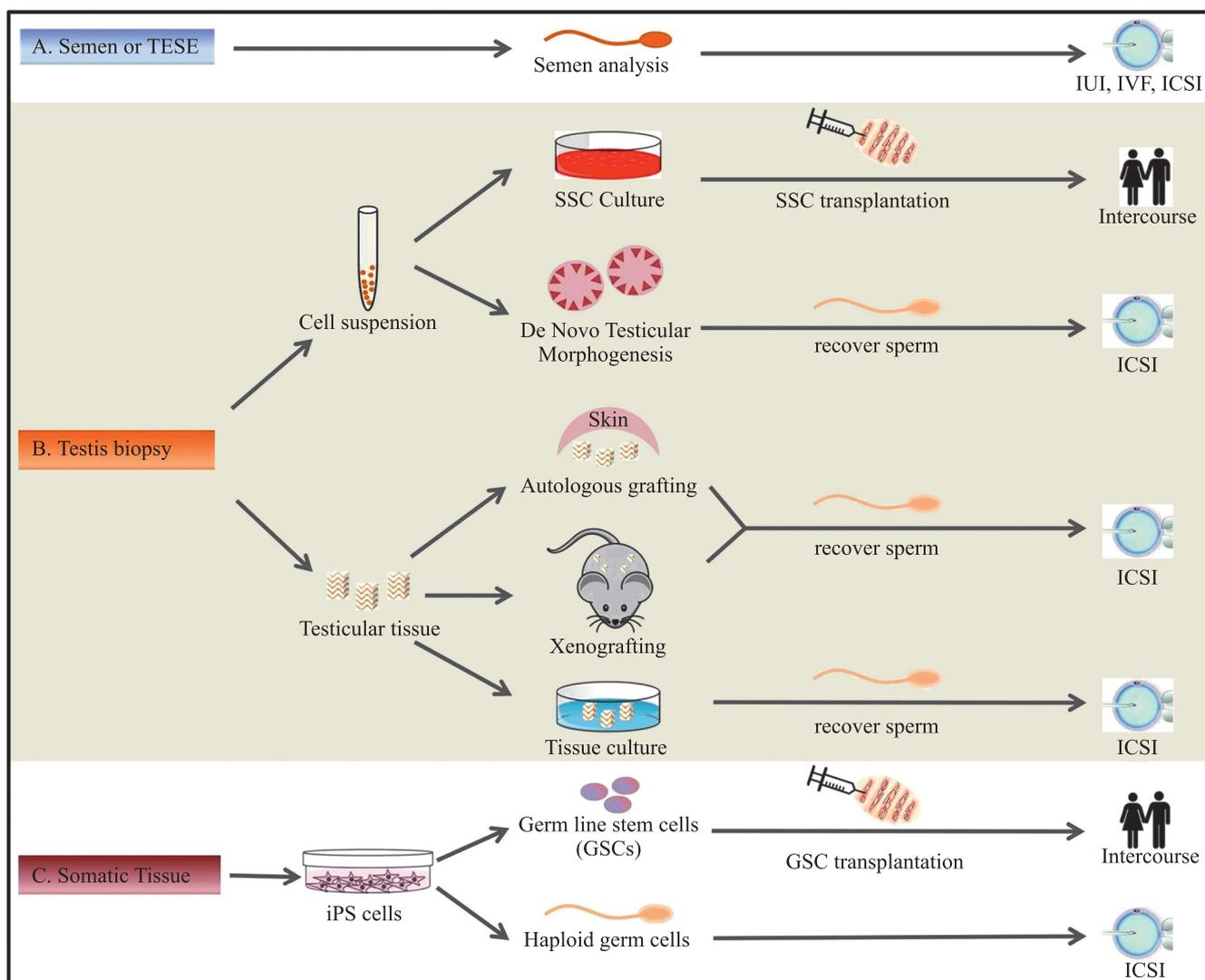


Рис. Стандартные и экспериментальные варианты лечения мужского бесплодия (по K. Gassei, K.E. Orwig, 2015)

Fig. Standard and experimental treatment options for male infertility (by K. Gassei, K.E. Orwig, 2015)

рованы под кожу или в мошонку и продуцировать зрелую сперму, которая может быть использована для оплодотворения яйцеклеток с помощью ICSI. Сперма может также генерироваться, когда незрелые ткани яичка сохраняются в культуре и используются для оплодотворения яйцеклеток с помощью ICSI.

С. Специфичные для пациента индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) могут быть получены из соматических тканей пациента (например, кожи или крови) и дифференцированы в зародышевые стволовые клетки (GSC) для дальнейшего их введения в семенники пациента. Этот способ может иметь потенциал для регенерации сперматогенеза и естественной фертильности. Также возможно дифференцировать клетки iPS в сперматозоиды, которые можно использовать для оплодотворения яйцеклеток путем ICSI.

По-видимому, существенную роль в инициации и поддержке научных исследований, посвященных профилактике и лечению мужской инфертильности, может сыграть помощь со стороны социальных сил. Общество начинает осознавать пользу от сохранения фертильности у детей и подростков, страдающих от онкологических заболеваний и подвергающихся гонадотоксической химиотерапии, а также имеющих серьезные нарушения сексуального развития [53]. Предпринимаются определенные усилия по созданию многопрофильных общественных групп для оказания помощи в разработке исследований по сохранению фертильности у детей, оценке соответствующих этических вопросов и необходимых материальных затрат. В частности, создан консорциум «Онкофертильность», целью которого является оказание помощи медицинским работникам в разработке соответствующих программ в учреждениях, не имеющих службы, занимающейся вопросами сохранения фертильности у детей [54].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hermann BP, Sukhwani M, Salati J, Sheng Y, Chu T, Orwig KE. Separating spermatogonia from cancer cells in contaminated prepubertal primate testis cell suspensions. *Hum Reprod.* 2011; 26 (12): 3222–3231.
- Struijk RB, Mulder CL, Veen van der F, Pelt van AM, Repping S. Restoring fertility in sterile childhood cancer survivors by autotransplanting spermatogonial stem cells: are we there yet? *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 903142. Published online 2013 Jan 3. doi: 10.1155/2013/903142.
- Berg van den H, Repping S, Veen van der F. Parental desire and acceptability of spermatogonial stem cell cryopreservation in boys with cancer. *Hum Reprod.* 2007; 22 (2): 594–597.
- Ginsberg JP. Educational paper: the effect of cancer therapy on fertility, the assessment of fertility and fertility preservation options for pediatric patients. *Eur J Pediatr.* 2011; 170 (6): 703–708.
- Linkeviciute A, Boniolo G, Chiavari L, Peccatori FA. Fertility preservation in cancer patients: the global framework. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40 (8): 1019–1027.
- Green DM, Kawashima T, Stovall M, Leisenring W, Sklar CA, Mertens AC et al. Fertility of male survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 2010; 28 (2): 332–339.
- Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol.* 1997; 41 (1): 111–122.
- Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell.* 1998; 30 (4): 389–397.
- Камалов АА, Сухих ГТ, Курпатовский ВИ, Зарайский ЕИ, Полтавцева ПА, Плотников ЕЮ и др. Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных стволовых и прогениторных клеточных культур при двустороннем абдоминальном крипторхизме. *Урология.* 2008; 6: 4–7. Kamalov AA, Sukhikh GT, Kirpatovskiy VI, Zarayskiy EI, Poltavtseva PA, Plotnikov EYu i dr. Osobennosti regeneratsii testikulyarnoy tkani i vosstanovlenie fertil'nosti u krys na fone ksenotransplantatsii obogashchennykh stvolovykh i progenitornykh kletochnykh kul'tur pri dvustoronnem abdominal'nom kriptorkhizme. *Urologiya.* 2008; 6: 4–7.
- Камалов АА, Сухих ГТ, Курпатовский ВИ, Зарайский ЕИ, Полтавцева ПА, Плотников ЕЮ и др. Особенности регенерации тестикулярной ткани и восстановление фертильности у крыс на фоне ксенотрансплантации обогащенных фетальных клеточных культур при двустороннем абдоминальном крипторхизме. *Урология.* 2008; 6: 7–11. Kamalov AA, Sukhikh GT, Kirpatovskiy VI, Zarayskiy EI, Poltavtseva PA, Plotnikov EYu i dr. Osobennosti regeneratsii testikulyarnoy tkani i vosstanovlenie fertil'nosti u krys na fone ksenotransplantatsii obogashchennykh fetal'nykh kletochnykh kul'tur pri dvustoronnem abdominal'nom kriptorkhizme. *Urologiya.* 2008; 6: 7–11.
- Курпатовский ВИ, Кудрявцев ГЮ, Кудрявцева ЛВ, Фролова ЕВ. Восстановление нарушенного сперматогенеза после интратестикулярной трансплантации ткани неонатального яичка. *Экспериментальная и клиническая урология.* 2018; 4: 15–21. Kirpatovskiy VI, Kudryavtsev GYu, Kudryavtseva LV, Frolova EV. Vosstanovlenie narushennogo spermatogeneza posle intratestikulyarnoy transplantatsii tkani neonatal'nogo yaichka. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya urologiya.* 2018; 4: 15–21.
- Smith JF, Yango P, Altman E, Choudhry S, Poelzl A, Zama AM et al. Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3 (9): 1043–1054.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M. Spermatogenic cells of the prepuber-

- tal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1977; 74 (1): 68–85.
14. Brinster RL, Avarbock MR. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91 (24): 11303–11307.
  15. Aponte PM. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2015; 7 (4): 669–680.
  16. Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction.* 2014; 147 (3): R65–R74.
  17. Kubota H, Brinster RL. Technology Insight: *In vitro* culture of spermatogonial stem cells and their potential therapeutic uses. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2 (2): 99–108.
  18. He BR, Lu F, Zhang L, Hao DJ, Yang H. An alternative long-term culture system for highly-pure mouse spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol.* 2015; 230 (6): 1365–1375.
  19. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. *Semin Reprod Med.* 2013; 31 (1): 39–48. Review.
  20. Youn H, Kim SH, Choi KA, Kim S. Characterization of Oct4-GFP spermatogonial stem cell line and its application in the reprogramming studies. *J Cell Biochem.* 2013; 114 (4): 920–928.
  21. Lim JJ, Seol DW, Choi KH, Shin DH, Kim HJ, Song SH et al. Spermatogonial stem cell enrichment using simple grafting of testis and *in vitro* cultivation. *Sci Rep.* 2014; 4.
  22. Tegelenbosch RAJ, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research.* 1993; 290 (2): 193–200.
  23. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction.* 2003; 69 (2): 612–616.
  24. Gassei K, Kyle E, Orwig. Experimental Methods to Preserve Male Fertility and Treat Male Infertility. *Fertil Steril.* 2016 Feb; 105 (2): 256–266.
  25. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 16489–16494.
  26. Hamra FK, Chapman KM, Nguyen DM, Williams-Stephens AA, Hammer RE, Garbers DL. Self renewal, expansion, and transfection of rat spermatogonial stem cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 17430–17435.
  27. Ryu BY, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102: 14302–14307.
  28. Langenstroth D, Kossack N, Westernströer B, Wistuba J, Behr R, Gromoll J, Schlatt S. Separation of somatic and germ cells is required to establish primate spermatogonial cultures. *Human Reproduction.* 2014; 29: 2018–2031.
  29. Chen B, Wang YB, Zhang ZL, Xia WL, Wang HX, Xiang ZQ et al. Xenon-free culture of human spermatogonial stem cells supported by human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells. *Asian journal of andrology.* 2009; 11: 557–565.
  30. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M et al. Propagation of human spermatogonial stem cells *in vitro*. *JAMA: The journal of the American Medical Association.* 2009; 302: 2127–2134.
  31. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 21672–21677.
  32. He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod.* 2010; 82: 363–372.
  33. Kokkinaki M, Djourabtchi A, Golestaneh N. Long-term culture of human ssea-4 positive spermatogonial stem cells *Journal of stem cell research and therapy.* 2011; S2: 003.
  34. Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E.* 2011; 9: 141.
  35. Nowroozi MR, Ahmadi H, Rafiian S, Mirzapour T, Movahedin M. *In vitro* colonization of human spermatogonia stem cells: Effect of patient's clinical characteristics and testicular histologic findings. *Urology.* 2011; 78: 1075–1081.
  36. Aoshima K, Baba A, Makino Y, Okada Y. Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. *PLoS One.* 2013; 8 (10).
  37. Kubota H, Brinster RL. Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol.* 2008; 86: 59–84.
  38. Ryu BY, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Dev Biol.* 2003; 263: 253–263.
  39. Ebata KT, Yeh JR, Zhang X, Nagano MC. Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors *in vitro*. *Experimental Cell Research.* 2011; 317 (10): 1319–1329.
  40. Mirzapour T, Movahedin M, Tengku Ibrahim TA, Koruji M, Haron AW, Nowroozi MR, Rafieian SH. Effects of basic fibroblast growth factor and leukaemia inhibitory factor on proliferation and short-term culture of human spermatogonial stem cells. *Andrologia.* 2012; 44: 41–55.
  41. Sadri-Ardekani H, Akhondi MA, van der Veen F, Repping S, van Pelt AMM. *In vitro* propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *The Journal of the American Medical Association.* 2011; 305 (23): 2416–2418.
  42. Guo Y, Hai Y, Gong Y, Li Z, He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol.* 2014 Apr; 229 (4): 407–413. doi: 10.1002/jcp.24471.
  43. Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL. Maintenance of mouse male germ line stem cells *in vitro*. *Biology of Reproduction.* 2003; 68 (6): 2207–2214.

44. Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Ishii K, Shinohara T. Dynamic changes in EPCAM expression during spermatogonial stem cell differentiation in the mouse testis. *PLoS One*. 2011; 6 (8): e23663.
45. Li Z, Leung M, Hopper R, Ellenbogen R, Zhang M. Feeder-free self-renewal of human embryonic stem cells in 3D porous natural polymer scaffolds. *Biomaterials*. 2010; 31(3): 404–412.
46. Lü D, Luo C, Zhang C, Li Z, Long M. Differential regulation of morphology and stemness of mouse embryonic stem cells by substrate stiffness and topography. *Biomaterials*. 2014; 35 (13): 3945–3955.
47. Nagano MC. Techniques for culturing spermatogonial stem cells continue to improve. *Biol Reprod*. 2011; 84 (1): 5–6.
48. Galuppo AG. Spermatogonial stem cells as a therapeutic alternative for fertility preservation of prepubertal boys. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015 Oct–Dec; 13 (4): 637–639. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3456.
49. Creemers LB, den Ouden K, van Pelt AMM, de Rooij DG. Maintenance of adult mouse type A spermatogonia *in vitro*: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. *Reproduction*. 2002; 124 (6): 791–799.
50. Sharma S, Wistuba J, Pock T, Schlatt S, Neuhaus N. Spermatogonial stem cells: updates from specification to clinical relevance. *Hum Reprod Update*. 2019 May 1; 25 (3): 275–297. doi: 10.1093/humupd/dmz006.
51. Камалов АА, Кирпатовский ВИ, Охоботов ДА, Ефименко АЮ, Макаревич ПИ, Сагарадзе ГД и др. Использование нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимальных стволовых клеток человека и коллагена для восстановления сперматогенеза на модели экспериментального крипторхизма. *Технологии живых систем*. 2017; 14 (1): 4–17. Kamalov AA, Kirpatovskiy VI, Okhobotov DA, Efimenko AYU, Makarevich PI, Sagaradze GD i dr. Ispol'zovanie novogo biomateriala na osnove produktov sekretsii mezenkhimal'nykh stvolovykh kletok cheloveka i kollagena dlya vosstanovleniya spermatogeneza na modeli eksperimental'nogo kriptorkhizma. *Tekhnologii zhivyykh sistem*. 2017; 14 (1): 4–17.
52. Del Vento F, Vermeulen M, de Michele F, Giudice MG, Poels J, des Rieux A, Wyn C. Tissue engineering to improve immature testicular tissue and cell transplantation outcomes: one step closer to fertility restoration for prepubertal boys exposed to gonadotoxic treatments. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan; 19 (1): 286. Published online 2018 Jan 18. doi: 10.3390/ijms19010286.
53. Johnson EK, Finlayson C, Rowell EE, Gosiengfao Y, Pavone ME, Lockart B et al. Fertility Preservation for Pediatric Patients: Current State and Future Possibilities. *J Urol*. 2017 Jul; 198 (1): 186–194. doi: 10.1016/j.juro.2016.09.159. Epub 2017 Feb 9.
54. Moravek MB, Appiah LC, Anazodo A, Burns KC, Gomez-Lobo V, Hoefgen HR et al. Development of a Pediatric Fertility Preservation Program: A Report From the Pediatric Initiative Network of the Oncofertility Consortium. *J Adolesc Health*. 2019 May; 64 (5): 563–573. doi: 10.1016/j.jadohealth.2018.10.297. Epub 2019 Jan 14.

Статья поступила в редакцию 4.10.2019 г.  
The article was submitted to the journal on 4.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-143-146

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ EX VIVO ПЕРФУЗИИ ДОНОРСКИХ СЕРДЕЦ

*М.О. Жульков, А.В. Фомичев, С.А. Альсов, Е.Н. Кливер, А.М. Чернявский*

Центр хирургии аорты, коронарных и периферических артерий,  
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина»  
Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

Больные с терминальной сердечной недостаточностью, рефрактерной к медикаментозной терапии, являются тяжелой категорией кардиологических больных. Многочисленные исследования доказали наибольшую эффективность трансплантации сердца по сравнению с другими методами лечения терминальной стадии хронической сердечной недостаточности. Однако несмотря на десятилетия развития трансплантологии, вопрос нехватки донорских органов остается открытым. Единственным способом сократить нехватку донорских органов является использование доноров с расширенными критериями, что требует использования самых последних технологий в области реанимации и кондиционирования органов.

