

ISSN 1995-1191

ВЕСТНИК

ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ



Russian Journal
of Transplantology
and Artificial Organs

ТОМ XXII

№ 1–2020

ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ



УЧРЕДИТЕЛЬ: ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ
«РОССИЙСКОЕ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»

2020. Том XXII. № 1

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»

2020. Vol. XXII. № 1

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. Tsurulnikova (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. Шляхто (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. Щукинская, 1
Тел./факс +7 (499) 193 87 62
E-mail: 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
Journal's web site: <http://journal.transpl.ru>
Scientific eLibrary: <http://elibrary.ru>

СОДЕРЖАНИЕ

СТРАНИЦА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Трансплантация органов детям
в Российской Федерации
С.В. Готье

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

Диагностическая значимость галектина-3
при патологии миокарда трансплантированного
сердца

*О.П. Шевченко, А.А. Улыбышева, Н.П. Можейко,
О.Е. Гичкун, Е.А. Стаханова, В.П. Васильева,
А.О. Шевченко*

Изолированный некомпактный миокард левого
желудочка сердца: клинико-морфологическое
исследование

*И.М. Ильинский, А.С. Иванов, Н.П. Можейко,
М.К. Луговский*

Уровень экспрессии микроРНК в ранние
и отдаленные сроки после трансплантации
у реципиентов сердца

*Д.А. Великий, О.Е. Гичкун, С.О. Шарапченко,
О.П. Шевченко, А.О. Шевченко*

Необходимость проведения микционной
цистоуретрографии для оценки взрослых кандидатов
на трансплантацию почки

М. Сарьер, М. Каллиоглу, Ю. Юксел

Возрастные особенности субпопуляционного
состава лимфоцитов и функциональной
активности мононуклеаров периферической крови
у больных хронической болезнью почек до и после
трансплантации

Д.В. Артемов, А.Б. Зулкарнаев, А.В. Ватазин

Скрининг гемотрансмиссивных инфекций
у посмертных доноров роговицы в Глазном
тканевом банке НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза»
имени академика С.Н. Федорова»

*С.А. Борзенко, М.Ю. Герасимов, Х.Д. Тонаева,
М.Х. Хубецова, Т.З. Керимов, Ю.А. Комах*

Программа трансплантации Боткинской больницы:
опыт 100 трансплантаций солидных органов

*А.В. Шабунин, И.П. Парфенов, М.Г. Минина, П.А. Дроздов,
И.В. Нестеренко, Д.А. Makeev, О.С. Журавель*

ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ

Неоднозначные результаты баллонной ангиопластики
при стенозах центральных вен у пациентов
на гемодиализе с нативной артериовенозной
фистулой

*З.Б. Карданахшвили, А.Б. Зулкарнаев, Б.В. Байков,
В.А. Степанов*

Зависимость механических свойств протеза-кольца
для аннулопластики митрального клапана от режимов
термической обработки

*К.Ю. Клышников, Т.В. Глушкова, Н.А. Щеглова,
А.В. Костельцев, Е.А. Овчаренко*

Результаты коррекции пороков аортального клапана
каркасным ксеноперикардальным протезом
«БиоЛАБ» малых размеров у возрастных пациентов

*С.И. Бабенко, Р.М. Муратов, Т.А. Чабайдзе, Н.Н. Соболева,
М.Н. Сормомов*

CONTENTS

EDITORIAL

- 6 Pediatric Organ Transplantation
in the Russian Federation
S.V. Gautier

ORGAN TRANSPLANTATION

- 8 Diagnostic value of galectin-3 in heart transplant
recipients with myocardial complications
*O.P. Shevchenko, A.A. Ulybysheva, N.P. Mozheiko,
O.E. Gichkun, E.A. Stakhanova, V.P. Vasilieva, A.O. Shevchenko*
- 16 Isolated non-compaction of the left ventricular
myocardium: a clinical and morphological study
I.M. Iljinsky, A.S. Ivanov, N.P. Mozheiko, M.K. Lugovskiy
- 26 MicroRNA expression levels in early and long-term period
following heart transplantation
*D.A. Velikiy, O.E. Gichkun, S.O. Sharapchenko,
O.P. Shevchenko, A.O. Shevchenko*
- 35 The necessity of voiding cystourethrogram
for the evaluation of recipient candidates in adult renal
transplantation
M. Sarier, M. Callioglu, Yu. Yuksel
- 40 Age-related features of the pattern of lymphocyte
subpopulations and functional activity of peripheral
blood mononuclear cells in patients with chronic kidney
disease before and after transplantation
D.V. Artemov, A.B. Zulkarnaev, A.V. Vatazin
- 50 Screening of cadaver cornea donor for infections
in the eye bank of the Fyodorov Eye Microsurgery
Federal State Institution
*S.A. Borzenok, M.Yu. Gerasimov, H.D. Tonaeva,
M.K. Khubetsova, T.Z. Kerimov, Yu.A. Komakh*
- 55 Botkin Hospital Transplant Program: 100 solid organ
transplantations
*A.V. Shabunin, I.P. Parfenov, M.G. Minina, P.A. Drozdov,
I.V. Nesterenko, D.A. Makeev, O.S. Zhuravel*

ARTIFICIAL ORGANS

- 59 Ambiguous results of balloon angioplasty for central vein
stenosis in hemodialysis patients with native arteriovenous
fistula
*Z.B. Kardanakhishvili, A.B. Zulkarnaev, B.V. Baykov,
V.A. Stepanov*
- 72 Dependence of mechanical properties of mitral valve
annuloplasty rings on annealing modes
*K.Yu. Klyshnikov, T.V. Glushkova, N.A. Shcheglova,
A.V. Kostelcev, E.A. Ovcharenko*
- 79 Results of correction of aortic valve defects using
small-diameter «BioLAB» xenopericardial prosthesis in old
patients
*S.I. Babenko, R.M. Muratov, T.A. Chabaidze, N.N. Soboleva,
M.N. Sorkomov*

Биодеградируемый сосудистый протез малого диаметра: виды модифицирования биологически активными молекулами и RGD-пептидами
Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараи

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Первый опыт успешного вынашивания двух последовательных беременностей после симультанной трансплантации печени с рено-портальной транспозицией и почки
О.В. Ткаченко, О.О. Руммо, К.У. Вильчук, И.В. Курлович, А.Е. Щерба, О.В. Калачик, А.М. Дзядзько, С.Ю. Нагибович, И.В. Наумчик, В.В. Римашевский, О.А. Панкратова, М.А. Фролова

Одномоментная лапароскопическая билатеральная нефруртерэктомия, аллотрансплантация трупной почки и формирование везикостомы у больного с нейрогенным мочевым пузырем
С.В. Арзуманов, И.В. Чучина, А.Е. Митиш, С.К. Яровой

Фатальное развитие плоскоклеточного рака через 10 лет после аллотрансплантации трупной почки
И.Н. Дымков, А.В. Смирнов, А.Д. Перлина, К.Г. Тайлер, И.В. Александров

Применение левосимендана при трансплантации легких в условиях ВА ЭКМО
С.В. Журавель, В.Э. Александрова, И.И. Уткина, Н.К. Кузнецова, Е.А. Тарабрин

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Децеллюляризация фрагмента донорской поджелудочной железы для получения тканеспецифического матрикса
А.С. Пономарева, Л.А. Кирсанова, Н.В. Баранова, В.А. Сургученко, Г.Н. Бубенцова, Ю.Б. Басок, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов

Внутрибелочная имплантация тканеинженерной конструкции поджелудочной железы крысам с экспериментальным сахарным диабетом
Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, В.И. Севастьянов

Модель биомедицинского клеточного продукта для доклинических исследований на крупном лабораторном животном
М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, А.А. Стручков, А.А. Ежеская, В.И. Загреков, Л.Н. Соснина, Е.В. Загайнова

Формирование опорно-двигательной культи глазного яблока с помощью тканеинженерной конструкции из никелида титана и аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови
Е.А. Горбунова, О.И. Кривошеина, Л.Р. Мустафина

Трансплантация тканевых эквивалентов в лечении некоторых повреждений кожи
Е.М. Фоминых, В.Н. Митрофанов, О.П. Живцов, А.А. Стручков, В.Ф. Зубрицкий, Ю.Н. Лебедева, Е.А. Воротеляк, Ю.В. Суханов

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Глобальный дефицит донорских органов: анализ национальных стратегий самообеспечения
О.Н. Резник, Д.В. Михель

86 Biodegradable small-diameter vascular graft: types of modification with bioactive molecules and RGD peptides
E.A. Senokosova, E.O. Krivkina, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

CLINICAL CASES

97 First experience in two successful consecutive pregnancies after simultaneous liver-kidney transplantation with reno-portal transposition
O.V. Tkachenko, O.O. Rummo, K.U. Vilchuk, I.V. Kurlovich, A.E. Shcherba, O.V. Kalachik, A.M. Dzyadzko, C.Y. Nagibovich, I.V. Naumchik, V.V. Rimashevski, O.A. Pankratova, M.A. Frolova

107 Simultaneous laparoscopic bilateral nephroureterectomy, cadaveric kidney allotransplantation and performance of vesicostomy in a patient with neurogenic bladder
S.V. Arzumanov, I.V. Chuchina, A.E. Mitish, S.K. Yarovoy

114 Fatal progression of squamous cell carcinoma 10 years after cadaveric kidney transplantation
I.N. Dymkov, A.V. Smirnov, A.D. Perlina, K.G. Tailer, I.V. Alexandrov

118 Levosimendan in lung transplant recipients on VA-ECMO
S.V. Zhuravel', V.E. Aleksandrova, I.I. Utkina, N.K. Kuznetsova, E.A. Tarabrin

REGENERATIVE MEDICINE AND CELL TECHNOLOGIES

123 Decellularization of donor pancreatic fragment to obtain a tissue-specific matrix scaffold
A.S. Ponomareva, L.A. Kirsanova, N.V. Baranova, V.A. Surguchenko, G.N. Bubentsova, Yu.B. Basok, I.A. Miloserdov, V.I. Sevastianov

134 Intraspinal implantation of tissue-engineered pancreatic construct in experimental diabetic rats
G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, L.A. Kirsanova, G.N. Bubentsova, V.I. Sevastianov

142 Biomedical cell product model for preclinical studies carried out on a large laboratory animal
M.N. Egorikhina, D.Ya. Aleinik, Yu.P. Rubtsova, I.N. Charykova, A.A. Struchkov, A.A. Ezhevskaya, V.I. Zagrekov, L.N. Sosnina, E.V. Zagaynova

157 Formation of eyeball orbital stump using titanium nickelide tissue-engineered construct and autologous blood mononuclear leukocytes
E.A. Gorbunova, O.I. Krivosheina, L.R. Mustafina

165 Tissue equivalent transplantation in the treatment of certain skin injuries
E.M. Fominykh, V.N. Mitrofanov, O.P. Zhivtsov, A.A. Struchkov, V.F. Zubritskiy, Yu.N. Lebedeva, E.A. Vorotelyak, Yu.V. Sukhanov

LITERATURE REVIEWS

174 Global organ shortage: an analysis of national self-sufficiency strategies
O.N. Reznik, D.V. Mikhel

Трансплантационные технологии для лечения нарушений углеводного обмена
В.Е. Загайнов, А.В. Мелешина, К.Г. Корнева, С.А. Васенин, Е.В. Загайнова

Фибрин – перспективный материал для тканевой сосудистой инженерии
В.Г. Матвеева, М.Ю. Ханова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш

Клинические, иммунологические и этические аспекты выбора реципиента при трансплантации трупных донорских почек
А.В. Ватазин, А.Б. Зулкарнаев, В.А. Степанов

ИНФОРМАЦИЯ

Требования к публикациям

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

- | | |
|-----|---|
| 184 | Transplantation technologies for treatment of carbohydrate metabolism disorders
<i>V.E. Zagainov, A.V. Meleshina, K.G. Korneva, S.A. Vasenin, E.V. Zagaynova</i> |
| 196 | Fibrin – a promising material for vascular tissue engineering
<i>V.G. Matveeva, M.U. Khanova, L.V. Antonova, L.S. Barbarash</i> |
| 209 | Clinical, immunological and ethical aspects of selecting a recipient for cadaver kidney transplantation
<i>V.A. Vatazin, A.B. Zulkarnaev, V.A. Stepanov</i> |

INFORMATION

- | | |
|-----|---|
| 220 | Instructions to authors |
| 224 | 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 |

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ ДЕТЯМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

PEDIATRIC ORGAN TRANSPLANTATION IN THE RUSSIAN FEDERATION

Глубокоуважаемые коллеги!

Dear colleagues!

Перед вами первый выпуск журнала за 2020 г. Одной из важнейших составляющих профессионального информационного поля и значимой частью содержания «Вестника...» являются ежегодные сообщения Регистра Российского трансплантологического общества, которые мы публикуем вот уже более 10 лет, обычно во втором номере, и которые позволяют оценить состояние клинической трансплантологии в стране в целом, в отдельных регионах и трансплантационных центрах, а также из года в год наблюдать динамику развития этой непростой отрасли здравоохранения.

Предваряя второй выпуск журнала с очередным сообщением Регистра, хотелось бы анонсировать те его аспекты, которые связаны с трансплантацией органов детям.

Отмечается очевидная положительная динамика в оказании трансплантационной помощи детям. За 2019 год в РФ было выполнено 2427 пересадок органов (16,5 на 1 млн населения), из них более 200 – детям. При распределении донорских органов дети, состоящие в листах ожидания, имеют приоритет.

Полностью решена проблема трансплантации печени детям. Операции выполняются всем выявленным и направленным в трансплантационные центры реципиентам. Полностью прекращена практика выезда за рубеж для детской трансплантации печени.

Отдельным контингентом педиатрических пациентов являются дети, которым выполняется одномоментная трансплантация печени и почки. Эти операции выполняются только в НМИЦ ТИО им. Шумакова, в том числе оперированы дети с массой тела 8–9 кг. Нашим



Here is the first issue of our journal for 2020. Annual reports from the Registry of the Russian Transplant Society are one of the most important components and a significant part of the Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. We have been publishing these reports for over 10 years – usually in the second issue. The reports give us the opportunity to evaluate the state of clinical transplantology in the country as a whole, in certain regions and transplant centers. They

also enable us to, from year to year, observe the trend in the development of this complex sector of the healthcare industry.

As we await the second issue of the journal with the next report from the Registry, I would like to announce those aspects that are related to pediatric organ transplantation.

Provision of pediatric transplant care has an obvious positive trend. In 2019, about 2427 organ transplantations were performed in the Russian Federation (16.5 per million population) of which more than 200 were pediatric transplants. Waitlisted children are given priority in the distribution of donor organs.

The problem of pediatric liver transplantation has been completely addressed. All recipients identified and referred to transplant centers undergo surgical interventions. The practice of traveling abroad for pediatric liver transplantation is now a thing of the past – it has completely stopped.

Children undergoing simultaneous liver-kidney transplantation are a separate contingent of pediatric patients. These operations are carried out only at Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs.

мировым приоритетом является разработанная и опубликованная в *American Journal of Transplantation* методика одновременного лапароскопического изъятия фрагмента печени и почки у живого донора.

Опыт выполнения трансплантации почки детям имеется в 16 центрах трансплантации (Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск, Кемерово, Казань, Уфа, Оренбург, Саратов, Омск и Воронеж). Готовится к началу работы в области педиатрической трансплантации почки Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, начала работу программа в НИИ детской неотложной хирургии и травматологии в Москве.

Отдельным вопросом является трансплантация сердца детям. Дети с массой тела от 20 кг получают трансплантаты от взрослых посмертных доноров небольших антропометрических параметров. Успешный опыт таких операций имеется в НМИЦ ТИО им. Шумакова, НМИЦ им. Алмазова, в Краснодаре и Новосибирске (всего 10–15 операций в год).

В то же время остается не решенной проблема пересадки сердца детям с массой тела менее 20 кг, что подразумевает необходимость начала работы в области посмертного донорства органов детей, которое предусмотрено статьей 47 ФЗ 323 и Инструкцией по констатации смерти мозга.

It includes children weighing 8–9 kg who underwent surgery. Our global priority is the technique for simultaneous laparoscopic removal of liver and kidney fragment from a living donor, which was developed and published by the American Journal of Transplantation.

About 16 transplant centers (Moscow, St. Petersburg, Novosibirsk, Kemerovo, Kazan, Ufa, Orenburg, Saratov, Omsk and Voronezh) have successfully performed pediatric kidney transplantation. The St. Petersburg State Pediatric Medical University is preparing to start activities on pediatric kidney transplantation; a program at the Research Institute of Pediatric Emergency Surgery and Traumatology in Moscow has kicked off.

Pediatric heart transplantation is a separate matter altogether. Children weighing 20 kg or more receive transplants from adult posthumous donors that have small anthropometric indicators. Such surgical interventions have been successfully performed at Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Almazov National Medical Research Centre, as well as in Krasnodar and Novosibirsk (a total of 10 to 15 operations per year).

However, the issue of heart transplantation for pediatric patients weighing less than 20 kg remains a major challenge. This implies the need to kick start work on posthumous organ donation from children. This issue is envisaged by article 47 of Federal Law 323 of the Russian Federation and by the Guidelines for the Determination of Brain Death.

С уважением
академик РАН С.В. Готье



Sincerely
Academician of the RAS, S.V. Gautier

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-8-15

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ГАЛЕКТИНА-3 ПРИ ПАТОЛОГИИ МИОКАРДА ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

О.П. Шевченко^{1, 2}, А.А. Улыбышева^{1, 3}, Н.П. Можейко¹, О.Е. Гичкун^{1, 2}, Е.А. Стаханова¹, В.П. Васильева³, А.О. Шевченко^{1, 2, 3}

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

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

³ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: определить диагностическую эффективность галектина-3 у реципиентов с фиброзом миокарда и острым отторжением трансплантата, верифицированными при эндомиокардиальной биопсии. **Материалы и методы.** В исследование включены 124 пациента с терминальной сердечной недостаточностью, возраст – от 16 до 71 (в среднем 48 ± 12) года, из них 106 (85%) мужчин и 18 (15%) женщин, которым в период с 2013-го по 2016 год в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России была выполнена трансплантация сердца. Верификацию острого клеточного, гуморального отторжения и фиброза миокарда трансплантированного сердца проводили на основании исследования образцов эндомиокардиальных биоптатов; выраженность и характер фиброза оценивали с помощью качественного метода визуализации. Концентрацию галектина-3 измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия). **Результаты.** В отдаленные сроки после трансплантации в сравнении с ранним посттрансплантационным периодом увеличивается число верифицированного фиброза миокарда трансплантата: у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения – на 88%, у реципиентов без кризов отторжения – на 37%. У реципиентов, перенесших острое гуморальное отторжение, фиброз миокарда трансплантата выявляется чаще, чем у реципиентов, перенесших острое клеточное отторжение (в 92 и 75% случаев соответственно). Уровень галектина-3 в плазме крови у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата выше, чем у реципиентов без такового ($p = 0,05$ спустя год и $p = 0,01$ спустя 1–5 лет после ТС). У реципиентов, перенесших кризы острого отторжения, риск развития фиброза миокарда трансплантата составил 1,64 ($RR = 1,64 \pm 0,1$ [95% ДИ 1,1–2,2]). **Заключение.** Галектин-3 обладает диагностической значимостью в отношении фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения.

Ключевые слова: трансплантация сердца, галектин-3, фиброз миокарда, острое отторжение, диагностическая значимость.

Для корреспонденции: Улыбышева Адэля Анверовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru

For correspondence: Ulybysheva Adelya Anverovna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru

DIAGNOSTIC VALUE OF GALECTIN-3 IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS WITH MYOCARDIAL COMPLICATIONS

O.P. Shevchenko^{1, 2}, A.A. Ulybysheva^{1, 3}, N.P. Mozheiko¹, O.E. Gichkun^{1, 2}, E.A. Stakhanova¹, V.P. Vasilieva³, A.O. Shevchenko^{1, 2, 3}

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

Objective: to determine the diagnostic value of galectin-3 in transplant recipients with myocardial fibrosis and acute heart transplant rejection, verified by endomyocardial biopsy. **Materials and methods.** The study included 124 patients with end-stage heart failure. Their ages ranged from 16 to 71 (average 48 ± 12) years, of which 106 (85%) were men and 18 (15%) were women. From 2013 to 2016, these patients underwent a heart transplant procedure at the Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation. Analysis of endomyocardial biopsy specimens was used to verify acute cellular, humoral rejection and myocardial fibrosis of the heart transplant. Severity and nature of fibrosis was evaluated using a qualitative imaging technique. Galectin-3 concentration was measured by enzyme immunoassay using Human Galectin-3 Platinum ELISA reagent kits (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria). **Results.** In the long-term post-transplantation period, in comparison with the early post-transplantation period, the number of verified graft myocardial fibrosis increased by 88% in recipients who had acute rejection crises and by 37% in recipients who had no rejection crises. Graft myocardial fibrosis was detected more often in recipients who had acute humoral rejection than in those who had acute cell rejection (92% vs 75% of cases, respectively). Plasma galectin-3 levels in recipients with graft myocardial fibrosis was higher than in recipients without it ($p = 0.05$ 1 year and $p = 0.01$ 1–5 years after heart transplantation). In recipients who had acute rejection crises, the risk of developing graft myocardial fibrosis was 1.64 (RR = 1.64 ± 0.1 [95% CI 1.1–2.2]). **Conclusion.** Galectin-3 is a biomarker for myocardial fibrosis in acute heart transplant rejection.

Keywords: heart transplantation, galectin-3, myocardial fibrosis, acute rejection, diagnostic value.

Успехи, достигнутые к настоящему времени в трансплантации сердца (ТС), обеспечили увеличение выживаемости и улучшение качества жизни реципиентов. В отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов сердца возрастает риск развития субклинической хронической сердечной недостаточности, возникающей вследствие совокупности различных патологических факторов, приводящих к формированию фиброза миокарда трансплантата, таких как артериальная гипертензия, острое отторжение и васкулопатия трансплантата, другие заболевания [1].

Объективным методом верификации патологии миокарда является эндомикардиальная биопсия (ЭМБ). После трансплантации ЭМБ выполняется в сроки, предусмотренные протоколом лечения или по показаниям, однако имеется ряд ограничений и рисков, свойственных инвазивным методам диагностики. Более того, при исследовании биоптата оценивают фрагмент миокарда, который может не отражать состояние других его участков, не попавших в исследуемый материал. Разработка малоинвазивных методов выявления осложнений в посттрансплан-

тационном периоде проводится с целью улучшения доклинической диагностики, в т. ч. в связи с необходимостью сократить количество многократно повторяемых инвазивных диагностических вмешательств, частично заменив их функциональными и/или лабораторными тестами, которые могут не только выявить наличие фиброза миокарда трансплантата, но и контролировать эффективность лечения реципиента.

Особое внимание уделяется выявлению про-фиброгенных биологических агентов, способных быть индикаторами риска негативных сердечно-сосудистых событий, связанных с развитием фиброза [2, 3]. К числу относительно недавно описанных биомаркеров развития сердечной недостаточности и фиброза миокарда относится галектин-3, принадлежащий к семейству лектинов и играющий важную роль в регуляции процессов пролиферации миофибробластов, иммунного ответа, воспаления и ремоделирования сосудов сердца [4, 5]. В месте повреждения галектин-3 секретируется во внеклеточное пространство и способствует развитию фиброза через активацию фибробластов [6]. У реципиентов сердца роль галектина-3 изучена в меньшей степени,

однако установлено, что его уровень в плазме крови выше у пациентов с фиброзом миокарда трансплантата [7]. Целью настоящего исследования явилось определение диагностической эффективности галектина-3 у реципиентов с фиброзом миокарда и острым отторжением трансплантата, верифицированными при эндомикардиальной биопсии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 124 пациента с сердечной недостаточностью III–IV функционального класса по классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA) в возрасте от 16 до 71 (в среднем 48 ± 12) года, из них 106 (85%) – мужчины и 18 (15%) – женщины, которым в период с 2013-го по 2016 год в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России была выполнена трансплантация сердца. У 67 реципиентов (51 мужчина и 16 женщин, от 16 до 71 года; 41 ± 12) причиной развития сердечной недостаточности была дилатационная кардиомиопатия, у 57 (55 мужчин и 2 женщины, от 37 до 70 лет; 57 ± 8) – ишемическая болезнь сердца.

Все пациенты, имеющие показания к ТС, проходили плановое обследование согласно протоколу ведения пациентов в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова и Национальным клиническим рекомендациям [8]. Плановое обследование реципиентов включало клинический осмотр, термометрию, вирусологическое и бактериологическое исследования, динамику изменений общих и биохимических показателей крови с

определением концентрации такролимуса, суточное мониторирование артериального давления, эхокардиографическое исследование, биопсии миокарда, ежегодное коронароангиографическое исследование.

Верификацию острого клеточного и гуморального отторжения, а также фиброза миокарда трансплантата производили на основании исследования образцов эндомикардиальных биоптатов. Для гистологического исследования кусочки эндомикарда фиксировали в 10% формалине, затем промывали водой, обезжизняли и заливали в парафин. На микротоме приготавливали срезы толщиной 3–4 мкм. Для верификации фиброза миокарда трансплантата срезы окрашивали трихромом по Массону, позволяющим четко различать соединительную ткань, которая, в зависимости от ее зрелости, окрашивается в различные оттенки синего и отличается от других тканей миокарда.

На рис. 1 представлены примеры гистологических препаратов биоптата трансплантированного сердца, в которых были обнаружены фибротические изменения различных видов: очаговый, диффузный, диффузно-очаговый фиброз.

Для диагностики острого клеточного отторжения (ОКО) срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для диагностики гуморального отторжения (AMR) использовали иммуногистохимический метод исследования. Степень острого клеточного и гуморального отторжения трансплантата оценивали по рекомендованным классификациям, принятым

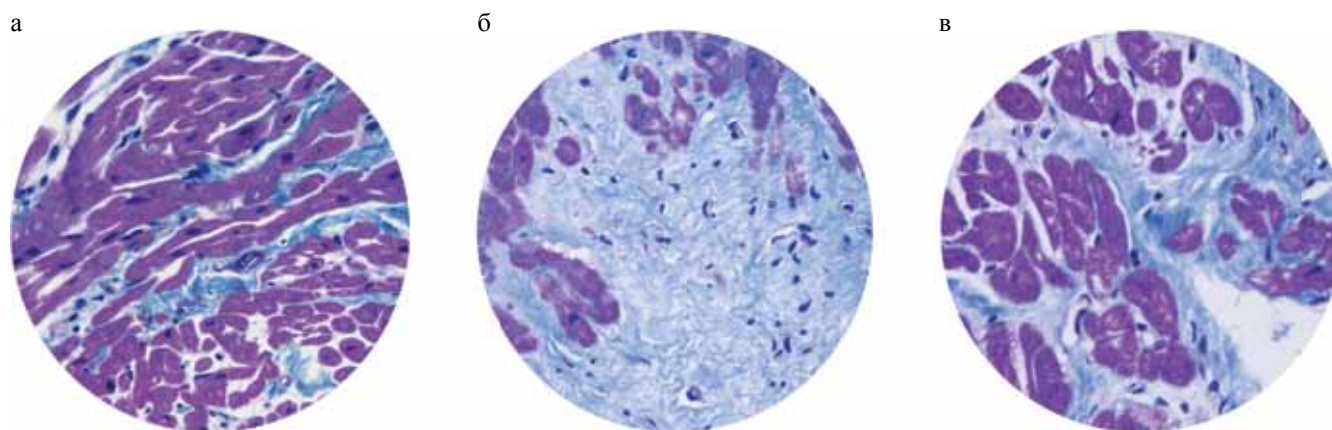


Рис. 1. Гистологические препараты эндомикардиальных биоптатов: а – диффузное разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани с единичными клетками фибробластического ряда, очаговая белковая зернистая дистрофия кардиомиоцитов; б – очаговое разрастание неоформленной соединительной ткани с единичными клетками соединительно-тканного ряда, умеренная белковая дистрофия кардиомиоцитов; в – диффузно-очаговое разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой отмечается пролиферация клеток соединительно-тканного ряда, очаговая белковая дистрофия кардиомиоцитов. Окраска трихромом по Массону (синим цветом окрашена соединительная ткань, розовым – кардиомиоциты). $\times 400$

Fig. 1. Histological preparations of endomyocardial biopsy specimens: а – diffuse growth of loose fibrous connective tissue with single fibroblastic cells, focal protein granular dystrophy of cardiomyocytes; б – focal growth of unformed connective tissue with single connective-tissue cells, moderate protein dystrophy of cardiomyocytes; в – diffuse focal growth of loose fibrous connective tissue, in which proliferation of connective-tissue cells, focal protein dystrophy of cardiomyocytes. Coloring according to Masson (connective tissue is colored blue, cardiomyocytes are pink). $\times 400$

Международным обществом трансплантации сердца и легких (ISHLT-2004 и ISHLT-2013).

Материалом для исследования концентрации галектина-3 служила плазма венозной крови. Концентрацию галектина-3 измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия).

Определение чувствительности и специфичности, подбор оптимального порога отсечения и выбор теста с наилучшей диагностической силой проводили при помощи ROC-анализа. Для оценки диагностической значимости галектина-3 использовали показатель относительного риска.

Анализ полученных данных производили с помощью стандартных методов статистической обработки с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel и пакета прикладных программ для научно-технических расчетов IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление гистологических признаков фиброза миокарда трансплантата в различные сроки после ТС производили у 124 реципиентов, отобранных методом случайной выборки из общего числа реципиентов ($n = 432$), которым была выполнена ТС в 2013–2016 гг. в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова. Исследованы 583 эндомикардиальных биоптата (от одного пациента: от 3 до 20; в среднем 5 ± 2 ЭМБ), полученные в следующие сроки после трансплантации: ранний период – первый месяц после ТС (30 ± 14 суток), спустя год (334 ± 69 суток) и спустя 1–5 лет (963 ± 273 суток).

К концу первого месяца после ТС у 58 (46%) из включенных в исследование реципиентов сердца был выявлен фиброз миокарда трансплантата; у 66 (54%) реципиентов по данным ЭМБ не было обнаруже-

но гистологических признаков фиброза. Спустя год после ТС у 74 (60%) реципиентов, а спустя 1–5 лет – уже у 95 (77%) реципиентов верифицирован фиброз миокарда трансплантата (рис. 2).

Представленные данные отражают частоту выявления фибротических изменений в миокарде трансплантата у реципиентов исследуемой группы, отобранных случайным образом, и не могут быть экстраполированы на всю популяцию реципиентов сердца, оперированных в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова в период 2013–2016 гг. В то же время полученные результаты позволяют констатировать, во-первых, достаточно частое, почти в половине случаев, выявление фиброза миокарда трансплантата уже в раннем периоде после ТС; во-вторых, можно констатировать значительное увеличение доли случаев фиброза миокарда трансплантата у реципиентов с течением времени, прошедшего после ТС: в настоящем исследовании на 67% через 1–5 лет, в сравнении с ранним периодом.

Причиной фиброза миокарда в раннем посттрансплантационном периоде, очевидно, может являться наличие фибротических изменений в миокарде донорского сердца. Следует отметить, что возраст доноров сердца для включенных в настоящее исследование реципиентов составил 42 ± 11 (от 18 до 64) лет. Исследования донорского сердца с целью выявления фибротических изменений не проводились, однако выполнение подобного анализа будет целесообразным для изучения факторов, влияющих на развитие фиброза миокарда трансплантата и отдаленный прогноз реципиентов сердца.

Анализ частоты выявления различных видов фиброза в ранние и отдаленные сроки после ТС показал, что к концу первого месяца после трансплантации из 58 реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата у 13 (22%) верифицирован диффузный фиброз, у 40 (69%) – очаговый и у 5 (9%) – диффузно-очаго-



Рис. 2. Доля случаев верифицированного фиброза миокарда в исследуемой группе реципиентов в различные сроки после трансплантации сердца

Fig. 2. Percentage of verified myocardial fibrosis in the recipients at different times after HTx

вый фиброз. Спустя 1–5 лет после ТС у 20 (21%) из 95 реципиентов с фиброзом миокарда верифицирован диффузный фиброз, у 55 (58%) – очаговый и у 20 (21%) – диффузно-очаговый фиброз. Диффузный фиброз развивается в интерстициальном или периваскулярном пространстве, он сопровождается избыточным отложением в миокарде коллагена I типа за счет преобладания процессов его синтеза над распадом [9]. При развитии очагового фиброза происходит замещение погибших кардиомиоцитов соединитель-

ной тканью и сопровождается избыточным отложением коллагена III типа [10]. Согласно результатам настоящего исследования, имеет место увеличение доли наиболее тяжелой, диффузно-очаговой формы фиброза в исследуемой группе реципиентов: от 9% в раннем посттрансплантационном периоде до 21% в отдаленные сроки.

Ранее было установлено, что уровень галектина-3 в плазме крови выше у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата; более высокие значения обнаружены при диффузно-очаговом фиброзе [7]. Для определения диагностической значимости галектина-3 в качестве маркера фиброза миокарда трансплантата использовали анализ ROC-кривой (рис. 3).

Расчеты показали, что площадь под ROC-кривой галектина-3 спустя 1–5 лет после трансплантации у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата составила $0,765 \pm 0,060$ [0,64–0,88], $p = 0,00$.

Пороговые уровни галектина-3, значимые для диагностики фиброза миокарда трансплантата спустя 1–5 лет после трансплантации сердца, определяли в точке по оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности. На графике зависимостей чувствительности и специфичности от концентрации галектина-3 в плазме крови точка пересечения кривых отражает величину порогового уровня (рис. 4).

Пороговое значение галектина-3, значимое для диагностики фиброза миокарда трансплантата в отдаленные сроки после ТС, составило 16,9 нг/мл. При уровне галектина-3, превышающем найденное пороговое значение, вероятность риска развития фиброза миокарда трансплантата у реципиентов сердца в 1,6 раза выше ($RR = 1,6 \pm 0,1$ [95% ДИ 1,2–2,0]), чем у реципиентов с уровнем галектина-3 ниже это-

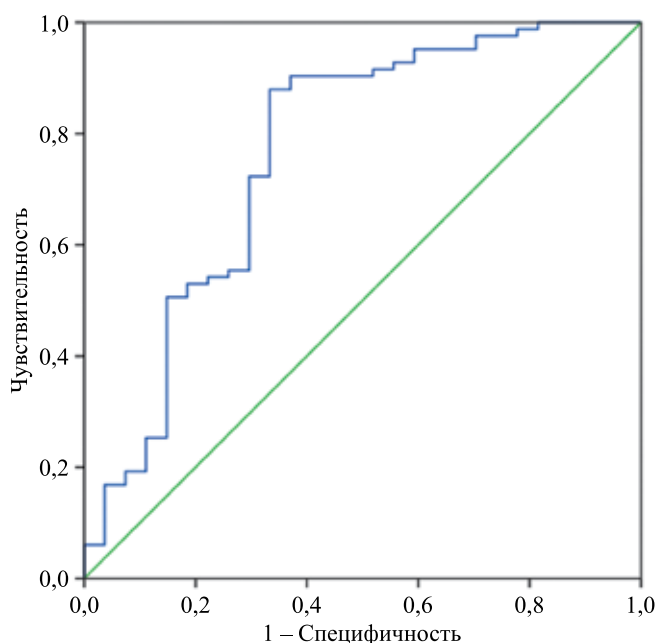


Рис. 3. ROC-кривая галектина-3 спустя 1–5 лет после трансплантации у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата

Fig. 3. Galectin-3 ROC curve 1–5 years after HTx in recipients with transplant myocardial fibrosis

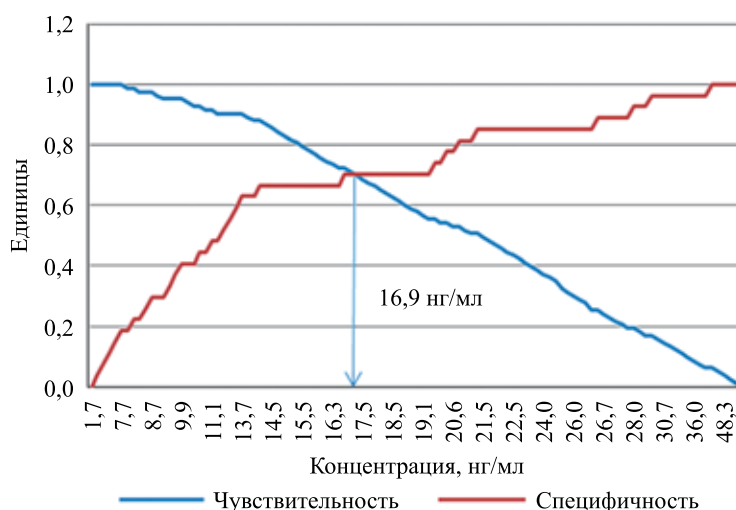


Рис. 4. Определение диагностически значимого порогового значения уровня галектина-3 спустя 1–5 лет после трансплантации в отношении фиброза миокарда трансплантата

Fig. 4. The diagnostic significant threshold value of the galectin-3 1–5 years after HTx for transplant myocardial fibrosis

го порогового значения (чувствительность – 71%, специфичность – 70%).

К числу основных факторов, ограничивающих выживаемость реципиентов сердца в раннем послеоперационном периоде и в течение первого года жизни после ТС, относится острое отторжение трансплантированного сердца. Реакция отторжения сердечного трансплантата – проявление защитной реакции организма реципиента против чужеродных клеток донорского органа, включает механизмы врожденного, клеточного и антителоопосредованного (гуморального) иммунного ответа, вследствие чего эпизоды острого отторжения трансплантата являются фактором, стимулирующим развитие фибротических изменений в трансплантированном сердце.

Среди 124 пациентов, включенных в настоящее исследование, 75 (60%) реципиентов перенесли кризы острого отторжения трансплантированного сердца в раннем посттрансплантационном периоде. Спустя год после трансплантации – уже 89 (72%), а спустя 1–5 лет – 92 (74%) реципиента сердца перенесли кризы острого отторжения.

Из числа пациентов, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, фиброз миокарда в ранние сроки после ТС обнаружен у 31 (41%) из 75 реципиентов; спустя год – у 51 (57%) из 89 реципиентов; спустя 1–5 лет верифицирован у 71 (77%) из 92 реципиентов.

У пациентов, не перенесших кризы острого отторжения, в ранние сроки фиброз миокарда трансплантата был выявлен у 27 (55%) из 49 реципиентов сердца; спустя год фиброз миокарда верифицирован у 23 (65%) из 35 реципиентов; спустя 1–5 лет – у 24 (75%) из 32 реципиентов.

Хотя в отдаленные сроки после трансплантации доля реципиентов с верифицированным фиброзом миокарда практически не различалась в группах перенесших и не перенесших острое отторжение (77 и 75% соответственно), анализ показал, что у реципиентов сердца, перенесших кризы острого отторжения, доля реципиентов с фиброзом миокарда спустя 1–5 лет в сравнении с ранним сроком после трансплантации возросла на 88%, а у реципиентов, не перенесших кризов острого отторжения, – на 37% (рис. 5).

Связь перенесенных эпизодов острого гуморального отторжения с развитием фиброза миокарда трансплантата более выражена: у реципиентов сердца, перенесших гуморальное отторжение, фиброз миокарда трансплантата в отдаленные сроки выявляется в 92% случаев, у реципиентов, перенесших кризы острого клеточного отторжения, – в 75% случаев (рис. 6).

По-видимому, обнаруженные различия связаны с дополнительным негативным влиянием иммунных

факторов, действующих при гуморальном отторжении на миокард трансплантата.

Результаты настоящего исследования подтверждают представление о влиянии эпизодов острого клеточного и острого гуморального отторжения на развитие фибротических изменений в трансплантированном сердце. Очевидно, формированию последних способствуют развивающиеся при остром отторжении отек, инфильтрация макрофагами и лимфоцитами, продукция активированными клетками воспаления и фибробластами провоспалительных и профиброгенных медиаторов и др. [11, 12].

Сравнительный анализ диагностической эффективности галектина-3 при фиброзе миокарда у реципиентов, перенесших и не перенесших острое отторжение трансплантата, показал следующее. В отдаленные сроки после ТС концентрация галектина-3 у реципиентов, перенесших и не перенесших острое отторжение трансплантата, составила 20,57 [13,92; 27,24] и 15,25 [12,06; 19,47] нг/мл соответственно, $p = 0,00$. У пациентов с фиброзом миокарда трансплантированного сердца и без фиброза, по данным ЭМБ, уровень галектина-3 составил 20,60 [14,52; 26,29] и 15,36 [11,95; 22,42] нг/мл соответственно, $p = 0,05$ [7].

При концентрации галектина-3, превышающей рассчитанное пороговое значение (16,9 нг/мл), от-

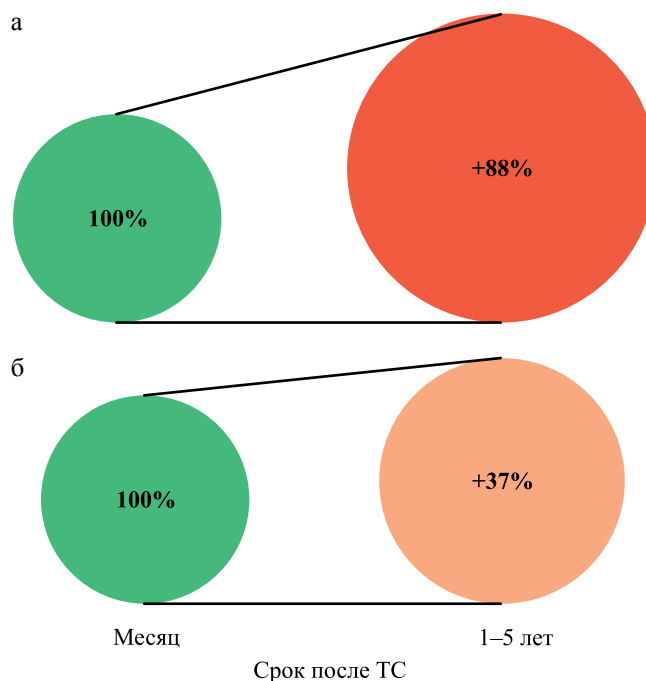


Рис. 5. Рост числа верифицированных случаев фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших (а) и не перенесших (б) кризы острого отторжения трансплантата

Fig. 5. An increase in the number of verified cases of graft myocardial fibrosis in recipients with (a) and without (b) episodes of acute rejection

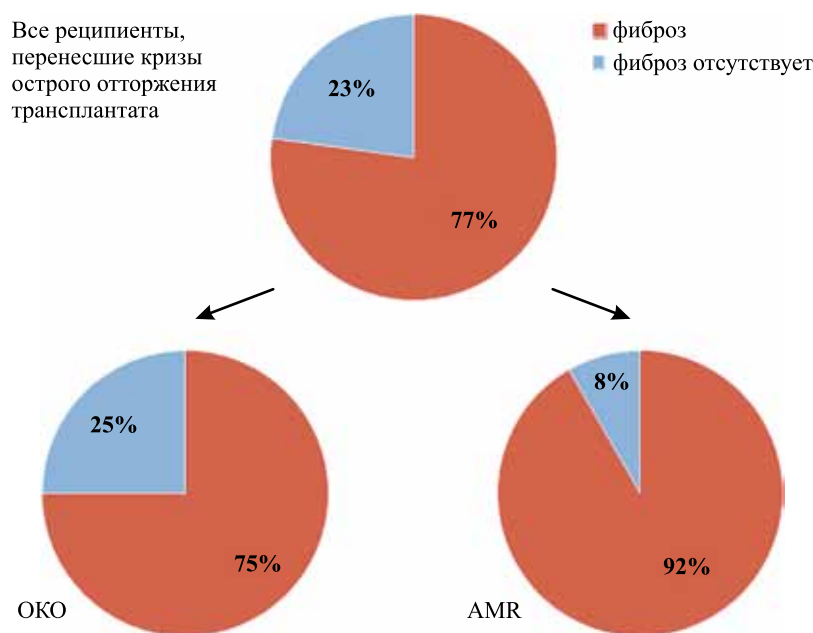


Рис. 6. Частота выявления фиброза миокарда (%) спустя 1–5 лет после трансплантации сердца у реципиентов, перенесших кризы острого клеточного (ОКО) и гуморального отторжения (AMR) трансплантата

Fig. 6. The frequency of detection of myocardial fibrosis (%) after 1–5 years after HTx in recipients with acute cellular (ACR) and humoral rejections (AMR) graft episodes

носительный риск фиброза миокарда в отдаленные сроки после трансплантации у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения, $RR = 1,64 \pm 0,1$ [95% ДИ 1,1–2,2] (чувствительность – 71%, специфичность – 75%).

У реципиентов с уровнем галектина-3 выше 16,9 нг/мл, но не перенесших острое отторжение, относительный риск развития фиброза миокарда $RR = 1,38 \pm 0,2$ [95% ДИ 0,8–2,3] (чувствительность – 71%, специфичность – 57%) и не был статистически значимым (границы доверительного интервала включали единицу).

Таким образом, в отдаленные сроки после ТС величина концентрации галектина-3 в плазме крови обладает диагностической значимостью в отношении фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших кризы острого отторжения. В то же время у реципиентов, не перенесших кризы отторжения, тест на галектин-3 для выявления фиброза миокарда трансплантата незначим. Вероятно, последнее связано с меньшей активностью процессов фиброгенеза, происходящих в организме реципиентов, не перенесших острое отторжение, на что указывают и обнаруженные в настоящей работе различия в увеличении числа верифицированных случаев фиброза миокарда трансплантата у реципиентов, перенесших (на 88%) и не перенесших (на 37%) кризы острого отторжения, за период от 1 месяца до 1–5 лет после ТС. У реципиентов сердца, перенесших кризы острого отторжения трансплантата, при уровне галектина-3 $\geq 16,9$ нг/мл

риск развития фиброза миокарда трансплантата выше в 1,64 раза, чем у реципиентов с уровнем галектина-3 ниже порогового значения.

Исследование профинансировано грантом Президента Российской Федерации НШ-2598.2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шевченко АО, Никитина ЕА, Колоскова НН, Шевченко ОП, Готье СВ. Контролируемая артериальная гипертензия и выживаемость без нежелательных событий у реципиентов сердца. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2018; 17 (4): 4–11. Shevchenko AO, Nikitina EA, Koloskova NN, Shevchenko OP, Gautier SV. Kontroliruemaya arterial'naja gipertenzija i vyzhivaemost' bez nezhelatel'nyh sobytij u recipientov serdca. *Kardiovaskuljarnaja terapija i profilaktika*. 2018; 17 (4): 4–11. [In Russ, English abstract].
2. Lok SI, Nous FM, van Kuik J et al. Myocardial fibrosis and pro-fibrotic markers in end-stage heart failure patients during continuous-flow left ventricular assist device support. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015; 48: 407–415.
3. Ahmad T, Wang T, O'Brien EC et al. Effects of left ventricular assist device support on biomarkers of cardiova-

- scular stress, fibrosis, fluid homeostasis, inflammation, and renal injury. *J Am Coll Cardiol HF*. 2015; 3: 30–39.
4. Dumić J, Dabelić S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta*. 2006. 1760: 6616–6635.
5. González A, Schelbert EB, Díez J, Butler J. Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure: Biological and Translational Perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71 (15): 1696–1706. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.02.
6. Драпкина ОМ, Деева ТА. Галектин-3 – биомаркер фиброза у пациентов с метаболическим синдромом. *Российский кардиологический журнал*. 2015; 9 (125): 96–102. Drapkina OM, Deeva TA. Galectin-3 – biomarker fibroza u patsientov s metabolicheskim sindromom. *Rossiyskiy kardiologicheskii zhurnal*. 2015; 9 (125): 96–102. [In Russ, English abstract].
7. Шевченко ОП, Улыбышева АА, Гичкун ОЕ, Можейко НП, Стаханова ЕА, Кван ВС, Шевченко АО. Галектин-3 при отторжении и фиброзе трансплантированного сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (3): 62–68. Shevchenko OP, Ulybysheva AA, Gichkun OE, Mozheiko NP, Stakhanova EA, Kvan VS, Shevchenko AO. Galectin-3 in heart transplant rejection and fibrosis. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 62–68. (In Russ.). <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-3-62-68>.
8. Готье СВ, Шевченко АО, Понцов ВН. Пациент с трансплантированным сердцем. М.–Тверь: Триада, 2014: 144. Gautier SV, Shevchenko AO, Poptsov VN. Patsiyent s transplantirovannym serdtsem. М.–Tver': Triada, 2014: 144. (In Russ.).
9. González A, López B, Ravassa S, San José G, Díez J. The Complex Dynamics of Myocardial Interstitial Fibrosis in Heart Failure. Focus on Collagen Cross-Linking. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019; 1866 (9): 1421–1432.
10. Wan YJ, Guo Q, Liu D, Jiang Y. Protocatechualdehyde reduces myocardial fibrosis by directly targeting conformational dynamics of collagen. *Eur J Pharmacol*. 2019; 855: 183–191.
11. Gyongyosi M, Winkler J, Ramos I, et al. Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside. *Eur J Heart Fail*. 2017; 19 (2): 177–191. doi: 10.1002/ejhf.696.
12. Kyselovic J, Leddy JJ. Cardiac Fibrosis: The Beneficial Effects of Exercise in Cardiac Fibrosis. *Exercise for Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: From Molecular to Clinical*. 2017; Part 1: 257–268. doi: 10.1007/978-981-10-4307-9_14.

Статья поступила в редакцию 18.11.2019 г.
The article was submitted to the journal on 18.11.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-16-25

ИЗОЛИРОВАННЫЙ НЕКОМПАКТНЫЙ МИОКАРД ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА: КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

И.М. Ильинский, А.С. Иванов, Н.П. Можейко, М.К. Луговский

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

Изолированный некомпактный миокард левого желудочка (ИНМЛЖ) у взрослых пациентов является редкой формой первичных кардиомиопатий. Известно несколько морфологических исследований этой патологии, при которой была выполнена трансплантация сердца. **Целью** данной работы является анализ научной литературы и историй болезни пациентов, а также изучение морфологии желудочков сердца с гистологическим исследованием удаленного сердца у пациентов с ИНМЛЖ. **Материалы и методы.** Проведен анализ литературы и историй болезни трёх пациентов (2 женщины) в возрасте 18, 31 и 1 мужчины 49 лет с ИНМЛЖ. Для проведения гистологического исследования использовали световую микроскопию фиксированного препарата миокарда, окрашенного гематоксилином и эозином. **Результаты.** При гистологическом исследовании было подтверждено наличие ИНМЛЖ у данных пациентов. **Заключение.** ИНМЛЖ – редкое заболевание, которое может протекать как бессимптомно, так и являться причиной тяжелой застойной сердечной недостаточности, требующей трансплантации сердца.

Ключевые слова: изолированный некомпактный миокард левого желудочка, трансплантация сердца.

ISOLATED NON-COMPACTION OF THE LEFT VENTRICULAR MYOCARDIUM: A CLINICAL AND MORPHOLOGICAL STUDY

I.M. Iljinsky, A.S. Ivanov, N.P. Mozheiko, M.K. Lugovskiy

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

Isolated left ventricular noncompaction (LVNC) in adult patients is a rare form of primary cardiomyopathy. There have been several morphological studies of this condition in which a heart transplantation was performed. **Objective:** to analyze literature and clinical cases of patients with LVNC, macroscopic and histological data of the removed hearts. **Materials and methods.** At our center three patients (2 women aged 18 and 31, and 1 man aged 49) were morphologically diagnosed with LVNC had a heart transplant. We retrospectively analyzed the clinical, macroscopic and histological data of the removed hearts in these patients and the results of the transplants performed. Light microscopy of a fixed myocardial preparation stained with hematoxylin and eosin was used for histological examination. **Results.** A histological examination confirmed the presence of LVMI in these patients. **Conclusion.** LVMI is a rare disease, that can occur asymptomatic or cause severe congestive heart failure, requiring transplantation.

Keywords: isolated left ventricular noncompaction, heart transplantation.

Изолированный некомпактный миокард левого желудочка (ИНМЛЖ) является одной из редких форм некомпактной кардиомиопатии. Чаще некомпактный миокард левого желудочка сочетается с другими пороками сердца. Известны наблюдения бивентрикулярного некомпактного миокарда. Все

формы некомпактного миокарда являются редкими наблюдениями, характеризующими нарушение нормального эмбриогенеза миокарда, что приводит к сохранению межтрабекулярных синусоидов и развитию спонгиозного миокарда [1]. В норме процесс уплотнения миокарда желудочков, происходящий

Для корреспонденции: Луговский Максим Константинович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (926) 590-62-05. E-mail: lugovskiymax@gmail.com

For correspondence: Lugovskiy Maksim Konstantinovich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (926) 590-62-05. E-mail: lugovskiymax@gmail.com

в период 5–8-й недели внутриутробного развития плода, начинается от эпикарда, распространяясь до эндокарда и от базальных отделов до верхушки сердца [2]. При ИНМЛЖ толщина стенки левого желудочка, особенно в области верхушки, увеличивается. Однако это происходит за счет увеличения толщины спонгиозного слоя, а компактный слой, напротив, остается тонким [3]. Диагностику ИНМЛЖ проводят с помощью эхокардиографического исследования и/или магнитно-резонансной томографии, редко применяют контрастную вентрикулографию сердца [4]. Эндомиокардиальная биопсия при ИНМЛЖ [5], на наш взгляд, неинформативна и нецелесообразна, т. к. в биоптат попадают фрагменты субэндокардиальной зоны.

Дифференциальную диагностику ИНМЛЖ нужно проводить с идиопатической дилатационной кардиомиопатией [6–8], а также с корригированной транспозицией магистральных сосудов, где в позиции левого желудочка сердца находится правый с его трабекулярностью, что может быть принято за некомпактный миокард. Клинические симптомы зависят от объема и локализации некомпактного миокарда. Часто заболевание проявляется желудочковой аритмией, что требует имплантации дефибриллятора кардиовертера. Этим пациентам часто ставят ошибочный диагноз – идиопатическая дилатационная кардиомиопатия [9].

У симптомных пациентов с ИНМЛЖ развивающаяся сердечная недостаточность преимущественно связана с систолической и диастолической дисфункцией левого желудочка. Систолическая дисфункция возникает из-за значительного уменьшения компактного слоя, а не в результате относительной ишемии миокарда вследствие несоответствия потребности миокарда с объемом доставляемого кислорода, как предполагал Y. Agmon et al. [3]. Механизм диастолической дисфункции включает комбинацию патологической релаксации и дефицита кровенаполнения левого желудочка в результате гипертрабекулярности [3]. Сердечная недостаточность при ИНМЛЖ может возникнуть в любом возрасте – от грудного до старческого.

По данным M. Greutmann et al. [10], из общего количества ($n = 115$) пациентов 77% были с симптомами заболевания. По сравнению с бессимптомными симптомные пациенты были значительно старше и имели более дилатированные левые желудочки и более низкую фракцию изгнания левого желудочка. При последующем наблюдении, в среднем в течение 2,7 года (в диапазоне от 0,1 до 19,4 года), ни один из бессимптомных пациентов не умер и не перенес трансплантации сердца, по сравнению с 31% (27 из 88) симптомных пациентов ($p = 0,001$). У больных с ИНМЛЖ класса NYHA III или выше сердечно-сосудистые осложнения – главные предикторы неблагоприятного исхода, а дилатация левого желудочка

и систолическая дисфункция – менее значимые показатели [10].

Некомпактный миокард левого желудочка чаще сочетается с врожденными пороками сердца [11], но бывает и изолированная форма, которая также может стать причиной тяжелой сердечной недостаточности [12]. Прогноз у этих пациентов неблагоприятный из-за ускоренного развития фатальных осложнений – аритмий, тромбоэмболий и тяжелой декомпенсации кровообращения по левожелудочковому типу [13]. Поэтому у больных с ИНМЛЖ, у которых развивается тяжелая застойная сердечная недостаточность, остается единственный и радикальный метод лечения – трансплантация сердца.

В одной из работ [14] приведены результаты эхокардиографии и патоморфологического исследования сердец двух новорожденных мальчиков с ИНМЛЖ, которым была выполнена трансплантация сердца в 40-дневном возрасте. По мнению авторов, диагностика ИНМЛЖ у новорожденных представляет большую сложность, так как у них по сравнению со взрослыми пациентами патологические изменения миокарда значительно менее выражены.

W.A. Zuckerman et al. [15] провел ретроспективный анализ летальности и результатов трансплантации сердца у педиатрических пациентов с ИНМЛЖ, находившихся на лечении в детской больнице Моргана Стэнли в Нью-Йорке с января 1993-го по сентябрь 2009 года. Некомпактный миокард левого желудочка был диагностирован у 50 детей, из которых 34 пациента были младше одного года. Двадцать шесть пациентов умерли или им выполнили трансплантацию сердца. Условное выживание пациентов, оставшихся в живых через год после диагностики заболевания, составило 75%, а пациентов, выживших в течение двух лет, – 92%. Независимыми предикторами плохого исхода были гемодинамическая нестабильность, сниженная функция желудочков и дилатация левого желудочка. Из 21 пациента с гемодинамической нестабильностью 17 умерли или им сделали трансплантацию сердца в среднем через 0,08 года после диагностики ИНМЛЖ. Авторы делают заключение о необходимости трансплантации сердца детям с ИНМЛЖ как можно в более ранние сроки после диагностики заболевания.

До 2001 года только шести пациентам с изолированным некомпактным миокардом левого желудочка была выполнена трансплантация сердца [4]. Эти авторы описывают диагностические трудности при обследовании молодой женщины с неврологическими симптомами, предсердной фибрилляцией и тяжелой систолической дисфункцией, что в конечном счете привело к необходимости трансплантации сердца. Это была седьмая операция у подобного контингента больных.

S. Stamou et al. [5] привели восьмое наблюдение, в котором пациенту с ИНМЛЖ была выполнена успешная трансплантация сердца. Восемнадцатилет-

летний мужчина, ранее не болевший, поступил в клинику для обследования в связи со слабостью, кашлем и болями в животе. Рентгенограмма показала кардиомегалию и венозный застой в легких. При эхокардиографии была выявлена дилатационная кардиомиопатия с фракцией выброса менее 10%, умеренная митральная регургитация и умеренная недостаточность трикуспидального клапана, несмотря на внутривенное введение добутамина. Состояние прогрессивно ухудшалось. При повторной эхокардиографии, в отличие от первой, были обнаружены многочисленные крупные трабекулы с глубокими межтрабекулярными пространствами в области верхушки и в средней трети левого желудочка. Более пяти месяцев пациент находился на постоянной внутривенной инотропной поддержке, а затем ему успешно была выполнена трансплантация сердца. Масса удаленного сердца составила 426 г. Патологоанатомическое исследование подтвердило диагноз ИНМЛЖ. После трансплантации сердца пациент был полностью реабилитирован; учился и работал спустя 2,5 года после операции.

Девятое наблюдение трансплантации сердца при некомпактном миокарде представлено J. Bordes et al. [16]. В этом наблюдении некомпактный миокард сочетался с двустворчатым аортальным клапаном у мужчины 42 лет, страдавшего рефрактерной сердечной недостаточностью, успешно вылеченной трансплантацией сердца. До трансплантации сердца у пациента при трансэзофагальной эхокардиографии была выявлена недостаточность двустворчатого аортального клапана, дилатация левого желудочка с фракцией выброса 40%. Больному была предложена пластика клапана, но он отказался от операции. Тремя месяцами позже пациент был вновь госпитализирован с застойной сердечной недостаточностью в отделение реанимации. При поступлении (на добутаmine 20 мг/кг в минуту) частота сердечных сокращений – 89 ударов в минуту, артериальное давление – 80/50 мм рт. ст. По данным эхокардиографии, резко снижена систолическая функция левого желудочка с фракцией выброса 25%. Левый желудочек значительно дилатирован, выраженная регургитация на митральном клапане. Аортальная недостаточность – минимальная. При повторной эхокардиографии визуализировали множественные трабекулы в левом желудочке, преимущественно в его апикальном и среднем отделах. В конце систолы максимальное отношение неуплотненного слоя к уплотненному превышало норму более чем в два раза. В правом желудочке трабекулярность также превышала норму. Окончательный клинический диагноз: бивентрикулярная некомпактная кардиомиопатия. Через три дня была выполнена операция. В течение суток после трансплантации сердца проводили экстракорпоральную поддержку кровообращения, а на шестые сутки пациент был экстубирован. На 17-е посттрансплантационные сутки его выписали из отделения

реанимации, и в течение последующих двух месяцев его состояние оставалось удовлетворительным [16].

У 22-летнего испанца, который в течение двух месяцев ощущал дискомфорт в груди, трансторакальная эхокардиография выявила выраженную трабекулярность и спонгиозный миокард левого желудочка с фракцией выброса 15–20%, а также подобные изменения миокарда правого желудочка. Магнитно-резонансная томография подтвердила данные эхокардиографии: чрезмерное образование трабекул в области верхушки и средних отделах левого желудочка, а также в области верхушки и боковой стенки правого желудочка. Коронарография без патологии. Пациент был включен в лист ожидания трансплантации сердца [17]. Таким образом, пациенту молодого возраста потребовалась трансплантация сердца в связи с тяжелой сердечной недостаточностью, развившейся в результате бивентрикулярной некомпактной кардиомиопатии.

У одних пациентов с НМЛЖ наблюдают длительное бессимптомное течение, а у других – прогрессирование систолической дисфункции левого желудочка, что ведет к летальному исходу, если не выполнить трансплантацию сердца [4, 18]. При рефрактерной сердечной недостаточности, которая развивается у 4–12% пациентов с некомпактной кардиомиопатией, требуется трансплантация сердца в неотложном порядке. [4]. Однако эта операция в значительной степени ограничена вследствие нехватки донорских органов [19].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы истории болезни трех пациентов, у которых диагностирован ИНМЛЖ и детально исследована морфология желудочков сердца, удаленных у них во время трансплантации. Проведено макроскопическое и гистологическое исследование передней и нижней стенки левого желудочка, свободной стенки правого желудочка и межжелудочковой перегородки.

После фиксации нейтральным формалином и обезвоживания материал заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Массону, проводили PAS-реакцию и заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты исследовали с использованием светового микроскопа.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Наблюдение № 1

Больная А.Т.А., 18 лет, поступила в ФГБУ «ФНЦТИО имени академика В.И. Шумакова» 10.11.2009 года с жалобами на одышку при незначительной физической нагрузке, утомляемость.

Диагноз при поступлении. Синдром изолированного некомпактного миокарда левого желудочка. NYHA III. Легочная гипертензия 2-й ст. Пароксиз-

мальная форма фибрилляции предсердий. Пароксизмальная наджелудочковая и желудочковая тахикардия. Неполная блокада левой ножки пучка Гиса. Статус 1В по UNOS.

Anamnesis morbi. Болеет с пятилетнего возраста. До 18-летнего возраста находилась на учете в НИИ педиатрии АМН СССР. С 1998 года отмечено появление пароксизмальной наджелудочковой тахикардии. В 2007 году – эпизод острой левожелудочковой недостаточности, купированный мочегонными препаратами и гормональной терапией. В 2008 году по результатам обследования поставлен диагноз «дилатационная кардиомиопатия», а в августе 2009 года диагностирован синдром изолированного НМЛЖ, NYHA III, выраженная легочная гипертензия. Проводилась терапия дилятрандом, престариумом, верошпироном, фуросемидом, ритмонормом.

Осмотр при поступлении. Состояние при поступлении стабильное, средней тяжести. Рост 166 см, масса тела 43 кг. Кожные покровы бледные. Периферических отеков нет. Цианоз губ, акроцианоз. Одышки в покое нет. Дыхание над легкими везикулярное, хрипов нет. Границы сердца расширены влево на 1,5 см от средней ключичной линии. Тоны сердца аритмичные, систолический шум на верхушке и в пятой точке, экстрасистолия, ЧСС 90 в минуту, АД 85/50 мм рт. ст. Живот мягкий, безболезненный. Печень и селезенка не увеличены. Очаговой неврологической симптоматики нет.

По данным ЭхоКГ: КДР ЛЖ – 6,2 см, КДО ЛЖ – 196, ФИ – 39–40%. ДЛА – 60 мм рт. ст. Сердце шаровидной формы с диффузным гипокинезом. Картина некомпактного миокарда левого желудочка с визуализацией узкой полоски до 3 мм компактного миокарда.

Исследование центральной гемодинамики: без оксида азота – ЧСС 91 в мин, АД – 96/75/69 мм рт. ст., ДЗЛК – 33 мм рт. ст., ДЛА – 72/53/38 мм рт. ст., ОЛС – 6,45 ед. Вуда; с применением функциональных проб ингаляции оксида азота – ЧСС 96 в мин, АД – 91/73/67 мм рт. ст., ДЗЛК – 18 мм рт. ст., ДЛА – 36/28/20 мм рт. ст., ОЛС – 3,33 ед. Вуда, что доказывало обратимость легочной гипертензии и отсутствие противопоказаний для трансплантации сердца. Ортопическая трансплантация сердца была выполнена 26.11.2009 года. Индукционная иммуносупрессия – симулект 20 мг. Послеоперационный период протекал без особенностей.

Патологоанатомическое исследование нативного сердца. Результаты макроскопического исследования. Желудочки сердца шаровидной формы, равновеликие, иссеченные по предсердно-желудочковой борозде, массой 195 г, размерами 11,5×8×3,5 см. Коронарные артерии широкие, без стенозов. Периметр фиброзного кольца митрального клапана – 12 см. Толщина миокарда свободной стенки левого

желудочка – 0,8 см, из которых компактный слой толщиной 2–3 мм. Выраженный субэндокардиальный фиброз левого желудочка. Миокард левого желудочка на разрезе коричневого цвета, дряблый, прорастание хорд в миокард передней стенки левого желудочка и части межжелудочковой перегородки. Периметр фиброзного кольца трикуспидального клапана – 13 см. Толщина миокарда свободной стенки правого желудочка 0,3 см. Створки трехстворчатого клапана белесоватого цвета. **Результаты гистологического исследования.** В передней стенке левого желудочка, в истонченном компактном слое выраженная диффузная белковая дистрофия и очаговая гидропическая дистрофия кардиомиоцитов. Отдельные клетки некротизированы. При PAS-реакции неравномерное окрашивание цитоплазмы кардиомиоцитов (рис. 1). В передней стенке и особенно в нижней стенке в компактном слое встречаются крупные тонкостенные кровеносные сосуды (рис. 2). В спонгиозном слое миокарда выраженный склероз эндокарда трабекул (рис. 3). В межжелудочковой перегородке отмечено избыточное образование жировой клетчатки и нервные стволы с периневральным разрастанием соединительной ткани (рис. 4). **Патологоанатомический диагноз:** изолированный некомпактный миокард левого желудочка с вторичной дилатацией его полости.

Таким образом, причиной развития сердечной недостаточности явился изолированный некомпактный миокард левого желудочка с вторичной дилатацией его полости. Ортопическая трансплантация сердца от 26.11.2009 года дала хороший результат,

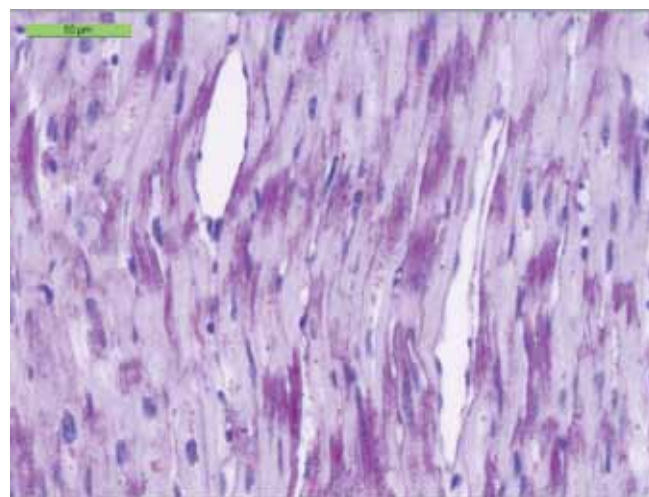


Рис. 1. Неравномерное PAS-позитивное окрашивание цитоплазмы кардиомиоцитов передней стенки левого желудочка. PAS-реакция. ×400

Fig. 1. Non-uniform PAS-positive colouring of the cytoplasm of the cardiac myocytes in a anterior wall of the left ventricle. PAS stain. ×400

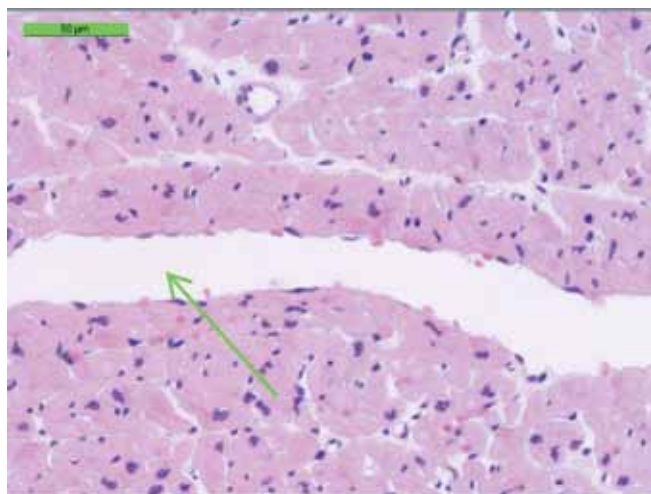


Рис. 2. Крупный тонкостенный кровеносный сосуд (зеленая стрелка) в компактном слое нижней стенки левого желудочка. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

Fig. 2. Large thin-walled blood vessel (green arrow) in a compact layer of the inferior wall of the left ventricle. H & E stain. ×400

и больная в удовлетворительном состоянии была выписана из клиники 29.12.2009 года.

Наблюдение № 2

Больная И.Е.В., 49 лет, поступила в ФГБУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» с жалобами на слабость, одышку при минимальной физической нагрузке и в покое, увеличение живота, отеки ног. **Диагноз при поступлении. Основное заболевание.** Рестриктивная кардиомиопатия. **Осложнения основного заболевания.** Синдром малого выброса левого желудочка. НК 3, 3–4 ФК по NYHA.

Anamnesis morbi. Длительное время наблюдали различные нарушения ритма, преимущественно предсердные. РЧА – без эффекта. В 2011 году выполнена операция «Лабиринт», изоляция правого предсердия, имплантация эпикардального ЭКС. С сентября 2012 года появился асцит и отеки. Одышка – последние три месяца. На фоне диуретической терапии снизился темп диуреза, прогрессировала азотемия. При эхокардиографии в мае 2013 года – малые объемы левого желудочка, увеличение правых отделов без признаков легочной гипертензии. В связи с гиперкалиемией и азотемией в мае-июне 2013 года проводили гемодиализ, ультрафильтрацию. Поступила для обследования по программе трансплантации сердца. Сохранялась олигоанурия, ежедневно проводили сеансы ГДФ.

Осмотр при поступлении. Состояние тяжелое. Сознание ясное. Передвигается на кресле. Ходит с трудом. Кожные покровы с бронзовым оттенком, сухие, тургор снижен. Отеки голеней, стоп, бедер. Асцит. Аускультативно дыхание везикулярное,

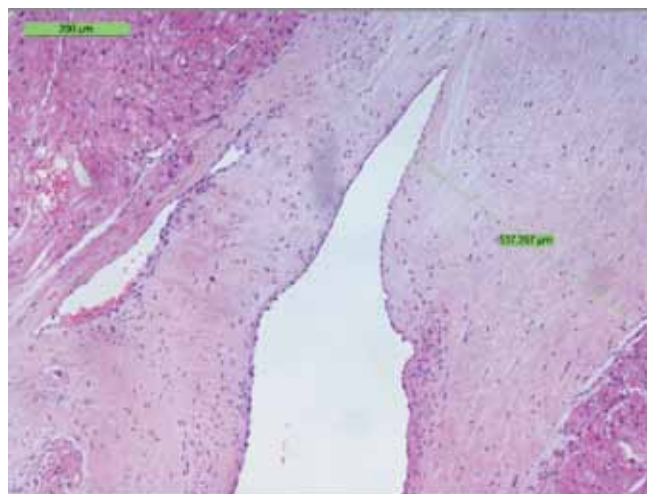


Рис. 3. Выраженный склероз эндокарда трабекул в области передней стенки левого желудочка. Окраска гематоксилином и эозином. ×100

Fig. 3. The expressed sclerosis of the endocardium of the trabeculae in the field of a anterior wall of the left ventricle. H & E stain. ×100

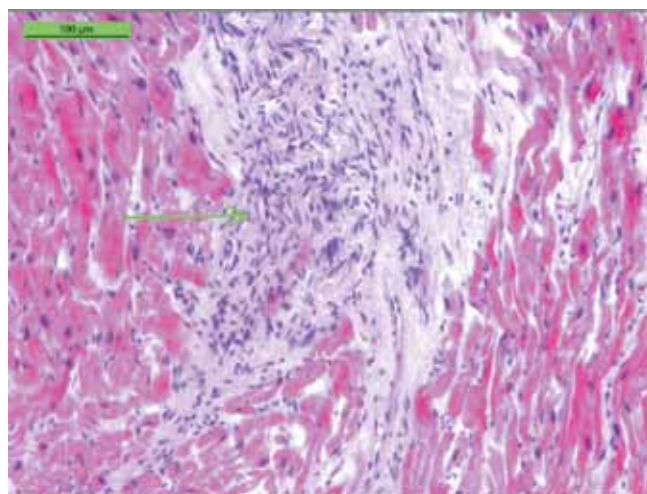


Рис. 4. Нервный ствол вегетативной системы в межжелудочковой перегородке. Окраска гематоксилином и эозином. ×200

Fig. 4. Nervous fulcrum of the vegetative system in the inter-ventricular septum. H & E stain. ×200

ослаблено в нижних отделах легких. Хрипов нет. ЧДД – 18 в минуту. Пульс ритмичный сниженного наполнения и напряжения, без дефицита, ЧСС – 90 в минуту. Тоны сердца приглушены. АД 100/70 мм рт. ст. Живот увеличен в объеме за счет ненапряженного асцита. Печень и почки не пальпируются. Симптом Пастернацкого отрицательный. Дизурические симптомы отсутствуют.

По данным ЭхоКГ: КДР ЛЖ – 5,4 см, КДО ЛЖ – 176, ФИ – 20%. ДЛА – 30 мм рт. ст.

Исследование центральной гемодинамики: без оксида азота – ЧСС – 91 в мин, АД – 96/75/69 мм

рт. ст., ДЗЛК – 16 мм рт. ст., ДЛА – 31/22/18 мм рт. ст., ОЛС – 3,1 ед. Вуда.

Больная была подготовлена к трансплантации сердца. **Предтрансплантационный диагноз. Основное заболевание.** Рестриктивная кардиомиопатия. **Осложнения основного заболевания.** Синдром малого выброса ЛЖ. НК 3, III–IV ФК по NYHA. Статус 1B по UNOS. **Сопутствующие заболевания.** Правосторонний нефроптоз. Киста правой почки. Нефропатия. Состояние после сеансов ГДФ.