*Ключевые слова: сердечная недостаточность, трансплантация сердца, перфузия ex vivo.*

## CURRENT STATE OF THE PROBLEM AND RESULTS OF EX VIVO PERFUSION OF DONOR HEARTS

*M.O. Zhulkov, A.V. Fomichev, S.A. Alsov, E.N. Cleaver, A.M. Chernyavsky*

Center for Surgery of Aorta, Coronary and Peripheral Arteries, Federal State Budgetary Institution  
Scientific Research Center named after ac. E.N. Meshalkina, Ministry of Health of the Russian Federation,  
Novosibirsk, Russian Federation

Patients with terminal heart failure refractory to drug therapy are a severe category of cardiological patients. Numerous studies have proven the greatest efficacy of heart transplantation compared to other treatments for the terminal stage of chronic heart failure. However, despite decades of the development of transplantology, the issue of shortage of donor organs remains open. The only way to reduce the shortage of donor organs is to use donors with advanced criteria, which requires the use of the latest technologies in the field of resuscitation and conditioning of organs.

*Key words: heart failure, heart transplantation, ex vivo perfusion.*

На протяжении последних 15 лет сердечная недостаточность остается основной причиной смерти во всем мире. Этим заболеванием страдают 1–2% всей популяции, а риск развития у людей старше 55 лет составляет 33 и 28% соответственно у мужчин и женщин [1]. В свете роста ожидаемой продолжительности жизни во всем мире и при сохраняющихся факторах риска, таких как артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца, прогнозируемая распространенность сердечной недостаточности до 2030 года возрастет на 46%, и следовательно, будет оставаться основной причиной смерти [2].

Несмотря на более чем полувековой период исследований в области лечения хронической сердечной

недостаточности, включающий разработки различных устройств вспомогательного кровообращения, терапию стволовыми клетками и т. д., не существует метода лечения, сопоставимого по эффективности с пересадкой донорского человеческого сердца [3]. Трансплантация сердца является «золотым стандартом» лечения пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности. К сожалению, ахиллесовой пятой этого метода лечения была и остается острая нехватка донорских органов. Так, по причине, связанной с нехваткой донорских органов, число пересадок сердца, выполненных в Соединенном Королевстве (Великобритания) и многих западных странах, резко упало за последние десятилетия.

**Для корреспонденции:** Жульков Максим Олегович. Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, д. 15.  
Тел. (906) 909-05-05. E-mail: maks.zhulkov.92@mail.ru

**For correspondence:** Zhulkov Maxim Olegovich. Address: 15, Rechkunovskaya str., Novosibirsk, 630055, Russian Federation.  
Tel. (906) 909-05-05. E-mail: maks.zhulkov.92@mail.ru

При этом количество пациентов в листе ожидания продолжает расти [4].

В Великобритании из приблизительно 750 000 пациентов, нуждающихся в трансплантации сердца, только 0,02% получают ее. Вследствие этого несоответствия между возможностью и потребностью почти 10% пациентов в листе ожидания продолжают ежегодно погибать [3]. По данным отчета Канадского института медицинской информации, за последние 10 лет в Канаде годовая смертность пациентов, ожидающих трансплантации сердца, составила 16% [5].

Первая успешная клиническая пересадка сердца была проведена с органом, пожертвованным после смерти от остановки кровообращения в 1967 г. Кристианом Барнардом и его командой в больнице Groote Schuur [6]. В ту эпоху (до установления критериев смерти мозга) пересадка сердца могла быть проведена только при условии нахождения донора и реципиента в непосредственной близости друг от друга. Введение термина «смерть мозга» на законодательном уровне позволило выполнять дистанционный забор донорских органов. При этом на протяжении многих лет использование сердец доноров, умерших от остановки кровообращения, было прекращено.

Однако некоторое время спустя к идее использования подобных органов с целью пересадки стали возвращаться. Для удовлетворения потребности донорскими органами хирурги были вынуждены расширять критерии забора донорских органов, в частности за счет использования органов, полученных от доноров, умерших от остановки кровообращения или имеющих эпизод асистолии. В литературе такие донорские органы называют «органами, полученными от доноров с расширенными критериями», «органы, полученные от доноров с необратимой остановкой сердечной деятельности» или «органы от асистолических доноров».

Стратегия, направленная на сокращение потребности донорских органов за счет использования трансплантатов от пациентов с расширенными критериями, доказала свою безопасность и была оформлена в виде протоколов в соответствии с национальными и международными нормативами в Австралии, Бельгии, Нидерландах, Испании, Великобритании и США. По данным G. Citerio et al., восстановление *ex vivo* маргинального донорского органа позволит увеличить донорский пул на 15–30% [7,8].

Использование подобного пула доноров стало возможным благодаря значительному прогрессу в области реанимации и кондиционирования донорских органов, в частности благодаря развитию систем перфузии органов, позволяющих решить целый ряд трудных задач, таких как оценка функционального статуса трансплантата, время ишемии, проблемы логистики доставки от донора к реципиенту.

Основной проблемой использования сердец доноров после смерти от остановки кровообращения

является время тепловой ишемии, а также необходимость сохранять жизнеспособность миокарда во время транспортировки. Несмотря на то что фармакологическая кардиопротекция является стандартом консервации донорских органов, уже через четыре часа функция трансплантата может быть скомпрометирована длительным ишемическим периодом, особенно у пациентов старшей возрастной группы [9].

Этот способ консервации органов является наибольшим фактором риска для первичной дисфункции аллотрансплантата и смерти [10, 11]. Увеличение времени холодовой ишемии с 3 до 6 часов удваивает риск смерти через 1 год после трансплантации по сравнению с 50% снижением прогнозируемой смертности через 1 год, в случае если период ишемии составляет менее 1 часа [12]. Эти данные подтвердили и американские ученые, доказав, что сокращение ишемического времени на 1 час увеличивает выживаемость на 2,2 года [13]. По данным J. Kobashigawa et al., ишемия, превышающая 4 часа, значительно увеличивает риск первичной дисфункции трансплантата, которая связана с 8% смертностью через 30 дней и повышенной смертностью через 5 и 15 лет после трансплантации [14].

Использование расширенных критериев для забора донорских органов хотя и позволяет увеличить доступность трансплантаций сердца, одновременно может сопровождаться рядом осложнений [15]. Поэтому стало очевидным, что расширение критериев забора органов требует использования альтернативных, более физиологичных способов кондиционирования. Теплая перфузия сердца *ex vivo* является альтернативным методом сохранения трансплантата, позволяющим улучшить функцию донорского органа, расширить пул доноров, пренебрегая временем, необходимым на транспортировку органа от донора к реципиенту [16].

Система TransMedics (Массачусетс) (СТМ) является первым коммерчески доступным устройством для транспортировки донорского сердца в нормотермическом перфузионном состоянии. Перфузат представляет собой запатентованный раствор для заливки с добавлением инсулина, антибиотика, метилпреднизолона, бикарбоната натрия, поливитаминов и свежей донорской крови [3].

В ряде исследований было доказано преимущество нормотермической перфузии *ex vivo* перед гипотермической консервацией донорских сердец. При этом важно отметить, что толерантность к тепловой ишемии донорских сердец, пожертвованных после остановки кровообращения, выше, чем у сердец от доноров со смертью мозга [17]. СТМ может быть успешно использована для оценки функциональных возможностей органов с «расширенными критериями», доноров сердец с низкой фракцией выброса левого желудочка, предшествующей остановкой сердца, длительной прогнозируемой ишемией (>4 ча-

сов) и неизвестным статусом коронарного русла из-за отсутствия коронарной ангиографии до этапа имплантации, что позволяет избежать потенциального риска опасных осложнений и смерти для реципиентов [18, 19].

Результаты Heart EXPAND Trial показали, что 75 из 93 донорских сердец, перфузированные системой TransMedics, были успешно трансплантированы, в результате чего коэффициент использования составил 81%. Среднее время перфузии OCS составило 6,35 часа. 30-дневная и 6-месячная выживаемость составили 94,7 и 88% соответственно [20].

Применение СТМ позволяет решить еще одну очень важную проблему, сокращающую донорский пул, – проблему логистики доставки органа реципиенту. Так, по разным оценкам, около 60% потенциальных аллотрансплантатов считаются не подходящими для пересадки по разным причинам, в том числе из-за невозможности скорейшей доставки органа реципиенту [21]. В США только 30–35% донорских сердец используются для трансплантации из-за ограничений по хранению с использованием стандартной фармакохолодовой защиты.

СТМ позволяет продлить время нахождения донорского органа вне тела минимум до 8 часов, расширяя потенциальную географию донорских баз, также позволяет проводить ангиографию донорского органа в системе, что особенно актуально для доноров старшей возрастной группы. Так, в 2015 году в Австралии донорское сердце было успешно пересажено через 10,5 часа перфузии СТМ. Теоретически в Великобритании это позволило бы международный обмен органами с Европой и восточной частью Соединенных Штатов Америки. Подобное расширение донорского пула является одним из основных потенциальных преимуществ устройства СТМ [22].

В 2018 году Rymbay Kaliyev et al. сообщили об успешной 16-часовой перфузии донорского сердца с последующей успешной трансплантацией реципиенту. Система поддержки донорского органа TransMedics позволила транспортировать орган на расстояние 500 км по железной дороге, в связи с плохими погодными условиями и невозможностью использовать воздушный транспорт [23].

Использование СТМ командой трансплантологов позволяет устранить срочность, связанную с желанием сократить период ишемии, а также избежать опасного высокоскоростного трафика команды, ранее связанного с серьезными травмами и смертельными случаями среди членов команды [3].

С каждым годом число случаев использования систем *ex vivo* перфузии растет. В исследовании Diana García S. MD. et al. тридцать сердец были сохранены с помощью СТМ в период с февраля 2013 года по январь 2014 года, 26 из которых (86,7%) были пересажены. Все эти процедуры трансплантации были классифицированы как процедуры высокого риска,

по причине длительного времени транспортировки – более 2,5 часа с расчетным временем ишемии дольше 4 часов, фракции выброса левого желудочка меньше чем 50%, гипертрофии левого желудочка, доноров после остановки сердца, доноров, злоупотреблявших алкоголем/наркотиками, ишемической болезни сердца или повышенного сопротивления легочных сосудов. По данным за 2015 год, система для транспортировки донорских органов была использована при проведении 246 ортотопических пересадок сердца по всему миру [3].

М.А. Quader et al. не было обнаружено различий в результатах при пересадке сердец с хорошей функцией левого желудочка при использовании системы для транспортировки донорских органов TransMedics и с использованием стандартной фармакохолодовой защиты в случаях суммарного периода ишемии до 2 часов. Тем не менее аллотрансплантаты с более длительным временем ишемии демонстрировали худшую функцию левого желудочка и повышенный уровень тропонина. Оценка функционального статуса органа *ex vivo* в сочетании с уменьшением времени холодовой ишемии минимизирует риск первичной дисфункции аллотрансплантата и потенциально увеличивает донорский пул [24].

По данным J.M. Tikkanen et al., долгосрочная выживаемость, улучшение качества жизни и функция трансплантата сопоставимы среди реципиентов, перенесших пересадку сердца, пережившего фармакохолодовую ишемию и тепловую перфузию *ex vivo* [25]. Vipin Mehta et al. продемонстрировали, что 30-дневная выживаемость реципиентов, получивших сердце после реперфузии *ex vivo*, составила 100% и 90-дневная выживаемость составила 86%. Этот результат сопоставим с результатами, опубликованными S. Messer et al., по их данным, 30-дневная и 90-дневная выживаемость составила 100 и 93% соответственно [26]. По данным Joshua L. Chan, MD et al., не было зафиксировано существенной разницы в 2-летней выживаемости между группами пациентов, перенесших трансплантацию сердца после перфузии *ex vivo*, и сердец, переживших фармакохолодовую ишемию. Двухлетняя выживаемость реципиентов составила 72,2 и 81,6% соответственно (p 0,38) [27].

Однако широкое использование СТМ ограничивается высокой стоимостью этой системы. В Великобритании Национальный институт здравоохранения сообщает, что стоимость одноразового перфузионного комплекта СТМ составляет около £ 30 000 [28]. Следует отметить, что эта смета включает только стоимость аппарата и не учитывает стоимости дополнительных расходных средств. При этом необходимо учитывать, что примерно 10–20% средств будет затрачиваться на сердца, признанные впоследствии не пригодными к трансплантации. Тем не менее, по данным Vipin Mehta et al., пересадка сердца от доноров после остановки кровообращения и использования

перфузии *ex vivo* может привести к 23% увеличению активности трансплантации сердца и должна быть принята в большем числе учреждений по всему миру [29].

Авторы заявляют об отсутствии

конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- World Health Organization. World Health Statistics 2016: Monitoring Health for the SDGs Annex B: Tables of Health Statistics by Country, WHO Region and Globally [Internet]. 2016.
- Heidenreich PA, Albert NM, Allen LA, Bluemke DA, Butler J, Fonarow GC et al. Forecasting the impact of heart failure in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circ Heart Fail.* 2013; 6: 606–619.
- Messer S, Ardehali A, Tsui S. Normothermic donor heart perfusion: current clinical experience and the future. *Transplant International.* 2015; 28 (6): 634–642.
- Blood N.H.S. Transplant. Organ Donation and Transplantation activity figures for the UK as at 12 April 2013. – 2014.
- Canadian Institute for Health Information. Canadian Organ Replacement Register Annual Report: Treatment of End-Stage Organ Failure in Canada, 2004 to 2013. Ottawa, ON: Canadian Institute for Health Information; (2015).
- Barnard CN. Human cardiac transplant: An interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *South African Medical Journal.* 1967; 41 (48): 1271–1274.
- Rudge C, Matesanz R, Delmonico FL, Chapman J. International practices of organ donation. *Br J Anaesthesia.* 2012; 108 (S1): i48–i55.
- Citerio G, Cypel M, Dobb GJ et al. Organ donation in adults: a critical care perspective. *Intensive Care Med.* 2016; 42: 305–315.
- Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S et al. Task Force 1: peri-operative care of the heart transplant patient. In: the International Society of Heart and Lung Transplantation guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010 Aug; 29 (8): 915–926.
- Banner NR, Thomas HL, Curnow E et al. The importance of cold and warm cardiac ischemic for survival after heart transplantation. Steering Group of the United Kingdom Cardiothoracic.
- Transplant Audit. *Transplantation.* 2008; 86: 542–547.
- Russo MJ, Iribarne A, Hong KN et al. Factors associated with primary allograft failure after heart transplantation. *Transplantation.* 2010; 90: 444–450.
- Hertz MI, Aurora P, Christie JD et al. Scientific Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: introduction to the 2009 annual reports. *J Heart Lung Transplant.* 2009; 28: 989–992.
- Schnitzler MA, Hauptman PJ, Takemoto SK et al. The impact of cold ischaemia time on life year benefit of heart transplantation. *Am J Transplant.* 2006; 6: 382.
- Kobashigawa J, Zuckermann A, Macdonald P et al. Consensus Conference Participants. Report from a consensus conference on primary graft dysfunction after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2014; 33: 327–340.
- Sáez DG et al. Evaluation of the organ care system in heart transplantation with an adverse donor/recipient profile. *The Annals of thoracic surgery.* 2014; 98 (6): 2099–2106.
- Del Riozz DF, Menkis AH, Pflugfelder PW, Novick RJ, McKenzie FN, Boyd WD, Kostul WJ. The role of donor age and ischemic time on survival following orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 1999; 18: 310–319.
- Iyer A, Gao L, Doyle A et al. Normothermic *ex vivo* perfusion provides superior preservation and enables viability assessment of hearts from DCD donors. *Am J Transplant.* 2015; 15: 371–380.
- Zaroff JG, Rosengard BR, Armstrong WF et al. Consensus conference report: maximizing use of organs recovered from the cadaver donor: cardiac recommendations: March 28–29, 2001, Crystal City, Va. *Circulation* 2002; 106: 836–841.
- Costanzo MR, Dipchand A, Starling R et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29: 914–956.
- Esmailian F et al. The PROCEED II international heart transplant trial with the organ care system technology (OCS). *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2013; 32 (4): S95–S96.
- Cypel M, Yeung JC, Machuca T et al. Experience with the first 50 *ex vivo* lung perfusions in clinical transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 144: 1200–1206.
- Ghodsizad A, Bordel V, Ungerer M et al. *Ex vivo* coronary angiography of a donor heart in the organ care system. *Heart Surg Forum.* 2012; 15: E161–3.
- Scholar T. The Chironian Vol. 22 No. – 1960.
- Quader MA, Wolfe LG, Kasirajan V. Heart transplantation outcomes from cardiac arrest-resuscitated donors. *Heart Lung Transplant.* 2013; 32: 1090–1095.
- Tikkanen JM, Cypel M, Machuca TN et al. Functional outcomes and quality of life after normothermic *ex vivo* lung perfusion lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2015; 34: 547–556.
- Page A et al. Early outcomes from DCD heart transplantation: a single centre experience. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2018; 37 (4): S13–S14.
- The National Institute for Health and Care Excellence. OCS Heart System for Heart Transplant, Medtech Innovation Briefing. <https://www.nice.org.uk/advice/mib86/resources/ocs-heart-system-for-heart-transplantpdf-63499411285189> (30 August 2018, date last accessed).
- Messer S, Page A, Axell R, Berman M, Hernández-Sánchez J, Colah S et al. Outcome after heart transplantation from donation after circulatorydetermined death donors. *J Heart Lung Transplant.* 2017; 36: 1311–1318.

Статья поступила в редакцию 26.09.2019 г.

The article was submitted to the journal on 26.09.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-147-154

## С.С. БРЮХОНЕНКО – ОСНОВОПОЛОЖНИК ТЕХНОЛОГИИ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ (ФИЛОСОФСКО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ И СОЦИОКУЛЬТУРНЫЙ КОНТЕКСТ)

*А.Я. Иванюшкин<sup>1, 2</sup>, О.Н. Резник<sup>3, 4, 5</sup>, О.В. Попова<sup>5</sup>*

<sup>1</sup> ГАОУ ВО «Московский городской педагогический университет», Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>5</sup> ФГБУН «Институт философии Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

Статья посвящена врачу, ученому-физиологу, изобретателю первого в мире аппарата искусственного кровообращения С.С. Брюхоненко (1890–1960), его вкладу в развитие современной науки и техники. Изобретение С.С. Брюхоненко трактуется как современная биотехнология, порождающая многоплановый общественный резонанс. Представлен философский анализ различия понятий «техника» и «технология». В статье раскрываются социокультурные смыслы влияния биомедицинских технологий на общество и культуру.

*Ключевые слова:* С.С. Брюхоненко, искусственное кровообращение, технология, научный приоритет, врач-труэнт.