Ортопическая трансплантация сердца с реимплантацией ЭКС с эпикардальным электродом выполнена 17.09.2013 года.

Патологоанатомическое исследование нативного сердца. Результаты макроскопического исследования. Желудочки сердца иссечены по предсердно-желудочковой борозде, массой 285 г, размерами 12×10,5×4 см. Коронарные артерии широкие, интима венечных артерий сердца и их ветвей гладкая чистая, артерии проходимые на всем протяжении. Периметр фиброзного кольца митрального клапана – 12 см. Толщина стенки левого желудочка в средних отделах – 1,2 см. Миокард на разрезе коричневого цвета, в средних отделах передней стенки левого желудочка с частичным переходом на межжелудочковую перегородку и в области вершины компактный слой толщиной около 3 мм, толщина губчатого слоя достигает 8–10 мм, между трабекулами глубокие и широкие щели. Периметр фиброзного кольца трикуспидального клапана – 10,5 см. Толщина стенки правого желудочка – 0,4 см. Толщина межжелудочковой перегородки – 1 см.

Результаты гистологического исследования. В области передней и нижней стенки левого желу-

дочка имеется выраженная дистрофия, хаотичное и беспорядочное расположение кардиомиоцитов компактного слоя миокарда; диффузно-очаговый склероз интерстиция с дегенерацией коллагена (рис. 5). Губчатый слой состоит из множественных трабекул с широкими межтрабекулярными промежутками (рис. 6), легкая степень склероза эндокарда и очаговый субэндокардиальный фиброз (рис. 7). В отдельных трабекулах передней стенки левого желудочка, как и в компактном слое, отмечена де-

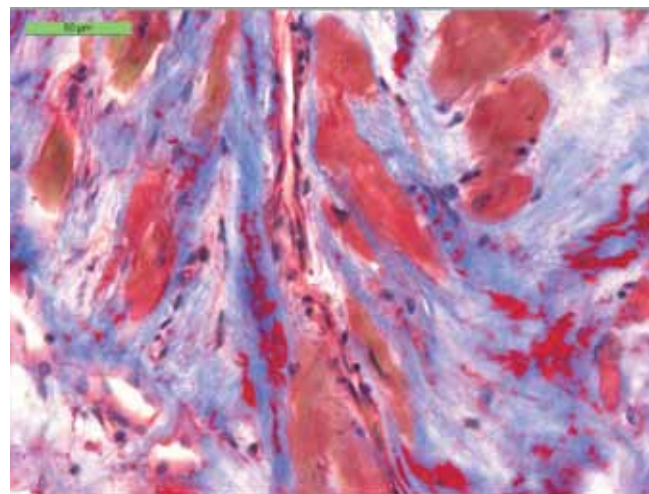


Рис. 5. Дистрофия кардиомиоцитов и склероз интерстиция с дегенерацией коллагена (бордового цвета) в нижней стенке левого желудочка. Трехцветная окраска по Массону. ×400

Fig. 5. Dystrophy of the cardiac myocytes and sclerosis of the interstitium with degeneration of the collagen in the inferior wall of the left ventricle. Masson trichrome stain. ×400

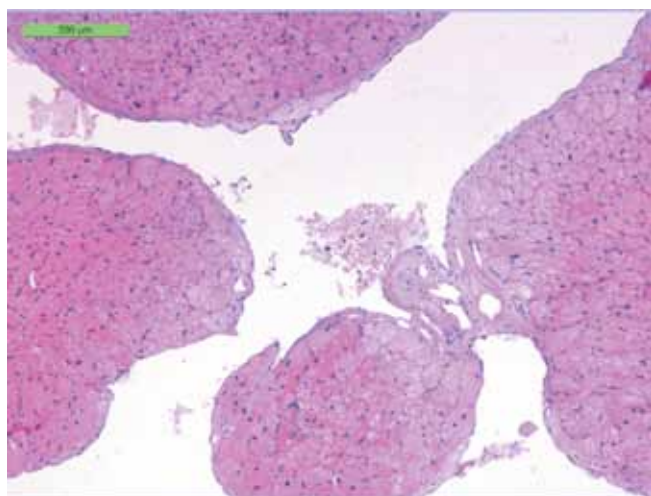


Рис. 6. Трабекулы с широкими межтрабекулярными пространствами в передней стенке левого желудочка. Окраска гематоксилином и эозином. ×100

Fig. 6. Trabeculas with wide intertrabecular spaces in a anterior wall of the left ventricle. H & E stain. ×100

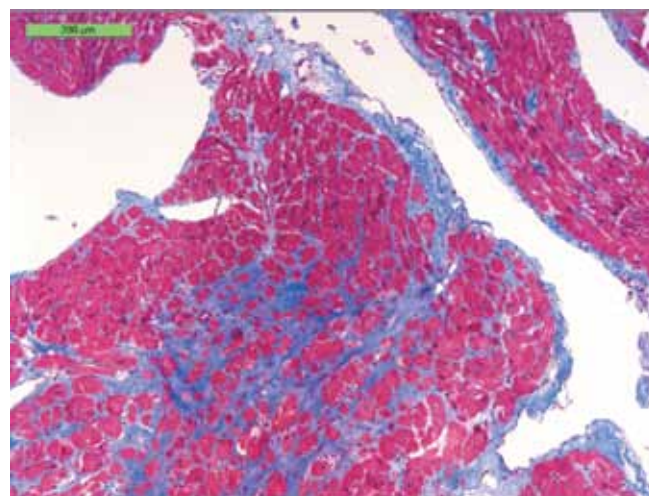


Рис. 7. Диффузный склероз трабекул в передней стенке левого желудочка. Трехцветная окраска по Массону. ×100

Fig. 7. Diffuse sclerosis of the trabeculas in a anterior wall of the left ventricle. Masson trichrome stain. ×100

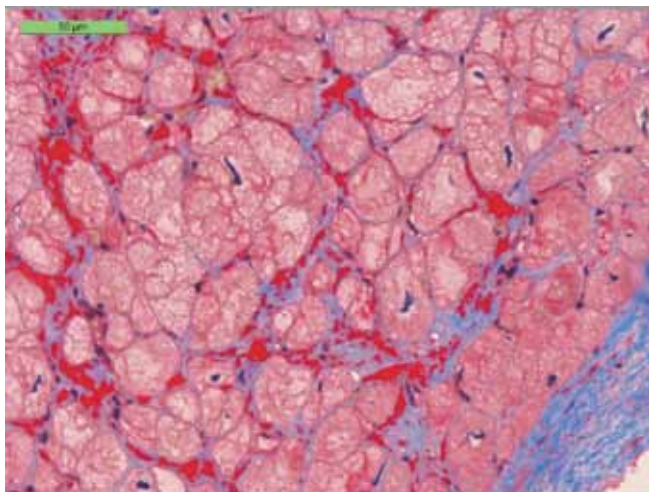


Рис. 8. Дистрофия кардиомиоцитов с дегенерацией коллагена (бордового цвета) в интерстиции трабекул свободной стенки правого желудочка. Трехцветная окраска по Массону. $\times 400$

Fig. 8. Dystrophy of the cardiac myocytes and a degeneration of collagen in interstitium of the trabeculas in the free wall of the right ventricle. Masson trichrome stain. $\times 400$

генерация коллагена (рис. 8). В межжелудочковой перегородке – дистрофия кардиомиоцитов, диффузный склероз интерстиция и разрастание соединительной ткани вокруг сосудов. В стенке правого желудочка имеет место дистрофия кардиомиоцитов, много гипертрофированных клеток, а также хаотичное и беспорядочное расположение кардиомиоцитов. Интрамиокардиальные сосуды и сосуды эпикарда – без особенностей. **Патологоанатомический диагноз:** изолированный некомпактный миокард левого желудочка.

Пациентка переведена из реанимации в отделение на 14-е послеоперационные сутки. **Заключительный клинический диагноз. Основное заболевание.** Изолированный некомпактный миокард левого желудочка. **Операция.** Ортотопическая трансплантация сердца от 17.09.2013 года. **Осложнения основного заболевания.** НК I. ФК II по NYHA. Железодефицитная анемия легкой степени. Состояние после сеансов ГДФ. **Сопутствующие заболевания.** Правосторонний нефроптоз. Киста правой почки. Больной проводилась стандартная терапия.

При выписке из Центра 30.10.2013 года и по настоящее время состояние больной стабильное. Жалоб не предъявляет.

Наблюдение № 3

Больной Х.Г.М., 31 год, поступил в Центр 03.11.2015 года с жалобами на одышку при минимальной физической нагрузке, приступы удушья по ночам, перебои в работе сердца, слабость.

Anamnesis morbi. В 2007 году при обследовании по поводу приступов синкопе диагностирована дилатационная кардиомиопатия, выявлено нарушение ритма по типу пароксизмальной наджелудочковой и пароксизмов неустойчивой желудочковой тахикардии. Проводилось лечение бета-блокаторами, антагонистами альдостерона, амиодароном 200 мг в сутки, дезагрегантами без выраженного клинического эффекта. Ухудшение в течение 2 месяцев, когда на фоне принимаемой медикаментозной терапии начали прогрессировать признаки сердечной недостаточности.

Диагноз при поступлении. Основное заболевание. Некомпактная кардиомиопатия. **Осложнения основного заболевания.** Правосторонний гидроторакс. ХСН ПБ. ФК III. Нарушение ритма: пароксизмы неустойчивой желудочковой и наджелудочковой тахикардии, пароксизмы тахикардии.

Осмотр при поступлении. Состояние тяжелое, обусловлено сердечной недостаточностью. Сознание ясное. Контакт доступен. Кожа чистая, акроцианоз. Пастозность голеней и стоп. Периферические лимфоузлы не увеличены. Перкуторно границы сердца расширены влево. Тоны сердца приглушены, ритм правильный, ЧСС 80 ударов в минуту. АД 100/70 мм рт. ст. Пульсация на артериях обеих стоп сохранена. Грудная клетка правильной формы. Границы легких не изменены. Дыхание свободное, жесткое, проводится во все отделы, ослаблено в нижнебоковых отделах, больше справа, хрипов нет. ЧДД – 24 в мин. Язык влажный, обложен белым налетом. Живот при пальпации мягкий, безболезненный. Печень +4 см кнаружи от края реберной дуги. Дизурических расстройств нет.

По данным ЭхоКГ: КДР – 5,8 см, КДО – 179, ФИ – 25%. ДЛА – 35 мм рт. ст. Выраженная трабекулярность полости и тромб в области верхушки левого желудочка, выраженный диффузный гипокинез.

При спиральной компьютерной томографии выявлено расширение камер сердца, тромбы в проекции верхушек левого и правого желудочков, правосторонний гидроторакс с компрессией правого легкого, а также признаки застойной печени.

Исследование центральной гемодинамики: без оксида азота – ЧСС – 98 в мин, АД – 99/73/65 мм рт. ст., ДЗЛК – 8 мм рт. ст., ДЛА – 20/10/15 мм рт. ст., ОЛС – 1,3 ед. Вуда.

Ортотопическая аллотрансплантация сердца была выполнена через неделю после поступления в Центр – 10.11.15 г.

Патологоанатомическое исследование нативного сердца. Результаты макроскопического исследования. Желудочки сердца, иссеченные по предсердно-желудочковой борозде, массой – 320 грамм, размерами 15×15×4 см. Интима ствола и ветвей

левой и правой коронарных артерий гладкая, блестящая.

Периметр фиброзного кольца митрального клапана – 13 см. Полость левого желудочка дилатирована. Толщина его стенки на различных уровнях варьирует от 0,9 до 1,3 см. За исключением базальных отделов компактный слой практически отсутствует и состоит из губчатого слоя трабекулярного строения. В межтрабекулярных пространствах нижней и средней трети, особенно в области верхушки, видны множественные тромбы разной степени организации, пестрого вида – от красного до серого цвета (рис. 9). Полость правого желудочка также дилатирована, периметр фиброзного кольца трикуспидального клапана – 15,5 см, а толщина миокарда от 0,1 до 0,2 см. Толщина межжелудочковой перегородки – 1,1 см, на разрезе в ее толще – прослойки жировой клетчатки. **Результаты гистологического исследования.** В передней и нижней стенке левого желудочка компактный слой миокарда менее 1 мм (рис. 10). Губчатый слой представлен множественными трабекулами с широкими межтрабекулярными промежутками. Трабекулы с выраженным склерозом (рис. 11), атрофией и дистрофией кардиомиоцитов (рис. 12). В свободной стенке правого желудочка также склероз интерстиция с дегенерацией коллагена и дистрофия кардиомиоцитов. В межжелудочковой перегородке склероз миокарда выражен в меньшей степени. Вместе с тем в прослойки соединительной ткани оказываются заключенными нервные стволы вегетативной системы.

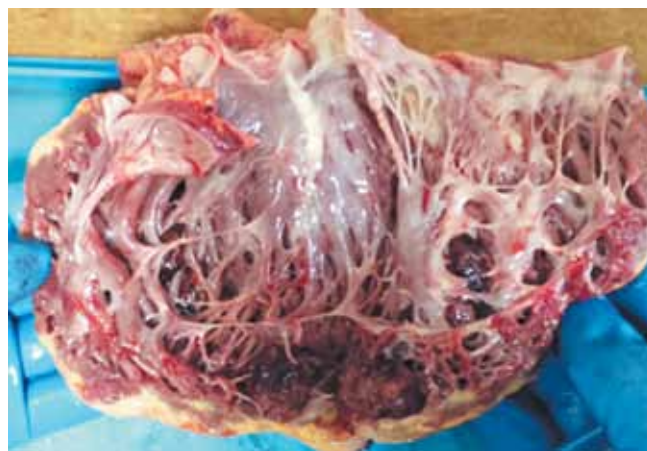


Рис. 9. Удаленные желудочки нативного сердца реципиента. Вскрытая полость левого желудочка сердца. Дилатация его полости. В свободной стенке желудочка почти полностью отсутствует компактный слой миокарда

Fig. 9. Removed ventricles of the native heart of the recipient. In figure – an opened cavity of the left ventricle of the heart. Dilated his cavities. In a free wall of the ventricle almost completely there is no compact layer of a myocardium

Наряду с разрастанием соединительной ткани в межжелудочковой перегородке отмечено значительное содержание жировой клетчатки (рис. 13). **Патологоанатомический диагноз.** Изолированный некомпактный миокард левого желудочка.

При выписке, 15.12.2015 г., и по настоящее время общее состояние пациента и функция трансплантата удовлетворительные, больной жалоб не предъявляет.

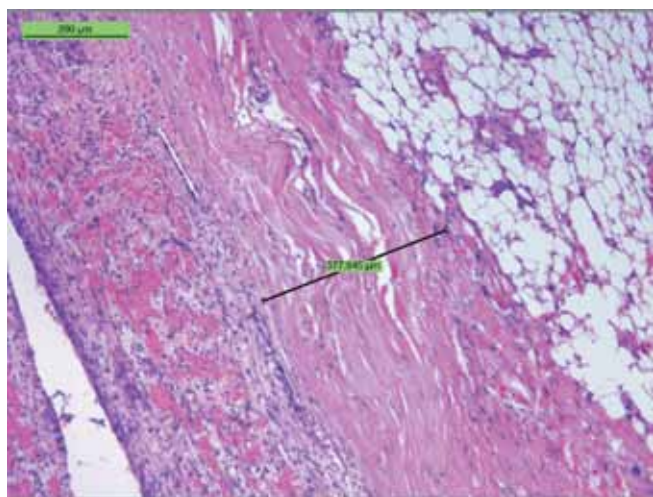


Рис. 10. Предельно истонченный компактный слой нижней стенки левого желудочка. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 10. Extremely thin a compact layer of the inferior wall of the left ventricle. H & E stain. $\times 100$

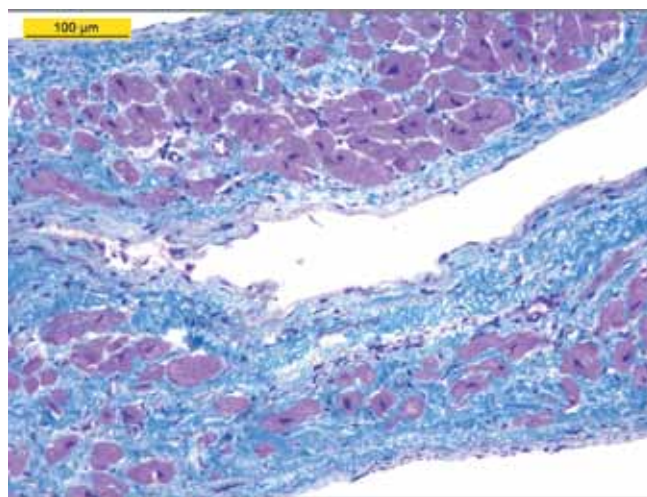


Рис. 11. Выраженный склероз эндокарда и интерстиция, а также атрофия кардиомиоцитов трабекул передней стенки левого желудочка. Трехцветная окраска по Массону. $\times 200$

Fig. 11. The expressed sclerosis of the endocardium and of the interstitium, and also an atrophy of the cardiac myocytes of the trabeculae in the anterior wall of the left ventricle. Masson trichrome stain. $\times 200$

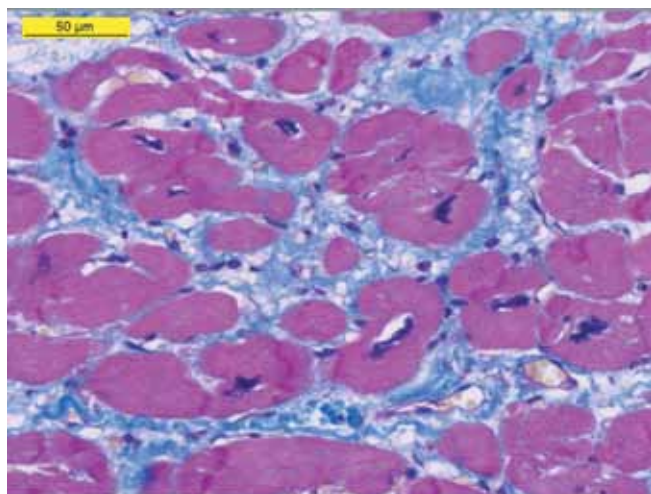


Рис. 12. Трабекула передней стенки левого желудочка. Выраженная дистрофия кардиомиоцитов с перинуклеарным отеком и гиперхроматозом уродливых ядер. Трехцветная окраска по Массону. $\times 400$

Fig. 12. Trabecula in a anterior wall of the left ventricle. The expressed dystrophy of the cardiac myocytes with perinuclear edema and hyperchromatosis of the misshapen nucleus. Masson trichrome stain. $\times 400$

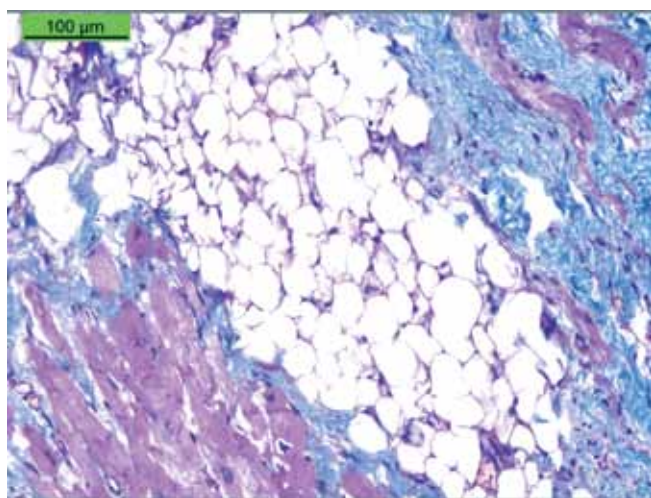


Рис. 13. Жировая клетчатка и склероз интерстиция в межжелудочковой перегородке. Трехцветная окраска по Массону. $\times 200$

Fig. 13. Fatty tissue and sclerosis of the interstitium in the interventricular septum. Masson trichrome stain. $\times 200$

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем Центре в листе ожидания трансплантации сердца основным контингентом являются пациенты, у которых застойная сердечная недостаточность развилась вследствие дилатационной или ишемической кардиомиопатии. Однако в последнее десятилетие трансплантацию сердца выполняют и больным, страдавшим другими заболеваниями сердца, в частности, такой редкой патологией,

как ИНМЛЖ. В Центре с 1986 года по 25 декабря 2019 года было выполнено 1413 трансплантаций сердца. Изолированный некомпактный миокард левого желудочка был диагностирован по данным ЭхоКГ СКТ и подтвержден морфологически только у трех пациентов, что составляет лишь 0,2%. Исходя из доступной литературы [4, 5, 16, 17], до настоящего времени было опубликовано только 10 наблюдений трансплантации сердца взрослым пациентам, страдавшим ИНМЛЖ.

Трудность диагностики ИНМЛЖ, о чем пишут многие авторы [6–9], можно отметить и в приведенных нами наблюдениях. Двоим пациентам (набл. 1, 3) длительное время ставили диагноз «дилатационная кардиомиопатия». Лишь на стадии развития терминальной сердечной недостаточности у одной больной (набл. 1) был поставлен до трансплантации сердца правильный клинический диагноз, а у другого больного (набл. 3) – только при госпитализации в наш Центр. Одна из больных (набл. 2), вплоть до трансплантации сердца, наблюдалась с диагнозом «рестриктивная кардиомиопатия». Только после морфологического исследования был поставлен верный диагноз – изолированный НМЛЖ.

По данным литературы [6–8], необходимо проводить особенно тщательную дифференциальную диагностику ИНМЛЖ с дилатационной кардиомиопатией, при которой дилатация полости левого желудочка сопровождается истончением компактного слоя миокарда, что создает впечатление гипертрабекулярности. Напротив, при ИНМЛЖ дилатация полости левого желудочка может привести к ошибочному диагнозу дилатационной кардиомиопатии [6]. W.C. Roberts et al. [7], сообщая о трансплантации сердца трем пациентам (из них две женщины) в возрасте 36, 45 и 49 лет с диагнозом «неишемическая дилатационная кардиомиопатия», отмечали у этих больных гипертрабекулярность свободной стенки дилатированного левого желудочка. В представленных собственных наблюдениях авторы говорят об ИНМЛЖ. Однако они считают, что анализ макрофотографий сердца из опубликованных наблюдений других авторов свидетельствует, по крайней мере, о морфологической гипердиагностике ИНМЛЖ [7]. Подтверждением этого тезиса является работа M. Zhang et al. [8], которые исследовали 64 нативных сердца трансплантологических пациентов, страдавших дилатационной кардиомиопатией; у пяти из этих больных был умеренно неуплотненный миокард левого желудочка и гипертрабекулярность.

Необходимость в трансплантации сердца пациентам с ИНМЛЖ возникает редко и определяется выраженностью застойной сердечной недостаточности, рефрактерной к консервативной терапии. Она может развиваться у детей грудного возраста, но может отсутствовать даже у взрослых пациентов. Более того,

у многих больных с изолированным НМЛЖ отсутствует какая-либо симптоматика [4, 18]. Во всех трех наблюдениях, в которых потребовалась трансплантация в нашем Центре, пациенты страдали застойной сердечной недостаточностью, связанной с ИНМЛЖ.

Подготовка к операции, техника трансплантации сердца и посттрансплантационное ведение пациентов, страдавших ИНМЛЖ, не отличаются от общей когорты трансплантологических больных, но, тем не менее, требуют индивидуального подхода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изолированный некомпактный миокард левого желудочка – редкое заболевание, которое мало освещено в научной литературе. Оно может протекать как без симптомов, так и быть причиной тяжелой застойной сердечной недостаточности, рефрактерной к консервативной терапии и определяющей необходимость трансплантации сердца.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hook S, Ratliff NB, Rosenkranz E, Sterba R. Isolated noncompaction of the ventricular myocardium. *Pediatr Cardiol.* 1996; 17: 43–45.
2. Agmon Y, Connolly HM, Olson LJ, Khandheria BK, Seward JB. Noncompaction of the ventricular myocardium. *J Am Soc Echocardiogr.* 1999; 12: 859–863.
3. Shah CP, Nagi KS, Thakur RK, Boughner DR, Xie B. Spongy left ventricular myocardium in an adult. *Tex Heart Inst J.* 1998; 25: 150–151.
4. Conraads V, Paelinck B, Vorlat A, Goethals M, Jacobs W, Vrints C. Isolated non-compaction of the left ventricle (a rare indication for transplantation). *J Heart Lung Transplant.* 2001; 20: 904–907.
5. Stamou S, Lefrak E, Athari FC, Burton NA, Massimiano PS. Heart transplantation in a patient with isolated noncompaction of the left ventricular myocardium. *Ann Thorac Surg.* 2004; 77: 1806–1808.
6. Шумаков ВИ, Хубутия МИ, Ильинский ИМ. Дилатационная кардиомиопатия. М.: Триада, 2003. 448 с. Shumakov V, Khubutiya M, Iljinsky I. Dilated Cardiomyopathy. М., 2003. 448 p.
7. Roberts WC, Karia SJ, Ko JM, Grayburn PA, George BA, Hall SA et al. Examination of isolated ventricular noncompaction (hypertrabeculation) as a distinct entity in adults. *Am J Cardiol.* 2011 Sep 1; 108 (5): 747–752. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.04.027. Epub 2011 Jul 1.
8. Zhang M, Tavora F, Huebner T, Heath J, Burke A. Allograft pathology in patients transplanted for idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Surg Pathol.* 2012 Mar; 36 (3): 389–395. doi: 10.1097/PAS.0b013e31823b02f5.
9. Szymanski C, Otmani A, Leborgne L et al. Ventricular tachycardia revealed by a left ventricular non-compaction. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie.* 2007; 56 (6): 319–323. View at Publisher. View at Google Scholar. View at PubMed.
10. Greutmann M, Mah ML, Silversides CK, Klaassen S, Attenhofer Jost CH, Jenni R, Oechslin EN. Predictors of adverse outcome in adolescents and adults with isolated left ventricular noncompaction. *Am J Cardiol.* 2012 Jan 15; 109 (2): 276–281. doi: 10.1016/j.amjcard.2011.08.043. Epub 2011 Oct 28.
11. Cavusoglu Y, Ata N, Timuralp B et al. Noncompaction of the ventricular myocardium: report of two cases with bicuspid aortic valve demonstrating poor prognosis and with prominent right ventricular involvement. *Echocardiography.* 2003; 20 (4): 379–383. View at Publisher. View at Google Scholar.
12. Chenard J, Samson M, Beaulieu M. Embryonal sinusoids in the myocardium (report of a case successfully treated surgically). *Can Med Assoc J.* 1965; 92: 1356–1359.
13. Robida A, Hajar HA. Ventricular conduction defect in isolated noncompaction of the ventricular myocardium. *Pediatr Cardiol.* 1996; 17: 189–191.
14. Spieker T, Krasemann T, Hoffmeier A, Buning A, Debus V, Kehl H et al. Heart transplantation for isolated noncompaction of the left ventricle in an infant. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2007 Mar; 55 (2): 127–129.
15. Zuckerman WA, Richmond ME, Singh RK, Carroll SJ, Starc TJ, Addonizio LJ. Left-ventricular noncompaction in a pediatric population: predictors of survival. *Pediatr Cardiol.* 2011 Apr; 32 (4): 406–412. doi: 10.1007/s00246-010-9868-5. Epub 2010 Dec 25.
16. Bordes J, Jop B, Imbert S, Hraiech S, Collard F, Kerbaul F. Case Report A Rare Cause of Heart Failure Treated by Heart Transplantation: Noncompaction of the Ventricular Myocardium. *Case Reports in Medicine.* Volume 2009, Article ID 725879, 3 pages. doi: 10.1155/2009/725879.
17. Said S, Cooper CJ, Quevedo K, Rodriguez E. Biventricular non-compaction with pre-dominant right ventricular involvement, reduced left ventricular systolic and diastolic function, and pulmonary hypertension in a Hispanic male. *Am J Case Rep.* 2013 Dec 13; 14: 539–542. doi: 10.12659/AJCR.889676. eCollection 2013.
18. Captur G, Nihoyannopoulos P. Left ventricular non-compaction: genetic heterogeneity, diagnosis and clinical course. *Int J Cardiol.* 2010 Apr 15; 140 (2): 145–153.
19. Uribarri A, Rojas SV, Avsar M, Hanke JS, Napp LC, Berlin D et al. First series of mechanical circulatory support in non-compaction cardiomyopathy: Is LVAD implantation a safe alternative? *Int J Cardiol.* 2015 Oct 15; 197: 128–132. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.04.046. Epub 2015 Apr 7.

*Статья поступила в редакцию 16.01.2020 г.
The article was submitted to the journal on 16.01.2020*

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-26-34

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МИКРОРНК В РАННИЕ И ОТДАЛЕННЫЕ СРОКИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ У РЕЦИПИЕНТОВ СЕРДЦА

Д.А. Великий¹, О.Е. Гичкун^{1, 2}, С.О. Шарапченко¹, О.П. Шевченко^{1, 2},
А.О. Шевченко^{1, 2, 3}

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

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

³ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: провести сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и определить связь с острым отторжением трансплантата. **Материалы и методы.** В исследование включены 46 реципиентов сердца, среди них 36 (78,3%) мужчин (средний возраст реципиентов составил $47,7 \pm 10,8$ (от 16 до 67) года) и 12 пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности, среди них 8 (66,7%) мужчин (средний возраст пациентов составил $46,1 \pm 6,4$ (от 37 до 64) года). Группу сравнения составили 12 здоровых лиц, значимо не отличающихся по полу и возрасту. Уровень экспрессии микроРНК в плазме крови определялся методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Верификацию отторжения трансплантата проводили на основании морфологического исследования образцов эндомикардиальных биоптатов. **Результаты.** Установлены достоверно более высокие показатели экспрессии микроРНК-101, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 в плазме крови у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности по сравнению со здоровыми лицами ($p < 0,02$). В ранние сроки после трансплантации у реципиентов сердца уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 был достоверно ниже, чем у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью ($p < 0,003$). Через год и более после трансплантации достоверные различия экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142 и микроРНК-339 у реципиентов сердца и у здоровых лиц отсутствовали. У реципиентов с острым отторжением уровень экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 достоверно отличался от показателей реципиентов без признаков отторжения ($p = 0,04$ и $p = 0,03$ соответственно). **Заключение.** Полученные данные об изменении уровня экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата позволяют предположить возможное диагностическое значение этих биомаркеров для определения риска развития отторжения.

Ключевые слова: трансплантация сердца, микроРНК, хроническая сердечная недостаточность, биомаркеры, отторжение.

Для корреспонденции: Великий Дмитрий Алексеевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 193-87-62. E-mail: dim_vel@mail.ru

For correspondence: Velikiy Dmitry Alekseevich. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel. (499) 193-87-62. E-mail: dim_vel@mail.ru

MICRORNA EXPRESSION LEVELS IN EARLY AND LONG-TERM PERIOD FOLLOWING HEART TRANSPLANTATION

*D.A. Velikiy¹, O.E. Gichkun^{1, 2}, S.O. Sharapchenko¹, O.P. Shevchenko^{1, 2},
A.O. Shevchenko^{1, 2, 3}*

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

Objective: to conduct comparative analysis of the expression levels of microRNA-101, microRNA-142, microRNA-27, microRNA-339 and microRNA-424 in patients with severe chronic heart failure and in heart recipients in the early and long-term period following heart transplantation and to determine the association with acute transplant rejection. **Materials and methods.** The study included 46 heart recipients, among whom were 36 men (78.3%); the average age of the recipients was 47.7 ± 10.8 (16 to 67) years, and 12 patients with end-stage chronic heart failure, among whom were 8 men (66.7%); the average age of the patients was 46.1 ± 6.4 (37 to 64) years. The control group consisted of 12 healthy individuals, not significantly different by gender and age. microRNA expression levels in blood plasma were determined through quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). Transplant rejection was verified via morphological analysis of endomyocardial biopsy specimens. **Results.** Blood plasma of patients with end-stage chronic heart failure had significantly higher expression rates of microRNA-101, microRNA-27, microRNA-339 and microRNA-424 than in healthy individuals ($p < 0.02$). In the early stages following transplantation, the expression levels of microRNA-101 and microRNA-27 in heart recipients were significantly lower than in patients with severe chronic heart failure ($p < 0.003$). A year or more after transplantation, there were no significant differences in the expression levels of microRNA-101, microRNA-142, and microRNA-339 in heart recipients and in healthy individuals. In recipients with acute rejection, the expression levels of microRNA-101 and microRNA-27 significantly differed from that of recipients without signs of rejection ($p = 0.04$ and $p = 0.03$, respectively). **Conclusion.** The obtained data on changes in the expression levels of microRNA-101 and microRNA-27 in heart recipients with acute transplant rejection suggests possible diagnostic value of these biomarkers in determining the risk of rejection.

Keywords: heart transplantation, microRNA, chronic heart failure, biomarkers, rejection.

Значительные достижения в области хирургической техники и совершенствование иммуносупрессивной терапии позволили увеличить выживаемость и улучшить качество жизни реципиентов сердца. Важнейшей задачей ведения пациентов после трансплантации является предотвращение отторжения трансплантата наряду с минимизацией дозы иммуносупрессивных препаратов. Разработка неинвазивных методов выявления отторжения трансплантированного сердца позволит улучшить раннюю диагностику и увеличить продолжительность жизни пациентов за счет снижения числа поздних посттрансплантационных осложнений [1–3].

В последние годы было показано участие ряда биомаркеров в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных сердечной недостаточностью и у пациентов с трансплантированным сердцем, а также возможность использования оценки их концентрации для прогнозирования и диагностики отторжения сердечного трансплантата [4–6]. Отдельную группу составляют микроРНК – малые некодирующие РНК, регулирующие экспрессию генов. Возможность точ-

ного и быстрого определения содержания микроРНК в биологических жидкостях в сочетании с их тканевой и нозологической специфичностью позволяет рассматривать эти малые сигнальные молекулы в качестве перспективных кандидатов на роль биомаркеров отторжения у реципиентов сердца [7–9].

В настоящей работе проведен сравнительный анализ уровня экспрессии микроРНК-27, микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-339 и микроРНК-424 у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и определена связь с острым отторжением трансплантата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 46 пациентов, которым в период с 2013-го по 2016 год в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России была выполнена трансплантация сердца (ТС), среди них 36 (78,3%) мужчин (средний возраст реципиентов составил $47,7 \pm 10,8$ (от 16 до 67) года) и 12 пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью (III и IV функциональный класс по NYHA), среди

них 8 (66,7%) мужчин (средний возраст пациентов составил $46,1 \pm 6,4$ (от 37 до 64) года). У 29 (63%) реципиентов до ТС была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 12 (26%) – ишемическая болезнь сердца (ИБС) и у 5 (11%) – прочие патологии. Максимальная длительность наблюдения реципиентов после ТС составила 2215 суток (медиана 264,5 [32; 785,3]). Группу сравнения составили 12 здоровых лиц, значимо не отличающихся по полу и возрасту.

Все пациенты, имевшие показания к ТС, проходили плановое обследование согласно Национальным клиническим рекомендациям «Трансплантация сердца и механическая поддержка кровообращения» и протоколу ведения пациентов в НМИЦ ТИО. После трансплантации плановые обследования реципиента включали: клиническую оценку состояния, общий и биохимический анализы крови с определением концентрации такролимуса, суточное мониторирование артериального давления (для коррекции антигипертензивной терапии), эхокардиографическое исследование, повторные биопсии миокарда, ежегодное коронароангиографическое исследование. Все реципиенты получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию, включающую комбинацию ингибиторов кальциневрина (такролимус) и цитостатиков (микофенолата мофетил или микофенолоновая кислота), а также варьирующие дозы преднизолона перорально в зависимости от сроков после операции и частоты эпизодов отторжения трансплантата и адъювантную медикаментозную терапию по показаниям [10].

Диагноз острого клеточного отторжения сердечного трансплантата устанавливался на основании результатов гистологического, гуморального – иммуногистохимического исследования эндокардиальных биоптатов.

Материалом для исследования экспрессии микроРНК служила плазма венозной крови; у реципиентов сердца исследовано 56 образцов в различные сроки после трансплантации (от 1 до 3 образцов от каждого пациента, в среднем 1,22).

Выделение суммарной РНК из плазмы периферической крови

Образцы периферической крови пациентов собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом ЭДТА, центрифугировали в течение 10 минут при 3000 оборотах в минуту. Плазму крови отделяли от клеточного осадка и незамедлительно замораживали при -20°C . РНК выделяли из 100 мкл плазмы крови с использованием наборов Serum Plasma (Qiagen, США) с предварительным добавлением $1,6 \times 10^8$ копий синтетической микроРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol.

Cel-miR-39 использовали в качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени

Суммарную РНК из каждого образца конвертировали в кДНК в реакционной смеси (20 мкл), содержащей буфер 1xmi Script HiSpec Buffer, нуклеотидную смесь 1xmi Script Nucleics Mix, при $T = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 60 минут с последующей инкубацией при 95°C в течение 5 минут, охлаждением на льду и доведением объема образца деионизированной водой до 200 мкл. Синтезированная кДНК (2 мкл) служила в качестве матрицы в ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных для исследуемых микроРНК: микроРНК-27, микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-339, микроРНК-424, cel-miR-39 (miScript Primer assay, Ce_miR-39_1, Qiagen), и набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Условия реакции ПЦР: 15 минут при $T = 95^{\circ}\text{C}$ с последующим проведением 40 циклов по 15 секунд при $T = 94^{\circ}\text{C}$, 30 секунд при $T = 50^{\circ}\text{C}$ и 30 секунд при $T = 70^{\circ}\text{C}$ в амплификаторе CFX 96 (Biorad). Интенсивность экспрессии микроРНК рассчитывалась по $2^{-\Delta\text{Ct}}$ методу [11] и выражалась в относительных единицах, эквивалентных $\log_2(2^{-\Delta\text{Ct}})$, где ΔCt – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов был проведен при помощи пакета прикладных программ IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США). Статистическую обработку полученных данных проводили непараметрическими методами: при сравнении зависимых выборок рассчитывали парный критерий Уилкоксона, для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности, как и у реципиентов сердца, показатели экспрессии микроРНК варьировали в широком диапазоне и соответствовали непараметрическому распределению. В настоящей работе результаты представлены значениями меди-

аны и интерквартильного размаха, выраженными в относительных единицах.

Уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца достоверно не различался у мужчин и женщин ($p = 0,29$, $p = 0,33$, $p = 0,25$, $p = 0,71$ и $p = 0,07$ соответс-

твенно). Показатели экспрессии микроРНК не зависели от возраста.

При сравнительном анализе экспрессии микроРНК были обнаружены достоверно более высокие показатели экспрессии микроРНК-101, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 в плазме крови пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности по сравнению со здоровыми лицами (рис. 1).

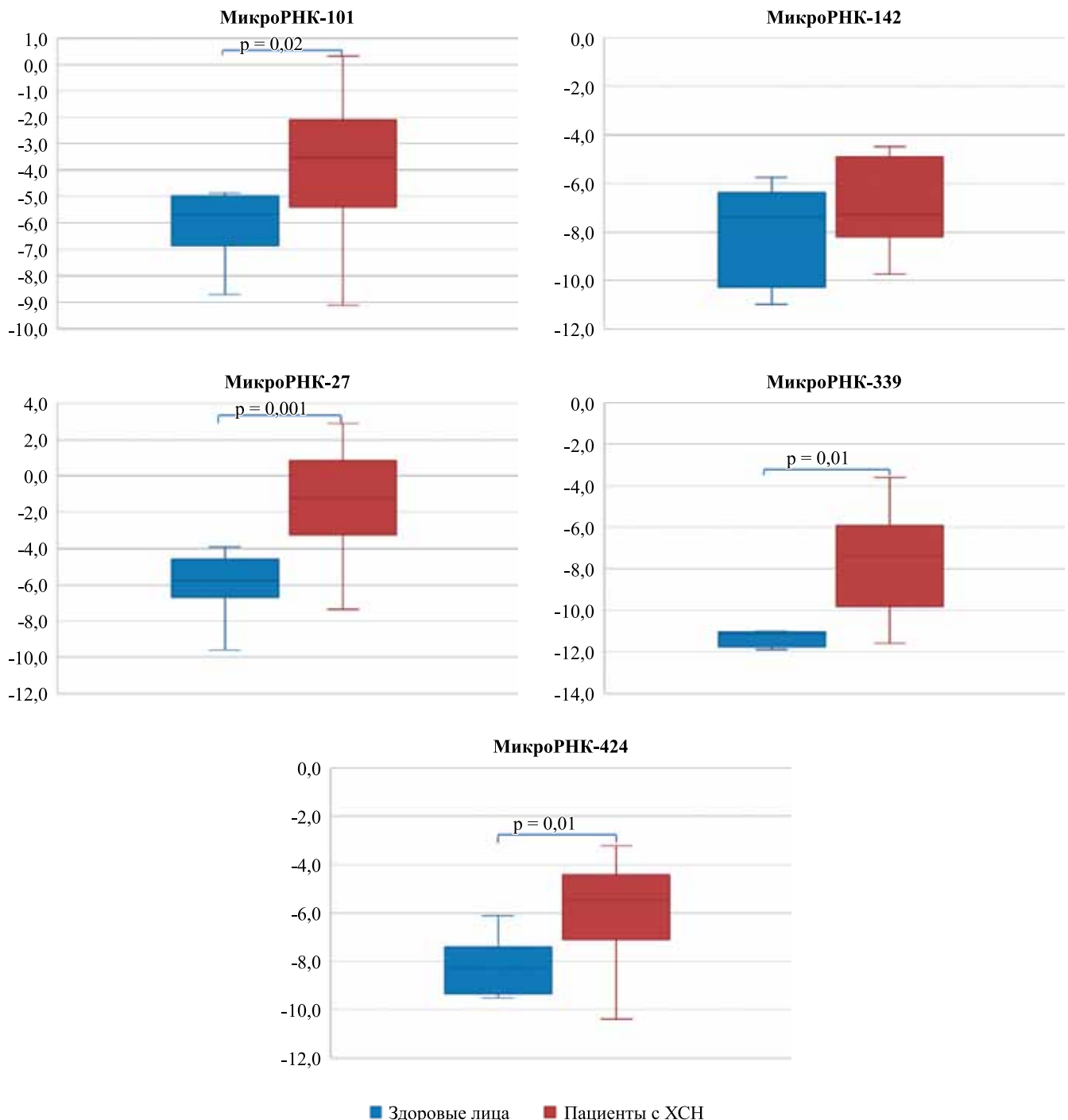


Рис. 1. Уровень экспрессии микроРНК у здоровых лиц и пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью, $\log_2(2^{-\Delta C_t})$

Fig. 1. The expression levels of microRNAs in healthy individuals and patients with severe chronic heart failure, $\log_2(2^{-\Delta C_t})$

Установленные различия уровня экспрессии микроРНК-101, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424, вероятно, отражают совокупность патологических процессов в миокарде пациентов с тяжелой хронической сердечной недостаточностью.

У реципиентов сердца не выявлено достоверных различий в уровне экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 в зависимости от исходного диагноза, послужившего показанием к трансплантации: ДКМП или ИБС ($p = 0,89$, $p = 0,44$, $p = 0,87$, $p = 0,08$ и $p = 0,52$ соответственно). Отсутствовала достоверная корреляционная связь между уровнем экспрессии

микроРНК-101 ($r = 0,001$, $p = 0,99$), микроРНК-142 ($r = 0,004$, $p = 0,98$), микроРНК-27 ($r = -0,06$, $p = 0,68$), микроРНК-339 ($r = 0,06$, $p = 0,7$) и микроРНК-424 ($r = 0,03$, $p = 0,84$) и концентрацией такролимуса в крови реципиентов (рис. 2).

Результаты сравнительного анализа показателей экспрессии микроРНК у пациентов с тяжелой ХСН и реципиентов сердца представлены в табл. 1. Группы пациентов с тяжелой ХСН и реципиентов сердца достоверно не различались по полу и возрасту.

Различия уровней экспрессии микроРНК-101, микроРНК-27, микроРНК-339 в группах у потенциальных реципиентов сердца и всех включенных

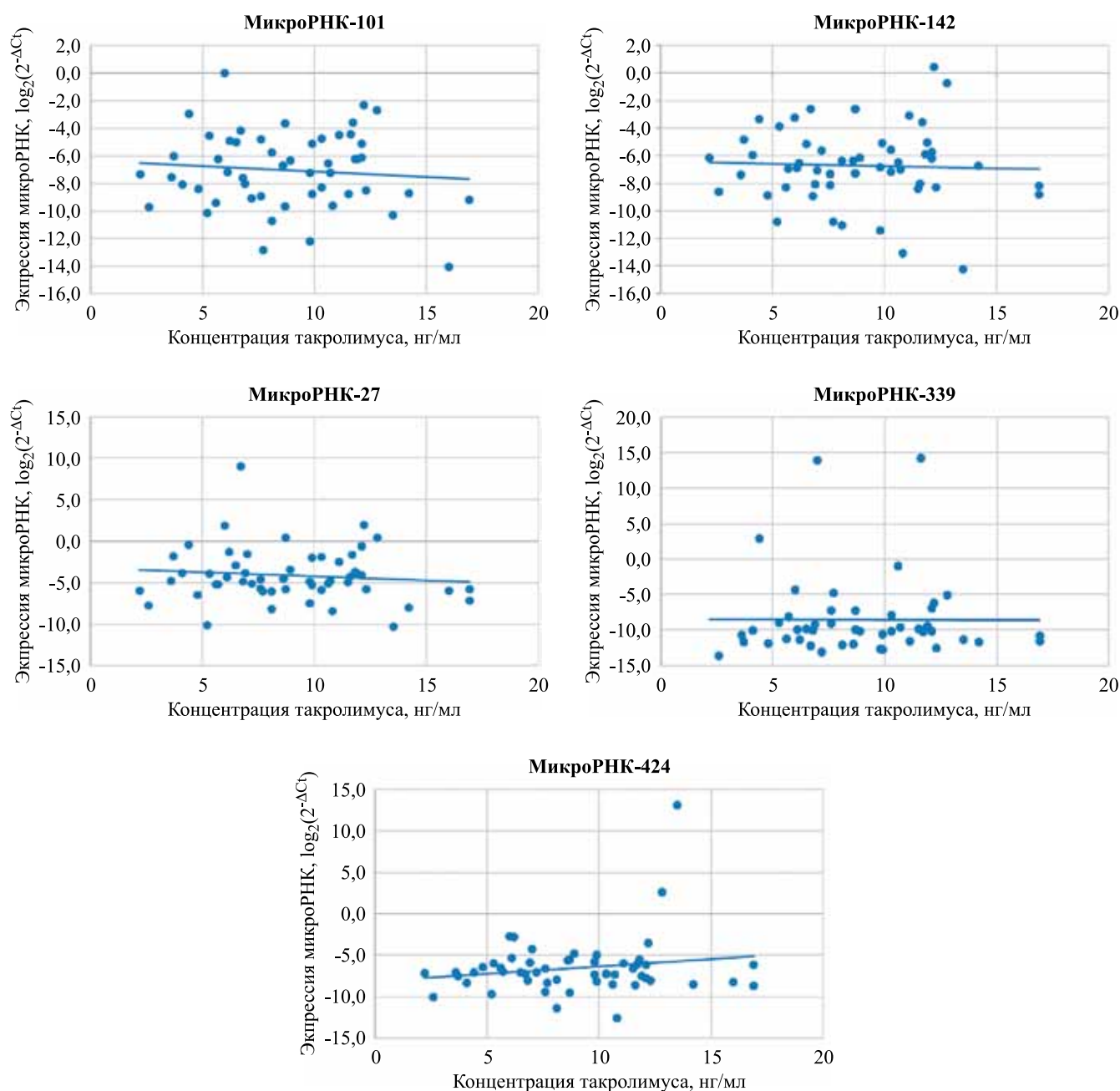


Рис. 2. Анализ корреляционной зависимости между уровнем экспрессии микроРНК и концентрацией такролимуса

Fig. 2. Correlation analysis of the expression levels of microRNAs and tacrolimus concentration

Таблица 1

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у пациентов с хронической сердечной недостаточностью и реципиентов сердца

Comparative analysis of microRNAs expression in patients with chronic heart failure and heart transplant recipients

МикроРНК, $\log_2(2^{-\Delta Ct})$	Пациенты с ХСН	Реципиенты сердца	Достоверность, p
МикроРНК-101	-3,53 [-5,4; -2,09]	-7,21 [-8,98; -5,1]	0,0002
МикроРНК-142	-7,27 [-8,2; -4,9]	-6,67 [-8,19; -5,5]	0,67
МикроРНК-27	-1,23 [-3,26; 0,84]	-4,78 [-5,94; -2,88]	0,01
МикроРНК-339	-7,38 [-9,81; -5,9]	-10,13 [-11,59; -9,02]	0,04
МикроРНК-424	-5,46 [-7,11; -4,42]	-7,05 [-8,11; -5,81]	0,52

Таблица 2

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации

Comparative analysis of microRNAs expression in heart recipients at early and long-term after transplantation

МикроРНК, $\log_2(2^{-\Delta Ct})$	Срок после ТС		Достоверность, p
	1 месяц, n = 22	1 год и более, n = 34	
МикроРНК-101	-8,75 [-9,74; -6,76]	-6,22 [-7,59; -4,78]	0,008
МикроРНК-142	-7,03 [-8,35; -6,01]	-6,52 [-7,39; -5,09]	0,25
МикроРНК-27	-5,79 [-6,06; -4,61]	-4,08 [-5,07; -1,92]	0,04
МикроРНК-339	-10,61 [-11,73; -9,93]	-9,88 [-11,37; -8,15]	0,83
МикроРНК-424	-7,13 [-8,15; -6,13]	-6,99 [-8,01; -5,74]	0,45

в исследование пациентов после трансплантации имели достоверный характер ($p = 0,0002$, $p = 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно).

Установлено, что в ранние сроки после трансплантации (медиана 24 [10; 35] суток) уровни экспрессии микроРНК-142, микроРНК-339 и микроРНК-424 у реципиентов сердца по сравнению с пациентами с тяжелой хронической сердечной недостаточностью достоверно не различались, хотя имелась тенденция к их снижению. Различия уровней экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 в этих группах носили достоверный характер ($p = 0,0001$ и $p = 0,003$ соответственно). Изменение профиля экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 в ранние сроки после трансплантации может быть связано с действием комплекса различных факторов, связанных с оперативным вмешательством, в том числе с системным воспалительным ответом, адаптацией организма к трансплантированному органу и иммуносупрессив-

ной терапии. Имеются данные об участии этих сигнальных молекул в регуляции процессов фиброобразования миокарда через взаимодействия с фактором транскрипции RUNX1 и рецептором 1 трансформирующего фактора роста β (TGF β R1) [12, 13].

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации представлен в табл. 2.

У реципиентов сердца спустя год и более после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-142, микроРНК-339 и микроРНК-424 по сравнению с реципиентами в ранние сроки после ТС достоверно не отличался, однако отмечалась тенденция к его повышению. Различия уровней экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 в данных группах имели достоверный характер ($p = 0,008$ и $p = 0,04$ соответственно).

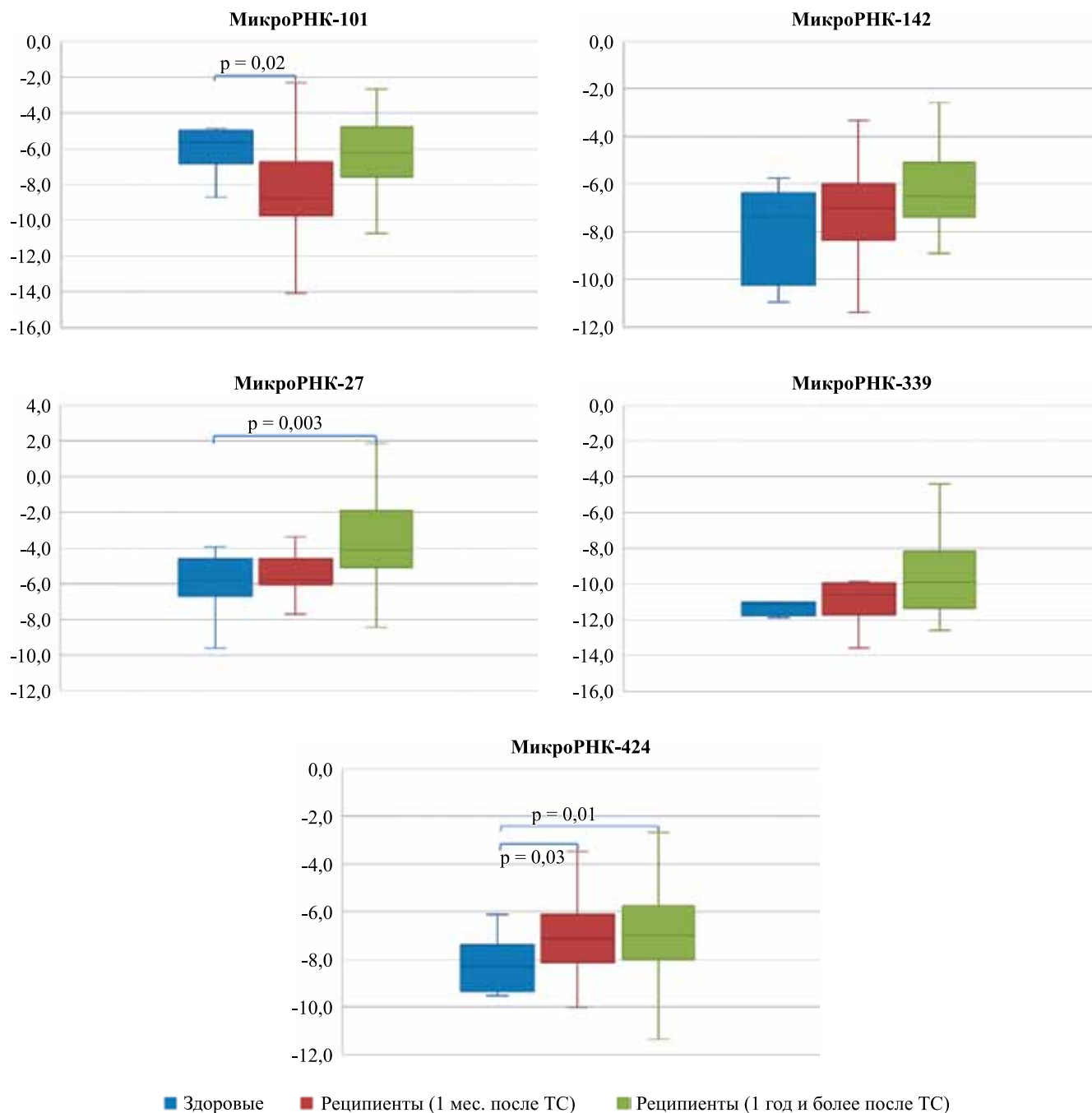


Рис. 3. Уровень экспрессии микроРНК у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и у здоровых лиц, $\log_2(2^{-\Delta C_t})$

Fig. 3. The expression levels of microRNA in heart recipients at early and long-term after transplantation, $\log_2(2^{-\Delta C_t})$

На рис. 3 представлены показатели экспрессии микроРНК у реципиентов сердца в ранние и отдаленные сроки после трансплантации и у здоровых лиц.

Установлено, что спустя год и более после трансплантации величина экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142 и микроРНК-339 у реципиентов достоверно не отличалась от таковой у здоровых лиц. Различия уровней экспрессии микроРНК-27 и микроРНК-424 в данных группах имели достоверный характер ($p = 0,003$ и $p = 0,01$ соответственно).

Анализ влияния острого отторжения на величину экспрессии исследуемых микроРНК показал следующее. В течение всего периода наблюдения после трансплантации признаки острого отторжения были верифицированы у 27 реципиентов в 31 образце эндомикардиальных биоптатов. Среди них острое клеточное отторжение (R1G–R3G степеней по классификации ISHLT-2004) наблюдалось у 23 реципиентов в 24 образцах, гуморальное – у 6 реципиентов в 6 образцах и смешанное – в 1 образце (табл. 3).

Таблица 3

**Характеристика реципиентов сердца без отторжения
и с отторжением**

**Characteristics of heart recipients
with and without rejection**

Параметр	Реципиенты	
	без отторжения	с отторжением
Возраст (лет)	48,4 ± 9,9	49 ± 10,4*
Мужской пол (n, %)	16 (64%)	27 (87%)
Диагноз до ТС (n, %)	ДКМП – 17 (68%) ИБС – 5 (20%) Прочее – 3 (12%)	ДКМП – 18 (58%) ИБС – 10 (32%) Прочее – 3 (10%)
Концентрация такролимуса (нг/мл)	9,9 [6,1; 12]	8,1 [6,7; 10,7]*

Примечание. * – $p > 0,05$, в сравнении с реципиентами без отторжения.

Note. * – $p > 0,05$, compared with recipients without rejection.

Таблица 4

**Сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов сердца
с отторжением трансплантата и без отторжения**

**Comparative analysis of microRNA expression in heart transplant recipients
with and without rejection**

МикроРНК, $\log_2(2^{-\Delta Ct})$	Реципиенты		Достоверность, p
	без отторжения	с отторжением	
МикроРНК-101	-7,13 [-8,09; -4,87]	-8,21 [-9,60; -6,22]	0,04
МикроРНК-142	-7,02 [-8,04; -5,73]	-6,36 [-8,72; -5,11]	0,51
МикроРНК-27	-4,65 [-5,32; -1,85]	-5,19 [-6,78; -3,86]	0,03
МикроРНК-339	-10,04 [-11,2; -8,22]	-10,26 [-11,62; -9,2]	0,81
МикроРНК-424	-7,04 [-7,47; -5,79]	-7,05 [-8,27; -5,92]	0,98

Реципиенты с острым отторжением трансплантата и без такового значимо не различались по возрасту, полу и диагнозу до трансплантации. При анализе концентрации такролимуса в крови реципиентов сердца не было выявлено достоверных различий в группе пациентов с острым отторжением и без такового, концентрация составила 8,1 [6,7; 10,7] и 9,9 [6,1; 12] нг/мл соответственно ($p = 0,75$).

В табл. 4 представлен сравнительный анализ экспрессии микроРНК у реципиентов сердца с острым отторжением трансплантата и без отторжения.

Установлены достоверные различия в величине экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов с острым отторжением по сравнению с реципиентами без отторжения ($p = 0,04$ и $p = 0,03$ соответственно). Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные о возможной диагностической роли микроРНК, в частности микроРНК-101, при остром отторжении трансплантационного сердца [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-27, микроРНК-339 и микроРНК-424 у пациентов с терминальной стадией хронической сердечной недостаточности – потенциальных реципиентов сердца выше, чем у здоровых лиц. Спустя год и более после трансплантации уровень экспрессии микроРНК-101, микроРНК-142 и микроРНК-339 у реципиентов сердца не отличается от здоровых лиц, что может отражать нормализацию адаптационных процессов в трансплантате.

Выявлены различия в уровне экспрессии микроРНК-101 и микроРНК-27 у реципиентов с острым отторжением по сравнению с реципиентами без такового, что может иметь потенциальное значение для оценки риска развития отторжения и возможности минимизации иммуносупрессивной терапии. Для оценки диагностической эффективности микроРНК необходимо проведение дальнейших исследований

профиля экспрессии этих биомаркеров у реципиентов сердца.

Исследование профинансировано грантом Президента Российской Федерации НШ-2598.2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ РФ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kransdorf EP, Kobashigawa JA. Novel molecular approaches to the detection of heart transplant rejection. *Per Med*. 2017 Jul; 14 (4): 293–297.
2. Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero G, Couto-Mallon D. Noninvasive monitoring of acute and chronic rejection in heart transplantation. *Curr Opin Cardiol*. 2017 Mar 16. doi: 10.1097/HCO.0000000000000400. [Epub ahead of print].
3. van Gelder T. Biomarkers in solid organ transplantation. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 Dec; 83 (12): 2602–2604.
4. Великий ДА, Гичкун ОЕ, Шевченко АО. Микро-РНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (7): 403–409. Velikiy DA, Gichkun OE, Shevchenko AO. MikroRNK: rol' v razvitii serdechno-sosudistyx zabolevaniy, perspektivy klinicheskogo primeneniya. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (7): 403–409. [In Russ, English abstract].
5. Savic-Radojevic A, Pljesa-Ercegovac M, Matic M et al. Novel biomarkers of heart failure. *Advances In Clinical Chemistry*. 2017; 79: 93–152.
6. Starling RC, Stehlik J, Baran DA et al. Multicenter analysis of immune biomarkers and heart transplant outcomes: results of the clinical trials in organ transplantation-05 study. *American Journal of Transplantation*. 2016; 16: 121–136.
7. Di Francesco A, Fedrigo M, Santovito D, Ntarelli L, Castellani C, De Pascale F et al. MicroRNA signatures in cardiac biopsies and detection of allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2018 Nov; 37 (11): 1329–1340.
8. Shah P, Bristow MR, Port JD. MicroRNAs in Heart Failure, Cardiac Transplantation, and Myocardial Recovery: Biomarkers with Therapeutic Potential. *Curr Heart Fail Rep*. 2017 Dec; 14 (6): 454–464.
9. Khush K, Zarafshar S. Molecular Diagnostic Testing in Cardiac Transplantation. *Curr Cardiol Rep*. 2017 Oct 13; 19 (11): 118.
10. Готье СВ, Шевченко АО, Попцов ВН. Пациент с трансплантированным сердцем: руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.: Триада, 2014: 144. Gautier SV, Shevchenko AO, Popcov VN. Pacient s transplantirovannym serdsem: rukovodstvo dlya vrachej po vedeniyu pacientov, perenesshih transplantaciyu serdca. M.: Triada, 2014: 144.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25 (4): 402–408.
12. Zhang XL, An BF, Zhang GC. MiR-27 alleviates myocardial cell damage induced by hypoxia/reoxygenation via targeting TGFBR1 and inhibiting NF-κB pathway. *Kaohsiung J Med Sci*. 2019 Oct; 35 (10): 607–614.
13. Li X, Zhang S, Wa M, Liu Z, Hu S. MicroRNA-101 Protects Against Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction via Downregulation of Runt-Related Transcription Factor 1. *J Am Heart Assoc*. 2019 Dec 3; 8 (23): e013112.
14. Sukma Dewi I, Hollander Z, Lam KK, McManus JW, Tebbutt SJ, Ng RT et al. Association of Serum MiR-142-3p and MiR-101-3p Levels with Acute Cellular Rejection after Heart Transplantation. *PLoS One*. 2017; 12 (1): e0170842.

*Статья поступила в редакцию 21.11.2019 г.
The article was submitted to the journal on 21.11.2019*

THE NECESSITY OF VOIDING CYSTOURETHROGRAM FOR THE EVALUATION OF RECIPIENT CANDIDATES IN ADULT RENAL TRANSPLANTATION

M. Sarier¹, M. Callioglu², Yu. Yukse²

¹ Istinye University, Istanbul, Turkey

² Medical Park Hospital, Antalya, Turkey

Objective. While international guidelines necessitate Voiding Cystourethrogram (VCUG) for pediatric patients, it is unnecessary for the evaluation of adult patients without urological disorders as renal transplant candidates. The objective of this study was to evaluate the results of adult candidates who underwent VCUG before transplantation and to demonstrate the necessity for this imaging. **Methods.** A retrospective study of the data of 1265 adult candidates who underwent VCUG before transplantation at our center, was undertaken. VUR, the presence of Post-voiding residual urine (PVR) (>100 ml), Low bladder capacity (LBC) (<100 ml), and urethral pathologies were evaluated with VCUG. **Results.** The mean age was 42.3 ± 1.3 . The mean dialysis period was 27.8 ± 4.2 months. According to the VCUG results, 19.2% of the patients had pathological findings. On the other hand, the rate of urological disorders was only 5.1%, according to end-stage renal disease (ESRD) etiologies. VCUG outcomes indicated bilateral high-grade reflux in native kidneys in 4.4% (n = 56) of the candidates, unilateral high-grade reflux in 4.1% (n = 52), bilateral low grade reflux in 2.1% (n = 26), unilateral low-grade reflux in 2.4% (n = 30), and reflux in rejected transplanted kidney in 2.3% (n = 29). In addition, significant LBC was noted in 4.8% (n = 61), significant PVR in 1.1% (n = 14), and urethral stricture in 0.5% (n = 6) of the candidates. **Conclusion.** VCUG should be considered as a part of routine evaluation in adult renal transplant recipient candidates as well as in pediatric candidates, even if their ESRD etiologies are not due to urological disorders.

Keywords: renal transplantation; transplant candidates; vesicoureteral reflux; voiding cystourethrogram.

НЕОБХОДИМОСТЬ ПРОВЕДЕНИЯ МИКЦИОННОЙ ЦИСТОУРЕТРОГРАФИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЗРОСЛЫХ КАНДИДАТОВ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ПОЧКИ

М. Сарьер¹, М. Каллиоглу², Ю. Юксел²

¹ Университет Истини, Стамбул, Турция

² Больница Медикал Парк, Анталья, Турция

В то время как во всех международных протоколах при подготовке к трансплантации почки в педиатрической практике потенциальным реципиентам предписано обязательно проводить микционную цистоуретрографию (МЦУГ), нет никаких указаний относительно этого перед проведением трансплантации почки взрослым пациентам без урологических нарушений. **Цель:** оценить результативность МЦУГ, проведенной перед трансплантацией взрослым пациентам, и необходимость использования этого метода визуализации перед операцией. **Материалы и методы.** Было проведено ретроспективное исследование данных 1265 взрослых реципиентов почки, которым выполняли МЦУГ перед трансплантацией в нашем центре. С помощью МЦУГ оценивали наличие и степень пузырно-мочеточникового рефлюкса (ПМР), остаточный объем мочи после мочеиспускания (PVR) (>100 мл), емкость мочевого пузыря (низкая емкость мочевого пузыря <100 мл) и патологию мочеиспускательного канала. **Результаты.** Средний возраст пациентов составил $42,3 \pm 1,3$ года. В среднем пациенты находились на диализе $27,8 \pm 4,2$ месяца. По результатам МЦУГ у 19,2% пациентов были обнаружены патологические изменения. С другой стороны, урологические нарушения были причиной терминальной почечной недостаточности (ТПН) всего в 5,1% случаев. По результатам МЦУГ были выявлены двусторонний ПМР тяжелой степени в нативных почках у 4,4% (n = 56) потенциальных реципиентов, односторонний ПМР тяжелой степени –

у 4,1% (n = 52), двусторонний ПМП легкой степени – в 2,1% (n = 26), односторонний ПМП легкой степени тяжести – у 2,4% (n = 30) и рефлюкс в трансплантат почки при его отторжении – у 2,3% (n = 29). Кроме того, обнаружено значительное снижение емкости мочевого пузыря у 4,8% (n = 61), значительное снижение PVR – у 1,1% (n = 14) и стриктура уретры – у 0,5% (n = 6) потенциальных реципиентов. **Заключение.** Следует рассмотреть целесообразность включения в повседневную клиническую практику МЦУГ для оценки функционального состояния мочевыводящих путей взрослых потенциальных реципиентов перед трансплантацией почки, а также реципиентов-детей, даже если ТПН не обусловлена урологическими заболеваниями.

Ключевые слова: трансплантация почки, кандидат на трансплантацию; пузырно-мочеточниковый рефлюкс; цистоуретрография.

ABBREVIATIONS

BOO – Bladder Outlet Obstruction
BPH – Benign Prostate Hyperplasia
ESRD – End Stage Renal Disease
LBC – Low Bladder Capacity
PVR – Post-Void Residual Urine Volume
TURP – Transurethral Resection of the Prostate
VCUG – Voiding Cystourethrogram
VUR – Vesico Ureteral Reflux
UTI – Urinary Tract Infection

INTRODUCTION

Today, renal transplantation is considered the optimal treatment for patients with end-stage renal disease (ESRD), providing favorable physical, socioeconomic, and psychological results [1]. Accurate assessment of recipient candidates is of paramount importance to the success of renal transplantation. Therefore, candidates are subjected to many examinations and evaluations before transplantation. As a part of urologic examinations, voiding cystourethrogram (VCUG) is an important radiologic test that provides information about vesicoureteral reflux (VUR) and anatomical evaluation of the lower urinary system, as well as information about bladder functions. But the use of VCUG in the assessment of candidates is controversial. Urologic disorders account for up to 60% of the etiology of ESRD in pediatric patients [2]. In adult patients, urologic disorders account for 1.4% to 5% of the factors playing a role in the etiology of ESRD [3]. While international guidelines require VCUG in the evaluation of pediatric kidney transplant candidates, VCUG is not necessary in adult patients except for those with a medical history of genitourinary abnormalities [4, 5]. The objective of this study is to evaluate the results of adult candidates who underwent VCUG before transplant and to demonstrate the necessity of this imaging.

MATERIALS & METHODS

In this retrospective study, patients who underwent renal transplantation in Medical Park Hospital Complex Antalya Turkey between November 2008 and October 2011 were evaluated. Pediatric renal transplant patients under 17 were excluded. Of the 1,441 adult patients

who underwent kidney transplant, the completed data of 1,265 patients who had undergone VCUG before transplant were studied. The study analyzed patients' demographic data; the urologic etiology of ESRD, such as the presence of obstructive or reflux uropathy; dialysis duration; and VCUG findings. VUR, the presence of post-void residual urine (PVR), low bladder capacity (LBC), and urethral pathologies were assessed with VCUG. Grading of vesicoureteral reflux is based on the International Reflux Study Committee Scale [6].

In VUR, Grades I and II were considered low-grade reflux; Grades III, IV, and V were considered high-grade reflux. Values less than 100 cc were considered significant in LBC, and values greater than 100 cc were considered significant in PVR.

The study was approved by the local ethics committee and written informed consent was received from all candidates. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software (SPSS for Windows version 16.0 SPSS Inc., Chicago IL, USA). Continuous variables were presented as mean \pm standard deviation.

RESULTS

The data of 1,265 patients who underwent VCUG were examined. The mean age was 42.3 ± 1.3 years and male-to-female ratio was 2.2. The mean dialysis duration was 27.8 ± 4.2 months. According to VCUG outcomes, 19.2% (n = 243) of patients had abnormal pathological findings in the pre-transplantation assessment. Urologic disorders were involved in the etiology of ESRD in 5.1% (n = 65) of the patients. VCUG outcomes indicated bilateral high-grade reflux in native kidneys in 4.4% (n = 56) of the patients, unilateral high-grade reflux in 4.1% (n = 52), bilateral low grade reflux in 2.1% (n = 26), unilateral low-grade reflux in 2.4% (n = 30), and reflux in rejected transplanted kidney in 2.3% (n = 29). In addition, significant LBC was noted in 4.8% (n = 61), significant PVR in 1.1% (n = 14), and urethral stricture in 0.5% (n = 6) of the candidates (Table).

DISCUSSION

Voiding cystourethrogram (VCUG), also called a micturating cystourethrography, is a fluoroscopic study of the lower urinary tract in which contrast is introdu-

Table
Distribution of abnormal findings determined by VCUG

Type of abnormality	Prevalence
Bilateral High-Grade VUR in Native Kidneys	4.4%
Unilateral High-Grade VUR	4.1%
Bilateral Low-Grade VUR	2.1%
Unilateral Low-Grade VUR	2.4%
VUR in rejected TX Kidney	2.3%
Low Bladder Capacity	4.8%
Post-Void Residual Urine	1.1%
Urethral Stricture	0.5%

ced into the bladder via a catheter. The most important feature distinguishing VCUG from the other imaging modalities is that it is an interactive test. VCUG shows not only the anatomic plane of the low urinary tract and the presence of VUR, but like a urodynamic test, it can demonstrate filling phase and capacity of the bladder as well as the voiding phase and voiding ability of the patient. Thus, it can show whether urodynamic investigation is necessary. VCUG is unnecessary in adult renal transplant candidates unless there is a genitourinary abnormality present, as shown by two studies in the 333 and 517 case series conducted more than two decades ago [7, 8]. Among these studies, Glazier et al. found significant abnormalities of only 2.5% in VCUG performed at pretransplant evaluation [8]. Our study, however, showed abnormalities of 19.2% with VCUG. Similarly, Kabler et al. found 25% abnormalities with VCUG in candidates before transplantation [9]. Ultimately, VCUG is a diagnostic imaging method and 19.2% and 25% abnormalities found in our study and in the mentioned study are significant in showing significance of a test. A solution to these disparities needs to be found to minimize complications that may develop after transplantation.

Low bladder capacity is directly correlated with dialysis duration. It is the most important symptom of a dysfunctioning bladder, which develops due to decreased diuresis. Men are at greater risk of bladder dysfunctions [10]. Storage dysfunction becomes prominent one year after dialysis, especially in male patients over 50 [11]. Fortunately, reduction in bladder capacity is reversible and transplant generally allows restoration of bladder maximal output, normal bladder capacity, and compliance. Studies have shown that low bladder capacity dramatically increases within one year after transplantation [12, 13]. In patients with low bladder capacity, maximum detrusor pressure may require VUR in the transplanted kidney. The risk for VUR in the transplanted kidney within one year was significantly higher in patients with a low bladder capacity than those with a normal capacity [14]. Independent of immunological status, graft survival is significantly lower in patients with a severe bladder

dysfunction such as a decreased maximal detrusor capacity less than 100 mL compared to other patients [15].

In conclusion, it may be risky to merely wait for patients with a low bladder capacity to return to normal. Many patients can be managed with anticholinergic drugs and intermittent self-catheterization, but some patients may require bladder augmentation or urinary diversion before transplant. It should be kept in mind that morbidity is lower and quality of life is better with intermittent self-catheterization compared with surgical approaches [15]. In a study by Song et al. evaluating pre-transplant VCUG outcomes, the rate of less than 100 mL bladder capacity was 14.1% in patients with a mean dialysis duration of 59 months [16] our study found the prevalence of low bladder capacity at 4.8% with a mean dialysis duration of 27 months. We think that the most important factor causing this difference between results of the studies was dialysis duration. It would be reasonable to perform VCUG to determine bladder capacity well before transplant, especially in patients with a dialysis duration longer than one year.

VUR is a prevalent disease, and VCUG is the gold standard in its diagnosis. The prevalence of VUR in the population is higher in younger patients and decreases with age, although VUR is seen in 5% of sexually active women in the non-transplanted population [17]. It is difficult to determine the exact incidence of vesicoureteral reflux in patients undergoing renal transplantation because VCUG is not performed routinely in clinical practice. It should be remembered that these patients may be asymptomatic for VUR. VUR symptoms such as frequently repeating urinary tract infection (UTI) may be suppressed, especially in anuric and oliguric patients who receive dialysis. Immunosuppressive treatments with increased diuresis after transplant may cause persistent infection of the native kidneys due to VUR, leading to morbid or mortal outcomes [9]. International guidelines recommend that consideration be given to the need for native nephrectomy pretransplant or perioperatively in selected patients to reduce the risk of post-transplant complications [18]. In our study, VUR was found in 15% of the candidates, according to VCUG results. Similarly, Song et al. found VUR of 17.5% [16]. Similar results from both studies indicate that, unlike low bladder capacity, the prevalence of VUR is not correlated with dialysis duration in these patients.