## S.S. BRYUKHONENKO – THE FOUNDER OF CARDIOPULMONARY BYPASS (PHILOSOPHICAL, METHODOLOGICAL AND SOCIOCULTURAL CONTEXT)

*A.Ya. Ivanyushkin<sup>1, 2</sup>, O.N. Reznik<sup>3, 4, 5</sup>, O.V. Popova<sup>5</sup>*

<sup>1</sup> Moscow City Teacher Training University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> V.P. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Saint Petersburg I.I. Dzhanelidze Research Institute of Emergency Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

<sup>4</sup> V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>5</sup> Institute of Philosophy, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

The article devoted to physiologist, inventor of the first in the world the heart and lung machine Sergei Brukhonenko (1890–1960). The invention of Sergei Brukhonenko is understood as modern biotechnology, which produces a big boom in modern society. The authors analyze the demarcation concepts «technology» and «technological». The article discusses the impact of sociocultural values produced by biotechnology on culture and society.

*Key words:* Sergei Brukhonenko, extracorporeal circulation, technology, scientific priority, truant doctor.

**Для корреспонденции:** Иванюшкин Александр Яковлевич. Адрес: 119034, Москва, Кропоткинский пер., д. 23.  
E-mail: a\_ivanyushkin@mail.ru

**For correspondence:** Ivanyushkin Alexander Yakovlevich. Address: 23, Kropotkinsky per., Moscow, 119034, Russian Federation.  
E-mail: a\_ivanyushkin@mail.ru

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Создание технологии искусственного кровообращения (ИК) относится к числу наиболее выдающихся высокотехнических достижений биомедицины XX в. Слово «высокотехнических» здесь требует пояснений. Например, введение в хирургическую практику такого научного открытия, как наркоз (середина XIX в.), совсем не потребовало доклинических исследований. В отличие от наркоза внедрению в клиническую практику метода ИК (50-е годы XX в.) предшествовали десятилетия развития физиологических знаний и одновременно совершенствования методов незамкнутой перфузии изолированных органов (например, сердца). Только вслед за этим могла быть решена задача перфузии целого организма. То есть известные науке со времен М. Сервета и У. Гарвея «малый» и «большой» круги кровообращения необходимо было воспроизвести в виде единого технологического контура «искусственное сердце плюс искусственные легкие».

Приоритет создания первого действующего в автоматическом режиме аппарата ИК принадлежит русскому врачу, ученому-физиологу, изобретателю С.С. Брюхоненко (1890–1960) [1, 2, 3 и др.]. Свой аппарат ИК С.С. Брюхоненко назвал «автожектор». Вообще говоря, историческая судьба терминов, которыми сами авторы пользовались для обозначения своих великих научных открытий, технических изобретений, всегда интересна в контексте истории науки. Например, И. Ньютон назвал свой закон всемирного тяготения «законом обратной пропорциональности», а В.К. Зворыкин изобретенный им телевизор – «иконоскопом». Наименование, которое дал С.С. Брюхоненко своему аппарату ИК, занимает достойное место в этом ряду самых важных открытий и изобретений науки и техники. Уже в первое десятилетие использования метода ИК в клинике (рубеж 50–60-х гг.) в нашей стране существовало несколько технических модификаций «автожектора», а в мире – более 70 [4].

Используемый нами термин «технология» позволяет раскрыть более глубокий, общекультурный смысл вклада в науку С.С. Брюхоненко, сосредоточиться на философской проблематике, подчас только намеченной в его работах. Понятие технологии употребляется в современной философии науки и техники в узком и широком смысле [5]. В узком смысле это понятие ясно каждому современному грамотному человеку (например, известная со времен первых цивилизаций технология металлургического производства). Понятие технологии в широком смысле чаще всего ассоциируется у нас с такими достижениями современной цивилизации, как информационные технологии или биотехнологии. В этом смысле понятие технологии предполагает, во-первых, ин-

новационную составляющую, то есть перманентное решение в русле данного научно-технического направления все новых и новых научных задач, осуществление все новых технических проектов; во-вторых, принципиально новую модель соотношения науки (в особенности новых форм организации научных исследований) и социальных практик; в-третьих, «встроенность» в ускоряющиеся процессы собственно научно-технического прогресса ценностной составляющей (моральной, философской, религиозной и т. д. рефлексии) [6].

ИК как метод экспериментальной и клинической хирургии является также и *технологией* хотя бы потому, что создание данного метода сделало возможным ускоряющееся развитие реаниматологии и трансплантологии со «встроенными» в эти клинические практики философскими проблемами.

Приоритет С.С. Брюхоненко в создании метода, технологии ИК зафиксирован в докладах на научных съездах, публикациях в научных изданиях, включая зарубежные, начиная с середины 20-х годов XX века. Многие отечественные авторы подчеркивают значение полученных С.С. Брюхоненко патентов на свой аппарат ИК в 1929 г. в Германии и Великобритании, в 1930 г. – во Франции и в 1934 г. – в СССР. В то же время обидным диссонансом звучат слова пионера клинической трансплантации сердца К. Барнарда, что при посещении в 1960 г. ведущих московских хирургических клиник<sup>1</sup> он не видел ни одной операции на открытом сердце и был «настолько разочарован состоянием хирургии в СССР, что никому не рекомендовал бы усовершенствоваться здесь в этой области» [7].

Справедливости ради следует сказать: первую операцию в СССР с применением отечественного аппарата ИК произвел А.А. Вишневецкий 27 ноября 1957 г. [2]. В целом же факт некоторого отставания применения этого метода в отечественной медицине в тот период бесспорен. Однако отметим и другой момент: первый этап внедрения в клиническую практику метода ИК можно назвать «драматической медициной» (Г. Глязер). Здесь мы находим конкретизацию проблемы демаркации двух понятий – техники и технологии. Этические дилеммы, которые решает герой повести Н.М. Амосова (1913–2002) «Мысли и сердце», – это только начало. Уже совсем скоро, с развитием клинической трансплантологии, дальнейший прогресс хирургии в этой области будет зависеть от легитимации нового критерия смерти (смерть мозга), от создания новой этико-правовой базы для обоснования, оправдания и регулирования практик донорства органов.

<sup>1</sup> Барнард посетил нашу страну в дни XXVII Всесоюзного съезда хирургов (проходил с 23 по 28 мая 1960 г.).

## 2. АВТОЖЕКТОР С.С. БРЮХОНЕНКО: СЕНСАЦИОННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ «ЖИВАЯ ГОЛОВА»<sup>2</sup>

Годы становления творческой личности С.С. Брюхоненко совпали с периодом Русской революции и последовавшими вслед за этим бурными десятилетиями советской истории. Его отец был инженером-железнодорожником, а сам он с юности проявлял склонность к изобретательству. Поступив в гимназию в Саратове, он заканчивает ее в Москве. В 1910–1914 гг. Сергей Брюхоненко – студент медицинского факультета Императорского Московского университета, увлекается бактериологией. Подписав по окончании университета в 1914 г. «Факультетское обещание», он отправился на фронт полковым врачом, а вернувшись с фронта в советскую Россию, опять оказался «на фронте» борьбы с сыпным тифом и холерой.

В этот момент произошла встреча Сергея Брюхоненко с профессором Ф.А. Андреевым, опубликовавшим еще в 1913 г. работу «Опыт восстановления деятельности сердца, дыхания и функций центральной нервной системы». Ф.А. Андреев был видным отечественным клиницистом и выдающимся ученым, новаторские научные идеи которого в значительной степени предопределили развитие таких высокотехнических направлений биомедицины XX века, как реаниматология и трансфузиология. П.М. Богопольский и соавт. отмечают: «Среди вопросов, которые Ф.А. Андреев с 1907 г. изучал ... понятие о «мнимой» смерти и периоде переживания изолированных органов и целого организма; восстановление функции сердца в условиях адекватной коронарной перфузии; нагнетание раствора Рингера–Локка с адреналином или дефибринированной крови в сонную артерию ... одновременное с внутриаартериальной инфузией отсасывание крови из верхней полой вены ... применение гирудина и пептона для понижения свертываемости крови ... изучение возможности восстановления функций ЦНС и всего организма с помощью ИК» [3]. С.С. Брюхоненко работал ассистентом профессора Андреева в 1919–1924 гг.

Началом создания технологии ИК стала разработка молодым врачом-ученым в эти годы *методики экспериментального исследования фундаментальных проблем патофизиологии*, когда он искал новые терапевтические средства лечения сыпного тифа. Своим «природным экспериментом» стал очаг холеры, вспыхнувшей среди больных тифом. Брюхоненко обратил внимание на то, что бактериологически доказанная холера, начавшаяся на 6–7-й день заболева-

ния сыпным тифом, как бы обрывала его. Оказалось также, что холера сопровождается понижением свертываемости крови, а сыпной тиф – повышением [2]. Обнаружив этот клинический феномен, Брюхоненко стал вводить в вену таким больным антикоагулянты и некоторые другие фармакологические субстанции. В итоге в 95% наблюдений возникал искусственно вызванный кризис, а в 5% случаев удавалось прервать болезнь. Ф.А. Андреев предложил своему ассистенту найти объяснение выявленному феномену, *исследуя отдельно* роль нервных и гуморальных факторов механизма терморегуляции. Брюхоненко ставит перед собой амбициозную цель – исследовать механизм терморегуляции на биологической модели «*изолированная голова*» теплокровного животного.

С.С. Брюхоненко вспоминал: «В период между 1920 и 1923 гг. мною был изобретен и сконструирован аппарат для искусственного кровообращения – автожектор и разработан метод изолированной головы собаки...» (курс. наш. – Авт.) [2]. В некоторых публикациях встречается мнение, что первый АИК создан С.С. Брюхоненко в соавторстве с С.И. Чечулиным. В связи с этим А.Г. Лапчинский (бывший в те годы сотрудником С.С. Брюхоненко) в докладе Московскому обществу хирургов в 1961 г. (в связи с годовщиной смерти С.С. Брюхоненко) заметил о «где-то вкравшейся ошибке» [1]. С.П. Глянецв подчеркивает, что С.И. Чечулин принимал участие в усовершенствовании автожектора, но это усовершенствование касалось незначительных его деталей [8].

Попытки обеспечить жизнедеятельность «изолированной головы» теплокровного животного (с помощью перфузии кровеносных сосудов) многократно предпринимались учеными и раньше, в частности, такие эксперименты проводил А.А. Кулябко, однако все они были безуспешными. Почему? Здесь уместно привести яркую и методологически точную мысль И.П. Павлова о том, что «наука движется толчками, в зависимости от успехов, делаемых методикой» [9]. Никому не удавалось достичь результата «переживания» такого органа, как голова теплокровного животного, потому что никто не создал адекватного исследовательской задаче научного метода.

Физиологические эксперименты с биологической моделью «изолированная голова» С.С. Брюхоненко и С.И. Чечулин проводили вместе. В своей опубликованной в 1928 г. работе «Опыты по изолированию головы собаки (с демонстрацией прибора)» [10] они освещают «Историю вопроса». В начале обзора упоминается высказанная еще в 1812 г. идея Ж.-Ж.-С. Легалуа (Le Gallois): посредством

<sup>2</sup> Кратко излагая биографию С.С. Брюхоненко, мы использовали не только опубликованные работы [2 и др.], но и *личные воспоминания профессора-биолога Л.Ф. Курило*, работавшей в 1957–1958 гг. лаборанткой в возглавляемой С.С. Брюхоненко физиологической лаборатории в НИИ экспериментальной хирургической аппаратуры и инструментов (НИИЭХАИ) МЗ СССР, за что принорим ей искреннюю благодарность.

трансфузии крови *оживить головной мозг* (после декапитации). В целом в обзоре дается анализ более десятка работ с 1834-го по 1924 г. франкоязычных и англоязычных авторов<sup>3</sup> (включая Ш. Броун-Секара). Авторы подчеркивают: «Нельзя не увидеть попыток создать условия действительно искусственного кровообращения». Однако анализ трудностей решения при этом множества физиологических и технических вопросов позволил им сделать вывод, что «в полной мере этого не удалось сделать ни одному из исследователей» [10]. Одна из причин заключалась в том, что у большинства исследователей-физиологов сам метод отделения головы от туловища экспериментальных животных был «варварским»<sup>4</sup>: «Декапитация животного производилась примитивно, с помощью особо устроенной гильотины... Поэтому мы выбрали путь чисто хирургический, и операцию отделения головы производили постепенно и в известной последовательности» (курс. наш. – Авт.) [10].

Остановим свое внимание на последних словах русских ученых, напомнив, что само создание А. Везалием современной научной анатомии генетически связано с новым культурным смыслом отношения к телу человека. Строгость научного наблюдения, научная объективность исследовательской деятельности анатома оборачивалась здесь бережным, *более уважительным, более гуманным* отношением к человеческим органам и тканям.

Масштаб научно-технического изобретения С.С. Брюхоненко выходит за рамки собственно технического прогресса. В процессе доказательства эффективности деятельности автожектора возникла новая дисциплина клинической и экспериментальной хирургии – перфузиология. Интересно оптимистическое заключение в одном из современных обзоров истории и достижений перфузиологии (2015) о теоретически возможной в будущем *идеальной перфузии* (курс. наш. – Авт.) [11]. Но ведь, по сути дела, пока мы имеем дело с симбиозом машины и человека, всего лишь с протезированием такого атрибута жизни, как кровообращение. И здесь возникает вопрос технопессимиста: «Возможно ли вообще создание “идеального протеза” кровообращения?». ИК *как технология* наиболее красноречиво иллюстрирует тренд современного человека на трансформацию себя «на уровне» самого бытия, в результате чего человек в современном мире приобретает качество «артефакта» [12].

Начиная с 1925 г., С.С. Брюхоненко и С.И. Чечулин многократно демонстрировали свой эксперимент «оживления головы собаки» на всероссийских съездах патологов, физиологов (на IV съезде в 1930 г. в присутствии приглашенных иностранных ученых).

Демонстрации продолжались и на VI съезде (после смерти С.И. Чечулина в 1938 г.). Подчеркнем факт присутствия на таких демонстрациях представителей высших органов власти советского государства. После успешной демонстрации этого опыта в МГУ в 1928 г. для расширения исследований С.С. Брюхоненко было выделено 30 тыс. руб. и организована Лаборатория экспериментальной терапии. Наконец, в череде этих научных форумов, на которых опять и опять повторялась демонстрация «оживления головы собаки», как бы апофеозом стал XV Международный конгресс физиологов, состоявшийся в 1935 г. в Москве под председательством академика И.П. Павлова (съезд щедро финансировался государством – ему придавалось большое политическое значение).

После триумфальной демонстрации эксперимента «оживления головы собаки» на XV Международном физиологическом конгрессе Постановлением Совета народных комиссаров СССР был создан Научно-исследовательский институт экспериментальной физиологии и терапии (НИИЭФТ), директором которого был назначен С.С. Брюхоненко. В это же время ему была присвоена (без защиты диссертации) ученая степень доктора медицинских наук. Штат нового института сотрудников составлял 150 человек. Этот коллектив разрабатывал и изготавливал автожекторы, которые вызывали *живой интерес после демонстрации* опытов на научных конгрессах и съездах» (курс. наш. – Авт.) [2].

Как видим, создание С.С. Брюхоненко экспериментально-физиологического и клинического метода ИК имело в качестве косвенного следствия *огромный общественный резонанс*. А.А. Кулябко в опубликованной в 1928 г. в газете «Правда» статье писал, что открытие С.С. Брюхоненко «производит феерическое впечатление». Особо следует отметить международный общественный резонанс: например, как всегда, ироничным было суждение Б. Шоу, что он готов предоставить доктору Брюхоненко для опытов свою голову [2]. Спустя 30 лет такой же бурный международный общественный резонанс вызвал эксперимент, осуществленный в 1953 г. В.П. Демиховым (и его младшим коллегой и соратником В.М. Горяиновым) по пересадке головы собаки-щенка (вместе с передними лапами) на шею взрослой собаки. Прошло еще десятилетие, и первая клиническая пересадка сердца К. Барнардом в конце 1967 г. стала причиной общественного резонанса, который по силе был сравним с реакцией общества на запуск первого спутника Земли в 1957 г. и первый полет человека в космос в 1961 г.

Все приведенные примеры – это примеры *развития современных технологий*. Как говорилось ранее,

<sup>3</sup> С.С. Брюхоненко владел английским, немецким и французским языками, в последние годы жизни изучал испанский [2].

<sup>4</sup> Историки науки подчеркивают, что Ш. Броун-Секар в своих экспериментах отделял голову собаки от туловища ударом сабли [2].

в понятии технологии в широком смысле как бы заложен «вирус»<sup>5</sup> прогрессирующих инноваций. В массовом сознании общества с такими технологиями связаны некие завышенные ожидания. Современные технологии – это такое поражающее наше воображение *настоящее* образа жизни человека, которое всегда обещает еще более удивительное *будущее*. Восприятие человеком современных технологий можно обозначить словом «очарование». Таким образом, современные технологии, являясь исходно этапом научно-технического прогресса, включают в себя две другие составляющие – социальную (глобальный «общественный резонанс») и психологическую («эффект очарования»).

Как говорилось ранее, понятие технологии в широком смысле предполагает анализ как бы «встроенной» в них *мировоззренческой, философской проблематики*. Физиологические эксперименты С.С. Брюхоненко и С.И. Чечулина подтверждают данное методологическое положение. Они писали в 1928 г.: «Особого внимания заслуживают явления, сопровождающие агонию и смерть, почему мы остановимся на них... подробнее» [10]. На следующих страницах данной работы мы находим предвосхищение ключевых проблем реаниматологии (сформировавшейся в качестве самостоятельной научной дисциплины уже во второй половине XX в.) – причем в равной степени проблем как научного, так и философского плана. Прежде всего Брюхоненко и Чечулин ясно формулируют базовую категорию реаниматологии «клиническая смерть», но используют при этом другие термины: «временная потеря функций и реактивной способности», «кажущаяся смерть», «мнимая смерть», «замедленная смерть», в противоположность «окончательной, действительной смерти» [10].

Понятия клинической и биологической смерти были введены позднее В.А. Неговским, работы которого получили известность за рубежом, что отражает приоритет отечественной науки в данной области. Однако в несовпадении терминов, обозначающих один предмет, скрываются философско-методологические проблемы, требующие специального анализа. Заметим, что термин «клиническая смерть» переводится на немецкий как *Scheintod*, то есть «*кажущаяся смерть*». Да и в отечественной литературе высказывалась точка зрения целесообразности отказа от терминов «клиническая» и «биологическая» смерть – как противоречащих законам логики [13].

Обосновав в своих экспериментах с помощью автожектора возможность восстановления в «изолированной голове» признаков жизни (после наблюдения

в течение 8–20 минут признаков смерти), С.С. Брюхоненко и С.И. Чечулин формулируют главный вопрос: «Можно ли отождествлять явления жизни и смерти, наблюдавшиеся нами на изолированной голове, с тем, что мы видим на целом организме?» [10]. И далее: «Ни у кого не явится сомнений, что перед нами налицо ряд функций, в которых принимают участие нервные окончания, проводники, участки центральной нервной системы, некоторые органы чувств и группы мышц. Но можно ли пойти дальше и назвать все это тем именем, которое невольно напрашивается – именно *ж и з н ь ю*?.. Нам кажется, что этот вопрос решается легче, чем вопрос – *что т а к о е ж и з н ь*? Действительно, физиология еще не смогла дать ясного и точного определения – что можно назвать живым и что мертвым»<sup>6</sup>.

В приведенных цитатах можно увидеть предвосхищение философско-методологических проблем, сопряженных с легитимацией в современном обществе нового критерия смерти человека как «смерти его головного мозга». Возьмем дефиницию в действующем юридическом акте МЗ РФ: «Смерть мозга человека наступает при полном и необратимом *прекращении всех функций* головного мозга... Момент смерти мозга человека является *моментом смерти человека*»<sup>7</sup> (курс. наш. – *Авт.*). Многие философские споры вокруг проблемы смерти мозга сосредоточены как раз в пункте прямолинейного отождествления двух частей приведенной дефиниции. А вот С.С. Брюхоненко и С.И. Чечулин в 1928 г. пронизательно видели некий «зазор» (как в онтологическом, так и эпистемологическом смысле) между физиологическими фактами *проявления жизни* в «изолированной голове» и *жизнью как таковой*.

Здесь они были ближе к своему старшему современнику В.И. Вернадскому, который писал, что вопрос о сущности жизни пока решается в основном на уровне религии или философии, что «наука должна подойти к этой проблеме сама. Этого сейчас нет» [14]. Поэтому, следуя строгим научным критериям, он предпочитал использовать не термин «жизнь», но «живое вещество». Очевидно, что в философском измерении категории жизни и смерти имеют «один и тот же масштаб». Общеизвестно, что легитимация нового критерия смерти («смерть мозга») неразрывно связана с перспективами развития трансплантологии. Наиболее последовательно это обстоятельство отразилось в Законе о трансплантации Японии 1997 г.: «Пациент, которому поставлен диагноз смерти мозга, является мертвым в юридическом смысле *только в том случае*, если он при жизни одобрил предшеству-

<sup>5</sup> Не случайно в современных информационных технологиях понятие «вирус» стало их имманентной характеристикой.

<sup>6</sup> Разрядка здесь и далее принадлежит Брюхоненко и Чечулину.

<sup>7</sup> Порядок установления диагноза смерти мозга человека: Приложение № 1 к приказу МЗ РФ от 25.12.2014 г. № 908н.

ющую трансплантации констатацию смерти мозга» (курс. наш. – Авт.) [15].

Приведем еще одно философское размышление Брюхоненко и Чечулина: «Возможно представить и такое состояние, когда возбудимость и функции не выявляются, но могут быть выявлены при наличии подходящих условий» [10]. Здесь они как бы предвидели сегодняшние философские сомнения некоторых авторов – является ли пациент с диагнозом «смерть мозга» действительно мертвым.

### 3. С.С. БРЮХОНЕНКО – ИЗОБРЕТАТЕЛЬ-САМОРОДОК

Начало 20-х годов XX века в России было временем коренной ломки всех социальных институтов, в том числе и науки как социального института. С.С. Брюхоненко вспоминал о подробностях рождения автожектора: «Начальная стадия работы носила изобретательный характер... одна из моделей... представляла собой хаотическое нагромождение металлических и стеклянных частей, укрепленных на одном штативе. Винты нарезались из обычных гвоздей с припаянными на них монетами. Как детали использовались медицинские шприцы, электрические звонки, химическая посуда и т. д.» [2]. С.С. Брюхоненко, не имея специального технического образования, был одновременно математиком, инженером, конструктором, когда в чертежах отдельных частей автожектора, например, *сводил к минимуму (до квадратного сантиметра) площадь соприкосновения мертвой плоти машины с кровью.*

Как известно, впервые в клинической практике аппарат ИК был успешно применен в 1953 г. в США Д.Х. Гиббоном (1903–1973). Существенная деталь: в истории изобретения первых американских аппаратов ИК активную роль сыграла компания IBM, которая стала во второй половине XX в. одним из лидеров в производстве компьютеров. Однако приоритет С.С. Брюхоненко в развитии клинической кардиохирургии неоспорим. *В опубликованной в СССР в 1928 г., а во Франции в 1929 г. статье «Искусственное кровообращение целого организма (собаки) с выключенным сердцем» (написана в конце 1926 – начале 1927 годов) Брюхоненко высказал идею возможности операций на остановленном сердце.* Спустя 10 лет он проводит решающий эксперимент (*experimentum crucis*): «Я как сейчас вспоминаю этот первый и решающий опыт. У собаки под наркозом вскрыта грудная полость, аппарат искусственного кровообращения присоединен к организму и включен. Я проверяю безукоризненность его работы и останавливаю работу сердца собаки простым нажатием на него рукой. Обычно в таких случаях быстро

наступает агония и смерть. С естественным волнением наблюдаю, не появятся ли эти грозные симптомы. Нет. Проходит минута, затем десятки минут. Собака остается живой. В тот же день я позвонил по телефону своему товарищу по прежней работе – хирургу профессору Н.Н. Терebinскому. Рассказав ему об этом эксперименте, я спросил, не заинтересуется ли он теми перспективами, которые открываются перед хирургом благодаря возможности применения этого открытия, для внутрисердечных операций с временным выключением сердца» [2, с. 62]<sup>8</sup>.

Читая одну из его важнейших работ «Аппарат для искусственного кровообращения (теплокровных)», опубликованную в 1928 г., любой врач понимает, что одна из главных задач, которую решал автор при моделировании кругового артериального и венозного кровотока, заключалась в обеспечении автоматизма регулирования в границах физиологической нормы уровня давления в кровеносном русле. Однако решений десятков конкретных технических задач (например, преодоления опасности «вызвать спаивание контактов или их окисление» [16]) подавляющее большинство специалистов в области биомедицины постичь просто не могут. Приведем такую аналогию. Только профессиональные музыканты в состоянии по достоинству оценить многие главы книги «Бах» всемирно известного философа, музыканта и врача Альберта Швейцера (например, «Музыкальный язык кантат»). Мы полагаем, что, поставив в один ряд имена Швейцера и Брюхоненко, мы имеем дело с феноменом творческой личности прямо-таки возродженческого масштаба – как в том, так и другом случае.

Замечательное подтверждение сказанному мы находим еще в одном факте творческой биографии С.С. Брюхоненко. За несколько десятилетий до появления персонального компьютера ученый предвосхитил компьютерную 3D-графику. Он изобрел прибор для стереоскопического объемного изображения предметов. Своему изобретению он давал научно-физиологическое объяснение: свойственное человеку бинокулярное зрение (когда каждый глаз видит предмет, говоря языком геометрии, под разным углом) как раз и обеспечивает нам объемное восприятие мира материальных вещей. С.С. Брюхоненко писал: «Если человечество имело до сих пор для своих рисунков плоскость, то теперь мы даем ему возможность рисовать в трех измерениях. Я рисую пять лет стереоскопически и считаю, что пространственные образы, которые я раньше не всегда мог воспроизвести, я могу теперь нарисовать в течение пяти минут. Получилась школа для пространственного мышления» [2]. Его изобретение было, по сути, пред-

<sup>8</sup> О вкладе в развитие кардиохирургии Н.Н. Терebinского см.: «Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского». 2015. № 3.

течей современных компьютерных 3D-моделей, на которых обучаются современные студенты-медики: «студенты медицинских институтов могли бы обучаться на анатомическом атласе стереоизображений, инженеры могли бы изображать будущие приборы в таком виде, который должен был иметь готовый прибор, архитекторы вместо сложных макетов могли бы делать простые рисунки и т. д.» [2, с. 73].

#### 4. С.С. БРЮХОНЕНКО КАК ВРАЧ-ТРУЭНТ

Термин *врач-труэнт* впервые использовал известный английский хирург лорд Беркли Мойниган (В. Moynihan, 1865–1936). На этот факт обратил наше внимание известный отечественный профессор-реаниматолог А.П. Зильбер, который многие годы исследует данное явление культуры и дает ему такое определение: «Медицинский труэнтизм – это плодотворное устремление врачей к полезной творческой деятельности вне медицины» [13]. Много страниц своей монографии «Этика и закон в медицине критических состояний» А.П. Зильбер уделил врачам-труэнтам: Н. Копернику, Н.И. Пирогову, А.А. Богданову и др. Упомянутый нами А. Швейцер, конечно же, тоже относится к самым выдающимся врачам-труэнтам [17].

Остановимся на постоянном тяготении С.С. Брюхоненко к творчеству в гуманитарной сфере. У Сергея Сергеевича был абсолютный музыкальный слух. Студентом он подрабатывал тапером в немом кинематографе. Позднее, как вспоминал его друг, знаменитый пианист Генрих Нейгауз, Сергей Сергеевич виртуозно исполнял на рояле одной рукой «Боже, царя храни», а другой – «Интернационал» [19]. Под влиянием опытов Брюхоненко с «живой головой» были написаны два научно-фантастических романа: широко известная «Голова профессора Доуэля» А. Беляева, а также «Генератор чудес» Ю. Долгушина. Прототипом главного героя последнего является сам С.С. Брюхоненко. Ю. Долгушин вспоминал: «Огромное влияние на мою работу оказало знакомство с известным физиологом и изобретателем профессором Сергеем Сергеевичем Брюхоненко. Когда я пришел впервые к нему, он оживлял мертвых собак. Тут я увидел созданное им «искусственное сердце» – аппарат, который чудесно заменял настоящее сердце животному, пока оно возвращалось к жизни. Это была подготовка к опытам над человеком. И это уже была самая настоящая фантастика... А потом Сергей Сергеевич редактировал часть глав «Генератора чудес» (курс. наш. – Авт.) [2]. Само название произведения Долгушина подтверждает проведенное нами ранее различение понятий «техника» и «тех-

нология» (последнее как бы зара(я)жено «вирусом очарования»). Нельзя не упомянуть о знакомстве ученого с М.А. Булгаковым<sup>9</sup>, о чем есть свидетельство в Дневнике (1933 г.) жены писателя Елены Сергеевны: «Поехали на Якиманку в Институт переливания крови<sup>10</sup>. Брюхоненко (Сергей Сергеевич) очень жалел, что не может показать оживление отрезанной головы собаки – нет подходящего экземпляра. Показывал кое-какие свои достижения. Но главное – настойчиво предлагал М.А. написать пьесу – вместе с ним, – положив в основу какой-нибудь из его научных опытов» (курс. наш. – Авт.) [18].

Биографы С.С. Брюхоненко пишут в «Послесловии» к своей книге о нем: «В 20-х годах он летал на самолете одной из первых конструкций, когда еще ноги висели в воздухе, а позже в костюме водолаза спускался под воду. Он был отличным пловцом и стремился разработать новые приемы плавания. Научившись кататься на коньках, он сразу же перешел на фигурное катание... Накануне одной из наиболее сложных, четвертой по счету операции он увлеченно рассказывал о найденном им решении сложной математической задачи... Сергей Сергеевич всегда был далек от борьбы за титулы и должности... Он щедро разбрасывал идеи и не жалел об этом, потому что никогда не иссякал» [2].

#### 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К сожалению, приоритет успешного применения технологии ИК в клинической хирургии принадлежит не России, а западным странам. Главная причина была в том, что в методологическом плане технология ИК (как и все современные технологии) имеет принципиально междисциплинарную природу, а *общий уровень* технического прогресса в этих странах в то время (20–50-е гг.) был выше. П.М. Богопольский и соавт. критически оценивают этап творческих исканий С.С. Брюхоненко в 30–40-е гг., когда он преимущественно занимался проблемой «оживления умерших», упорно полагая, что период клинической смерти, равный примерно 5 минутам, с помощью метода ИК может быть в принципе продлен. Необходимо признать, что в свете всего последующего экспериментального и клинического опыта реаниматологии позиция этих авторов научно обоснована. Со своей стороны добавим следующее. Научное мировоззрение С.С. Брюхоненко сформировалось в первые десятилетия XX в., когда были популярны научные мегапроекты, например, евгеники (в России им посвящены работы Н.К. Кольцова, Ю.А. Филипченко и др.). Доминирование, начиная с 20-х годов, в научном творчестве С.С. Брюхоненко идеи «ожив-

<sup>9</sup> На этот факт обратил наше внимание к. филос. н. И.А. Иванюшкин.

<sup>10</sup> В 1931–1935 гг. Брюхоненко был заведующим лаборатории экспериментальной терапии Центрального института гематологии и переливания крови.

ления после смерти» было созвучно самому «духу революции» в тогдашнем российском обществе.

*Подготовлено при поддержке РФФ, грант № 17-18-01444, 2019 год.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Лапчинский АГ. С.С. Брюхоненко – основоположник искусственного кровообращения. Брюхоненко С.С. Искусственное кровообращение: Сборник работ по вопросам искусственного кровообращения. М.: Наука, 1964: 6–12. Lapchinskij AG. S.S. Bryuhonenko – osnovopolozhnik iskusstvennogo krovoobrashcheniya. Bryuhonenko S.S. Iskusstvennoe krovoobrashchenie: Sbornik rabot po voprosam iskusstvennogo krovoobrashcheniya. M.: Nauka, 1964: 6–12.*
2. *Сироткина Г, Гуткин ВС. С.С. Брюхоненко. М.: Медицина, 1972. Sirotkina G, Gutkin VS. S.S. Bryuhonenko. M.: Medicina, 1972.*
3. *Богопольский ПМ, Глянцев СП, Логинов ДТ. Сергей Сергеевич Брюхоненко – создатель метода искусственного кровообращения (к 125-летию со дня рождения). Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2016; 6: 74–82. Bogopol'skij PM, Glyancev SP, Loginov DT. Sergej Sergeevich Bryuhonenko – sozdatel' metoda iskusstvennogo krovoobrashcheniya (k 125-letiyu so dnya rozhdeniya). Kardiologiya i serdechno-sosudistaya hirurgiya. 2016; 6: 74–82.*
4. *Андреев СА. Прошлое, настоящее и будущее искусственного кровообращения. Современные вопросы искусственного кровообращения в эксперименте и клинике / Под ред. С.А. Андреева. М.: Медицина, 1966: 9–25. Andreev SA. Proshloe, nastoyashchee i budushchee iskusstvennogo krovoobrashcheniya. Sovremennye voprosy iskusstvennogo krovoobrashcheniya v ehksperimente i klinike / Pod red. S.A. Andreeva. M.: Medicina, 1966: 9–25.*
5. *Розин ВМ. Технология. Новая философская энциклопедия. В четырех томах. Т. IV. М.: Мысль, 2001: 65. Rozin VM. Tekhnologiya. Novaya filosofskaya ehnciklopediya. V chetyrekh tomah. T. IV. M.: Mysl', 2001: 65.*
6. *Тищенко ПД. Биовласть в эпоху биотехнологий. М.: ИФ РАН, 2001. 177. Tishchenko PD. Biovlast' v ehpoхu biotekhnologij. M.: IF RAN, 2001. 177.*
7. *Аничков НМ. 12 очерков по истории медицины и патологии. М.: Синтез бук, 2014: 167–188. Anichkov NM. 12 ocherkov po istorii mediciny i patologii. M.: Sintez buk, 2014: 167–188.*
8. *Глянцев СП. Феномен Демихова. Трансплантология. 2012; 1-2: 74–83. Glyancev SP. Fenomen Demihova. Transplantologiya. 2012; 1-2: 74–83.*
9. *Павлов ИП. Лекции о работе главных пищеварительных желез / Ред. и статья акад. К.М. Быкова. Л.: Изд-во академии наук СССР, 1949. Pavlov IP. Lekcii o rabote glavnyh pishchevaritel'nyh zhelez / Red. i stat'ya akad. K.M. Bykova. L.: Izd-vo akademii nauk SSSR, 1949.*
10. *Брюхоненко СС, Чечулин СИ. Опыты по изолированию головы собаки (с демонстрацией прибора). Труды Научного химико-фармацевтического института. Вып. 20. М.: Изд. Научно-технического управления В.С.Н.Х., 1928: 6–43. Bryuhonenko SS, Chechulin SI. Opyty po izolirovaniyu golovy sobaki (s demonstraciej pribora). Trudy Nauchnogo himiko-farmaceuticheskogo instituta. Вып. 20. M.: Izd. Nauchno-tekhnicheskogo upravleniya V.S.N.H., 1928: 6–43.*
11. *Аверина ТБ. Искусственное кровообращение. Анналы хирургии. 2013; 2: 5–12. Averina TB. Iskusstvennoe krovoobrashchenie. Annaly hirurgii. 2013; 2: 5–12.*
12. *Попова ОВ. Человек как артефакт биотехнологий. М.: Канон+, 2017. Popova OV. Chelovek kak artefakt biotekhnologij. M.: Kanon+, 2017.*
13. *Зильбер АП. Этика и закон в медицине критических состояний. Петрозаводск: Издательство Петрозаводского университета, 1998. Zil'ber AP. Ehtika i zakon v medicine kriticheskikh sostoyanij. Petrozavodsk: Izdatel'stvo Petrozavodskogo universiteta, 1998.*
14. *Вернадский ВИ. Размышления натуралиста, кн. II. Научная мысль как планетное явление. М.: Наука, 1977. Vernadskij VI. Razmyshleniya naturalista, kn. II. Nauchnaya mysl' kak planetnoe yavlenie. M.: Nauka, 1977.*
15. *Иванюшкин АЯ, Попова ОВ. Проблема смерти мозга в дискурсе биоэтики. М.: Nota bene, 2013. Ivanyushkin AYа, Popova OV. Problema smerti mozga v diskurse bioehtiki. M.: Nota bene, 2013.*
16. *Брюхоненко СС. Аппарат для искусственного кровообращения (теплокровных). Труды научного Химико-фармацевтического института. Вып. 20. М.: Изд. Научно-технического управления В.С.Н.Х., 1928: 73–80. Bryuhonenko SS. Apparat dlya iskusstvennogo krovoobrashcheniya (teplokrovnyh). Trudy nauchnogo Himiko-farmaceuticheskogo instituta. Вып. 20. M.: Izd. Nauchno-tekhnicheskogo upravleniya V.S.N.H., 1928: 73–80.*
17. *Иванюшкин АЯ. Альберт Швейцер: философ, музыкант и врач (три ипостаси гения). Вестник Московского городского педагогического университета: Серия «Философские науки». 2012; 2: 110–121. Ivanyushkin AYа. Al'bert Shvejcer: filosof, muzykant i vrach (tri ipostasi geniya). Vestnik Moskovskogo gorodskogo pedagogicheskogo universiteta: Seriya «Filosofskie nauki». 2012; 2: 110–121.*
18. *Чудакова М. Жизнеописание Михаила Булгакова. М.: Книга, 1988. Chudakova M. Zhizneopisanie Mihaila Bulgakova. M.: Kniga, 1988.*
19. *Сергей Сергеевич Брюхоненко [Электронный ресурс]. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Брюхоненко,\\_Сергей\\_Сергеевич](https://ru.wikipedia.org/wiki/Брюхоненко,_Сергей_Сергеевич) (дата обращения: 23.07.2018).*