PVR is an important pathological finding that can be detected with VCUG. Unlike low bladder capacity, high PVR is not expected during post-transplant recovery. Complications that may develop due to high levels of PVR will persist after transplantation, which may directly affect graft survival. Dysfunction of the bladder that causes long-term high intravesical pressure and significant post-voiding residual volume can cause VUR in the transplanted kidney and can pose a risk to graft function. Consequently, it is advantageous to diagnose these disor-

ders as soon as possible, ideally prior to transplantation [19]. Studies conducted in the non-transplanted patients have reported a direct correlation between high PVR and UTI [20, 21]. UTI is the most common cause of post-transplant mortality and morbidity, affecting the duration of hospitalization [22]. Therefore, it is important to seek and plan treatment for the underlying causes of PVR. It should be remembered that UTI, which results most commonly from neurogenic bladder or bladder outlet obstruction (BOO), may be suppressed in anuric and oliguric patients who receive dialysis. Initiation of intermittent self-catheterization in a neurogenic bladder immediately after transplant is a highly efficient way to protect the transplanted kidney against infection and VUR. Another cause of PVR is BOO, which develops due to benign prostate hyperplasia (BPH). It should be kept in mind that male kidney transplant candidates over 50 are at a higher risk for BOO [23]. However, surgical treatment before transplantation is not recommended in patients undergoing dialysis. Because anuria will persist following the transurethral resection of prostate (TURP), these patients will be at high risk for development of bladder neck contracture in the postoperative period [24]. In addition to the initiation of alpha blockers in patients with severe lower urinary tract symptoms, it was shown that TURP or transurethral incision of the prostate (TUIP) operations can be performed safely in the first month after transplantation [23].

Another remarkable finding of VCUG was a urethral stricture in 0.5% of the patients. Urethral stricture may be seen with LBC in patients who receive dialysis for a long time [25]. As in patients with BOO and ESRD, symptoms may also be masked in these patients; diagnosis can be established during VCUG. In patients considered to have urethral stricture as a result of strain or failure of urethral catheterization at the anterior or bulbar urethra during VCUG the stricture can be restored by performing an internal urethrotomy before transplantation. This will likely prevent a surprise for the transplant team.

VCUG is a minimally invasive imaging method. Complications that may occur with this method should be taken into account. It should be remembered that oliguric and anuric patients are more likely to develop UTI after catheterization of the bladder. A resulting infection can cause postponement of the kidney transplantation, which may result in serious stress to the candidate. There is no sufficient data in the literature regarding a UTI resulting from a VCUG performed in candidates before transplantation. In a study investigating VUR in non-transplanted pediatric patients, UTI was found in 16.9% of children one week after VCUG was performed [26]. Prophylactic antibiotics given before VCUG may reduce this rate to a value as low as 1.7% [27]. Therefore, prophylactic antibiotics should be considered in candidates before VCUG in cases of infection risk.

This study has some limitations. Follow-up outcomes of patients with positive VCUG findings were not mentioned in this study.

CONCLUSION

VCUG should be considered a part of routine evaluation in adult kidney recipient candidates even if the etiology of ESRD is not related to urologic disorders. Candidates who received dialysis for longer than one year and male candidates over 50 should be given a routine assessment with VCUG. Pathologies that may directly affect graft survival after transplant can be diagnosed with VCUG.

The study were approved by Medical Park Hospital Local Ethics Committee (Protocol number: 2019/013).

Исследование было одобрено местным этическим комитетом больницы Медикал Парк (номер протокола: 2019/013).

The authors declare no conflict of interest.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G et al. Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *Am J Transplant.* 2011; 11 (10): 2093–2109. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x.
2. Dodson JL, Jerry-Fluker J V, Ng DK et al. Urological disorders in chronic kidney disease in children cohort: clinical characteristics and estimation of glomerular filtration rate. *J Urol.* 2011; 186 (4): 1460–1466. doi: 10.1016/j.juro.2011.05.059.
3. Power RE, Hickey DP, Little DM. Urological evaluation prior to renal transplantation. *Transplant Proc.* 2004; 36 (10): 2962–2967. doi: 10.1016/j.transproceed.2004.11.006.
4. Karam G, Kälble T, Alcaraz A et al. Guidelines on renal transplantation. *Eur Assoc Urol.* 2014; 23. doi: 10.1056/NEJM199408113310606.
5. Benavente RC, Dorado CQ, Martin LL, Rodriguez CS, Gonima PC, Enguita CG. The candidate for renal transplantation work up: Medical, urological and oncological evaluation. *Arch Esp Urol.* 2011; 64 (5): 441–460.
6. Williams G, Fletcher JT, Alexander SI, Craig JC. Vesicoureteral Reflux. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19 (5): 847–862. doi: 10.1681/ASN.2007020245.
7. Shandera K, Sago A, Angstadt J, Peretsman S, Jaffers G. An assessment of the need for the voiding cystourethrogram for urologic screening prior to renal transplantation. *Clin Transplant.* 1993; 7 (4): 299–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10146299>. Accessed November 11, 2018.
8. Glazier DB, Whang MI, Geffner SR et al. Evaluation of voiding cystourethrogram prior to renal transplantation. *Transplantation.* 1996; 62 (12): 1762–1765. <http://>

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990358. Accessed November 11, 2018.
9. Kabler RL, Cerny JC. Pre-transplant urologic investigation and treatment of end stage renal disease. *J Urol.* 1983; 129 (3): 475–478. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6339746>. Accessed November 11, 2018.
10. Tsunoyama K, Ishida H, Omoto K, Shimizu T, Shirakawa H, Tanabe K. Bladder function of end-stage renal disease patients. *Int J Urol.* 2010; 17 (9): 791–795. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02579.x.
11. Zachoval R, Borovicka V, Marada T et al. The Effects of Diuresis, Duration of Dialysis and Age on Lower Urinary Tract Function in Urologically Healthy Male Patients on the Waiting List for Kidney Transplant. *Urol J.* 2018; 15 (2): 49–54. doi: 10.22037/uj.v0i0.3888.
12. Inoue T, Satoh S, Saito M et al. Correlations Between Pretransplant Dialysis Duration, Bladder Capacity, and Prevalence of Vesicoureteral Reflux to the Graft. *Transplantation.* 2011; 92 (3): 311–315. doi: 10.1097/TP.0b013e318223d7d6.
13. Chun JM, Jung GO, Park JB et al. Renal Transplantation in Patients With a Small Bladder. *Transplant Proc.* 2008; 40 (7): 2333–2335. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.06.028.
14. Inoue T, Satoh S, Saito M et al. Correlations Between Pretransplant Dialysis Duration, Bladder Capacity, and Prevalence of Vesicoureteral Reflux to the Graft. *Transplantation.* 2011; 92 (3): 311–315. doi: 10.1097/TP.0b013e318223d7d6.
15. Kashi SH, Wynne KS, Sadek SA, Lodge JP. An evaluation of vesical urodynamics before renal transplantation and its effect on renal allograft function and survival. *Transplantation.* 1994; 57 (10): 1455–1457. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8197607>. Accessed November 12, 2018.
16. Song M, Park J, Kim YH et al. Bladder capacity in kidney transplant patients with end-stage renal disease. *Int Urol Nephrol.* 2015; 47 (1): 101–106. doi: 10.1007/s11255-014-0848-1.
17. Parmaksız E. Predictors of vesicourethral reflux in pre-transplant evaluation of end-stage renal disease patients. *South Clin Istanbul Eurasia.* 2018; 29 (3): 176–179. doi: 10.14744/scie.2018.63935.
18. Knoll G, Cockfield S, Blydt-Hansen T et al. Canadian Society of Transplantation: consensus guidelines on eligibility for kidney transplantation. *Can Med Assoc J.* 2005; 173 (10): S1–S25. doi: 10.1503/cmaj.1041588.
19. Zermann DH. Disorders of micturition. In: *Diseases of the Kidney, 7th Ed.* Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins, 2001. Vol. 1: 663–694.
20. Kim B-R, Lim JH, Lee SA et al. The Relation between Postvoid Residual and Occurrence of Urinary Tract Infection after Stroke in Rehabilitation Unit. *Ann Rehabil Med.* 2012; 36 (2): 248. doi: 10.5535/arm.2012.36.2.248.
21. Dromerick AW, Edwards DF. Relation of postvoid residual to urinary tract infection during stroke rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil.* 2003; 84 (9): 1369–1372. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13680576>. Accessed November 10, 2018.
22. Sarier M, Demir M, Goktas S et al. Results of Real-time Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay in Renal Transplant Recipients With Sterile Pyuria. *Transplant Proc.* 2017; 49 (6): 1307–1311. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.02.051.
23. Sarier M, Duman I, Demir M, Yuksel Y, Emek M, Kukul E. The outcomes of transurethral incision/resection of the prostate (TUIP/TURP) performed early after renal transplantation. *Turkish J Urol.* 2018; 44 (2): 172–177. doi: 10.5152/tud.2018.98404.
24. Shenasky JH. Renal transplantation in patients with urologic abnormalities. *J Urol.* 1976; 115 (5): 490–493. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/775135>. Accessed March 15, 2017.
25. Martin X, Aboutaieb R, Soliman S, el Essawy A, Dawahra M, Lefrancois N. The use of long-term defunctionalized bladder in renal transplantation: is it safe? *Eur Urol.* 1999; 36 (5): 450–453. doi: 10.1159/000020029.
26. Onay ÖS, Agras PI, Bayrakci US, Cengiz N, Erçoban HS, Melek E, Uslu Y. Urinary tract infections following voiding cystourethrography in children. *Turk Arch Ped* 2008. 2008; (43): 14–16.
27. Rachmiel M, Aladjem M, Starinsky R, Strauss S, Villa Y, Goldman M. Symptomatic urinary tract infections following voiding cystourethrography. *Pediatr Nephrol.* 2005; 20 (10): 1449–1452. doi: 10.1007/s00467-005-1942-5.

The article was submitted to the journal on 22.07.2019
Статья поступила в редакцию 22.07.2019 г.

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-40-49

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА ЛИМФОЦИТОВ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК ДО И ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Д.В. Артемов, А.Б. Зулькарнаев, А.В. Ватазин

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

Цель: проанализировать особенности субпопуляционного состава лимфоцитов и функциональной активности мононуклеаров периферической крови у больных хронической болезнью почек старшей возрастной группы. **Материалы и методы.** В исследование включены пациенты ($n = 21$) с хронической болезнью почек (ХБП) старше 55 лет, которым была выполнена аллотрансплантация почки (АТП) от субоптимальных доноров. Средний возраст составил $61,4 \pm 4,5$ года (от 55 до 69). Коморбидный фон оценивали по шкале CIRS-G, среднее количество баллов – $13,6 \pm 5,09$. Группу сравнения сформировали из 21 добровольца 55–70 лет без острых воспалительных заболеваний и признаков ХБП. Средний возраст составил $61,1 \pm 4,4$ года, среднее количество баллов по шкале CIRS-G – $12,11 \pm 6,04$. У всех участников исследования определяли субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови методом проточной цитометрии. Для оценки функционального состояния мононуклеаров периферической крови использовали метод витальной компьютерной лазерной цитоморфометрии. Оценивали показатель функциональной активности (ПФА) ядра клеток, который позволяет косвенно судить о степени функциональной активности клетки. **Результаты.** У больных ХБП до АТП отмечено уменьшение доли CD4-клеток ($p = 0,009$), увеличение доли CD8-клеток ($p = 0,02$), уменьшение отношения CD4/CD8 ($p = 0,017$), увеличение доли естественных киллеров ($p = 0,025$) по сравнению со здоровыми добровольцами. При этом снижение общей доли CD3-клеток, увеличение экспрессии HLA-DR CD3-клетками и увеличение доли В-клеток было статистически незначимо: $p = 0,137$, $p = 0,072$ и $p = 0,135$ соответственно. На пятые сутки после АТП доля CD3-клеток увеличивалась ($p = 0,017$) главным образом за счет роста доли CD4-клеток ($p = 0,002$) по сравнению с показателем до АТП. Также увеличилось содержание естественных киллеров ($p = 0,002$) и экспрессия HLA-DR на CD3-клетках ($p < 0,0001$). Увеличение доли CD8-клеток, отношения CD4/CD8 и снижения доли В-клеток было статистически незначимо: $p = 0,439$, $p = 0,277$ и $p = 0,236$ соответственно. У больных ХБП до АТП отмечено снижение ПФА по сравнению со здоровыми добровольцами ($p = 0,0138$). После АТП этот показатель значительно увеличился по сравнению со значением до АТП ($p < 0,0001$) и превысил значение ПФА у здоровых добровольцев ($p < 0,0001$). У здоровых добровольцев не было отмечено значимой связи функциональной активности мононуклеаров периферической крови с возрастом ($r = -0,263$ [95%ДИ $-0,6236$; $0,1907$], $p = 0,264$, $r^2 = 0,069$). В то же время у больных ХБП мы отметили значимую отрицательную зависимость ПФА от возраста: $r = -0,52$ [95%ДИ $-0,7771$; $-0,1135$], $p = 0,0157$, $r^2 = 0,27$ до АТП; $r = -0,418$ [95%ДИ $-0,7559$; $-0,06256$], $p = 0,0272$, $r^2 = 0,175$ после АТП. **Заключение.** Больные ХБП старшей возрастной группы до и после АТП подвержены существенному изменению морфофункционального состояния мононуклеарных клеток периферической крови и субпопуляционного состава лимфоцитов. При этом выраженность изменения функционального состояния этих клеток имеет сильную связь с возрастом, чего не наблюдается в группе здоровых добровольцев. Это следует учитывать при выборе иммуносупрессивной терапии у реципиентов почечного трансплантата старшей возрастной группы.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, трансплантация почки, субпопуляции лимфоцитов, функциональная активность клеток.

Для корреспонденции: Артемов Дмитрий Владимирович. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корпус 6. Тел. (926) 528-96-52. E-mail: anatom555@yandex.ru

For correspondence: Artemov Dmitriy Vladimirovich. Address: Building 6, 61/2, Shchepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel. (926) 528-96-52. E-mail: anatom555@yandex.ru

AGE-RELATED FEATURES OF THE PATTERN OF LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE BEFORE AND AFTER TRANSPLANTATION

D.V. Artemov, A.B. Zulkarnaev, A.V. Vatazin

M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Clinical and Research Institute, Moscow, Russian Federation

Objective: to analyze the features of the pattern of lymphocyte subpopulations and the functional activity of peripheral blood mononuclear cells in older adult patients with chronic kidney disease. **Materials and methods.** The study featured 21 patients with chronic kidney disease (CKD), over 55 years of age, who underwent kidney transplantation (KT) from unrelated suboptimal donors. The average age was 61.4 ± 4.5 years (55 to 69). Comorbidity was assessed using the CIRS-G scale; the average number of points was 13.6 ± 5.09 . The control group consisted of 21 volunteers, aged 55–70, without acute inflammatory diseases and signs of chronic kidney disease (CKD). The average age was 61.1 ± 4.4 years, the average CIRS-G score was 12.11 ± 6.04 . In all patients, the pattern of lymphocyte subpopulations of peripheral blood was evaluated by flow cytometry. Vital computer laser cytometry was used to assess the functional state of peripheral blood mononuclear cells. The Functional Activities Index (FAI) was evaluated to indirectly assess the degree of functional activity of cells. **Results.** In CKD patients before KT, there was a decrease in the proportion of CD4 cells ($p = 0.009$), an increase in the proportion of CD8 cells ($p = 0.02$), a decrease in the CD4/CD8 ratio ($p = 0.017$), an increase in the proportion of natural killers ($p = 0.025$) compared with healthy volunteers. Moreover, a decrease in the total proportion of CD3 cells, an increase in HLA-DR expression on CD3 cells, and an increase in the proportion of B cells were statistically insignificant: $p = 0.137$, $p = 0.072$ and $p = 0.135$, respectively. On the fifth day after KT, the proportion of CD3 cells increased ($p = 0.017$) mainly due to an increase in the proportion of CD4 cells ($p = 0.002$) compared to the pre-KT index. The proportion of natural killers ($p = 0.002$) and HLA-DR expression on CD3 cells ($p < 0.0001$) also increased. An increase in the proportion of CD8 cells and in the CD4/CD8 ratio, and a decrease in the proportion of B cells were statistically insignificant: $p = 0.439$, $p = 0.277$, and $p = 0.236$, respectively. A decrease in FAI was noted in patients with CKD before KT in comparison with healthy volunteers ($p = 0.0138$). After ATP, this indicator significantly increased compared to the pre-KT value ($p < 0.0001$) and exceeded the FAI value in healthy volunteers ($p < 0.0001$). In healthy volunteers, there was no significant correlation between the functional activity of peripheral blood mononuclear cells and age ($r = -0.263$ [95% CI $-0.6236; 0.1907$], $p = 0.264$, $r^2 = 0.069$). At the same time, significant negative correlation between FAI and age was noted in CKD patients: $r = -0.52$ [95% CI $-0.7771; -0.1135$], $p = 0.0157$, $r^2 = 0.27$ before KT; $r = -0.418$ [95% CI $-0.7559; -0.06256$], $p = 0.0272$, $r^2 = 0.175$ after KT. **Conclusion.** Older adult CKD patients before and after KT were likely to have significant changes in the morphofunctional state of peripheral blood mononuclear cells and pattern of lymphocyte subpopulations. Moreover, the severity of changes in the functional state of these cells had a strong correlation with age, which was not observed in the group of healthy volunteers. This should be considered when choosing immunosuppressive therapy in older kidney transplant recipients.

Keywords: chronic kidney disease, kidney transplantation, lymphocyte subpopulations, cell functional activity.

ВВЕДЕНИЕ

Количество пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии неуклонно растет, о чем свидетельствуют данные отчетов крупных профессиональных сообществ в России и за рубежом. Это обусловлено значительным увеличением доступности заместительной почечной терапии, увеличивающейся распространенностью заболеваний, проявляющихся почечной недостаточностью, а также значительным улучшением качества современной заместительной почечной терапии, благодаря чему увеличивается продолжительность жизни данной категории больных [1–3].

Среди всех методов заместительной почечной терапии оптимальным является аллотрансплантация трупной почки (АТП), которая обеспечивает наилучшую медико-социальную реабилитацию, качество и продолжительность жизни пациентов [1–3]. Усугубляющийся дефицит донорских органов привел к пересмотру принципов их распределения. В настоящее время основополагающим является их качество [4]. Основным способом увеличения количества донорских органов, и в том числе почек, является использование органов, полученных от субоптимальных (маргинальных) доноров, то есть доноров с расширенными критериями (нестабильная гемодинамика,

сахарный диабет, гипертоническая болезнь, травмы, возрастные доноры и т. п.) [5–7].

Важной проблемой является трансплантация почки «возрастным» реципиентам. Реципиенты почечного аллотрансплантата старших возрастных групп по сравнению с лицами молодого возраста отличаются наличием неблагоприятного преморбидного фона, связанного с высокой частотой сопутствующих хронических заболеваний (артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, сахарный диабет, хроническая анемия и др.) и высоким индексом полиморбидности. Клинические проявления и осложнения хронической болезни почек замаскированы под терапевтический симптомокомплекс, определяющий заболевания внутренних органов. Это делает трансплантацию в этой группе особенно сложной и подчеркивает важность выбора оптимальной иммуносупрессивной терапии.

Практическая реализация принципа «old for old» приводит к тому, что данная категория пациентов имеет большие шансы получить орган от субоптимального донора, чем более молодые пациенты. При этом особенности иммунитета у пожилых пациентов должны учитываться при выборе иммуносупрессивной терапии [8–11]. Нет сомнений в том, что именно выбор оптимальной иммуносупрессивной терапии является основным условием большой продолжительности функционирования трансплантата и жизни реципиента. В связи с этим исследование различных аспектов возрастных особенностей иммунного гомеостаза у пациентов, которые ожидают трансплантацию почки, представляется нам важной и актуальной задачей.

Цель исследования: проанализировать особенности субпопуляционного состава лимфоцитов и функциональной активности мононуклеаров периферической крови у больных хронической болезнью почек старшей возрастной группы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены реципиенты ($n = 21$) старшей возрастной группы (старше 55 лет), которым была выполнена трансплантация почки в 2010–2018 годах. Средний возраст больных $61,4 \pm 4,5$ года (от 55 до 69 лет). Причины ХБП: гломерулонефрит – 23,8% (5 пациентов), пиелонефрит – 23,8% (5 пациентов), артериальная гипертензия – 23,8% (5 пациентов), сахарный диабет – 19% (4 пациента), поликистоз почек – 9,5% (2 пациента). Коморбидный фон оценивали по шкале Cumulative Illness Rating Scale for Geriatrics (CIRS-G) в модификации Миллера [12]. Среднее количество баллов составило $13,6 \pm 5,09$.

Все больные получали заместительную почечную терапию: 19 пациентов – гемодиализ, 2 пациента – перитонеальный диализ.

В соответствии с принципом «old for old» [13, 14] все донорские почки были получены от субоптимальных доноров – «возрастных» и «асистолических» доноров 4-й (остановка сердца после диагностики смерти мозга, «контролируемый донор») или 5-й категории (внезапная остановка сердца у пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии, «неконтролируемый донор») по модифицированной Маастрихтской классификации доноров с небувающим сердцем [15]. Срок консервации составил в среднем $13,2 \pm 3,4$ часа. В подавляющем большинстве случаев у донора были изъяты только почки.

Селекция пары донор–реципиент осуществлялась с учетом группы крови и лейкоцитарных антигенов человека A, B и DRB1 локусов. В зависимости от количества и сочетания несовпадений по локусам вычисляли индекс совместимости [16]: медиана составила 6 (интерквартильный размах от 6 до 7).

У всех реципиентов трансплантация выполнялась впервые, предсуществующих анти-HLA антител не было. Скрининг на антитела проводили при помощи мультиплексной технологии на платформе Luminex с реактивами LIFECODES Lifescreen Deluxe (Immucor). Трансплантация выполнялась только при отрицательной перекрестной пробе (комплемент-зависимый микролимфоцитотоксический тест).

Все пациенты получили стандартную индукционную терапию с применением анти-CD25 антител и метилпреднизолона. Мы использовали трехкомпонентный протокол иммуносупрессии: такролимус (с контролем концентрации и последующей коррекцией дозы), микофенолаты и преднизолон в стандартных дозировках [17].

Всем пациентам в послеоперационном периоде проводились стандартные клиничко-лабораторные, рентгенологические, ультразвуковые исследования.

Мы сформировали группу сравнения из добровольцев ($n = 21$) 55–70 лет без острых воспалительных заболеваний и без признаков почечной недостаточности. Средний возраст в группе сравнения составил $61,1 \pm 4,4$ года, среднее количество баллов по шкале CIRS-G – $12,11 \pm 6,04$.

Иммунофенотипические исследования выполняли методом проточной цитометрии на аппарате FACSCalibur (Becton Dickinson, США). Проводился многопараметровый проточноцитофлуориметрический субпопуляционный анализ.

Для оценки функционального состояния мононуклеаров периферической крови использовали метод витальной компьютерной лазерной цитоморфометрии на лазерном фазово-интерференционном микроскопе «Цитоскан» (МГИРЭА, Россия). Метод позволяет получить фазово-интерференционную картину живых клеток и оценить уровень анизотропии хроматина ядра. Это позволяет косвенно судить о степени функциональной активности, которую оце-

нивали по показателю функциональной активности (ПФА) ядра сепарированных мононуклеарных клеток периферической крови.

Протокол настоящего исследования получил одобрение локального этического комитета (протокол № 4 от 6 апреля 2010 года) и был утвержден решением ученого совета ГБУЗ МО «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского» (протокол № 4 от 19 апреля 2010 года). Все лица, участвующие в исследовании, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Проверка выборок на соответствие закону нормального распределения проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Переменные, имеющие нормальное распределение, представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Переменные, распределение которых отлично от нормального, а также переменные ординального типа представлены как медиана и интерквартильный размах: медиана (1-й квартиль; 3-й квартиль).

Для анализа связи между количественными признаками применялся коэффициент корреляции Пирсона, вычисляли коэффициент корреляции (r), его 95% доверительный интервал (95%ДИ), а также коэффициент детерминации (r^2).

При анализе нескольких выборок с нормальным распределением использовался дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки. Расчеты проводились в программе GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Оценивался двусторонний уровень значимости. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С целью анализа особенностей активации клеточного звена иммунитета при трансплантации почки мы проанализировали различия субпопуляций лимфоцитов у здоровых добровольцев и больных ХБП 5Д стадии, получающих лечение диализом, до и после трансплантации (рис. 1).

При сравнении субпопуляций клеток больных с ХБП 5Д, получающих лечение диализом, с показателями здоровых добровольцев видно, что значительно возрастает вариабельность. Это свидетельствует о высокой неоднородности популяции диализных пациентов. При статистически незначимой тенденции к сокращению доли CD3-клеток ($p = 0,137$) значительно сокращается доля CD4-клеток ($p = 0,009$) и возрастает доля CD8-клеток ($p = 0,02$). В результате такой разнонаправленной динамики снизился иммунорегуляторный индекс (отношение CD4/CD8) – $p = 0,017$.

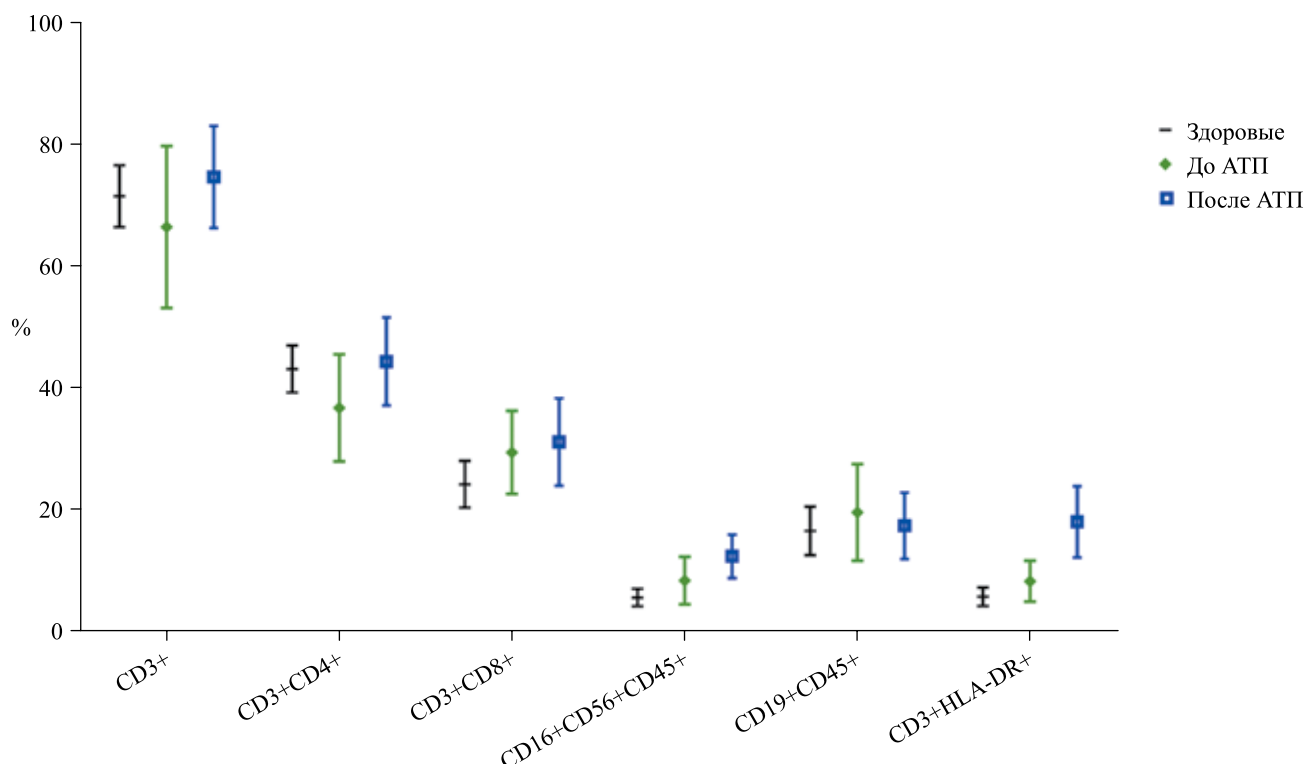


Рис. 1. Субпопуляции лимфоцитов, доли HLA-DR⁺-клеток и естественных киллеров у здоровых добровольцев, пациентов ХБП 5Д стадии до и после трансплантации почки

Fig. 1. Lymphocyte subsets, HLA-DR⁺ cell and natural killer cells fractions in healthy volunteers, CKD 5D patients before and after kidney transplantation

Кроме того, у больных на диализе возрастает количество естественных киллеров ($p = 0,025$) и отмечается тенденция к некоторому увеличению доли В-клеток ($p = 0,135$), а также увеличению экспрессии HLA-DR CD3-клетками ($p = 0,072$).

После трансплантации почки на пятые сутки после операции доля CD3-клеток статистически значимо увеличивается ($p = 0,017$), главным образом за счет

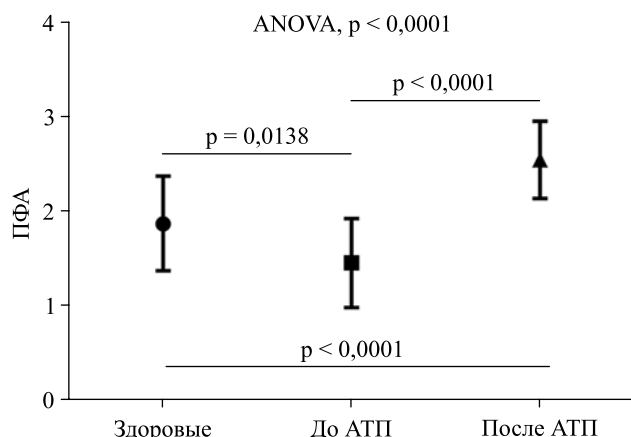


Рис. 2. Показатель функциональной активности мононуклеаров периферической крови у здоровых добровольцев, пациентов ХБП 5Д стадии до и после трансплантации почки

Fig. 2. Functional activity value of peripheral blood mononuclear cells in healthy volunteers, patients with CKD 5D before and after kidney transplantation

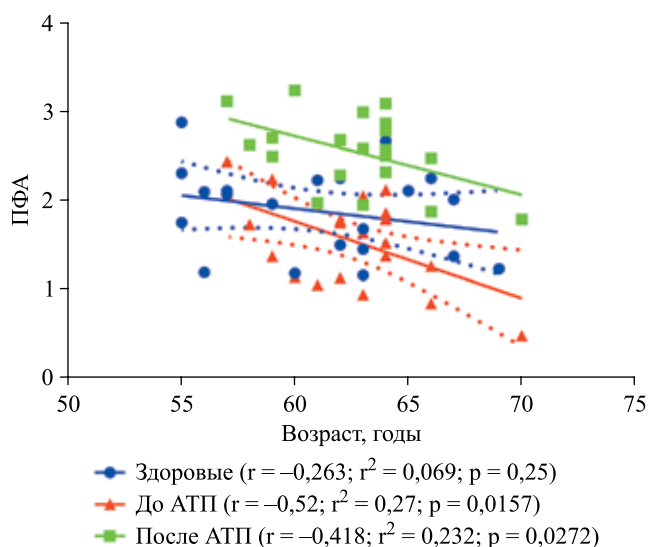


Рис. 3. Зависимость от возраста показателя функциональной активности мононуклеаров периферической крови у здоровых добровольцев, пациентов ХБП 5Д стадии до и после трансплантации почки

Fig. 3. Correlation of age and functional activity value of peripheral blood mononuclear cells in healthy volunteers, patients with CKD stage 5D before and after kidney transplantation

роста доли CD4-клеток ($p = 0,002$) при незначительном увеличении доли CD8-клеток ($p = 0,439$). В результате иммунорегуляторный индекс незначительно возрос ($p = 0,236$). Также увеличилось содержание естественных киллеров ($p = 0,002$) и незначительно уменьшилась доля В-клеток ($p = 0,277$). Экспрессия HLA-DR на CD3-клетках значительно повысилась ($p < 0,0001$).

У больных ХБП 5Д происходит снижение функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови по сравнению со здоровыми добровольцами, что отражается в статистически значимом ($p = 0,0138$) снижении показателя ПФА. После трансплантации почки этот показатель значительно возрастает по сравнению с показателем до операции ($p < 0,0001$) и превышает значение ПФА у здоровых добровольцев ($p < 0,0001$) (рис. 2).

Нами были отмечены интересные возрастные особенности (рис. 3).

У здоровых добровольцев функциональная активность мононуклеаров периферической крови постепенно снижается по мере увеличения возраста. Тем не менее связь эта была слабой ($r = -0,263$ [95%ДИ $-0,6236; 0,1907$], $r^2 = 0,069$) и не достигла необходимого уровня статистической значимости ($p = 0,264$). В то же время у больных ХБП 5Д эта зависимость была такой же направленности, но выражена значительно сильнее: ($r = -0,52$ [95%ДИ $-0,7771; -0,1135$], $r^2 = 0,27$) и была статистически значима ($p = 0,0157$). У больных после трансплантации почки средний уровень ПФА был выше, чем до трансплантации ($p < 0,0001$, рис. 2), но связь с возрастом была похожей: $r = -0,418$ [95%ДИ $-0,7559; -0,06256$], $r^2 = 0,175$ и статистически значимой ($p = 0,0272$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Возрастные особенности иммунных реакций известны давно. Так, реципиентам старших возрастных групп свойственно изменение соотношения различных субпопуляций лимфоцитов, а также метаболизма и функционального потенциала этих клеток [18–21]. Мы же сосредоточили свое внимание на особенностях субпопуляционного состава лимфоцитов и морфофункционального состояния мононуклеаров периферической крови у больных ХБП 5Д, а именно у пациентов старшей возрастной группы до и после трансплантации почки.

Известно, что больным хронической болезнью почек свойственно развитие хронического воспаления в сочетании со стойкой дисфункцией нативного и адаптивного иммунитета [22]. Клиническим проявлением этого факта, а также косвенным его подтверждением является повышенный риск инфекционных осложнений [23, 24] и злокачественных новообразований [23, 25], а также снижение эффективности вакцинации

[26, 27], о чем свидетельствуют результаты крупных исследований.

Нами было установлено, что у пациентов ХБП 5-й стадии происходит уменьшение доли CD4-клеток и увеличение доли CD8 Т-клеток, при этом их соотношение значительно уменьшается. Кроме этого, происходит некоторое снижение общей доли CD3-клеток (статистически не значимое в нашем исследовании) со значительным увеличением вариабельности этого показателя, что косвенно свидетельствует о неоднородности популяции пациентов ХБП.

Есть свидетельства тому, что тяжесть лимфопении связана с рядом факторов: тяжестью нарушения функции почек и окислительного стресса, уровнем мочевины, креатинина, фосфора, сахарным диабетом и др. [28–32]. Изменение субпопуляционного состава лимфоцитов, как и сокращение их общего количества, обусловлено повышенной склонностью к апоптозу, преобразованием цитокинового профиля, что свойственно больным ХБП [30, 33–35]. Помимо этого, процедура диализа сама по себе способствует апоптозу Т-клеток и снижает их пролиферативную способность [29, 31, 35].

Связанные с прогрессирующей утратой почечной функции нарушения регуляции Т-клеток часто описывают как преждевременное «старение иммунной системы», что характеризуется значительным сокращением популяции наивных Т-клеток и относительным увеличением Т-клеток памяти, снижением соотношения CD4/CD8 Т-клеток, повышенной склонностью к апоптозу, изменением рецепторного репертуара Т-клеток и сокращением длины теломера. У пациентов ХБП 25–45 лет показатели сопоставимы с показателями здоровых лиц 60–80 лет [30, 36, 37].

Выраженность изменений Т-клеточного иммунитета имеет непосредственную связь с результатами трансплантации почки. Увеличение времени ожидания трансплантации почки на диализе способствует накоплению аллореактивных Т-клеток, сопровождается увеличением риска острого отторжения трансплантата [38, 39] и значительно ухудшает результаты трансплантации [40–42]. Несмотря на то что особенности Т-клеточного иммунитета оказывают влияние на результаты трансплантации почки [32, 43, 44], в настоящее время эти знания не позволяют модифицировать существующую клиническую практику путем персонализации иммуносупрессивной терапии, что подчеркивает актуальность исследований в этом направлении. О том, что особенности нарушений Т-клеточного иммунитета (в контексте «старения» иммунной системы) могут оказывать влияние не только на ближайшие (поскольку имеющиеся нарушения формируют своего рода предтрансплантационный фон), но и долгосрочные результаты трансплантации почки, свидетельствуют результаты исследований, в

которых было показано, что эти нарушения сохраняются и после успешной трансплантации [32, 37].

Естественные киллеры (ЕК) являются одной из специализированных субпопуляций лимфоцитов, которые играют важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете, а также регуляции гомеостаза и воспалительных процессов в тканях [45, 46]. В нашем исследовании доля этих клеток у больных ХБП была значительно больше, чем у здоровых добровольцев. Это свидетельствует об активации нативного иммунитета, что может носить компенсаторно-адаптационный характер на фоне дисфункции адаптивного Т-клеточного иммунитета при ХБП [47]. С другой стороны, увеличение доли ЕК у больных ХБП можно объяснить активным участием этих клеток в прогрессировании ХБП (независимо от основной этиологии заболевания почек) [48–51].

Доля В-клеток у здоровых лиц и пациентов ХБП различалась статистически незначимо. Тем не менее у последних она была несколько выше, как и неоднородность этого показателя. Этому также есть несколько не исключающих друг друга объяснений. В-клетки играют важную роль в патогенезе многих аутоиммунных поражений почек [52–54]. В нашем исследовании у значительной доли больных формальной причиной ХБП были гломерулонефрит и артериальная гипертензия (10 из 21). Тем не менее надо учитывать, что гистологическая верификация диагноза (причины ХБП) проводится крайне редко, что не позволяет исключить возможность наличия иной причины. В пользу этого также косвенно свидетельствует и факт того, что структура причин ХБП в нашей стране, по данным всероссийского регистра [2], значительно отличается от других крупных регистров [1, 3]. К тому же, например, мы не учитывали форму гломерулонефрита (что можно отнести к ограничению исследования). Другим объяснением (вытекающим из первого) может быть применение различных препаратов для лечения основного заболевания (причины ХБП). Например, ритуксимаб (анти-CD20 моноклональное антитело) широко применяется для лечения многих аутоиммунных заболеваний: ANCA-ассоциированного васкулита, мембранозной нефропатии, волчаночного нефрита, смешанной криоглобулинемии, нефротического синдрома при болезни минимальных изменений, фокально-сегментарного гломерулосклероза и др. [47, 55]. Следует отметить, что о полярности изменения доли В-клеток у пациентов ХБП нет единого мнения [56, 57].

В нашем исследовании пациенты с ХБП имели повышенный уровень экспрессии HLA-DR по сравнению со здоровыми лицами. Этому может способствовать хроническое воспаление низкой степени активности, свойственное пациентам с ХБП [22, 58, 59].

У реципиентов почечного трансплантата на пятые сутки после трансплантации нами было отмечено увеличение доли CD3-клеток, CD4-клеток, ЕК, а также экспрессии HLA-DR. Это можно рассматривать, с одной стороны, как неспецифическую реакцию на оперативное вмешательство [60–63]. С другой стороны, синхронное увеличение доли CD4-клеток и ЕК может быть специфической реакцией на аллотрансплантацию [64–69].

Если не брать во внимание проблему предсенсифицированных пациентов, то тяжелые гуморальные реакции на трансплантат, клиническим проявлением которых является реакция отторжения, относятся, как правило, к позднему послеоперационному периоду и протекают при активном участии адаптивного иммунитета. Мы сознательно сформировали выборку пациентов, не имеющих предсуществующих анти-HLA антител. В патогенезе синдрома ишемии-реперфузии основную роль играют неспецифические реакции нативного иммунитета с активацией главным образом клеточного звена. В связи с этим мы оценили морфофункциональные параметры клеточного звена иммунитета (как основного эффекторного звена) у реципиентов почечного аллотрансплантата.

После трансплантации происходит увеличение активности мононуклеаров периферической крови (даже по сравнению со здоровыми добровольцами). Это вполне ожидаемо и может объясняться как неспецифическими, так и специфическими механизмами. В то же время у больных ХБП 5, как до, так и после трансплантации, выявлена статистически значимая связь ПФА от возраста, что не было отмечено в группе здоровых добровольцев. Это достаточно хорошо укладывается в современную концепцию формирующихся на фоне ХБП нарушений морфофункционального состояния клеток иммунной системы. Вместе с тем выявленная зависимость свидетельствует в пользу того, что возраст реципиента является важным фактором, способным повлиять на выбор режима иммуносупрессивной терапии. Это приобретает еще большую актуальность в свете того, что пожилым пациентам свойственно существенное изменение метаболизма иммуносупрессивных препаратов, и соответственно, их концентрации в крови (в частности – ингибиторов кальциневрина), что делает еще более сложным достижение зыбкого баланса между недостаточной и избыточной иммуносупрессией [8–11, 70, 71].

ВЫВОДЫ

Больные ХБП старшей возрастной группы до и после АТП подвержены существенному изменению морфофункционального состояния мононуклеарных клеток периферической крови и субпопуляционного состава лимфоцитов. При этом выраженность изменения функционального состояния этих клеток имеет

сильную связь с возрастом, чего не наблюдается в группе здоровых добровольцев. Это следует учитывать при выборе иммуносупрессивной терапии у реципиентов почечного трансплантата старшей возрастной группы.

Работы были выполнены с использованием средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МД-2253.2018.7.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. USRDS.org [Internet]. United States Renal Data System. 2016 USRDS annual data report. Volume 2 – End-stage Renal Disease (ESRD) in the United States: 1 · Incidence, Prevalence, Patient Characteristics, and Treatment Modalities 2016; Available at: <https://www.usrds.org/2016/view/Default.aspx>.
2. Томили́на НА, Андру́сев АМ, Перегудова НГ, Шинкаре́в МБ. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации В 2010–2015 гг. Отчет по данным общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества, часть первая. *Нефрология и диализ*. 2017; 19 (4, приложение): 1–95. Tomilina NA, Andrushev AM, Peregudova NG, Shinkarev MB. Renal replacement therapy for End Stage Renal Disease in Russian Federation, 2010–2015. Russian National Renal Replacement Therapy Registry Report of Russian Public Organization of Nephrologists «Russian Dialysis Society», Part 1. *Nefrologiya i dializ [Nephrology and dialysis]*. 2017; 19 (4, supplement): 1–95. [In Russ, English abstract]. doi: 10.28996/1680-4422-2017-4suppl-1-95.
3. ERA-EDTA-reg.org [Internet]. European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015. 2017; Available at: <https://www.era-edta-reg.org/files/annual-reports/pdf/AnnRep2015.pdf>.
4. Chopra B, Sureshkumar KK. Changing organ allocation policy for kidney transplantation in the United States. *World J Transplant*. 2015; 5 (2): 38–43. doi: 10.5500/wjt.v5.i2.38.
5. Нестеренко ИВ, Ватазин АВ, Филиппов ПЯ, Янковой АГ. Новый подход в оценке почечных трансплантатов, полученных от возрастных маргинальных доноров. *Медицинский альманах*. 2008; 5: 23–24. Nesterenko IV, Vatazin AV, Filiptsev PYa, Yankovoi AG. The new approach to kidney trasplants having got from aged marginal donors. *Meditinskii al'manakh*. 2008; 5: 23–24. [In Russian].
6. Нестеренко ИВ, Ватазин АВ, Филиппов ПЯ, Янковой АГ. Трансплантация почки от маргинальных доноров, получающих в процессе кондиционирования высокие дозы инотропной поддержки. *Медицинский*

- альманах. 2008; 5: 25–27. *Nesterenko IV, Vatazin AV, Filiptsev PYa, Yankovoi AG.* The kidney transplantation from marginal donors getting high doses of inotropic support while conditioning process. *Meditinskii al'manakh.* 2008; 5: 25–27. [In Russian].
7. *Нестеренко ИВ, Филиппев ПЯ, Ватазин АВ.* Новые аспекты использования маргинальных доноров с сопутствующими заболеваниями. *Альманах клинической медицины.* 2008; 18: 29–34. *Nesterenko IV, Filiptsev PYa, Vatazin AV.* New aspects of using marginal donors with concomitant diseases. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny.* 2008; 18: 29–34. [In Russian].
8. *Meier-Kriesche HU, Kaplan B.* Immunosuppression in elderly renal transplant recipients: are current regimens too aggressive? *Drugs Aging.* 2001; 18 (10): 751–759. doi: 10.2165/00002512-200118100-00004.
9. *Meier-Kriesche HU, Ojo AO, Hanson JA, Kaplan B.* Exponentially increased risk of infectious death in older renal transplant recipients. *Kidney Int.* 2001; 59 (4): 1539–1543. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.0590041539.x.
10. *de Fijter JW.* The impact of age on rejection in kidney transplantation. *Drugs Aging.* 2005; 22 (5): 433–449. doi: 10.2165/00002512-200522050-00007.
11. *Danovitch GM, Gill J, Bunnapradist S.* Immunosuppression of the elderly kidney transplant recipient. *Transplantation.* 2007; 84 (3): 285–291. doi: 10.1097/01.tp.0000275423.69689.dc.
12. *Miller MD, Paradis CF, Houck PR, Mazumdar S, Stack JA, Rifai AH.* Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res.* 1992; 41: 237–248.
13. *Singh P, Ng YH, Unruh M.* Kidney Transplantation Among the Elderly: Challenges and Opportunities to Improve Outcomes. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016; 23 (1): 44–50. doi: 10.1053/j.ackd.2015.11.002.
14. *Nikodimopoulou M, Karakasi K, Daoudaki M, Fouza A, Vagiots L, Myserlis G et al.* Kidney Transplantation in Old Recipients From Old Donors: A Single-Center Experience. *Transplant Proc.* 2019; 51 (2): 405–407. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.01.019.
15. *Geraci PM, Sepe V.* Non-heart-beating organ donation in Italy. *Minerva Anesthesiol.* 2011; 77 (6): 613–623.
16. *Трансплантология.* 2-е изд., испр. и доп. Под ред. В.И. Шумакова. М.: МИА, 2006. *Transplantation.* 2nd edition. V.I. Shumakov, ed. Moscow: MIA, 2006. (In Russ.).
17. *Трансплантология. Фармакотерапия без ошибок.* Под ред. С.В. Готье, Я.Г. Мойсюка. М.: Е-нот, 2014: 122–179. *Transplantation. Pharmacotherapy without mistakes.* S.V. Gautier, Ya.G. Moisyuk, eds. Moscow: E-noto, 2014: 122–179. (In Russian).
18. *Jagger A, Shimojima Y, Goronzy JJ, Weyand CM.* Regulatory T cells and the immune aging process: a mini-review. *Gerontology.* 2014; 60 (2): 130–137. doi: 10.1159/000355303.
19. *Valdiglesias V, Sánchez-Flores M, Maseda A, Marcos-Pérez D, Millán-Calenti JC, Pásaro E et al.* Lymphocyte Subsets in a Population of Nonfrail Elderly Individuals. *J Toxicol Environ Health A.* 2015; 78 (13–14): 790–804. doi: 10.1080/15287394.2015.1051170.
20. *Pinti M, Appay V, Campisi J, Frasca D, Fülöp T, Sauce D et al.* Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol.* 2016; 46 (10): 2286–2301. doi: 10.1002/eji.201546178.
21. *Gill Z, Nieuwoudt M, Ndifon W.* The Hayflick Limit and Age-Related Adaptive Immune Deficiency. *Gerontology.* 2018; 64 (2): 135–139. doi: 10.1159/000478091.
22. *Betjes MG.* Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013; 9 (5): 255–265. doi: 10.1038/nrneph.2013.44.
23. *Vogelzang JL, van Stralen KJ, Noordzij M, Diez JA, Carrero JJ, Couchoud C et al.* Mortality from infections and malignancies in patients treated with renal replacement therapy: data from the ERA-EDTA registry. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30 (6): 1028–1037. doi: 10.1093/ndt/gfv007.
24. *Navaneethan SD, Schold JD, Arrigain S, Jolly SE, Nally JV Jr.* Cause-Specific Deaths in Non-Dialysis-Dependent CKD. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26 (10): 2512–2520. doi: 10.1681/ASN.2014101034.
25. *Cheung CY, Chan GC, Chan SK, Ng F, Lam MF, Wong SS et al.* Cancer Incidence and Mortality in Chronic Dialysis Population: A Multicenter Cohort Study. *Am J Nephrol.* 2016; 43 (3): 153–159. doi: 10.1159/000445362.
26. *Litjens NH, Huisman M, van den Dorpel M, Betjes MG.* Impaired immune responses and antigen-specific memory CD4+ T cells in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008; 19 (8): 1483–1490. doi: 10.1681/ASN.2007090971.
27. *Kim JU, Kim M, Kim S, Nguyen TT, Kim E, Lee S, Kim S, Kim H.* Dendritic Cell Dysfunction in Patients with End-stage Renal Disease. *Immune Netw.* 2017; 17 (3): 152–162. doi: 10.4110/in.2017.17.3.152.
28. *Litjens NH, van Druningen CJ, Betjes MG.* Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naïve T lymphocytes. *Clin Immunol.* 2006; 118 (1): 83–91. doi: 10.1016/j.clim.2005.09.007.
29. *Yoon JW, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND.* Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2006; 70 (2): 371–376. doi: 10.1038/sj.ki.5001550.
30. *Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NH.* Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2011; 80 (2): 208–217. doi: 10.1038/ki.2011.110.
31. *Lisowska KA, Dębska-Ślizień A, Jasiulewicz A, Heleniak Z, Bryl E, Witkowski JM.* Hemodialysis affects phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *J Clin Immunol.* 2012; 32 (1): 189–200. doi: 10.1007/s10875-011-9603-x.
32. *Meijers RW, Litjens NH, de Wit EA, Langerak AW, Baan CC, Betjes MG.* Uremia-associated immunological aging is stably imprinted in the T-cell system and not reversed by kidney transplantation. *Transpl Int.* 2014; 27 (12): 1272–1284. doi: 10.1111/tri.12416.
33. *Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters JP.* Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in

- patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13 (1): 204–212.
34. Xie DQ, Gan H, Du XG, Li ZR, Wu J. The characterization of Th1/Th2 profile in end-stage renal disease patients and the correlation with the apoptosis of T lymphocyte. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2006; 22 (6): 763–766.
 35. Winterberg PD, Ford ML. The effect of chronic kidney disease on T cell alloimmunity. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017; 22 (1): 22–28. doi: 10.1097/MOT.0000000000000375.
 36. Lisowska KA, Debska-Slizien A, Radzka M, Witkowski JM, Rutkowski B, Bryl E. Recombinant human erythropoietin treatment of chronic renal failure patients normalizes altered phenotype and proliferation of CD4-positive T lymphocytes. *Artif Organs*. 2010; 34 (3): E77–84. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00942.x.
 37. Betjes MG, Litjens NH. Chronic kidney disease and premature ageing of the adaptive immune response. *Curr Urol Rep*. 2015; 16 (1): 471. doi: 10.1007/s11934-014-0471-9.
 38. Augustine JJ, Poggio ED, Clemente M, Aeder MI, Bodziak KA, Schullak JA et al. Hemodialysis vintage, black ethnicity, and pretransplantation antidonor cellular immunity in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18 (5): 1602–1606. doi: 10.1681/ASN.2006101105.
 39. Crespo E, Lucia M, Cruzado JM, Luque S, Melilli E, Manonelles A et al. Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy. *PLoS One*. 2015; 10 (2): e0117618. doi: 10.1371/journal.pone.0117618.
 40. Hart A, Salkowski N, Snyder JJ, Israni AK, Kasiske BL. Beyond «Median Waiting Time»: Development and Validation of a Competing Risk Model to Predict Outcomes on the Kidney Transplant Waiting List. *Transplantation*. 2016; 100 (7): 1564–1570. doi: 10.1097/TP.0000000000001185.
 41. Gritane K, Jusinskis J, Malcevs A, Suhorukovs V, Amerika D, Puide I et al. Influence of Pretransplant Dialysis Vintage on Repeated Kidney Transplantation Outcomes. *Transplant Proc*. 2018; 50 (5): 1249–1257. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.01.056.
 42. Ватазин АВ, Зулькарнаев АБ, Степанов ВА. Анализ выживаемости пациентов в листе ожидания трансплантации почки с позиции конкурирующих рисков. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 35–45. Vatazin AV, Zulkarnaev AB, Stepanov VA. Survival analysis of patients in the waiting list for kidney transplantation in terms of competing risks. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2019; 21 (1): 35–45. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-35-45.
 43. Crepin T, Carron C, Roubiou C, Gaugler B, Gaiffe E, Simula-Faivre D et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2015; 15 (4): 1028–1038. doi: 10.1111/ajt.13092.
 44. Luque Y, Jamme M, Rabant M, DeWolf S, Noël LH, Therivet E et al. Long-term CD4 lymphopenia is associated with accelerated decline of kidney allograft function. *Nephrol Dial Transplant*. 2016; 31 (3): 487–495. doi: 10.1093/ndt/gfv362.
 45. Björkström NK, Ljunggren HG, Michaëlsson J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2016; 16 (5): 310–320. doi: 10.1038/nri.2016.34.
 46. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*. 2018; 9: 1869. doi: 10.3389/fimmu.2018.01869.
 47. Xiang FF, Zhu JM, Cao XS, Shen B, Zou JZ, Liu ZH et al. Lymphocyte depletion and subset alteration correlate to renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail*. 2016; 38 (1): 7–14. doi: 10.3109/0886022X.2015.1106871.
 48. Schmaderer C, Heemann U. Blocking innate immunity to slow the progression of chronic kidney disease. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2014; 387 (10): 905–907. doi: 10.1007/s00210-014-1031-z.
 49. Spada R, Rojas JM, Pérez-Yagüe S, Mulens V, Cannata-Ortiz P, Bragado R et al. NKG2D ligand overexpression in lupus nephritis correlates with increased NK cell activity and differentiation in kidneys but not in the periphery. *J Leukoc Biol*. 2015; 97 (3): 583–598. doi: 10.1189/jlb.4A0714-326R.
 50. Law BMP, Wilkinson R, Wang X, Kilday K, Lindner M, Rist MJ et al. Interferon- γ production by tubulointerstitial human CD56 bright natural killer cells contributes to renal fibrosis and chronic kidney disease progression. *Kidney Int*. 2017; 92 (1): 79–88. doi: 10.1016/j.kint.2017.02.006.
 51. Turner JE. Natural killers: the bad guys in fibrosis? *Kidney Int*. 2017; 92 (1): 9–11. doi: 10.1016/j.kint.2017.03.011.
 52. Hamze M, Desmetz C, Guglielmi P. B cell-derived cytokines in disease. *Eur Cytokine Netw*. 2013; 24 (1): 20–26. doi: 10.1684/ecn.2013.0327.
 53. Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017; 12 (6): 983–997. doi: 10.2215/CJN.11761116.
 54. Caravaca-Fontán F, Gutiérrez E, Delgado Lillo R, Praga M. Monoclonal gammopathies of renal significance. *Nefrologia*. 2017; 37 (5): 465–477. doi: 10.1016/j.nefro.2017.03.012.
 55. Kattah AG, Fervenza FC, Roccatello D. Rituximab-based novel strategies for the treatment of immune-mediated glomerular diseases. *Autoimmun Rev*. 2013; 12 (8): 854–859. doi: 10.1016/j.autrev.2012.09.002.
 56. Pahl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimehr R, Vaziri ND. Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25 (1): 205–212. doi: 10.1093/ndt/gfp397.
 57. Kim KW, Chung BH, Jeon EJ, Kim BM, Choi BS, Park CW et al. B cell-associated immune profiles in patients with end-stage renal disease (ESRD). *Exp Mol Med*. 2012; 44 (8): 465–472. doi: 10.3858/emmm.2012.44.8.053.

58. Malinowski K, Tsukuda K, Terashima T, Rapaport FT. Effects of end-stage renal disease on the expression of differentiation and HLA-DR markers on the surface of T and B lymphocytes. *Transplant Proc.* 1997; 29 (1–2): 1020–1024.
59. Naicker SD, Cormican S, Griffin TP, Maretto S, Martin WP, Ferguson JP et al. Chronic Kidney Disease Severity Is Associated With Selective Expansion of a Distinctive Intermediate Monocyte Subpopulation. *Front Immunol.* 2018; 9: 2845. doi: 10.3389/fimmu.2018.02845.
60. Shimaoka M, Hosotsubo K, Sugimoto M, Sakaue G, Taenaka N, Yoshiya I et al. The influence of surgical stress on T cells: enhancement of early phase lymphocyte activation. *Anesth Analg.* 1998; 87 (6): 1431–1435.
61. Buunen M, Gholghesaei M, Veldkamp R, Meijer DW, Bonjer HJ, Bouvy ND. Stress response to laparoscopic surgery: a review. *Surg Endosc.* 2004; 18 (7): 1022–1028. doi: 10.1007/s00464-003-9169-7.
62. Bartal I, Melamed R, Greenfeld K, Atzil S, Glasner A, Domankevich V et al. Immune perturbations in patients along the perioperative period: alterations in cell surface markers and leukocyte subtypes before and after surgery. *Brain Behav Immun.* 2010; 24 (3): 376–386. doi: 10.1016/j.bbi.2009.02.010.
63. Caprara GV, Nisini R, Castellani V, Vittorio P, Alessandri G, Vincenzo Z et al. Lymphocyte subsets are influenced by positivity levels in healthy subjects before and after mild acute stress. *Immunol Lett.* 2017; 188: 13–20. doi: 10.1016/j.imlet.2017.05.012.
64. Nankivell BJ, Borrowers RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003; 349 (24): 2326–2333. doi: 10.1056/NEJMoa020009.
65. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol.* 2004; 5 (12): 1260–1265. doi: 10.1038/ni1138.
66. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol.* 2004; 173 (6): 3716–3724. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3716.
67. Noval Rivas M, Hazzan M, Weatherly K, Gaudray F, Salmon I, Braun MY. NK cell regulation of CD4 T cell-mediated graft-versus-host disease. *J Immunol.* 2010; 184 (12): 6790–6798. doi: 10.4049/jimmunol.0902598.
68. Zecher D, Li Q, Oberbarnscheidt MH, Demetris AJ, Shlomchik WD, Rothstein DM, Lakkis FG. NK cells delay allograft rejection in lymphopenic hosts by downregulating the homeostatic proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2010; 184 (12): 6649–6657. doi: 10.4049/jimmunol.0903729.
69. Garrod KR, Liu FC, Forrest LE, Parker I, Kang SM, Cahalan MD. NK cell patrolling and elimination of donor-derived dendritic cells favor indirect alloreactivity. *J Immunol.* 2010; 184 (5): 2329–2336. doi: 10.4049/jimmunol.0902748.
70. Meier-Kriesche H, Ojo AO, Arndorfer JA, Leichtman AB, Lake K, Cibrik DM et al. Need for individualized immunosuppression in elderly renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2001; 33 (1–2): 1190–1191. Jacobson PA, Schladt D, Oetting WS, Leduc R, Guan W, Matas AJ, Israni A. Lower calcineurin inhibitor doses in older compared to younger kidney transplant recipients yield similar troughs. *Am J Transplant.* 2012; 12 (12): 3326–3336. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04232.x.

Статья поступила в редакцию 23.07.2019 г.
The article was submitted to the journal on 23.07.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-50-54

СКРИНИНГ ГЕМОТРАНСМИССИВНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ПОСМЕРТНЫХ ДОНОРОВ РОГОВИЦЫ В ГЛАЗНОМ ТКАНЕВОМ БАНКЕ НМИЦ «МНТК «МИКРОХИРУРГИЯ ГЛАЗА» ИМЕНИ АКАДЕМИКА С.Н. ФЕДОРОВА»

С.А. Борзенко^{1, 2}, М.Ю. Герасимов¹, Х.Д. Тонаева¹, М.Х. Хубецова¹, Т.З. Керимов²,
Ю.А. Комах¹

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»

Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет
имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: проанализировать отрицательные лабораторные результаты скрининга трупного донорского материала в процессе подготовки роговиц для трансплантации по данным внутреннего регистра доноров Глазного тканевого банка (ГТБ) МНТК «Микрохирургия глаза» и Европейской ассоциации глазных банков (англ.: European Eye Bank Association, ЕЕВА) за период 2011–2015 гг. **Материалы и методы.** Анализ данных был проведен с использованием внутреннего регистра доноров ГТБ и ежегодных директорий ЕЕВА. Анализируемые данные включали в себя число полученных глазных яблок, частоту незавершенных тестов (гемолиз для ГТБ) и положительных серологических результатов на вирус иммунодефицита человека (ВИЧ, тип 1 и 2), вирусный гепатит В, вирусный гепатит С и сифилис. **Результаты.** Всего за 5 лет в ГТБ поступило 3479 глазных яблок. Гемолиз образцов донорской крови явился причиной исключения из обработки и утилизации 13,9% (n = 486) роговиц. В ЕЕВА за аналогичный период было зарегистрировано меньше незавершенных тестов. Наряду с гемолизом положительные серологические тесты привели к исключению из обработки 19,4% (n = 676) роговиц, поступивших в ГТБ. В целом число положительных серологических тестов в ГТБ было существенно выше в сравнении с данными ЕЕВА. Частота положительных тестов на ВИЧ (тип 1 и 2) и сифилис в ГТБ имела слабую вариабельность в течение каждого года, в то время как частота гепатита В возросла в 2015 г. Также за анализируемый период было отмечено превалирование положительной серологии на гепатит С среди доноров в ГТБ. Достаточно часто в образцах крови была зарегистрирована микст-инфекция. **Заключение.** По данным анализа положительная серология и гемолиз явились главными противопоказаниями и привели к исключению из обработки 33,3% (n = 1162) поступивших в ГТБ кадаверных донорских роговиц. Частота положительных серологических тестов по обозначенным инфекциям в ГТБ была выше в сравнении с данными ЕЕВА, со значительным превалированием гепатита С.

Ключевые слова: трансплантация роговицы, Глазной тканевой банк, серологические тесты, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус гепатита В, вирус гепатита С, сифилис.

Для корреспонденции: Герасимов Максим Юрьевич. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а.
Тел. (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

For correspondence: Gerasimov Maksim Yurevich. Address: 59A, Beskudnikovsky blvd., Moscow, 127486, Russian Federation.
Tel. (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

SCREENING OF CADAVER CORNEA DONOR FOR INFECTIONS IN THE EYE BANK OF THE FYODOROV EYE MICROSURGERY FEDERAL STATE INSTITUTION

S.A. Borzenok^{1, 2}, M.Yu. Gerasimov¹, H.D. Tonaeva¹, M.K. Khubetsova¹, T.Z. Kerimov², Yu.A. Komakh¹

¹ S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

² A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Objective: to analyze negative laboratory results of cadaver cornea donor screening during preparation of corneas for transplantation according to data from the internal registry of donors of the eye bank (EB) of the Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution and the European Eye Bank Association (EEBA) from 2011 through 2015.

Materials and methods. Data analysis was carried out using the internal registry of EB donors and the EEBA annual directories. The analyzed data included the number of eyeballs obtained, the frequency of incomplete tests (hemolysis for EB) and positive serological results for human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2), viral hepatitis B, viral hepatitis C and syphilis. **Results.** In just 5 years, the EB received 3,479 eyeballs. After hemolysis of donor blood samples, 13.9% (n = 486) of corneas were excluded from the EB. EEBA recorded fewer inconclusive tests during the same period. After hemolysis and positive serological tests, 19.4% (n = 676) of corneas were excluded from the EB. Overall, the number of positive serological tests in EBs was far higher than in the EEBA data. Frequency of positive HIV tests (HIV-1 and HIV-2) and syphilis in EB showed low variability annually, while incidence of hepatitis B increased in 2015. For the analyzed period, positive serology for hepatitis C was found to be prevalent among EB donors. Mixed infections were quite often recorded in blood samples. **Conclusion.** Based on analysis conducted, positive serology and hemolysis were the main contraindications and led to exclusion of 33.3% (n = 1162) of cadaver donor corneas received in EB. Frequency of positive serological tests for indicated infections in EB was higher than in the EEBA data, with significant predomination of hepatitis C.

Keywords: corneal transplantation, eye bank, serological tests, human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, syphilis.

ВВЕДЕНИЕ

Глазной тканевой банк (ГТБ) МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова был основан в 1988 году для усовершенствования практики роговичного донорства на территории СССР (приказ Генерального директора акад. С.Н. Федорова № 150 от 21.11.1988). С 1995 года ГТБ является действительным членом Европейской ассоциации глазных банков (European Eye Bank Association, EEBA) [1] и принимает активное участие в работе Ассоциации и ежегодных конференциях. В настоящее время ГТБ подготавливает донорскую ткань для всех видов кератопластики и играет ключевую роль в трансплантации роговиц в России.

Инфекционный скрининг является неотъемлемой частью работы ГТБ и имеет цель не допустить трансмиссии инфекций от донора к реципиенту через роговичный трансплантат. В мировой практике известны два случая передачи вируса гепатита В через роговичный трансплантат от донора позитивного по «австралийскому антигену» [2]. В то же время случаев трансмиссии вируса иммунодефицита человека, тип 1 и 2 (ВИЧ), вирусного гепатита С и возбудителя сифилиса через роговичную донорскую ткань до настоящего времени не зарегистрировано [3, 4]. Принимая во внимание чрезвычайную важность ин-

фекционного скрининга при подготовке и консервировании трансплантата роговицы, образец крови каждого донора, поступивший в ГТБ, обследуется на указанные инфекции согласно лицензированному регламенту.

В соответствии с «Алгоритмом заготовки трупных роговиц человека для трансплантации» [5] первичный скрининг посмертных доноров проводится экспертами-патологоанатомами в танатологических отделениях. Исключаются доноры со следами инъекций на теле, татуировками, больные туберкулезом, умершие от ожоговой травмы, а также в случаях давности биологической смерти более 24 часов и в возрасте старше 70 лет. ГТБ получает донорский материал в форме глазного яблока после его энуклеации силами танатологической службы. В обязательном порядке от каждого донора получают образцы крови для проведения серологических тестов. Эти биологические материалы доставляются в запечатанном контейнере и хранятся до момента выдачи результатов серологических тестов при +4 °С. Все поступившие образцы крови от доноров-трупов проходят серологические тесты на ВИЧ (тип 1 и 2), вирусный гепатит В, вирусный гепатит С и сифилис в клинической лаборатории МНТК «Микрохирургия глаза», имеющей лицензию на работу с инфекционными

возбудителями III–IV группы патогенности. Образцы с гемолизом и положительными результатами на обозначенные инфекции подвергаются утилизации согласно требованиям СанПиН. Глазные яблоки от неинфицированных доноров переходят к следующему этапу для выполнения морфофункционального скрининга. Далее производится определение показателя трансплантатбельности (морфологический эквивалент функции), выкраивание корнеосклерального диска и его гипотермическая консервация в среде Борзенка–Мороз для последующего клинического применения [6].

В системе Европейской ассоциации глазных банков отсутствует единый стандарт заготовки донорских роговиц, однако инфекционный скрининг выполняется также для ВИЧ (тип 1 и 2), вирусных гепатитов В и С, сифилиса. Ранее С.А. Борзенком проводился анализ инфицированности доноров-трупов роговиц за 1996–2005 гг. [6]. Однако сравнительный анализ встречаемости обозначенных инфекций за указанный период не выполнялся.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ данных был осуществлен с использованием внутреннего регистра доноров ГТБ и ежегодных форм директории Европейской ассоциации глазных банков с 2011-го по 2015 год включительно. Сравнивались данные по числу полученных глазных яблок, частоте незавершенных анализов (гемолиза), результатам серологических тестов (одновременно скрининговых и подтверждающих) на ВИЧ (тип 1 и 2), вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, сифилис.

РЕЗУЛЬТАТЫ

За период с января 2011-го по декабрь 2015 г. в ГТБ поступило 3479 глазных яблок доноров-трупов. Медиана составила 566 в год и варьировала от 556 (1-й квартиль) до 692 (3-й квартиль).

Ежегодно гемолиз был причиной утилизации 13,9% роговиц по медиане (13,8–14,0%, 1–3-й квартиль), поступивших в ГТБ. В системе ЕЕВА используется термин «Serology test inconclusive or impossible» («серологический тест неубедительный или невыполнимый»), и количество таких тестов, по данным ассоциации, составляло 2,0% (медиана) в год (1,2–2,1%, 1–3-й квартили) (рис. 1, в).

Положительные тесты на ВИЧ (тип 1 и 2), полученные при анализе образцов крови в ГТБ, были зарегистрированы в 1,2% случаев (медиана) с низкой вариабельностью по годам: 1,1–1,7% (1–3-й квартили). В системе ЕЕВА было отмечено в 3 раза меньше положительных тестов на ВИЧ (тип 1 и 2), а медиана составила 0,4% (рис. 1, а, б).

Положительные тесты на вирусный гепатит В в образцах крови доноров в ГТБ регистрировались в 5,3% случаев (медиана) с резким, более чем дву-

кратным, увеличением до 10,7% в 2015 году. За тот же период в системе ЕЕВА было зарегистрировано в 2,9 раза меньше положительных результатов на вирусный гепатит В (рис. 1, а, б) с низкой ежегодной вариабельностью.

Тесты на гепатит С в ГТБ были положительны в 12,1% (медиана) образцов крови доноров с пиком 14,5% в 2012 году и спадом до 8,3% в 2014 г. За аналогичный период времени в системе ЕЕВА частота положительных тестов на гепатит С была ниже в 13,4 раза по медиане в сравнении с данными ГТБ. Отмечалась слабая вариабельность по годам и общая тенденция к снижению данного показателя (рис. 1, а, б).

Положительные серологические тесты на сифилис в образцах крови доноров в ГТБ и системе ЕЕВА были слабовариабельны, однако различались в 7,7 раза по медиане (рис. 1, а, б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Инфекционный скрининг доноров-трупов роговиц в ГТБ позволяет предупредить инфицирование реципиентов ВИЧ-инфекцией, вирусными гепатитами В и С, сифилисом. Функционирующая медико-технологическая система ГТБ предусматривает обязательный учет результатов каждого серологического исследования, проводимого при подготовке консервированного трансплантата роговицы. В ходе ежедневной тридцатилетней работы накоплен уникальный статистический материал, позволяющий проследить частоту встречаемости обозначенных инфекций и гемолиза за приведенный промежуток времени.

С 2011-го по 2015 г. в ГТБ гемолиз образцов крови доноров-трупов привел к утилизации 486 роговиц, или 13,9% поступившего материала. За анализируемый период в ГТБ серопозитивные тесты на ВИЧ (тип 1 и 2), гепатит В, гепатит С и сифилис привели к утилизации 676 роговиц, или 19,4% поступившего материала. Всего за период с 2011-го по 2015 г. 33,3% доноров ($n = 1162$) были исключены по причинам обнаружения инфекций в получаемых образцах крови либо в связи с наличием гемолиза.