*Статья поступила в редакцию 26.08.2019 г.*

*The article was submitted to the journal on 26.08.2019*

DOI: 10.15825/1995-1191-2019-4-155-163

# THE ROLE OF ALTRUISM AND EMPATHY IN ANTICIPATING THE ATTITUDE TOWARD ORGAN DONATION AMONG NURSES IN INTENSIVE CARE UNITS OF QAZVIN: A CROSS-SECTIONAL STUDY

*Yekefallah Leili<sup>1</sup>, Dehghankar Leila<sup>2</sup>, Taherkhani Mahnaz<sup>3</sup>, Ranjbaran Mehdi<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> PhD of Nursing, Social Determinants of Health Research Center, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Department of Nursing, Social Determinants of Health Research Center, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>3</sup> Student of MSc Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>4</sup> School of Public Health, Qazvin University of Medical Sciences, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Aim:** Nurses, especially nurses in ICUs play an important role in organ donation; their performance in relation to their role is more affected by their attitude in this regard, identification of effective factors on the positive attitude of nurses towards organ donation is essential. This study was conducted aimed to determine the empathy and altruism with the nurses' attitudes in intensive care unit towards organ donation and brain death. **Methods.** In this cross-sectional study, which was conducted in 2019, 222 nurses from intensive care unit were selected by stratified random sampling. For collecting data the questionnaires of altruism, empathy and attitude toward organ donation were completed by nurses. Data was analyzed using pearson correlation, multiple linear regression. **Results.** There was a significant correlation between altruism ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.24$ ) and its components (anonymous prosocial behaviors ( $r = 0.33$ ,  $p < 0.001$ ), emotional prosocial behaviors ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.03$ ), dire prosocial behaviors ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.03$ ) and compliant prosocial behaviors ( $r = 0.21$  and  $p = 0.001$ )) with attitudes and also between empathy ( $r = 0.04$ ,  $r = 0.13$ ), perspective taking component ( $p = 0.02$ ,  $r = 0.152$ ) and imaginary empathy ( $r = 0.14$ ,  $p = 0.03$ ) with nurses' attitudes. The components of anonymous prosocial behaviors in altruism ( $p < 0.0001$ ), gender ( $p = 0.007$ ) and having organ donation card ( $p = 0.012$ ) are positive predictors of nurses' attitudes towards organ donation. **Conclusion.** The results showed that altruism and having organ donation card were two of the most important factors in the tendency of nurses to organ donation. Therefore, the implementation of educational programs regarding changing nurse's attitude in order to increase the sense of altruism and empathy about organ donation is necessary. By strengthening the sense of altruism and empathy in the family of brain death patients, they can be helped to decide on donate their patient's organ with more certainty.

*Key words: Altruism, Empathy, Attitude, Organ Donation, Nurses.*

**Corresponding Author:** Mahnaz Taherkhani, Student of MSc Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.

Tel. 098283338034. Fax. 098283338034. E-mail: mahnztaherkhani55@gmail.com

# РОЛЬ АЛЬТРУИЗМА И ЭМПАТИИ В ОТНОШЕНИИ К ДОНОРСТВУ ОРГАНОВ У МЕДСЕСТЕР В ОТДЕЛЕНИЯХ ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ В КАЗВИНЕ: ПЕРЕКРЕСТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

*Yekefallah Leili<sup>1</sup>, Dehghankar Leila<sup>2</sup>, Taherkhani Mahnaz<sup>3</sup>, Ranjbaran Mehdi<sup>4</sup>*

<sup>1</sup> PhD of Nursing, Social Determinants of Health Research Center, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>2</sup> Department of Nursing, Social Determinants of Health Research Center, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>3</sup> Student of MSc Nursing, Faculty of Nursing and Midwifery, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

<sup>4</sup> School of Public Health, Qazvin University of Medical Sciences, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Цель.** Медицинские сотрудники среднего звена, особенно медсестры в отделениях реанимации и интенсивной терапии, играют важную роль в донорстве органов. На их работу влияет множество различных факторов, и поэтому важно определить, какие из них являются эффективными для формирования положительного отношения медсестер к донорству органов. Это исследование было проведено с целью определения уровня эмпатии и альтруизма к донорству органов и смерти мозга у медсестер отделений реанимации интенсивной терапии. **Материалы и методы.** В этом перекрестном исследовании, которое проводилось в 2019 году, было отобрано 222 медсестры из отделений реанимации и интенсивной терапии с помощью стратифицированной случайной выборки. Для сбора данных медсестры заполняли анкеты, по которым в дальнейшем были оценены их уровни альтруизма, эмпатии, а также отношение к донорству органов. Данные были проанализированы с использованием корреляции Пирсона, множественной линейной регрессии. **Результаты.** Наблюдалась значительная корреляция между альтруизмом ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,24$ ) и его компонентами (анонимное просоциальное поведение ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,001$ ), эмоциональное просоциальное поведение ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,03$ ), отрицательное просоциальное поведение ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,03$ ), просоциальное поведение ( $r = 0,21$ ,  $p = 0,001$ ) с отношением к донорству органов, а также между эмпатией ( $r = 0,04$ ,  $r = 0,13$ ), компонентом, учитывающим перспективы ( $p = 0,02$ ,  $r = 0,152$ ) и воображаемым сочувствием ( $r = 0,14$ ,  $p = 0,03$ ) с отношением медсестер к донорству органов. Компоненты анонимного просоциального поведения при альтруизме ( $p < 0,0001$ ), пол ( $p = 0,007$ ) и наличие карты донорства органов ( $p = 0,012$ ) являются положительными предикторами отношения медсестер к донорству органов. **Выводы.** Результаты показали, что альтруизм и наличие карты донорства органов были двумя наиболее важными факторами в положительном отношении медсестер к донорству органов. Следовательно, необходима реализация образовательных программ, касающихся изменения отношения медсестер к посмертному донорству органов. Укрепляя чувство альтруизма и эмпатии в семье пациента со смертью мозга, можно помочь с большей уверенностью принять решение о пожертвовании органа своего близкого человека.

*Ключевые слова:* альтруизм, эмпатия, отношение, донорство органов, медсестры.

## INTRODUCTION

The issue of the organ transplantation has long been propounded in social and scientific circles. It is considered as the best treatment for the terminal and irreversible organ failures and it saves lives in patients with such failures and improves their quality of life [1]. Transplantation is a therapeutic method that is used when all other therapeutic methods fail. It is one of the complex methods that require an expert team from the very beginning of supplying the organ [2]. One of the potential and considerable sources of supplying organs for transplantation is the brain death patients [3]. Many years ago, after the adoption of the law on organ donation, the concept of the

organ transplantation was established in Iran and many efforts have been made to promote this humanitarian action with ethical considerations. However, the rate of organ donation is still very low compared to the number of brain deaths [4]. According to the report of the Iranian Association of Organ Donation, every ten minutes one person is added to the waiting list and every two hours a patient who needs the organ transplantation loses his or her life. It is while a person dies with a brain death every 70 minutes. Due to a shortage of donated organs, the number of organ transplantations is much lower in Iran than Europe and the United States so that thousands of people die every year due to lack of access to the required organs [5]. In our country, the rate of organ donation per

one million people is 2.3 transplantations while Spain with 35 transplantations per million populations has the best situation in this regard, and in other European and American countries, this number ranges from 10 to 25 transplantations per one million people [6].

The difference between the number of people waiting for organ transplantation and the number of people donating their organs is annually increasing worldwide, and this continuing condition makes it necessary to understand how psychological factors can increase people's willingness to donate their organs [7]. According to studies, factors such as prior knowledge of the deceased's wishes (such as signing a donor card), the presence of relatives at the time of the donor's injury, clear and accurate information about the cause and diagnosis of brain death and the benefits of organ donation, the understanding of tests confirming brain death, encouraging organ donation, willingness to help others, ensuring high quality care and respect for the donor's body, good and proper relationship with families and meeting their needs (including mental and social needs), and altruism and empathy are the main reasons for the agreement of the families of brain dead patients with organ donation [8].

Altruism which is one of the prosocial behaviors is often recognized as one of the fundamental principles of organ transplantation [9]. According to the research, four types of prosocial behaviors have been introduced so far, including altruistic prosocial behaviors that are defined as voluntary helping motivated primarily by concern for the needs and welfare of others and often induced by sympathy responding and internalized norms and principles consistent with helping others [10]. Buttsen believes that altruism is to understand the others' suffering and to experience the sympathetic concern for others [11]. compliant prosocial behaviors that are defined as helping others in response to their verbal or non-verbal requests [12]; emotional prosocial behaviors that are defined as helping others under emotionally evocative circumstances and are divided into two subsets of emotional prosocial behaviors and dire prosocial behaviors. Highly emotionally evocative situations lead to overarousal and personal distress for some people, while the response may be sympathy for others [13]; and public prosocial behaviors that are divided into the two subsets of anonymous behavior as helping without knowledge of who is helped and public prosocial behavior as a tendency to perform prosocial acts in front of others [10]. In various studies, including Milaniak (2018), Khani (2017), Newton (2011), and Hill (2016), it has been recognized that altruism is one of the main reasons for the willingness to donate organs [7, 14, 15, 16].

Empathy is also considered as an important predictor of various helping behaviors [17]. In studies conducted on empathy, the main focus has been on its definition, cognition, and sometimes on emotion. According to Davis, empathy is not defined as a single dimensional structure (cognitive or emotional), but it consists of a

set of constructs structures. Davis considers four components for empathy, including perspective taking as the ability to consider others' perspectives, fantasy as the tendency to imaginary replace oneself into feelings and actions of fictitious characters in books and movies, empathic concern as other-oriented feelings of sympathy and concern for others in distress, and personal distress as self-oriented feelings of personal distress, discomfort, and anxiety in interpersonal conditions [18]. In general, empathy involves sympathy and a willingness to comfort others' suffering [11]. Therefore, empathy can also be linked to the willingness of people to donate an organ [17]. However, the role of empathy in decision making on the organ donation has rarely been considered and only a few studies have been conducted in this field [7]. Cohen et al. (2012) concluded in their study that there was a positive and significant relationship between empathy and the willingness to donate an organ among the students [17]. In the study by Milaniak (2018), a significant correlation was recognized between altruism, empathy and decision making about organ donation among nursing and paramedical students [7], while no significant relationship was found between the consent for the organ donation and the level of empathy in the study conducted by Wilczek et al. (2014) [19].

The organ donation process begins by determining which patients can be suitable for the donation of an organ. For organ donation, brain death should be confirmed by the brain death confirmation association, and the shorter the time interval between the admission of the patient and the confirmation of brain death, the more the number of organs, especially the lungs, which can be transplanted [20]. According to the mortality pattern, the need for living donors can be reduced in developing countries, such as Iran and other Mediterranean countries, by improving the quality of health care, identifying effectively brain death, and obtaining the consent using appropriate strategies [21].

As the primary caregiver of the patient, a nurse in intensive care units may be the first person who diagnoses the patient's lack of response as a sign of brain death [22]. Nurses, especially nurses in the emergency and intensive care units, play an important role in the organ donation process, ranging from identifying and evaluating potential donors to supporting their families to participate in organ donation. Providing information accurately, transparently, sensitively and in a professional manner information to the families of these patients, the nurses make them ready to understand why their dear ones are in such critical conditions and help them to accept easily their deaths, and thus consider the option of donating organs [23]. The performance of nurses in relation to their role in the organ donation process is more affected by their attitudes toward the organ donation, and those who have a more positive attitude to it have better performance in this regard [24].

Different studies conducted in Iran and other countries to assess the knowledge and attitude and performance of nurses in relation to the brain death and organ donation process indicate that nurses have poor knowledge, attitude, and performance toward the organ donation process [6, 24, 25]. Given that we live today in a society where thousands of patients in need of organs are waiting for transplantation with a painful life while we face every day with many brain dead patients whose organs can improve the life quality of patients who need the organs, as well as considering the role of nurses in the organ donation process, it is very important to recognize the factors affecting the attitude of nurses toward organ donation. Therefore, to determine the relationship between empathy and altruism and the attitudes of nurses in intensive care units toward organ donation and brain death, the present study has been conducted to understand which steps should be taken to strengthen the status of this important current priority in the medical community.

## METHOD

The present research has been a cross-sectional descriptive-analytic study. The statistical population of this study included all nurses who were working in ICU, dialysis and emergency units of educational and health centers in Qazvin at the time of the research. Using the equation  $n = (Z^2 \times SD^2)/d^2$ , the sample size was calculated to be 208 people considering the confidence level of 95%, the  $d = 0.8$ , and the maximum standard deviation (SD) of nurses' empathy score of 5.88, obtained in the study by Milaniak et al. (2018) [7]. Taking the probability of sample loss into account, the sample size was considered to be 229 people to enhance the validity of the results of the study.

The sampling was performed using a stratified random method so that the units of each hospital were considered as one stratum and the samples were taken using a simple random method from each stratum which included various intensive care units based on the ratio of nurses in those units to the total population by drawing lots from the list of nurses in the random number table. The exclusion criteria in the present study were having the work experience less than one year in intensive care units, lack of interest in participating in research, having a history of donating an organ or transplantation and or the need for an organ donation in family and relatives, the withdrawal from participating in the study, the completion of years of service, and the change of service place before the completion of the research.

## THE TOOLS USED TO COLLECT DATA IN THIS STUDY INCLUDED:

– Demographic and occupational information questionnaire with 8 questions to collect data such as age, gender, marital status, religion, type of employment, degree of education, organizational position, and

work experience of the participant in intensive care units.

– Carlo's prosocial tendencies measure (PTM-R) with 25 questions, including 5 subscales of anonymous prosocial behaviors (7 items), altruistic and public prosocial behaviors (8 items), emotional prosocial behaviors (3 items), dire prosocial behaviors (4 items), and compliant prosocial behaviors (3 items). The questionnaire was scored by a 5-point Likert scale ranging from «doesn't describe me at all» to «describes me fully» with points 1, 2, 3, 4, and 5 respectively. The 5<sup>th</sup> subscale was scored in reverse order. In this test, score 5 indicates the highest degree of altruistic behavior and the highest score is equal to 125. The validity and reliability of this tool have been analyzed separately for each subscale by Carlo et al. (2003) and it has been recognized that they are desirable [26]. Additionally, its validity and reliability have been studied in Iran by Kajbaf et al. (2010) and using a test-retest method, the reliability coefficient of this tool has been calculated by the Cronbach's alpha of 0.86 to be 0.863 [27].

Davis Empathy Questionnaire:

– Empathy questionnaire with 28 questions, which has been developed by Davis in 1983, to measure empathy. It measures the four subscales of personal distress, empathic concern, perspective taking, and fantasy. Each subscale in this test includes 7 sentences that are scored based on a 5-point Likert scale (ranging from 0 = strongly disagree to 4 = strongly agree) and the questions 3, 4, 7, 12, 13, 14, 15, 18, and 19 are scored in reverse. The minimum and maximum score for each subscale can be 0 and 28, respectively. A higher score indicates more empathy. In the study by Davis, the test-retest reliability of the tool has been equal to 0.61–0.79 for men and 0.62–0.81 for women, while the internal reliability has been equal to 0.71–0.77. and its validity is reported to be desirable [28]. In Iran, the study conducted by Khodabakhsh et al. (2012) has calculated the test-retest reliability of the tool to be 0.71 [29]. In the study conducted by Alah Gholilo et al., the Cronbach's alpha coefficient and the reliability coefficient of this tool has been reported as 0.77 and 0.76, respectively [30].

– Attitudes toward organ donation questionnaire with 13 questions, which has been developed by Chakradhar et al. The scores given to each item in this tool range from 1 = strongly disagree to 5 = strongly agree and the total score may vary from 13 to 65. Obtaining a higher score indicates a more positive attitude toward organ donation. The validity of this questionnaire has been determined by the content validity in a study by Purbahram et al. (2017). Its reliability has also been calculated by Cronbach's alpha coefficient in the same study to be 76.3%, which is considered as acceptable reliability [31].

The present study has been conducted as a student thesis. After obtaining a license from the Ethics Committee of the Qazvin University of Medical Sciences (IR.QUMS.REC.1397.179), obtaining a letter of introduction from the university’s research deputy, providing the necessary explanations regarding the purpose of the research, and obtaining the written consent of the participants, the data collection began. To comply with ethical standards, the questionnaires were distributed as anonymous and the confidentiality of data obtained from the participants was ensured. After collecting the questionnaires, data analysis was performed using SPSS 23 and descriptive statistics (frequency, percentage, central tendency indexes, and dispersion).

**RESULTS**

The total number of samples studied in this research was reduced from 229 to 222 because of the incompleteness of some of the questionnaires and their removal from the study. The majority of samples were female (84.7%) and married (75.2%) with the mean age of  $32.30 \pm 6.21$  and the average amount of work experience in intensive care units of  $6.18 \pm 4.52$ . 92.8% of the studied samples were nurses with a bachelor degree and 5.9% of them had higher degrees. 105 cases of nurses worked in ICU, 89 in the emergency unit, and 28 in the dialysis unit. 49 cases of the studied samples had signed a donor card (Table 1).

According to the results, the mean score of  $89 \pm 12.17$  was obtained for altruism,  $59.35 \pm 8.91$  for the empathy, and  $48.25 \pm 8.50$  for the attitude. The mean score of attitude was higher in women than men ( $p = 0.006$ ) and in married people than the single ones ( $p = 0.02$ ). The mean score of attitude was also higher in supervisors than nurses ( $p = 0.41$ ). Additionally, it was higher in nurses working in ICU and dialysis units than those in the emergency units ( $p = 0.23$ ). A significant relationship was not found between the attitude and education level ( $p = 0.84$ ) and employment status ( $p = 0.81$ ).

The results of the present study have shown that there was a positive correlation between altruism ( $p < 0.001$  and  $r = 0.24$ ) and its components, including anonymous prosocial behaviors ( $p < 0.001$  and  $r = 0.33$ ), emotional

Table 1  
**Demographic characteristics of nurses in ICU, emergency and dialysis units of Educational and health Centers affiliated to Qazvin University of Medical Sciences**

	Variable	Number	Percentage
Unit	ICU	105	47.3
	Emergency	89	40.2
	Dialysis	28	12.7
Gender	Male	34	15.3
	Female	188	84.7
Marital status	Single	54	24.4
	Married	167	75.6
Employment status	Permanent	92	41.6
	Temporary-to-permanent	21	9.5
	Passing a training course	53	24.0
	Contractual	55	24.9
Organizational position	Supervisor	7	3.3
	Nurse	203	96.7
Education level	Bachelor	206	93.6
	Master	13	5.9
	PhD	1	0.5

prosocial behaviors ( $p = 0.03$  and  $r = 0.14$ ), dire prosocial behaviors ( $p = 0.03$  and  $r = 0.14$ ), and compliant prosocial behaviors ( $p = 0.001$  and  $r = 0.21$ ), and the attitudes of nurses toward organ donation. However, there was a negative correlation between public prosocial behaviors and the attitudes of nurses ( $p = 0.87$  and  $r = -0.03$ ). Concerning the variable of empathy, there was a positive correlation between the total score of empathy ( $p = 0.04$  and  $r = 0.13$ ), perspective taking ( $p = 0.02$  and  $r = 0.152$ ), and fantasy ( $p = 0.03$  and  $r = 0.10$ ) and the attitudes of nurses. There was no positive correlation between personal distress ( $p = 0.13$ ,  $r = 0.10$ ) and empathic concern ( $p = 0.99$  and  $r = 0.00$ ) (Table 2). The two variables of altruism and empathy have also had a positive correlation ( $p < 0.001$  and  $r = 0.420$ ).

The results of multiple linear regression analysis, which was done to investigate the predictive role of research variables (quantitative and qualitative) in relation to the organ donation, have shown that gender, marital

Table 2  
**Correlation between altruism and empathy with the attitudes of nurses in ICU, emergency and dialysis units of Educational and Health Centers affiliated to Qazvin University of Medical Sciences**

	The total score of attitude		The total score of attitude		
	Correlation coefficient	P-value		Correlation coefficient	P-value
Total score of altruism	0.24	<0.001	Total score of empathy	0.133	0.048
Anonymous prosocial behaviors	0.338	<0.001	Personal distress	0.102	0.131
Altruistic and public prosocial behaviors	-0.010	0.878	Empathic concern	0.000	0.997
Emotional prosocial behaviors	0.144	0.031	Perspective takes	0.152	0.023
Dire prosocial behaviors	0.143	0.033	Fantasy	0.140	0.037
Compliant prosocial behaviors	0.219	0.001			

Table 3

**Predictors of the attitudes of nurses in ICU, emergency, and dialysis units toward organ donation in Educational and Health Centers affiliated to Qazvin University of Medical Sciences**

Variable	B	Std. Error	Beta	P-value	95% confidence interval	
					Minimum	Maximum
Constant value	19,922	5,339		0.000	9/396	30/448
Gender	4,172	1.540	0.175	0.007	1,136	7,208
Marital status	0,999	1,323	0.51	0.451	-1,609	3,608
Signing a donor card	3,223	1.279	0.159	0.012	0,702	5,744
Anonymous prosocial behaviors	0,582	0,148	0,349	0,000	0,290	0,874
Altruistic and public prosocial behaviors	-0,64	0,291	-0,18	0,828	-0,637	0,510
Emotional prosocial behaviors	-0,431	0,263	-0,148	0,103	-0,951	0,88
Dire prosocial behaviors	0,321	0,288	0,083	0,266	-0,246	0,889
Personal distress	-0,020	0,159	-0,009	0,900	-0,333	0,293
Empathic concern	0,141	0,228	0,048	0,536	-0,308	0,591
Perspective takes	0,239	0,240	0,074	0,321	-0,234	0,711

status, signing a donor card, and altruism have been positive predictors of nurses’ attitude toward organ donation and empathy has been the negative predictor (Table 3).

Linear regression was performed to assess the predictors of the attitudes toward organ donation. Variables that had  $p > 0.2$  in the single-variable model were entered into multiple linear regressions by “inter” method, that according to the results, the components of the anonymous prosocial behaviors ( $p < 0.0001$ ) in altruism and gender variables ( $p = 0.007$ ) and having organ donation card ( $p = 0.012$ ) were significant predictors of nurses’ attitude towards organ donation and in total, these variables predicted 20% change in attitude (Table 3).

**DISCUSSION**

The results obtained from the present study that has aimed to investigate the relationship between empathy and altruism with the attitude of nurses toward organ donation confirm the effect of altruism on the attitude of nurses toward organ donation. There was a direct and significant relationship between the total score of altruism and such components as anonymous prosocial behaviors, emotional prosocial behaviors, dire prosocial behaviors, and compliant prosocial behaviors with the attitudes of nurses toward organ donation. This is in agreement with the results obtained from the study by Khani et al. (2016), which showed a significant direct relationship between altruism and the attitude toward organ donation as well as a significant indirect relationship between the altruism caused by practicing religious beliefs and the attitude toward the organ donation [14]. Hill et al. (2016) demonstrated that there was a moderate positive correlation between the altruism and the attitude toward the organ donation and among the altruism and big five personality dimensions, only altruism was an important predictor of decision making on organ donation [16]. In the study by Khani et al. (2014) that investigated the role of social capitals and altruism in the prediction of medical doctors’ attitudes toward organ donation, a posi-

tive and significant correlation was recognized between the attitude toward the organ donation and the altruism [32]. In the study conducted by Newton et al. (2011), the altruistic motivation to help others was introduced as the most commonly identified motivator for becoming an organ donor [15]. It can be said that the feeling of altruism has a significant effect on the attitude of nurses toward organ donation and improves the performance of nurses in identifying brain death patients, caring for them, and increasing the consent of their families for the organ donation.

The results have also shown that there was a direct and significant correlation between the total score of empathy, perspective taking, and fantasy with the attitude of nurses. However, there was no correlation between distress and empathic concern. In study of Cohen et al. (2012), empathic concern and self-interest (personal distress) were considered as a positive predictor of tendency to organ donation, while paying attention to the interests of others (empathic attention) was not the positive predictor of tendency to organ donation. In the present study, there was a significant relationship between imaginary empathy and perspective taking with attitude toward organ donation, but none of the subscales of empathy was not a positive predictors of nurses’ attitude toward donation [17]. The research conducted by Wilczek et al. (2014) demonstrated that there was no significant correlation between empathy and the willingness to donate organs of brain death patients. It is in contrast to the results of the present study. Their study showed that the highest percentage of empathy was associated with the female participants [19], which is in agreement with this study.

The results of the study by Milaniak et al. (2018) showed a significant correlation between altruism and empathy with the causes of posthumous organ donation. In their study, the highest percentage of willing to sign a donor card was associated with the group who had a moderate level of altruism, and the highest percentage of

those who had signed previously a donor card was seen in the group with a high level of altruism [7]. These are consistent with the findings of the present study. In terms of empathy, only perspective taking was considered as a significant predictor and there was a poor relationship between the perspective taking and the dependent variable. There was a significant difference between the level of personal distress and disagreement with the organ donation. There was a positive and significant correlation between the fantasy and the agreement with the organ donation after the death of relatives, which was in agreement with the present study, but in the present study, none of the empathy subscales were positive predictor of the attitude toward organ donation [7]. There was no correlation between altruism and empathy that this finding was not in agreement with our study [7]. Empathy affected the agreement with donating organs of relatives after brain death and those with a higher level of empathy tended to develop a more positive attitude toward organ donation. According to the findings of the study it can be concluded that nurses with a high level of empathy can improve the status of organ donation in the society by developing more positive attitudes toward organ donation in relatives of brain death patients. In addition, the present study has shown that the score of attitude has been higher in those who have signed a donor card and signing a donor card has a positive and significant correlation with a positive attitude toward organ donation. In the study by Purbahram et al. (2017), the score of attitude in nurses who signed a donor card was higher than those who didn't sign a donor card. However, this difference was not significant [31]. The study conducted by Rodrigue (2004) also demonstrated that those who signed a donor card had more positive attitudes toward organ donation than those who didn't sign a donor card [34]. In the present study the gender, marital status and the component of anonymous prosocial behaviors have been a positive predictor of attitude toward organ donation while the effect of age, marital status, other component of altruism and also empathy and its components has not been significant. It is not in agreement with the findings of the study by Hill (2016), in which the age was the positive predictor of the attitude toward the organ donation and the gender was the negative predictor of it [16], as well as the results of study by Rodrigue (2004), in which the gender and marital status had no relationship with the attitudes and beliefs toward the organ donation [34].

Considering the necessity of research in the field of organ donation and the increasing need of the society for it, it is suggested that different methods to be used to increase the feelings of altruism and empathy to strengthen the positive attitude toward the organ donation among nurses in intensive care units.

## CONCLUSION

The results of our research show that empathy and altruism can lead to positive attitudes of nurses toward the organ donation and improve their performance in the organ donation process and ultimately, promote the status of organ donation in the society. More research is needed to understand how empathy and altruism affect the organ donation process. The results showed that altruism and having organ donation card were the most important factors in the tendency of nurses to organ donation. Therefore, the implementation of educational programs regarding changing nurse's attitude in order to increase the sense of altruism and empathy about organ donation is necessary. By strengthening the sense of altruism and empathy in the family of brain death patients, they can be helped to decide on donate their patient's organ with more certainty.

## LIMITATIONS

The present study has been of the kind of correlational research and as a limitation, it cannot be said that the predictor variables have been the main cause of the independent variable. It is suggested that the effects of other psychological and social characteristics on the attitudes of nurses toward the organ donation to be investigated in the next research.

The present research is correlational and as a limitation, it can not be said that the predictor variables are the main cause of the independent variable. Secondly, a questionnaire was used to collect the data. Therefore, considering that the questionnaires had an aspect of self-evaluation, there might be a bias (orientation) in the responses. Therefore, it is suggested that interview and observation be used in subsequent studies. It is also suggested that in the subsequent studies, other tools for measuring altruism and empathy and the effects of other psychological and social characteristics on the nurses' attitude towards organ donation should be investigated.

*The authors declare no conflict of interest.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

## REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grinyó JM. Why is organ transplantation clinically important? *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013; 3 (6): a014985.
2. Vlaisavljevic Z, Živanović D. A nurse is an important factor in increasing organ donation. 2018. 91–94 p.
3. Sánchez-Vallejo A, Gómez-Salgado J, Fernández-Martínez MN, Fernández-García D. Examination of the Brain-Dead Organ Donor Management Process at a Spanish Hospital. *International journal of environmental research and public health*. 2018; 15 (10): 2173.
4. Kiani M, Abbasi M, Ahmadi M, Salehi B. Organ Transplantation in Iran; Current State and Challenges with a View on Ethical Consideration. *J Clin Med*. 2018; 7 (3).

5. *Baghi V, Dalvand S, Farajzadeh M, Nazari M, GHanei GR.* Evaluation of knowledge and attitude towards organ donation among the residents of Sanandag city, Iran. 2017; 4 (1): 1–8.
6. *Mohebi S, Mohammadi-zavareh M, Zamani F, Gharlipor Z, Heidary H.* Factors Affecting Qom Medical School Students' Intention regarding Organ Donation: a Study based on Behavioral Intention Model. *Journal of Health Literacy.* Autumn 2016; 1 (3): 147–154.
7. *Milaniak I, Wilczek-Rużyczka E, Przybyłowski P.* Role of Empathy and Altruism in Organ Donation Decision-making Among Nursing and Paramedic Students. *Transplantation proceedings.* 2018; 50 (7): 1928–1932.
8. *Miller C, Breakwell R.* What factors influence a family's decision to agree to organ donation? A critical literature review. *London journal of primary care.* 2018; 10 (4): 103–107.
9. *Moorlock G, Ives J, Draper H.* Altruism in organ donation: an unnecessary requirement? *Journal of medical ethics.* 2014; 40 (2): 134–138.
10. *Carlo G, Randall BA.* The development of a measure of prosocial behaviors for late adolescents. *Journal of youth and adolescence.* 2002; 31 (1): 31–44.
11. *Feigin S, Owens G, Goodyear-Smith F.* Theories of human altruism: A systematic review. *Journal of Psychiatry and Brain Functions.* 2018; 1 (1): 5.
12. *Eisenberg-Berg N, Cameron E, Tryon K, Dodez R.* Socialization of prosocial behavior in the preschool classroom. *Developmental Psychology.* 1981; 17 (6): 773.
13. *Eisenberg N, Fabes R.* Prosocial development (In W. Damon & N. Eisenberg (Eds.). *Handbook of child psychology: Social, emotional, and personality development.* Berlin: Springer; 1998; 3: 701–778.
14. *Khani L, Hashemianfar SA, Ghaffari M, Smaili R.* The role of moral beliefs and altruism in explaining attitudes toward organ donation with the mediation of act to religious belief. *Med Ethics. J* 2017; 11 (39): 45–53.
15. *Newton JD.* How does the general public view posthumous organ donation? A meta-synthesis of the qualitative literature. *BMC Public Health.* 2011; 11 (1): 791.
16. *Hill EM.* Posthumous organ donation attitudes, intentions to donate, and organ donor status: Examining the role of the big five personality dimensions and altruism. *Personality and Individual Differences.* 2016; 88: 182–186.
17. *Cohen EL, Hoffner C.* Gifts of giving: the role of empathy and perceived benefits to others and self in young adults' decisions to become organ donors. *Journal of Health Psychology.* 2013; 18 (1): 128–138.
18. *Davis M.* *Empathy: A Social Psychological Approach,* 1994. Brown and Benchmark Publishers, Madison, WI.
19. *Wilczek-Rużyczka E, Milaniak I, Przybyłowski P, Wierzbicki K, Sadowski J, editors.* Influence of empathy, beliefs, attitudes, and demographic variables on willingness to donate organs. *Transplantation proceedings;* 2014: Elsevier.
20. *Resnick S, Seamon MJ, Holena D, Pascual J, Reilly PM, Martin ND.* Early declaration of death by neurologic criteria results in greater organ donor potential. *Journal of Surgical Research.* 2017; 29: 218–234.
21. *Bahrami A, Khaleghi E, Vakilzadeh AK, Afzalaghaee M.* Process and barriers to organ donation and causes of brain death in northeast of Iran. *Electronic physician.* 2017; 9 (2): 3797–3802.
22. *O'Leary GM.* Deceased donor organ donation: The critical care nurse's role. *Nursing.* 2019 *Critical Care.* 2018; 13 (4): 27–32.
23. *Mills L, Koulouglioti C.* How can nurses support relatives of a dying patient with the organ donation option? *Nursing in critical care.* 2016; 21 (4): 214–224.
24. *Manzari Z, Masoumian Hoseini ST, Karimi Moonaghi H, Behnam Vashani H.* Effect of Education Based on Nursing Model of Dynamism and Continuous Improvement in Seeking Assurance and Getting Approve on Nurses' Knowledge, Attitude and Practice about Their Role in Organ Donation Process. *J Mazand Univ Med Sci.* 2014; 24 (119): 141–153.
25. *Nacar M, Cetinkaya F, Baykan Z, Elmali F.* Knowledge Attitudes and Behaviors About Organ Donation Among First- and Sixth-class Medical Students: A Study From Turkey. *Transplantation proceedings.* 2015; 47 (6): 1553–1559.
26. *Carlo G, Hausmann A, Christiansen S, Randall BA.* Sociocognitive and behavioral correlates of a measure of prosocial tendencies for adolescents. *The journal of early adolescence.* 2003; 23 (1): 107–134.
27. *Mohammadbagher Kajbaf, Elnaz Sajjadian, Abolghasem Nouri.* A Study of Factor Structur, Validity and Reliability of Pro-social Tendencies Measure Revised Questionnaire Among University Students. *Journal of applied sociology.* 2010; 21 (2): 101–118.
28. *Davis M.* Measuring individual differences in empathy: Evidence for a multidimensional approach. 1983: 113–126.
29. *Khodabakhsh MR.* Relationship between Attachment Style and Empathy in Nursing Students. *IJN.* 2012; 25 (77): 40–49.
30. *Alah Gholilo K, Abolghasemi A, Zahed A.* The Relationship of Mindfulness Skills and Metacognitive Beliefs with Interpersonal Reactivity of Substance Abusers. *Journal of clinical psychology.* 2014; 6 (3): 33–41.
31. *Purbahram R, Ashktorab T, Barazabadi Farahani Z, Nasiri M.* Knowledge and Attitude of the Intensive Care Unit Nurses in Mazandaran Province towards Organ Donation. *Iran Journal of Nursing.* 2017; 30 (107): 1–9.
32. *Khani (MA) L, Ghaffari (MA) M, Hashemian Far (PhD) S.* The Role of Social Capital and Altruism in Prediction of Medical Doctors' Attitudes to Organ Donation. *JBUMS.* 2014; 16 (8): 19–25.
33. *AlHejaili W, Almalik F, Albrahim L, Alkhalidi F, AlHejaili A, AlSayyari A.* Scores of awareness and altruism in organ transplantation among Saudi health colleges students-impact of gender, year of study, and field of specialization. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2018; 29 (5): 1028–1034.
34. *Rodrigue James R, Cornell Danielle L, Jackson Shannon I, Kanasky William, Marhefka Stephanie, Reed Alan I.* Are organ donation attitudes and beliefs, empathy, and life orientation related to donor registration status? *Progress in Transplantation.* 2004; 14 (1): 56–60.