По результатам проведенного анализа было обнаружено, что такие инфекции, как ВИЧ, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, сифилис, встречаются соответственно в 3; 2,9; 13,4; 7,7 раза чаще, по данным внутреннего регистра ГТБ, по сравнению с данными ЕЕВА, что подчеркивает актуальность учета в подобных исследованиях медико-социальных и иных особенностей популяции [7]. Руководствуясь официальными данными Росстата и Минздрава [8], мы не выявили взаимосвязей частоты встречаемости положительных серологических тестов с показателями заболеваемости населения обозначенными инфекциями за 2011–2015 гг. (рис. 2). В этой связи

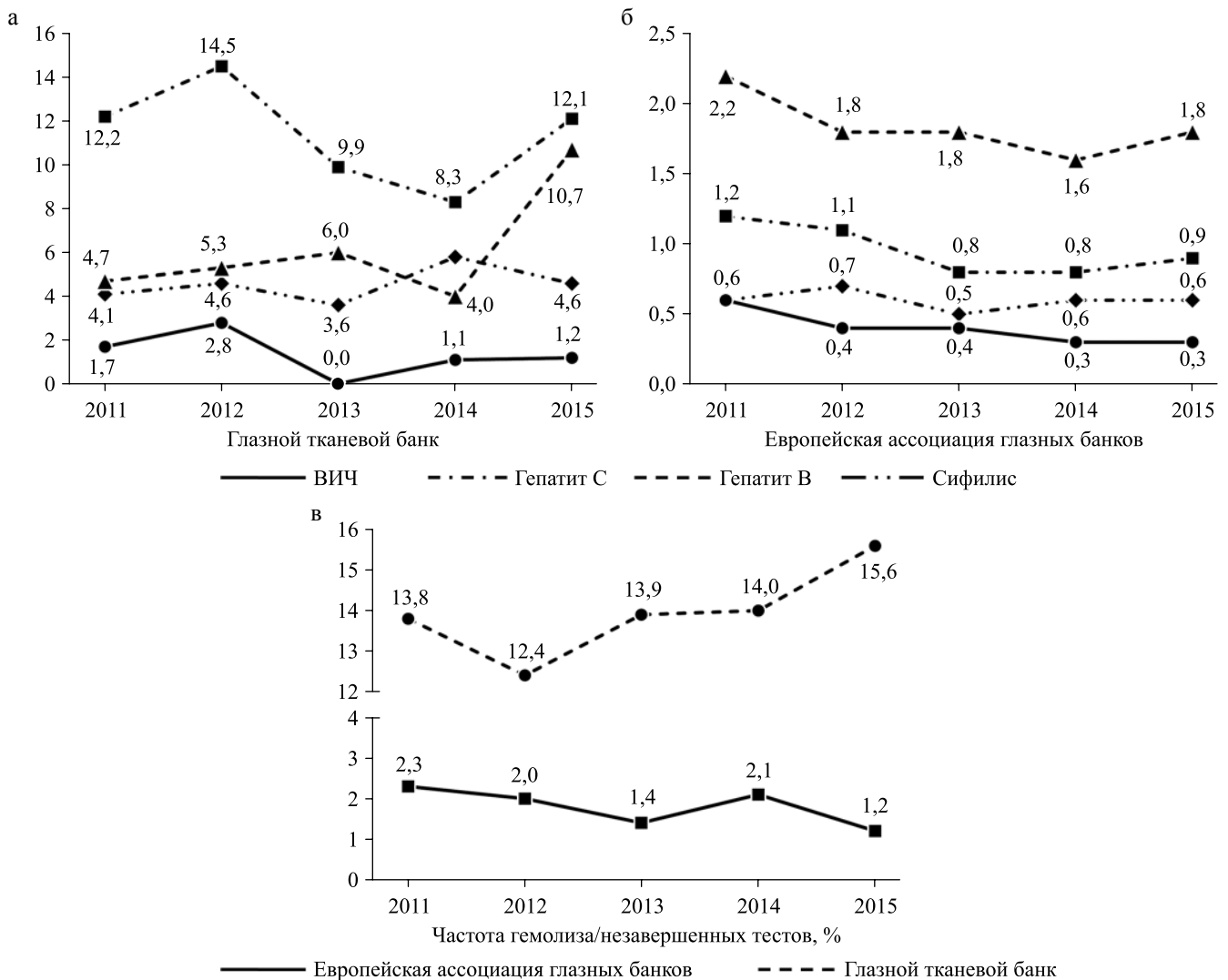


Рис. 1. Результаты инфекционного скрининга образцов крови доноров-трупов за период 2011–2015 гг. Частота встречаемости в образцах крови доноров положительных серологических тестов на ВИЧ (тип 1 и 2), вирусный гепатит В, вирусный гепатит С и сифилис в Глазном тканевом банке МНТК «МГ» (а) и Европейской ассоциации глазных банков (б); частота встречаемости гемолиза, выявленного в процессе обработки донорской крови в Глазном тканевом банке МНТК «МГ», и незавершенных тестов, зарегистрированных в Европейской ассоциации глазных банков (в)

Fig. 1. Corneal donor screening results for the period from 2011 through 2015. Rates of positive serology tests for human immunodeficiency virus (type 1 and 2), Hepatitis B and C viruses, and Syphilis in Eye tissue bank Eye Microsurgery (а) and European Eye Bank Association (б); rates of hemolysis in donor blood samples in Eye tissue bank Eye Microsurgery and European Eye Bank Association (в)

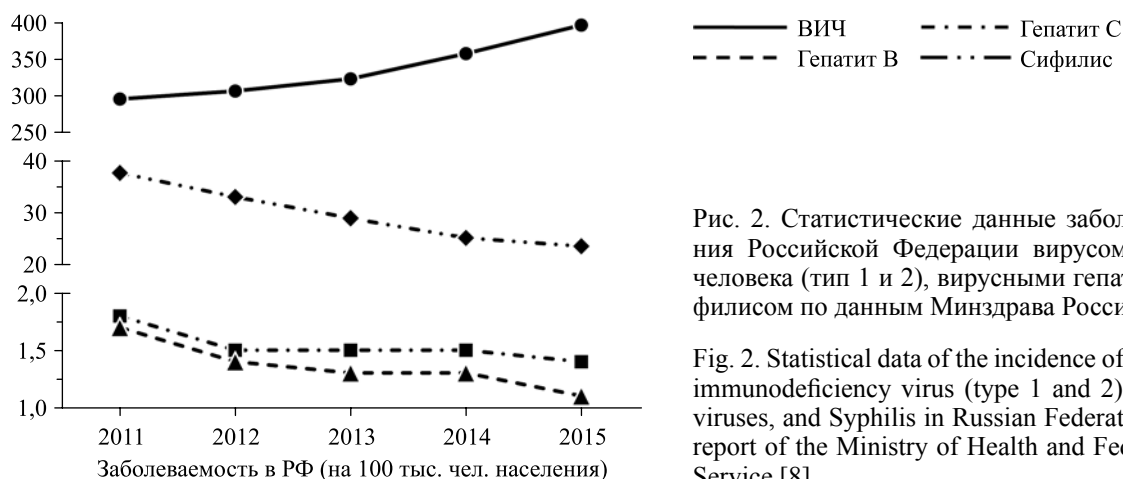


Рис. 2. Статистические данные заболеваемости населения Российской Федерации вирусом иммунодефицита человека (тип 1 и 2), вирусными гепатитами В и С и сифилисом по данным Минздрава России/Росстата [8]

Fig. 2. Statistical data of the incidence of a disease for human immunodeficiency virus (type 1 and 2), Hepatitis B and C viruses, and Syphilis in Russian Federation according to the report of the Ministry of Health and Federal State Statistics Service [8]

необходимо дальнейшее изучение результатов инфекционного скрининга роговичных доноров в глазных тканевых банках Российской Федерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования было установлено, что за период с января 2011-го по декабрь 2015 г. в Глазной тканевой банк головной организации ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России поступило 3479 глазных яблок. Все полученные образцы крови от доноров-трупов были подвергнуты серологическому тестированию в клинической лаборатории МНТК «Микрохирургия глаза» на ВИЧ (тип 1 и 2), вирусные гепатиты В и С, сифилис. По результатам серологических исследований 19,4% доноров оказались серопозитивными, в то время как гемолиз был выявлен в 13,9% случаев. При сопоставлении полученных результатов с данными Европейской ассоциации глазных банков за аналогичный период было установлено, что серопревалентность таких инфекций, как ВИЧ, вирусный гепатит В, вирусный гепатит С, сифилис, выше у доноров ГТБ. При этом не было выявлено взаимосвязей частоты встречаемости положительных серологических тестов с показателями заболеваемости населения Российской Федерации вышеобозначенными инфекциями за 2011–2015 гг.

Таким образом, инфекционный скрининг доноров-трупов роговиц позволяет предупреждать инфицирование реципиентов ВИЧ-инфекцией, вирусными гепатитами В и С, сифилисом и разрабатывать прогностически значимые алгоритмы профилактики контаминации реципиентов обозначенными гемотрансмиссивными инфекциями в глазных тканевых банках России.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Brightbill FS. Corneal surgery: theory, technique, and tissue. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 1993: 735.
2. Hoft RH, Pflugfelder SC, Forster RK, Ullman S, Polack FM, Schiff ER. Clinical evidence for hepatitis B transmission resulting from corneal transplantation. *Cornea*. 1997; 16: 132–137. PMID: 9071524.
3. Pruss A, Caspari G, Krüger DH, Blümel J, Nübling CM, Gürtler L, Gerlich WH. Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed. *Transpl Infect Dis*. 2010; 12: 375–386. doi: 10.1111/j.1399-3062.2010.00505.x.
4. Bredehorn-Mayr T, Duncker GIW, Armitage WJ. Eye Banking (Developments in Ophthalmology Vol. 43). Basel: S. Karger AG; 2009: 27.
5. Борзенко СА, Малюгин БЭ, Гаврилова НА, Комах ЮА, Тонаева ХД. Алгоритм заготовки трупных роговиц человека для трансплантации. М., 2016: 20. Borzenok SA, Malyugin BE, Gavrilova NA, Komakh YuA, Tonaeva HD. Algoritm zagotovki trupnyh rogovic cheloveka dlya transplantacii. M., 2016: 20.
6. Борзенко СА. Медико-технологические и методологические основы эффективной деятельности глазных тканевых банков России в обеспечении операций по сквозной трансплантации роговицы: дис. ... докт. мед. наук. М., 2008: 305. Borzenok SA. Mediko-tehnologicheskie i metodologicheskie osnovy ehffektivnoj deyatel'nosti glaznyh tkanevyh bankov Rossii v obespechenii operacij po skvoznoj transplantacii rogovicy. [Dissertation]. M., 2008^ 305.
7. Зубкин МЛ, Семенов ТА, Селькова ЕП, Кокоева ФК, Червинко ВИ, Балакирев ЭМ, Аleshкин ВА. Гепатит Е: новая проблема трансплантологии? *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; 14 (4): 103–114. Zubkin ML, Semenenko TA, Selkova EP, Kokoeva FK, Chervinko VI, Balakirev EM, Aleshkin VA. Hepatitis E: a new problem in transpantology? *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2012; 14 (4): 103–114. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2012-4-103-114.
8. Федеральная служба государственной статистики: заболеваемость населения социально-значимыми болезнями [Internet]. Доступно по ссылке: http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/zdrav/zdr2-2.xls. Federal State Statistics Service: morbidity rate of socially significant diseases [Internet]. Available from: http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/zdrav/zdr2-2.xls.

Статья поступила в редакцию 14.02.2019 г.

The article was submitted to the journal on 14.02.2019

ПРОГРАММА ТРАНСПЛАНТАЦИИ БОТКИНСКОЙ БОЛЬНИЦЫ: ОПЫТ 100 ТРАНСПЛАНТАЦИЙ СОЛИДНЫХ ОРГАНОВ

*А.В. Шабунин^{1, 2}, И.П. Парфенов¹, М.Г. Минина², П.А. Дроздов², И.В. Нестеренко²,
Д.А. Макеев², О.С. Журавель²*

¹ ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

Цель: оценить первые результаты программы трансплантации Боткинской больницы. **Материалы и методы.** С июня 2018-го по октябрь 2019 года в ГКБ им. С.П. Боткина выполнено 100 трансплантаций солидных органов. Из них 72 трансплантации почки: средний возраст реципиентов составил $45,65 \pm 11,35$ года, совпадение по HLA в среднем составило $2,09 \pm 1,03$ и 28 трансплантаций печени. Средний возраст реципиентов составил $50,14 \pm 7,62$ года, средний MELD составил $17,78 \pm 3,28$ (14–34). **Результаты.** После трансплантации органов 30-дневной летальности не зафиксировано. Послеоперационные осложнения после трансплантации почки зафиксированы у 11 больных (15,2%): у 3 (4,3%) – нагноение послеоперационной раны, у 2 (2,8%) – гематомы в зоне послеоперационного шва на фоне проведения гемодиализа, у 5 (6,9%) – лимфоцеле брюшинного пространства, у 1 больного (1,4%) – уросепсис. Зафиксировано 4 случая (5,5%) острого отторжения, в 3 случаях (4,2%) – гуморальное отторжение, в 1 случае (1,3%) – клеточное. Ранние послеоперационные осложнения после трансплантации печени зафиксированы у 2 больных (7,2%): у одного больного – гематома под правой долей печени на 1-е сутки после операции, источником кровотечения явилась диафрагма, у одной больной – подтекание асцита через послеоперационные швы, что потребовало релапаротомии. У 2 больных (7,2%) зафиксированы послеоперационные осложнения в отдаленном послеоперационном периоде. В одном случае стриктура холедохо-холедохо-анастомоза – выполнено стентирование стриктуры покрытым нитиноловым стентом. В другом случае острая спаечная кишечная непроходимость, что потребовало лапаротомии, адгезиолизиса. **Заключение.** Внедрение программы трансплантации в многопрофильные стационары позволяет увеличить объемы трансплантологической помощи в отдельно взятом регионе, улучшить результаты лечения больных с терминальным поражением органов.

Ключевые слова: трансплантация почки, трансплантация печени, ГКБ им. С.П. Боткина.

BOTKIN HOSPITAL TRANSPLANT PROGRAM: 100 SOLID ORGAN TRANSPLANTATIONS

*A.V. Shabunin^{1, 2}, I.P. Parfenov¹, M.G. Minina², P.A. Drozdov², I.V. Nesterenko²,
D.A. Makeev², O.S. Zhuravel²*

¹ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

² S.P. Botkin City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

Objective: to evaluate the first results of the Botkin Hospital transplant program. **Materials and methods.** From June 2018 to October 2019, 100 solid organ transplants were performed at the Botkin City Clinical Hospital. Out of the 100 transplantations, 72 were kidney transplants (average age of recipients was 45.65 ± 11.35 years, HLA match averaged 2.09 ± 1.03) and 28 were liver transplants (average age of recipients was 50.14 ± 7.62 years, average MELD was 17.78 ± 3.28 (14–34)). **Results.** After transplantation, there was no 30-day mortality. Post-operative complications following kidney transplantation were established in 11 patients (15.2%). In 3 patients

Для корреспонденции: Дроздов Павел Алексеевич. Адрес: 117148, Москва, ул. Брусилова, д. 15, кв. 8.
Тел. (962) 985-04-41. E-mail: dc.drozdov@gmail.com

For correspondence: Drozdov Pavel Alexeevich. Address: 15, Brusilova str., apt 8, Moscow, 117148, Russian Federation.
Tel. (962) 985-04-41. E-mail: dc.drozdov@gmail.com

(4.3%) – suppuration of postoperative wound, in 2 patients (2.8%) – hematomas in the area of the postoperative suture during hemodialysis, in 5 patients (6.9%) – retroperitoneal lymphocele, in 1 patient (1.4%) – urosepsis. There were 4 cases (5.5%) of acute rejection, 3 cases (4.2%) of humoral rejection, and 1 case (1.3%) of cellular rejection. Early postoperative complications following liver transplantation were detected in 2 patients (7.2%). In one patient – hematoma under the right lobe of the liver on the 1st day after surgery, the diaphragm was the source of bleeding, in one patient – ascites leakage through postoperative sutures, which required relaparotomy. In 2 patients (7.2%), postoperative complications were found in the separated postoperative period. In one case, of choledochcholedochal anastomotic stricture – stricture stenting was performed with coated nitinol stent. In another case, acute adhesive intestinal obstruction, which required laparotomy, adhesiolysis. **Conclusion.** Implementation of the transplantation program in multidisciplinary hospitals can boost transplant care in a district and improve the treatment results of patients with terminal organ damage.

Keywords: kidney transplantation, liver transplantation, Botkin Hospital.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие трансплантологической помощи в Москве – актуальное направление современной медицины [1, 2]. На 31 декабря 2018 года в листе ожидания на трансплантацию трупной почки в Москве стоят 1529 человек, печени – 208 человек [3]. Более половины пациентов, ожидающих трансплантацию, находятся в трудоспособном возрасте. Финансовые затраты на заместительную почечную терапию гемодиализом в Москве составляют 10 млрд руб. в год, и более 3 млрд руб. в год расходуется на лечение пациентов с неизлечимыми заболеваниями печени [4]. Это определяет медицинскую, финансовую и социальную проблемы лечения этих пациентов [5].

Решением этих проблем служит дальнейшее развитие трансплантационных технологий [6, 7]. Так в течение последних 4–5 лет в Москве неуклонно растет количество эффективных доноров, увеличивается количество донорских органов [3], что ведет за собой увеличение количества трансплантаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Городская клиническая больница имени С.П. Боткина – крупнейший в России многопрофильный стационар, в котором развернуто более 1800 коек. Больница оказывает медицинскую помощь по всем направлениям лечения, а также обладает всем спектром лабораторной и инструментальной диагностики. Работа по внедрению программы трансплантации в Боткинской больнице включала три этапа, проходящих параллельно в течение года.

Первый этап – юридический. Первым его шагом стало включение Приказом Министерства здравоохранения РФ № 307н/4 от 04.06.2015 ГКБ им. С.П. Боткина в реестр учреждений здравоохранения, осуществляющих забор, заготовку и трансплантацию органов и (или) тканей человека. Далее, Приказом № 404н/1 Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.07.2017 ГКБ им. С.П. Боткина была включена в реестр учреждений здравоохранения субъектов Российской Федерации, осуществляющих трансплантацию органов и(или) тканей че-

ловека. Завершающим шагом первого этапа стало получение ГКБ им. С.П. Боткина лицензии Росздравнадзора на осуществление медицинской деятельности при оказании специализированной помощи по трансплантации органов и(или) тканей от 29.11.2017.

Второй этап – научный, который состоял в подготовке специалистов Боткинской больницы на базе ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России и ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского» ДЗМ. Всего по программе трансплантологии прошли учебу 26 сотрудников, среди них 6 хирургов, 4 уролога, 1 гастроэнтеролог, 2 анестезиолога, 5 реаниматологов, 2 врача лабораторной диагностики, 4 нефролога, 2 операционные сестры. Участники программы «Трансплантация органов и тканей в Боткинской больнице» активно участвовали в операциях по трансплантации печени и почки на базе ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ» и ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также отрабатывали навыки в cadaver-class патологоанатомического отделения Боткинской больницы.

Третий этап – клинический, который заключался в разработке регламента мероприятий по оказанию высокотехнологичной медицинской помощи по трансплантации почки и печени. На этом этапе были сформированы листы ожидания трупной почки и печени.

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЧКИ

Первая трупная пересадка почки в Боткинской больнице была выполнена 7 июня 2018 года пациентке с хроническим гломерулонефритом. За 16 месяцев функционирования программы трансплантации Боткинской больницы было выполнено 72 трансплантации почки.

У всех доноров почки смерть была констатирована на основании неврологических критериев – смерть головного мозга (СГМ). Причиной смерти доноров в 62,3% случаев стало острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК). Средний возраст доноров составил $46,44 \pm 9,7$ (22–65) года. У всех доноров

показатели электролитов крови были в пределах или несколько выше нормы (K^+ – $4,06 \pm 0,64$ (3–7,0) ммоль/л, Na^+ – $142,14 \pm 11,24$ (127–165) ммоль/л). Средний показатель креатинина составил $93,58 \pm 27,69$ (44–180) мкмоль/л, мочевины – $6,06 \pm 2,43$ (2,0–10,9) ммоль/л.

Средний возраст реципиентов составил $45,65 \pm 11,35$ (20–70) года. Совпадение по HLA в среднем составило $2,09 \pm 1,03$ (1–5), однако необходимо отметить, что у всех пар было совпадение как минимум по одному Dg антигену. Додиализных больных было 5 (6,9%), так же 17 (23,6%) реципиентам перед операцией потребовался сеанс экстренного гемодиализа.

Среднее время холодовой ишемии составило $585,41 \pm 191,93$ (133–1188) мин, средняя кровопотеря – $104,29 \pm 52,54$ (30–300) мл, среднее время операции составило $250,72 \pm 40,6$ (160–370) мин. При трансплантации почки во всех случаях устанавливался мочеточниковый стент, который удалялся в конце третьей недели после пересадки. Средний койко-день в ОРИТ после трансплантации почки составил – $1,55 \pm 0,85$ (1–4). Общий послеоперационный койко-день после трансплантации почки составил – $17,08 \pm 6,18$ (12–33). Послеоперационные осложнения зафиксированы у 11 больных (15,2%): у 3 (4,3%) – нагноение послеоперационной раны, у 2 (2,8%) – гематомы в зоне послеоперационного шва на фоне проведения гемодиализа, у 5 (6,9%) – лимфоцеле забрюшинного пространства, у 1 больного (1,4%) – уросепсис. Зафиксировано 4 случая (5,5%) острого отторжения, в 3 случаях (4,2%) – гуморальное отторжение, в 1 случае (1,3%) – клеточное. Тридцатидневной летальности не было. После трансплантации почки во всех случаях использовали четырехкомпонентную схему иммуносупрессии (моноклональные антитела, глюкокортикостероиды, ингибиторы кальциневрина, ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы).

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПЕЧЕНИ

Первая трупная пересадка печени состоялась 8 июля 2018 года пациентке с первичным билиарным циррозом.

За 15 месяцев функционирования программы трансплантации в Боткинской больнице было выполнено 28 трансплантаций печени.

Средний возраст доноров составил $41,96 \pm 10,46$ (22–56) года. Средние показатели АСТ ($57,97 \pm 58,84$ (7–208) Ед/л) и АЛТ ($42,85 \pm 38,59$ (5–184) Ед/л) немногим превышали норму (40 Ед/л). Средний уровень билирубина ($11,89 \pm 9,14$ (3,7–43) Ед/л) в пределах нормы.

Средний возраст реципиентов составил $50,14 \pm 7,62$ (34–66) года. Средний MELD составил $17,78 \pm 3,28$ (14–34).

Все трансплантации печени были выполнены по стандартной методике piggy-back. В 25 случаях сформирован узловой холедохо-холедохоанастомоз, в 3 случаях – непрерывный рассасывающейся монофиламентной нитью 6-0. Среднее время холодовой ишемии составило $396,82 \pm 68,88$ (290–590) мин, тепловой ишемии – $37,78 \pm 8,88$ (20–60) мин. Средняя кровопотеря – $1322,22 \pm 752,6$ (200–3000) мл, среднее время операции составило $531,1 \pm 59,2$ (430–720) мин. Средний койко-день в ОРИТ после трансплантации печени составил $3,04 \pm 1,47$ (1–8). Общий послеоперационный койко-день после трансплантации печени составил $16,33 \pm 5,14$ (11–37). Тридцатидневной летальности не зафиксировано. Ранние послеоперационные осложнения зафиксированы у 2 больных (7,2%): у одного больного – гематома под правой долей печени на 1-е сутки после операции, источником кровотечения явилась диафрагма, у одной больной – подтекание асцита через послеоперационные швы, что потребовало релапаротомии, дренирования брюшной полости. У 2 больных (7,2%) зафиксированы послеоперационные осложнения в отдаленном послеоперационном периоде. В одном случае стриктура холедохо-холедохоанастомоза – выполнено стентирование стриктуры покрытым нитиновым стентом. В другом случае острая спаечная кишечная непроходимость, что потребовало лапаротомии, адгезиолизиса. Реакций острого отторжения, документированного гистологически, зафиксировано не было. Летальности не было. При трансплантации печени по поводу аутоиммунных заболеваний использовалась четырехкомпонентная схема ($n = 4$), при других заболеваниях – трехкомпонентная или двухкомпонентная схемы ($n = 24$) (моноклональные антитела, ингибиторы кальциневрина, ингибиторы инозинмонофосфатдегидрогеназы).

Третьим направлением трансплантационной программы Боткинской больницы стала пересадка роговицы. До настоящего времени офтальмологами Боткинской больницы выполнено 160 операций.

Четвертым направлением программы стала аутологичная трансплантация стволовых кроветворных клеток. В гематологической клинике Боткинской больницы выполнено 23 операции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Повышение доступности трансплантологической помощи в Российской Федерации – важная медицинская, финансовая и социальная проблема. Высокотехнологичную медицинскую помощь методом трансплантации необходимо развивать в ведущих медицинских учреждениях регионального уровня, обладающих современной материально-технической базой, высококвалифицированными медицинскими кадрами.

Боткинская больница на момент старта программы трансплантации соответствовала всем современным стандартам, предъявляемым к трансплантологическим центрам. В ее составе функционирует нефрологический центр, клиника урологии, отделение хирургии печени и поджелудочной железы, отделение гепатологии, анестезиолого-реанимационный центр, отделение экстракорпоральных методов детоксикации, клиника офтальмологии, клиника гематологии. Это позволило в короткие сроки с привлечением только собственных кадров и с минимальными финансовыми затратами внедрить программу трансплантации по четырем направлениям и за 1 год и 4 месяца выполнить 100 трансплантаций солидных органов с хорошими непосредственными результатами, которые сопоставимы с результатами других трансплантационных центров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение программы трансплантации в многопрофильные стационары позволяет увеличить объемы трансплантологической помощи в отдельно взятом регионе, улучшить результаты лечения больных с терминальным поражением органов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шумаков ВИ, Мойсюк ЯГ, Козлов ИА, Попцов ВН, Милосердов ИА, Шаршаткин АВ и др. Опыт трансплантации печени в одном центре: современные технологии и проблемы улучшения результатов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2008; 1: 5–13. Shumakov VI, Moysyuk YaG, Kozlov IA, Poptsov VN, Miloserdov IA, Sharshatkin AV et al. The experience of liver transplantation in one center: contemporary technology and problems of improvement the results. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2008; 18: 5–13.
2. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2018 году. XI сообщение регистра Российского трансплантологического общества. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (3): 7–32. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2018. 11th report of National Register. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 7–32. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-3-7-32>.
3. Руммо ОО. Семь лет трансплантации печени в Республике Беларусь. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2015; 17 (2): 100–104. Rummo OO. 7 years of liver transplantation in the Republic of Belarus. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 7–32. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2015-2-100-104>.
4. Flayou K, Hadiya I, Raoundi O, Lahyani M, Jabbour Y, Yddousalah O et al. Surgical complications after kidney transplantation. *JMSR*. 2015; 2 (1): 110–113.
5. Шабунин АВ, Парфенов ИП, Минина МГ, Дроздов ПА, Левина ОН. В Боткинской больнице стартовала программа по трансплантации печени. *Эффективная фармакотерапия*. 2019; 15 (2): 50–53. Shabunin AV, Parfenov IP, Minina MG, Drozdov PA, Levina ON. Liver transplantation program launched at Botkin Hospital. *Effektivnaya farmakoterpiya*. 2019; 15 (2): 50–53.
6. Seehofer D, Eurich D, Veltzke-Schlieker W, Neuhaus P. Biliary complications after liver transplantation: old problems and new challenges. *American Journal of Transplantation*. 2013; 13 (2): 253–265. <https://doi.org/10.1111/ajt.12034>.
7. Trapero-Marugán M, Little EC, Berenguer M. Stretching the boundaries for liver transplant in the 21st century. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2018; 3 (11): 803–811. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30213-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30213-9).

*Статья поступила в редакцию 14.11.2019 г.
The article was submitted to the journal on 14.11.2019*

НЕОДНОЗНАЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ БАЛЛОННОЙ АНГИОПЛАСТИКИ ПРИ СТЕНОЗАХ ЦЕНТРАЛЬНЫХ ВЕН У ПАЦИЕНТОВ НА ГЕМОДИАЛИЗЕ С НАТИВНОЙ АРТЕРИОВЕНОЗНОЙ ФИСТУЛОЙ

З.Б. Карданахишвили^{1, 2}, А.Б. Зулкарнаев³, Б.В. Байков^{1, 4}, В.А. Степанов³

¹ ГБУЗ «Госпиталь для ветеранов войн № 2 Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

² ГБУЗ «Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

³ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

⁴ ГБУЗ МО «Красногорская городская больница № 1», Красногорск, Российская Федерация

Цель: провести комплексный сравнительный анализ показателей проходимости нативной артериовенозной фистулы (АВФ) при стенозе центральных вен (СЦВ) после эндоваскулярной баллонной ангиопластики и паллиативных оперативных вмешательств. **Материалы и методы.** В ретроспективное исследование включены 80 пациентов с подтвержденным стенозом центральных вен: подключичных, брахиоцефальных вен, нижней полой вены или множественным поражением. К основной группе были отнесены 39 пациентов, у которых выполнена чрескожная баллонная ангиопластика. К группе сравнения были отнесены 41 пациент, у которых по различным причинам баллонная ангиопластика не выполнялась, а проводились паллиативные вмешательства: тромбэктомия, проксимализация артериовенозного анастомоза, редукция кровотока по АВФ. **Результаты.** Первичная проходимость (интервал времени между первым вмешательством по поводу СЦВ и повторным вмешательством) составила 61,5% [95%ДИ 44,5; 74,7] и 15,4% [95%ДИ 6,2; 28,3] через 6 и 12 месяцев соответственно в основной группе, 39% [95%ДИ 24,3; 53,4] и 0% – в группе сравнения, HR 0,5337 [95%ДИ 0,3381; 0,8427], log-rank p = 0,0011. Мы не отметили различий в функциональной первичной проходимости (интервал времени между началом использования АВФ и первым вмешательством по поводу СЦВ): 89,7% [95%ДИ 74,9; 96] и 30,8% [95%ДИ 17,3; 45,4] через год и три года соответственно в основной группе, 80,5% [95%ДИ 64,8; 89,7] и 24,4% [95%ДИ 12,7; 38,2] – в группе сравнения. Различий между группами не было, HR 0,7695 [95%ДИ 0,4952; 1,196], log-rank p = 0,2259. В основной группе между первичной проходимостью и функциональной первичной проходимостью выявлена сильная отрицательная связь: $r = -0,627$ [95%ДИ $-0,787$; $-0,388$], $p < 0,0001$. В группе сравнения такой зависимости не выявлено: $r = 0,049$ [95%ДИ $-0,262$; $-0,351$], $p = 0,7599$. Таким образом, чем позднее развился СЦВ, тем меньше была эффективность баллонной ангиопластики. Баллонная ангиопластика позволила значительно увеличить продолжительность использования АВФ после первой операции по поводу СЦВ (вторичная проходимость): 84,6% [95%ДИ 68,9; 92,8], 66,7% [95%ДИ 49,6; 79,1] и 17,9% [95%ДИ 7,9; 31,3] через 6 и 12 и 24 месяца соответственно в основной группе, 56,1% [95%ДИ 39,7; 69,6], 19,5% [95%ДИ 9,2; 32,7] и 0% – в группе сравнения, HR 0,4009 [95%ДИ 0,2481; 0,6477], log-rank p < 0,0001. Функциональная вторичная проходимость составила (общая продолжительность использования АВФ): 100%, 74,4% [95%ДИ 57,6; 85,3] и 12,8% [95%ДИ 4,7; 25,2] через один, три и пять лет в основной группе, 95,1% [95%ДИ 81,9; 98,8], 36,6% [95%ДИ 22,3; 51] и 4,9% [95%ДИ 0,9; 14,5] – в группе сравнения, HR 0,5661 [95%ДИ 0,3598; 0,8906], log-rank p = 0,0067. **Выводы.** 1. Стеноз центральных вен неизбежно приводит к утрате сосудистого доступа с ипсилатеральной стороны. 2. Баллонная ангиопластика позволяет несколько продлить период использования АВФ, не способна радикально изменить долгосрочные результаты течения СЦВ. 3. На результаты баллонной ангиопластики значительное влияние оказывает продолжительность периода от момента начала использования АВФ до развития СЦВ. 4. Многократные повторные баллонные ангиопластики, по-видимому, оправданы у пациентов, возможность создания нового устойчивого сосудистого доступа у которых сомнительна. 4. Объемная скорость кровотока по АВФ

Для корреспонденции: Зулкарнаев Алексей Батыргараевич. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2, корпус 6. Тел. (916) 705-98-99. E-mail: 7059899@gmail.com

For correspondence: Zulkarnaev Alexey Batyrgaraevich. Address: 61/2, Schepkina str, block 6, Moscow, 129110, Russian Federation. Tel. (916) 705-98-99. E-mail: 7059899@gmail.com

является важным фактором, определяющим выраженность клинических проявлений СЦВ и потребность в повторных оперативных вмешательствах.

Ключевые слова: стеноз центральных вен, артериовенозная фистула, сосудистый доступ для гемодиализа, баллонная ангиопластика, транслюминальная чрескожная ангиопластика, эндоваскулярная хирургия.

AMBIGUOUS RESULTS OF BALLOON ANGIOPLASTY FOR CENTRAL VEIN STENOSIS IN HEMODIALYSIS PATIENTS WITH NATIVE ARTERIOVENOUS FISTULA

Z.B. Kardanakhishvili^{1,2}, A.B. Zulkarnaev³, B.V. Baykov^{1,4}, V.A. Stepanov³

¹ War Veterans Hospital No. 2, Moscow, Russian Federation

² M.E. Zhadkevich City clinical hospital, Moscow, Russian Federation

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

⁴ Krasnogorsk city hospital No 1, Krasnogorsk, Russian Federation

Objective: to conduct comprehensive comparative analysis of the patency rate of native arteriovenous fistula (AVF) for central vein stenosis (CVS) after endovascular balloon angioplasty and palliative surgery. **Materials and methods.** The retrospective study included 80 patients with confirmed central vein stenosis: subclavian, brachiocephalic veins, inferior vena cava, or multiple lesions. The experimental group included 39 patients who underwent percutaneous balloon angioplasty. The control group included 41 patients who, for various reasons, did not do balloon angioplasty, but underwent palliative interventions: thrombectomy, proximalization of arteriovenous anastomosis, AVF blood flow-reducing surgical procedures. **Results.** Primary patency (time interval between the first intervention for CVS and the second intervention) in the experimental group was 61.5% [95% CI 44.5; 74.7] and 15.4% [95% CI 6.2; 28.3] at 6 and 12 months, respectively. In the control group, it was 39% [95% CI 24.3; 53.4] and 0% respectively. Hazard ratio (HR) 0.5337 [95% CI 0.3381; 0.8427], log-rank test $p = 0.0011$. No differences in functional primary patency (time interval between the start of using AVF and the first intervention for CVS) were found: 89.7% [95% CI 74.9; 96] and 30.8% [95% CI 17.3; 45.4] at 1 year and 3 years, respectively, in the experimental group, and 80.5% [95% CI 64.8; 89.7] and 24.4% [95% CI 12.7; 38.2] in the control group. There were no differences between the groups HR 0.7695 [95% CI 0.4952; 1.196], log-rank $p = 0.2259$. In the experimental group, strong negative correlation between primary patency and functional primary patency was detected: $r = -0.627$ [95% CI -0.787 ; -0.388], $p < 0.0001$. In the control group, no such correlation was found: $r = 0.049$ [95% CI -0.262 ; -0.351], $p = 0.7599$. Thus, the later CVS developed, the less effective balloon angioplasty was. Balloon angioplasty significantly increased duration of AVF use after first intervention for CVS (secondary patency): 84.6% [95% CI 68.9; 92.8], 66.7% [95% CI 49.6; 79.1] and 17.9% [95% CI 7.9; 31.3] at 6, 12 and 24 months, respectively in the experimental group. In the control group, it was 56.1% [95% CI 39.7; 69.6], 19.5% [95% CI 9.2; 32.7] and 0%. HR 0.4009 [95% CI 0.2481; 0.6477], log-rank $p < 0.0001$. Functional secondary patency (total duration of AVF use) was: 100%, 74.4% [95% CI 57.6; 85.3] and 12.8% [95% CI 4.7; 25.2] at 1, 3 and 5 years in the experimental group, and 95.1% [95% CI 81.9; 98.8], 36.6% [95% CI 22.3; 51] and 4.9% [95% CI 0.9; 14.5] in the control group. HR 0.5661 [95% CI 0.3598; 0.8906], log-rank $p = 0.0067$. **Conclusions.** 1. Central vein stenosis inevitably cuts vascular access from the ipsilateral side. 2. Balloon angioplasty allows to slightly prolong AVF use but it cannot radically change the long-term results of CVS treatment. 3. The outcome of balloon angioplasty greatly depends on the length of the period from the time the use of AVF started to the time CVS developed. 4. Multiple repeated balloon angioplasties are apparently justified in patients for whom creating a new vascular access might not be possible. 4. AVF volumetric blood flow velocity is an important factor determining the severity of CVS clinical manifestations and whether repeated surgical interventions are needed.

Keywords: central vein stenosis, arteriovenous fistula, hemodialysis vascular access, balloon angioplasty, percutaneous transluminal angioplasty, endovascular surgery.

ВВЕДЕНИЕ

Сосудистый доступ – один из ключевых аспектов выживаемости пациентов хронической болезни почек (ХБП), получающих лечение программным гемодиализом (ГД). Из года в год отмечается монотонный

рост количества пациентов с ХБП 5-й стадии, а темп прироста постепенно увеличивается [1]. Общеизвестно, что оптимальным сосудистым доступом является артериовенозная фистула (АВФ). Проведение ГД с использованием АВФ ассоциировано с лучшей

выживаемостью по сравнению с другими видами сосудистого доступа [2–4].

Одним из серьезных осложнений у пациентов на ГД является стеноз центральных вен (СЦВ). Известно, что СЦВ значительно повышает риск утраты доступа с ипсилатеральной стороны, а также имеет множество неблагоприятных проявлений от субклинической венозной гипертензии до синдрома верхней полой вены [5]. Распространенность СЦВ колеблется в широких пределах: от 2 до 40% [6–8]. Важным аспектом является тот факт, что СЦВ не только приводит к утрате функционирующего сосудистого доступа, но и делает невозможным формирование нового доступа с ипсилатеральной стороны [6, 7]. Это в значительной мере сокращает «сосудистый ресурс» формирования не только нативной артериовенозной фистулы (АВФ), но и любого типа сосудистого доступа.

Одним из основных этиологических факторов развития СЦВ является имплантация центрального венозного катетера (ЦВК) [9–11]. Несмотря на принцип «fistula first» [12, 13], в США ГД с использованием ЦВК получает 21% пациентов [14], в Европе – 28% [15], в России – 12% [16]. При этом потребность в использовании ЦВК наиболее высока на этапе начала заместительной почечной терапии: в США начинают ГД с использованием ЦВК – 80% [14] пациентов, в Европе – 61% [15], по нашим данным [17] (регистр пациентов хронической болезнью почек Московской области) – 43% пациентов. В связи с повсеместно сохраняющейся высокой потребностью в использовании ЦВК не приходится надеяться на спонтанное разрешение проблемы развития СЦВ.

Одним из самых динамично развивающихся направлений реконструктивной хирургии сосудистого доступа для ГД являются эндоваскулярные хирургические вмешательства. Несмотря на энтузиазм после первых публикаций об успешном опыте чрескожной баллонной ангиопластики стенозов и реканализации окклюзий центральных вен [18, 19] и высокую вероятность технического успеха (которая, по данным многих авторов, достигает 100% [20–22]), позже было установлено, что долгосрочные показатели проходимости АВФ невысоки [5, 23]. Выявленные противоречия способствовали переосмыслению подходов к пластике стенозов и окклюзий центральных вен, которое, надо полагать, не завершилось и сегодня. По мере накопления опыта и завершения клинических исследований были предложены подходы к улучшению результатов эндоваскулярных вмешательств. Так, предложено использовать стенты [24] и стент-графты [25], применять баллонные катетеры с лекарственным покрытием [26] и катетеры с баллонами высокого давления [27]. Такое многообразие доступных методов воздействия на пораженный сегмент вен компенсируется отсутствием конкретных показаний, позволяющих выбрать

оптимальный метод, что в значительной мере компрометирует эндоваскулярные вмешательства. Вместе с тем наиболее доступным методом восстановления проходимости центральных вен у пациентов на ГД остается чрескожная баллонная ангиопластика. Мы посвятили свое исследование анализу особенностей результатов первичной ангиопластики без использования стентов.

Цель исследования: провести комплексный сравнительный анализ показателей проходимости нативной АВФ при стенозе центральных вен после эндоваскулярной баллонной ангиопластики и паллиативных оперативных вмешательств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом и утвержден решением ученого совета.

Пациенты

В ретроспективное исследование включены 80 пациентов с подтвержденным стенозом центральных вен. К основной группе были отнесены 39 (48,75%) пациентов, у которых выполнены эндоваскулярные баллонные ангиопластики (БА). При тромбозе выполнялась тромбэктомия в случае тромбоза, которая дополнялась проксимализацией артериовенозного анастомоза при необходимости. К группе сравнения были отнесены пациенты, у которых по различным причинам БА не выполнялись. У пациентов этой группы выполнялись паллиативные операции: тромбэктомия в случае тромбоза, которая дополнялась проксимализацией артериовенозного анастомоза при необходимости, или редукция кровотока по АВФ при помощи формирования бандажа из синтетического сосудистого протеза на юктаанастомотическом сегменте «фистульной» вены, если показанием к операции были клинические проявления венозной гипертензии конечности. В эту группу вошел 41 пациент (51,25%).

Основные критерии включения: возраст на момент включения в исследование более 18 лет, стеноз подключичной, яремной, брахиоцефальной вены, нижней полой вены или их сочетание; использование АВФ в течение минимум одного месяца; наличие достоверной информации об анамнезе и катамнезе; утрата АВФ. Пациенты, у которых применялись стенты, а также пациенты, у которых в качестве сосудистого доступа использовались синтетические сосудистые протезы, были исключены из исследования (такие наблюдения были исключены из анализа).

У всех пациентов, кроме 5 (3 (7,7%) в основной группе и 2 (4,9%) в группе сравнения), первое формирование АВФ было выполнено до начала ГД. Однако большая доля пациентов начала ГД через ЦВК из-за первичной дисфункции: 25 (64,1%) в основной группе и 28 (68,3%) в группе сравнения. До первого

вмешательства в связи с СЦВ пациенты перенесли от одного до трех вмешательств. Предпочтение отдавалось туннельным ЦВК. В обеих группах потребность в использовании ЦВК была высокой. Основные показатели в группах обобщены в таблице. Для оценки коморбидного фона была использована шкала CIRS (Cumulative Illness Rating Scale) [28] в модификации Миллера [29] как наиболее удобная для ретроспективного анализа в условиях нашего цент-

ра. При анализе причин ХБП к группе «системные процессы» были отнесены пациенты с васкулитами, миеломной болезнью, ВИЧ-инфекцией, пациенты с новообразованием почек (часть из них – ренопривные), пациенты, перенесшие химиотерапию, имеющие длительный анамнез наркомании и др.

У 23 пациентов основной группы и 26 пациентов группы сравнения был выявлен изолированный стеноз подключичной, плечеголовной или верхней

Таблица

Характеристики групп
The characteristics of the groups

	Основная группа (n = 39)	Группа сравнения (n = 41)	Значимость различий
Возраст, годы	45 [39,25; 50], от 23 до 59 ¹	47 [41; 55], от 26 до 71 ¹	p = 0,3999
Пол (М/Ж)	43,6%/56,4% (17/22)	41,5%/58,5% (17/24)	p = 0,8475
Коморбидность, баллы CIRS	14,5 [12; 19,75], от 7 до 26 ¹	18 [12; 23], от 7 до 29 ¹	p = 0,0894
Причина ХБП			
Поликистоз почек	25,6% (10)	22% (9)	p = 0,993
Пиелонефрит	12,8% (5)	12,2% (5)	
Гломерулонефрит	15,4% (6)	17,1% (7)	
Сахарный диабет	28,2% (11)	31,7% (13)	
Системные процессы	17,9% (7)	17,1% (7)	
Период от формирования АВФ до ее использования, месяцы	4 [3; 4,6], от 0,7 до 7 ¹	3 [3; 4], от 2 до 7 ¹	p = 0,43
Период от начала использования АВФ до первой операции по поводу СЦВ, месяцы	29 [18,5; 40,5] от 6 до 54 ¹	25 [16; 36] от 4 до 51 ¹	p = 0,2858
Потребность в реконструктивных вмешательствах до начала использования АВФ	3,704 [2,79; 4,82] ²	3,841 [2,917; 4,965] ²	0,964 [0,665; 1,396] ³ p = 0,845
Потребность в реконструктивных вмешательствах с момента начала использования АВФ до первой операции по поводу СЦВ	2,263 [1,478; 3,316] ⁴	2,241 [1,435; 3,334] ⁴	1,01 [0,577; 1,773] ³ p = 0,9742
Количество ЦВК до первой операции по поводу СЦВ	3 [2; 5], от 0 до 7 ¹	3 [2; 5], от 0 до 8 ¹	p = 0,763
Потребность в использовании ЦВК до первой операции по поводу СЦВ	1,443 [1,205; 1,713] ²	1,298 [1,091; 1,532] ²	1,112 [0,875; 1,412] ³ p = 0,3859
Количество катетеров по отношению к продолжительности катетеризации	4,72 [4,944; 5,605] ⁵	4,796 [4,032; 5,663] ⁵	0,984 [0,774; 1,25] ³ p = 0,897
Средняя продолжительность использования одного ЦВК, месяцы	1,4 [1,18; 1,8], от 0,7 до 5,7 ¹	1,3 [1,03; 1,98], от 0,6 до 5,6 ¹	p = 0,753
Локализация стеноза:			
подключичная вена слева	46,2% (18)	51,2% (21)	p = 0,9915
подключичная вена справа	28,2% (11)	24,4% (10)	
внутренняя яремная вена слева	17,9% (7)	14,6% (6)	
внутренняя яремная вена справа	23,1% (9)	22% (9)	
левая плечеголовная вена	12,8% (5)	12,2% (5)	
правая плечеголовная вена	7,7% (3)	9,8% (4)	
верхняя полая вена	5,1% (2)	2,4% (1)	
Потребность в открытых реконструктивных вмешательствах после первой операции по поводу СЦВ	0,374 [0,24; 0,556] ²	2,451 [1,963; 3,023] ²	0,153 [0,095; 0,237] ³ p < 0,0001

Окончание таблицы

	Основная группа (n = 39)	Группа сравнения (n = 41)	Значимость различий
Потребность в баллонной ангиопластике	1,137 [0,89134; 1,43] ²	–	–
Общая потребность в оперативных вмешательствах после первой операции по поводу СЦВ	1,511 [1,225; 1,843] ²	2,451 [1,963; 3,023] ²	0,617 [0,461; 0,825] ³ p = 0,0011

Примечание. ¹ Медиана, интерквартильный размах и диапазон. ² Количество операций на 10 пациенто-месяцев и 95% доверительный интервал. ³ Отношение плотностей инцидентности (интенсивности наступления событий) и 95% доверительный интервал. ⁴ Количество операций на 100 пациенто-месяцев и 95% доверительный интервал. ⁵ Количество ЦВК на 100 катетеро-дней и 95% доверительный интервал.

Note. ¹ Median, first and third quartile, minimum and maximum. ² Number of surgical interventions per 10 patient-months and 95% confidence interval. ³ Incidence rate ratio (intensity of events) and 95% confidence interval. ⁴ Number of surgical interventions per 100 patient-months and 95% confidence interval. ⁵ Number of central venous catheters per 100 catheter-months and 95% confidence interval.

полой вены. У 16 пациентов основной группы и 15 пациентов группы сравнения стеноз одной из этих вен сочетался со стенозом яремных вен. Стеноз центральных вен был подтвержден ангиографически или при помощи ультразвукового исследования. При этом у пациентов группы сравнения стеноз в ряде случаев был выявлен при ангиографическом исследовании, выполненном в связи с трудностями имплантации ЦВК.

Оцениваемые показатели

В соответствии со свежими клиническими рекомендациями [30] мы оценили следующие показатели:

- первичную проходимость – интервал времени между первым вмешательством по поводу стеноза центральных вен и первым повторным хирургическим вмешательством (бессобытийная выживаемость сосудистого доступа с момента первого вмешательства по поводу СЦВ);
- ассистированную первичную проходимость – интервал времени между первым вмешательством по поводу стеноза центральных вен и первым тромбозом АВФ, включающий хирургические открытые или эндоваскулярные вмешательства для поддержания ее функционирования (безокклюзионная выживаемость сосудистого доступа с момента первого вмешательства по поводу СЦВ);
- вторичную проходимость – интервал времени между первым вмешательством по поводу стеноза центральных вен и полным прекращением использования АВФ, включающий все хирургические вмешательства;
- функциональную первичную проходимость – интервал времени между началом использования АВФ и первым оперативным вмешательством.

Помимо этого, оценивали функциональную вторичную проходимость и функциональную ассистированную первичную проходимость. Эти показатели аналогичны описанным выше, с той лишь разницей,

что началом измерения соответствующего периода считали момент начала использования АВФ.

Методы статистического анализа

Для количественных признаков (например, возраст, средняя продолжительность использования ЦВК) рассчитывали медиану и интерквартильный размах (первый и третий квартиль). Сравнения проводили при помощи критерия Манна–Уитни. Для номинальных показателей (например, пол, локализация стеноза) рассчитывали доли. Сравнения проводили при помощи критерия хи-квадрат.

Оценку проходимости проводили при помощи метода Каплана–Мейера (Kaplan–Meier estimate). Значимость различий оценивали при помощи критериев Mantel-Cox log-rank – «Log-rank test» (отдаленный период) и Gehan-Breslow-Wilcoxon – «Breslow test» (ближайший период). Вычисляли точечные оценки и 95% доверительные интервалы (95%ДИ). Кроме этого, вычисляли медиану (и 95% ДИ) выживаемости, т. е. момент времени, когда событие не произошло у 50% субъектов. Относительный риск события оценивали при помощи hazard ratio – HR (log-rank).

Для того чтобы учесть общее количество событий при оценке риска, определяли плотность инцидентности (incidence density rate), которая представляет собой интенсивность наступления событий: количество событий за стандартизированный временной интервал (например, количество операций 10 пациенто-месяцев наблюдения). Отношение двух оценок плотности инцидентности (incidence rate ratio – IRR) интерпретировали как относительный риск.

Расчеты проводились в GraphPad v.8 и OpenEpi v.3. Оценивался двусторонний уровень значимости. Значения p < 0,05 считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели функциональной проходимости, а также проходимости после первого вмешательства по поводу СЦВ приведены на рисунке.

Мы не отметили значимых различий в показателях функциональной первичной проходимости (рис., а) между группами: 89,7% [95%ДИ 74,9; 96] и 30,8% [95%ДИ 17,3; 45,4] через год и три года соответствен-

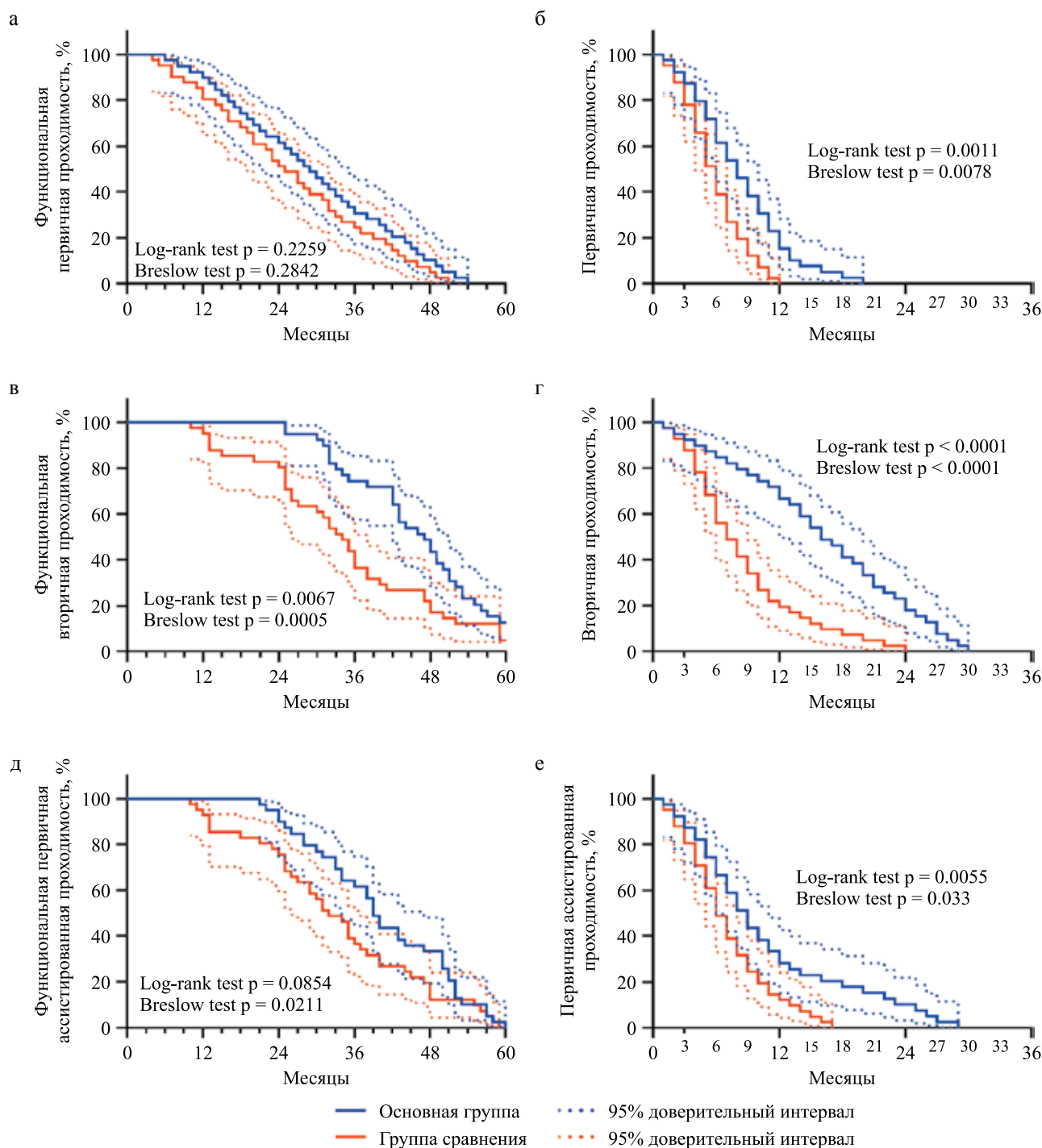


Рис. Показатели функциональной проходимости – первичной (а), вторичной (в) и асстирированной первичной (д); показатели проходимости после первого вмешательства по поводу стеноза центральных вен – первичной (б), вторичной (г) и асстирированной первичной (е). Красным отмечена группа пациентов после баллонной ангиопластики, синим – после паллиативных «открытых», точками обозначены границы 95% доверительных интервалов (Оценка Каплана–Мейера)

Fig. Functional patency rates – primary (a), secondary (в) and assisted primary (д); patency rates after the first intervention for central veins stenosis – primary (б), secondary (г) and assisted primary (е). The group of patients after endovascular surgical interventions was marked in red, the group of patients after palliative «open» surgical interventions was marked in blue, the dots indicates the 95% confidence intervals (Kaplan–Meier estimate)

но в основной группе, 80,5% [95%ДИ 64,8; 89,7] и 24,4% [95%ДИ 12,7; 38,2] – в группе сравнения, HR 0,7695 [95%ДИ 0,4952; 1,196], $p = 0,2259$; медиана в основной группе 29 месяцев [95%ДИ 22,9; 35,1], в группе сравнения – 25 месяцев [95%ДИ 19,8; 30,2].

При этом необходимость в повторном вмешательстве была меньше после БА по сравнению с паллиативными «открытыми» вмешательствами, о чем свидетельствуют показатели первичной проходимости (рис., б): 61,5% [95%ДИ 44,5; 74,7] и 15,4% [95%ДИ 6,2; 28,3] через 6 и 12 месяцев соответственно в основной группе, 39% [95%ДИ 24,3; 53,4] и 0% – в группе сравнения, HR 0,5337 [95%ДИ 0,3381; 0,8427], $p = 0,0011$; медиана в основной группе 8 месяцев [95%ДИ 6; 10], в группе сравнения – 6 месяцев [95%ДИ 4,9; 7,1].

В основной группе между первичной проходимостью и функциональной первичной проходимостью выявлена сильная отрицательная связь: $r = -0,627$ [95%ДИ $-0,787$; $-0,388$], $r^2 = 0,393$, $p < 0,0001$. В группе сравнения такой зависимости не выявлено: $r = 0,049$ [95%ДИ $-0,262$; $-0,351$], $r^2 = 0,002$, $p = 0,7599$.

Общая продолжительность использования АВФ в основной группе была существенно больше, чем в группе сравнения, о чем свидетельствуют показатели функциональной вторичной проходимости (рис., в): 100%, 74,4% [95%ДИ 57,6; 85,3] и 12,8% [95%ДИ 4,7; 25,2] через один, три и пять лет в основной группе, 95,1% [95%ДИ 81,9; 98,8], 36,6% [95%ДИ 22,3; 51] и 4,9% [95%ДИ 0,9; 14,5] – в группе сравнения, HR 0,5661 [95%ДИ 0,3598; 0,8906], $p = 0,0067$; медиана в основной группе 47 месяцев [95%ДИ 40,9; 53,1], в группе сравнения – 34 месяца [95%ДИ 29,8; 38,2].

При этом БА позволила значительно увеличить продолжительность использования АВФ после первой операции по поводу СЦВ, о чем свидетельствуют показатели вторичной проходимости (рис., г): 84,6% [95%ДИ 68,9; 92,8], 66,7% [95%ДИ 49,6; 79,1] и 17,9% [95%ДИ 7,9; 31,3] через 6 и 12 и 24 месяца соответственно в основной группе, 56,1% [95%ДИ 39,7; 69,6], 19,5% [95%ДИ 9,2; 32,7] и 0% – в группе сравнения, HR 0,4009 [95%ДИ 0,2481; 0,6477], $p < 0,0001$; медиана в основной группе 16 месяцев [95%ДИ 12,5; 19,5], в группе сравнения – 7 месяцев [95%ДИ 4,9; 9,1].

Безокклюзионный период от момента начала использования АВФ был выше в основной группе, чем в группе сравнения, о чем свидетельствует показатель функциональной первичной ассистированной проходимости (рис., д): 100%, 61,5% [95%ДИ 44,5; 74,7] и 2,6% [95%ДИ 0,2; 11,5] через один, три и пять лет соответственно в основной группе, 92,7% [95%ДИ 79; 97,6], 36,6% [95%ДИ 22,3; 51] и 0% – в группе сравнения, HR 0,7212 [95%ДИ 0,4633; 1,123], $p = 0,1193$; медиана в основной группе 39 месяцев

[95%ДИ 36,5; 41,5], в группе сравнения – 32 месяца [95%ДИ 27,5; 36,5].

Безокклюзионный период с момента первого хирургического вмешательства был также существенно больше в основной группе, о чем свидетельствует показатель первичной ассистированной проходимости (рис., е): 66,7% [95%ДИ 49,6; 79,1], 28,2% [95%ДИ 15,3; 42,7] и 10,3% [95%ДИ 3,3; 22] через 6, 12 и 24 месяца соответственно в основной группе, 48,8% [95%ДИ 32,9; 62,9], 12,2% [95%ДИ 4,5; 24,1] и 0% – в группе сравнения, HR 0,5758 [95%ДИ 0,3664; 0,905], $p = 0,0055$; медиана в основной группе 9 месяцев [95%ДИ 7; 11], в группе сравнения – 7 месяцев [95%ДИ 5,6; 8,4].

ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения объективности исследования выборка сознательно была сформирована таким образом, что у всех субъектов наступил исход – функция АВФ была утрачена.

Из таблицы видно, что обе выборки получены из одной совокупности: мы не отметили различий между группами по основным параметрам. Вместе с тем эта совокупность отличается от общей популяции пациентов на ГД по распределению причин ХБП [17]. Закономерно, что доли пациентов с причинами ХБП, которые предопределяют сложности обеспечения постоянным сосудистым доступом (поликистозная болезнь почек, сахарный диабет и системные процессы были значительно больше). Несмотря на то что первое формирование АВФ у большинства пациентов было выполнено до начала ГД, большая доля пациентов начала ГД через ЦВК. В результате за 3–4 месяца до формирования устойчивого сосудистого доступа и начала использования АВФ пациенты перенесли в среднем 3 реконструктивных вмешательства, выполненные в связи с первичной несостоятельностью: ранними тромбозами или замедленным «созреванием» «фистульной» вены. Поскольку подавляющее большинство этих вмешательств заключалось в проксимализации артериовенозного анастомоза, к моменту начала использования большинство пациентов имели АВФ на средней или верхней трети предплечья (проксимальная АВФ). Мы считаем это важным фактором как развития стеноза центральных вен, так и его быстрой клинической манифестации. Известно, что большая объемная скорость кровотока по АВФ (что свойственно проксимальным АВФ) приводит к аномальному напряжению сдвига, турбулентности. Нефизиологичная гемодинамика способствует повреждению эндотелия, активации эндотелиоцитов и тромбоцитов, неоинтимальной гиперплазии. В результате ремоделирования и фиброза происходит утолщение стенок вен [31–34]. При этом повышенная объемная скорость кровотока быстро

приводит к истощению функционально-компенсаторных возможностей вены и ее коллатералей.

В подавляющем большинстве случаев основным иницирующим фактором стеноза центральных вен является применение ЦВК [9–11]. Действительно, у пациентов в исследовании потребность в использовании ЦВК была высокой (табл.). При этом, несмотря на то что предпочтение отдавалось перманентным ЦВК, средняя продолжительность (медиана) использования одного составляла примерно 1,3–1,4 месяца. Развитие дисфункций ЦВК или инфекционные осложнения требовали имплантации нового катетера. Несмотря на то что это не было непосредственной целью нашего анализа, на основании собственного опыта мы склоняемся к выводу, что количество имплантаций ЦВК является более важным фактором риска развития СЦВ, чем продолжительность катетеризации. Это подтверждается рядом исследований [35–38]. Тем не менее необходимо отметить, что у исследователей нет единодушия в этом вопросе: есть сторонники и противоположного мнения [36–39].

Любопытно, что у 4 пациентов (1 в основной группе и 3 в группе сравнения) ЦВК не использовались. Известно описание идиопатического стеноза центральных вен, который, тем не менее, встречается крайне редко [40]. Стеноз в данном случае мог возникнуть в области слияния или отхождения ветвей и в области извитых сегментов вен и анатомических изгибов, длительное время подверженных повышенному давлению и турбулентному потоку крови вследствие наличия АВФ с ипсилатеральной стороны [41, 42].

Симптомокомплекс венозной гипертензии может возникать и в отсутствие органического стеноза, обусловленного поражением стенки вены. «Функциональный» стеноз может развиваться в результате сдавления вены извне анатомическими структурами в области верхней апертуры грудной клетки [43–45]. Этот феномен известен под собирательным термином «синдром верхней апертуры грудной клетки» [46]. Такие наблюдения у пациентов на гемодиализе достаточно хорошо описаны [40, 47, 48]. В наиболее тяжелых случаях развивается синдром Педжета–Шреттера [49, 50]. Высокая объемная скорость кровотока по АВФ в значительной мере способствует ранней клинической манифестации компрессии (или органического стеноза) вены [40, 43, 44, 51–53].

Внешняя компрессия вены (как и ее физиологические изгибы) на фоне прямого артериовенозного сброса большого объема крови (как результат формирования АВФ) может вызывать турбулентность тока крови и способствовать неоинтимальной гиперплазии и фиброзу [51, 54] стенки вены. В связи с этим хроническая компрессия вены на уровне верхней апертуры грудной клетки может представлять со-

бой важный потенциальный фактор развития стеноза центральных вен [55].

Мы отметили большую частоту развития стеноза подключичных вен, особенно слева. Это хорошо согласуется с данными других авторов: использование для катетеризации подключичных вен (по сравнению с внутренними яремными венами) [7, 35, 37, 56, 57] и использование вен слева [7, 58] сопряжено с повышенным риском развития стеноза. Это можно объяснить анатомическими особенностями: более извилистым путем к правому предсердию сердца, а также меньшим диаметром вен слева [7, 10]. Тем не менее такое распределение локализации стенозов может искаженно отражать действительность, т. к. локализация стеноза была одной из критериев включения. В исследование не попали пациенты с изолированным стенозом яремных вен. Это было сделано сознательно, поскольку изолированный стеноз яремных вен создает объективные трудности при имплантации ЦВК, однако в меньшей степени влияет на показатели проходимости АВФ.

При сравнительном анализе результатов лечения (сопоставление значений проходимости и функциональной проходимости) проявляются некоторые интересные нюансы, которые позволяют несколько по-иному оценить результаты БА и существенно дополнить представление об оптимальном обеспечении пациентов с СЦВ устойчивым сосудистым доступом.

Показатели первичной проходимости (рис., б) традиционны: в группе сравнения через один год после первой операции по поводу СЦВ у всех пациентов потребовалась повторная операция. В основной группе к 15 месяцам повторная операция потребовалась у 92% пациентов. Лишь у небольшой группы пациентов повторное вмешательство потребовалось в более поздние сроки. Тем не менее первичная проходимость не превысила 20 месяцев.

Кривые функциональной первичной проходимости, с одной стороны, свидетельствуют о том, что проявления ЦВС, требующие оперативного лечения, с одинаковой вероятностью могут встречаться на любых сроках ее использования. В обеих группах кривые выживаемости убывают почти линейно, что является косвенным признаком того, что интенсивность наступления события (первая повторная операция) относительно постоянна. С другой стороны, предсказать, когда произойдет клиническая манифестация СЦВ, достаточно трудно. Очевидно, что это зависит от множества факторов, среди которых основными, как мы полагаем, являются исходное состояние вен пациента, скорость кровотока по АВФ и анамнез использования ЦВК. Первые операции по поводу СЦВ в основной группе были выполнены уже через 6 месяцев использования АВФ, а в группе сравнения – через 4. Совокупное влияние ряда факторов способствовало тому, что уже в эти сроки

у пациентов сформировался клинически значимый стеноз центральных вен. В связи с этим очень важно не просто выявить значимые факторы риска развития СЦВ (чему посвящено большинство подобных исследований), но и с приемлемой точностью оценить уникальное влияние каждого из них на *инцидентность* СЦВ на разных сроках лечения. Вполне вероятно, что влияние разных факторов на риск развития СЦВ будет различно. Например, пациент, у которого в течение шести месяцев успешно использовался один туннельный ЦВК, и пациент, по различным причинам перенесший несколько катетеризаций в течение одного месяца, могут иметь разные риски развития СЦВ. Результаты подобного анализа могут служить поводом для проведения, например, ангиографии (инвазивного и дорогостоящего метода) при дисфункции сосудистого доступа у пациента группы риска до появления клинически значимых симптомов венозной гипертензии.

Очень важные особенности мы выявили при сопоставлении первичной проходимости и функциональной первичной проходимости (рис., а). Эти два показателя неразрывно связаны. Конечная точка для функциональной первичной проходимости (первая повторная после формирования АВФ операция) является начальной точкой отсчета первичной проходимости. В основной группе между функциональной первичной проходимостью и первичной проходимостью выявлена сильная отрицательная связь: чем позже потребовалось первое вмешательство по поводу СЦВ, тем раньше потребуется повторное вмешательство. Это вполне объяснимо: гемодинамические нарушения на фоне длительно функционирующей АВФ, с одной стороны, по-видимому, приводят к формированию соответствующего морфологического субстрата – изменению стенки вены. С другой стороны, постепенно увеличивающийся кровоток по АВФ (особенно при проксимальной АВФ) – к манифестации клинических признаков СЦВ. Поскольку, как мы установили, «поздние» стенозы хуже поддаются лечению и после хирургического разрешения СЦВ при помощи БА быстрее развивается рецидив, компенсаторный потенциал венозных коллатералей не успевает реализоваться в полной мере. В группе сравнения такой зависимости не выявлено: длительность от первого вмешательства по поводу СЦВ до повторного не зависела от длительности периода времени между формированием АВФ и развитием СЦВ. Мы можем объяснить это тем, что суть операций в группе сравнения состояла в тромбэктомии в случае тромбоза, которая дополнялась проксимализацией артериовенозного анастомоза при необходимости, или в редукции кровотока по АВФ при помощи формирования бандажа из синтетического сосудистого протеза на юктаанастомотическом сегменте «фистульной» вены, если показанием к операции были

клинические проявления венозной гипертензии конечности. И формирование бандажа, и формирование нового артериовенозного анастомоза приводили к уменьшению кровотока по АВФ. Это, с одной стороны, свидетельствует о важном влиянии этого параметра на клинические проявления СЦВ. С другой стороны, отсутствие значимой связи между показателями функциональной первичной проходимости и первичной проходимости свидетельствует, что редукция кровотока по АВФ является эффективной паллиативной операцией на любых сроках (в рамках нашего исследования) формирования СЦВ, в отличие от эффективности баллонной ангиопластики.

Как следует из рис., г, БА позволяет существенно увеличить вторичную проходимость, т. е. период между первым вмешательством по поводу СЦВ и полной утратой функции АВФ. Тем не менее даже в основной группе вторичная проходимость не превышает 30 месяцев. Кроме этого, различия между кривыми функциональной вторичной проходимости не столь выражены. В обеих группах функция АВФ была полностью утрачена через 70 месяцев после начала использования АВФ в основной группе и 66 месяцев – в группе сравнения. Несмотря на то что различия между группами были статистически значимы (даже в отдаленном периоде, о чем свидетельствует р-значение по критерию log-rank), после 54 месяцев доверительные интервалы пересекают альтернативные кривые выживаемости. Иными словами, когда бы ни развился ЦВС, к 5 годам после начала использования АВФ ее функция, вероятнее всего, будет утрачена вне зависимости от применяемого метода лечения. С учетом того что, по данным таблицы и рис., а, период от начала использования АВФ до первой операции по поводу СЦВ (т. е. по сути – срок развития клинически значимого СЦВ) между группами не различался, это можно объяснить тем фактом, что эффективность БА снижается по мере увеличения времени использования АВФ. Это также подтверждается наличием значимой отрицательной связи между первичной проходимостью и функциональной первичной проходимостью. В результате различия в показателях вторичной проходимости частично компенсируются.

Вместе с тем БА позволила более чем в два раза сократить риск утраты функции АВФ на ранних сроках ее использования: в группе сравнения первая АВФ была утрачена через 10 месяцев, в основной группе – через 25 месяцев (функциональная вторичная проходимость – рис., в).

Различия в первичной и вторичной проходимости АВФ в группе сравнения свидетельствуют о том, что редукция кровотока является эффективным паллиативным методом увеличения проходимости АВФ. Однако в отношении оптимального значения объемной скорости кровотока по АВФ нет единого мнения.

Необходимо помнить, что значительно снижение этого показателя может увеличивать риск тромбоза АВФ [59–62]. В нашем исследовании при необходимости редукции кровотока целевые значения находились в интервале 1–1,5 литра в минуту.

Одной из важных причин большей функциональной вторичной выживаемости АВФ у пациентов основной группы мы считаем факт, что в основной группе «открытые» оперативные вмешательства лишь дополняли эндоваскулярные при необходимости, в то время как в группе сравнения «открытые» вмешательства были единственным вариантом хирургических вмешательств. При этом, поскольку часто требовалась проксимализация артериовенозного анастомоза, закономерно, что в группе сравнения «сосудистый ресурс» был исчерпан быстрее.

Анализ первичной ассистированной проходимости (рис., е) показал, что на поздних сроках после первого вмешательства по поводу СЦВ в основной группе вероятность тромбоза АВФ значительно ниже: повторные операции выполнялись в связи с нарастающими явлениями венозной гипертензии (клинические проявления, косвенные «диализные» знаки: снижение эффективности ГД, рост давления в «венозной» магистрали, рост рециркуляции в сосудистом доступе). В случае если повторная операция была выполнена вскоре после первого вмешательства по поводу СЦВ, различия между группами не так очевидны: оценка p -value находится очень близко к порогу статистической значимости ($p = 0,033$ по критерию Breslow). При анализе функциональной первичной ассистированной проходимости (т. е. в случае, когда точкой отсчета периода является начало использования АВФ) результаты несколько другие (рис., д): период времени от начала использования АВФ до первой операции по поводу СЦВ в некоторой степени компенсирует различия между группами. Различия в отдаленном периоде статистически не значимы (log-rank test $p = 0,0854$), в ближайшем периоде – значимы (Breslow test $p = 0,0211$). Однако обе оценки находятся на пороге уровня статистической значимости. Иными словами, БА позволяет несколько уменьшить риск тромбоза АВФ, однако по мере увеличения времени использования АВФ эффективность их снижается. Вместе с тем БА позволила более чем в два раза сократить риск тромбоза на ранних сроках ее использования: в группе сравнения первый тромбоз АВФ произошел через 10 месяцев, в основной группе – через 21 месяц.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во-первых, исследование носило ретроспективный характер. Во-вторых, были определены критерии включения и исключения, позволяющие наиболее эффективно достичь цели исследования, но ограничивающие специфическую выборку. Сле-

дует быть осторожным при попытке интерполяции полученных оценок проходимости АВФ на общую популяцию пациентов на ГД. Работа была проведена для исследования особенностей причинно-следственных связей (которые в целом актуальны и для общей популяции пациентов на ГД), а не общей оценки эффективности баллонной ангиопластики. В-третьих, в исследование не включались пациенты, у которых применялись различные варианты стентов. Имеются убедительные свидетельства в пользу того, что использование стентов позволяет значительно увеличить показатели проходимости [25, 63–68]. Основным сдерживающим фактором применения стентов является ограниченное увеличение первичной проходимости, отсутствие четких показаний для использования стента и выбора его типа, а также существенное повышение стоимости лечения [69]. Анализ эффективности ангиопластики с использованием стентов требует отдельного тщательного анализа, который будет представлен нами позднее. В-четвертых, мы не учитывали тип баллона, его рабочее давление и протяженность стеноза. Есть основания полагать, что эти факторы также имеют клиническое значение [66, 70–72]. В-пятых, мы не включали в исследование пациентов, у которых АВФ была сформирована при помощи синтетического сосудистого протеза, а также тех пациентов, где протез был использован при реконструкциях (такие пациенты были исключены из исследования). Это важный фактор в контексте нашего исследования, поскольку очевидно, что сосудистый протез имеет меньший потенциал к значительному увеличению артериовенозного кровотока по сравнению с нативной АВФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К сожалению, необходимо признать, что стеноз центральных вен неизбежно приводит к утрате сосудистого доступа с ипсилатеральной стороны. Баллонная ангиопластика на данный момент является практически безальтернативным способом быстрого восстановления проходимости центральных вен у пациентов на ГД. Она позволяет несколько продлить период использования АВФ. Однако результаты БА значительно зависят от продолжительности периода с начала использования АВФ до развития СЦВ. При этом чрескожная баллонная ангиопластика не способна радикально изменить долгосрочные результаты течения СЦВ. В случае развития этого осложнения необходимо оценить возможность формирования нового сосудистого доступа с контралатеральной стороны. Многократные повторные баллонные ангиопластики, по-видимому, оправданы у пациентов, возможность создания нового устойчивого сосудистого доступа у которых сомнительна.