The article was submitted to the journal on 4.06.2019  
Статья поступила в редакцию 4.06.2019 г.

**ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ  
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ОТДЕЛ ПОДГОТОВКИ НАУЧНЫХ И МЕДИЦИНСКИХ КАДРОВ**

Лицензия на осуществление образовательной деятельности № 2643 от 21.09.2017 г.

Россия, 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1, тел. 8 (499) 193-87-62

ФГБУ «НМИЦ ТИО имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России является ведущим научно-исследовательским медицинским учреждением, успешно развивающим одно из приоритетных направлений в современной хирургической науке – трансплантологию.

В Центре осуществляются все виды трансплантации органов пациентам от 3 месяцев до старшего возраста, проводятся все виды кардиохирургических вмешательств. Учреждение оснащено новейшим высокотехнологичным оборудованием, на котором работают высококвалифицированные научные кадры и медицинские специалисты – доктора наук, осуществляющие подготовку врачей и научных работников для регионов Российской Федерации.

На базе клинических отделений Центра организовано проведение циклов повышения квалификации продолжительностью 72 и 144 часа по следующим дополнительным профессиональным программам:

- Анестезиологические пособия и интенсивная терапия при трансплантации жизненно важных органов.
- Болезни почек, почечная недостаточность и заместительная почечная терапия.
- Донорство в клинической трансплантологии.
- Клиническая трансплантация печени.
- Клиническая трансплантация печени у детей.
- Клиническая трансплантация почки.
- Клиническая трансплантация сердца.
- Основы трансплантологии и искусственных органов.
- Патологическая анатомия у больных после аллотрансплантации органов и имплантации искусственных органов.
- Трансплантационная иммунология и иммуносупрессия.
- Деятельность операционной медицинской сестры в клинической трансплантологии.

*Гарантийное письмо на обучение специалистов от организаций высылать на электронную почту.  
E-mail: dim\_vel@mail.ru*

*Консультации организованы в отделе подготовки научных и медицинских кадров (Щукинская, 1, новый корпус, 9-й этаж, ученый секретарь – к. м. н. Великий Дмитрий Алексеевич).*

## ТРЕБОВАНИЯ К ПУБЛИКАЦИЯМ

Статьи должны содержать оригинальные данные, нигде ранее не опубликованные и не направленные на публикацию в другие редакции. Плата за публикацию рукописей не взимается.

Текстовый материал должен быть представлен в формате А4 (1 экземпляр, через 1,5 pt интервала, Times New Roman, 12 pt), а также в виде идентичного файла Microsoft Word на электронном носителе (лазерный диск, прикрепленный к электронному письму файл).

### Схема построения статьи

#### 1. Титульная страница

Должна быть представлена на русском и английском языках и соответствовать шаблону:

- **Название статьи**

Англоязычное название должно быть грамотным с точки зрения английского языка, при этом полностью соответствовать по смыслу русскоязычному названию.

- **Авторы статьи**

При написании авторов статьи инициалы имени и отчества указываются перед фамилией. Ф. И. О. на английском языке необходимо писать так, как в заграничном паспорте или как в ранее опубликованных статьях в зарубежных журналах.

- **Название учреждения**

– Полное официальное название учреждения, город, страна. Наиболее полный список названий учреждений на русском и английском языках можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru

– Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести их названия с Ф. И. О. авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре после фамилии и перед названием учреждения.

- **Для корреспонденции**

Полностью указать фамилию, имя, отчество автора, с которым будет вестись переписка, адрес (с почтовым индексом), телефон, факс, e-mail.

#### Пример титульной страницы

#### Сравнительный анализ диагностической значимости панелей биомаркеров у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации

О.П. Шевченко<sup>1, 2</sup>, А.В. Аксенова<sup>1</sup>, А.А. Улыбышева<sup>1, 3</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>, Е.А. Никитина<sup>1</sup>, В.И. Орлов<sup>1</sup>, Е.А. Стаханова<sup>1</sup>, А.О. Шевченко<sup>1, 2</sup>

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

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

#### Для корреспонденции

Аксенова Александра Владимировна

Адрес:

Тел.:

E-mail:

#### Comparative analysis of diagnostic significance of biomarkers' panels in cardiac recipients in the long term period after transplantation

O.P. Shevchenko<sup>1, 2</sup>, A.V. Aksyonova<sup>1</sup>, A.A. Ulybysheva<sup>1, 3</sup>, N.P. Mozheiko<sup>1</sup>, E.A. Nikitina<sup>1</sup>, V.I. Orlov<sup>1</sup>, E.A. Stakhanova<sup>1</sup>, A.O. Shevchenko<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

#### For correspondence

Aksyonova Alexandra Vladimirovna

Address:

Tel.

E-mail:

#### 2. Реферат

К каждой статье должен быть приложен реферат на русском и английском языках. Объем текста реферата для оригинальной статьи – не более 300 слов, для обзора литературы, клинического наблюдения – не более 200 слов. Реферат должен полностью соответствовать содержанию работы. Англоязычная версия реферата статьи должна по смыслу и структуре соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка. Для перевода реферата не допускается использование электронных программ-переводчиков (например, Google Переводчик) без последующей редакции.

В реферате не следует употреблять аббревиатуры без предварительного раскрытия.

Реферат **оригинальной статьи** должен содержать следующие разделы:

**Цель** (*Aim*),  
**Материалы и методы** (*Materials and methods*),  
**Результаты** (*Results*),  
**Заключение** (*Conclusion*).

В реферате следует представить наиболее существенные результаты проведенных исследований.

Нельзя писать: «*Проведен сравнительный анализ чувствительности и специфичности...*».

Следует писать: «*Чувствительность составила ...% и ...%, p = , специфичность соответственно ...% и ...%, p = ».*

### 3. Ключевые слова

В конце реферата должны быть приведены ключевые слова (*key words*) на русском и английском языках. Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings – MeSH. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

### 4. Указание о конфликте интересов

Автор обязан уведомить редактора о реальном или потенциальном конфликте интересов, включив информацию о конфликте интересов в соответствующий раздел статьи. Если конфликта интересов нет, автор должен также сообщить об этом. Пример формулировки: «Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов».

Данная информация приводится перед текстом статьи.

### 5. Текст статьи

**Оригинальная статья** должна включать следующие разделы:

- Введение
- Материалы и методы
- Результаты
- Обсуждение
- Заключение
- Список литературы

**Обзорная статья** должна содержать анализ литературы с представлением современных источников (в основном за последние 5 лет).

**Клиническое наблюдение** должно быть хорошо иллюстрировано (отражать суть проблемы) и содержать обсуждение вопроса с использованием данных литературы.

**Библиографические ссылки** в тексте статьи обозначаются порядковым номером в квадратных скобках: [1], [2, 5], [14–18] и **в списке литературы представляются по порядку упоминания в тексте независимо от языка ссылки.**

Все величины, приведенные в статье, должны быть выражены или дублированы в единицах СИ.

### 6. Список литературы / References

Автор несет полную ответственность за точность данных, приведенных в приставленном списке литературы. В списке литературы ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Список литературы представляется на отдельной странице. Ссылки на источники располагаются в порядке цитирования и приводятся на языке оригинала.

Названия журналов на русском языке в списке литературы не сокращаются. Если русскоязычный журнал имеет также название на английском языке, оно может быть указано в ссылке после транслитерированного названия. Названия иностранных журналов могут сокращаться в соответствии с вариантом сокращения, принятым конкретным журналом.

Если цитируемая статья имеет DOI (digital object identifier, цифровой идентификатор объекта) и/или PMID (PubMed), его/их необходимо указать в конце ссылки.

В ссылках на русскоязычные статьи, имеющие также название на английском языке, вначале приводится русское, а затем английское название. Если статья не имеет английского названия, ссылка приводится вначале на русском языке, а затем в транслитерированном виде, начиная на той же строке. Транслитерацию рекомендуется выполнять на сайте <http://www.translit.ru> в формате BGN.

В ссылке на неанглоязычные статьи после выходных данных необходимо указать язык публикации и наличие резюме на английском языке, например: [In Russ, English abstract].

Для составления описаний в списке литературы используется стандарт на библиографическую ссылку NLM – National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Если количество авторов не превышает 6, в библиографическом описании указываются все авторы. Если количество авторов более 6, следует указать шесть первых авторов и добавить «и др.» (et al.).

#### Примеры библиографических описаний

1. *Статья из русскоязычного журнала, имеющая англоязычное название*

*Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2015 году. VIII сообщение регистра Российского трансплантологического общества. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 18 (2): 6–26. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2015. 8th report of National Register. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2016; 18 (2): 6–26. [In Russ, English abstract] DOI:10.15825/1995-1191-2016-2-6-26.*

2. *Статья из русскоязычного журнала, не имеющая англоязычного названия*  
Трапезникова МФ, Филиппов ПЯ, Перлин ДВ, Кулачков СМ. Лечение стриктур мочеточника после трансплантации почки. *Урология и нефрология*. 1994; 3: 42–45. Trapeznikova MF, Filiptsev PYa, Perlin DV, Kulachkov SM. Lechenie striktur mochetochnika posle transplantatsii pochki. *Urologiya i nefrologiya*. 1994; 3: 42–45.
3. *Статья из англоязычного журнала*  
Goldstein DJ, Oz MC, Rose EA. Implantable left ventricular assist devices. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1522–1533.
4. *Англоязычная монография*  
Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
5. *Русскоязычная монография*  
Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА (2008), 246 с. Gautier SV, Konstantinov BA, Tsi-rulnikova OM. *Transplantatsiya pecheni*. М.: МИА (2008), 246.
6. *Диссертация (автореферат диссертации)*  
Орлова ОВ. Роль маркеров воспаления, тромбоза, неоангиогенеза и апоптоза в прогнозировании васкулопатии сердечного трансплантата: дис. ... докт. мед. наук. М., 2009, 84 с. Orlova OV. Rol' markerov vospaleniya, tromboza, neoangiogeneza i apoptoza v progno-

zirovanii vaskulopatii serdechnogo transplantata. [Dissertation]. М., 2009, 84.

7. *Ресурс в сети Internet*  
Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

## Требования к таблицам и иллюстрациям

**Таблицы** следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

**Иллюстрации и рисунки** должны быть представлены в электронном виде (формат JPEG или TIF с разрешением не менее 300 точек на дюйм и размером не менее 6 × 9 см), в объеме, близком к 1 Мб. Рисунок должен содержать все авторские обозначения – стрелки, цифры, указатели и пр. Подписи к рисункам должны быть представлены в отдельном файле с расширением \*.doc. Сначала дается название, а затем объясняются все цифровые и буквенные обозначения.

**Названия таблиц, иллюстраций и рисунков, а также объяснения к ним должны быть представлены на русском и английском языках.**

**Статьи направлять в редакцию журнала по адресу:**

123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1, ФГБУ «НМИЦ ТИО им. академика В.И. Шумакова»,  
«Вестник трансплантологии и искусственных органов»  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Articles should contain original information that has not been previously published and is not considered for publication in other editions. Fee for publication of manuscripts will not be charged.

Textual material should be presented in A4 format (1 copy, 1,5 pt spaced, font type Times New Roman, size 12 pt), as well as in Microsoft Word file of the identical content on electronic media (CD, attached to an e-mail file).

### Structure of the article

The Title page should include:

- Initials (first name and patronymic) of the authors of the article should be specified before their respective last names.

- Full official name of the institution, city and country.
- If authors from different institutions participated in writing of the manuscript, it is necessary to correlate those with the names of the authors by adding a digital index uppercase after last name, and right before the name of the institution.

### Information about the authors

For each author fully specify the last and the first name, patronymic and position in the relevant department/institution.

## For correspondence

Fully specify the last and the first name, patronymic of the author, who will be holding correspondence, address (including postal code), telephone, fax number, e-mail.

## Abstract

Each article must be accompanied by an abstract. The amount of text for the abstract of the original article should be of no more than 300 words, for a literature review, clinical observation – no more than 200 words. The abstract must fully comply with the content of the work. The abstract should not use abbreviations without prior expansion.

Abstract of *the original article* should contain the following sections: *Aim, Materials and methods, Results, Conclusion*. The abstract should present the most important results of the research.

Do not write: «*A comparative analysis of the sensitivity and specificity was conducted ...*»

Should write: «*The sensitivity was ... % and ...%, p = , specificity, respectively ...% and ...%, p = ».*

## Key words

At the end of the abstract keywords must be given. To select the keywords a thesaurus of U.S. National Library of Medicine should be used – Medical Subject Headings (MeSH) at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>.

## Conflict of interest

The author should inform the editor about the factual or potential conflict of interest have included the information about such conflict into the respective section of an article.

If there is no conflict of interest, the author should say so in the form like the following: «Author declares unawareness of the conflict of interest».

This information is supposed to be placed before the article text.

## Text of article

**Original article** should include the following sections:

- Introduction
- Materials and methods
- Results
- Discussion
- Conclusion
- References

**Review article** should include an analysis of the literature with the presentation of modern sources (mainly in the last 5 years).

**Clinical observation** should be well illustrated (to reflect the essence of the problem) and include discussion with the use of literature data.

*References* in the text are indicated by number in square brackets: [1], [2, 5], [14–18] and *in the references section are presented in order of their appearance in the text*. All values given in the article should be expressed or duplicated in **SI** units.

## References

The author is solely responsible for the accuracy of the data included in the references section of the article. References to unpublished papers or papers in print works are not allowed.

References are presented on a separate page.

The names of journals can be contracted in accordance with an embodiment of reduction adopted by the specific journal.

If the article quoted has DOI (a digital object identifier) or/and PMID (Pub Med identifier) they must be specified after the description of the article. To compile descriptions in References section NLM bibliographic reference citation standard is used – U.S. National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). If the number of authors does not exceed 6, the bibliographic description includes all the authors. If the number of authors is more, only the first six authors should be indicated and then add et al.

## Requirements for tables and figures

**Tables** should be placed into the text; they should have numbered heading and clearly labeled graphs, convenient and simple to read. Table's data must comply with the numbers in the text, but should not duplicate the information therein. Table references in the text are required.

**Illustrations and drawings** should be submitted in electronic format (JPEG or TIFF format with a resolution of at least 300 dpi and no smaller than 6 × 9 cm), in a volume of close to 1 MB. Drawings must include all copyright symbols – arrows, numbers, signs, etc. Figure captions should be submitted in a separate file with the extension \*.doc. First, the name is given, then all arithmetic and alphabetical symbols (lettering) are explained.

### Articles should be addressed to the Editor at:

Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs  
V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs  
1, Shchukinskaya ul., Moscow 123182, Russian Federation  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)

## ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В 2019 ГОДУ В ЖУРНАЛЕ «ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ»

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

- В.Н. Попцов, Е.А. Спирина, С.Ю. Устин, С.А. Масютин, А.А. Догонашева, В.Ю. Воронков, Е.Н. Золотова, А.И. Скокова*  
Трансплантация донорского сердца с гипертрофией миокарда левого желудочка 1,5 см и более..... № 1 (7–16)
- Н.Н. Колоскова, В.Н. Попцов, В.М. Захаревич, И.И. Муминов, Н.П. Можейко, О.Е. Гичкун, Е.А. Никитина, В.С. Кван, Т.А. Халилулин, А.Р. Закирьянов, А.О. Шевченко*  
Гендерные аспекты развития кризов антителоопосредованного отторжения и васкулопатии трансплантата у реципиентов пересаженного сердца: опыт одного центра ..... № 1 (17–22)
- Н.А. Авксентьев, Е.В. Деркач, Е.И. Прокопенко*  
Фармакоэкономическое исследование применения эверолимуса для иммуносупрессивной терапии у de novo реципиентов почечного трансплантата в России..... № 1 (23–34)
- А.В. Ватазин, А.Б. Зулъкарнаев, В.А. Степанов*  
Анализ выживаемости пациентов в листе ожидания трансплантации почки с позиции конкурирующих рисков..... № 1 (35–45)
- Л.К. Тхатль, Т.В. Ставенчук, Е.Д. Космачева, И.А. Паикова*  
Критерии диагностики гуморального отторжения с помощью методики 2D-speckle-tracking echocardiography ..... № 1 (46–56)
- С.В. Романов, О.П. Абаева, О.Ю. Александрова, Г.Ю. Смирнова*  
Проблемы и перспективы построения системы органного донорства в регионе (на примере Нижегородской области) ..... № 1 (57–63)
- В.А. Клевно, М.Л. Арефьев*  
Анализ пула потенциальных доноров Московской области и случаев изъятия органов для трансплантации, подвергшихся судебно-медицинскому исследованию в 2017 году ..... № 1 (64–70)
- С.В. Готье, В.М. Захаревич, Т.А. Халилулин, А.О. Шевченко, В.Н. Попцов, Р.Л. Ахмадзай, А.М. Гольц, А.Р. Закирьянов, Н.Н. Колоскова, Н.Ю. Захаревич, Е.А. Никитина, О.А. Поздняков, К.С. Кирьяков*  
Трансплантация сердца как радикальный метод восстановления качества жизни у пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности ..... № 2 (7–15)
- И.Ю. Логинова, О.В. Каменская, А.М. Чернявский, Д.В. Доронин, С.А. Альсов, В.Н. Ломиворотов*  
Динамика парциального давления углекислого газа в конечной порции выдоха при кардиопульмональном нагрузочном тестировании до и после трансплантации сердца..... № 2 (16–22)
- В.Н. Попцов, Е.А. Спирина, В.В. Пчельников, В.М. Хатуцкий, Э.З. Алиев, В.Ю. Воронков, Л.Р. Насипова, А.С. Епремян, Е.Н. Золотова, А.И. Скокова, П.М. Агасян*  
Трансплантация сердца от доноров, перенесших сердечно-легочную реанимацию ..... № 2 (23–30)
- М.Ш. Хубутия, Н.В. Шмарина, И.В. Дмитриев*  
11-летний опыт повторной трансплантации почки у пожилых реципиентов в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ..... № 2 (31–38)
- В.С. Дайнеко, А.Н. Ананьев, Е.С. Невирович, А.Е. Скворцов, С.А. Будылев, А.Н. Селиванов, М.М. Москаленко, В.А. Мануковский, О.Н. Резник*  
Результаты трансплантации почки пациентам с терминальной почечной недостаточностью, обусловленной аутосомно-доминантным поликистозом почек..... № 2 (39–48)
- А.Б. Зулъкарнаев, Н.М. Фоминых, З.Б. Карданахшвили*  
Сосудистый доступ и выживаемость пациентов на гемодиализе: особенности причинно-следственной связи..... № 2 (49–58)
- З.Б. Карданахшвили, А.Б. Зулъкарнаев*  
Стеноз центральных вен и методы его лечения у больных на гемодиализе ..... № 2 (59–68)
- П.И. Захаров, П.П. Портнягин, В.С. Сивцев, С.В. Ломоносов, В.И. Павлов, Д.А. Данилов, А.Г. Николаев, Д.В. Васильев, А.С. Коростелев*  
Первый клинический случай трансплантации сердца в Дальневосточном федеральном округе ..... № 2 (69–74)
- С.В. Готье, С.М. Хомяков*  
Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2018 году. XI сообщение регистра Российского трансплантологического общества..... № 3 (7–32)
- О.П. Шевченко, О.М. Цирульникова, О.Е. Гичкун, И.В. Паиков, С.О. Шарпаченко, Д.А. Великий*  
Особенности профиля экспрессии микроРНК у потенциальных реципиентов легких ..... № 3 (33–38)
- И.Г. Ким, Н.А. Томилина, И.В. Островская, И.А. Скрябина, Н.Д. Федорова*  
Анализ результатов раннего применения эверолимуса в комбинации с минимизированной дозой ингибиторов кальциневрина после трансплантации почки..... № 3 (39–52)

<i>Г.А. Акопов, А.С. Иванов, В.Н. Попцов, М.К. Луговский, А.М. Погосян</i> Реконструктивная хирургия донорского сердца перед его трансплантацией .....	№ 3 (53–61)
<i>О.П. Шевченко, А.А. Ульбышева, О.Е. Гичкун, Н.П. Можейко, Е.А. Стаханова, В.С. Кван, А.О. Шевченко</i> Галектин-3 при отторжении и фиброзе трансплантированного сердца.....	№ 3 (62–68)
<i>М.А. Симоненко, Г.В. Николаев, К.Н. Маликов, П.А. Федотов, Ю.В. Сазонова, М.А. Борцова, В.Е. Рубинчик, А.О. Маричев, А.Е. Баутин, М.Ю. Ситникова, М.Л. Гордеев, М.А. Карпенко</i> Трансплантация сердца у реципиентов с исходной легочной гипертензией: 9-летний опыт НМИЦ имени В.А. Алмазова.....	№ 4 (7–13)
<i>С.А. Саховский, Н.Н. Колоскова, Д.А. Изотов, Е.А. Спирина, А.Ю. Гончарова, В.М. Лучкин, Б.Л. Миронков</i> Оценка продолжительности жизни реципиентов сердца с трансмиссивным атеросклерозом коронарных артерий.....	№ 4 (14–19)
<i>О.А. Герасимова, В.В. Боровик, Ф.К. Жеребцов, Д.А. Гранов</i> Злокачественные новообразования внепеченочной локализации после трансплантации печени: опыт одного трансплантационного центра .....	№ 4 (20–25)
<i>В.Л. Коробка, В.Д. Пасечников, Е.С. Пак, М.Ю. Кострыкин, А.В. Ткачев, Н.И. Балин, Р.Е. Громыко, Р.В. Коробка, А.М. Шаповалов, А.М. Бабиева, А.В. Микутин, В.С. Агабекян</i> Выбывание из листа ожидания кандидатов на трансплантацию печени (делистинг) вследствие рекомпенсации хронических заболеваний печени – характеристика пациентов и предикторы делистинга в проспективном исследовании.....	№ 4 (26–35)
<i>И.М. Ильинский, Н.П. Можейко, Д.В. Воронов, М.Г. Минина, О.М. Цирульникова, С.В. Готье</i> Особенности морфологии биоптатов печени доноров старше 60 лет .....	№ 4 (36–40)

## ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ

<i>Г.П. Иткин, А.С. Бучнев, А.П. Кулешов, А.И. Сырбу</i> Оценка биоэнергетики сокращения миокарда в условиях механической поддержки кровообращения .....	№ 1 (71–76)
<i>Т.В. Глушкова, Е.А. Овчаренко, М.А. Резцова, К.Ю. Клышников, А.В. Батрагин, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараиш</i> Анализ причин дисфункций биопротезов клапанов сердца на примере дисфункции биопротеза «ЮниЛайн».....	№ 2 (75–83)
<i>А.С. Бучнев, А.П. Кулешов, А.А. Дробышев, Г.П. Иткин</i> Гемодинамическая оценка нового метода генерации пульсирующего потока в системах сердечно-легочного обхода.....	№ 3 (69–75)
<i>А.Г. Строков, Я.Л. Поз</i> Оптимизация конвекционного потока при онлайн гемодиализации .....	№ 4 (41–44)

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

<i>Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, И.В. Вахрушев, А.В. Цветкова, А.А. Грядунова, К.Н. Ярыгин, В.И. Севастьянов</i> Сравнительное исследование процесса хондрогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из разных источников.....	№ 1 (101–112)
<i>З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, В.И. Севастьянов</i> Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток .....	№ 1 (113–121)
<i>М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, М.Е. Крашенинников, А.О. Никольская, Е.А. Волкова, И.М. Ильинский, Н.П. Можейко, В.И. Севастьянов, С.В. Готье</i> Влияние соотношения клеток печени и ММСК костного мозга в имплантируемых клеточно-инженерных конструкциях печени на эффективность восстановления функциональных и морфологических показателей при хронической печеночной недостаточности .....	№ 1 (122–134)
<i>Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, В.Ю. Белов, В.И. Севастьянов</i> Исследование возможности трансдермального переноса циклоспорина на модельных системах.....	№ 1 (135–141)
<i>Л.В. Антонова, В.Н. Сильников, М.Ю. Ханова, Л.С. Королева, И.Ю. Серпокрылова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.А. Сенокосова, А.В. Миронов, Е.О. Кривкина, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараиш</i> Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами .....	№ 1 (142–152)
<i>Д.Д. Наместникова, И.Л. Губский, Д.И. Салихова, Г.Е. Леонов, К.К. Сухинич, П.А. Мельников, Д.А. Вишневский, Э.А. Черкашова, А.Н. Габашивили, Т.Б. Бухарова, В.В. Бурунова, Т.Х. Фатхудинов, В.П. Чехонин, Л.В. Губский, С.Л. Киселев, Д.В. Гольдштейн, К.Н. Ярыгин</i> Терапевтическая эффективность внутриартериального введения нейтральных прогениторных клеток, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, при остром экспериментальном ишемическом инсульте у крыс .....	№ 1 (153–164)

*С.А. Борзенко, Е.И. Хаценко, Д.С. Островский, М.Х. Хубецова, А.В. Шацких, И.Г. Трифаненкова, М.А. Плахотный, Е.В. Ерохина*  
 Разработка техники трансплантации 3D-клеточных сфероидов ретиального пигментного эпителия в опыте на животных ..... № 2 (84–91)

*Е.С. Евстратова, П.В. Шегай, С.В. Попов, Н.В. Воробьев, С.А. Иванов, А.Д. Каприн*  
 Современные возможности регенеративной медицины: биофабрикация полых органов ..... № 2 (92–103)

*Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, Е.А. Волкова, В.И. Севастьянов*  
 Экспериментальная имплантация тканеинженерной конструкции поджелудочной железы ..... № 2 (104–111)

*В.В. Комок, Н.С. Буненков, С.А. Белый, В.М. Пизин, В.М. Кондратьев, А.В. Дулаев, В.И. Лукашенко, А.Е. Кобак, Т.С. Максимова, И.П. Сергиенко, Е.В. Парусова, Л.А. Смирнова, Е.В. Бабенко, Б.В. Афанасьев, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава*  
 Оценка безопасности трансплантации аутологичных мононуклеаров костного мозга в комбинированном лечении ишемической болезни сердца. Результаты рандомизированного, слепого, плацебо контролируемого исследования (TAMIS) ..... № 2 (112–120)

*З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, В.И. Севастьянов*  
 Сравнительный анализ регенераторной активности клеток костного мозга и общей РНК, выделенной из них, при хроническом фиброзирующем повреждении печени ..... № 3 (100–110)

*С.А. Борзенко, М.Ю. Герасимов, Д.С. Островский, Б.Э. Малюгин*  
 Культивирование клеток эпителия слизистой губы человека для аутологичной трансплантации при двустороннем синдроме лимбальной недостаточности роговицы ..... № 3 (111–120)

*А.А. Попов, В.А. Кирсанова, И.К. Свиридова, С.А. Ахмедова, М.М. Филлюшин, Н.С. Сергеева*  
 Остеозамещающие свойства скелета аквакультур склерактиниевых кораллов (экспериментальное исследование) ..... № 3 (121–126)

*Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, А.С. Пономарева, Е.А. Немец, Ю.Б. Басок, Г.Н. Бубенцова, В.А. Сургученко, В.И. Севастьянов*  
 Сравнительный анализ секреторной способности островков Лангерганса, культивированных с биополимерным коллагенсодержащим гидрогелем и тканеспецифическим матриксом ..... № 4 (45–53)

*В.В. Комок, Н.С. Буненков, С.А. Белый, В.М. Пизин, В.М. Кондратьев, А.В. Дулаев, А.Е. Кобак, Т.С. Максимова, И.П. Сергиенко, Е.В. Парусова, Л.А. Смирнова, Е.В. Бабенко, Б.В. Афанасьев, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава*  
 Оценка эффективности комбинированного лечения ишемической болезни сердца – аортокоронарное шунтирование, трансплантация аутологичных мононуклеаров костного мозга: результаты рандомизированного, слепого, плацебо контролируемого исследования ..... № 4 (54–66)

*М.А. Резвова, Е.А. Овчаренко, П.А. Никишев, С.В. Костюк, Л.В. Антонова, Т.Н. Акентьева, Т.В. Глушкова, Е.Г. Великанова, Д.К. Шишкова, Е.О. Кривкина, К.Ю. Клышников, Ю.А. Кудрявцева, Л.С. Барбараиш*  
 Перспективы использования триблок-сополимеров SIBS в кардиохирургии: *in vitro* и *in vivo* исследование в сравнении с ePTFE ..... № 4 (67–80)

*А.С. Сотниченко, И.В. Гилевич, К.И. Мелконян, Я.А. Юцкевич, А.В. Каракулев, С.Б. Богданов, И.М. Быков, А.Н. Редько, В.А. Порханов, С.Н. Алексеенко*  
 Разработка методики получения дермального внеклеточного матрикса ..... № 4 (81–87)

*Д.С. Барановский, А.В. Ляндуп, М.В. Балясин, И.Д. Клабуков, О.А. Красильникова, М.Е. Крашенинников, В.Д. Паришин*  
 Интерлейкин II-1 $\beta$  стимулирует ревитализацию хрящевого матрикса назальными хондроцитами человека *in vitro* ..... № 4 (88–95)

*М.В. Балясин, Д.С. Барановский, А.Г. Демченко, А.Л. Файзуллин, О.А. Красильникова, И.Д. Клабуков, М.Е. Крашенинников, А.В. Ляндуп, В.Д. Паришин*  
 Экспериментальная ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции трахеи, созданной на основе заселенного мезенхимальными и эпителиальными клетками девитализированного матрикса ..... № 4 (96–107)

**КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ**

*Е.Э. Кливер, И.С. Мурашов, А.М. Волков, Е.Н. Кливер, Д.В. Доронин*  
 Трансплантация сердца у больной с первичной злокачественной опухолью миокарда ..... № 1 (77–81)

*Ю.Г. Мотин, О.В. Омельченко, Д.Б. Лохин, С.В. Гаппоев, Е.Н. Семенова, А.Ю. Прохожнев, В.А. Яковлев, Е.В. Григоров, А.Ю. Грызлов, А.Л. Ключев*  
 Поражение гломерулярного аппарата почки при полиомавирусной нефропатии трансплантата ..... № 1 (82–87)

*А.Е. Скворцов, С.Ф. Багненко, С.С. Комедев, В.М. Теплов, И.И. Колачев, А.Ю. Щуров, А.Л. Меркулов, В.П. Филатов, А.А. Бойков, О.Н. Резник*  
 Первый в Российской Федерации случай успешной трансплантации печени и почек от донора с внегоспитальной необратимой остановкой сердца ..... № 1 (88–95)

*А.А. Шилов, А.В. Безденежных, В.И. Ганюков, Р.С. Тарасов, Е.Г. Учасова, О.Л. Барбараиш, Л.С. Барбараиш*  
 Случай успешного стентирования коронарной артерии у пациента с трансплантированным сердцем при остром коронарном синдроме ..... № 1 (96–100)

- А.Д. Сапожников, А.Д. Перлина, И.Н. Дымков*  
Регрессия саркомы Капоши после длительного лечения ингибиторами m-TOR и полной отмены иммуносупрессии у реципиента после трансплантации почки..... № 2 (121–124)
- Д.А. Гранов, А.А. Поликарпов, И.И. Тилеубергенов, В.Н. Жуйков, А.В. Моисеенко, А.Р. Шералиев, И.Г. Карданова*  
Случай успешной ретрансплантации печени у пациента с ранним тромбозом печеночной артерии, осложненным некрозом желчных протоков, сепсисом..... № 3 (76–83)
- А.С. Иванов, М.К. Луговский, И.М. Ильинский, Н.П. Можейко, Н.Н. Абрамова*  
Доброкачественная шваннома правого предсердия ..... № 3 (84–89)
- О.Н. Ветчинникова, Е.Ю. Полякова*  
Кальцификация периферических артерий и двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия скелета у пациентов на заместительной почечной терапии ..... № 3 (90–99)

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- С.А. Саховский, Н.Н. Колоскова, А.Ю. Гончарова, Б.Л. Миронков*  
Внутрисосудистые методы визуализации в оценке васкулопатии трансплантированного сердца ..... № 1 (165–168)
- И.В. Пашков, В.Н. Попцов, Д.О. Олешкевич, С.В. Готье*  
Осложнения раннего послеоперационного периода после трансплантации легких..... № 2 (125–137)
- Д.А. Великий, С.О. Шарпаченко, И.В. Пашков, О.Е. Гичкун, О.П. Шевченко*  
МикроРНК у реципиентов легких: перспективы клинического применения..... № 2 (138–144)
- А.А. Улыбышева, О.П. Шевченко, О.Е. Гичкун, А.О. Шевченко*  
Галектин-3 у реципиентов сердца..... № 2 (145–149)
- И.М. Ильинский, А.С. Иванов, Н.П. Можейко, М.К. Луговский*  
Шванномы сердца..... № 2 (150–160)
- И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*  
Неалкогольная жировая болезнь печени – быстро растущее показание к трансплантации печени в современном мире ..... № 3 (127–140)
- В.Э. Дубров, Е.С. Климашина, И.М. Щербаков, Г.А. Шипунов, В.И. Путляев, П.В. Евдокимов, А.А. Тихонов, С.В. Гулько, Д.А. Зюзин*  
Возможности получения и применения биоматериалов на основе гидрогелей для регенерации костной ткани человека ..... № 3 (141–150)
- Е.И. Прокопенко*  
Цитомегаловирусная инфекция после трансплантации почки: реальные достижения и перспективы изучения патогенеза, профилактики и лечения..... № 3 (151–165)
- Д.А. Сайдулаев, И.А. Милосердов, С.В. Готье*  
Профилактика и хирургические методы лечения урологических осложнений у реципиентов почки ..... № 3 (166–173)
- И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*  
Новые тенденции в исследовании острого повреждения почек после трансплантации печени ..... № 4 (108–120)
- А.В. Созыкин, О.П. Шевченко, Я.А. Наумов, А.Г. Строков, В.П. Васильева, А.О. Шевченко*  
Внутрисосудистая визуализация атеросклеротических бляшек у больных с кардиоренальным синдромом: возможности оптической когерентной томографии..... № 4 (121–128)
- Я.Л. Поз, А.Г. Строков*  
Модификация кислотного иона в составе диализирующей жидкости..... № 4 (129–133)
- Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая, В.И. Севастьянов*  
Перспективы применения сперматогонимальных стволовых клеток при лечении мужской инфертильности..... № 4 (134–142)
- М.О. Жульков, А.В. Фомичев, С.А. Альсов, Е.Н. Кливер, А.М. Чернявский*  
Современное состояние проблемы и результаты ex vivo перфузии донорских сердец..... № 4 (143–146)

## ВОПРОСЫ ЭТИКИ И ФИЛОСОФИИ

- О.Н. Резник, А.М. Прилуцкий, В.Ю. Лебедев, Д.В. Михель*  
Неприятие обществом проблемы посмертного донорства органов: причины и структура мортальных страхов..... № 1 (169–179)

## ИСТОРИЧЕСКИЕ И ГУМАНИТАРНЫЕ АСПЕКТЫ

- А.Я. Иванюшкин, О.Н. Резник, О.В. Попова*  
С.С. Брюхоненко – основоположник технологии искусственного кровообращения (философско-методологический и социокультурный контекст)..... № 4 (147–154)
- Yekefallah Leili, Dehghankar Leila, Taherkhani Mahnaz, Ranjbaran Mehdi*  
Роль альтруизма и эмпатии в отношении к донорству органов у медсестер в отделениях интенсивной терапии в Казвине: перекрестное исследование ..... № 4 (155–162)

Перепечатка опубликованных в журнале материалов допускается только с разрешения редакции.

При использовании материалов ссылка на журнал обязательна.

Присланные материалы не возвращаются.

Редакция не несет ответственности за достоверность рекламной информации.

Издание зарегистрировано в Госкомпечати РФ, № 018616 от 23.03.99 г.

Подписано к печати 24.12.19.

Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «Триада».

ИД № 06059 от 16.10.01 г.

170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 514,

тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30

E-mail: triadatver@yandex.ru

<http://www.triada.tver.ru>

Отпечатано в ООО «Тверская фабрика печати».

170006, г. Тверь, Беляковский пер., 46.

Заказ \_\_\_\_