Объемная скорость кровотока по АВФ является важным фактором, определяющим выраженность

клинических проявлений СЦВ и потребность в повторных оперативных вмешательствах. Редукция кровотока по АВФ – эффективный паллиативный метод лечения при СЦВ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Томилина НА, Андрусов АМ, Перегудова НГ, Шинкарев МБ. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 2010–2015 гг. Отчет по данным общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества, часть первая. *Нефрология и диализ*. 2017; 19 (4, приложение): 1–95. Tomilina NA, Andrushev AM, Peregudova NG, Shinkarev MB. Renal replacement therapy for End Stage Renal Disease in Russian Federation, 2010–2015. Russian National Renal Replacement Therapy Registry Report of Russian Public Organization of Nephrologists «Russian Dialysis Society», Part 1. *Nefrologiya i dializ [Nephrology and dialysis]*. 2017; 19 (4, supplement): 1–95. [In Russ, English abstract]. doi: 10.28996/1680-4422-2017-4suppl-1-95.
2. Ravani P, Palmer SC, Oliver MJ, Quinn RR, MacRae JM, Tai DJ et al. Associations between hemodialysis access type and clinical outcomes: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24 (3): 465–473. doi: 10.1681/ASN.2012070643.
3. Almasri J, Alsawas M, Mainou M, Mustafa RA, Wang Z, Woo K et al. Outcomes of vascular access for hemodialysis: A systematic review and meta-analysis. *J Vasc Surg*. 2016; 64 (1): 236–243. doi: 10.1016/j.jvs.2016.01.053.
4. Arhuidese JJ, Orandi BJ, Nejm B, Malas M. Utilization, patency, and complications associated with vascular access for hemodialysis in the United States. *J Vasc Surg*. 2018; 68 (4): 1166–1174. doi: 10.1016/j.jvs.2018.01.049.
5. Miller LM, MacRae JM, Kiaii M, Clark E, Dipchand C, Kappel J et al. Hemodialysis Tunneled Catheter Noninfectious Complications. *Can J Kidney Health Dis*. 2016; 3: 2054358116669130. doi: 10.1177/2054358116669130.
6. Mansour M, Kamper L, Altenburg A, Haage P. Radiological central vein treatment in vascular access. *J Vasc Access*. 2008; 9: 85e101.
7. Agarwal AK, Patel BM, Haddad NJ. Central vein stenosis: a nephrologist's perspective. *Semin Dial*. 2007; 20: 53e62.
8. Kundu S. Review of central venous disease in hemodialysis patients. *J Vasc Intervent Radiol JVIR*. 2010; 21: 963e8. doi: 10.1016/j.jvir.2010.01.044.
9. MacRae JM, Ahmed A, Johnson N, Levin A, Kiaii M. Central vein stenosis: a common problem in patients on hemodialysis. *ASAIO J*. 2005; 51 (1): 77–81.
10. Agarwal AK. Central vein stenosis. *Am J Kidney Dis*. 2013; 61 (6): 1001–1015. doi: 10.1053/j.ajkd.2012.10.024.
11. Tedla FM, Clerger G, Distant D, Salifu M. Prevalence of Central Vein Stenosis in Patients Referred for Vein Mapping. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2018; 13 (7): 1063–1068. doi: 10.2215/CJN.14001217.
12. Brown RS, Patibandla BK, Goldfarb-Rumyantzev AS. The Survival Benefit of «Fistula First, Catheter Last» in Hemodialysis Is Primarily Due to Patient Factors. *J Am Soc Nephrol*. 2017; 28 (2): 645–652.
13. Sequeira A, Naljayam M, Vachharajani TJ. Vascular Access Guidelines: Summary, Rationale, and Controversies. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2017; 20 (1): 2–8.
14. USRDS.org [Internet]. United States Renal Data System. 2016 USRDS annual data report. Volume 2 – End-stage Renal Disease (ESRD) in the United States: 1 · Incidence, Prevalence, Patient Characteristics, and Treatment Modalities 2016; Available at: <https://www.usrds.org/2016/view/Default.aspx>.
15. ERA-EDTA-reg.org [Internet]. European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2015. 2017; Available at: <https://www.era-edta-reg.org/files/annual-reports/pdf/AnnRep2015.pdf>.
16. Бикбов БТ, Томилина НА. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 1998–2013 гг. Отчет по данным общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества. Часть первая. *Нефрология и диализ*. 2015; 17 (3, приложение): 5–111. Bikbov BT, Tomilina NA. Renal replacement therapy for ESRD in Russian Federation, 1998–2013 Report of the Russian Renal Replacement Therapy Registry. Part 1. *Nefrologiya i dializ [Nephrology and dialysis]*. 2015; 17 (3, supplement): 5–111. [In Russ, English abstract]. doi: 10.28996/1680-4422-2017-4suppl-1-95.
17. Ватазин АВ, Зулкарнаев АБ, Фоминых НМ, Карданахшвили ЗБ, Стругайло ЕВ. Формирование и обслуживание сосудистого доступа для хронического гемодиализа в Московской области: пятилетний опыт регионального центра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (4): 44–53. Vatazin AV, Zulkarnaev AB, Fominykh NM, Kardanakhshvili ZB, Strugailo EV. The creation and maintenance of vascular access for chronic hemodialysis in the Moscow region: a five-year experience of a regional center. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (4): 44–53. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2018-4-44-53.
18. Fant GF, Dennis VW, Quarles LD. Late vascular complications of the subclavian dialysis catheter. *Am J Kidney Dis*. 1986; 7 (3): 225–228.
19. Schwab SJ, Quarles LD, Middleton JP, Cohan RH, Saeed M, Dennis VW. Hemodialysis-associated subclavian vein stenosis. *Kidney Int*. 1988; 33 (6): 1156–1159.
20. Massmann A, Fries P, Obst-Gleditsch K, Minko P, Shayesteh-Kheslat R, Buecker A. Paclitaxel-coated balloon angioplasty for symptomatic central vein restenosis in patients with hemodialysis fistulas. *J Endovasc Ther*. 2015; 22 (1): 74–79. doi: 10.1177/1526602814566907.

21. Aj A, Razak Uk A, R P, Pai U, M S. Percutaneous intervention for symptomatic central vein stenosis in patients with upper limb arteriovenous dialysis access. *Indian Heart J.* 2018; 70 (5): 690–698. doi: 10.1016/j.ihj.2018.01.013.
22. Shi YX, Ye M, Liang W, Zhang H, Zhao YP, Zhang JW. Endovascular treatment of central venous stenosis and obstruction in hemodialysis patients. *Chin Med J (Engl).* 2013; 126 (3): 426–430.
23. Surowiec SM, Fegley AJ, Tanski WJ, Sivamurthy N, Illig KA, Lee DE et al. Endovascular management of central venous stenoses in the hemodialysis patient: results of percutaneous therapy. *Vasc Endovascular Surg.* 2004; 38 (4): 349–354.
24. Massara M, De Caridi G, Alberti A, Volpe P, Spinelli F. Symptomatic superior vena cava syndrome in hemodialysis patients: mid-term results of primary stenting. *Semin Vasc Surg.* 2016; 29 (4): 186–191. doi: 10.1053/j.semvasc.2017.05.001.
25. Haskal ZJ, Trerotola S, Dolmatch B, Schuman E, Altman S, Mietling S et al. Stent graft versus balloon angioplasty for failing dialysis-access grafts. *N Engl J Med.* 2010; 362 (6): 494–503. doi: 10.1056/NEJMoa0902045.
26. Hongsakul K, Bannangkoon K, Rookkapan S, Boonsri-rat U, Kritpracha B. Paclitaxel-Coated Balloon Angioplasty for Early Restenosis of Central Veins in Hemodialysis Patients: A Single Center Initial Experience. *Korean J Radiol.* 2018; 19 (3): 410–416. doi: 10.3348/kjr.2018.19.3.410.
27. Aftab SA, Tay KH, Irani FG, Gong Lo RH, Gogna A, Haaland B et al. Randomized clinical trial of cutting balloon angioplasty versus high-pressure balloon angioplasty in hemodialysis arteriovenous fistula stenoses resistant to conventional balloon angioplasty. *J Vasc Interv Radiol.* 2014; 25 (2): 190–198. doi: 10.1016/j.jvir.2013.10.020.
28. Linn BS, Linn MW, Gurel L. Cumulative illness rating scale. *J Amer Geriatr Soc.* 1968; 16: 622–626.
29. Miller MD, Paradis CF, Houck PR, Mazumdar S, Stack JA, Rifai AH et al. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research: application of the Cumulative Illness Rating Scale. *Psychiatry Res.* 1992; 41: 237–248.
30. Schmidli J, Widmer MK, Basile C, de Donato G, Gallieni M, Gibbons CP et al. Editor's Choice – Vascular Access: 2018 Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2018; 55 (6): 757–818. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.02.001.
31. Kundu S. Central venous disease in hemodialysis patients: prevalence, etiology and treatment. *J Vasc Access.* 2010; 11 (1): 1–7.
32. Roy-Chaudhury P, Spergel LM, Besarab A, Asif A, Ravani P. Biology of arteriovenous fistula failure. *J Nephrol.* 2007; 20 (2): 150–163.
33. Browne LD, Bashar K, Griffin P, Kavanagh EG, Walsh SR, Walsh MT. The Role of Shear Stress in Arteriovenous Fistula Maturation and Failure: A Systematic Review. *PLoS One.* 2015; 10 (12): e0145795. doi: 10.1371/journal.pone.0145795.
34. Fitts MK, Pike DB, Anderson K, Shiu YT. Hemodynamic Shear Stress and Endothelial Dysfunction in Hemodialysis Access. *Open Urol Nephrol J.* 2014; 7 (Suppl 1 M5): 33–44.
35. Osman OO, El-Magzoub AR, Elamin S. Prevalence and Risk Factors of Central Venous Stenosis among Prevalent Hemodialysis Patients, a Single Center Experience. *Arab J Nephrol Transplant.* 2014; 7 (1): 45–47.
36. Agarwal AK. Central vein stenosis: current concepts. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2009; 16 (5): 360–370. doi: 10.1053/j.ackd.2009.06.003.
37. Naroienjad M, Saedi D, Rezvani A. Prevalence of central vein stenosis following catheterization in patients with end-stage renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2010; 21 (5): 975–978.
38. Yardim H, Erkoç R, Soyoral YU, Begenik H, Avcu S. Assessment of internal jugular vein thrombosis due to central venous catheter in hemodialysis patients: a retrospective and prospective serial evaluation with ultrasonography. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2012; 18 (6): 662–665. doi: 10.1177/1076029611432739.
39. Gonsalves CF, Eschelman DJ, Sullivan KL, DuBois N, Bonn J. Incidence of central vein stenosis and occlusion following upper extremity PICC and port placement. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2003; 26 (2): 123–127.
40. Oguzkurt L, Tercan F, Yildirim S, Torun D. Central venous stenosis in haemodialysis patients without a previous history of catheter placement. *Eur J Radiol.* 2005; 55 (2): 237–242.
41. Shi Y, Zhu M, Cheng J, Zhang J, Ni Z. Venous stenosis in chronic dialysis patients with a well-functioning arteriovenous fistula. *Vascular.* 2016; 24 (1): 25–30. doi: 10.1177/1708538115575649.
42. Dixon BS. Why don't fistulas mature? *Kidney Int.* 2006; 70 (8): 1413–1422.
43. Horita Y. Percutaneous transluminal angioplasty for central venous stenosis or occlusion in hemodialysis patients. *J Vasc Access.* 2019; 20 (1_suppl): 87–92. doi: 10.1177/1129729817747545.
44. Hall HC, Moudgill N, Kahn M, Burkhart R, Eisenberg J, Rao A et al. An unusual cause of venous hypertension after dialysis access creation. *Ann Vasc Surg.* 2011; 25 (7): 983.e1–4.
45. Collin G, Jones RG, Willis AP. Central venous obstruction in the thorax. *Clin Radiol.* 2015; 70 (6): 654–660. doi: 10.1016/j.crad.2015.01.014.
46. Муртазина АФ, Никитин СС, Наумова ЕС. Синдром верхней апертуры грудной клетки: клинические и диагностические особенности. Нервно-мышечные болезни. 2017; 7 (4): 10–19. Murtazina AF, Nikitin SS, Naumova ES. Thoracic outlet syndrome: clinical and diagnostic features. *Neuromuscular Diseases.* 2017; 7 (4): 10–19. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17650/2222-8721-2017-7-4-10-19.
47. Itkin M, Kraus MJ, Trerotola SO. Extrinsic compression of the left innominate vein in hemodialysis patients. *J Vasc Interv Radiol.* 2004; 15 (1 Pt 1): 51–56.
48. Glass C, Dugan M, Gillespie D, Doyle A, Illig K. Costoclavicular venous decompression in patients with threa-

- tened arteriovenous hemodialysis access. *Ann Vasc Surg.* 2011; 25 (5): 640–645. doi: 10.1016/j.avsg.2010.12.020.
49. Wooster M, Fernandez B, Summers KL, Illig KA. Surgical and endovascular central venous reconstruction combined with thoracic outlet decompression in highly symptomatic patients. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2019; 7 (1): 106–112.e3. doi: 10.1016/j.jvsv.2018.07.019.
 50. Vemuri C, Salehi P, Benarroch-Gampel J, McLaughlin LN, Thompson RW. Diagnosis and treatment of effort-induced thrombosis of the axillary subclavian vein due to venous thoracic outlet syndrome. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2016; 4 (4): 485–500. doi: 10.1016/j.jvsv.2016.01.004.
 51. Jennings WC, Miller GA, Coburn MZ, Howard CA, Lawless MA. Vascular access flow reduction for arteriovenous fistula salvage in symptomatic patients with central venous occlusion. *J Vasc Access.* 2012; 13 (2): 157–162. doi: 10.5301/jva.5000020.
 52. Jennings WC, Maliska CM, Blebea J, Taubman KE. Creating arteriovenous fistulas in patients with chronic central venous obstruction. *J Vasc Access.* 2016 7; 17 (3): 239–242. doi: 10.5301/jva.5000507.
 53. Sequeira A, Tan TW. Complications of a High-flow Access and Its Management. *Semin Dial.* 2015; 28 (5): 533–543. doi: 10.1111/sdi.12366.
 54. Trerotola SO, Kothari S, Sammarco TE, Chittams JL. Central venous stenosis is more often symptomatic in hemodialysis patients with grafts compared with fistulas. *J Vasc Interv Radiol.* 2015; 26 (2): 240–246. doi: 10.1016/j.jvir.2014.10.048.
 55. Kotoda A, Akimoto T, Sugase T, Yamamoto H, Kusano E. Is there a link between the structural impact of thoracic outlet and the development of central venous stenosis? *Med Hypotheses.* 2013; 80 (1): 29–31. doi: 10.1016/j.mehy.2012.09.023.
 56. Bozof R, Kats M, Barker J, Allon M. Time to symptomatic vascular stenosis at different locations in patients with arteriovenous grafts. *Semin Dial.* 2008; 21: 285e8. doi: 10.1111/j.1525-139X.2008.00436.x.
 57. Ruesch S, Walder B, Tramèr MR. Complications of central venous catheters: internal jugular versus subclavian access – a systematic review. *Crit Care Med.* 2002; 30 (2): 454–460.
 58. Gibson F, Bodenham A. Misplaced central venous catheters: applied anatomy and practical management. *Br J Anaesth.* 2013; 110 (3): 333–346. doi: 10.1093/bja/aes497.
 59. Kidney.org [Internet]. KDOQI. Clinical practice guidelines for vascular access. 2006; Available at: https://www.kidney.org/sites/default/files/docs/12-50-0210_jag_dcp_guidelines-pd_oct06_sectionb_ofc.pdf.
 60. Benaragama KS, Barwell J, Lord C, John BJ, Babber A, Sandoval S et al. Post-operative arterio-venous fistula blood flow influences primary and secondary patency following access surgery. *J Ren Care.* 2018. doi: 10.1111/jorc.12238.
 61. Polkinghorne KR, Kerr PG. Epidemiology and blood flow surveillance of the native arteriovenous fistula: a review of the recent literature. *Hemodial Int.* 2003; 7 (3): 209–215. doi: 10.1046/j.1492-7535.2003.00039.x.
 62. Aragoncillo I, Abad S, Caldés S, Amézquita Y, Vega A, Cirugeda A et al. Adding access blood flow surveillance reduces thrombosis and improves arteriovenous fistula patency: a randomized controlled trial. *J Vasc Access.* 2017; 18 (4): 352–358. doi: 10.5301/jva.5000700.
 63. Miquelin DG, Reis LF, da Silva AA, de Godoy JM. Percutaneous transluminal angioplasty in the treatment of stenosis of arteriovenous fistulae for hemodialysis. *Int Arch Med.* 2008; 1 (1): 16. doi: 10.1186/1755-7682-1-16.
 64. Haskal ZJ, Saad TF, Hoggard JG, Cooper RI, Lipkowitz GS, Gerges A et al. Prospective, Randomized, Concurrently-Controlled Study of a Stent Graft versus Balloon Angioplasty for Treatment of Arteriovenous Access Graft Stenosis: 2-Year Results of the RENOVA Study. *J Vasc Interv Radiol.* 2016; 27 (8): 1105–1114.e3. doi: 10.1016/j.jvir.2016.05.019.
 65. Abreo K, Sequeira A. Role of stents in hemodialysis vascular access. *J Vasc Access.* 2018; 19 (4): 341–345. doi: 10.1177/1129729818761280.
 66. Agarwal SK, Nadkarni GN, Yacoub R, Patel AA, Jenkins JS, Collins TJ et al. Comparison of Cutting Balloon Angioplasty and Percutaneous Balloon Angioplasty of Arteriovenous Fistula Stenosis: A Meta-Analysis and Systematic Review of Randomized Clinical Trials. *J Interv Cardiol.* 2015; 28 (3): 288–295. doi: 10.1111/joic.12202.
 67. Kim CY, Guevara CJ, Engstrom BI, Gage SM, O'Brien PJ, Miller MJ et al. Analysis of infection risk following covered stent exclusion of pseudoaneurysms in prosthetic arteriovenous hemodialysis access grafts. *Journal of vascular and interventional radiology: JVIR.* 2012; 23 (1): 69–74.
 68. Jones RG, Willis AP, Jones C. Long-term results of stent-graft placement to treat central venous stenosis and occlusion in hemodialysis patients with arteriovenous fistulas. *J. Vasc. Interv. Radiol.* 2011; 22 (9): 1240–1245.
 69. Schmidli J, Widmer MK, Basile C, de Donato G, Gaglieni M, Gibbons CP et al. Editor's Choice – Vascular Access: 2018 Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2018; 55 (6): 757–818. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.02.001.
 70. Mickley V. Central vein obstruction in vascular access. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006; 32 (4): 439–444.
 71. Khawaja AZ, Cassidy DB, Al Shakarchi J, McGrogan DG, Inston NG, Jones RG. Systematic review of drug eluting balloon angioplasty for arteriovenous haemodialysis access stenosis. *J Vasc Access.* 2016; 17 (2): 103–110. doi: 10.5301/jva.5000508.
 72. Hongsakul K, Bannangkoon K, Rookkapan S, Boonsri-rat U, Kritpracha B. Paclitaxel-Coated Balloon Angioplasty for Early Restenosis of Central Veins in Hemodialysis Patients: A Single Center Initial Experience. *Korean J Radiol.* 2018; 19 (3): 410–416. doi: 10.3348/kjr.2018.19.3.410.

Статья поступила в редакцию 29.08.2019 г.

The article was submitted to the journal on 29.08.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-72-78

ЗАВИСИМОСТЬ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОТЕЗА-КОЛЬЦА ДЛЯ АННУЛОПЛАСТИКИ МИТРАЛЬНОГО КЛАПАНА ОТ РЕЖИМОВ ТЕРМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ

К.Ю. Клышников¹, Т.В. Глушкова¹, Н.А. Щеглова², А.В. Костельцев², Е.А. Овчаренко¹

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

² ЗАО «НеоКор», Кемерово, Российская Федерация

Цель: исследование зависимости физико-механических характеристик опорных каркасов кольца для аннулопластики митрального клапана от режимов его термообработки. **Материалы и методы.** Оценивали характер изменения кривых «сила–деформация» в условиях одноосного сжатия экспериментальных образцов, обработанных при варьировании температуры, времени и давления во время задания рабочей формы. **Результаты.** Отмечено, что повышение экспозиции, температуры, а также снижение давления приводило к увеличению жесткости конструкции и прочности в диапазоне малых деформаций. При этом степень влияния температуры и времени сопоставимы по вкладу. В первом случае изменение параметра на 40% (500–700 градусов) вызывало изменение механических свойств кольца в виде прироста силы на 20%. Аналогичное изменение времени (4,5–6,5 мин) термообработки вызывало 27-процентный прирост силы, необходимой для сжатия на 15%. **Заключение.** Выявленные в работе экспериментальные зависимости позволяют определить основные рекомендованные параметры режима термообработки: диапазон температур 600–700 градусов, экспозиция от 10,5 минуты, давление воздуха в камере печи 0,1–0,5 атм.

Ключевые слова: нитинол, термообработка, митральная регургитация, аннулопластика, кольцо-протез.

DEPENDENCE OF MECHANICAL PROPERTIES OF MITRAL VALVE ANNULOPLASTY RINGS ON ANNEALING MODES

K.Yu. Klyshnikov¹, T.V. Glushkova¹, N.A. Shcheglova², A.V. Kostelcev², E.A. Ovcharenko¹

¹ Research Institute for Complex Problems of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

² NeoCor, JSC, Kemerovo, Russian Federation

Objective: to investigate dependence of the mechanical properties of mitral annuloplasty rings on heat annealing modes. **Materials and methods.** The study evaluates the nature of change in stress–strain curves under uniaxial compression of experimental samples processed at varying annealing temperature, duration and pressure. **Results.** It was noted that higher exposure, temperature, and lower pressure led to increased structural rigidity and strength for small strains. Moreover, the extent of influence of annealing temperature and duration was comparable. A 40% (500–700 °C) change in temperature altered the mechanical properties of the ring – 20% increase in strength. A similar change in heat treatment time (4.5–6.5 min) resulted in a 27% increase in the force required for a 15% compression. **Conclusion.** The experimental dependences presented in the work allow recommending main parameters for heat treatment mode: temperature range 600–700 °C, 10.5 minutes exposure time, and 0.1–0.5 atm air pressure in the furnace chamber.

Keywords: nitinol, annealing, mitral regurgitation, annuloplasty, prosthetic ring.

Для корреспонденции: Клышников Кирилл Юрьевич. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6. Тел. (923) 516-68-66. E-mail: KlyshnikovK@gmail.com

For correspondence: Klyshnikov Kirill Yurievich. Address: 6, Sosnoviy blvd, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (923) 516-68-66. E-mail: KlyshnikovK@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая ишемическая митральная регургитация (ИМР) является распространенным и значимым осложнением инфаркта миокарда, которое сопровождает его в 20–30% случаев [1, 2]. Патологический механизм ИМР включает в себя неблагоприятное ремоделирование левого желудочка, дилатацию фиброзного кольца и ограничение подвижности створок, в том числе за счет изменений геометрии и свойств хордально-папиллярного аппарата [3]. Подобные состояния требуют коррекции, как первопричины – ишемии, методами реваскуляризации миокарда, так и непосредственно морфофункциональных нарушений работы митрального клапана – протезированием или аннулопластикой [4]. Современные публикации и метаанализы крупных исследований, сравнивающие протезирование и реконструкцию митрального клапана, не могут однозначно рекомендовать тот или иной подход [5–7]. В целом большинство подобных работ содержат вывод об отсутствии значимых различий в выживаемости, частоте летальных исходов, ассоциированных с вмешательством, или частоте серьезных неблагоприятных сердечных или цереброваскулярных событий, акцентируя внимание на преимуществах лишь для отдельных групп или по отдельным показателям [6, 7]. Таким образом, выбор оптимальной хирургической тактики для коррекции тяжелой ИМР в рутинной практике зависит от ряда клинических и субъективных показателей.

Современные тренды по разработке колец для митральной аннулопластики ориентированы на обеспечение компромиссной биомеханики фиброзного кольца с минимизацией напряженно-деформированного состояния в фазе релаксации для обеспечения минимального риска несоответствия характеристик изделия и окружающих тканей. Подобный подход может максимально сохранить трехмерную архитектуру и подвижность митрального фиброзного кольца с возможностью естественных деформаций в процессе сердечного цикла и положительно сказаться на снижении риска осложнений в виде отрыва имплантируемого кольца и последующего образования фистулы [8–10]. По жесткости выделяют 3 типа колец: полужесткие (semi-rigid), жесткие (rigid) и полосы (band). Современные исследования показывают, что в ранний послеоперационный период полужесткие кольца имеют преимущества перед жесткими, однако отдаленные клинические результаты показывают нивелирование данных преимуществ [6]. Тем не менее дальнейшее совершенствование подходов и внедрение новых материалов в конструкции полужестких колец, направленных на сохранение подвижности фиброзного кольца, способно повысить их эффективность при коррекции ИМР и повлиять на

клинические результаты применения [11–13]. В связи с этим на базе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» ведутся разработки собственной конструкции кольца-протеза митрального клапана для случаев ИМР, в основе которого лежит полужесткий опорный каркас из материала со свехэластичными свойствами (нитинол).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В качестве объектов исследования использовали опорные каркасы разрабатываемого кольца, представляющего собой замкнутые трехмерные проволочные конструкции эллипсообразной формы, выполненные из никелида титана медицинского назначения (SE508LVM). Изначальный концепт опорного кольца предполагает полужесткое исполнение вкупе с замкнутым контуром, что, с одной стороны, обеспечит его подвижность в цикле «систола–диастола», с другой – позволит надежно поддерживать форму фиброзного кольца. Все экспериментальные каркасы кольца были выполнены в типоразмере 30 мм, определяемым как продольная длина. Конечную форму опорным каркасам придавали путем термообработки в металлической матрице-оправке, фиксирующей трехмерную геометрию изделия. Непосредственно термообработку проводили в трубчатой муфельной печи TVF1200X43 (ООО «Актан вакуум», Россия) с возможностью создания пониженного давления в режимах, представленных в таблице.

Таблица

Характеристика режимов придания конечной формы – термообработки исследуемых образцов опорных каркасов колец

Characteristics of the annealing modes of the studied annuloplasty rings

№ п/п	t, °C	T, мин	P, атм.	D, мм
1	700	6,5	0,1	0,48
2	600	6,5	0,1	0,48
3	500	6,5	0,1	0,48
4	700	12,5	0,1	0,48
5	700	10,5	0,1	0,48
6	700	8,5	0,1	0,48
7	700	6,5	0,1	0,48
8	700	4,5	0,1	0,48
9	700	6,5	1,0	0,48
10	700	6,5	0,5	0,48
11	700	6,5	0,1	0,48
12	700	6,5	0,1	1,00
13	700	6,5	0,1	0,48

В целом, подбор характеристик режимов придания конечной формы опорного кольца включал варьирование температурных (500–700 градусов) и временных (4,5–12,5 мин) показателей термообработки, а также давления (0,1–1,0 атм.). Кроме того, для установления базовых зависимостей прочностных и упруго-деформативных свойств от диаметра проволоки опорные каркасы изготавливали из проволоки 0,48 и 1,00 мм.

В качестве группы сравнения использовали коммерческие полужесткие кольца 30-типоразмера: Physio (Edwards LifeScience, США), CG Future™ (Medtronic, США), Memo 3D™ (LivaNova, Великобритания), получившие широкое распространение в хирургической практике [14–16].

Процедура испытания

Критерием выбора оптимальных механических параметров явились физико-механические свойства каркасов колец в условиях одноосного сжатия в продольном и поперечном направлениях. Оценку механических свойств осуществляли на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия) с использованием датчика номинальной силы 50 Н. Исследуемые образцы монтировали между плоскими держателями-плитами с последующим приложением нагрузки до достижения 15% деформации (рис. 1). Диапазон нагрузки был выбран эмпирически как область упругой деформации. Нагружение и разгрузку осуществляли со скоростью 50 мм/мин. В процессе получали данные по соотношению «сила–перемещение», по которым анализировали ключевые механические характеристики каркасов – жесткость.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка физико-механических свойств

Основные зависимости механических характеристик исследуемых образцов от давления, температуры и времени термообработки представлены на рис. 2.

По результатам, полученным в настоящем исследовании, отмечено, что повышение экспозиции, температуры, а также снижение давления приводило к увеличению жесткости конструкции и прочности в диапазоне малых деформаций. Аналогичные тенденции были показаны и для поперечного направления, однако выраженные в меньшей степени, т. к. прилагаемая деформация была ниже – 3,2 мм против 4,9 мм для продольного.

Зависимость механических свойств образцов от диаметра проволоки при сравнении 0,48 и 1,00 для одинаковых режимов продемонстрировала ожидаемую повышенную жесткость для второго варианта, однако прирост силы сжатия оказался непропорционален приросту толщины проволоки. Так, при увеличении диаметра в 2,08 раза сила, необходимая для сжатия, увеличилась в 9,7 раза, с 2,44 Н до 25,9 Н. Подобный прирост силы был получен и для поперечного теста – в 8,6 раза. При этом было отмечено возникновение пластической деформации 38,5%.

ОБСУЖДЕНИЕ

В целом результаты исследования продемонстрировали стойкую зависимость свойств изделия от режима термообработки. При этом степень влияния температуры и времени сопоставимы по вкладу. В первом случае изменение параметра на 40% (500–700 градусов) вызывало изменение механических свойств кольца в виде прироста силы на 20%. Аналогичное изменение времени (4,5–6,5 мин) термообработки вызывало 27-процентный прирост силы, необходимой для сжатия на 15%.

Однако видно, что вариативность внутри каждого из параметров неоднородна. Увеличение времени термического воздействия на 2 мин в диапазоне от 4,5 до 10,5 мин каждый раз приводило к повышению жесткости опорного кольца (рис. 2). А переход 10,5–12,5 мин – значимых изменений механических свойств не привнес ни для продольного, ни для по-

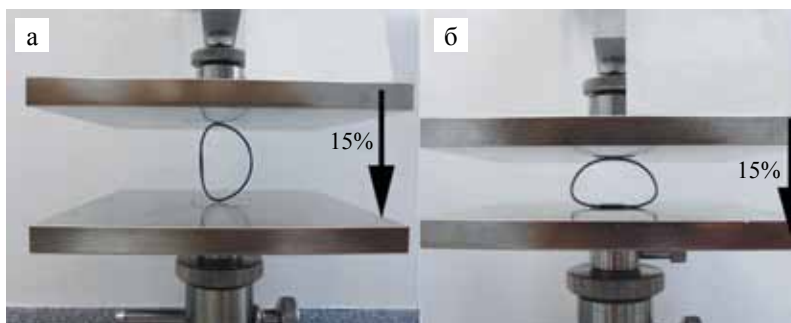


Рис. 1. Принцип физико-механического испытания опорных каркасов разрабатываемого кольца: а – каркас опорного кольца для аннулопластики митрального клапана, вмонтированный между плитами универсальной испытательной машины; б – аналогичное кольцо, испытание которого проводят в поперечном направлении (исходное состояние)

Fig. 1. Mechanical testing of the annuloplasty rings: а – mitral annuloplasty ring mounted between grips of the universal testing machine; б – a similar ring tested in the transverse compression (baseline)

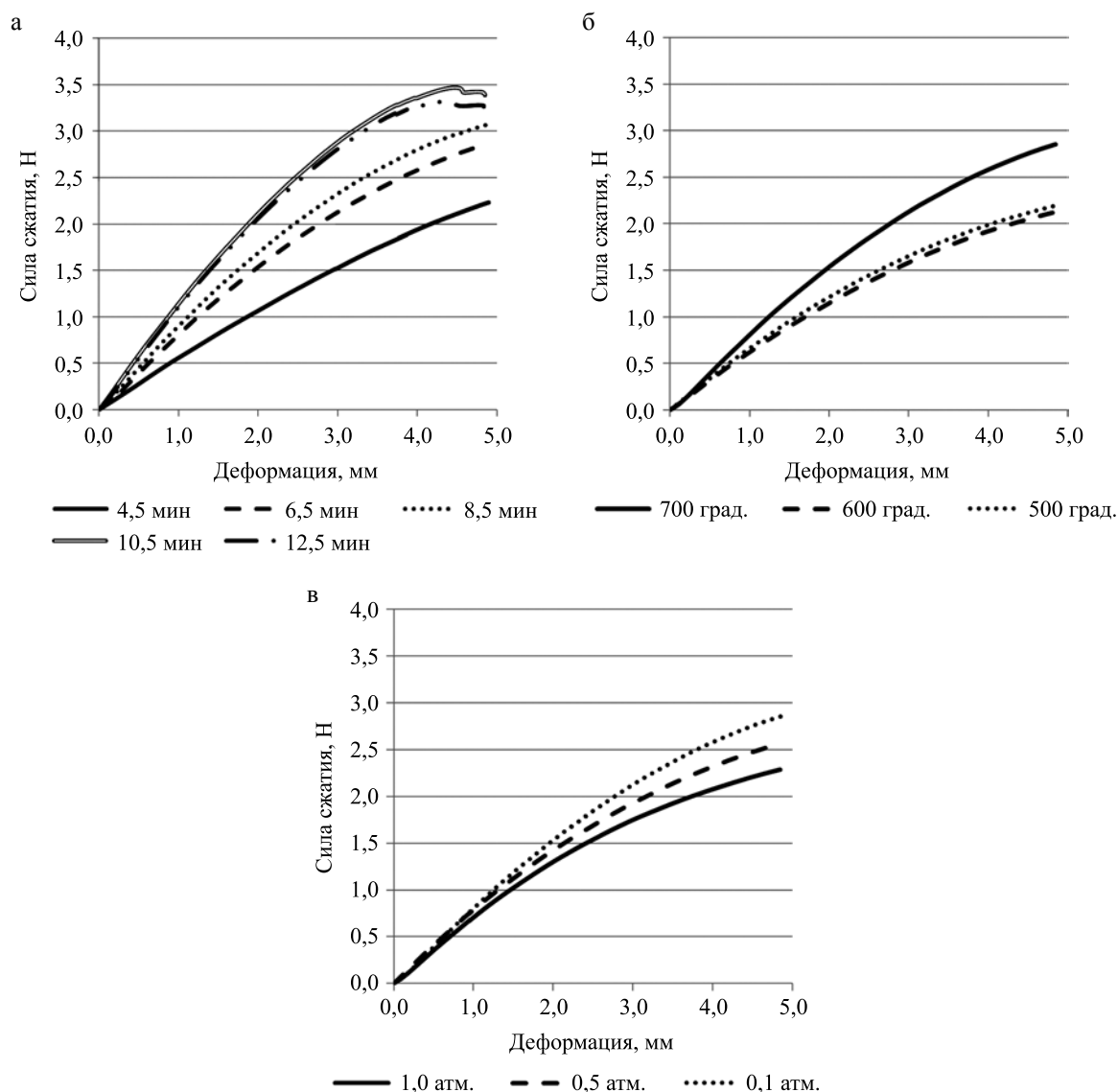


Рис. 2. Зависимости механических свойств испытанных образцов от параметров режима термообработки, представленные в виде кривых «сила–деформация» при одноосном тесте сжатия в продольном направлении на 15%: а – от времени обработки; б – от температуры обработки; в – от давления в камере печи

Fig. 2. Dependencies between the mechanical properties of the tested samples and the annealing modes, presented as the stress–strain curves under uniaxial compression in the longitudinal direction by 15%: а – processing time; б – annealing temperature; в – atm pressure in the furnace chamber

перечного направлений. По-видимому, изменение свойств материала с повышением времени термообработки определяется лишь объемом металла, который успеет нагреться до необходимой температуры. С учетом высокой теплоемкости, при малой длительности термообработки, матрица-оправка не успевала достаточно разогреться, что приводило к недостаточному прогреву и самого кольца. Непосредственно процесс термообработки заключается в задании изделию новой «родительской» (parent) формы, без изменений конфигурации кристаллической решетки [17]. Можно предположить, что при малой экспозиции незначительная часть материала исследуемого каркаса кольца не успевала закрепить необходимую «родительскую» форму, что в целом визуально не

отражалось на геометрии кольца, но сказывалось на его физико-механических свойствах. Таким образом, для данного исследования можно заключить, что минимум 10,5 мин достаточно для полного прогрева матрицы-оправки и передачи тепловой энергии самому кольцу для полного закрепления «родительской» геометрии при использовании проволоки из никелида титана диаметром 0,48 мм.

Особенности физико-механического отклика нитинола определены трансформацией фаз кристаллической решетки «аустенит–мартенсит» и обратно, обеспечивающей высокий процент обратимой деформации (до 9–10%) [18]. Определяющим фактором данной трансформации является точка перехода A_f (Austenite Finish – конечный переход в аустенит) –

температура, при которой материал демонстрирует свои основные физико-механические свойства будучи в фазе аустенита, т. е. в «рабочем» состоянии. Важной особенностью является повышение жесткости материала в зависимости от разницы A_f и текущей температуры тестирования материала [19]. Например, при $A_f = 0^\circ\text{C}$ и тестировании при комнатной температуре 22°C сплав будет демонстрировать большую жесткость, чем сплав с $A_f = 17^\circ\text{C}$. В литературе для нитинола показано, что на смещение A_f влияет прежде всего температура обработки – на рис. 3 видно, что температура термообработки (отжига) значительно смещает A_f , особенно после 600°C [20].

Аналогичный результат был получен и в настоящем исследовании при изменении температуры от 500 до 600 градусов – свойства каркасов значимо не менялись, а при повышении до 700 градусов наблюдали резкий подъем силы сжатия и жесткости. Данный эффект обусловлен особенностями точки A_f , которая может быть значительно смещена именно высокой температурой в диапазоне 600 – 700 градусов. Сам процесс термообработки возможен и при более низких температурах, начиная от 450 – 550 градусов [17, 22], однако для такого диапазона, напротив, показано повышение A_f , ведущее к снижению жесткости.

Другим фактором, оказывающим влияние на параметр A_f , является молярный состав сплава, точнее

баланс «никель–титан» [17]. Изменение на 1% концентрации свободного никеля или титана ведет к сдвигу температуры перехода в аустенит на 100° [23]. При этом, на изменение состава сплава «никель–титан» опосредованное влияние оказывает давление воздуха в камере печи, определяющее содержание кислорода при термообработке, и в конечном итоге количество образованных оксидов никеля и титана. Настоящее исследование показало, что при термообработке в условиях нормального атмосферного давления воздуха была получена менее прочная конструкция в сравнении с вариантами, полученными при пониженном давлении ($0,1$ и $0,5$ МПа). Причина подобного явления в снижении процентного состава свободного никеля и титана за счет образования оксидов NiO , Ni_2O_3 и TiO_2 , т. е. в изменении эквивалентного состояния «никель–титан». В исходном сплаве количество никеля равно $50,8\%$ по массе [24], что обеспечивает особенности его физико-механического отклика – эффект сверхэластичности [25]. В процессе оксидации происходит изменение – как правило, неконтролируемое – пропорции «никель–титан», что меняет механические характеристики за счет смещения точки A_f . Таким образом, возникновение оксидов может существенно исказить прогнозируемые свойства конечного изделия – повысить или понизить его жесткость, что в условиях реального производства является негативным фактором

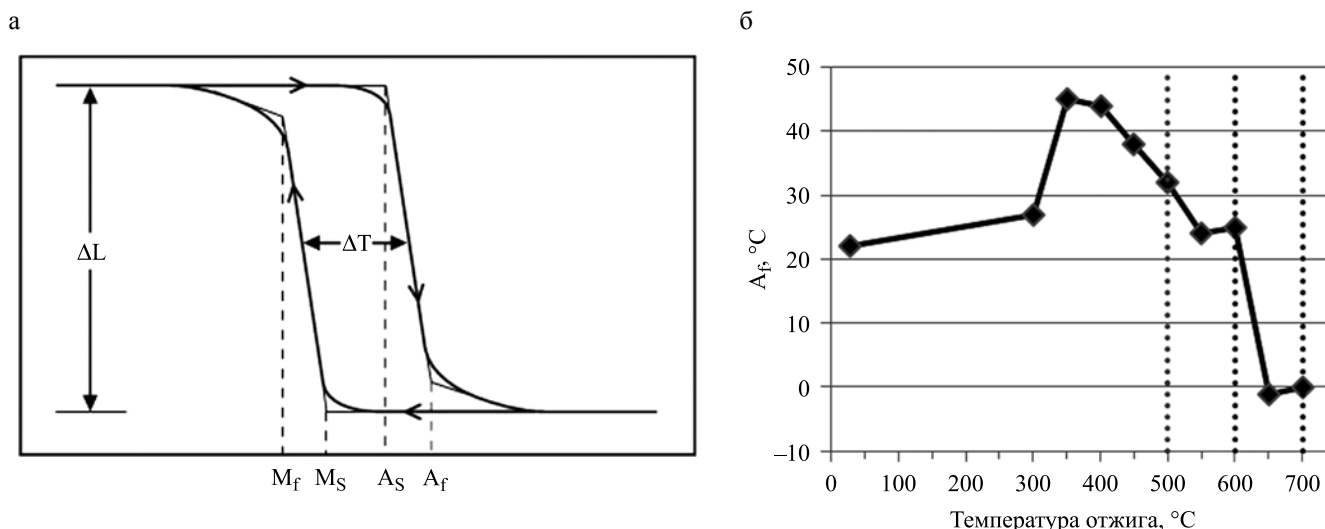


Рис. 3. Температурные особенности отклика нитинола: а – зависимость фазового состояния нитинола от температуры; б – смещение A_f под действием температуры термообработки нитинола молярного состава Ti-50,85% [21]; A_s – начальная температура трансформации мартенсит–аустенит при нагреве; A_f – конечная температура трансформации мартенсит–аустенит при нагреве; M_s – начальная температура трансформации аустенит–мартенсит при охлаждении; M_f – конечная температура трансформации аустенит–мартенсит при охлаждении [20]. Пунктирными линиями отмечены режимы, используемые в настоящем исследовании: 500 , 600 и 700°C

Fig. 3. Nitinol response to temperature: а – is the dependence of the nitinol phase state on the temperature; б – A_f offset under the annealing temperature of Ti-50.85 mol% Ni [21]; A_s is the initial temperature of martensite to austenite transformation during heating; A_f is the final temperature of martensite–austenite transformation upon heating; M_s is the initial temperature of austenite–martensite transformation upon cooling; M_f is the final temperature of austenite–martensite transformation upon cooling [20]. The dotted lines indicate the annealing modes used in this study: 500 , 600 and 700°C

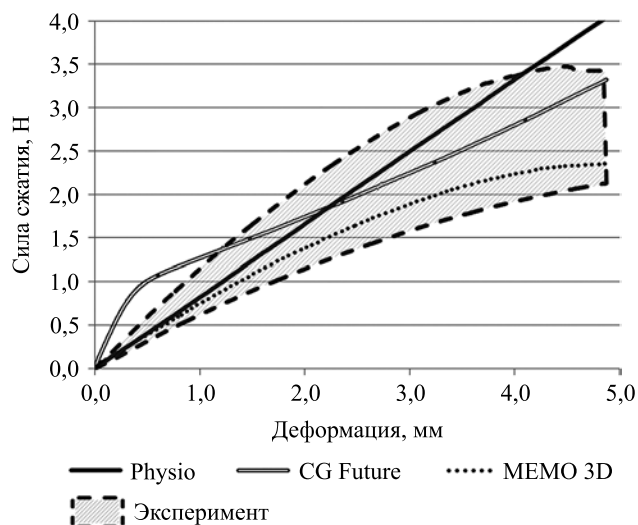


Рис. 4. Анализ вариативности физико-механических характеристик исследуемых образцов в сравнении с коммерческими кольцами-протезами 30-типоразмера: Physio (Edwards LifeScience, США), CG Future™ (Medtronic, США), Memo 3D™ (LivaNova, Великобритания)

Fig. 4. Analysis of the variability of the mechanical properties of the study samples in comparison with the 30-mm commercial annuloplasty rings: Physio (Edwards LifeScience, USA), CG Future™ (Medtronic, USA), Memo 3D™ (LivaNova, UK)

и, скорее всего, приведет к выбраковке каркасов со свойствами, измененными за счет окиссации. Важно отметить, что возникновение оксидов подтверждается визуально – изменением цвета поверхности каркасов на серый, т. е. образованием оксида титана TiO_2 [26], что и было отмечено на исследуемых каркасах с термообработкой в условиях нормального давления.

Сравнение физико-механических свойств исследуемых опорных каркасов с зарубежными коммерческими кольцами-протезами аналогичных диаметров и назначения продемонстрировало схожесть физико-механических свойств при 15% сжатии (рис. 4). Результаты клинического применения коммерческих полужестких колец (Physio, CG Future, Memo 3D) [14–16], уже хорошо зарекомендовавших себя с точки зрения хирургической практики, предположительно обусловлены их упруго-деформативными свойствами, близкими к свойствам нативных тканей, в связи с чем возможно предполагать, что и разрабатываемые кольца-протезы будут иметь схожую биомеханику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом проведенное исследование позволило определить перспективные режимы термообработки для дальнейшей трансляции в производство, в том числе с позиции соответствия коммерческим аналогичным устройствам – кольцам для аннулопластики мировых производителей. Полученные экспериментальные зависимости демонстрируют преимущест-

ва следующих параметров режима термообработки: диапазон температур 600–700 градусов, экспозиция от 10,5 мин, давление воздуха в камере печи 0,1–0,5 атм.

Исследование выполнено за счет гранта «Метод персонализированной реконструкции фиброзного кольца клапана сердца при ишемической митральной регургитации (внутренний номер МК-1891.2020.7)» Совета по грантам Президента Российской Федерации № 075-15-2020-067.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflict of interest.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Dayan V, Soca G, Cura L, Mestres CA. Similar survival after mitral valve replacement or repair for ischemic mitral regurgitation: a meta-analysis. *Ann Thorac Surg.* 2014; 97: 758–765. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.10.044.
2. Бузиашвили ЮИ, Кокшенина ИВ, Бузиашвили ВЮ, Абуков СТ. Вопросы лечебной тактики при умеренной ишемической митральной регургитации (обзор литературы). *Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия.* 2015; 8 (2): 69–76. Buziashvili YuI, Kokshe-nena IV, Buziashvili VYu, Abukov ST. Voprosy lechebnoy taktiki pri umerennoy ishemicheskoy mitral'noy regurgitatsii (obzor literatury). *Kardiologiya i serdechno-sosudistaya khirurgiya.* 2015; 8 (2): 69–76. [In Russ].
3. Lee LS, Kwon MH, Cevasco M, Schmitto JD, Mokashi SA, McGurk S et al. Postoperative recurrence of mitral regurgitation after annuloplasty for functional mitral regurgitation. *Ann Thorac Surg.* 2012; 94: 1211–1216; discussion 1216–1217. doi: 10.1016/j.athoracsur.2012.05.005.
4. Назаров ВМ, Смолянинов КА, Железнев СИ, Богачев-Прокофьев АВ, Демин ИИ, Татаринцев ПБ. Различные типы коррекции вторичной митральной недостаточности при аортальных пороках (опорное кольцо vs шовная аннулопластика), 10-летние отдаленные результаты. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2015; 136 (5): 27–31. Nazarov VM, Smolyaninov KA, Zheleznev SI, Bogachev-Prokof'yev AV, Demin II, Tatarintsev PB. Razlichnyye tipy korrektsii vtorichnoy mitral'noy nedostatochnosti pri aortal'nykh porokakh (opornoye kol'tso vs shovnaya annuloplastika), 10-letniye otdalennyye rezul'taty. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk).* 2015; 136 (5): 27–31 [In Russ].
5. Acker MA, Parides MK, Perrault LP et al. Mitral-valve repair versus replacement for severe ischemic mitral regurgitation. *N Engl J Med.* 2013; 370 (1): 23–32. doi: 10.1056/NEJMoa1312808.
6. Li B, Chen S, Sun H, Xu J, Song Y, Wang W et al. Mitral valve annuloplasty versus replacement for severe ischemic mitral regurgitation. *Scientific reports.* 2018; 8 (1): 1537. PubMed PMID: 29367688, doi: 10.1038/s41598-018-19909-7.

7. Shang X, Lu R, Liu M, Xiao S, Dong N. Mitral valve repair versus replacement in elderly patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of thoracic disease*. 2017; 9 (9): 3045–3051. PubMed PMID: 29221278, doi: 10.21037/jtd.2017.08.43.
8. Skov SN, Røpcke DM, Tjørnild MJ, Ilkjær C, Rasmussen J, Nygaard H et al. Remodeling Mitral Annuloplasty Ring Concept with Preserved Dynamics of Annular Height. *J Heart Valve Dis*. 2017; 26 (3): 295–303. PubMed PMID: 29092114.
9. Andreas M, Doll N, Livesey S, Castella M, Kocher A, Casselman F et al. Safety and feasibility of a novel adjustable mitral annuloplasty ring: a multicentre European experience. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2016; 49 (1): 249–254. PubMed PMID: 25694471, doi: 10.1093/ejcts/ezv015.
10. Chan JL, Li M, Mazilu D, Miller JG, Diaconescu AC, Horvath KA. Novel Direct Annuloplasty Fastener System for Minimally Invasive Mitral Valve Repair. *Cardiovascular engineering and technology*. 2018; 9 (1): 53–59. PubMed PMID: 29168146, doi: 10.1007/s13239-017-0337-7.
11. Choi A, Rim Y, Mun JS, Kim H. A novel finite element-based patient-specific mitral valve repair: virtual ring annuloplasty. *Bio-medical materials and engineering*. 2014; 24 (1): 341–347. doi: 10.3233/BME-130816.
12. Labrosse M, Mesana T, Baxter I, Chan V. Finite element analysis to model complex mitral valve repair. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*. 2016; 24 (1): 60–62. PubMed PMID: 24211915, doi: 10.1177/0218492314539334.
13. Бельский ВВ, Муратов РМ, Сачков АС. Современные тенденции выбора метода аннулопластики при коррекции митральной недостаточности. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2016; 58 (6): 328–335. Bel'skiy VV, Muratov RM, Sachkov AS. Sovremennyye tendentsii vybora metoda annuloplastiki pri korrektsii mitral'noy nedostatochnosti. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2016; 58 (6): 328–335 [In Russ].
14. Shahin GM, van der Heijden GJ, Bots ML, Cramer MJ, Jaarsma W, Gadellaa JC et al. The Carpentier-Edwards Classic and Physio mitral annuloplasty rings: a randomized trial. *The heart surgery forum*. 2005; 8 (5): E389–394; discussion E394–395. PubMed PMID: 16401533, doi: 10.1532/HSF98.20051114.
15. Lange R, Guenther T, Kieffer B, Noebauer C, Goetz W, Busch R et al. Mitral valve repair with the new semirigid partial Colvin-Galloway Future annuloplasty band. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008; 135 (5): 1087–1093, 1093.e1-4. PubMed PMID: 18455589, doi: 10.1016/j.jtcvs.2007.11.037.
16. Wan S, Lee AP, Attaran S, Yu PS, Au SS, Kwok MW et al. Mitral valve repair using a semirigid ring: patient selection and early outcomes. *Asian cardiovascular & thoracic annals*. 2016; 24 (7): 647–652. PubMed PMID: 27448551, doi: 10.1177/0218492316659970.
17. Hoh DJ, Hoh BL, Amar AP, Wang MY. Shape memory alloys: metallurgy, biocompatibility, and biomechanics for neurosurgical applications. *Neurosurgery*. 2009; 64 (5 Suppl 2): 199–214; discussion 214–215. PubMed PMID: 19404101, doi: 10.1227/01.NEU.0000330392.09889.99.
18. Stoeckel D, Pelton A, Duerig T. Self-expanding nitinol stents: material and design considerations. *European radiology*. 2004; 14 (2): 292–301. PubMed PMID: 12955452, doi: 10.1007/s00330-003-2022-5.
19. Chen W, Song B. Temperature dependence of a NiTi shape memory alloy's superelastic behavior at a high strain rate. *Journal of mechanics of materials and structures*. 2006; 1 (2): 339–356. doi: 10.2140/jomms.2006.1.339.
20. Yan W, Chun HW, Xin Ping Zhang, Mai Y-W. Effect of transformation volume contraction on the toughness of superelastic shape memory alloys. *Smart Material and Structure*. 2002; 11 (6): 947–955. doi: 10.1088/0964-1726/11/6/316.
21. Moorlegheem WV, Otte D. The Use of Shape Memory Alloys for Fire Protection. *Engineering Aspects of Shape Memory Alloys*. Butterworth-Heinemann Ltd., London, 1990.
22. Barras CD, Myers KA. Nitinol – its use in vascular surgery and other applications. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2000; 19 (6): 564–569. doi: 10.1053/ejvs.2000.1111.
23. Pelton AR, Russell SM, DiCello J. The physical metallurgy of nitinol for medical applications. *JOM: the journal of the Minerals, Metals & Materials Society*. 2003; 55: 33–37. doi: 10.1007/s11837-003-0243-3.
24. Chen W, Song B. Temperature dependence of a niti shape memory alloy's superelastic behavior at a high strain rate. *Journal of mechanics of materials and structures*. 2006; 1 (2): 339–356.
25. Gil FJ, Planell JA. Shape memory alloys for medical applications. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H. *Journal of Engineering in Medicine*. 1998; 212 (6): 473–488. PubMed PMID: 9852742.
26. Madamba DLL. The Effect of Surface Treatment on Nickel Leaching from Nitinol [Internet]. SJSU Scholar Works; 2013. [cited 2018 December 3] Available from: https://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/4287.

Статья поступила в редакцию 20.12.2018 г.
The article was submitted to the journal on 20.12.2018

РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕКЦИИ ПОРОКОВ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА КАРКАСНЫМ КСЕНОПЕРИКАРДИАЛЬНЫМ ПРОТЕЗОМ «БиоЛАБ» МАЛЫХ РАЗМЕРОВ У ВОЗРАСТНЫХ ПАЦИЕНТОВ

С.И. Бабенко, Р.М. Муратов, Т.А. Чабайдзе, Н.Н. Соболева, М.Н. Соркомов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Несоответствие между протезом и пациентом (PPM) возникает, когда протез клапана, имплантированный во время операции, слишком мал по отношению к размеру тела пациента, что вызывает высокие трансвальвулярные градиенты. Мы исследовали непосредственные результаты и зависимость трансвальвулярных градиентов от индекса массы тела и площади поверхности пациента после протезирования аортального клапана протезом «БиоЛАБ» с маленькими размерами. **Материал и методы.** С января 2011 года по август 2018 года в отделении неотложной хирургии приобретенных пороков сердца ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ было имплантировано 65 каркасных ксеноперикардиальных протезов «БиоЛАБ» маленьких (18, 20) размеров в позицию аортального клапана. Средний возраст пациентов $75,4 \pm 4,1$ (от 65 до 86 лет). Средний показатель индекса массы тела пациентов $25,74 \pm 5,11$ кг/м² (19,57–39,54). Средний показатель площади поверхности тела $1,79 \pm 0,15$ (1,54–2,18). **Результаты.** Изолированное протезирование аортального клапана выполнено 38 (58%) пациентам, остальные операции носили сочетанный характер. Реопераций вследствие раннего протезного эндокардита или дисфункции протеза на госпитальном этапе не было. Госпитальная смертность – 4 (6%) пациента. Корреляционная зависимость пикового градиента на протезе от площади поверхности тела и индекса массы тела составила 10 и 8% соответственно. **Выводы.** Исследование подтвердило безопасность и эффективность использования маленьких размеров ксеноперикардиальных каркасных протезов «БиоЛАБ» в позиции аортального клапана.

Ключевые слова: аортальное протезирование, биопротезирование, протез-пациент-несоответствие.

RESULTS OF CORRECTION OF AORTIC VALVE DEFECTS USING SMALL-DIAMETER «BioLAB» XENOPERICARDIAL PROSTHESIS IN OLD PATIENTS

S.I. Babenko, R.M. Muratov, T.A. Chabaidze, N.N. Soboleva, M.N. Sorkomov

A.N. Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

A prosthesis-patient mismatch (PPM) describes a state in which the valve prosthesis implanted during surgery is too small in relation to the patient's body size. This leads to high transvalvular pressure gradients. We investigate direct results and dependence of transvalvular pressure gradients on body mass index and surface area in patients after correction of aortic valve defects using small-diameter BioLAB prosthesis. **Material and methods.** From January 2011 to August 2018, 65 small-diameter (18, 20) BioLAB scaffold xenopericardial prostheses were implanted in aortic position at the Department of Emergency Surgery for Acquired Heart Defects, Bakulev National Medical Research Center of Cardiovascular Surgery. The average age of the patients was 75.4 ± 4.1 (65–86 years). The average patient body mass index was 25.74 ± 5.11 kg/m² (19.57–39.54). The average body surface area was 1.79 ± 0.15 (1.54–2.18). **Results.** Isolated aortic valve replacement was performed in 38 (58%) patients, the rest of the surgeries were combined with other techniques. There were no reoperations due to early prosthetic endocarditis or prosthetic dysfunction in hospital. Hospital mortality was 6% (4 patients). Correlation dependence

Для корреспонденции: Соркомов Максим Нюргустанович. Адрес: 121552, Москва, Рублевское шоссе, д. 135. Тел. (495) 414-78-49. E-mail: sorcommn@gmail.com

For correspondence: Sorkomov Maxim Nurgustanovich. Address: 135, Rublevskoe sh., Moscow, 121552, Russian Federation. Tel. (495) 414-78-49. E-mail: sorcommn@gmail.com

of peak pressure prosthesis gradient on body surface area and body mass index was 10% and 8%, respectively. **Conclusions.** This study confirmed the safety and effectiveness of using small-diameter BioLAB scaffold xenopericardial prostheses in aortic valve position.

Keywords: aortic valve replacement; bioprosthetic replacement; prosthesis-patient mismatch.

В результате старения населения в общей популяции в течение последних десятилетий все большее количество пожилых пациентов направляется на операцию замены аортального клапана. Для этой когорты настоятельно рекомендуются биологические протезы, поскольку они обеспечивают свободу от пожизненного приема непрямых антикоагулянтов и потенциальную долговечность, что обеспечивает лучшую выживаемость без клапанозависимых осложнений по сравнению с механическими протезами [4].

В 2004 году в ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ впервые в России был создан низкопрофильный ксеноперикардальный протез на жестком каркасе для аортальной позиции размерами 18, 20, 22 и 24 мм. Первый опыт имплантации протезов показал хорошие непосредственные результаты и отличные гемодинамические показатели в раннем послеоперационном периоде [1]. Ранние результаты продемонстрировали достоверный регресс массы миокарда левого желудочка у пациентов с критическим стенозом аортального клапана и выраженной гипертрофией левого желудочка [2].

Наше сообщение анализирует опыт использования ксеноперикардального каркасного протеза «БиоЛАБ» малых размеров у пожилых пациентов, учитывая особенности и риски госпитального периода, возникновение структурной клапанной дегенерации, неструктурных дисфункций и эндокардита после операции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С января 2011 года по август 2018 года в отделении неотложной хирургии приобретенных пороков сердца было имплантировано 65 каркасных ксеноперикардальных протезов «БиоЛАБ» малых (18, 20) размеров в позицию аортального клапана, одной пациентке протез 20-го размера был имплантирован дважды, второй раз в связи с перенесенным поздним протезным эндокардитом. Средний возраст пациентов $75,4 \pm 4,1$ года (от 65 до 86 лет). Из 64 пациентов: женщин – 53 (85%), мужчин – 10 (15%). Всем пациентам помимо общеклинических методов обследования перед операцией выполнялась коронарография. По результатам исследования решался вопрос о необходимости шунтирования коронарных артерий. Оперативная летальность определялась как смерть пациентов во время госпитализации. Послеоперационными серьезными осложнениями, ухуд-

шающими прогноз течения основного заболевания, считали медиастинит, длительную вентиляцию легких, пневмонию, реторакотомию. У всех пациентов оценивали площадь поверхности тела и индекс массы тела. Недостаточным считали вес при индексе массы тела (ИМТ) менее 20 кг/м^2 , нормальным – при ИМТ от $20,0$ до $24,9 \text{ кг/м}^2$, избыточным – при ИМТ от $25,0$ до $29,9 \text{ кг/м}^2$, ожирение – при ИМТ от $30,0$ до $34,9 \text{ кг/м}^2$ и патологическое ожирение – при ИМТ более 35 кг/м^2 .

Трансторакальная эхокардиография была выполнена всем пациентам накануне операции и в раннем послеоперационном периоде (10–30 дней после операции). Для вычисления среднего и пикового систолических градиентов на аортальном клапане использовали модифицированную формулу Бернулли. В послеоперационном периоде кроме градиентов на аортальном протезе измеряли эффективную площадь отверстия, индексированную площадь отверстия, массу миокарда левого желудочка и индексированную массу миокарда левого желудочка. Все измерения пикового и среднесистолического градиентов на аортальном протезе проводили при показателях артериального давления $110\text{--}130/70\text{--}90 \text{ мм рт. ст.}$ и частоте сердечного ритма $60\text{--}90 \text{ уд/мин.}$ Исследования проводились на аппаратах «Siemens Acuson» и «Hewlett Packard» Sonos-2500 с помощью секторальных фазово-электронных датчиков с частотами 2,5 и 3,6 МГц.

Статистическая обработка

Статистический анализ проводился с помощью стандартных процедур (t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни, критерий Хи-квадрат), для количественных показателей были рассчитаны среднее значение (M), стандартное отклонение (SD), максимальные и минимальные величины, медиана, межквартильный диапазон.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика всех прооперированных пациентов представлена в табл. 1. Средний показатель индекса массы тела пациентов составил $25,74 \pm 5,11 \text{ кг/м}^2$ ($19,57\text{--}39,54$). Соответственно используемой нами классификации 19 пациентов имели избыточный вес, у 12 было ожирение (индекс массы более 30 кг/м^2) и у 8 – патологическое ожирение с индексом массы более 35 кг/м^2 . Все операции выполнялись в условиях искусственного кровообращения и фармакохолодовой кардиopleгии. Основным доступом

была срединная стернотомия, шести пациентам (9%) была выполнена мини-стернотомия (j-образная). Показанием для доступа явилось ожирение у трех пациенток (индекс массы тела 35,43; 39,54 и 33,79), обструктивная болезнь легких со снижением ЖЕЛ до 47% и остеопороз. Возраст пациентов: 70, 78, два пациента 79 и два пациента 86 лет. Всем пациентам выполнялось изолированное протезирование аортального клапана. У трех пациентов стернотомия носила повторный характер в связи с ранее выполненными вмешательствами (протезирование аортального клапана механическим протезом, протезирование аортального клапана ксеноперикардальным каркасным протезом «БиоЛАБ», шунтирование (МИРМ) ПМЖВ). Одной пациентке ранее был имплантирован протез в аортальную позицию эндоваскулярно, репротезирование явилось следствием дегенерации протеза через четыре года (табл. 2). Было имплантировано 4 протеза 18-го размера и 61 протез 20-го размера.

Реопераций, связанных с ранним протезным эндокардитом или дисфункцией протеза, на госпитальном этапе не было. Одна пациентка была реоперирована через 15 месяцев после операции в связи с поздним протезным эндокардитом, ей вновь был имплантирован ксеноперикардальный каркасный протез «БиоЛАБ» 20-го размера. Операция выполнялась в плановом порядке, послеоперационный период протекал гладко, пациентка была выписана из отделения на 10-е сутки в удовлетворительном состоянии.

Среднее время нахождения в отделении реанимации составило $48,1 \pm 38,7$ ч (от 19 до 521 часа).

При изучении гемодинамических параметров оказалось, что у одного пациента с индексом массы тела $24,51 \text{ кг/м}^2$ пиковый градиент на протезе 20-го размера был 27 мм рт. ст., а средний – 17 мм рт. ст. Мы исследовали влияние площади поверхности тела пациентов и индекса массы тела на пиковый градиент аортального протеза в раннем послеоперационном периоде (табл. 3). Оказалось, что корреляционная зависимость очень низкая и составила 10 и 8% соответственно (рис. 1, 2).

На госпитальном этапе умерло 4 (6%) пациента. Возраст умерших 71, 75, 77 и 86 лет. Причины смерти не были связаны с типом протеза. Одна из умерших пациентов, 77 лет, в нашем исследовании имела ИМТ 19,57 и была единственной с кахексией. Она гладко перенесла операционный период, была переведена в отделение на вторые сутки, однако физическая активность восстанавливалась крайне медленно, на 9-е сутки нахождения в отделении ее самочувствие ухудшилось, была диагностирована пневмония, пациентка переведена в реанимационное отделение с дыхательной недостаточностью. В дальнейшем прогрессировала сердечная и полиорганная недостаточность. Один пациент, оперированный в возрасте

86 лет и имеющий ИМТ 21,26, также прошел гладкий послеоперационный период, был переведен в отделение, но на 7-е сутки ночью внезапно произошла остановка сердца с последующими реанимационными мероприятиями, которые осложнились полиорганной недостаточностью. Еще у одной пациентки 75 лет на

Таблица 1
Демографические показатели и факторы риска (n = 65)

Demographics and risk factors (n = 65)

Параметр	Абс. (%)
Средний возраст	$75,4 \pm 4,1$ (от 65 до 86 лет)
Старше 75 лет	39 (60)
Пол, ж/м	55 (85) / 10 (15)
Индекс массы тела (кг/м^2)	$25,74 \pm 5,11$ (19,57–39,54)
Площадь поверхности (м^2)	$1,79 \pm 0,15$ (1,54–2,18)
Артериальная гипертензия	28 (44)
Сахарный диабет	13 (30)
ОНМК в анамнезе	3 (5)
ХОБЛ	11 (17)
ФВ ЛЖ (%)	$61,96 \pm 5,9$ (40–80)
III–IV ФК NYHA	65 (100)

Таблица 2
Характер выполненного хирургического вмешательства и интраоперационные параметры (n = 65)

The parameters of the surgical intervention and the intraoperative data (n = 65)

Вид вмешательства	Абс. (%)
Протезирование аортального клапана (ПАК)	38 (58)
ПАК + пластика митрального клапана	9
ПАК + пластика трикуспидального клапана	6
ПАК (мини-стернотомия)	6 (9)
ПАК + миоэктомия	3
ПАК + АКШ	14 (22)
Репротезирование (+ после TAVI)	3
*Искусственное кровообращение (мин)	120 (41)
*Время пережатия аорты (мин)	12

Примечание. * – медиана (межквартильный интервал).

Note. * – median (interquartile interval).

Таблица 3
Гемодинамические показатели раннего послеоперационного периода (n = 61)
Baseline characteristic of the early postoperative period (n = 61)

Параметр	Среднее значение (диапазон)
КСО	$34,5 \pm 12,0$
КДО	$99,8 \pm 28,4$
ФВ ЛЖ	$61,54 \pm 8,53$
Пик. гр., мм рт. ст.	$16,6 \pm 5,7$ (6–27)
Ср. гр., мм рт. ст.	$8,6 \pm 3,4$ (2,8–17)

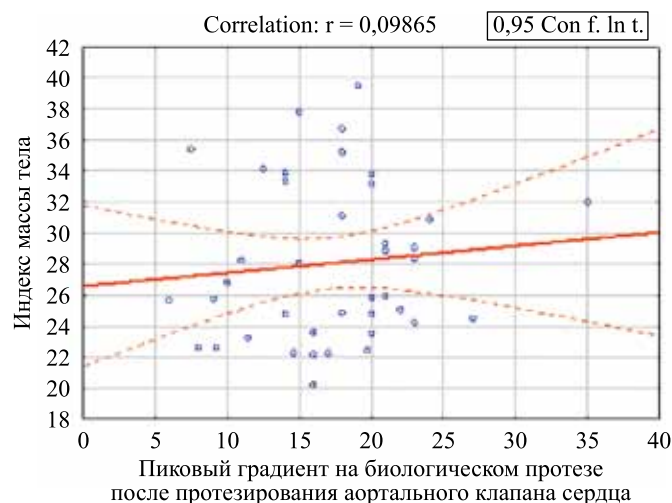


Рис. 1. Зависимость пикового градиента на аортальном протезе от индекса массы тела пациента (корреляционная зависимость 10%)

Fig. 1. Dependence of the patient's body mass index by the peak gradient prosthesis (correlation dependence 10%)

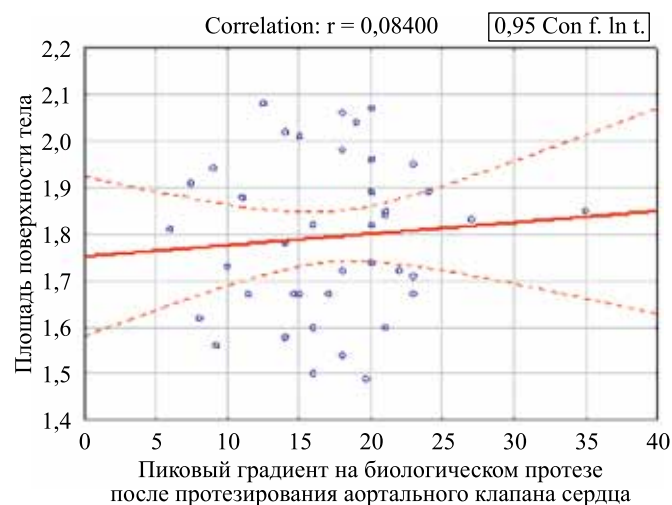


Рис. 2. Зависимость пикового градиента на аортальном протезе от площади поверхности пациента (корреляционная зависимость 8%)

Fig. 2. Dependence of the patient's surface area by the peak gradient on the prosthesis (correlation dependence 8%)

этапе зашивания грудины возникло массивное кровотечение (1,5 л) из аортотомного разреза, грудина была вновь разведена, подключено искусственное кровотечение, ушит аортотомный дефект. Однако вследствие длительного пережатия аорты и времени искусственного кровообращения в дальнейшем прогрессировала полиорганная недостаточность, и пациентка умерла. Еще одна пациентка 71 года умерла от полиорганной недостаточности, она была оперирована по поводу постлучевого поражения сердца (аортальный стеноз и ИБС), длительная и травматичная операция явилась следствием исходной тяжести, большого объема хирургического вмешательства, длительного периода пережатия аорты и искусственного кровообращения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Распространенность аортального стеноза в Европе составляет 3–8% среди людей старше 75 лет. Известно, что при отсутствии лечения у 90% пациентов с тяжелым аортальным стенозом ожидаемая продолжительность жизни не более 10 лет, а 50% пациентов умирают уже в течение 2–3 лет после появления симптомов болезни [11]. Кальцинированный аортальный стеноз, который представляет собой образование фиброкальциевых узелков на структурах клапана, имеет распространенность 0,4% в общей популяции и 1,7% в популяции людей старше 65 лет [12]. Дегенеративное заболевание стало самой распространенной причиной патологии аортального клапана в развитых странах мира. Эти изменения больше не

считаются доброкачественным следствием старения организма, кальцификация клапана – результат активного процесса, который, как и атеросклеротическое сосудистое заболевание, является следствием разрушения базальной мембраны между эндотелием и соединительной тканью створки, инфильтрацией воспалительными клетками и отложением липидов. Факторами риска по-прежнему остаются сахарный диабет, гиперхолестеринемия, гипертония и курение [13].

Протезирование аортального клапана при лечении аортального стеноза является одной из наиболее распространенных операций на клапанах сердца, выполняемых в современной кардиохирургии. Обычно механические клапаны, которые являются более тромбогенными, но и более долговечными, имплантируют пациентам моложе 65 лет, тогда как биологические клапаны используются главным образом у пожилых людей. Проблема тканевых клапанов хорошо известна: склонность к дегенерации [14]. Тем не менее более половины клапанов, использующихся в мире для замены клапана аорты, являются биопротезами, как следствие предпочтения пациентов и увеличения количества долгожителей в общей популяции, особенно после внедрения метода TAVI в 2007 году. Предикторы дегенерации ткани биопротеза включают факторы, связанные с пациентом (молодой возраст, более высокий индекс массы тела), сердечно-сосудистые и сопутствующие факторы (курение, диабет, дислипидемия, почечная недостаточность, гипертрофия левого желудочка, малый размер протеза). Анализ отдаленных результатов имплантации 12 569 ксеноперикардиальных каркасных протезов «Карпантье-Эдвардс» в аортальную позицию показал, что для пациентов моложе 60 лет риск реопераций, связанных с дегенерацией через 10, 15 и 20 лет, составил 5,6% (95% доверительный интервал [ДИ] 4,7–6,8), 20% (95% ДИ 17–23) и 45% (95% ДИ 39–52), для пациентов от 60 до 80 лет – 1,5% (95% ДИ 1,3–1,7), 5,1% (95% ДИ 4,4–5,8) и 8,1% (95% ДИ 6,7–9,7) соответственно и для пациентов старше 80 лет – 0% (за весь период наблюдения). В более ранних работах мы сообщали, что показанием для имплантации биологического протеза в аортальную позицию является возраст старше 65 лет [3]. Однако сейчас мы считаем показанием для имплантации биопротеза в аортальную позицию возраст старше 70 лет, поэтому в этом исследовании средний возраст пациентов $75,4 \pm 4,1$ года и 60% из них старше 75 лет.

Многие исследователи считают, что непосредственно малый размер протеза не связан с риском дегенерации и эксплантации биопротеза в отдаленном периоде, однако одной из проблем, которую необходимо учитывать при имплантации малого размера протеза в аортальную позицию, является вероятность несоответствия между протезом и па-

циентом (PPM), которая была впервые описана в 1978 году Rahimtoola [9]. Douglas R. Johnston et al. исследовали влияние пикового градиента на протезе в раннем послеоперационном периоде на отдаленные результаты, и в частности связь показателей с дегенерацией протеза. Оказалось, что высокие показатели пикового градиента влияли на дегенерацию биопротеза в большей степени у молодых пациентов и не были связаны с дегенерацией биоткани у пациентов старше 80 лет. Повышение пикового градиента более чем на 10 мм рт. ст. от нормальной величины в раннем послеоперационном периоде у молодых пациентов было связано с более чем двукратным увеличением риска эксплантации связанной с дегенерацией биоткани через 20 лет после операции [14]. В нашем исследовании, несмотря на использование каркасных ксеноперикардиальных протезов только маленьких размеров, в том числе у пациентов с ожирением и большой площадью поверхности тела, средний показатель пикового градиента составил $16,6 \pm 5,7$ (6–27) мм рт. ст. и средний показатель средне-систолического градиента $8,6 \pm 3,4$ (2,8–17) мм рт. ст. Мы исследовали зависимость пикового градиента от индекса массы миокарда пациента и от его площади поверхности в раннем послеоперационном периоде. Оказалось, что корреляционная зависимость очень низкая – 10 и 8% соответственно. С.И. Железнев и соавт. [4] проанализировали результаты имплантации 52 протезов «БиоЛАБ» 20-го размера пациентам пожилого и старческого возраста.

Средний показатель индекса массы тела в этой группе составил $28,1 \pm 5,5$ кг/м², несколько больше, чем в нашем исследовании ($25,74 \pm 5,11$ кг/м²), и средний показатель площади поверхности тела $1,6 \pm 0,1$. Исследование авторами транспротезных градиентов в раннем послеоперационном периоде показало: пиковый градиент 23 ± 6 мм рт. ст., средний систолический 12 ± 4 мм рт. ст., эффективная площадь $2,4 \pm 0,2$ см² и индексированная площадь отверстия $1,5 \pm 0,2$ см², что соответствует хорошим показателям. Авторы делают вывод, что техническая простота имплантации, формирование достаточно большого проходного отверстия и потоков крови, характеризующихся ламинарностью, прогнозируют стабильность результатов в раннем послеоперационном периоде.

В литературе обсуждают вопрос влияния размера протеза и индексированной площади отверстия на регресс массы миокарда левого желудочка, что в значительной степени определяет качество жизни в отдаленном периоде и вообще выживаемость. Однако Rajappan et al. в своей работе продемонстрировали, что степень нарушения резерва коронарного кровотока, измеренного с помощью позитронно-эмиссионной томографии, была связана с тяжестью стеноза клапана до операции, а не с массой левого желудочка.

Изменения же коронарного кровотока после протезирования аортального клапана не были напрямую связаны с регрессом массы миокарда левого желудочка, но в большей степени зависели от величины изменения индексированной площади отверстия клапана в результате протезирования аортального клапана [6, 7]. Garcia et al. [8] сообщили, что если индекс индексированной площади отверстия на аортальном клапане превышает $0,8\text{--}0,9\text{ см}^2/\text{м}^2$, то резерв коронарного кровотока практически не изменен, но он резко уменьшается, когда индексированная площадь отверстия ниже этого порога, и становится почти полностью исчерпанным, когда индексированная площадь отверстия меньше $0,5\text{ см}^2/\text{м}^2$.

В основном все представленные результаты протезирования аортального клапана у пожилых пациентов обязательно включают подгруппу с ишемической болезнью сердца и шунтированием коронарных артерий. Анализ подгрупп показывает, что существуют различия в результатах протезирования аортального клапана с одномоментным шунтированием коронарных артерий или без этой процедуры, однако различия эти статистически не значимы [10]. В нашем исследовании на госпитальном этапе умерла одна пациентка после коррекции сочетанной патологии, однако это была пациентка с постлучевым поражением сердца и коронарных артерий. Известно, что эта патология сопряжена с патологическим злокачественным кальцинозом основания сердца и коронарных артерий, что может приводить к более травматичному хирургическому процессу. В целом лечение сочетанной патологии не повлияло на длительность пребывания пациентов в стационаре.

Немаловажным остается вопрос влияния ИМТ на результаты хирургического лечения, как в раннем, так и в отдаленном послеоперационном периодах. В нашем исследовании средний показатель ИМТ составил 25,7, что по используемой нами классификации нужно отнести к избыточному весу. Многие исследования на пациентах с застойной сердечной недостаточностью показали значительную связь между потерей веса пациентов перед операцией и высокой смертностью [16]. Механическая потеря веса, связанная с сердечной недостаточностью, объясняется как часть метаболических нарушений, а именно: инсулинорезистентность и избыточная катехоламиновая активность вследствие высвобождения катехоламинов. В результате метаболический фенотип сердечной недостаточности характеризуется истощением тканей организма, включая мышцы, жир и кости, что приводит к значительной потере веса и в конечном итоге к развитию кахексии. Следовательно, благоприятный прогноз для пациентов с ожирением и сердечной недостаточностью говорит о том, что они имеют более высокие метаболические резервы, что позволяет им лучше переносить катехоламиновый

стресс, чем пациентам без избыточного веса [17]. Одна из умерших – пациентка 77 лет – в нашем исследовании имела ИМТ 19,57 и была единственной с кахексией. Она гладко перенесла операционный период, однако восстановление физической активности происходило крайне медленно, сохранялась дыхательная недостаточность, обусловленная мышечно-респираторной дисфункцией, на 9-е сутки ее самочувствие ухудшилось, была диагностирована пневмония, пациентка переведена в реанимационное отделение. В дальнейшем прогрессировала сердечная и полиорганная недостаточность. Трем пациентам с ожирением в нашем исследовании была выполнена J-образная мини-стернотомия, чтобы избежать развития дыхательной недостаточности и раневых осложнений в послеоперационном периоде. Известно, что мини-стернотомия при изолированном протезировании аортального клапана является безопасной процедурой, она снижает риск кровопотери, уменьшает послеоперационный койко/день, пациенты меньше страдают от боли в раннем послеоперационном периоде [18, 19]. Nobuyuki Furukawa et al. считают, что основными преимуществами мини-стернотомии нужно считать уменьшение послеоперационного болевого синдрома, улучшение дыхательной функции, а также более раннее возвращение к повседневной деятельности, что значительно важнее для пациентов пожилого возраста, чем косметический эффект процедуры [20].

Мы считаем, что наше исследование имеет важное клиническое значение, поскольку оно дополняет накопленный опыт и подтверждает безопасность и эффективность использования каркасных ксеноперикардальных биологических протезов «БиоЛАБ» маленьких размеров в аортальной позиции. Основываясь на этом анализе, можно сказать, что необязательно прибегать к методам расширения фиброзного кольца у пожилых пациентов с узким корнем аорты, т. к. стремление расширить фиброзное кольцо, чтобы имплантировать протез большего размера, удлиняет время перфузии и подвергает жизнь пациентов неоправданному риску.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Муратов РМ, Бабенко СИ, Комолов СР, Соболева НН. Первый опыт использования каркасных ксеноперикардальных низкопрофильных протезов серии «БиоЛАБ» в аортальной позиции. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2010; 4: 19–21. Muratov RM, Babenko SI, Komolov SR, Soboleva NN. The first experience of using frame xenopericardial low-profile

- prostheses of the «BioLAB» series in the aortic position. *Thoracic and cardiovascular surgery*. 2010; 4: 19–21.
2. Бабенко СИ, Муратов РМ, Соболева НН, Лазарев РА, Орлинская ВА, Мацоношвили ТР, Бокерия ЛА. Параметры гемодинамики и ремоделирование левого желудочка при использовании различных видов биологических протезов в аортальной позиции. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2009; 5: 17–21. Babenko SI, Muratov RM, Soboleva NN, Lazarev RA, Orlinskaya VA, Matsonoshvili TR, Bokeria LA. Hemodynamic parameters and left ventricular remodeling using different types of biological prostheses in the aortic position. *Thoracic and cardiovascular surgery*. 2009; 5: 17–21.
 3. Бабенко СИ, Муратов РМ, Соболева НН, Титов ДА, Бокерия ЛА. Отдаленные результаты имплантации каркасного ксеноперикардального протеза «БиоЛАБ» в аортальную позицию. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2013; 6: 41–46. Babenko SI, Muratov RM, Soboleva NN, Titov DA, Bokeria LA. Long-term results of implantation of xenopericardial prosthesis frame «BioLAB» in the aortic position. *Thoracic and cardiovascular surgery*. 2013; 6: 41–46.
 4. Железнев СИ, Исаян МВ, Астапов ДА, Тулеутаев РМ, Семенова ЕИ. Протезирование аортального клапана биологическим протезом «БиоЛАБ КА/ПТ» у больных пожилого и старческого возраста. *Сибирский медицинский журнал (Томск)*. 2012; 27 (3): 72–76. Zheleznev SI, Isayan MV, Astapov DA, Tuleutaev RM, Semenova EI. Aortic valve replacement with stented bioprosthesis «BIOLAB KA/PT» in elderly and old patients. *Siberian medical journal (Tomsk)*. 2012; 27 (3): 72–76.
 5. Piccardi A, Blossier D, LeGuyader A, Orsel I, Sekkal S, Cornu E, Laskar M. Fate of aortic bioprostheses: An 18-year experience. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. March 2016; 151 (3): 754–761. doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.10.020.
 6. Rajappan K, Rimoldi O, Camici PG, Pennell DJ, Sheridan DJ. Mechanisms of coronary microcirculatory dysfunction in patients with aortic stenosis and angiographically normal coronary arteries. *Circulation*. 2002; 105: 470–476. doi.org/10.1161/hc0402.102931.
 7. Rajappan K, Rimoldi OE, Camici PG, Bellenger NG, Pennell DJ, Sheridan DJ. Functional changes in coronary microcirculation after valve replacement in patients with aortic stenosis. *Circulation*. 2003; 107: 3170–3175. doi.org/10.1161/01.cir.0000074211.28917.31.
 8. Garcia D, Camici PG, Durand LG, Rajappan K, Gailard E, Rimoldi OE et al. Impairment of coronary flow reserve in aortic stenosis. *J Appl Physiol*. 2009; 106: 113–121. doi.org/10.1152/jappphysiol.00049.2008.
 9. Rahimtoola SH. The problem of valve prosthesis-patient mismatch. *Circulation*. 1978; 58 (1): 20–24. doi.org/10.1161/01.cir.58.1.20.
 10. Foroutan F, Guyatt GH, O'Brien K, Bain E, Stein M, Bhagra S et al. Prognosis after surgical replacement with a bioprosthetic aortic valve in patients with severe symptomatic aortic stenosis: systematic review of observational studies. *BMJ*. 2016; 354: i5065. doi.org/10.1136/bmj.i5065.
 11. Baumgartner H, Falk V, Bax JJ, de Bonis M, Hamm C, Holm PJ. Valvular heart disease Supplement to 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2017; 38 (36): 2739–2791. doi.org/10.1093/eurheartj/ehx636.
 12. Lindman BR, Clavel M-A, Mathieu P, Jung B, Lancellotti P, Otto CM et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 124 (2): 16006 10.1038/nrdp.2016.6 doi.org/10.1038/nrdp.2016.7.
 13. Goldbarg SH, Elmariah S, Miller MA, Fuster V. Insights into degenerative aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 50 (13): 1205–1213. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.06.024.
 14. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Puri R, Pibarot P, Rodés-Cabau J. Aortic bioprosthetic valve durability: incidence, mechanisms, predictors, and management of surgical and transcatheter valve degeneration. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70 (8): 1013–1028. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.715.
 15. Johnston DR, Soltesz EG, Vakil N, Rajeswaran J, Rosselli EE, Sabik JF III et al. Long-Term Durability of Bioprosthetic Aortic Valves: Implications From 12,569 Implants. *Ann Thorac Surg*. 2015; 99 (4): 1239–1247. https://doi.org/10.1016/j.resinv.2017.04.002.
 16. Rossignol P et al. Loss in body weight is an independent prognostic factor for mortality in chronic heart failure: insights from the GISSI-HF and Val-HeFT trials. *Eur J Heart Fail*. 2015; 17 (4): 424–433. https://doi.org/10.1002/ejhf.240.
 17. Mancio J, Fonseca P, Figueiredo B, Ferreira W, Carvalho M, Ferreira N et al. Association of body mass index and visceral fat with aortic valve calcification and mortality after transcatheter aortic valve replacement: the obesity paradox in severe aortic stenosis. *Diabetol Metab Syndr*. 2017; 9: 86. https://doi.org/10.1186/s13098-017-0285-2.
 18. Filip G, Bryndza MA, Konstanty-Kalandyck J, Piatek J, Węgrzyn P, Ceranowicz P et al. Ministernotomy or sternotomy in isolated aortic valve replacement? Early results. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2018; 15 (4): 213–218. https://doi.org/10.5114/kitp.2018.80916.
 19. Santana O, Reyna J, Grana R, Buendia M, Lamas GA, Lamelas J. Outcomes of minimally invasive valve surgery versus standard sternotomy in obese patients undergoing isolated valve surgery. *Ann Thorac Surg*. 2011; 91: 406–410. https://doi.org/10.1016/j.athorac-sur.2010.09.039.
 20. Furukawa N, Kuss O, Aboud A, Schönbrodt M, Renner A, Meibodi KH et al. Ministernotomy versus conventional sternotomy for aortic valve replacement: matched propensity score analysis of 808 patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2014; 46, (2): 221–227. https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt616.

Статья поступила в редакцию 29.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 29.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-86-96

БИОДЕГРАДИРУЕМЫЙ СОСУДИСТЫЙ ПРОТЕЗ МАЛОГО ДИАМЕТРА: ВИДЫ МОДИФИЦИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ МОЛЕКУЛАМИ И RGD-ПЕПТИДАМИ

Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараш

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Российская Федерация

На сегодняшний день остается высокой потребность в протезах малого диаметра для замещения поврежденного участка кровеносного бассейна, в частности, таковые активно применяются при аортокоронарном шунтировании. В качестве альтернативы аутотрансплантатам выступают синтетические графты на основе полимеров. Перспективным направлением тканевой инженерии является создание биоразлагаемого графта, который может послужить основой для формирования сосудистых тканей *de novo* непосредственно в организме пациента. Оптимизация полимерного состава изделий уже привела к улучшению как физико-механических, так и биосовместимых свойств изделий, но все же они далеки от требуемых. Одним из решающих факторов надежности сосудистого трансплантата малого диаметра является скорейшее образование эндотелиальной выстилки на его внутренней поверхности, что может обеспечить атромбогенный эффект и полноценный просвет будущего новообразованного сосуда. Для достижения данной цели проводят модифицирование графтов посредством включения в полимерный состав или иммобилизацию на его внутреннюю поверхность биоактивных молекул либо функционально активных пептидных последовательностей. К последним относится сайт клеточной адгезии – аргинин – глицин – аспарагиновая кислота (или RGD-пептид), которая присутствует в большинстве белков экстрацеллюлярного матрикса и имеет тропность к интегриновым рецепторам эндотелиальных клеток. Имитация функциональной активности естественного экстрацеллюлярного матрикса может способствовать спонтанной эндотелизации внутренней поверхности сосудистого протеза, что демонстрируют результаты многих исследований. При этом конфигурация RGD-пептида определяет выживаемость и дифференцировку эндотелиальных клеток, а линкер, через который пептид сшит с полимерной поверхностью, определяет биодоступность RGD-пептида для эндотелиальных клеток.

Ключевые слова: тканевая инженерия, полимерный графт, RGD-пептиды, эндотелизация, биосовместимость.

BIODEGRADABLE SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFT: TYPES OF MODIFICATION WITH BIOACTIVE MOLECULES AND RGD PEPTIDES

E.A. Senokosova, E.O. Krivkina, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

The need for small-diameter grafts for replacing the damaged area of the blood pool is still very high. These grafts are very popular for coronary artery bypass grafting. Polymeric synthetic grafts are an alternative to autografts. A promising area of tissue engineering is the creation of a biodegradable graft. It can serve as the basis for *de novo* generation of vascular tissue directly in the patient's body. Optimization of the polymer composition of products has led to improved physicochemical and biocompatible properties of the products. However, the improvements are still far from needed. One of the decisive factors in the reliability of a small-diameter vascular graft is the early formation of endothelial lining on its inner surface, which can provide atrombogenic effect and full lumen of the future newly formed vessel. To achieve this goal, grafts are modified by incorporating bioactive molecules or

Для корреспонденции: Сенокосова Евгения Андреевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (3842) 64-46-50. E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

For correspondence: Senokosova Evgeniya Andreevna. Address: 6, Sosnovy Blvd, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (3842) 64-46-50. E-mail: sergeewa.ew@yandex.ru

functionally active peptide sequences into the polymer composition or immobilizing on its inner surface. Peptide sequences include cell adhesion site – arginine-glycine-aspartic acid (RGD peptide). This sequence is present in most extracellular matrix proteins and has a tropism for integrin receptors of endothelial cells. Many studies have shown that imitation of the functional activity of the natural extracellular matrix can promote spontaneous endothelization of the inner surface of a vascular graft. Moreover, configuration of the RGD peptide determines the survival and differentiation of endothelial cells. The linker through which the peptide is crosslinked to the polymer surface determines the bioavailability of the RGD peptide for endothelial cells.

Keywords: tissue engineering, polymer graft, RGD peptides, endothelization, biocompatibility.

1. ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются основной причиной смертности и инвалидизации населения большинства стран мира [1]. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения, в 2015 году ССЗ явились причиной смерти порядка 17,7 миллиона человек [2]. При анализе этой проблемы C.D. Mathers и D. Loncar установили, что к 2030 году настоящая цифра увеличится на 30% [3]. Безусловное лидерство среди ССЗ за атеросклерозом, при развитии которого происходит образование и увеличение атероматозной бляшки в толще стенки артерий [2]. При этом нарушается проходимость сосуда, и как следствие, ухудшается кровоснабжение тканей [2, 4–8].

В современной сердечно-сосудистой хирургии при лечении поврежденного сосуда встает выбор между ангиопластикой и заменой на сосудистый имплантат (сосудистый графт). Применение в качестве имплантатов собственных артерий и вен пациента представляет собой идеальный вариант, но существует ряд ограничений использования.

Ауто-, ксено-, аллотрансплантаты

Аутоартерии (грудные, лучевые) и аутоины (большая подкожная) по многим показателям пригодны для трансплантации в коронарное русло [9]. К недостаткам данного вида трансплантатов можно отнести: анатомические особенности строения сосуда, не допускающие к использованию в качестве пластического материала; ограничение количества артерий и вен; возможную травматизацию как сосуда, так и окружающих тканей при изъятии; риск развития ишемии в месте забора материала; возрастную дегенерацию [10, 11]. Одновременно ведутся разработки в области создания алло- и ксенографтов. Ведущей проблемой аллографтов (гомографты или трансплантаты, полученные от других людей) и ксенографтов (трансплантаты, полученные от других видов животных) является чужой генетический материал. Применение таковых подразумевает тщательно выверенный протокол девитализации, асептической обработки и при необходимости криоконсервации образцов.

Иммунное отторжение, аллергические реакции, развитие инфекционного процесса и кальцификация – в некоторых случаях таких осложнений можно ожидать при использовании данного рода имплантатов [12–14].

Искусственные трансплантаты

Синтетические сосудистые протезы можно разделить на 2 разновидности: биостабильные и биоразлагаемые. Биостабильные графты изготавливаются из политетрафторэтилена, полиэтилентерефталата, полиуретанов. Подобные протезы успешно применяют в реконструктивной хирургии сосудов с диаметром более 6 мм. В случае с поврежденным сосудом меньшего диаметра, особенностью гемодинамики которого является более низкая скорость кровотока, биостабильные графты становятся непригодными вследствие стремительной гиперплазии неоинтимы и тромбоза [15–17].

Достаточно привлекательны биоразлагаемые полимерные сосудистые графты, главной особенностью которых является имитация структуры внеклеточного матрикса с дальнейшим полным замещением полимерной матрицы новообразованной сосудистой тканью реципиента. В роли материала для изготовления данных протезов могут выступить синтетические полимеры: полигликолевая кислота, полимолочная кислота, поликапролактон, полиглицеролсебакат, полигидроксиалканоаты и другие. Для изготовления тканеинженерных сосудистых графтов применяются различные методы, такие как формование погружением в раствор (solvent casting), разделение фаз (phase separation), выщелачивание солей из полимерного раствора, трехмерный принтинг и электроспиннинг (electrospinning) [18]. Последний можно считать приоритетным. Благодаря методу электроспиннинга можно добиться вытягивания полимерного раствора в волокна диаметром от 10 мкм до 50 нм с формированием разноразмерных и высокопористых каркасов [19–21]. Также при изменении режима изготовления и смены состава растворов в процессе электроспиннинга возможно изготовить каркасы, состоящие из различных по составу слоев [22].

Повышение биосовместимости синтетического материала и виды модифицирования

Некоторые полимеры полилактонового типа демонстрируют удовлетворительные механические свойства, низкую токсичность и иммуногенность, но присущая им высокая гидрофобность и низкая поверхностная энергия ограничивают смачиваемость материала, адгезию и пролиферацию клеток, необходимых для дальнейшего ремоделирования тканей [23, 24]. При использовании комбинации синтетического полимера с природным (коллаген, хитозан, фибрин, фиброин шелка, полигидроксibuтират валерат и другие) можно увеличить биосовместимость изготавливаемого матрикса [25–27]. Также биосовместимость каркаса можно повысить путем использования для его изготовления смеси различных полимеров. При использовании комбинации полимера поликапролактона (polycaprolactone, PCL) с полигидроксibuтират валератом (polyhydroxybutyrate-co-valerate, PHBV) было продемонстрировано повышение биосовместимости матрицы из смеси данных полимеров относительно образца, изготовленного только из поликапролактона [28].

На этапе тестирования биоразлагаемых искусственных протезов *in vivo* возникают серьезные проблемы: тромбообразование, кальцификация, несоответствие физико-механических свойств и комплаентности с нативным сосудом, развитие воспалительного процесса, недостаточная биосовместимость материала [29]. Стратегии по их преодолению направлены, в том числе, на разработку расширения биофункциональных свойств кондуитов.

В частности, стимуляция процесса эндотелизации внутренней поверхности графта может способствовать уменьшению риска тромбообразования. Процесс модифицирования графтов подразумевает включение в состав полимерной матрицы (инкорпорирование в толщу наноразмерных волокон полимера либо поверхностную иммобилизацию) веществ, способствующих привлечению адгезии, поддержанию жизнедеятельности клеток, необходимых для скорейшего образования эндотелиальной выстилки и формирования других сосудистых тканей *de novo*. К таким веществам можно отнести ряд факторов роста и хемоаттрактантных молекул [30, 31]. В то же время большой научный интерес вызывает поверхностное модифицирование готовых полимерных матриксов путем иммобилизации на их поверхность функционально-активных пептидов, способных селективно адгезировать эндотелиальные клетки из системного кровотока реципиента [32]. К таким пептидам относится последовательность аргинин – глицин – аспарагиновая кислота (RGD), присутствующая в составе большинства белков экстрацеллюлярного

матрикса [33]. RGD-последовательность является одним из ключевых лигандов для интегринов – рецепторов, которые ответственны за клеточную адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку и выживание [34]. Одной из важнейших задач при разработке изделий с RGD-содержащими пептидами является выбор конфигурации RGD, а также лиганда либо линкера, через который адгезивный пептид будет иммобилизован на полимерную поверхность.

В настоящее время одновременно во многих странах активно изучается возможность использования RGD-пептидов для модифицирования поверхности тканеинженерных конструкций, контактирующих с кровью и требующих скорейшей эндотелизации поверхности. Научно-исследовательские группы автономно занимаются разработками в данной области, применяя собственные протоколы, начиная от синтеза определенной конфигурации пептида до модели тестирования готового изделия *in vivo*. Поэтому, согласно имеющимся литературным данным, обоснованное научное мнение о предпочтительной конфигурации RGD-пептида и структуре лиганда/линкера отсутствует, что делает данную область малоизученной, а следовательно, достаточно привлекательной для исследования в плане создания функционально-активных изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии. Настоящий обзор освещает основные современные подходы, используемые в разработках модифицированных биодеградируемых протезов, с акцентом на описание использования поверхностного модифицирования RGD-пептидами сосудистого протеза малого диаметра.

Сосудистый эндотелий

Сосудистый эндотелий (СЭ) – это непрерывный высокодифференцированный монослой плоских клеток мезенхимального происхождения (эндотелиоцитов), выстилающих внутреннюю поверхность каждой составной части сердечно-сосудистой и лимфатической систем [35]. Можно выделить несколько особенностей, подчеркивающих первостепенную важность достижения скорейшей и качественной эндотелизации внутренней поверхности полимерного сосудистого протеза. Во-первых, эндотелиальный монослой сформирован эндотелиоцитами с различным фенотипом, соотношение которых зависит от многих факторов: величины давления в сосуде, скорости, силы напряжения сдвига, пульсирующего или постоянного потока, особенностей экстрацеллюлярного матрикса [36, 37]. Другими словами, сосудистая эндотелиальная выстилка – высокоадаптивная система, позволяющая сосудам и полостям поддерживать функционирование в различных условиях (виды и длительность раздражителей). Во-вторых, сосудистый эндотелий имеет морфологические и

функциональные вариации, подходящие под конкретное местонахождение в организме [38]. Сосудистый эндотелий продуцирует большое количество биологически активных веществ от неорганической молекулы NO до сложных органических структур (эндотелиальный натрийуретический пептид С-типа) [39, 40]. Таким образом, СЭ является не только барьерным слоем клеток между кровью (или лимфой) и субэндотелиальными сосудистыми тканями, но и активным эндокринным «органом», который участвует в функциональной саморегуляции, регенерации и ремоделировании сосудистого русла, в непосредственном метаболизме тканей и органов, трансваскулярной миграции веществ и клеток, например лейкоцитов, а также влияет на важнейший этап работы системы гемостаза – коагуляцию [41–43]. Существенный вклад СЭ в нормальную физиологию организма указывает на то, что любая его дисфункция может привести к широкому спектру патологических состояний. К наиболее социально важным и дискутируемым можно отнести ССЗ, сепсис и рак [44–46]. Поэтому скорейшее формирование эндотелиального монослоя на внутренней поверхности биodeградируемого полимерного протеза, заменяющего поврежденный участок сосудистого русла, является важной задачей при создании биосовместимых и функционально активных сосудозамещающих изделий. Скорость и качество эндотелизации будут определять состоятельность самого тканеинженерного протеза, его дальнейшее ремоделирование и физиологию тех тканей и органа / системы органов, в сосудистый бассейн которого он имплантирован.

2. ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ МОДИФИЦИРОВАНИЯ СОСУДИСТЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ПРОТЕЗОВ В ЦЕЛЯХ СКОРЕЙШЕЙ ЭНДОТЕЛИЗАЦИИ ВНУТРЕННЕЙ ПОВЕРХНОСТИ

Включение в состав тканеинженерной матрицы веществ, способных привлечь эндотелиальные клетки из системного кровотока реципиента и обеспечить оптимальные условия для жизнедеятельности, является одним из направлений создания биофункциональных биоразлагаемых сосудистых протезов. К таким веществам можно отнести биоактивные молекулы, управляющие процессами ремоделирования полимерного каркаса с приоритетом скорейшей и качественной эндотелизации внутренней поверхности. Большое внимание уделяется ростовым факторам – сигнальным полипептидам, регулирующим выживание, миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток [47]. Вследствие химической нестабильности ростовых факторов одним из распространенных методов включения их в состав полимерной матрицы

является инкорпорирование. Например, в процессе двухфазного электроспиннинга биомолекулы заключаются в состав полимерных волокон, формирующих изделие, что обеспечивает их структурную сохранность и пролонгированное высвобождение, связанное с постепенной биodeградацией полимерного волокна [48–50]. Еще одним успешным методом, позволяющим обеспечить молекулам структурную стабильность и увеличение времени жизни, является адсорбция ростовых факторов к фибронектину, фибрину, желатину, гепарину, которые, в свою очередь, иммобилизуются к поверхности матрикса. Говоря об ассимиляции и ремоделировании тканей на месте полимерного трубчатого каркаса, следует учитывать тот факт, что поддержание жизнедеятельности адгезированных клеток и будущих тканей возможно при наличии обширной и разветвленной сосудистой сети [51]. Поэтому фактор роста эндотелия сосудов (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) в качестве компонента модифицирования представляет большой интерес и является приоритетным, действуя в направлении усиления эндотелизации внутренней поверхности графтов, а также стимулируя образование и рост сосудистой сети на трансплантате и прорастание капилляров в его толщу.

Молекула VEGF способна обеспечить миграцию уже зрелых форм эндотелиальных клеток к полимерному матриксу из зон анастомозов и привлечь предшественников эндотелиальных клеток из крови [52]. Наиболее активно стимулирует ангиогенез изоформа VEGF-A 165 (преобладает количественно), связываясь с основным рецептором VEGFR2 на эндотелиальной клетке, обеспечивает наиболее значимые функциональные сигналы [53–55]. В.В. Севостьяновой с соавт. (2018) опубликованы данные, описывающие характер эндотелизации внутренней поверхности графтов из поликапролактона с инкорпорированным VEGF, которые были имплантированы в брюшную часть аорты лабораторным крысам на 1, 3, 6 месяцев. Так, PCL/VEGF-графты продемонстрировали лучшую краткосрочную (75% против 50%) и долгосрочную (100% против 75%) проходимость относительно немодифицированных аналогов. Благодаря VEGF на внутренней поверхности трансплантатов уже через месяц имплантации было идентифицировано большое количество незрелых CD31⁺ CD34⁺ эндотелиальных клеток, которые в динамике к окончанию срока имплантации в брюшную часть аорты крыс образовывали монослой с преобладанием зрелых клеток с фенотипом CD31⁺ CD34⁺. Немодифицированные PCL-графты не были столь успешны [56]. Схожие результаты получены с сополимерными PHBV/PCL-графтами, модифицированными тем же ростовым фактором [57]. В исследовании J.J.D. Henry et al. (2017) показано, что при имплантации в сонную артерию лабораторных крыс сосудистых графтов из

полимолочной кислоты (PLLA – poly-l-lactide acid) и PLLA/PCL-вариации, модифицированных в каждом случае VEGF, уже через 2 недели отмечен активный ангиогенез: на внутренней поверхности 82% образцов обнаруживались эндотелиальные клетки, тогда как у немодифицированных графтов данный процент был в 2 раза ниже [58]. Другие биоактивные факторы вносят менее выраженный вклад в процесс эндотелизации, действуя более опосредованно.

Основной фактор роста фибробластов *Basic fibroblast growth factor (bFGF)* оказывает влияние на множество физиологических и патологических процессов: клеточную выживаемость, дифференцировку, пролиферацию, ангиогенез, адгезию, а также на скелетообразование и заживление ран [59, 60]. Регуляция ангиогенеза bFGF основана на стимуляции зрелых эндотелиальных клеток к пролиферации и организации в трубчатые структуры [61, 62]. Как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* были получены успешные результаты, касающиеся адгезии и жизнеспособности ЭК. При культивировании микрососудистых эндотелиальных клеток человека (Human microvascular endothelial cells – HMECs) и эндотелиальных прогениторных клеток периферической крови собаки (CEPC) на поверхности децеллюляризованной сонной артерии свиньи, покрытой bFGF, в условиях имитации кровотока было продемонстрировано более успешное удержание ЭК на образцах, модифицированных bFGF (60%) [63]. Благодаря процедуре обертывания венозного трансплантата в желатиновом гидрогелевом листе, содержащем bFGF, улучшились их структурные и физиологические свойства, увеличилась выживаемость ЭК при имплантации лабораторным мышам относительно немодифицированных вен [64].

Многие другие ростовые факторы и хемоаттрактантные молекулы также используются в качестве агентов для модифицирования искусственных полимерных сосудистых протезов. В частности, достаточно интересен тромбоцитарный ростовой фактор *Platelet-derived growth factor (PDGF)* по причине его участия в эмбриональном и постнатальном периодах в дифференцировке, пролиферации, миграции клеток мезенхимального происхождения, в формировании и стабилизации кровеносных сосудов, в регенерации тканей [65–67]. Трансформирующий ростовой фактор (*Transforming growth factor beta, TGF-beta*), выделяясь во внеклеточную среду различными типами клеток, выполняет ряд функций, в том числе контролирует клеточную пролиферацию и дифференцировку, стимулирует ангиогенез [68].

Стромальный фактор (*Stromal cell-derived factor – 1 alpha, SDF-1α*) – хемоаттрактантная молекула, выполняющая множество важных функций в эмбриональном периоде и во взрослом организме. SDF-1α управляет миграцией разных типов клеток, привле-

кает и участвует в пролиферации эндотелиальных прогениторных клеток из костного мозга [69, 70]. По итогам имплантации в сонную артерию овец графтов, изготовленных из полиэстера с SDF-1α, было отмечено привлечение стволовых клеток, улучшение эндотелизации, снижение гиперплазии интимы и частоты тромбозов [72].

При модифицировании синтетических изделий для замещения сосудов малого диаметра могут применяться и несколько видов биологически активных молекул для запуска разносторонних эффектов, стимулирующих и поддерживающих эндотелизацию, способствующих ремоделированию тканей сосуда с образованием всех надлежащих тканевых слоев, присущих истинному сосуду. Так, послойное инкорпорирование комплекса (VEGF, bFGF и SDF-1α) в биодеградируемом сосудистом протезе из PHBV/PCL способствовало 100% проходимости и ранней полноценной эндотелизации графтов в экспериментах *in vivo* в отличие от образцов с каждым отдельно инкорпорированным фактором [72]. Доказано, что молекулы bFGF, SDF-1α поддерживали устойчивое VEGF-индуцированное образование качественной эндотелиальной выстилки на внутренней поверхности сосудистого протеза. Высокая первичная проходимость в период 12-месячной имплантации крысам обеспечила формирование сосудистых тканей на месте биодеградируемого матрикса с одновременным снижением интенсивности кальцификации и отсутствием признаков иммунного отторжения [73].

3. ПОВЕРХНОСТНОЕ МОДИФИЦИРОВАНИЕ RGD-ПЕПТИДАМИ

Разрабатывается большое количество методов модифицирования внутренней поверхности искусственных сосудозамещающих изделий с целью получения функционально активного эндотелиального монослоя. К эффективному, но довольно спорному способу можно отнести эндотелизацию графтов аутологичными клетками *in vitro*. В данном случае увеличивается время изготовления клеточнозаселенного сосудистого протеза и его стоимость [74]. Такой графт непригоден к использованию в экстренной сердечно-сосудистой хирургии. В экстренных случаях более успешным вариантом может явиться бесклеточный модифицированный биодеградируемый графт, формирующий непосредственно в организме пациента микроокружение для привлечения клеток, участвующих в процессе эндотелизации. В области тканевой инженерии активно развивается такое направление, как поверхностное модифицирование полимерных сосудистых протезов, которое подразумевает создание биомиметической поверхности, схожей с архитектурой и функционалом природного экстрацеллюлярного матрикса.

Экстрацеллюлярный матрикс и интегриновые рецепторы

Экстрацеллюлярный матрикс (ЭЦМ) состоит из сложного комплекса белков различной структуры и конфигурации, обладающей специфичностью соотношения состава основного гликопротеина – коллагена к другим гликопротеинам, протеогликанам и гиалуроновой кислоте для каждого вида тканей [75]. Основные функции ЭЦМ: формирует границы между группами клеток; выступает в роли среды для миграции клеток; благодаря факторам роста и белкам, содержащим сайты клеточной адгезии, осуществляет регуляцию поведения клеток. Сочетание данных функций также позволяет ЭЦМ поддерживать структурную иерархию в организации тканей [76]. Взаимодействие ЭЦМ и клеток обеспечивается через интегрин-опосредованную клеточную адгезию. Интегриновый рецептор представляет собой гетеродимер, состоящий из α - и β -субъединиц. Клетки человека в общей сложности имеют 18 α -субъединиц и 8 β -субъединиц в разных вариациях, представляющих 24 вида трансмембранных рецепторов. Интегрин преобразует сигналы от лиганда в клетку, также происходит и обратная передача внутриклеточных сигналов в направлении на лиганд, что, в свою очередь, регулирует сродство взаимосвязывания и силу взаимодействия [77–79]. В результате активируется множество сигнальных молекулярных каскадов, приводящих к структурным и физиологическим изменениям клетки, ответственным за поддержание направленной адгезии, пролиферации, опосредованной регуляции клеточного цикла [80]. В процессе эндотелизации внутренней поверхности волоконистого матрикса сосудозамещающего изделия принимают участие как клетки-предшественники, так и зрелые эндотелиальные клетки, циркулирующие в кровотоке и мигрирующие с концов анастомозов с нативным сосудом [81–83]. ЭК экспрессируют 13 видов интегринов, из которых в процессе адгезии с последующей эндотелизацией наиболее активно участвуют $\beta 1$ -субсемейство, $\alpha \nu \beta 3$ и $\alpha \nu \beta 5$ [84]. Акцент на сопряженных к определенным интегриновым рецепторам белковых лигандах и их сайтах клеточной адгезии закладывает основу для разработки модифицирования внутренней поверхности тканеинженерных сосудозамещающих изделий с целью оптимизации взаимодействия клеток из пористого искусственного материала и стимуляции ускоренной эндотелизации. Для $\beta 1$ -интегринов лигандом будет являться коллаген и ламинин, а сайтом связывания – пептидная последовательность Asp-Gly-Glu-Ala (DGEA), для ламинина дополнительно сайты распознавания – Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), Arg-Gly-Asp (RGD) и некоторые другие. Интегрины $\alpha \nu \beta 3$ и $\alpha \nu \beta 5$ имеют сродство к фибронектину, фактору фон Виллебранда, фибулину,

остеопонтину, витронектину с адгезивной пептидной последовательностью RGD [85–87]. RGD-пептид можно считать общим интегрин-связывающим мотивом. Представительная универсальность RGD на ЭЦМ делает его максимально пригодным фактором модифицирования поверхности биodeградируемых полимерных матриксов. В научных изысканиях исследуются пептидные последовательности, полученные как в ходе процедуры экстракции из природного материала, так и искусственно синтезированные. Последние имеют некоторые преимущества: снижен риск иммунного ответа и инфекции, связанные с недостаточной степенью очистки материала. При сравнении функциональных свойств естественных RGD-содержащих белков и их искусственных аналогов последние оказались более эффективны [88].

Благодаря искусственному синтезу можно получить разнообразные конфигурации RGD-пептидов, обладающие разным потенциалом взаимодействия с клетками. Все количество изучаемых конфигураций можно разделить на 2 группы: нециклические (линейные) и циклические формы. Показано, что именно циклические RGD-пептиды специфически связываются с $\alpha \nu \beta 3$ интегринами [89]. Лиганд может быть природного происхождения либо синтезирован (линкер). Контроль специфических взаимодействий между клеточными рецепторами и лигандами ЭЦМ является критическим аспектом в тканевой инженерии, так как обеспечивает эффективность клеточной миграции и адгезии [90]. Показано, что именно длина лиганда обеспечивает биодоступность RGD-пептидов для интегрин-опосредованного взаимодействия с клеткой и дальнейшей регуляции силы адгезии, скорости миграции [91]. Количество вариаций «полимерная композиция – линкер – RGD-пептид» достаточно велико, поэтому в настоящее время вопрос о приоритетном варианте модифицирования RGD-пептидами полимерных сосудистых протезов открыт.

Виды конфигураций RGD и сопряженные с ними лиганды/линкеры

Синтезированный пептид GRGDDSP, иммобилизованный на PCL-графт посредством водостойкого биоадгезивного белка fr-151 мидий (MAP), при имплантации в сонную артерию кроликов показал свою эффективность. Такое покрытие улучшило эндотелизацию поверхности MAP-RGD-графтов путем активного привлечения зрелых и прогениторных эндотелиальных клеток, что обеспечило месячную проходимость почти в 70% случаев [92]. Акцент данной работы был поставлен на линкере MAP: искусственно синтезированная форма из природных компонентов оказалась более биосовместима, достаточно проста в получении относительно имеющихся коммерческих образцов [93].

В исследовании M.F.A. Cutiongco et al. (2015) было проведено сравнение *in vitro* и *ex vivo* циклической формы пептида cRGD (CRRGDWLC) и нециклического пептида RGDS, сшитых с поверхностью PVA-графтов (poly(vinyl alcohol) hydrogel) с помощью линкера, изготовленного через процедуру межфазного полиэлектролитного комплексообразования (IPC): формирование волокон из хитозана и альгината. В рамках данного исследования в качестве альтернативных модифицирующих агентов выступили фибронектин и гепарин [94]. Жизнеспособность эндотелиальных клеток пупочной вены человека (Human umbilical vein endothelial cells – HUVEC) на полимерных пленках с покрытием из фибронектина, RGDS и cRGD показала положительную тенденцию к улучшению клеточной выживаемости по сравнению с немодифицированными аналогами. При этом модифицирование гепарином было признано непригодным из-за сниженной адгезии и пролиферации эндотелиальных клеток. В ходе оценки гемосовместимости образцы, модифицированные фибронектином, были также исключены по причине активации тромбоцитов. Полимерные пленки с нециклическим RGDS демонстрировали активацию тромбоцитов в меньшей степени, чем пленки с фибронектином. Образцы с циклическим cRGD активировали отдельные тромбоциты, которые были лишь частично прикреплены псевдоподиями, что указало на низкую активацию тромбоцитов и представило данную модификацию как наиболее пригодную к дальнейшему тестированию *in vivo* [95].

В одном из исследований Samantha Noel et al. (2015) рассматривались синтезированные адгезивные пептидные последовательности CGGRGD, CGGYIGSR и CGGREDDV, иммобилизованные через полиэтиленгликоль-линкер (PEG) на поверхность полиэтилентерефталатных пленок с целью повышения атромбогенных свойств искусственного материала. Эффективность модифицированных вариантов полимерных пленок оценивали по показателям адгезии и жизнедеятельности культуры клеток HUVEC. Привитый REDV-пептид не улучшил адгезию эндотелиальных клеток, в то время как RGD-пептид и YIGSR-пептид значительно увеличили метаболическую активность клеточной культуры. Авторы отметили, что коиммобилизация пептидов RGD и YIGSR еще более усилила метаболическую активность HUVEC, что указало на синергизм между двумя последовательностями [96]. W.S. Choi et al. (2016) проводили поверхностное модифицирование через PEG-линкер гепарином, адгезивными пептидами GRGDS и YIGSR полимерного каркаса, изготовленного из смеси полиуретана (polyurethane, PU) и эластомера (Pellethane). В эксперименте *in vitro* было показано, что эффект RGD-пептида, оказываемый на адгезию и пролиферацию культуры клеток HUVEC,

был несколько выше, чем у YIGSR-пептида и образца с коиммобилизацией обоих пептидов. Имплантацию немодифицированных и модифицированных гепарином и двумя адгезивными пептидами графтов проводили кроликам на срок до 2 месяцев. По итогам эксперимента проходимость модифицированных образцов составила 71,4% против 46,2% у немодифицированных аналогов [97].

В одной из работ исследовательской группы под руководством Л.В. Антоновой (2015 г.), касающейся модифицирования биоразлагаемых графтов адгезивными пептидами, была рассмотрена конфигурация GRGDG [98]. PHBV/PCL-графты с инкорпорированным VEGF также подвержены поверхностному модифицированию. По итогам краткосрочной и долгосрочной имплантации графтов с RGD или VEGF в брюшную часть аорты лабораторным крысам авторами не было отмечено каких-либо существенных отличий в эволюции клеточности при формировании эндотелиального монослоя, который был более функционально зрел по сравнению с немодифицированными графтами. Оба вида модифицирования оказались достаточно эффективными [99]. В дальнейшем уже в 2019 году данная исследовательская группа представила результаты исследований *in vitro*, *in vivo*, в которых сравнивались результаты модифицирования различными конфигурациями RGD-пептидов и линкеров, иммобилизованными на поверхность PHBV/PCL-графтов. Рассматриваемые адгезивные пептидные последовательности: нециклические RGDK и AhRGD, циклический пептид c[RGDFK]. Сшивка пептидов с полимерным материалом производилась через линкеры разной длины и химического состава: короткий 1,6-hexamethylenediamine и длинный 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine. Как и в исследовании M.F.A. Cutiongco et al. (2015), наиболее оптимальной конфигурацией явилась именно циклическая форма c[RGDFK], но существенное влияние на биодоступность молекулы как *in vitro*, так и *in vivo* оказала длина линкерной группы. Адгезия колониеформирующих эндотелиальных клеток человека на образцах графтов, модифицированных c[RGDFK] через линкер 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine, в несколько раз превысила таковую в сравнении с другими RGD-модифицированными образцами. Также удалось добиться более качественного эндотелиального монослоя на внутренней поверхности графтов, имплантированных лабораторным крысам, и 100% проходимости графтов на разных сроках имплантации (1 и 3 месяца). Одновременно гемосовместимые свойства такого материала были выше в сравнении с образцами, модифицированными тем же циклическим RGD-пептидом, но сшитым с полимерной поверхностью через короткий линкер – 1,6-hexamethylenediamine [100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Факторам роста и адгезивным пептидным последовательностям, в особенности RGD, уделяется большое внимание в разных сферах разработок, основанных на селективном связывании с клетками-мишенями. Биологически активные молекулы – VEGF, bFGF и некоторые другие, интегрированные в состав материала сосудистого протеза, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* показали свою эффективность. Применение нескольких факторов роста для модифицирования биodeградируемых сосудозамещающих изделий может привести к наиболее оптимальному новообразованию тканей истинного кровеносного сосуда на месте имплантата. Тропность к эндотелиальным клеткам делает RGD-пептиды и его конфигурации идеальными агентами для модифицирования поверхности тканеинженерных конструкций, контактирующих с кровью и требующих скорейшей эндотелизации поверхности. Скорость спонтанной эндотелизации, которую необходимо инициировать при имплантации искусственного кровеносного протеза малого диаметра, будет напрямую зависеть от биодоступности RGD-пептида, которую возможно обеспечить при помощи линкера определенной протяженности.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- World health statistics 2016. Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. *World Health Organization*. WHO Press. 2016; 64.
- Мировая статистика здравоохранения, 2017 г.: мониторинг показателей здоровья в отношении целей устойчивого развития. Женева: Всемирная организация здравоохранения; 2018. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2018.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006; 3 (11): 2011–2030.
- Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*. 2016; 248: 97–109.
- Gimbrone MA, Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118 (4): 620–636.
- Yurdagul AJr, Finney AC, Woolard MD, Orr AW. The arterial microenvironment: the where and why of atherosclerosis. *J Biochem*. 2016; 473 (10): 1281–1295.
- Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res*. 2014; 114: 1852–1866.
- Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005; 11: 1–18.
- Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW, Breuer CK. *In vivo* applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Eng. Part B: Reviews*. 2014; 20 (6) 628–640.
- Shah SA, Chark D, Williams J, Hessheimer A, Huh J, Wu YC et al. Retrospective Analysis of Local Sensorimotor Deficits After Radial Artery Harvesting for Coronary Artery Bypass Grafting. *J Surg Res*. 2007; 139 (2): 203–208.
- Tara S, Rocco KA, Hibino N, Sugiura T, Kurobe H, Breuer CK et al. Vessel bioengineering. *CIRC J*. 2014; 78 (1): 12–19.
- Gatto C, Giurgola L, D'Amato Tothova J. A suitable and efficient procedure for the removal of decontaminating antibiotics from tissue allografts. *Cell Tissue Bank*. 2013; 14 (1): 107–115.
- Palumbo VD, Bruno A, Tomasello G, Damiano G, Lo Monte AI. Bioengineered vascular scaffolds: the state of the art. *Int J Artif Organs*. 2014; 37 (7): 503–512.
- Sankaran KK, Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. Nanoarchitecture of scaffolds and endothelial cells in engineering small diameter vascular grafts. *Bio-technol J*. 2015; 10 (1): 96–108.
- Wang X, Lin P, Yao Q, Chen C. Development of small-diameter vascular grafts. *World J Surg*. 2007; 31: 682–689.
- Jaspan VN, Hines GL. The current status of tissue-engineered vascular grafts. *Cardiology in Review*. 2015; 23 (5): 236–239.
- Tresoldi C, Pellegata AF, Mantero S. Cells and stimuli in small-caliber blood vessel tissue engineering. *Regen Med*. 2015. 10 (4): 505–527.
- Ravi S, Chaikof EL. Biomaterials for vascular tissue engineering. *Regen Med*. 2010; 5: 107–120.
- Doshi J, Reneker DH. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. *J Electrostat*. 1995; 35 (2–3): 151–160.
- Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci*. 2011; 1–19.
- Rim NG, Shin CS, Shin H. Current approaches to electrospun nanofibers for tissue engineering. *Biomed Mater*. 2013; 8: 014102.
- Greenwald SE, Berry CL. Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol*. 2000; 190: 292–299.
- Бабаян А.Л. Поверхностная энергия полимеров (эластомерных композиций): сравнительный анализ значений поверхностной энергии с параметрами дефектности полимеров. *Научный журнал КубГАУ*. 2017; 131 (07). Babayan AL. Poverkhnostnaya energiya polimerov (elastomernykh kompozitsiy): sravnitel'nyy analiz znacheniy poverkhnostnoy energii s parametrami defektnosti polimerov. *Nauchnyy zhurnal KubGAU*. 2017; 131 (07).
- Shen H, Hu X, Yang F, Bei J, Wang S. Combining oxygen plasma treatment with anchorage of cationized

- gelatin for enhancing cell affinity of poly (lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 2007; 28: 4219–4230.
25. Meinhart JG, Schense JC, Schima H, Gorlitzer M, Hubbell JA, Deutsch M et al. Enhanced endothelial cell retention on shear-stressed synthetic vascular grafts pre-coated with RGD-cross-linked fibrin. *Tissue Eng*. 2005; 11 (5e6): 887–895.
 26. Fernandez P, Bareille R, Conrad V, Midy D, Bordenave L. Evaluation of an *in vitro* endothelialized vascular graft under pulsatile shear stress with a novel radiolabeling procedure. *Biomaterials*. 2001; 22 (7): 649–658.
 27. Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*. 2005; 26 (13): 1457–1466.
 28. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Сейфалиан АМ, Матвеева ВГ, Великанова ЕА, Сергеева ЕА и др. Сравнительное тестирование *in vitro* биodeградируемых сосудистых имплантатов для оценки перспективы использования в тканевой инженерии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2015; (4): 34–41. Antonova LV, Sevostyanova VV, Seifalian AM, Matveeva VG, Velikanova EA, Sergeeva EA et al. Comparative *in vitro* testing of biodegradable vascular grafts for tissue engineering applications. *Complex issues of cardiovascular diseases*. 2015; (4): 34–41. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17802/2306-1278-2015-4-34-41.
 29. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res*. 2001; 31: 81–110.
 30. Lee KW, Johnson NR, Gao J, Wang Y. Human progenitor cell recruitment via SDF-1 α coacervate-laden PGS vascular grafts. *Biomaterials*. 2013; 34 (38): 9877–9885.
 31. Gong W, Lei D, Li S, Huang P, Qi Q, Sun Y et al. Hybrid small-diameter vascular grafts: anti-expansion effect of electrospun poly ϵ -caprolactone on heparin-coated decellularized matrices. *Biomaterials*. 2015; 76: 359–370.
 32. Ren X, Feng Y, Guo J, Wang H, Li Q, Yang J et al. Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications. *Chem Soc Rev*. 2015; 44 (15): 5680–5742.
 33. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2013; 14 (7): 13447–13462.
 34. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*. 2009; (122): 159–163.
 35. Gomazkov OA. Endothelium – «Endocrine Tree». *Nature*. 2000; 5: 38–46.
 36. Kotsovolis G, Kallaras K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. *Hippokratia*. 2010; 14 (2): 88–93.
 37. Бабичев АВ. Роль эндотелия в механизмах гемостаза. *Педиатр*. 2013; 4 (1): 122–127. Babichev AV. Rol' endoteliya v mekhanizmaxh gemostaza. *Pediatr*. 2013; 4 (1): 122–127.
 38. Петрищев НН. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции. СПб.: ИИЦ ВМА, 2007: 296. Petrishchev NN. Disfunktsiya endoteliya. Patogeneticheskoe znachenie i metody korrektsii. SPb.: IITs VMA, 2007: 296.
 39. Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 2002; 7: 132–147.
 40. Bae CR, Hino J, Hosoda H, Arai Y, Son C, Makino H et al. Overexpression of C-type Natriuretic Peptide in Endothelial Cells Protects against Insulin Resistance and Inflammation during Diet-induced Obesity. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 9807.
 41. Hagensen MK, Vanhoutte PM, Bentzon JF. Arterial endothelial cells: still the craftsmen of regenerated endothelium. *Cardiovascular Res*. 2012; 95 (3): 281–289.
 42. Pi X, Xie L, Patterson C. Emerging Roles of Vascular Endothelium in Metabolic Homeostasis. *Circ Res*. 2018; 123 (4): 477–494.
 43. Mas M. A Close Look at the Endothelium: Its Role in the Regulation of Vasomotor Tone. *Eur Urol Suppl*. 2009; 8: 48–57.
 44. Gimbrone MA, Garcia-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118 (4): 620–636.
 45. Franses JW, Drosu NC, Gibson WJ, Chitalia VC, Edelman ER. Dysfunctional endothelial cells directly stimulate cancer inflammation and metastasis. *Int J Cancer*. 2013; 133 (6): 1334–144.
 46. Kotsovolis G, Kallaras K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. *Hippokratia*. 2010; 14 (2): 88–93.
 47. Briggs T, Arinze TL. Growth factor delivery from electrospun materials. *J Biomater Tissue Eng*. 2011; 1 (2): 129–138.
 48. Sevostyanova VV, Golovkin AS, Antonova LV, Glushkova TV, Barbarash OL, Barbarash LS. Modification of polycaprolactone scaffolds with vascular endothelial growth factors for potential application in development of tissue engineered vascular grafts. *Genes & Cells*. 2015; 10 (1): 84–90.
 49. Spano F, Quarta A, Martelli C, Ottobriani L, Rossi RM, Gigli G et al. Fibrous scaffolds fabricated by emulsion electrospinning: from hosting capacity to *in vivo* biocompatibility. *Nanoscale*. 2016; 8 (17): 9293–9303.
 50. Антонова ЛВ, Матвеева ВГ, Великанова ЕА, Ханова МЮ, Севостьянова ВВ, Цепкина АВ и др. Оценка *in vitro* активности ростовых факторов и хемоаттрактантных молекул, инкорпорированных в полимерные матрицы на основе полигидроксипутирата/валерата и поликапролактона. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018; 7 (2): 89–101. Antonova LV, Matveeva VG, Velikanova EA, Khanova MY, Sevostyanova VV, Tsepokina AV et al. *In vitro* activity of bioactive molecules incorporated into poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 89–101. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-89-101.
 51. Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011; 63 (4–5): 300–311.

52. Chen X, Wang J, An Q, Li D, Liu P, Zhu W et al. Electrospun poly(L-lactic acid-co-ε-caprolactone) fibers loaded with heparin and vascular endothelial growth factor to improve blood compatibility and endothelial progenitor cell proliferation. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2015; 128: 106–114.
53. Maes C. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mechanisms of Development*. 2002; 111 (1–2): 61–73.
54. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011; 146: 873–887.
55. Miettinen M, Rikala MS, Rysz J, Lasota J, Wang ZF. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) as a marker for malignant vascular tumors and mesothelioma – immunohistochemical study of 262 vascular endothelial and 1640 nonvascular tumors. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36 (4): 629–639.
56. Sevostyanova VV, Antonova LV, Velikanova EA, Krivkina EO, Glushkova TV et al. Endothelialization of Polycaprolactone Vascular Graft under the Action of Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor. *Bull Exp Biol Med*. 2018; 165 (2): 264–268.
57. Antonova LV, Sevostyanova VV, Kutikhin AG, Mironov AV, Krivkina EO, Shabaev AR et al. Vascular Endothelial Growth Factor Improves Physico-Mechanical Properties and Enhances Endothelialization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/Poly(ε-caprolactone) Small-Diameter Vascular Grafts *In vivo*. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 230.
58. Henry JJD, Yu J, Wang A, Lee R, Fang J, Li S. Engineering the mechanical and biological properties of nanofibrous vascular grafts for *in situ* vascular tissue engineering. *Biofabrication*. 2017; 9 (3): 035007.
59. Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, Cotten M, Christofori G. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2000; 60: 7163–7169.
60. Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the FGF and FGFR gene families. *Trends Genet*. 2004; 20: 563–569.
61. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H et al. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J. Tissue Eng*. 2010; 1 (1): 218142.
62. Liu F, Li G, Deng L, Kuang B, Li X. The roles of FGF 10 in vasculogenesis and angiogenesis. *Biom Res*. 2017; 3: 1329–1332.
63. Conklin BS, Wu H, Lin PH, Lumsden AB, Chen C. Basic Fibroblast Growth Factor Coating and Endothelial Cell Seeding of a Decellularized Heparin-coated Vascular Graft. *Artificial Organs*. 2004; 28 (7): 668–675.
64. Haraguchi T, Okada K, Tabata Y, Maniwa Y, Hayashi Y, Okita Y. Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor From Gelatin Hydrogel Sheet Improves Structural and Physiological Properties of Vein Graft in Rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 548–555.
65. Ghil JS, Chung HM. Evidence that platelet derived growth factor (PDGF) action is required for mesoderm patterning in early amphibian (*Xenopus laevis*) embryogenesis. *Int J Dev Biol*. 1999; 43 (4): 329–334.
66. Caplan AI, Correa DJ. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res*. 2011; 29 (12): 1795–1803.
67. Delgado JJ, Sanchez E, Baro M, Reyes R, Evora C, Delgado A. A platelet derived growth factor delivery system for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; 29 (8): 1903–1912.
68. Yuan SM, Wang YQ, Shen Y, Jing H. Transforming growth factor-β in graft vessels: histology and immunohistochemistry. *Clinics*. 2011; 66 (5): 895–901.
69. Севастьянов ВИ, Курпичников МИ. Биосовместимые материалы. М.: МИА, 2011: 544 с. Sevastianov VI, Kirpichnikov MP. Biosovmestimye materialy. M.: MIA, 2011: 544.
70. Lewellis SW, Knaut H. Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23 (3): 333–340.
71. De Visscher G. Improved endothelialization and reduced thrombosis by coating a synthetic vascular graft with fibronectin and stem cell homing factor SDF-1α. *Acta Biomaterialia*. 2012; 8 (3): 1330–1338.
72. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Кутихин АГ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ, Глушкова ТВ и др. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами BFGF, SDF-1α и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 96–109. Antonova LV, Sevost'yanova VV, Kutikhin AG, Velikanova EA, Matveeva VG, Glushkova TV i dr. Vliyanie sposoba modifitsirovaniya trubchatogo polimernogo matriksa biomolekulami BFGF, SDF-1α i VEGF na protsessy formirovaniya *in vivo* tkaneinzhe-nernogo krovenosnogo sosuda malogo diametra. *Vest-nik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2018; 20 (1): 96–109.
73. Antonova LV, Sevostyanova VV, Mironov AV, Krivkina EO, Velikanova EA, Matveeva VG et al. *In situ* vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemo-attractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 25–36.
74. McAllister TN, Maruszewski M, Garrido SA, Wystrychowski W, Dusserre N, Marini A et al. Effectiveness of haemodialysis access with an autologous tissueengineered vascular graft: a multicentre cohort study. *The Lancet*. 2009; 373 (9673): 1440–1446.
75. Kleinman HK, Philp D, Hoffman MP. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr Opin Biotechnol*. 2003; 14 (5): 526–532.
76. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000; 287: 1427–1430.
77. Shimaoka M, Springer TA. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2: 703–716.

78. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2004; 199: 174–180.
79. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69: 11–25.
80. Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophys J.* 1996; 71: 2869–2884.
81. Talacua H, Smits AI, Muylaert DE, van Rijswijk JW, Vink A, Verhaar MC et al. In situ Tissue Engineering of Functional Small-Diameter Blood Vessels by Host Circulating Cells Only. *Tissue Eng. Part. A.* 2015; 21 (19–20): 2583–2594.
82. Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007; 109 (11): 4761–4768.
83. Hsia K, Yao CL, Chen WM, Chen JH, Lee H, Lu JH. Scaffolds and cell-based tissue engineering for blood vessel therapy. *Cells Tissues Organs.* 2016; 202 (5/6): 281–295.
84. Ruegg C, Dormond O, Mariotti A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1654: 51–67.
85. Берман АЕ, Козлова НИ, Морозевич ГЕ. Интегрины как потенциальная мишень для целевой терапии рака. *Биомедицинская химия.* 2013; 59 (3): 239–248. Berman AE, Kozlova NI, Morozovich GE. Integrins as a potential target for targeted anticancer therapy. *Biochem.* 2013; 59 (3): 239–248. [In Russ, English abstract].
86. Weber LM, Hayda KN, Haskins K, Anseth KS. The effects of cell-matrix interactions on encapsulated beta-cell function within hydrogels functionalized with matrix-derived adhesive peptides. *Biomaterials.* 2007; 28 (19): 3004–3011.
87. Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK et al. A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 1989; 264 (27): 16174–16182.
88. Hsu SH, Chu WP, Lin YS, Chiang YL, Chen DC, Tsai CL. The effect of an RGD-containing fusion protein CBD-RGD in promoting cellular adhesion. *J Biotechnol.* 2004; 111 (2): 143–154.
89. Liu J, Cheng X, Tian X, Guan D, Ao J, Wu Z et al. Design and synthesis of novel dual-cyclic RGD peptides for $\alpha v \beta 3$ integrin targeting. *Bioorg Med Chem Lett.* 2019; 29 (7): 896–900.
90. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009; 324 (5935): 1673–1677.
91. Wu S, Du W, Duan Y, Zhang D, Liu Y, Wu B et al. Regulating the migration of smooth muscle cells by a vertically distributed poly (2-hydroxyethyl methacrylate) gradient on polymer brushes covalently immobilized with RGD peptides. *Acta Biomater.* 2018; 75: 75–92.
92. Kang TY, Lee JH, Kim BJ, Kang JA, Hong JM, Kim BS. In vivo endothelialization of tubular vascular grafts through in situ recruitment of endothelial and endothelial progenitor cells by RGD-fused mussel adhesive proteins. *Biofabrication.* 2015; 7 (1): 015007.
93. Hwang DS, Gim Y, Yoo HJ, Cha HJ. Practical ecombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. *Biomaterials.* 2007; 28 (24): 3560–3568.
94. Cutiongco MF, Choo RK, Shen NJ, Chua BM, Sju E, Choo AW et al. Composite Scaffold of Poly (Vinyl Alcohol) and Interfacial Polyelectrolyte Complexation Fibers for Controlled Biomolecule Delivery. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015; 3: 3.
95. Cutiongco MF, Anderson DE, Hinds MT, Yim EK. In vitro and ex vivo hemocompatibility of off-the-shelf modified poly (vinyl alcohol) vascular grafts. *Acta Biomater.* 2015; 25: 97–108.
96. Noel S, Hachem A, Merhi Y, De Crescenzo G. Development of a Polyester Coating Combining Antithrombogenic and Cell Adhesive Properties: Influence of Sequence and Surface Density of Adhesion Peptides. *Biomacromolecules.* 2015; 16 (6): 1682–1694.
97. Choi WS, Joung YK, Lee Y, Bae JW, Park HK, Park YH et al. Enhanced Patency and Endothelialization of Small-Caliber Vascular Grafts Fabricated by Coimmobilization of Heparin and Cell-Adhesive Peptides. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8 (7): 4336–4346.
98. Sedaghati T, Jell G, Seifalian A. Investigation of Schwann cell behaviour on RGD-functionalised bioabsorbable nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *New Biotechnol.* 2014; 31: 203–213.
99. Antonova LV, Seifalian AM, Kutikhin AG, Sevostyanova VV, Matveeva VG, Velikanova EA et al. Conjugation with RGD Peptides and Incorporation of Vascular Endothelial Growth Factor Are Equally Efficient for Biofunctionalization of Tissue-Engineered Vascular Grafts. *Int J Mol Sci.* 2016; 17 (11): 1920.
100. Antonova L, Silnikov V, Sevostyanova V, Yuzhalin A, Koroleva L, Velikanova E et al. Biocompatibility of Small-Diameter Vascular Grafts in Different Modes of RGD Modification. *Polymers.* 2019; 11 (1): 174.

Статья поступила в редакцию 9.07.2019 г.
The article was submitted to the journal on 9.07.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-97-106

ПЕРВЫЙ ОПЫТ УСПЕШНОГО ВЫНАШИВАНИЯ ДВУХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ БЕРЕМЕННОСТЕЙ ПОСЛЕ СИМУЛЬТАННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ С РЕНО-ПОРТАЛЬНОЙ ТРАНСПОЗИЦИЕЙ И ПОЧКИ

О.В. Ткаченко¹, О.О. Руммо², К.У. Вильчук¹, И.В. Курлович¹, А.Е. Щерба²,
О.В. Калачик², А.М. Дзядзько², С.Ю. Нагибович¹, И.В. Наумчик¹, В.В. Римашиевский¹,
О.А. Панкратова¹, М.А. Фролова²

¹ ГУ «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя», Минск, Республика Беларусь

² ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

В статье представлен первый в мировой практике клинический случай двух доношенных последовательных беременностей у пациентки после симультанной трансплантации печени с рено-портальной транспозицией и почки, завершившихся рождением здоровых детей и благоприятным течением послеродового и отдаленного периодов, освещены особенности ведения и родоразрешения, приведен обзор литературы по данной проблеме.

Ключевые слова: беременность, симультанная трансплантация печени и почки, рено-портальная транспозиция, критический стеноз воротной вены, аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь.

FIRST EXPERIENCE IN TWO SUCCESSFUL CONSECUTIVE PREGNANCIES AFTER SIMULTANEOUS LIVER-KIDNEY TRANSPLANTATION WITH RENO-PORTAL TRANSPOSITION

O.V. Tkachenko¹, O.O. Rummo², K.U. Vilchuk¹, I.V. Kurlovich¹, A.E. Shcherba²,
O.V. Kalachik², A.M. Dzyadzko², C.Y. Nagibovich¹, I.V. Naumchik¹, V.V. Rimashevski¹,
O.A. Pankratova¹, M.A. Frolova²

¹ The Mother and Child Republican Centre for Applied Research, Minsk, Republic of Belarus

² Minsk Applied Research Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus

The paper presents the world's first clinical case of two full-term successive pregnancies in a patient following simultaneous liver-kidney transplantation with reno-portal transposition. Both pregnancies ended with the birth of healthy children and favorable course of postpartum and long-term periods. The features of management and childbirth are highlighted. Literature review on this problem is presented.

Keywords: pregnancy, simultaneous liver-kidney transplantation, reno-portal transposition, severe portal vein stenosis, autosomal recessive polycystic kidney disease.

Для корреспонденции: Ткаченко Ольга Владимировна. Адрес: 220053, Минск, ул. Орловская, д. 66.
Тел.: (017) 233-29-71, +375 298 570 025. E-mail: tkachenkoolgavladimirovna@gmail.com

For correspondence: Tkachenko Olga Vladimirovna. Address: 66, Orlovskaya str., Minsk, 220053, Republic of Belarus.
Tel.: (017) 233-29-71, +375 298 570 025. E-mail: tkachenkoolgavladimirovna@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активное развитие и широкое междисциплинарное взаимодействие акушерства и гинекологии и трансплантологии способствует успешному вынашиванию беременности не только после трансплантации отдельных солидных органов, но и в случае мультивисцеральных трансплантаций со сложными сосудистыми реконструкциями, обеспечивая благоприятный исход беременности в сложных клинических ситуациях. Высокий профессиональный уровень специалистов-трансплантологов обеспечивает возможность выполнения сложных симультанных трансплантаций, когда имеющиеся сосудистые осложнения, такие как тотальный тромбоз воротной вены, без проведения высокотехнологичных сосудистых реконструкций являются абсолютными противопоказаниями к трансплантации по причине бесперспективности восстановления нормальной перфузии графта, нарушения функции и приживления пересаженного органа в посттрансплантационном периоде [1, 2]. Эти методики большинством исследователей считаются наиболее сложными, связанными с высокой заболеваемостью и риском смерти реципиента в раннем послеоперационном периоде [2–6]. Описаны единичные случаи успешно выполненных операций подобного типа с благоприятным долгосрочным прогнозом по данным ведущих мировых центров трансплантации [7]. Случаи вынашивания беременности у пациенток после таких вмешательств в литературе не описаны. Наличие комплекса пересаженных органов и сложной сосудистой реконструкции в организме беременной женщины обуславливают атипичность течения адаптивных гестационных процессов, высокий риск развития осложнений беременности и родоразрешения и определяют необходимость высококвалифицированной акушерско-гинекологической помощи и персонализированных схем медицинской профилактики, диагностики и лечения осложнений. В настоящее время в Республике Беларусь пациентка после симультанной трансплантации печени с рено-портальной транспозицией и почки успешно выносила 2 последовательные беременности. Уникальность ситуации определяется ведением обеих беременностей до срока доношенными и удовлетворительным состоянием новорожденных и родильницы в послеродовом периоде и далее. Подобная клиническая ситуация, даже с вынашиванием одной беременности, не описана ни в одном из литературных источников, представленных в международных базах данных, что определяет необходимость освещения принципов ее ведения как беременности высокого риска с благоприятным исходом, не имеющей аналогов в мире.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Согласно метаанализу, проведенному D'Amico G. et al., сотрудниками Центра трансплантации Кливлендской клиники США (Transplantation Center, Department of General Surgery, Digestive Disease and Surgery Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA), опубликованному в феврале 2019 года в Transplant International, в настоящее время во всем мире зарегистрировано только 66 трансплантаций с выполнением рено-портальной транспозиции, из них в 50 (72,7%) случаях реципиенты – мужчины, в 15 (22,7%) – женщины и в 1 (1,5%) – 14-летний ребенок. Рено-портальная транспозиция выполнялась в 42 случаях (63%) при трансплантации целого органа – печени, в 12 (18%) случаях – при трансплантации доли печени; 7,5% (5) органов были получены от живых доноров и 4,5% (3) – путем перекрестного донорства (domino grafts). Выживаемость пациента и трансплантата составили по 80%. У 71% больных развились послеоперационные осложнения: асцит – у 18 пациентов (27,2%), инфекционные осложнения – у 13 (19,6%), транзиторная почечная дисфункция – у 12 (18,1%), кровотечение из варикозно расширенных вен – у 2 (3%), истечение желчи / стеноз – у 4 (6,1%), тромбоз печеночной артерии – у 3 (4,5%), ранний ретромбоз воротной вены – у 2 (3%), хроническая почечная дисфункция – у 2 (3%) и поздний (через 12 месяцев) ретромбоз воротной вены – у 1 пациента (1,5%). Из 3 пациентов с тромбозом печеночной артерии 2 потребовалось выполнение повторной сосудистой реконструкции и 1 – ретрансплантации печени. Одному из 2 пациентов с ранним ретромбозом воротной вены потребовалась портальная ангиопластика со стентированием, что привело к удовлетворительному результату, второй пациент умер от полиорганной недостаточности. Пациенту с поздним ретромбозом воротной вены потребовалась ретрансплантация печени, и он умер в листе ожидания от полиорганной недостаточности. Смертность составила 19,6% (13 пациентов), среди причин смерти также отмечены: сепсис – 4 пациента (30,7%), кровоизлияние в мозг – 4 (30,7%), рецидив гепатоцеллюлярной карциномы – 2 (15,4%), кровотечение из варикозно расширенных вен – 1 (7,7%), внезапная остановка сердца – 1 пациент (7,7%) [1].

С момента введения в 2002 году модели оценки терминальной стадии заболеваний печени и прогноза жизни у пациентов с терминальной стадией печеночной недостаточности (Model for End-Stage Liver Disease – MELD) зарегистрировано увеличение числа симультанных трансплантаций печени и почки [3, 4, 8–13], тем не менее, выполнение рено-портальной транспозиции при симультанной трансплантации печени и почки описано только в одном источнике: сотрудники Отделения органной трансплантации Уни-

верситетской клиники Чикаго, США (Northwestern University, Feinberg School of Medicine Department of Surgery, Division of Organ Transplantation, Chicago, USA) T.B. Baker et al. в своей публикации заявляют о собственном опыте как о единственном случае выполнения рено-портальной транспозиции при симультанной трансплантации печени и почки [7].

В случае с нашей пациенткой при симультанной трансплантации печени и почки техника выполнения трансплантации печеночного графта была усложнена необходимостью имплантации донорской печени на фоне критического стеноза воротной вены и спонтанного сплено-ренального шунта больших размеров и потребовала применения высокотехнологичной методики формирования рено-портальной транспозиции.

Q. Lai et al. (2014), Отделение абдоминальной трансплантации Университетской клиники Св. Луки в Брюсселе (Starzl Unit of Abdominal Transplantation, University Hospitals Saint-Luc, Brussels, Belgium) в своей публикации в World Journal of Hepatology сообщают, что еще недавно наличие серьезных сосудистых осложнений, таких как тромбоз и критический стеноз воротной вены, являлось абсолютным противопоказанием к трансплантации, такие пациенты считались неоперабельными; в последние годы благодаря совершенствованию хирургических методов лечения появилась возможность обеспечения адекватной гемодинамики в сосудах портальной системы у пациентов с такой сосудистой мальформацией путем выполнения рено-портальной или портокавальной транспозиции [6]. Причем формирование рено-портальной транспозиции является предпочтительным методом, поскольку при успешном выполнении сопряжено с меньшим количеством осложнений [1, 14]. Однако эти методики большинством исследователей считаются наиболее сложными, связанными с высокой заболеваемостью и риском смерти реципиента в раннем послеоперационном периоде в случае неполной коррекции существующей портальной гипертензии, приводящей к скорой дисфункции печеночного графта [2–6, 15–17]. Для достижения удовлетворительных результатов пациенты должны быть направлены в специализированные центры, хирургическая стратегия должна быть тщательно спланирована до трансплантации, могут потребоваться высокотехнологичные сосудистые вмешательства, в ряде случаев – индивидуальная техника трансплантации, не имеющая аналогов в мире [5, 14, 18, 19].

В настоящее время в международных публикациях описано 6 беременностей у 5 женщин после симультанной трансплантации печени и почки и не описано ни одного случая беременности после симультанной трансплантации печени с рено-портальной транспозицией и почки. В приведенных случа-

ях из осложнений беременности указаны: задержка роста плода – у всех пациенток, преэклампсия – у двух пациенток, в четырех случаях было выполнено досрочное родоразрешение. У 4 пациенток беременность была единственная, одна пациентка выносила 2 последовательные беременности с развитием обратимой дисфункции почечного трансплантата во время обеих беременностей и выходом на стойкое нарушение функции пересаженной почки через 17 месяцев после родоразрешения. В указанных публикациях не приводятся данные о состоянии женщин в отдаленном периоде после родоразрешения, а также о состоянии здоровья и особенностях развития детей после периода новорожденности [20–23].

Беременность у женщин после трансплантации всегда ассоциирована с повышенным риском развития осложнений, вынашивание беременности после мультивисцеральной трансплантации – более сложная и редкая ситуация, наличие сложной сосудистой реконструкции при мультивисцеральной трансплантации во время беременности – ситуация неизученная, требующая персонифицированного ведения и междисциплинарного подхода. Физиологическое увеличение в динамике беременности практически в 2 раза объема циркулирующей крови и нарастающее воздействие гормональных, нейрогенных и механических факторов на сосудистую стенку обуславливают повышение гемодинамической нагрузки на сосудистый анастомоз. Вместе с тем альтернативный ток крови в сосудистой сети трансплантированного комплекса, послеоперационное повышение ригидности сосудистой стенки в местах анастомозирования, особенности желчеотделения, липидного, азотистого обмена и в целом функционирования трансплантированных органов вызывают изменение адаптационных гестационных процессов, что увеличивает риск инициации патологического процесса и развития осложнений.

На базе ГУ «РНПЦ «Мать и дитя» за период с 2008 года успешно родоразрешены 44 беременные с трансплантированными органами [24–26]. Нами был представлен опыт вынашивания первой беременности этой пациентки [27], однако, учитывая отсутствие подобных публикаций и уникальность клинической ситуации, с целью освещения лечебно-диагностического мониторинга и обмена опытом с зарубежными коллегами коллективом авторов приводится клинический случай успешного вынашивания двух последовательных доношенных беременностей у женщины после симультанной трансплантации печени с рено-портальной транспозицией и почки.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Впервые заболевание у пациентки А., 1985 года рождения, было выявлено в возрасте 10 месяцев,

когда при обследовании по поводу пневмонии были обнаружены гепатоспленомегалия и увеличение почек, сопровождавшиеся протеинурией и повышением уровня креатинина сыворотки крови. У пациентки была младшая сестра-сибс, имевшая аналогичные изменения внутренних органов, и хотя болезней печени и почек у родителей и близких родственников не было, был предположен наследственный характер заболевания, семья консультирована у генетиков. На основании соблюдения всех критериев К. Zerres: 1) типичные изменения почек, выявленные при визуализирующих методах исследования, 2) патологоанатомическое подтверждение диагноза у родного сибса, 3) отсутствие поликистоза почек при ультразвуковом обследовании родителей в возрасте старше 30 лет, 4) наличие клинически и гистологически подтвержденного фиброза печени – выставлен диагноз аутосомно-рецессивной поликистозной болезни. Поскольку данное заболевание не подлежит этиопатогенетическому лечению и при манифестации в раннем детском возрасте имеет крайне неблагоприятный прогноз, несмотря на проводимую симптоматическую терапию, прогрессивное ухудшение состояния пациентки и развитие терминальной стадии заболевания привело к необходимости симультанной трансплантации печени и почки. Заключительный диагноз на момент включения в лист ожидания: «Поликистозная болезнь с

поражением печени и почек. Вторичный хронический пиелонефрит, ремиссия. ХПН, терминальная стадия. ХБП 5Д. Цирроз печени криптогенный, класс тяжести В по Чайлд–Пью. MELD 19. Смешанная форма портальной гипертензии. Спленомегалия. Гиперспленизм. Варикозное расширение вен пищевода 2-й степени. Портальная гастропатия: хронический поверхностный гастробульбит. Асцит. Симптоматическая анемия средней степени тяжести».

В ходе дополнительного обследования пациентки по данным КТ-ангиографии был выявлен критический стеноз воротной вены и спонтанный сплено-рентальный шунт больших размеров, сформировавшийся на фоне портальной гипертензии. Данная анатомическая особенность вносит значительный вклад в гемодинамические характеристики портальной перфузии и требует выполнения сосудистой реконструкции на этапе имплантации печеночного графта. Это необходимо для предупреждения развития ранней дисфункции трансплантата, которая может возникнуть на фоне изменения объемного кровотока по воротной вене за счет стеноза и выраженного сплено-рентального сброса. Оптимальным вариантом сосудистой реконструкции в данном случае является выполнение рено-портальной транспозиции (рис. 1).

В ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (тогда – Республиканский научно-практический центр

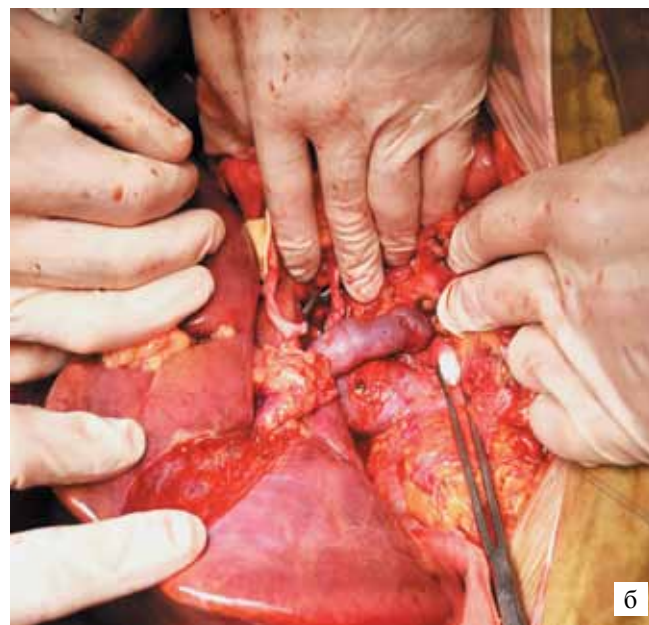
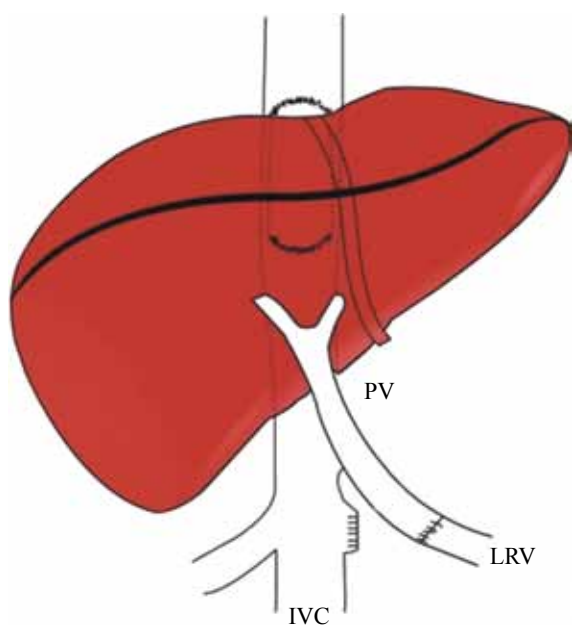


Рис. 1. Рено-портальная транспозиция: а – графическое изображение рено-портальной транспозиции; б – окончательный вид анастомоза между воротной веной трансплантата печени и левой почечной веной реципиента – пациентки А. (интраоперационное фото из архива проф. О.О. Руммо). PV – воротная вена, *vena portae*, IVC – нижняя полая вена, *vena cava inferior*, LRV – левая почечная вена, *vena renalis sinistra*

Fig. 1. Rено-portal transposition: а – graphic image of reno-portal transposition; б – the final view of anastomosis between the portal vein of the liver graft and the left renal vein of the recipient – the patient А. (intraoperative image from the experience of Prof. O. Rummo). PV – portal vein, *vena portae*, IVC – inferior cava vein, *vena cava inferior*, LRV – left renal vein, *vena renalis sinistra*

трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я городская клиническая больница») 1 апреля 2015 года пациентке выполнена сочетанная ортотопическая трансплантация печени с рено-портальной транспозицией и гетеротопическая интраабдоминальная трансплантация почки. Клинические характеристики заболевания и выполненного оперативного вмешательства представлены в табл. 1.

Хорошее приживление и функционирование трансплантатов способствовало быстрому выздоровлению и достижению высокого качества жизни пациентки, а также восстановлению фертильности и потребности в реализации репродуктивной функции. Тем не менее, учитывая генетически детерминированное заболевание пациентки, вопрос о вынашивании беременности мог решаться только после генетического консультирования. На основании аутосомно-рецессивного типа наследования заболевания и вероятности гетерозиготного носительства мутации у здорового мужа – 1:70 (популяционная) риск рождения ребенка с аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью составил 0,7%, что трактуется как низкая степень генетического риска и позволяет планировать беременность у данной пары.

Подробные характеристики обеих беременностей, а также схемы профилактики и лечения осложнений представлены в табл. 2.

В течение обеих беременностей женщине выполнялись пренатальные исследования по программе скрининга беременных: комбинированный скрининг 1-го триместра (ультразвуковое исследование плода с измерением толщины воротникового пространства и определение трех биохимических маркеров), ультразвуковое исследование плода в сроках 20 и 32 недели беременности. По результатам пренатального исследования патология плода не выявлена. По данным доплерометрического и кардиотокографического исследований, состояние плода оставалось удовлетворительным на протяжении всего периода наблюдения.

Родоразрешение в обоих случаях выполнялось оперативным путем в сроке доношенной беременности, показаниями к оперативному родоразрешению были: анатомически узкий таз, состояние после мультивисцеральной трансплантации с сосудистой реконструкцией, оперированная матка (во второй беременности). Методом анестезиологического пособия была комбинированная спинально-эпидуральная анестезия. Учитывая нежелательность повышения метаболической нагрузки при назначении гормональной контрацепции и риска инфицирования при установке

Таблица 1

**Анамнестические данные пациентки А.,
особенности оперативного вмешательства**

**Anamnestic data of the patient A.,
the peculiarities of surgical intervention**

Клинические характеристики	Персонифицированные данные	
Заболевание, приведшее к необходимости мультивисцеральной трансплантации	Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь (Autosomal recessive polycystic kidney disease – ARPKD)	
Характер заболевания	Врожденное, генетически детерминированное	
Период манифестации заболевания	Грудной возраст	
Возраст наступления терминальной стадии заболевания	28 лет	
Длительность нахождения в листе ожидания	11 месяцев	
Сосудистое осложнение, являющееся противопоказанием к выполнению трансплантации	Критический стеноз воротной вены, спонтанный сплено-ренальный шунт больших размеров	
Причина противопоказания	Развитие нарушения перфузии печеночного графта в посттрансплантационном периоде	
Высокотехнологичная сосудистая реконструкция, позволившая выполнить трансплантацию	Рено-портальная транспозиция (см. рис. 1)	
Вид выполненной трансплантации	Сочетанная ортотопическая трансплантация печени с рено-портальной транспозицией и гетеротопическая интраабдоминальная трансплантация почки	
Уровни лабораторных показателей до и после трансплантации:	До трансплантации	После трансплантации
– креатинин сыворотки крови	479,2 мкмоль/л	74,2 мкмоль/л
– мочевины	40,0 ммоль/л	4,8 ммоль/л
– мочевого азота	595,6 мкмоль/л	379,2 мкмоль/л
– щелочная фосфатаза	227,8 Е/л	49,3 Е/л
– СКФ по Кокрофту–Голту	12,6 мл/мин	91,4 мл/мин

Таблица 2

Клинические характеристики течения беременности и родов, схемы медицинской профилактики и лечения осложнений у пациентки А. во время 1-й и 2-й беременностей

Clinical characteristics of pregnancy and childbirth, schemes of medical prevention and treatment of complications in patient A. during 1 and 2 pregnancies

Клин. характеристики	1-я беременность	2-я беременность
Беременность		
Стаж трансплантированного комплекса на момент наступления беременности	11 месяцев	3 года 1 месяц
Схема иммуносупрессивной терапии	Такролимус (адваграф): суточная доза увеличена в динамике беременности с 5 до 7 мг, метилпреднизолон: с 2 до 4 мг	Такролимус (програф): суточная доза увеличена в динамике беременности с 7 до 8 мг
Группы риска осложнений беременности	По преэклампсии, по развитию плацентарной недостаточности, по развитию дисфункции / отторжения трансплантата, по развитию тромбоэмболических осложнений, по развитию тяжелой анемии сочетанного генеза, по развитию гестационного сахарного диабета, по инфицированию	
Схемы профилактики (группы препаратов)	Антикоагулянтная терапия (лекарственные средства, обладающие ангиопротекторным действием в профилактических дозах); гепатопротекторные средства: урсодезоксихолевая кислота, эссенциальные фосфолипиды; метаболические средства, аминокислоты и их производные: адеметионин; средства для лечения заболеваний печени: экстракт артишока; фитопрепараты для профилактики инфекций мочевых путей в акушерстве; лекарственные средства железа, фолиевой кислоты, витаминов группы В	
Развившиеся осложнения беременности	Анемия сочетанного генеза, угроза прерывания беременности в сроке 18–19 недель, кольпит	Анемия сочетанного генеза, предлежание хориона, гиперферментемия, бессимптомная бактериурия
Схемы лечения (группы препаратов)	Комбинированные противанемические средства двухвалентного железа с фолиевой, аскорбиновой кислотой, цианкобаламином, парентеральное введение лекарственных средств железа, витаминов группы В; спазмолитическая терапия: дротаверин / папаверин; вагинальные суппозитории с метронидазолом и миконазолом для санации влагалища	Парентеральное введение лекарственных средств железа, витаминов группы В; при снижении показателей обмена железа, концентрации гемоглобина <90 г/л – подкожное введение эритропоэтина; гепатопротекторные средства: урсодезоксихолевая кислота 250–500 мг/сут, эссенциальные фосфолипиды 1800 мг/сут, метаболические средства, аминокислоты и их производные: адеметионин фосфомицина трометамол, фитопрепараты для профилактики инфекций мочевых путей
Срок родоразрешения	38–39 недель (268 дней)	37–38 недель (262 дня)
Состояние новорожденного и послеродовой период		
Пол ребенка	Мужской	Женский
Масса, г	3030	2790
Длина, см	47	50
Оценка по Апгар, баллы	8/9	8/8
Состояние новорожденного	удовлетворительное	удовлетворительное
Осложнения у новорожденного	–	–
Осложнения у родильницы	–	–
Совместное пребывание	+	+
Выписан домой вместе с родильницей / переведен	выписан	выписан
Выписаны на ... сутки	9	9

внутриматочных систем, во время второй операции была выполнена стерилизация. На основании международных данных по безопасности грудного вскармливания при приеме препаратов такролимуса пациентке было предложено сохранить лактацию, однако по собственным соображениям от грудного вскармливания родильница отказалась. Лактация была подавлена назначением каберголина. Послеродовой период протекал без осложнений. Оба раза швы были сняты на 8-е сутки, на 9-е сутки пациентка вместе с ребенком выписана домой.

В настоящее время прошло 2 года 7 месяцев после первых и 5 месяцев после вторых родов, пациентка чувствует себя хорошо, лабораторные показатели соответствуют прегестационному уровню, по данным инструментальных исследований патологии также не выявлено. Ультразвуковое исследование трансплантатов с доплерометрией нативных сосудов и анастомоза выполнялось в динамике обеих беременностей и в послеродовом периоде: дисфункции не выявлено. Данные представлены в табл. 3 и на рис. 2.

Состояние обоих детей и в период новорожденности, и в настоящее время полностью соответствует возрастным характеристикам. По данным обследования уровни лабораторных показателей соответствуют популяционным. Мальчик посещает

дошкольное учреждение стандартного типа, активен, в возрасте 2 года 7 месяцев имеет рост 94 см, весит 14,5 кг. Девочка в возрасте 5 месяцев имеет рост 64 см, весит 7,2 кг. Когнитивное развитие обоих детей без особенностей.

В дальнейшем будет продолжена диспансеризация данной семьи: диагностический мониторинг помимо общеклинических исследований, как и во время беременности, включает углубленное исследование мочевыделительной и пищеварительной систем с определением ранних маркеров почечного и печеночного повреждения, онкомаркеров. Будет продолжено наблюдение за детьми с целью определения особенностей состояния здоровья и развития в динамике возраста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный случай из практики представляет собой уникальную клиническую ситуацию, когда, несмотря на высокий риск развития осложнений, пациентка с мультивисцеральной трансплантацией и высокотехнологичной сосудистой реконструкцией смогла выносить две доношенные последовательные беременности, завершившиеся рождением здоровых детей и благоприятным течением послеродового и отдаленного периодов, достигнув прегестационного уровня лабораторных показателей и отсутствия

Таблица 3

Уровни лабораторных показателей в динамике обеих беременностей и после родоразрешения

Levels of laboratory parameters in the dynamics of both pregnancies and after delivery

Показатели	До беременности	1-я беременность				После 1-й беременности (через 1 год)	2-я беременность				После 2-й беременности (через 5 мес.)
		1-й триместр	2-й триместр	3-й триместр	Послеродовой период		1-й триместр	2-й триместр	3-й триместр	Послеродовой период	
Креатинин, мкмоль/л	67,5	91,2	72,0	98,0	93,0	70,9	87,0	71,0	127,0	97,0	69,7
Мочевина, ммоль/л	4,7	5,0	4,8	6,4	6,2	5,7	5,3	5,8	8,0	6,5	5,3
АЛТ, Е/л	19,0	15,1	18,1	17,0	15,0	9,0	8,0	9,0	35,1	18,0	19,0
АСТ, Е/л	10,8	11,3	15,9	26,0	24,1	12,0	14,0	10,2	38,0	27,2	16,0
Гемоглобин, г/л	118,0	102,1	96,4	92,9	104,3	108,2	107,0	92,8	92,4	103,0	114,0
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	79,6	67,1	102,0	129,1	185,0	72,4	82,5	87,3	95,6	119,0	91,4
СПБ, г/сут	0	0,06	0,08	0,13	0,03	0	0,022	0,06	0,125	0	0
СКФ по Кокрофту–Голту, мл/мин	94,0	88,2	74,1	57,4	89,3	97,0	87,6	88,1	86,4	92,3	93,0

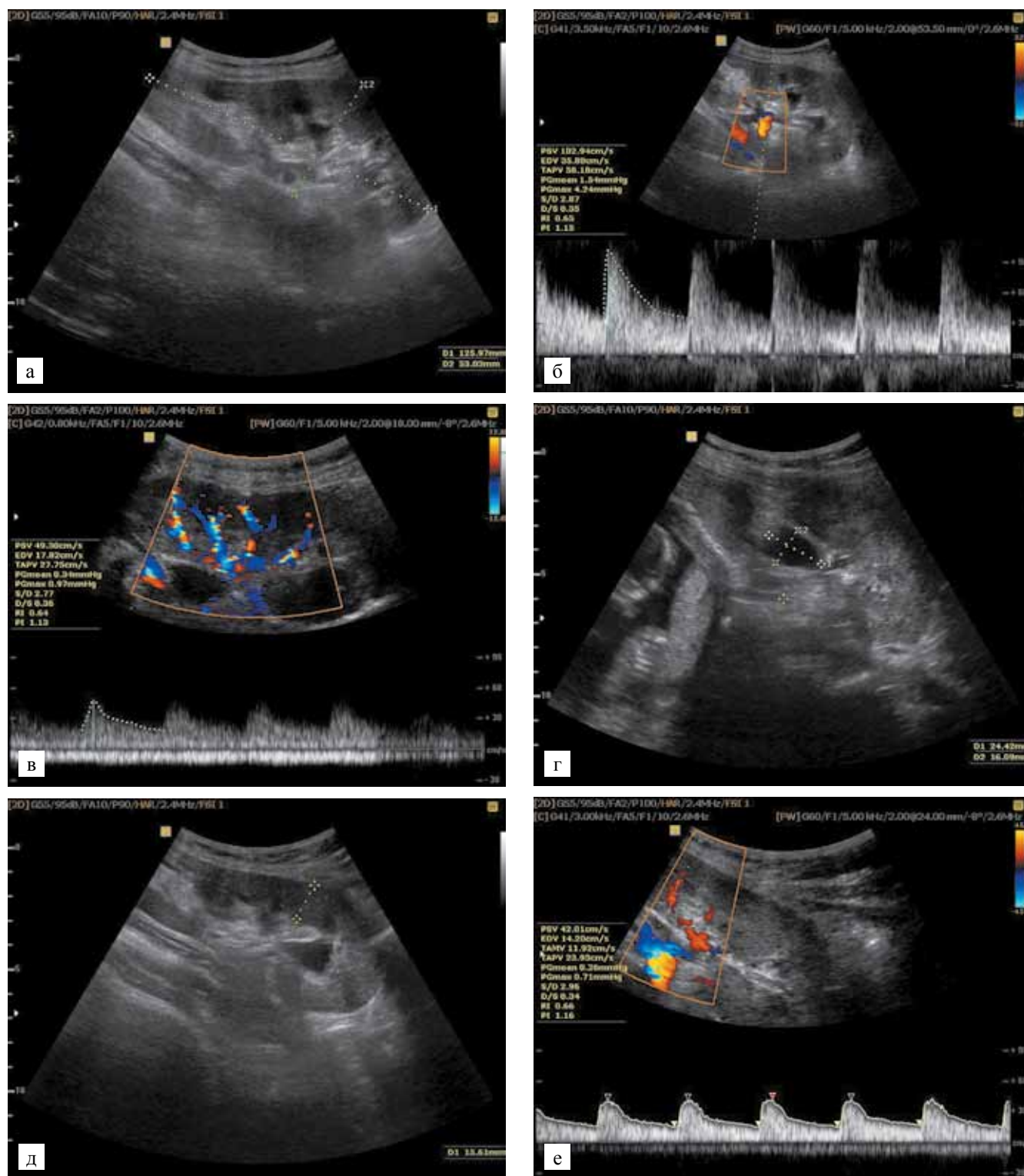


Рис. 2. Ультразвуковые характеристики трансплантированного комплекса на 8-е сутки послеродового периода. Транс-абдоминальное УЗИ датчиком 3,5–5 МГц в меню «abdomen»: а–в – ультразвуковой образ почечного трансплантата: а – В-режим, б – доплерометрическое исследование кровотока в основном стволе почечной артерии трансплантата, в – в междольевых артериях почечного трансплантата; г–е – ультразвуковой образ структур ворот трансплантата печени: г – *vena portae*, В-режим, д – рено-портальный анастомоз, В-режим, е – доплерометрическое исследование кровотока в *vena portae* и рено-портальном анастомозе

Fig. 2. Ultrasound characteristics of the transplanted complex on the 8th day of the postpartum period. Transabdominal ultrasound with a transducer of 3.5–5 MHz in menu «abdomen»: а–в – ultrasound image of the renal graft: а – on gray scale ultrasound, б – renal artery of the graft on color Doppler ultrasound, в – interlobar arteries of the renal graft on color Doppler ultrasound; г–е – ultrasound image of the structures of the gate of the transplant liver: г – *vena portae* on gray scale ultrasound, д – reno-portal anastomosis on gray scale ultrasound, е – blood flow in the *vena portae* and reno-portal anastomosis on color Doppler ultrasound

патологических изменений морфофункциональных характеристик сформированного комплекса. Отсутствие аналогичных наблюдений в международной медицинской литературе позволяет сделать вывод о первом мировом опыте ведения беременности у пациентки с данным диагнозом.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. D'Amico G, Hassan A, Diago Uso T, Hashimoto K, Aucejo FN, Fujiki M. et al. Renoportal Anastomosis in Liver Transplantation and Its Impact on Patient Outcomes: A Systematic Literature Review. *Transpl Int*. 2019 Feb; 32 (2): 117–127. doi: 10.1111/tri.13368.
2. Aktas H, Ozer A, Guner OS, Gurluler E, Emiroglu R. Liver Transplantation in Patients With Complete Portal Vein Thrombosis: Renoportal or Varicoportal Anastomosis Using Cryopreserved Vein Grafts. *Transplant Proc*. 2017 Oct; 49 (8): 1820–1823. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.06.029.
3. Singal AK, Ong S, Satapathy SK, Kamath PS, Wiesner RH. Simultaneous liver kidney transplantation. *Transpl Int*. 2019 Apr; 32 (4): 343–352. doi: 10.1111/tri.13388.
4. Lum EL, Cardenas A, Martin P, Bunnapradist S. Current Status of Simultaneous Liver Kidney Transplantation in the United States. *Liver Transpl*. 2019 Mar 12. doi: 10.1002/lt.25444.
5. Grezzana-Filho TJM, Chedid MF, Chedid AD, Bassani-Filho EL, Pereira PF, Leipnitz I et al. How to do liver transplantation using renoportal bypass. *ANZ J Surg*. 2018 Mar; 88 (3): 236–237. doi: 10.1111/ans.14299.
6. Lai Q, Spoleitini G, Pinheiro RS, Melandro F, Guglielmo N, Lerut J. From portal to splanchnic venous thrombosis: What surgeons should bear in mind? *World J Hepatol*. 2014 Aug 27; 6 (8): 549–558. doi: 10.4254/wjh.v6.i8.549.
7. Baker TB, Jay CL, Fryer JP, Abecassis MM. Transplant renoportal vein conduit for complete mesenteric thrombosis: a case report. *Am Surg*. 2010 Sep; 76 (9): 1016–1019.
8. Chang SH, Wang M, Liu X, Alhamad T, Lentine KL, Schnitzler MA et al. Racial/ethnic disparities in access and outcomes of simultaneous liver-kidney transplant among liver transplant candidates with renal dysfunction in the United States. *Transplantation*. 2019 Jan 30. doi: 10.1097/TP.0000000000002574.
9. Hussain SM, Sureshkumar KK. Refining the Role of Simultaneous Liver Kidney Transplantation. *J Clin Transl Hepatol*. 2018 Sep 28; 6 (3): 289–295. doi: 10.14218/JCTH.2017.00065.
10. Grant L, Tujios S, Singal AG. Outcomes of simultaneous liver-kidney transplantation: implications for patient selection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018 Apr; 23 (2): 264–270. doi: 10.1097/MOT.0000000000000501.
11. MacDonald AJ, Nadim MK, Durand F, Karvellas CJ. Acute kidney injury in cirrhosis: implications for liver transplantation. *Curr Opin Crit Care*. 2019 Apr; 25 (2): 171–178. doi: 10.1097/MCC.0000000000000590.
12. Nguyen MC, Black S, Washburn K, El-Hinnawi A. En bloc liver-kidney transplantation with renal artery variation using donor splenic artery and left gastric artery as inflow to the kidney: Case report. *Int J Surg Case Rep*. 2018; 53: 13–16. doi: 10.1016/j.ijscr.2018.10.002.
13. MacConmara MP, Parekh J. Simultaneous liver-kidney translocation: importance of creatinine levels, dialysis, and organ quality in survival. *Kidney Int Rep*. 2016; 1 (4): 221–229.
14. Memeo R, Salloum C, Subar D, De'angelis N, Zantidenas D, Compagnon P. Transformation of cavoportal inflow to renoportal inflow to the graft during liver transplantation for stage IV portal vein thrombosis. *Liver Transpl*. 2013 Jul; 19 (7): 776–777. doi: 10.1002/lt.23651.
15. Ozdemir F, Kutluturk K, Barut B, Abbasov P, Kutlu R, Kayaalp C et al. Renoportal anastomosis in living donor liver transplantation with prior proximal splenorenal shunt. *World J Transplant*. 2017 Feb 24; 7 (1): 94–97. doi: 10.5500/wjt.v7.i1.94.
16. Tang R, Han D, Li M, Shen S, Huang X, Zhao W et al. Left renal vein ligation for large splenorenal shunt during liver transplantation. *ANZ J Surg*. 2017 Oct; 87 (10): 767–772. doi: 10.1111/ans.14044.
17. Ogasawara H, Nakanishi C, Miyagi S, Tokodai K, Hara Y, Nakanishi W et al. Renoportal Anastomosis in Left Lateral Lobe Living Donor Liver Transplantation: A Pediatric Case. *Case Rep Gastroenterol*. 2017 Sep 27; 11 (3): 584–592. doi: 10.1159/000481160. eCollection 2017 Sep–Dec.
18. McKenna GJ. Making the extraordinary, ordinary: renoportal bypass for complete portal vein thrombosis. *Liver Transpl*. 2015 Mar; 21 (3): 275–276. doi: 10.1002/lt.24091.
19. Quintini C, Spaggiari M, Hashimoto K, Aucejo F, Diago T, Fujiki M et al. Safety and effectiveness of renoportal bypass in patients with complete portal vein thrombosis: an analysis of 10 patients. *Liver Transpl*. 2015 Mar; 21 (3): 344–352. doi: 10.1002/lt.24053. Epub 2015 Feb 10.
20. Belingheri M, Ghio L, Sala A, Menni F, Trespidi L, Ferrareso M et al. Combined liver-kidney transplantation in glycogen storage disease Ia: a case beyond the guidelines. *Liver Transpl*. 2007 May; 13 (5): 762–764.
21. Lee PJ, Muiesan P, Heaton N. Successful pregnancy after combined renal-hepatic transplantation in glycogen storage disease type Ia. *J Inher Metab Dis*. 2004; 27 (4): 537–538.
22. Pruvot FR, Noel C, Declerck N, Valat-Rigot AS, Roumilhac D, Hazzan M et al. Consecutive successful pregnancies in a combined liver and kidney transplant recipient with type 1 primary hyperoxaluria. *Transplantation*. 1997 Feb 27; 63 (4): 615–616.
23. Skannal DG, Dungy-Poythress LJ, Miodovnik M, First MR. Pregnancy in a combined liver and kidney

- transplant recipient with type 1 primary hyperoxaluria. *Obstet Gynecol.* 1995 Oct; 86 (4 Pt 2): 641–643.
24. Ткаченко ОВ, Вильчук КУ, Руммо ОО, Курлович ИВ, Нагибович СЮ, Калачик ОВ и др. Беременность при трансплантированной почке на фоне тяжелого сахарного диабета 1-го типа: ведение, родоразрешение, анестезиологическое пособие. *Біль, знеболення та інтенсивна терапія.* 2018; 3 (84): 49–56. Tkachenko OV, Vilchuk KU, Rummo OO, Kurlovich IV, Nagibovich SYu., Kalachik OV et al. Pregnancy against insulin-dependent diabetes and kidney transplant: management, delivery and anaesthesia. *Pain, anaesthesia, intensive care.* 2018; 3 (84): 49–56. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2017-2-52-60.
25. Ткаченко ОВ, Вильчук КУ, Руммо ОО, Курлович ИВ, Нагибович СЮ, Римашевский ВВ и др. Благоприятный исход беременности после трансплантации почки и аутотрансплантации ткани паращитовидной железы. Клинический случай. *Медицинские новости.* 2018; 5: 29–32. Tkachenko OV, Vilchuk KU, Rummo OO, Kurlovich IV, Nagibovich SYu, Rimashevski VV et al. Successful pregnancy after combined kidney transplantation with parathyroid tissue autotransplantation. Clinical case. *Meditzinskie novosti.* 2018; 5: 29–32. [In Russ, English abstract].
26. Ткаченко ОВ, Вильчук КУ, Руммо ОО, Курлович ИВ, Калачик ОВ, Долголикоса АА и др. Планирование беременности после трансплантации почки. *Современные перинатальные медицинские технологии в решении проблем демографической безопасности.* 2018; 11: 132–136. Tkachenko OV, Vilchuk KU, Rummo OO, Kurlovich IV, Kalachik OV, Dolgolikova AA et al. Planning pregnancy after kidney transplantation. *Covremennye perinatal'nye meditsinskie tekhnologii v reshenii problem demograficheskoy bezopasnosti.* 2018; 11: 132–136. [In Russ, English abstract].
27. Ткаченко ОВ, Вильчук КУ, Руммо ОО, Курлович ИВ, Щербина АЕ, Наумчик ИВ и др. Первый опыт успешного вынашивания беременности после симультанной трансплантации печени и почки с рено-портальной транспозицией. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2017; 19 (2): 52–60. Tkachenko OV, Vilchuk KU, Rummo OO, Kurlovich IV, Shcherba AE, Naumchik IV et al. The first experience of successful pregnancy after simultaneous liver-kidney transplantation with reno-portal transposition. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2017; 19 (2): 52–60. [In Russ, English abstract] doi: 10.15825/1995-1191-2017-2-52-60.

Статья поступила в редакцию 9.07.2019 г.
The article was submitted to the journal on 9.07.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-107-113

ОДНОМОМЕНТНАЯ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКАЯ БИЛАТЕРАЛЬНАЯ НЕФРУРЕТЕРЭКТОМИЯ, АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИЯ ТРУПНОЙ ПОЧКИ И ФОРМИРОВАНИЕ ВЕЗИКОСТОМЫ У БОЛЬНОГО С НЕЙРОГЕННЫМ МОЧЕВЫМ ПУЗЫРЕМ

С.В. Арзуманов, И.В. Чучина, А.Е. Митиш, С.К. Яровой

Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В статье представлен случай одномоментной лапароскопической билатеральной нефруртерэктомии, аллотрансплантации трупной почки и формирование везикостомы. Данное наблюдение показывает возможность успешного хирургического лечения у пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности, первопричиной которой являлась нейрогенная дисфункция мочевого пузыря. Течение раннего послеоперационного периода и дальнейшая реабилитация существенно не отличались от таковых после стандартной аллотрансплантации почки.

Ключевые слова: аллотрансплантация, везикостома, нейрогенная дисфункция мочевого пузыря, хроническая болезнь почек, лапароскопическая нефрэктомия, иммуносупрессия.

SIMULTANEOUS LAPAROSCOPIC BILATERAL NEPHROURETERECTOMY, CADAVERIC KIDNEY ALLOTRANSPLANTATION AND PERFORMANCE OF VESICOSTOMY IN A PATIENT WITH NEUROGENIC BLADDER

S.V. Arzumanov, I.V. Chuchina, A.E. Mitish, S.K. Yarovoy

N.A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology – the branch of NMRRC of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

We present a case of simultaneous laparoscopic bilateral nephroureterectomy, cadaveric kidney allotransplantation and performance of vesicostomy. This observation shows that patients with end-stage kidney disease, primarily caused by neurogenic bladder dysfunction, can be successfully treated via surgery. The course of early post-operative period and further rehabilitation did not differ significantly from that obtainable after standard kidney allotransplantation.

Keywords: kidney allotransplantation, vesicostomy, neurogenic bladder, chronic kidney disease, laparoscopic nephrectomy, immunosuppression.

ВВЕДЕНИЕ

Нейрогенная дисфункция мочевого пузыря – группа расстройств функций мочевого пузыря, возникающих при заболеваниях головного и спинного

мозга, а также периферических нервов и интрауральных нервных сплетений. В основе многих дисфункций мочеиспускания, в частности тех, которые могут привести к повреждениям верхних отделов

Для корреспонденции: Чучина Ирина Владимировна, Арзуманов Сергей Викторович. Адрес: 105425, Москва, ул. 3-я Парковая, 51, стр. 1.

Тел.: (925) 909-29-61, (903) 255-59-06. E-mail: dr.sukhobrus@yandex.ru, kidneytranspl@gmail.com

For correspondence: Chuchina Irina Vladimirovna, Arzumanov Sergey Viktorovich. Address: 51/1, 3rd Parkovaya str., Moscow, 105425, Russian Federation.

Tel.: (925) 909-29-61, (903) 255-59-06. E-mail: dr.sukhobrus@yandex.ru, kidneytranspl@gmail.com

мочевых путей, лежит недостаточность координации активности детрузора, шейки мочевого пузыря или наружного сфинктера. Указанные нарушения встречаются либо изолированно, либо в комбинации и часто приводят к повышению внутрипузырного давления без явных неврологических предлежащих патологических процессов [1].

Идиопатический гиперактивный мочевой пузырь (ГАМП) является очень распространенным синдромом, включающим симптомы ургентности, учащение мочеиспускания и у части пациентов – недержание мочи. Клинические проявления ГАМП не столь драматичны, как проявления нейрогенного мочевого пузыря. Актуальность проблемы заключается в большой распространенности – около 11 млн жителей России также могут отмечать подобные симптомы [2].

Существует множество причин дисфункции нижних мочевых путей (ДНМП), которые могут быть в целом классифицированы как врожденные структурные аномалии (задний уретральный клапан, пузырно-мочеточниковый рефлюкс и синдром Игла–Барретта), неврологические расстройства (spinabifida, патологические изменения на уровне базальных ганглиев головного мозга, стеноз спинномозгового канала, периферическая нейропатия и др.) и вызванные неврологической патологией (сахарный диабет, туберкулез мочевого пузыря, доброкачественная гиперплазия предстательной железы, рак предстательной железы, забрюшинный фиброз, уролитиаз и др.). У пациентов с дефектами нервной трубки риск дисфункции нижних мочевых путей, повлекший за собой почечную недостаточность, в восемь раз выше, а у пациентов с параплегией/тетраплегией этот риск в пять раз выше по сравнению с общей популяцией. Нейрогенные состояния компрометируют безопасное, эффективное и контролируемое удержание мочи и процесс мочеиспускания. Постоянное высокое внутрипузырное давление является преобладающим фактором повреждения почек. Внутрипузырное давление, превышающее 35–40 см H_2O , сопровождается пузырно-мочеточниковым рефлюксом (ПМР), дилатацией верхних мочевых путей и пиелоренальным рефлюксом, который приводит к нефропатии. Инфекции мочевых путей и нефролитиаз являются дополнительными повреждающими факторами.

Показания к хирургической коррекции нижних мочевых путей рассматриваются индивидуально, с целью создания мочевого резервуара с низким давлением и адекватной функцией. Хирургические варианты лечения включают континентную аппендикovesикостому (операция Митрофанова), аугментационную цистопластику, илеальный конduit (операция Брикера) или реимплантацию мочеточников. Несмотря на хирургическое вмешательство, многие

пациенты в конечном итоге достигнут терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН) и будут нуждаться в заместительной почечной терапии и трансплантации.

Высокая частота дисфункции мочевого пузыря в разной степени наблюдается у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП). Основными проблемами являются гиперактивность мочевого пузыря, нестабильность детрузора и детрузорно-сфинктерная диссинергия у этой группы пациентов. Пациенты с терминальной стадией почечной недостаточности обычно олиго- и ануричны и чаще не испытывают жалоб на этом фоне, хотя все еще могут ощущать дискомфорт в области брюшной полости и императивные позывы [3]. Имея небольшую емкость мочевого пузыря и гиперактивные симптомы, около четверти пациентов с ТХПН показывали умеренную степень тяжести IPSS – 21,3% у женщин и 26,6% у мужчин независимо от варианта гемодиализа [4]. В исследовании J.L. Chen аномальная функция накопления была отмечена у 71% пациентов с ТХПН, а обструктивная в 51,6%, а также явления хронического воспаления и уротелиальной дисфункции у 48,4% пациентов при цистоскопии [5]. Везикоуротетральный рефлюкс в исследовании D.M. Silva наблюдался у 110 из 622 (17,5%) пациентов, а остаточная моча – у 83 (13,6%) [6].

Аугментация или диверсия мочевого пузыря является единственным вариантом при трансплантации почки у реципиентов с ДНМП, получены удовлетворительные результаты данного оперативного вмешательства в сравнении с общей популяцией реципиентов с нормальной функцией НМП [7–9]. Было широко распространено мнение, что пациенты с дисфункцией мочевого пузыря не должны рассматриваться в качестве кандидатов для трансплантации почек. Опубликованы работы, результаты которых показывали, что нет разницы в коэффициентах выживаемости трансплантата и выживаемости пациентов [10–12]. В контролируемых исследованиях пациенты с нижней мочевой дисфункцией имели коэффициент смертности и выживаемости, аналогичный контрольной группе без дисфункции мочевого пузыря, однако имеется высокий риск инфекции МВП, что в свою очередь сопровождается минимизацией иммуносупрессивной терапии и в дальнейшем может привести к неблагоприятному исходу [13–16]. Реципиентам почечного трансплантата, имеющим в анамнезе ДНМП, требуются специальные хирургические методики формирования мочевых путей, обеспечивающие адекватный отток мочи, которые могут быть выполнены как предварительный этап или симультанно с трансплантацией почки. В зависимости от конкретной ситуации подготовка может заключаться в создании кишечного резервуара [17], мочевыводящего подкожного свища [18], увеличении

(аугментации) собственного пузыря с использованием вставки из кишечника или мочеточника [19]. В зависимости от варианта отведения мочи возможно использование самокатетеризации или уроприемника. Вариант везикостомии считается более предпочтительным. Техники везикостомии, предложенные Blocksom (1958) и J. Lapides (1961), по сути, заключаются в формировании пузырно-кожного свища и практически без изменений применяются за рубежом в настоящее время [20]. Недостатком везикостомии являются осложнения, частота которых колеблется от 5 до 20% [21]. Характерными осложнениями методики Blocksom являются пролапс слизистой мочевого пузыря, наблюдающийся у 6–15% больных, и стеноз пузырно-кожного анастомоза, который возникает в 15–22% случаев. Недостатками методики этих методов являются снижение емкости мочевого пузыря и хронический цистит. Данная категория пациентов имеет высокий риск развития инфекции мочевыводящих путей, что требует соответствующей профилактики и/или лечения.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Пациент 22 лет с диагнозом: «Аномалия развития мочевыводящих путей: двухсторонний пузырно-мочеточниковый рефлюкс. Хронический пиелонефрит, латентное течение (СКФ 16 мл/мин/1,73 м²). ХБП 4-й ст. Нейрогенная дисфункция мочевого пузыря. Детрузорно-сфинктерная диссенергия».

Из анамнеза известно, что первые симптомы заболевания появились в возрасте 4 лет: фебрильная лихорадка, острая задержка мочи. В том же возрасте, в 2000 г. выявлен пузырно-мочеточниковый рефлюкс слева, проведено оперативное вмешательство: пластика интрамурального отдела левого мочеточника с антирефлюксной защитой. Наблюдался у нефролога нерегулярно, постепенно прогрессировала ХБП. В 2017 г. пациент был направлен в НИИ урологии НМИЦ радиологии Минздрава России с целью решения вопроса о выполнении аллотрансплантации почки.

При обследовании: по данным ультразвукового исследования выявлена сморщенная почка справа, чашечно-лоханочная система (ЧЛС) расширена: чашечки 0,6 см, лоханка 1,3 см, верхний отдел мочеточника не расширен. Левая почка объемом 60,0 см³, паренхима 1,4–0,9 см. ЧЛС расширена: чашечки 0,8 см, лоханка 1,7 см, верхний отдел мочеточника расширен до 0,4 см. Мочевой пузырь объемом 600 мл, контуры его четкие фестончатые, стенки диффузно утолщены (1,0 см).

Выполнена цистография (рис. 1). Введено 870 мл рентгенконтрастного вещества, позыв к мочеиспусканию отсутствует. Определяется мочевой пузырь башенной формы, с нечеткими, неровными контурами. ПМР справа III–IV ст.

По данным комплексного уродинамического обследования: выявлена высокоамплитудная гиперактивность детрузора. Чувствительность мочевого пузыря снижена, мочеиспускание не зафиксировано на объеме 800 мл (рис. 2).

В дальнейшем сформирована артериовенозная фистула левого предплечья, начата заместительная почечная терапия программным гемодиализом. Пациент внесен в лист ожидания донорской почки.

В 2017 г. в НИИ урологии НМИЦ радиологии Минздрава России выполнена лапароскопическая билатеральная нефруретерэктомия, аллотрансплантация трупной почки справа, формирование континентной везикостомы. Заключительный этап операции представлен на рис. 3, 4.

Время ишемии почечного трансплантата составило 11 часов. Общее время оперативного вмешательства составило 5 часов 45 минут.

Послеоперационный период протекал стабильно. Первичная функция трансплантата. Проводилась стандартная иммуносупрессивная терапия. Страховой дренаж и уретральный катетер удалены на вторые послеоперационные сутки, катетер везикостомы удален на восемнадцатые послеоперационные сутки, с предварительным его пережатием. Спустя три недели пациент начал проводить самокатетеризацию после каждого акта мочеиспускания. На 26-е послеоперационные сутки пациенту вы-



Рис 1. Цистограмма

Fig. 1. The cystoradiogram

полнена везикостомаскопия, цистоскопия, удаление внутреннего стента трансплантированной почки, по данным которой отмечается трабекулярность мочевого пузыря III ст., что свидетельствует о вы-

раженной дисфункции мочевого пузыря. По данным контрольного ультразвукового исследования трансплантированного органа расширение чашечно-лоханочной системы не определяется.

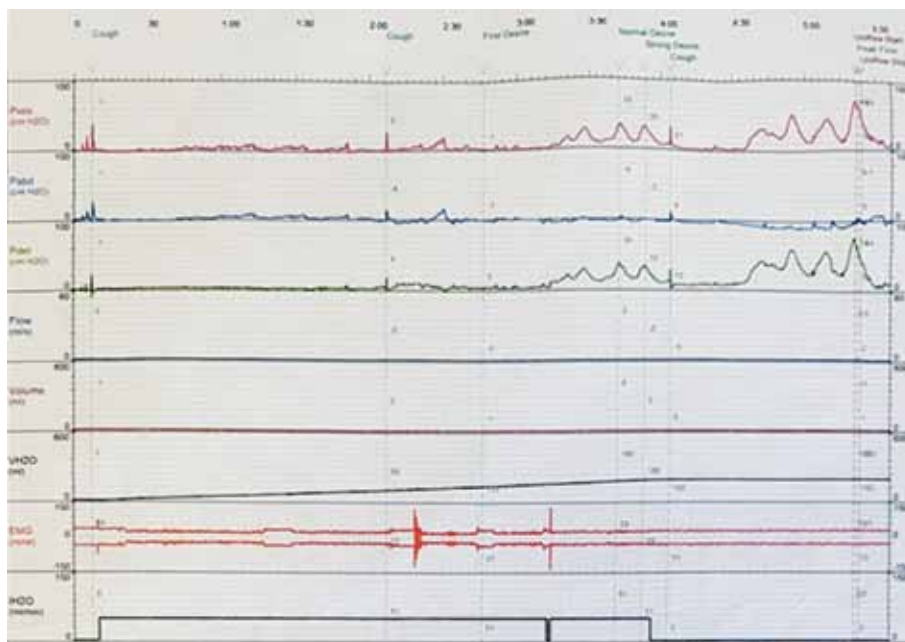


Рис 2. Комплексное уродинамическое обследование

Fig. 2. Complex urodynamic examination

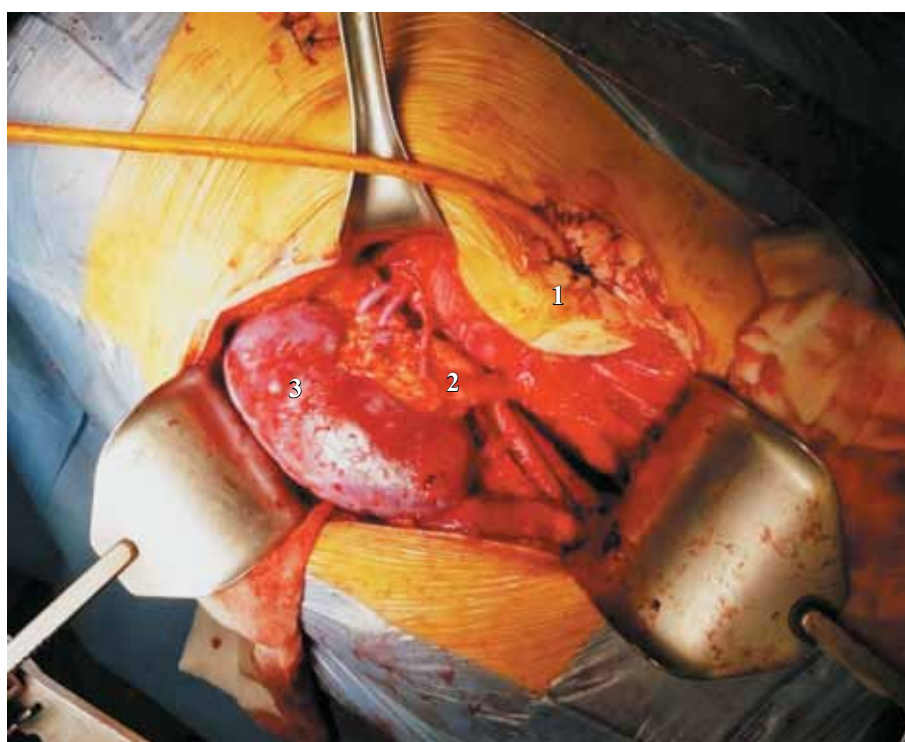


Рис 3. Вид операционного поля на заключительном этапе: 1 – выведенная на переднюю брюшную стенку везикостома; 2 – мочеточник почечного трансплантата; 3 – почка (трансплантат)

Fig. 3. Surgical field at the final stage: 1 – the excluded vesicostoma on the anterior abdominal wall; 2 – ureter of the kidney transplant; 3 – kidney (transplantate)

При сроке наблюдения 19 месяцев. Пациент наблюдается амбулаторно, контроль – ежемесячно. Мочеиспускание проводится посредством катетеризации через везикостому (6 раз в сутки), самопроизвольное мочеиспускание. Один эпизод острой инфекции мочевых путей.

Данные лабораторных методов исследования на момент последнего наблюдения.

Общий анализ крови: $Hb - 120 \text{ г/дл}$, эритроциты – $3,2 \times 10^{12}/\text{л}$, тромбоциты – $147 \times 10^9/\text{л}$, СОЭ – 4 мм/ч. Биохимический анализ крови: креатинин – 115 мкмоль/л, мочевины – 6 ммоль/л, калий – 4,3 ммоль/л, натрий – 144 ммоль/л, кальций – 1,2 ммоль/л. Общий анализ мочи: удельный вес – 1016, белок отсутствует, эритроциты – 0–1 в п/зр, лейкоциты – 0–1 в п/зр.

Ультразвуковое исследование трансплантированной почки: размеры $12,1 \times 5,3 \times 5,3 \text{ см}$, объем до 180 см^3 ; толщина паренхимы: до 1,8 см; кровоток определяется адекватным; $R_i - 0,70$, ЧЛС не расширена, мочеточник не расширен.

С целью исключения пузырно-мочеточникового рефлюкса выполнена цистография через везикостому. Введено 250 мл рентгеноконтрастного вещества, пузырно-мочеточниковый рефлюкс не выявлен (рис. 5).

По данным комплексного уродинамического исследования: чувствительность мочевого пузыря снижена, позыв к мочеиспусканию зафиксирован на объеме 270 мл.

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанный опыт одномоментной лапароскопической билатеральной нефруретерэктомии, аллотрансплантации трупной почки, формирования везикостомы говорит об успешном единовременном комплексном хирургическом лечении с последующей удовлетворительной реабилитацией.

Решающую роль для одномоментного оперативного вмешательства играло стабильное преддиагностическое состояние, сохранная водовыделительная функция почек, которая обеспечивала постоянное наполнение мочевого пузыря, что в свою очередь способствовало формированию везикостомы с хорошей объемной емкостью и функциональностью. Ранее предполагалось, что предтрансплантационная двусторонняя нефрэктомия уменьшает инфекционную заболеваемость и повышает выживаемость трансплантата. На терминальной стадии хронической почечной недостаточности поддерживаются гемодинамические, экскреторные и эндокринные функции. В исследованиях приходят к выводу, что билатеральная нефрэктомия, как отдельный вид оперативного вмешательства перед трансплантацией почки, имеет значительный риск смертности и заболеваемости и не является методом выбора у

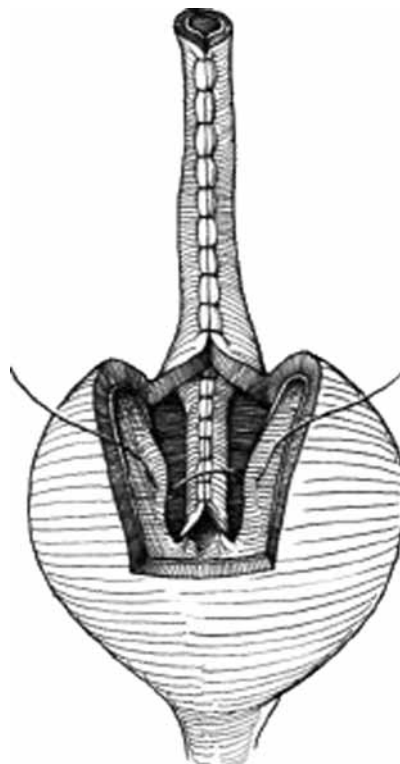


Рис 4. Схема формирования везикостомы

Fig. 4. The scheme of formation of a vesicostomy



Рис 5. Цистограмма после операции

Fig. 5. The cystoradiogram after surgery

пациентов, имеющих ДНМП с большой емкостью мочевого пузыря [22, 23], но при этом одномоментная трансплантация почки с двусторонней нефрэктомией имеет более высокий уровень урологических осложнений, кровопотери и необходимости переливания крови, чем двусторонняя нефрэктомия в качестве первого этапа [24, 25].

Дисфункция мочевого пузыря может провоцировать инфекцию мочевых путей, что влияет на выживаемость почечного трансплантата. Таким образом, необходимо пристальное внимание к симптомам дисфункции НМП после успешной пересадки почки. В немногих исследованиях изучались дисфункция нижних мочевых путей и симптомы нижних мочевых путей (СНМП) среди реципиентов. Экспериментальные и клинические исследования неоднократно показывали, что восстановление диуреза приводит к проявлениям СНМП и дисфункции мочеиспускания. Когда это происходит, повторные мочевые инфекции или другие патологические изменения в мочевом пузыре могут привести к структурной перестройке всех слоев НМП и серьезным морфологическим и функциональным нарушениям, таким как сокращение мочевого пузыря с минимальной емкостью. После успешной трансплантации почки дисфункция и симптомы НМП могут быть выявлены вместе со всеми их негативными последствиями. Анурия и олигурия являются наиболее важными факторами риска для урологических осложнений после трансплантации почки [26, 27]. Команде трансплантологов необходимо предусмотреть возможные источники инфекции [28, 29]. У пациентов с нейрогенной дисфункцией должен осуществляться адекватный вид деривации мочи. Этапность оказания помощи и виды деривации мочи определяются индивидуально [30]. Выбор формирования везикостомы у пациента заключался в большом по объему мочевом пузыре — до 1000 мл, что давало беспрепятственно сформировать стому из ткани мочевого пузыря. В ранние и поздние послеоперационные сроки везикостома обеспечивала полноценное дренирование мочевого пузыря, что является профилактикой пузырно-мочеточникового рефлюкса в трансплантированную почку, который, в свою очередь, может привести к рефлюкс-нефропатии трансплантата или развитию уросепсиса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент отсутствуют четкие рекомендации для реципиентов почечного трансплантата. Необходимо проводить скрининг симптомов ДНМП, поскольку данная патология может быть причиной пузырно-мочеточникового рефлюкса, индуцировать инфекции мочевых путей и связанные с вышеперечисленным дальнейшие осложнения. Уродинамическая комплексная оценка перед трансплантацией почки важна в качестве обязательного обследования реци-

пиентов. Данное обследование выявит имеющиеся дисфункциональные нарушения мочеиспускания и/или мочевого пузыря, которая поможет избежать в дальнейшем дисфункции аллотрансплантата. В зависимости от степени дисфункции необходимо проведение уродинамического наблюдения после трансплантации.

Одномоментная лапароскопическая билатеральная нефруретерэктомия, аллотрансплантация трупной почки, формирование везикостомы может являться операцией выбора у пациентов с уретерогидронефрозом собственных почек, нейрогенной дисфункцией мочевого пузыря, приведшей к терминальной почечной недостаточности.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сарсенбаев КК. Нейрогенная дисфункция мочевого пузыря у детей с различной соматической патологией. *Вестник современных исследований*. 2018; 2.2: 11–13. Sarsenbaev KK. Nejrogennaya disfunkciya mochevogo puzyrya u detej s razlichnoj somaticheskoy patologiej. *Vestnik sovremennyh issledovanij*. 2018; 2.2: 11–13.
2. Каприн АД и др. Ботулинотерапия в современной урологии. *Медицинский совет*. 2016; 10. Kaprin AD i dr. Botulinoterapiya v sovremennoj urologii. *Medicinskij sovet*. 2016; 10.
3. Cheng SF, Jiang YH, Kuo HC. Urothelial Dysfunction and Chronic Inflammation are Associated With Increased Bladder Sensation in Patients With Chronic Renal Insufficiency. *International neurourology journal*. 2018; 22 (Suppl 1): S46.
4. Wu MY et al. Lower urinary tract symptoms are frequent in dialysis patients. *Peritoneal Dialysis International*. 2011; 31 (1): 99–102.
5. Chen JL, Lee MC, Kuo HC. Reduction of cystometric bladder capacity and bladder compliance with time in patients with end-stage renal disease. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2012; 111 (4): 209–213.
6. Silva DM et al. Bladder function evaluation before renal transplantation in nonurologic disease: is it necessary? *Urology*. 2014; 83 (2): 406–410.
7. Vince RA, Klausner AP. Surveillance strategies for neurogenic lower urinary tract dysfunction. *Urologic Clinics*. 2017; 44 (3): 367–375.
8. Georgopoulos P, Apostolidis A. Neurogenic voiding dysfunction. *Current opinion in urology*. 2017; 27 (3): 300–306.
9. Sims-Williams HJ et al. Renal Outcomes in Children with Operated Spina Bifida in Uganda. *International journal of nephrology*. 2018; 2018.
10. Basiri A, Hosseini MS, Khoddam R. Augmentation cystoplasty before and after renal transplantation: long-

- term results. *Transplantation proceedings*. 2002; 34 (6): 2106.
11. Otukesh H et al. Outcome of renal transplantation in children with low urinary tract abnormality. *Transplantation proceedings*. Elsevier, 2005; 37 (7): 3071–3074.
 12. Al-Khudairi N et al. Interventions for impaired bladders in paediatric renal transplant recipients with lower urinary tract dysfunction. *Transplant International*. 2013; 26 (4): 428–434.
 13. Красильников ДЕ. Принцип Митрофанова в реконструктивной урологии. Обзор литературы. *Педиатр*. 2010; 1 (1). Krasil'nikov DE. Princip Mitrofanova v rekonstruktivnoj urologii. Obzor literatury. *Pediatr*. 2010; 1 (1).
 14. Чубарова ЕА и др. Аугментационная цистопластика как способ восстановления емкости органа после частичной или полной цистэктомии. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. 2012 (6). Chubarova EA i dr. Augmentacionnaya cistoplastika kak sposob vosstanovleniya emkosti organa posle chastichnoj ili polnoj cistektomii. *Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Melkie domashnie i dikie zhivotnye*. 2012 (6).
 15. Милованов ЮС и др. Качество жизни больных хронической болезнью почек на заместительной почечной терапии. *Терапевтический архив*. 2018; 90 (6): 89–91. Milovanov YuS i dr. Kachestvo zhizni bol'nyh hronicheskoy bolezni'yu pochek na zamestitel'noj pochechnoj terapii. *Terapevticheskij arhiv*. 2018; 90 (6): 89–91.
 16. Wilson RS et al. Long-term outcomes of renal transplant in recipients with lower urinary tract dysfunction. *International Journal of Surgery*. 2018; 55: S108.
 17. Coosemans W, Baert L, Kuypers D et al. Renal Transplantation Onto Abnormal Urinary Tract: Ileal Conduit Urinary Diversion. *Transplant Proceed*. 2001; 33: 2493.
 18. Garrison RN, Bentley FR, Amin M. Terminal loop cutaneous uretostomy in cadaveric kidney transplantation. *Arch Surg*. 1998; 124: 467.
 19. Nahas WC, Mazzucchi E, Arap MA et al. Augmentation cystoplasty in renal transplantation: a good and safe option – experience with 25 cases. *Urology*. 2002; 60: 770.
 20. Duckett JW, Snyder HM. Continent urinary diversion: variations on the Mitrofanoff principle. *J Urol*. 1986; 136 (1): 58–62.
 21. Tucci S Jr, Facincani I, Beduschi MC, Franco PB, Martins ACP. Vesicostomia cutânea em crianças. *J Pediatr (Rio J)*. 1997; 73: 8–265.
 22. Villani V et al. Bilateral native nephrectomy reduces systemic oxalate level after combined liver kidney transplant: A case report. *Pediatric transplantation*. 2017; 21 (3): e12901.
 23. Branchereau J et al. Management of renal transplant urolithiasis: a multicentre study by the French Urology Association Transplantation Committee. *World journal of urology*. 2018; 36 (1): 105–109.
 24. Argyrou C, Moris D, Vernadakis S. Tailoring the 'Perfect Fit' for Renal Transplant Recipients with End-stage Polycystic Kidney Disease: Indications and Timing of Native Nephrectomy. *In vivo*. 2017; 31 (3): 307–312.
 25. Jean RA, Alexandre M, Yoo PS. Kidney Transplantation With and Without Native Nephrectomy for Polycystic Kidney Disease: Results of the National Inpatient Sample and the Rationale for a 2-Stage Procedure. *Journal of the American College of Surgeons*. 2018; 226 (6): 1079–1084.
 26. Tillou X et al. Does daily urine output really matter in renal transplantation? *Ann Transplant*. 2013; 18: 716–720.
 27. Ромих ВВ. Клиническая уродинамика и нейроурология: от диагностики к эффективному лечению и реабилитации. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2010; 4: 92–98. Romih VV. Klinicheskaya urodinamika i nejrourologiya: ot diagnostiki k effektivnomu lecheniyu i rehabilitacii. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2010; 4: 92–98.
 28. Лысенко МА и др. Билатеральная нефрэктомия у пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности и активным течением хронического пиелонефрита. *Урология*. 2016; 1: 46–51. Lysenko MA i dr. Bilateral'naya nefrektomiya u pacientov s terminal'noj stadiej hronicheskoy pochechnoj nedostatochnosti i aktivnym techeniem hronicheskogo pielonefrita. *Urologiya*. 2016; 1: 46–51.
 29. Greenleaf E et al. Native kidney pyelonephritis as the cause of recurrent urinary tract infections in a kidney transplant recipient. *Kidney international*. 2018; 93 (3): 762.
 30. Курбангулов ИР, Павлов ВН, Загитов АР, Смаков ШС. Кишечная пластика мочевого пузыря и родственная пересадка почки у больной с нейрогенным мочевым пузырем. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2008; 10 (6): 78–83. Kurbangulov IR, Pavlov VN, Zagitov AR, Smakov ShS. Kishhechnaya plastika mochevogo puzyrya i rodstvennaya peresadka pochki u bol'noj s nejrogennym mochevym puzyrem. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2008; 10 (6): 78–83.

Статья поступила в редакцию 21.11.2019 г.
The article was submitted to the journal on 21.11.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-114-117

ФАТАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ПЛОСКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЧЕРЕЗ 10 ЛЕТ ПОСЛЕ АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРУПНОЙ ПОЧКИ

И.Н. Дымков^{1, 2}, А.В. Смирнов¹, А.Д. Перлина³, К.Г. Тайлер², И.В. Александров^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Волгоград, Российская Федерация

² ГБУЗ «Волгоградский областной уронефрологический центр», Волжский, Российская Федерация

³ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

Многочисленные литературные данные указывают на то, что одними из самых часто встречающихся новообразований у пациентов после трансплантации почки являются немеланоцитарные злокачественные образования кожи. Множественные поражения и более агрессивное клиническое течение наблюдаются чаще у пациентов с почечным трансплантатом, чем в общей популяции. В данном наблюдении представлен случай злокачественного новообразования кожных покровов у пациента через 10 лет после трансплантации трупной почки, который принимал стандартную 3-компонентную иммуносупрессию с удовлетворительной функцией трансплантата (уровень креатинина сыворотки крови оставался на уровне 157–178 мкмоль/л). Образование волосистой части головы было удалено, при гистологическом исследовании морфологическая картина базально-клеточного рака с плоскоклеточной дифференцировкой. Впоследствии обнаружен рецидив кожного новообразования височной области, а также новые очаги в лобной области и на коже передней грудной стенки. Несмотря на хирургическое лечение и курс близкофокусного рентгеновского излучения, заболевание сопровождалось быстрой прогрессией, приведшей к летальному исходу. Плоскоклеточный рак может очень быстро прогрессировать у пациентов после трансплантации солидных органов, несмотря на проводимое комбинированное лечение. Возможно, в таких случаях стоит обсуждать полную отмену иммуносупрессивной терапии и удаление почечного трансплантата, чтобы попытаться контролировать прогрессирование онкологического процесса.

Ключевые слова: новообразования кожи, плоскоклеточный рак, трансплантация почки, иммуносупрессия.

FATAL PROGRESSION OF SQUAMOUS CELL CARCINOMA 10 YEARS AFTER CADAVERIC KIDNEY TRANSPLANTATION

I.N. Dymkov^{1, 2}, A.V. Smirnov¹, A.D. Perlina³, K.G. Tailer², I.V. Alexandrov^{1, 2}

¹ Volgograd State Medical University, Volgograd, Russian Federation

² Volgograd Regional Center of Urology and Nephrology, Volzhsky, Russian Federation

³ M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Various research has shown that non-melanocytic malignant skin lesion is one of the most common post-kidney transplant neoplasms. Multiple lesions and a more aggressive clinical course are more common in kidney transplant patients than in the general population. This paper presents a case of malignant skin neoplasms in a patient 10 years after cadaveric kidney transplantation. The patient received standard 3-component immunosuppression with satisfactory graft function (serum creatinine level remained at 157–178 $\mu\text{mol/L}$). Scalp neoplasm was removed. Histological examination revealed a morphological picture characteristic of basal cell carcinoma with squamous differentiation. Subsequently, a relapse of the skin neoplasm of the temporal region, as well as new lesions in the frontal region and the skin of the anterior chest wall, were discovered. Despite surgical treatment and close-focus

Для корреспонденции: Дымков Иван Николаевич. Адрес: 404120, Волгоградская обл., Волжский, ул. Карбышева, 86. Тел. (906) 400-55-78. E-mail: indymkov@bk.ru

For correspondence: Dymkov Ivan Nikolaevich. Address: 86, General Karbishev str., Volzhsky city, Volgograd reg., 404120, Russian Federation.

Tel. (906) 400-55-78. E-mail: indymkov@bk.ru

x-ray radiation, the disease rapidly progressed and eventually led to death. Squamous cell carcinoma can progress very rapidly in patients after solid organ transplantation, despite ongoing combination treatment. Perhaps in such cases, it is worth cancelling immunosuppressive therapy completely and removing the kidney graft in order to control progression of the malignant tumor process.

Keywords: skin neoplasms, squamous cell carcinoma, kidney transplantation, immunosuppression.

ВВЕДЕНИЕ

Пациенты после трансплантации солидных органов, получающие иммуносупрессивную терапию длительное время, имеют более высокий риск развития инфекционных и онкологических осложнений со стороны кожных покровов.

В мировой литературе встречаются статьи, подтверждающие риск развития рака кожи у данной группы пациентов [6]. Отмечен тот факт, что рост случаев рака кожи у пациентов, получающих иммуносупрессивную терапию после трансплантации почки, пропорционален продолжительности и дозе терапии. Помимо иммуносупрессивной терапии другие факторы риска развития рака кожи включают воздействие ультрафиолетового (УФ) излучения, эпизоды солнечных ожогов в детском возрасте, наличие солнечных кератозов, наличие опухолевых поражений до трансплантации и мужской пол.

ОПИСАНИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Пациент С. в 1999 году, в возрасте 37 лет, стал отмечать повышение артериального давления до 200/120 мм рт. ст. При обследовании в 2002 г. были обнаружены изменения в общем анализе мочи (протеинурия, эритроцитурия), после дообследования диагностирован хронический гломерулонефрит. У нефролога не наблюдался. В связи с прогрессированием хронической почечной недостаточности с конца августа 2004 г. начата заместительная почечная терапия методом программного гемодиализа.

В январе 2005 г. выполнена операция – аллотрансплантация трупной почки с немедленной функцией трансплантата. Стартовая схема иммуносупрессивной терапии – трехкомпонентная (циклоsporин, микофенолата мофетил, метилпреднизолон) без индукции моно- и поликлональными антителами. Послеоперационный период протекал без осложнений, пациент был выписан на амбулаторное лечение на 20-е сутки после операции.

В связи с развитием нефропатии трансплантата в 2007 году, проявляющейся ростом креатинина плазмы крови до 278 мкмоль/л, умеренной альбуминурией, была проведена конверсия циклоsporина на такролимус с положительным клиническим эффектом, креатинин плазмы крови стабилизировался на уровне 156–167 мкмоль/л.

В конце 2010 года находился на стационарном лечении по поводу двусторонней внебольничной пнев-

монии. После курса антибактериальной терапии, без изменения режима иммуносупрессии, выписан после рентгенологического подтверждения разрешения пневмонии.

Дальнейший период наблюдения протекал без особенностей, функция трансплантата оставалась удовлетворительной, уровень креатинина сыворотки крови оставался на уровне 157–178 мкмоль/л.

В 2015 году при очередном визите в клинику было обнаружено кожное новообразование в левой височной области. Новообразование было удалено, при гистологическом исследовании морфологическая картина базально-клеточного рака с плоскоклеточной дифференцировкой, наличием участков ороговения по типу «раковых жемчужин» (рис. 1).

Послеоперационный период протекал без осложнений, выписан на диспансерное наблюдение онколога по месту жительства.

В марте 2018 года обнаружен рецидив кожного новообразования височной области, а также обнаружены новые очаги в лобной области, передней грудной стенке. Выполнено широкое иссечение всех кожных новообразований с основанием. При гистологическом исследовании был верифицирован плоскоклеточный рак (рис. 2).

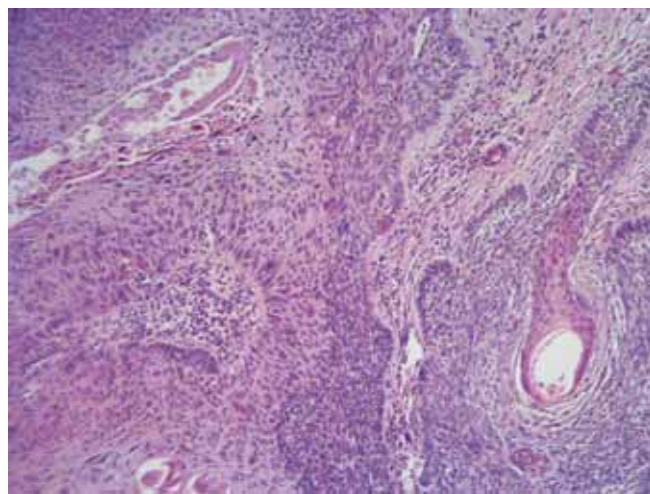


Рис. 1. Пациент С., 57 лет. Морфологическая картина базально-клеточного рака с плоскоклеточной дифференцировкой, наличием участков ороговения по типу «раковых жемчужин». Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 1. Patient S., 57 years old. Morphological picture of basal cell carcinoma with squamous differentiation, the presence of keratinization sites according to the type of «cancerous pearls». Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$

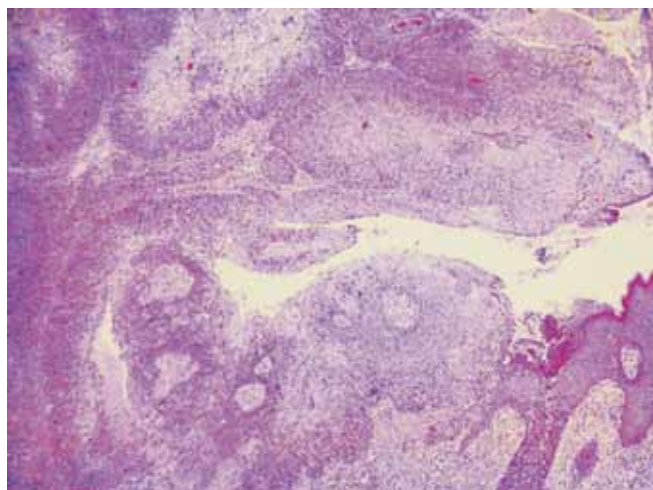


Рис. 2. Плоскоклеточный рак с участками с низкой дифференцировкой. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 2. Squamous cell carcinoma with areas of low differentiation. Hematoxylin and eosin stain. $\times 100$

Гладкое течение послеоперационного периода. В связи с прогрессией онкологического процесса был проведен курс близкофокусного рентгеновского излучения – доза 3–5 гр/сут, курсом 50–80 гр.

Тем не менее в июле 2018 года зафиксировано прогрессирование процесса в мягкие ткани теменной области с деструкцией костей черепа (рис. 3, 4). Выполнена биопсия опухоли мягких тканей теменной области. При гистологическом исследовании: низкодифференцированный плоскоклеточный рак.

Несмотря на проводимую терапию, отмечалась прогрессия заболевания, приведшая к летальному исходу через три года после начала заболевания.

ОБСУЖДЕНИЕ

Многочисленные данные указывают на то, что одними из самых часто встречающихся новообразований у пациентов после трансплантации почки являются немеланоцитарные злокачественные образования кожи [8, 9]. Множественные поражения



Рис. 3. Компьютерная томография костей черепа. Прогрессирование процесса в мягкие ткани теменной области с деструкцией костей черепа

Fig. 3. CT bones of skull. Progression of the process into the soft tissues of the parietal region with destruction skull bones

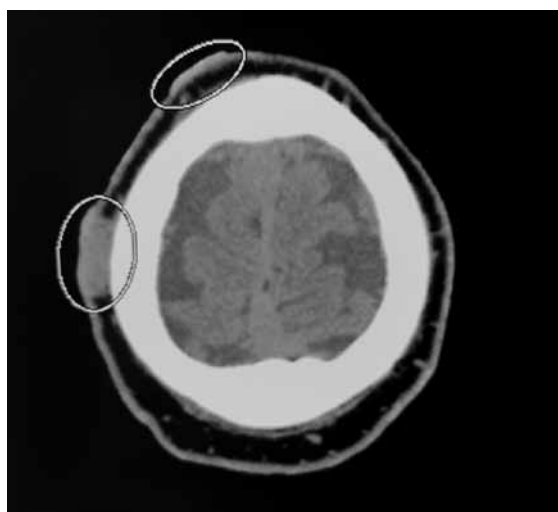


Рис. 4. Компьютерная томография костей черепа. Прогрессирование процесса в мягкие ткани теменной области с деструкцией костей черепа

Fig. 4. CT bones of skull. Progression of the process into the soft tissues of the parietal region with destruction skull bones

и более агрессивное клиническое течение наблюдаются чаще у пациентов с почечным трансплантатом, чем в общей популяции [1, 2].

Риск развития рака кожи варьируется в зависимости от географического региона. В частности, самая высокая заболеваемость в Австралии.

Солнечное облучение является одним из главных факторов риска для развития немеланомного рака у пациентов после трансплантации почки. Так, по данным Joanna Sułowicz et al., из всех 53 поражений, диагностированных у 25 из 486 пациентов с пересаженной почкой, 34 (64,2%) были расположены на лице, которое является наиболее открытой для ультрафиолетового излучения частью тела.

По данным Imko-Walczyk, среди пациентов после трансплантации почки в Гданьске (Польша) была выявлена аналогичная локализация рака кожи, как в общей популяции (76% плоскоклеточных карцином и 72% базальноклеточных были обнаружены в области головы и шеи) [6].

Исследователи выявили, что количество выявленных случаев рака увеличивалось в зависимости от продолжительности иммуносупрессии и составило 20,7% через 5 лет, 37,35% через 10 лет и 53,08% через 15 лет после трансплантации [5].

Большинство публикаций содержат информацию о том, что по частоте случаев плоскоклеточный рак преобладает над базальноклеточным [4, 7].

Плоскоклеточный рак кожи – опухоль, происходящая из плоского эпителия, имеет более высокую по сравнению с другими кожными опухолями степень злокачественности и обычно трансформируется из некоторых предраковых заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Достоверно оценить факторы риска развития и прогрессии злокачественного образования кожных покровов у нашего пациента достаточно сложно.

Тем не менее Волгоградская область является регионом с достаточно высокой УФ-нагрузкой, что, безусловно, может оказывать дополнительное влияние на пациентов группы риска, в частности, после трансплантации солидных органов. Первые признаки заболевания были отмечены через 7 лет после конверсии иммуносупрессивной терапии с циклоспорина на такролимус.

Проводимые хирургические и лучевые методы лечения при плоскоклеточном раке кожи на фоне иммуносупрессии у пациента после трансплантации сопровождались быстрой прогрессией, которая и привела к летальному исходу. Возможно, в случаях быстрого прогресса злокачественных образований кожи у пациентов после трансплантации почки альтернативным решением может быть полная отмена

иммуносупрессивной терапии с высокой вероятностью потери трансплантата в попытке сохранения жизни пациенту.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Bernat Garcia J, Morales Suárez-Varela M, Vilata JJ et al. Risk factors for nonmelanoma skin cancer in kidney transplant patients in a Spanish population in the Mediterranean region. *Acta Derm Venerol.* 2013; 93: 422–427. doi: 10.2340/00015555-1525.
2. Etzkorn JR, Parikh RP, Marzan SS et al. Identifying risk factors using a skin cancer screening program. *Cancer Control.* 2013; 20: 248–254. doi: 10.1177/107327481302000402.
3. Mudigona T, Levendro MM, O'Neill JL et al. Incidence, risk factors, and preventive management of skin cancers in organ transplant recipients: a review of single- and multicenter retrospective studies from 2006 to 2010. *Dermatol Surg.* 2013; 39: 345–364.
4. Urwin HR, Jones PW, Harden PN et al. Predicting risk of nonmelanoma skin cancer and premalignant skin lesions in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2009; 87: 1667–1671. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a5ce2e.
5. Moloney FJ, Comber H, O'Lorain P et al. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol.* 2006; 154: 498–504.
6. Imko-Walczyk B. The assessment of the risk of cancer and their possible prevention in patients after kidney transplantation. Doctoral thesis. Gdańsk, Poland; 2009. <http://pbc.gda.pl/dlibra/doccontent?id=4847&from=FBC>. Polish.
7. Kauffmann HM, Cherikh WS, McBride MA et al. Post-transplant *de novo* malignancies in renal transplant recipients: the past and present. *Transplant Int.* 2006; 19: 607–619. doi: 10.1111/j.1432-2277.2006.00330.
8. Казанцева ИА, Гуревич ЛЕ, Бобров МА. Редкие клинические наблюдения «комбинированных» карцином кожи у реципиентов аллотрансплантата трупной почки. *Альманах клинической медицины.* 2018; 4 (46): 367–373. Kazanceva IA, Gurevich LE, Bobrov MA. Rare clinical cases of «combined» skin carcinomas in cadaver renal allograft recipients. *Almanah klinicheskoy mediciny.* 2018; 4 (46): 367–373. (in Russ).
9. Ватазин АВ, Дутов ВВ, Зулкарнаев АБ, Федулкина ВА, Крстич М. Инфекционные осложнения после трансплантации почки. *Урология.* 2013; 3: 107–111. Vatazin AV, Dutov VV, Zulkarnaev AB, Fedulkina VA, Krstich M. Infectious complications after kidney transplantation. *Urology.* 2013; 3: 107–111. (in Russ).

*Статья поступила в редакцию 9.01.2020 г.
The article was submitted to the journal on 9.01.2020*

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-118-122

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕВОСИМЕНДАНА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ ВА ЭКМО

С.В. Журавель, В.Э. Александрова, И.И. Уткина, Н.К. Кузнецова, Е.А. Тарабрин

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

Одним из наиболее грозных осложнений в раннем послеоперационном периоде после трансплантации легких является развитие сердечно-сосудистой недостаточности. В то же время опыт применения левосимендана в раннем периоде после трансплантации легких в настоящее время незначителен и остается дискуссионным. Представлен клинический случай успешного применения левосимендана у пациента с правожелудочковой сердечной недостаточностью при трансплантации легких в условиях использования центральной вено-артериальной экстракорпоральной мембранной оксигенации (ВА ЭКМО).

Ключевые слова: левосимендан, трансплантация легких, правожелудочковая сердечная недостаточность.

LEVOSIMENDAN IN LUNG TRANSPLANT RECIPIENTS ON VA-ECMO

S.V. Zhuravel', V.E. Aleksandrova, I.I. Utkina, N.K. Kuznetsova, E.A. Tarabrin

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russian Federation

Chronic heart failure is one of the most dreadful complications in the early postoperative period following lung transplantation. At the same time, the effect of using levosimendan in the early post-lung transplant period is currently insignificant and remains debatable. This paper presents a clinical case where levosimendan was successfully used in a patient with right ventricular heart failure during lung transplantation undergoing central venoarterial extracorporeal membrane oxygenation (VA-ECMO).

Keywords: levosimendan, lung transplantation, right ventricular heart failure.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация легких (ТЛ) выполняется пациентам с терминальными стадиями заболеваний органов дыхания, когда остальные методы лечения неэффективны [1–3].

В настоящее время, по данным Российского трансплантологического общества (РТО), ТЛ осуществляется в 4 центрах [4]. В НИИ СП им. Н.В. Склифосовского к 2019 году выполнено более 60 двусторонних трансплантаций легких. Ранний послеоперационный период у реципиентов легких может сопровождаться осложнениями, наиболее частыми из которых являются: кровотечения, дисфункция трансплантата, несостоятельность бронхиальных анастомозов. По данным литературы, в 20–30% случаях после ТЛ развивается острое почечное повреждение (ОПП),

с показаниями для проведения заместительной почечной терапии (ЗПТ), у 40% пациентов в раннем послеоперационном периоде регистрируются нейрокognитивные расстройства [5–8]. Одним из наиболее грозных осложнений является развитие сердечно-сосудистой недостаточности. У реципиентов легких часто встречается отсроченное восстановление функции правого желудочка (ПЖ) вследствие высокой легочной гипертензии, а также изолированная недостаточность левого желудочка (ЛЖ) с незначительным вовлечением ПЖ. В клинической практике интенсивной терапии левожелудочковой сердечной недостаточности (ЛЖСН) и клинически значимой дисфункции правого желудочка применяется левосимендан [9–11].

Для корреспонденции: Журавель Сергей Владимирович. Адрес: 129090, Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3. Тел. (495) 621-39-77. E-mail: zhsergey5@gmail.com

For correspondence: Zhuravel' Sergey Vladimirovich. Address: 3, Bolshaya Sukharevskaya sq., Moscow, 129090, Russian Federation. Tel. (495) 621-39-77. E-mail: zhsergey5@gmail.com

В то же время опыт применения левосимендана в раннем периоде после трансплантации легких в настоящее время незначителен и остается дискуссионным. Встречаются единичные случаи успешного применения левосимендана.

Представляем клинический случай успешного применения левосимендана у пациента с правожелудочковой сердечной недостаточностью при трансплантации легких в условиях использования центральной вено-артериальной экстракорпоральной мембранной оксигенации (ВА ЭКМО).

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациенту, 41 год, с диагнозом «нелангергансоклочный гистиоцитоз легких (легочная гипертензия 3-й степени)» успешно выполнена трансплантация легких в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского.

Интраоперационный мониторинг при ТЛ включал непрерывный контроль электрокардиограммы (ЭКГ), измерение частоты сокращений сердца (ЧСС), пульсоксиметрию (SpO_2), инвазивное измерение параметров центральной гемодинамики: артериального давления (сАД, дАД, срАД), центрального венозного давления (ЦВД) и давления в легочной артерии катетером Swan-Ganz (ДЛА, ДЗЛА/ДЗЛК, СВ).

Вводный наркоз проводили пропофолом (2 мг/кг), фентанилом (4 мкг/кг), цисатракуриумом безилатом (150 мкг/кг). После преоксигенации 100% кислородом пациент раздельно интубирован трубкой Роберт-Шоу (№ 37). Установлен режим вентиляции с поддержкой давлением (PSV). Мониторинг параметров вентиляции (МОД, ДО, ЧДД, пикового давления вдоха – Ppeak, положительного давления конца выдоха (ПДКВ, РЕЕР) и газообмена (FiO_2 , концентрацию ингаляционного анестетика) в дыхательном контуре проводили при помощи газоанализатора Drager Primus (Германия).

Поддержание анестезии осуществляли внутривенным введением цисатракуриума безилата в дозе 1,5 мкг/кг/мин и фентанила – 100–150 мкг/кг/мин, а также с использованием ингаляционного анестетика – десфлурана (МАК 1,0–1,4). Мониторинг глубины анестезии регистрировали с помощью биспектрального индекса (BIS). В лаборатории экспресс-диагностики проводили анализ показателей кислородного статуса (pO_2 , pCO_2 , ctO_2), показателей КОС артериальной крови (PH, $sHCO_3$) и электролитного состава крови (K, Na, Ca, Cl), а также гемоглобина и гематокрита.

После индукции в анестезию и на этапе пневмонэктомии справа показатели гемодинамики определялись стабильными (АД 140–110/90–75 мм рт. ст.) При этом систолическое давление в легочной артерии (ДЛА) определялось на уровне 102 мм рт. ст.

После пневмонэктомии справа отмечалась тенденция к гипотонии (АД – 75–80/41–52 мм рт. ст.), для коррекции которой на фоне возрастающей концентрации допамина (до 12,78 мкг/кг/мин) был подключен добутамин – 5 мкг/кг/мин и норадреналин



Рис. 1. Рентгенологическая картина до ТЛ

Fig. 1. X-ray picture before Lungs Transplant

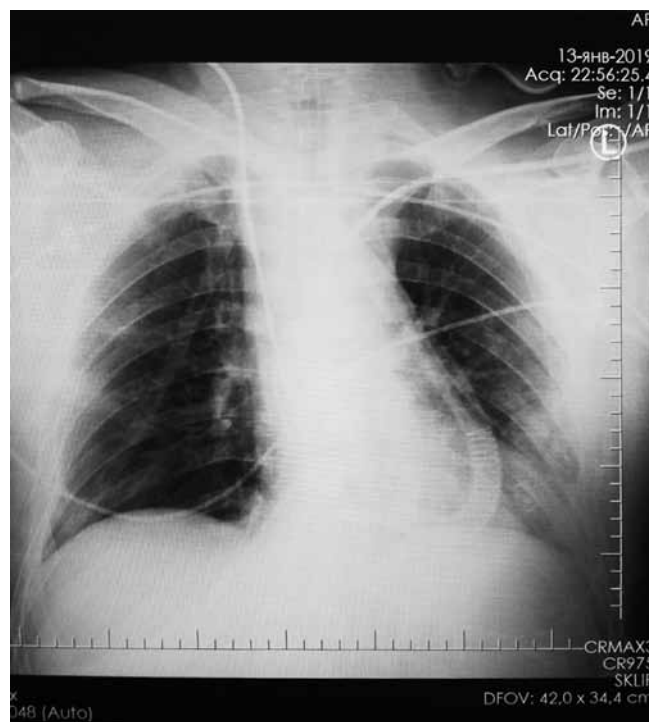


Рис. 2. Рентгенологическая картина после ТЛ

Fig. 2. X-ray picture post Lungs Transplant

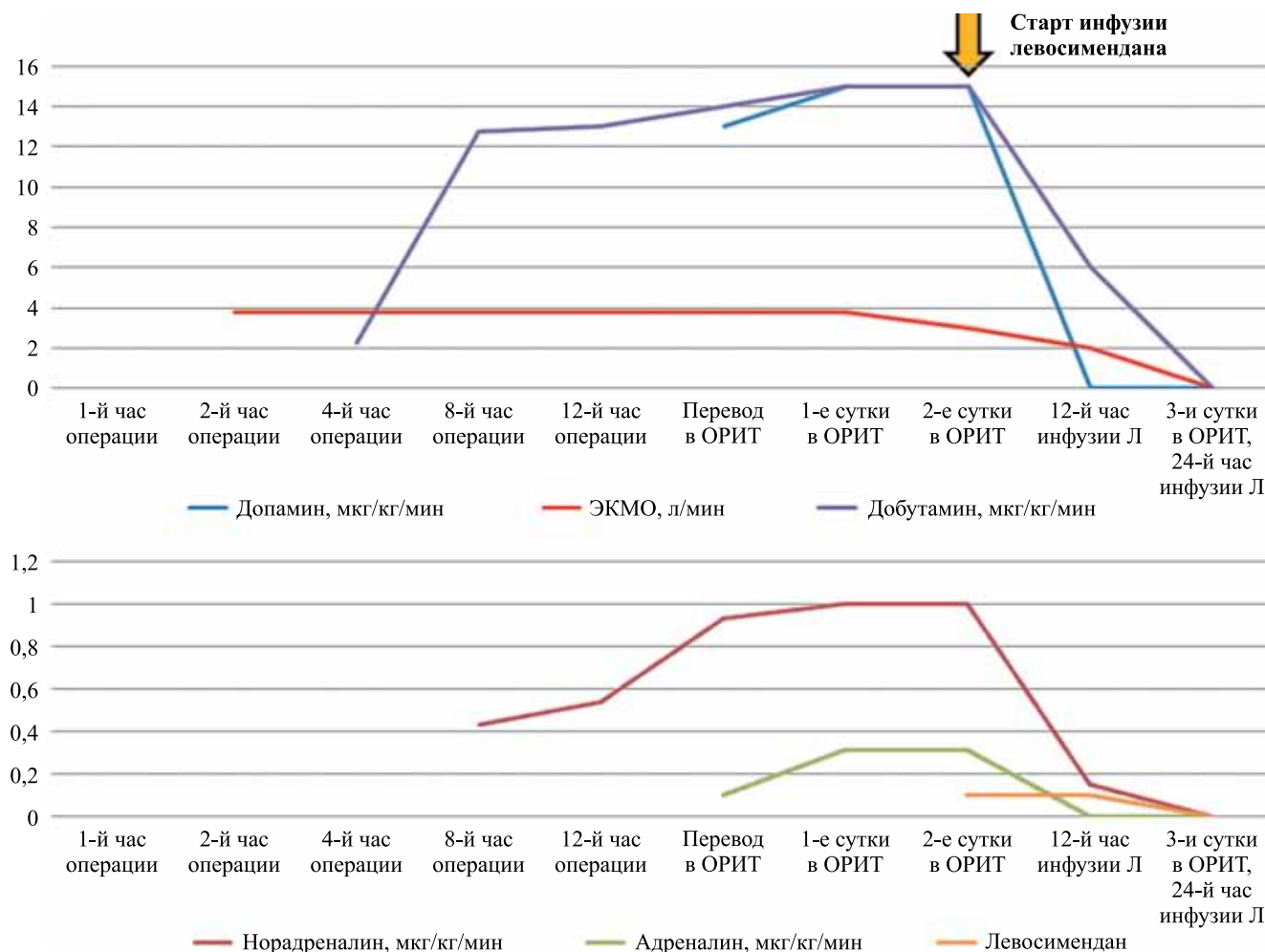


Рис. 3. Дозировка кардиотонических и инотропных препаратов в раннем послеоперационном периоде

Fig. 3. Dosage of cardiostimulant and inotropic agents in the early postoperative period

с постепенным увеличением дозы до 400 нг/кг/мин. Прогрессирование резистентной к кардиотоникам и вазопрессорам гипотонии, рост уровня лактата до 7 ммоль/л, гиперкапния (увеличение уровня pCO_2 до 85 мм рт. ст.) явились показанием к использованию вено-артериальной экстракорпоральной мембранной оксигенации (ВА ЭКМО), «центральной» подключение с производительностью 3,8 л/мин на аппарате Rotoflow (Maquet).

ТЛ была выполнена успешно. Время операции составило 13 часов 20 минут. По данным эндоскопического исследования, состояние бронхиальных анастомозов удовлетворительное. Интраоперационная кровопотеря составила 2000 мл. Пациент переведен в ОРИТ в условиях ВА ЭКМО с производительностью 4,0 л/мин.

В палате интенсивной терапии с целью стабилизации артериального давления потребовалось значительное увеличение доз кардиотоников и вазопрессоров. Так, норадреналин применяли в дозе 950 нг/кг/мин, добутамин – 14 мкг/кг/мин, допамин – 13 мкг/кг/мин, кроме того, к терапии был добавлен адреналин

в дозе 200 нг/кг/мин. SvO_2 регистрировали на уровне 55–65 при контроле в режиме online на аппарате Cardiohelp (Maquet). АД на фоне высоких доз на уровне 80–90/45–55 мм рт. ст., скорость потока ЭКМО увеличена до 4,5 л/мин.

На следующие, 2-е сутки послеоперационного периода к лекарственной терапии добавили непрерывную инфузию левосимендана со скоростью 0,1 мкг/кг/мин. Уже к 12-му часу после начала введения левосимендана отмечена положительная динамика. Так, дозы вводимых добутамина и норадреналина снижены до 6 мкг/кг/мин и 150 нг/кг/мин соответственно, допамин и адреналин были отменены: АД регистрировали на уровне 132–128/81–75 мм рт. ст. После завершения 24-часовой непрерывной инфузии левосимендана артериальное давление регистрировали в нормальных пределах (134–123/67–73 мм рт. ст.) без вазопрессорной и кардиотонической поддержки.

На третьи послеоперационные сутки в условиях операционной осуществили деканюляцию сосудов с остановкой ВА ЭКМО. Дальнейшее послеопера-

ционное ведение пациента проходило без значимых осложнений. Пациент выписан на 30-е сутки.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тяжелая легочная гипертензия является фактором риска развития правожелудочковой недостаточности в раннем послеоперационном периоде после двусторонней трансплантации легких. Устранение факторов, способствующих развитию и поддержанию ПЖ недостаточности, осуществляется комплексным подходом, а именно назначением поддерживающей терапии, увеличивающей сердечный выброс, коррекцией артериального давления, оптимизацией инфузионной терапии, снижением постнагрузки на ПЖ, профилактикой и лечением аритмий и инфекционных осложнений, а также применением агрессивных методов лечения, включая продолженное ВА ЭКМО в послеоперационном периоде [12, 13].

Механизм действия левосимендана основан на увеличении тропности кардиомиоцитов к кальцию. Способность к сокращению миоцита начинается с изменения конфигурации сердечного тропонина С под влиянием ионов кальция. В начале систолы левосимендан избирательно связывается насыщенным кальцием сердечным тропонином С, что приводит к стабилизации конформации этого белка, запускающей сокращение миофибрилл. В результате этого взаимодействия связь поперечных миозиновых мостиков с актином удлиняется, что приводит как к усилению силы мышечного сокращения, так и к росту количества связей в единицу времени. Следует отметить, что влияние левосимендана обратимо. Так, в диастолу при более низких концентрациях кальция лекарственное средство «освобождает» тропонин С, и как следствие, сохраняется расслабление миокарда [14].

В эксперименте на здоровых животных была продемонстрирована способность левосимендана увеличивать сократимость правого желудочка без значимого влияния на легочное сосудистое сопротивление [15]. Следует отметить еще один механизм действия левосимендана, который позволяет открывать АТФ-зависимые калиевые каналы в гладких мышцах сосудистой стенки и митохондриях. Клиническим результатом является расширение коронарных артерий и снижение давления в малом круге кровообращения [16].

Таким образом, на наш взгляд, снижение постнагрузки за счет расширения легочных сосудов в сочетании с адекватной преднагрузкой и кардиотоническим эффектом левосимендана способствовали постепенному восстановлению сердечного выброса и нормализации артериального давления.

ВЫВОДЫ

24-часовая непрерывная инфузия левосимендана привела к стабилизации гемодинамики без индукции аритмий. Данный препарат можно использовать у пациентов, перенесших ТЛ, с послеоперационной правожелудочковой недостаточностью и легочной артериальной гипертензией для получения значительного снижения систолического давления в ЛА, увеличения ударного объема сердца.

Кардиопротективные свойства левосимендана в сочетании с ВА ЭКМО, вазопрессорной поддержкой и оптимизацией инфузионной терапии позволили компенсировать явления сердечно-сосудистой недостаточности, легочной гипертензии в раннем послеоперационном периоде.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG et al. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 2005; 112: 154–235.
2. Forrest P. Anaesthesia and right ventricular failure. *Anaesth Intensive Care*. 2009 May; 37 (3): 370–385.
3. Carillo C, Pecoraro Y, Anile M, Mantovani S, Oliva A, D'Abramo A et al. Evaluation of Renal Function in Patients Undergoing Lung Transplantation. *Transplant Proc*. 2017 May; 49 (4): 699–701. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.02.036.
4. Sher Y, Mooney J, Dhillon G, Lee R, Maldonado JR. Delirium after lung transplantation: Association with recipient characteristics, hospital resource utilization, and mortality. *Clin Transplant*. 2017 May; 31 (5). doi: 10.1111/ctr.12966. Epub 2017 Apr 11.
5. Cheng TZ, Choi KJ, Honeybrook AL, Zakare-Fagbami RT, Gray AL, Snyder LD et al. Decreased Antibiotic Utilization After Sinus Surgery in Cystic Fibrosis Patients With Lung Transplantation. *Am J Rhinol Allergy*. 2019 July; 33 (4): 354–358. doi: 10.1177/1945892419830624.
6. Missant C, Rex S, Segers P, Wouters PF. Levosimendan improves right ventriculovascular coupling in a porcine model of right ventricular dysfunction. *Crit Care Med*. 2007; 35: 707–715.
7. Bartolome SD, Torres F. Severe pulmonary arterial hypertension: stratification of medical therapies, mechanical support, and lung transplantation. *Heart Fail*

- Rev. 2016; 21 (3): 347–356. doi: 10.1007/s10741-016-9562-7.
8. Leather HA, Ver Eycken K, Segers P, Herijgers P, Vandermeersch E, Wouters PF. Effects of levosimendan on right ventricular function and ventriculovascular coupling in open chest pigs. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2339–2343.
 9. Cavusoglu Y, Beyaztas A, Birdane A, Ata N. Levosimendan and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2010 Jul; 11 (7): 478–480. doi: 10.2459/JCM.0b013e32833a0a0b.
 10. Cavusoglu Y, Tek M, Birdane A, Ata N, Demirustu C, Gorenek B et al. Both levosimendan and dobutamine treatments result in significant reduction of NT-proBNP levels, but levosimendan has better and prolonged neurohormonal effects than dobutamine. *Int J Cardiol.* 2008; 127: e188–e191.
 11. Chanchlani R, Joseph Kim S, Kim ED, Banh T, Borges K, Vasilevska-Ristovska J et al. Incidence of hyperglycemia and diabetes and association with electrolyte abnormalities in pediatric solid organ transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant.* 2017 Sep; 32 (9): 1579–1586. Published online 2017 Jul 27. doi: 10.1093/ndt/gfx205.
 12. Хубутія МШ, Тарабрін ЕА, Журавель СВ і др. Опыт применения экстракорпоральной мембранной оксигенации для обеспечения двусторонней трансплантации легких. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2014; 2: 66–74. Khubutiya MSh, Tarabrin EA, Zhuravel' SV i dr. Opyt primeneniya ekstrakorporal'noy membrannoy oksigenatsii dlya obespecheniya dvustoronney transplantatsii legkikh. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2014; 2: 66–74.
 13. Hoeper MM, Benza RL, Corris P, de Perrot M, Fadel E, Keogh AM et al. Intensive care, right ventricular support and lung transplantation in patients with pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2019 Jan; 53 (1): 1801906. doi: 10.1183/13993003.01906-2018.
 14. Sundberg S, Lilleberg J, Nieminen MS et al. Hemodynamic and neurohumoral effects of levosimendan, a new calcium sensitizer, at rest and during exercise in healthy men. *Am J Cardiol.* 1995; 75: 1061–1066.
 15. Leather HA, Ver Eycken K, Segers P et al. Effects of levosimendan on right ventricular function and ventriculovascular coupling in open chest pigs. *Crit Care Med.* 2003; 31: 2339–2343.
 16. Sonntag S, Sundberg S, Lehtonen LA, Kleber FX. The calcium sensitizer levosimendan improves the function of stunned myocardium after percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute myocardial ischemia. *JACC.* 2004; 43: 2177–2182.

Статья поступила в редакцию 8.08.2019 г.
The article was submitted to the journal on 8.08.2019

ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИЯ ФРАГМЕНТА ДОНОРСКОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО МАТРИКСА

А.С. Пономарева¹, Л.А. Кирсанова¹, Н.В. Баранова¹, В.А. Сургученко¹, Г.Н. Бубенцова¹, Ю.Б. Басок¹, И.А. Милосердов^{1, 2}, В.И. Севастьянов¹

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

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

Одной из актуальных задач тканевой инженерии является получение искусственного матрикса, способного имитировать для клеток микроокружение биологической среды. Таким матриксом при создании биоинженерной конструкции поджелудочной железы (ПЖ) может быть тканеспецифический каркас, полученный из децеллюляризованной ткани ПЖ. **Цель:** получение и исследование характеристических свойств тканеспецифического каркаса поджелудочной железы из децеллюляризованных фрагментов панкреатической ткани человека. **Материалы и методы.** Протокол децеллюляризации включал в себя 3 цикла замораживания и оттаивания фрагментов ПЖ с последующей обработкой поверхностно-активными веществами – додецилсульфатом натрия и Тритоном X100. На каждом этапе децеллюляризации проводили рутинное окрашивание образцов гематоксилином и эозином и на общий коллаген. Дополнительно проводили иммуногистохимический анализ срезов децеллюляризованной ПЖ человека (ДПЖч) на коллаген I типа и эластические волокна. Ядра клеток в исходных образцах и полученном матриксе визуализировали, используя флуоресцентное окрашивание DAPI. Определяли количество ДНК в нативной и децеллюляризованной ткани ПЖ. Цитотоксичность тканеспецифического матрикса оценивали *in vitro* методом прямого контакта. Матриксные свойства образцов ДПЖч определяли с использованием МСК жировой ткани человека. **Результаты.** Предложен способ децеллюляризации ПЖ, позволяющий получение тканеспецифического матрикса в виде соединительно-тканного каркаса, полностью свободного от детрита с сохраненной тонковолокнистой сетевидной структурой, в которой выявлены эластические и коллагеновые волокна, в том числе коллагена I типа. Окрашивание DAPI подтверждало отсутствие ядерного материала в децеллюляризованном матриксе, а остаточное количество ДНК не превышало 0,1%. Доказано отсутствие цитотоксичности матрикса и его способность поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч. **Заключение.** Как один из этапов создания биоинженерной конструкции ПЖ, разработан способ получения биосовместимого (отсутствие цитотоксичности и иммуногенности) тканеспецифического каркаса из децеллюляризованной панкреатической ткани человека с сохранением морфофункциональных свойств нативного внеклеточного матрикса ПЖ и обеспечивающего адгезию и пролиферацию клеточных культур.

Ключевые слова: поджелудочная железа, децеллюляризация, тканеспецифический каркас, тканевая инженерия.

Для корреспонденции: Пономарева Анна Сергеевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

For correspondence: Ponomareva Anna Sergeevna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel.: (499) 196-26-61; (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

DECELLULARIZATION OF DONOR PANCREATIC FRAGMENT TO OBTAIN A TISSUE-SPECIFIC MATRIX SCAFFOLD

A.S. Ponomareva¹, L.A. Kirsanova¹, N.V. Baranova¹, V.A. Surguchenko¹, G.N. Bubentsova¹, Yu.B. Basok¹, I.A. Miloserdov^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

One of the pressing issues in tissue engineering is on how to obtain an artificial matrix that can simulate a biological microenvironment for cells. When creating a bioengineered pancreatic construct, a tissue-specific scaffold obtained from decellularized pancreatic tissue can serve as such matrix. **Objective:** to obtain and study the characteristic properties of a tissue-specific pancreas scaffold from decellularized human pancreatic fragments. **Materials and methods.** The decellularization protocol included 3 freeze/thaw cycles, followed by treatment with surfactants (sodium dodecyl sulfate and Triton X100). At each decellularization stage, samples were routinely stained with hematoxylin and eosin and for total collagen. In addition, immunohistochemical staining of decellularized human pancreas (DHP) for type I collagen and elastic fibers was performed. Cell nuclei in the original samples and the resulting matrix were visualized using DAPI fluorescent staining. DNA quantity in the native and decellularized pancreatic tissue was determined. The cytotoxicity of the tissue-specific matrix was evaluated *in vitro* by direct contact. The matrix properties of DHP samples were determined using mesenchymal stem cells (MSCs) of human adipose tissue. **Results.** A pancreatic decellularization method is proposed. This method allows to obtain a tissue-specific matrix in the form of a connective tissue scaffold completely free of detritus with preserved thin-fiber mesh-like structure, in which elastic and collagen fibers, including type I collagen, are identified. DAPI staining confirmed the absence of nuclear material in the decellularized matrix, while residual amount of DNA did not exceed 0.1%. Absence of matrix cytotoxicity and its ability to maintain adhesion and proliferation of human adipose tissue-derived MSCs was proved. **Conclusion.** As one of the stages in creating a bioengineered pancreatic construct, a method has been developed for producing a biocompatible (lack of cytotoxicity and immunogenicity) tissue-specific scaffold from decellularized human pancreatic tissue. In the scaffold, the morphofunctional properties of the native extracellular matrix-based scaffolds of the pancreas are preserved. Adhesion and proliferation of cell cultures are ensured.

Keywords: pancreas, decellularization, tissue-specific scaffold, tissue engineering.

ВВЕДЕНИЕ

Инсулинозависимый сахарный диабет является хроническим заболеванием, возникающим в результате истощения популяции β -клеток вследствие аутоиммунного повреждения. Современные исследования направлены на восполнение популяции β -клеток путем создания биоинженерных эквивалентов поджелудочной железы, состоящих из β -клеток, стволовых клеток или изолированных островков Лангерганса и матрикса-носителя, обеспечивающего более длительное выживание и эффективное функционирование трансплантируемых клеток. В качестве матриксов используют материалы различной природы, обладающие определенными физико-механическими, биологическими и функциональными свойствами, такими как биосовместимость, отсутствие иммуногенности, механическая прочность и эластичность, способность к биодеградации и т. д. [1]. Важным свойством матриксов для тканевой инженерии является имитация сигналов нативной микросреды, т. е. тканеспецифичность.

Не вызывает сомнения тот факт, что наиболее подходящим для клеток остается «родной» матрикс

с характерными особенностями структуры и состава. Для получения тканеспецифического матрикса органы и ткани подвергают децеллюляризации для удаления ДНК, клеточного материала и клеточных поверхностных антигенов с помощью ряда методов, использующих химическую, ферментативную или механическую обработку [2]. Протоколы децеллюляризации должны быть разработаны с учетом таких факторов, как плотность и толщина исходной ткани, количество клеток, содержание липидов [2, 3].

Внеклеточный матрикс (ВКМ) представляет собой полипептидные цепи коллагена, ламинина, фибронектина и эластина, переплетенные с полисахаридными цепями – гликозаминогликанами [4]. Обычно коллагены обеспечивают структурную жесткость и сцепление тканей, поддержку целостности и формы, структуры органа; эластины обеспечивают прочность, упругость и растяжимость ткани. Кроме того, фибронектин, фибриллин и ламинин участвуют в ремоделировании цитоскелета, сократительной способности и дифференциальной клеточной адгезии [4].

Состав и организация ВКМ варьируется от ткани к ткани, однако основная функция всех ВКМ заключается в обеспечении механической поддержки клеток и поддержании множества биологических функций, таких как жизнеспособность и рост клеток. В поджелудочной железе ВКМ, в составе которого определяется коллаген I, III, IV, V и VI типа, эластин, а также ламинин и фибронектин, регулирует основные аспекты биологии островков, включая развитие, морфологию и дифференцировку, внутриклеточную передачу сигналов, экспрессию генов, адгезию и миграцию, пролиферацию, секрецию и выживаемость [4, 5]. Взаимодействия клетка–матрикс важны для того, чтобы зрелые β -клетки оставались функциональными и избегали апоптоза, а также для поддержания функциональной массы β -клеток [6]. Во время процесса выделения островки часто лишаются значительной части ВКМ и васкулярной сети, что в дальнейшем негативно сказывается на жизнеспособности изолированных ОЛ. Показано, что островки, которые частично сохраняют ВКМ после выделения, демонстрируют снижение скорости апоптоза и значительно лучше поддерживают секрецию инсулина, чем более агрессивно очищенные островки [4].

Учитывая, насколько существенную роль играет ВКМ в обеспечении жизнеспособности и функционирования ОЛ, в процессе децеллюляризации важно не только освободить матрикс от клеточного компонента, но и по возможности максимально сохранить неизменными структуру и состав ВКМ. В дальнейшем такой матрикс может быть рецеллюляризован соответствующими типами клеток с перспективой получения тканевого эквивалента ПЖ с определенными функциональными свойствами [6].

Матрикс поджелудочной железы как целого органа был получен от мышей [7, 8], крыс [9], свиней [6, 10] и человека [11]. Однако восстановление сосудистой сети таких интактных децеллюляризованных каркасов органов является сложной задачей. Альтернативный подход, который особенно актуален для эндокринного трансплантата островков, заключается в объединении клеток с децеллюляризованным матриксом, полученным из фрагмента поджелудочной железы [3]. Такая стратегия может быть перспективна для приложений тканевой инженерии из-за простоты ее использования.

В нашем исследовании мы изучили возможность получения тканеспецифического матрикса ПЖ, используя для децеллюляризации небольшие фрагменты панкреатической ткани. Такой подход позволяет повысить эффективность децеллюляризации, полноценно заселить клетками весь объем децеллюляризованного матрикса, упростить доставку кислорода и питательных веществ к донорским клеткам, в том числе в глубине матрикса, значительно снизить стоимость процедуры децеллюляризации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходный материал

В работе использовали хвостовую часть ПЖ, полученную в результате мультиорганного забора органов посмертных доноров ($n = 6$) и не пригодную для трансплантации (возраст доноров 34–63 года).

Децеллюляризация ПЖ

Для повышения эффективности децеллюляризации в протокол исследования был введен цикл замораживания–оттаивания с целью деструкции клеток ткани на предварительном этапе. Фрагменты донорской поджелудочной железы подвергали 1, 2 или 3 циклам замораживания при -80°C и оттаивания до $+37^{\circ}\text{C}$ с последующим механическим измельчением ткани до $1 \times 1 \times 1$ мм. Далее фрагменты ткани обрабатывали в трех сменах буферного раствора ($\text{pH} = 7,4$), содержащего растворы 0,1% додецилсульфата натрия и повышающую концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) (Sigma, США). В каждом растворе образец находился в течение суток при комнатной температуре в условиях постоянного перемешивания со скоростью 2 об/мин на роллерной системе CellRoll (INTEGRABiosciencesAG, Швейцария). При смене растворов мелкодисперсный матрикс фильтровали с применением металлического сита (диаметр ячеек 0,4–0,6 мм) и возвращали в раствор с более высокой концентрацией Тритон X100.

По окончании процесса децеллюляризации фрагменты ПЖч тщательно отмывали от остатков поверхностно-активных агентов в течение 72 часов в фосфатном буферном растворе с добавлением антибиотика/антимикотика. Отмытые фрагменты ПЖч вносили в криопробирки, замораживали и подвергали γ -стерилизации (1,5 Мрад).

Гистологическое исследование

На каждом этапе децеллюляризации с целью контроля эффективности процесса часть материала 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 получали с помощью микротомы RM2245 (Leica, Германия) и в дальнейшем окрашивали гематоксилином и эозином, на общий коллаген (метод Массона) и на эластические волокна (метод Унны–Тенцера), ядра клеток визуализировали флуоресцентным окрашиванием DAPI (Sigma, США). Кроме того, проводили постановку иммуногистохимической реакции на коллаген I типа, используя anti-collagen I antibody (Abcam, Великобритания) и систему визуализации Rabbit Specific HRP|DAB (ABC) Detection IHCkit (Abcam, Великобритания).

Определение общего количества ДНК в матриксе

Остаточное количество ДНК служит индикатором сохранившихся в децеллюляризованном матриксе клеточных компонентов, несущих основную долю антигенов, обеспечивающих реакцию отторжения трансплантата [12].

Перед исследованием образцы хранили при температуре -20°C . Выделение ДНК проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя.

Для количественного определения двухцепочечной ДНК использовали флуоресцентный краситель TM Picogreen Quant-iT (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Кратко, 50 мкл лизата исследуемого образца разбавляли в пропорции 1:1 буферным раствором TE, а затем добавляли к 100 мкл раствора красителя. В течение 5 минут полученный раствор инкубировали при комнатной температуре без доступа света, далее образцы активировали излучением с длиной волны 480 нм и затем анализировали на ридере для микропланшетов Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 520 нм. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага λ (Invitrogen, США) (0 нг/мл – 1000 нг/мл).

Исследование цитотоксичности матрикса

Цитотоксичность образцов матрикса в виде фрагментов децеллюляризованной ткани поджелудочной железы человека в условиях *in vitro* оценивали методом прямого контакта согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-5-2011 на культуре фибробластов мыши линии L929 [13]. Отрицательным контрольным образцом служила культуральная среда с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, HyClone, SV30160.03, США). Положительным контрольным образцом – стандарт цинка одноэлементный водный 10 000 мкг/мл (Sigma-Aldrich, США). Все процедуры проводили в асептических условиях. Мониторинг культуры осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Eclipse TS100 (Nikon, Япония).

Метаболическую активность фибробластов после контакта с образцами матрикса определяли через 24 ч с помощью реагента prestoBlue TM Cell Viability Reagent (Invitrogen TM , США) согласно протоколу, рекомендуемому производителем. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшетов Spark 10M с программным обеспечением SparkControl TM Magellan V1.2.20 на длинах волн 570 и 600 нм.

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения

Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения \pm среднее квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Исследование функциональных свойств матрикса

Функциональные свойства матрикса ДПЖч относительно его способности поддерживать адгезию, пролиферацию и дифференцировку клеток исследовали на культуре мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Посев МСК ЖТч (II пассаж) производили из расчета 15×10^4 клеток/10 мг матрикса. Через 6 суток культивирования несколько образцов были отобраны для оценки жизнеспособности МСК ЖТч с помощью набора LIVE/DEAD ® Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular probes ® by Life technologies TM , США). А через 15 суток культивирования оставшиеся образцы матрикса с клетками были зафиксированы в 10% забуференном формалине для дальнейшего гистологического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологический анализ нативной ПЖ

Проведенное морфологическое исследование нативной ПЖ выявило, что три исследованные железы имели признаки выраженного липоматоза, в то время как в трех других железах были обнаружены признаки диффузного фиброза панкреатической ткани (рис. 1).

Гистологический анализ ткани с липоматозом на разных этапах децеллюляризации фрагментов ПЖ

Было исследовано 3 серии образцов нативной ПЖ с признаками липоматоза, отличающихся количеством циклов замораживания и оттаивания. Проведенное гистологическое исследование показало, что на начальном этапе обработки – после однократного замораживания – в ткани ПЖ с липоматозом наблюдали частичное повреждение клеток панкреатической паренхимы, выражающееся в деструкции, прежде всего клеток ацинарной ткани. При этом границы между клетками непосредственно в ацинусах выглядели стертыми, размытыми, а клеточные ядра не визуализировались или были пикнотичными. Однако контуры ацинусов еще четко определялись. Островки Лангерганса в целом выглядели структурно более сохранными, хотя отмечалась гиперхромность значительной части ядер инсулоцитов. Следует отметить, что процесс деструкции клеток на данном этапе не носил глобального характера и захватывал не более 50% исследуемого фрагмента панкреатической ткани (рис. 2, а, б).

Фрагменты ПЖ с липоматозом, подвергшиеся двум циклам замораживания–оттаивания, в значительной степени отличались по морфологическим признакам от предыдущей серии образцов. Прежде

всего это касалось тотального распространения процесса клеточной деструкции на весь тканевой фрагмент. Не наблюдали даже частичного сохранения морфологических признаков первоначальной струк-

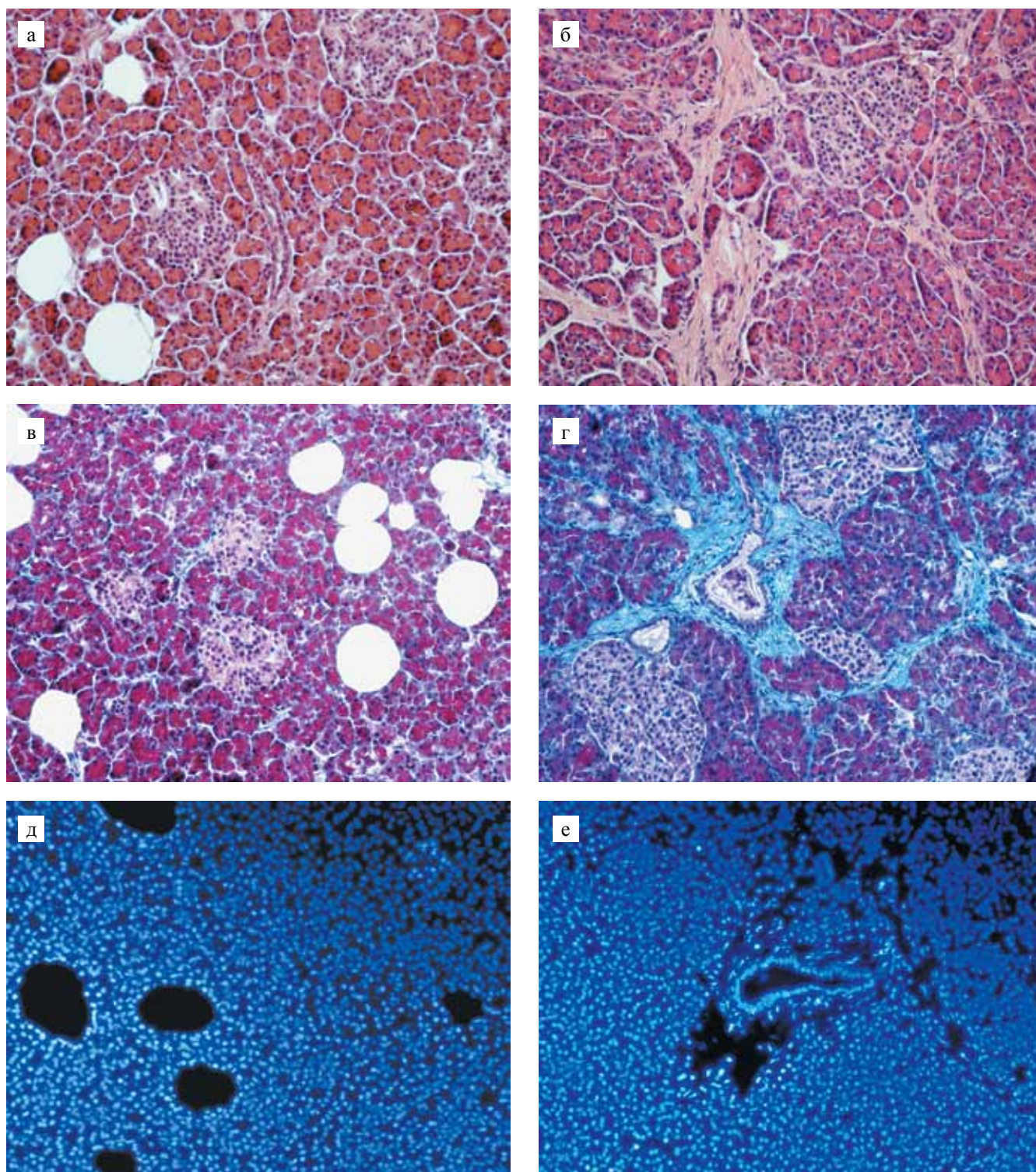


Рис. 1. Гистологическая картина поджелудочной железы человека: а, в, д – нативная донорская поджелудочная железа с признаками липоматоза; б, г, е – нативная донорская поджелудочная железа с признаками фиброза; а, б – гематоксилин и эозин; в, г – метод Массона; д, е – окрашивание клеточных ядер DAPI. $\times 200$

Fig. 1. The histological presentation of human pancreas: а, в, д – native donor pancreas with lipomatosis features; б, г, е – native donor pancreas with fibrosis features; а, б – hematoxylin and eosin; в, г – Masson's method; д, е – nuclear DAPI staining. $\times 200$

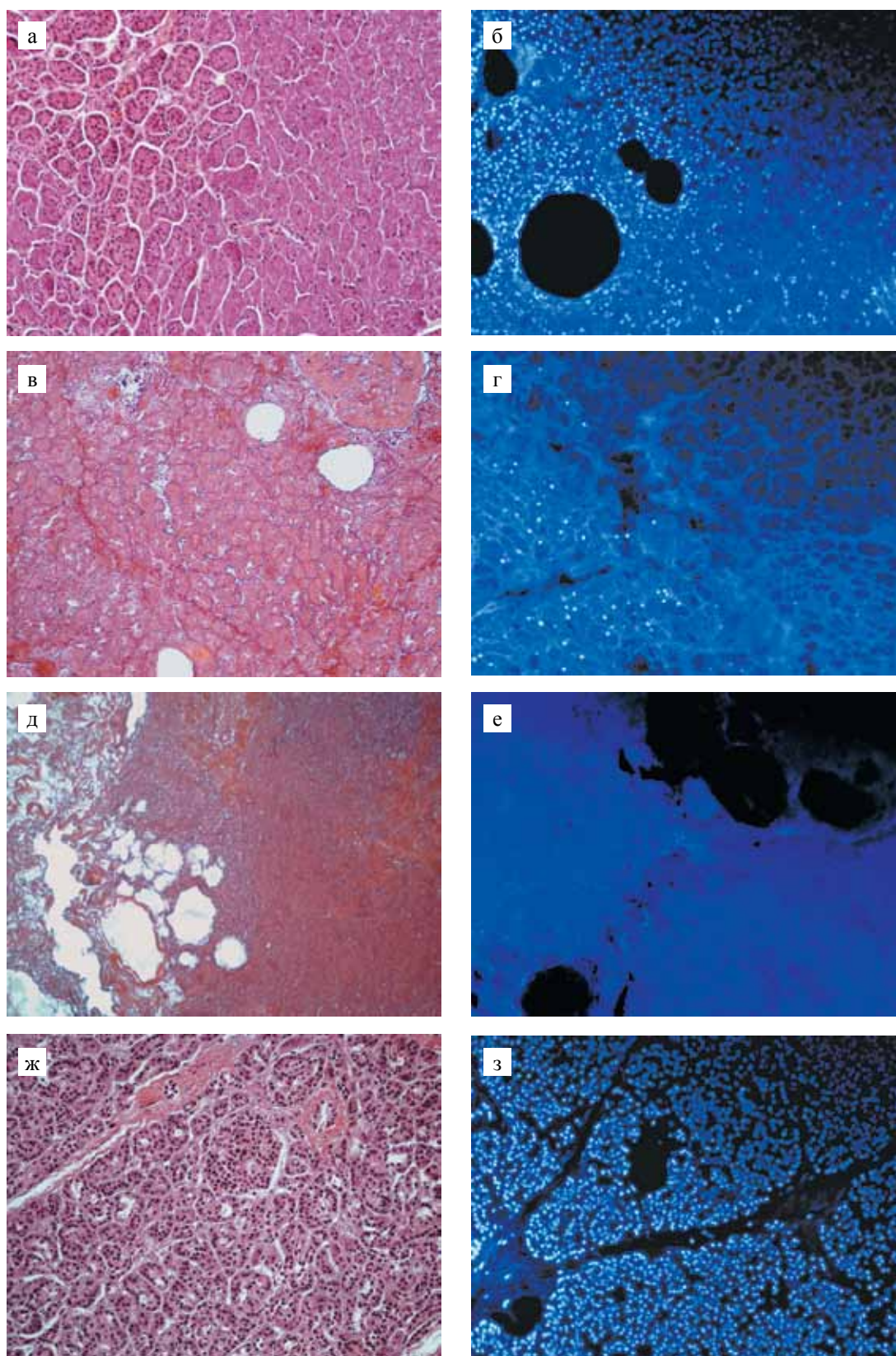


Рис. 2. Гистологическая картина ткани поджелудочной железы после последовательных циклов замораживания–оттаивания: а, б – 1 цикл замораживания до -80°C и оттаивания до $+37^{\circ}\text{C}$; в, г – 2 цикла; д, е – 3 цикла замораживания–оттаивания ПЖ с липоматозом; ж, з – 3 цикла замораживания–оттаивания ПЖ с фиброзом; а, в, д, ж – гематоксилин и эозин; б, г, е, з – окрашивание ядер DAPI. $\times 200$

Fig. 2. The histological presentation of pancreatic tissue after successive cycles of freezing and thawing: а, б – 1 cycle of freezing up to -80°C and thawing up to $+37^{\circ}\text{C}$; в, г – 2 cycles; д, е – 3 cycles of freezing and thawing of pancreas with lipomatosis; ж, з – 3 cycles of freezing and thawing of pancreas with fibrosis; а, в, д, ж – hematoxylin and eosin; б, г, е, з – nuclear DAPI staining. $\times 200$

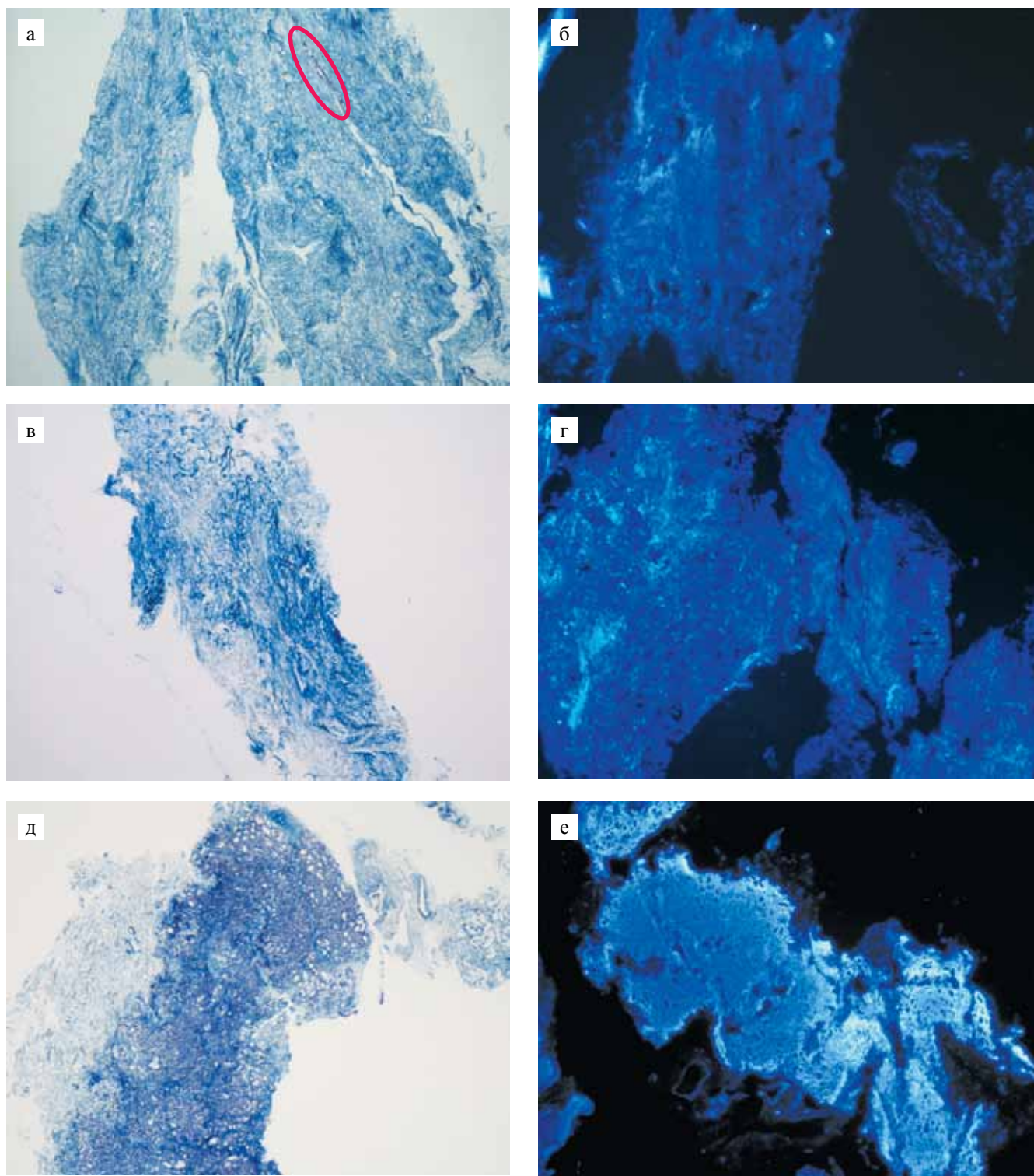


Рис. 3. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы (ДПЖ): а, б – ДПЖ с липоматозом после 2 циклов замораживания–оттаивания, красным овалом отмечен участок с микрофрагментами клеточного детрита; в, г – ДПЖ с липоматозом после 3 циклов замораживания–оттаивания; д, е – ДПЖ с фиброзом после 3 циклов замораживания–оттаивания; а, в, д – метод Массона; б, г, е – окрашивание ядер DAPI. $\times 100$

Fig. 3. The histological presentation of decellularized pancreas (DP): а, б – DP with lipomatosis after 2 cycles of freezing and thawing, the red oval marks the area with microfragments of cellular detritus; в, г – DP with lipomatosis after 3 cycles of freezing and thawing; д, е – DP with fibrosis after 3 cycles of freezing and thawing; а, в, д – Masson's method; б, г, е – nuclear DAPI staining. $\times 100$

туры панкреатической ткани: ацинусы, островки, их фрагменты не были обнаружены. В образцах определяли лишь разбросанные в толще одиночные сохранившиеся клетки или отдельные пикнотичные ядра. Строма при этом обильно маскировалась мелкими зернами клеточного детрита (рис. 2, в, г). Было принято решение использовать полученные таким способом образцы для дальнейшей обработки поверхностно-активными агентами с целью получения очищенного ВКМ ПЖ. В результате проведенной децеллюляризации соединительно-тканый каркас удалось извлечь от основной массы детрита и получить образцы, характеризующиеся тонковолокнистой ажурной структурой, где, однако, локально выявляли минимальное включение зерен клеточного детрита (рис. 3, а, б).

В образцах фрагментов ПЖ с липоматозом после трех последовательных циклов замораживания–оттаивания в отличие от ранее исследованных образцов сохранившиеся клетки, клеточные ядра, продукты кариорексиса не обнаруживали. При этом строма маскировалась мелкодисперсными фрагментами детрита (рис. 2, д, е).

В ходе последующей децеллюляризации ткани с липоматозом после трех циклов замораживания–оттаивания наблюдали практически полное удаление зерен детрита (рис. 3, г), и как результат, получение очищенного тонковолокнистого матрикса, в котором при окрашивании по методу Массона отчетливо выявляли синие коллагеновые волокна (рис. 3, в). Проведенное иммуногистохимическое окрашивание также подтвердило наличие в составе ВКМ коллагена I типа, являющегося важнейшей составляющей

матрикса панкреатической ткани (рис. 3, а). При окрашивании орсеином выявляли красно-коричневые эластические волокна (рис. 3, б). Данные результаты свидетельствуют о сохранности основных фибриллярных белков матрикса панкреатической ткани.

Гистологический анализ ткани с фиброзом на разных этапах децеллюляризации фрагментов ПЖ

Уже на первых этапах обработки поджелудочной железы с фиброзом было выявлено значительное различие в гистологической картине от ПЖ с липоматозом – даже после трех циклов замораживания–оттаивания во фрагментах ткани сохранялось значительное количество клеток с пикнотичными ядрами (рис. 2, ж, з).

Тем не менее была проведена дальнейшая обработка поверхностно-активными агентами таких образцов, чтобы подтвердить предположение о непригодности разработанного протокола децеллюляризации для поджелудочной железы с диффузным фиброзом. Действительно, в полученных образцах присутствуют участки с большим количеством сохранившихся клеток и ядер (рис. 3, д, е), в то время как при аналогичной обработке поджелудочной железы с липоматозом удается получить хорошо очищенный тонковолокнистый матрикс.

Определение общего количества ДНК в матриксе ДПЖ

Количественный анализ показал, что при децеллюляризации поджелудочной железы с диффузным

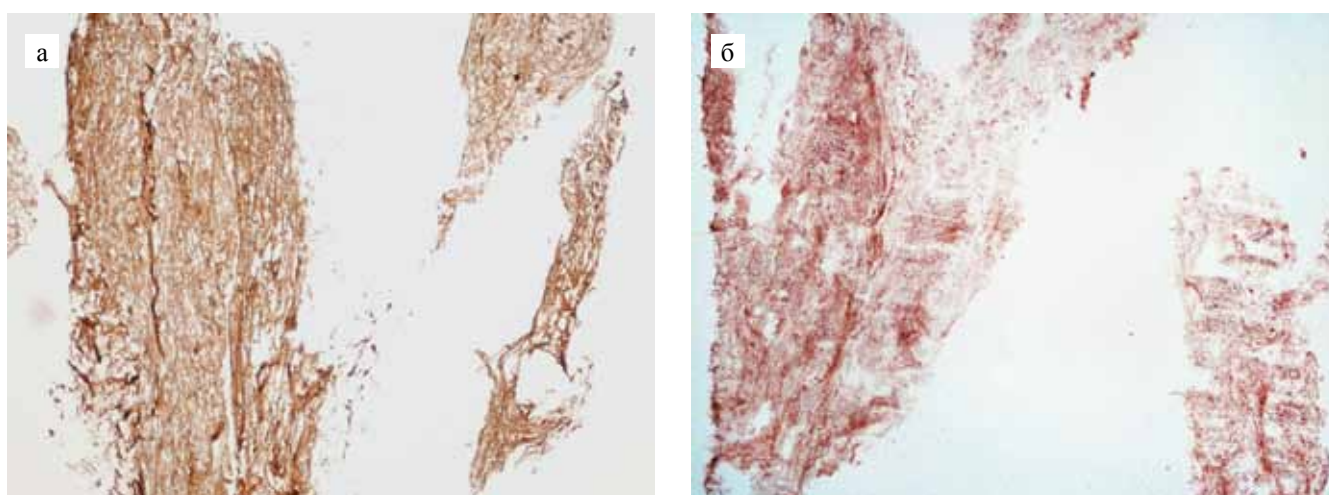


Рис. 4. Гистологическая картина децеллюляризованной поджелудочной железы с липоматозом: а – иммуногистохимическое окрашивание демонстрирует наличие в составе матрикса коллагена I типа; б – окрашивание по методу Унны–Тенцера выявляет наличие эластических волокон в матриксе. ×100

Fig. 4. The histological presentation of decellularized pancreas with lipomatosis: а – immunohistochemical staining demonstrates the presence of type I collagen in the matrix; б – Unna–Tenzer staining reveals the presence of elastic fibers in the matrix. ×100

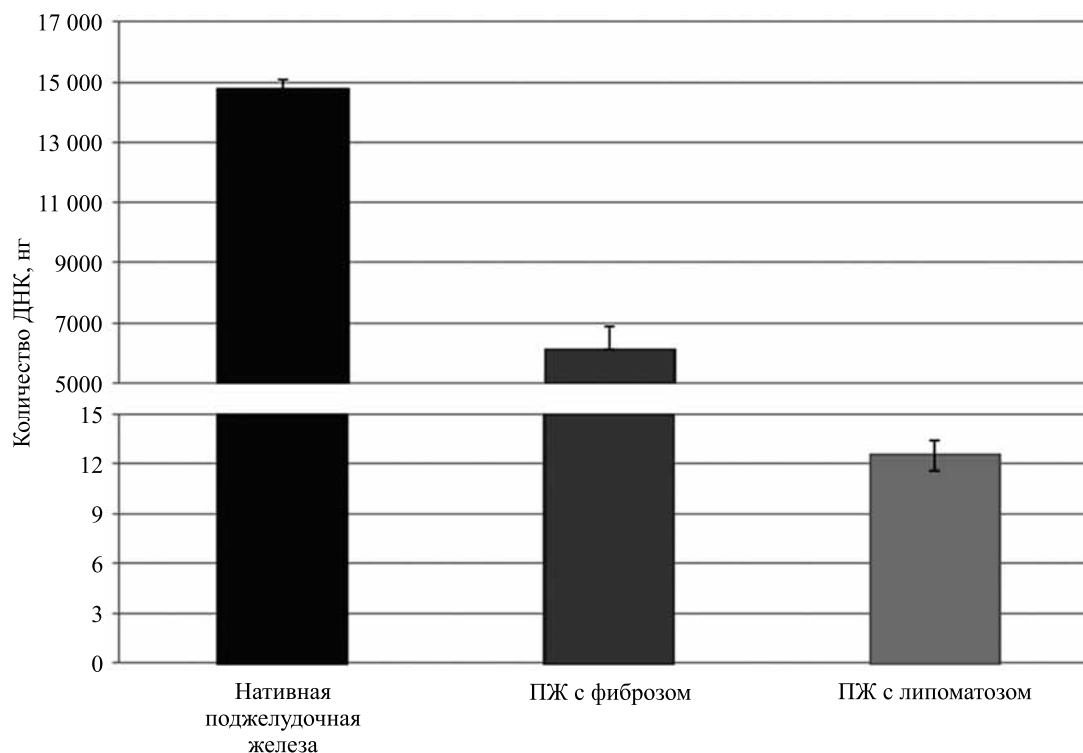


Рис. 5. Сравнительный анализ количественного содержания ДНК в нативной ткани, в поджелудочной железе с фиброзом и с липоматозом после децеллюляризации

Fig. 5. Quantification of DNA content in native tissue, in the pancreas with fibrosis and with lipomatosis after decellularization

фиброзом, согласно разработанному протоколу, в ткани сохранялось $6128,3 \pm 718,0$ нг ДНК/мг ткани (41,5% ДНК). При этом после децеллюляризации поджелудочной железы с липоматозом нам удалось очистить ткань от ДНК в значительной степени ($p < 0,05$): содержание ДНК снизилось с $14782,2 \pm 319,9$ до $12,6 \pm 0,9$ нг/мг ткани (рис. 5), что составляет 0,1% ДНК и свидетельствует о высокой эффективности разработанного протокола децеллюляризации и низкой иммуногенности полученного матрикса соответственно.

Исходя из полученных результатов, для дальнейших исследований использовали матриксы ДПЖч, полученные по предложенному протоколу децеллюляризации только для фрагментов ПЖ с выявленными признаками липоматоза.

Цитотоксичность матрикса ДПЖч

Анализ результатов проводили согласно оценочной шкале степени ответной реакции клеток после инкубации с образцами матриксов в соответствии с ГОСТ ISO 10993-5-2011 (табл. 1). Отрицательный

Таблица 1

Степень ответной реакции клеток
Stages of cell response

Степень реакции	Реакция	Наблюдения	
0	Отсутствует	Единичные интрацитоплазматические гранулы Пролиферирующих клеток более 90%	Нет лизиса
1	Незначительная	Не более 20% клеток круглые, слабо прикрепленные, без интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток более 80%, но менее 90%	Лизис не более 20%
2	Нерезкая	Не более 50% клеток круглые, не имеющие интрацитоплазматических гранул Пролиферирующих клеток более 50%, но менее 80%	Лизис не более 50%
3	Умеренная	Не более 70% монослой содержат круглые клетки Пролиферирующих клеток более 30%, но менее 50%	Лизис не более 70%
4	Резкая	Практически полностью разрушенный монослой Пролиферирующих клеток менее 30%	Лизис более 70%

контроль должен соответствовать степени реакции 0, положительный контроль – 3 или 4. Степень ответной реакции исследуемого образца не должна превышать 2.

В табл. 2 представлены значения, характеризующие жизнеспособность фибробластов L929 отно-

сительно отрицательного контроля – культуральной среды, содержащей 10% ЭТС. После контакта с образцами жизнеспособность фибробластов остается выше 90%, что соответствует степени реакции 0 и говорит об отсутствии цитотоксического действия образцов исследуемых матриц. Положительный

Таблица 2

Процент жизнеспособных фибробластов линии L929 относительно отрицательного контроля

The percentage of viable fibroblasts of L929 line relative to the negative control

№ образца	Наименование образца	% жизнеспособных клеток относительно отрицательного контроля \pm сигма	Степень ответной реакции клеток
1	ДПЖч донор 1	$97,3 \pm 8,9$	0
2	ДПЖч донор 2	$90,5 \pm 3,9$	0
3	Положительный контроль	$7,8 \pm 2,3$	4

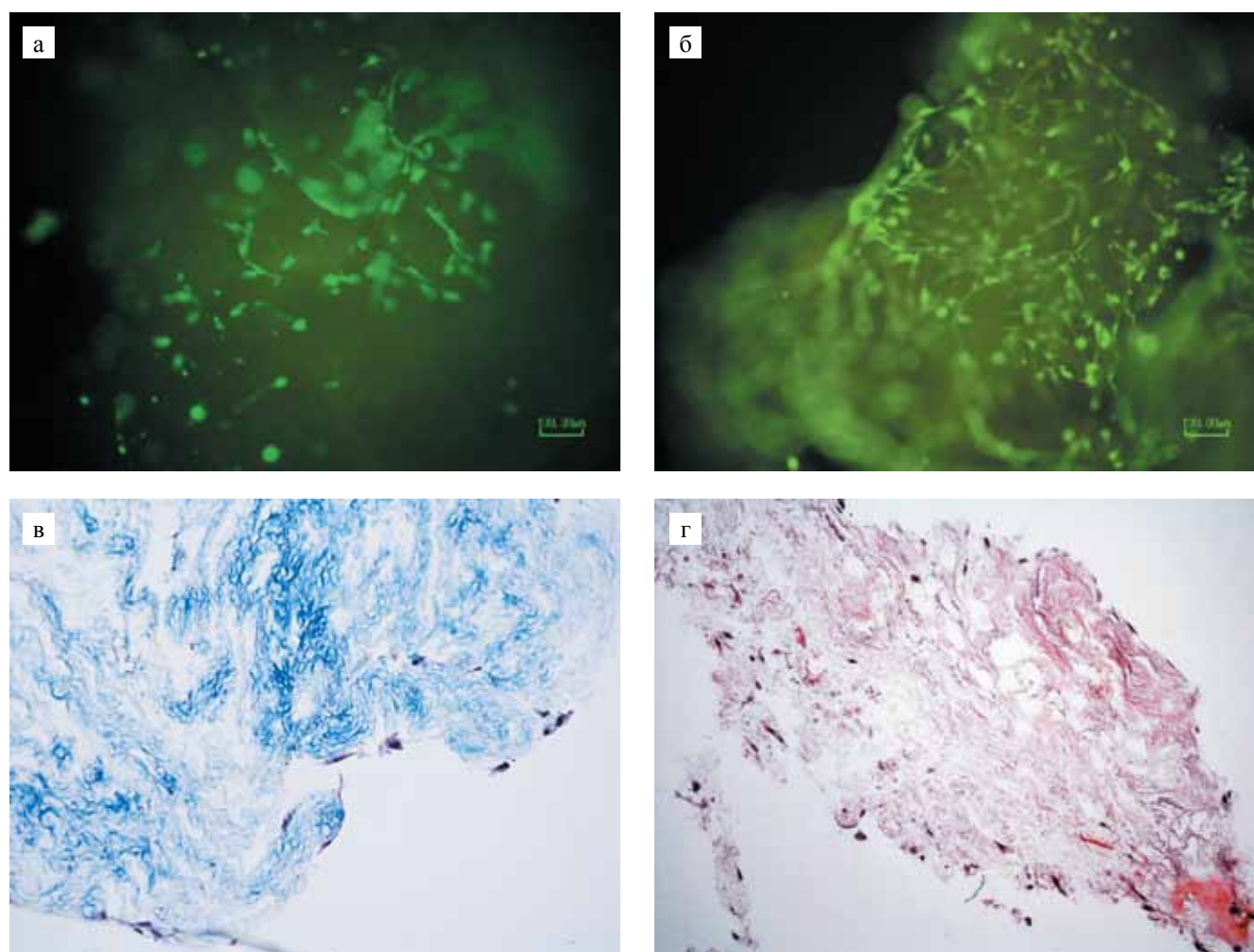


Рис. 6. Культивирование МСК ЖТч на тканеспецифическом каркасе поджелудочной железы: а – прижизненное окрашивание витальным красителем LIVE/DEAD® МСК ЖТч после 1 суток культивирования, б – прижизненное окрашивание клеток LIVE/DEAD® после 6 суток культивирования; в – МСК ЖТч после 15 суток культивирования на матриксе из ДПЖ, по методу Массона. $\times 200$; г – МСК ЖТч после 15 суток культивирования на матриксе из ДПЖ, гематоксилин и эозин. $\times 100$

Fig. 6. Culturing of hADMSCs on tissue-specific pancreas scaffold: а – intravital staining of hADMSCs with LIVE/DEAD® vital stain after 1 day of culturing, б – intravital staining of cells with LIVE/DEAD® after 6 days of culturing; в – hADMSCs after 15 days of culturing on DP-matrix, the Masson method. $\times 200$; г – hADMSCs after 15 days of culturing on DP-matrix, hematoxylin and eosin. $\times 100$

контроль показал резкую цитотоксичность, степень реакции 4.

Функциональные свойства матрикса ДПЖч

Уже на первые сутки культивирования (рис. 6, а) МСК ЖТч на матриксах из ДПЖч наблюдали адгезию и распластывание клеток. К 6-м суткам количество МСК ЖТч увеличивалось, отсутствовали нежизнеспособные клетки, ядра которых окрашиваются в красный цвет (рис. 6, б).

Анализ гистологических препаратов образцов показал, что через 15 суток культивирования происходило интенсивное заселение матрикса МСК ЖТч. Клетки распластанные, имеют характерную для данного типа клеток фибробластоподобную форму, располагаются не только на поверхности, но и активно проникают в глубокие слои матрикса (рис. 6, в, г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, определен критерий отбора исходного материала для эффективной децеллюляризации ПЖ человека. Выявлено преимущество использования ПЖ с липоматозом по сравнению с фиброзированной ПЖ. Предложенный протокол децеллюляризации фрагментов донорской поджелудочной железы с липоматозом является эффективным и позволяет получить тканеспецифический матрикс/каркас, свободный от клеток и клеточных фрагментов, с низким содержанием ДНК и сохранением морфофункциональных свойств ВКМ ПЖ. Полученный матрикс не проявляет признаков цитотоксичности, поддерживает адгезию и пролиферацию МСК ЖТч и может быть в дальнейшем использован для рецеллюляризации островковыми клетками (инсулоцитами, эндокринными клетками островков Лангерганса) при создании биоинженерной конструкции ПЖ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сургученко ВА. Матрикс для тканевой инженерии и гибридных органов. *Биосовместимые материалы (учебное пособие)*. Под ред. В.И. Севастьянова и М.П. Кирпичникова. М.: МИА, 2011. Часть II, глава 1: 199–226. *Surguchenko VA. Matriksy dlya tkanevoj inzhenerii i gibridnyh organov. Biosovmestimye materialy (uchebnoye posobie)*. Pod red. V.I. Sevast'yanova i M.P. Kirpichnikova. M.: MIA, 2011. Chast' II, glava 1: 199–226.
2. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 April; 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
3. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F, Feeney AK, Maguire RM, Brown ME et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Scientific Reports*. 2018; 8: 10452. doi: 10.1038/s41598-018-28857-1.
4. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular Matrix in Pancreatic Islets: Relevance to Scaffold Design and Transplantation. *Cell Transplant*. 2009; 18 (1): 1–12. doi: 10.3727/096368909788237195.
5. Riopel M, Wang K. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Frontiers in Bioscience*. 2014 Jan; 19: 77–90. doi: 10.2741/4196.
6. 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. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
7. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3D Culture of MIN-6 Cells on Decellularized Pancreatic Scaffold: *in vitro* and *in vivo* Study. *BioMed Research International*. 2015 Nov: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/432645>.
8. Goh SK, Bertera S, Olsen P, Candiello J, Halfter W, Uechi G et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.066.
9. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Scientific Reports*. 2017; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
10. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling J, Pareta R, Mack D, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
11. Peloso A, Urbani L, Cravedi P, Katari R, Maghsoudlou P, Fallas MEA et al. The human pancreas as a source of pro-tolerogenic extracellular matrix scaffold for a new generation bio-artificial endocrine pancreas. *Ann Surg*. 2016; 264 (1): 169–179. doi: 10.1097/SLA.0000000000001364.
12. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011. 32 (12): 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
13. Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*». Межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 10993-5-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*».

*Статья поступила в редакцию 3.02.2020 г.
The article was submitted to the journal on 3.02.2020*

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-134-141

ВНУТРИСЕЛЕЗЕНОЧНАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСАМ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, В.И. Севастьянов

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

Цель: изучить влияние внутриселезеночной имплантации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ) на течение экспериментального сахарного диабета (СД). **Материалы и методы.** Флотирующие островкоподобные культуры (ФОК) получали из ПЖ новорожденных кроликов. Для формирования ТИК ПЖ проводили инкубацию ФОК с биополимерным микрогетерогенным коллагенсодержащим гидрогелем (БМКГ). Образцы ТИК ПЖ вводили в пульпу селезенки крыс с СД, индуцированным стрептозотоцином. **Результаты.** Формирование ТИК ПЖ, обладающей инсулинпродуцирующей активностью, происходило на 7–10-й день инкубации ФОК с БМКГ. После имплантации ТИК ПЖ у крыс-реципиентов было отмечено стойкое снижение гипергликемии и исчезновение клинических признаков СД. Гистологический анализ выявил в месте имплантации ТИК ПЖ наличие групп островковых клеток без признаков иммунной клеточной реакции. **Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о том, что ксеногенные островковые клетки, находившиеся в составе ТИК ПЖ, способны выживать и активно функционировать после их имплантации в пульпу селезенки крыс с экспериментальным СД.

Ключевые слова: поджелудочная железа, новорожденные кролики, флотирующие островкоподобные культуры, биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель, тканеинженерная конструкция, крысы, стрептозотоциновый сахарный диабет, имплантация в селезенку, гликемия.

INTRASPLENIC IMPLANTATION OF TISSUE-ENGINEERED PANCREATIC CONSTRUCT IN EXPERIMENTAL DIABETIC RATS

G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, L.A. Kirsanova, G.N. Bubentsova, V.I. Sevastianov

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

Objective: to study the effect of intrasplenic implantation of a tissue-engineered pancreatic construct (TEPC) on experimental diabetes mellitus. **Materials and methods.** Floating islet-like cultures (FICs) were obtained from the pancreas of newborn rabbits. To form TEPC, FICs were incubated with biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCH). TEPC samples were injected into the splenic pulp of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Results.** TEPC with insulin-producing activity was formed on the 7–10th day of incubation of FICs with BMCH. After TEPC implantation in recipient rats, persistent decrease in hyperglycemia and disappearance of clinical signs of diabetes were noted. Histological analysis revealed the presence of groups of islet cells without signs of immune cell response at the TEPC implantation site. **Conclusion.** Our findings indicate that xenogeneic islet cells that were part of the TEPC of the pancreas can survive and actively function after implantation in the splenic pulp of diabetic rat.

Keywords: pancreas, newborn rabbits, floating islet-like cultures, biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel, tissue-engineered construct, rats, streptozotocin-induced diabetes, splenic implantation, glycemia.

Для корреспонденции: Скалецкая Галина Николаевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел.: (499) 190-42-66; (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

For correspondence: Skaletskaya Galina Nikolaevna. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Tel.: (499) 190-42-66; (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

По данным Международной федерации диабета (IDF), 415 миллионов человек во всем мире страдают сахарным диабетом, и их число, по прогнозам, увеличится до 642 миллионов к 2040 году (<http://www.diabetesatlas.org>), и в США, в частности, в 2050 году это заболевание будет диагностировано у 1 из 3 взрослых жителей. Лечение сахарного диабета 1-го типа, который составляет около 10% больных сахарным диабетом, за последнее столетие принципиально не изменилось – по-прежнему единственным способом сохранения жизни больного остается ежедневное введение инсулина. При этом применение интенсивной инсулинотерапии с использованием различных синтезированных препаратов гормона не способно обезопасить от развития и неуклонного прогрессирования поздних диабетических осложнений, таких как ретинопатия, нефропатия и нейропатия, являющихся основными причинами наступления инвалидности и преждевременной смерти пациентов с сахарным диабетом [1, 2]. Естественным направлением медицинской науки является разработка методов, способных возместить отсутствующие при СД 1 (вследствие аутоиммунной деструкции) β -клетки в островках поджелудочной железы путем введения донорских островковых клеток, активная функция которых помимо снижения потребности во введении препаратов инсулина (вплоть до полной их отмены на определенное время) способна приводить к регрессу диабетических ангиопатий. Однако аллотрансплантацию островков, которая считается наиболее эффективным способом заместительного лечения, перспективным направлением назвать сложно из-за непреодолимого дефицита источника островков, которым является поджелудочная железа посмертных доноров. При этом для достижения инсулиннезависимости реципиентов требуется, как правило, использование от 2 до 4 донорских органов [3], так как значительное количество островков повреждается в процессе их многоэтапной изоляции от экзокринной панкреатической ткани, а также в первые 3 суток после инфузии в воротную вену, в течение которых теряется до 60% трансплантированных островков. Причинами таких потерь являются прежде всего развитие в местах имплантации воспалительной реакции и отсутствие адекватной васкуляризации. Кроме того, интрапортальное введение остается небезопасным способом инфузии и требует ограничить массу вводимого клеточного материала из-за опасности массовой эмболизации ветвей воротной вены. В связи с этим целесообразен поиск более безопасных способов введения островков (островковых клеток) при условии обеспечения благоприятного микроокружения и достаточного кровоснабжения имплантата. Определенные надежды связываются

с созданием тканеинженерной конструкции поджелудочной железы (ТИК ПЖ), применение которой в той или иной степени может решить указанные выше проблемы.

Ранее нами были опубликованы материалы, посвященные разработке экспериментальной модели ТИК ПЖ [4] и результатам ее внутрибрюшинной имплантации. В настоящем исследовании изучено влияние внутриселезеночной имплантации ТИК ПЖ на течение экспериментального сахарного диабета у крыс, причем длительность наблюдения за животными-реципиентами была ограничена 4 неделями, так как сохранение признаков функционирования трансплантата в течение такого срока позволяет считать стойкое его приживание в организме реципиента свершившимся фактом. Выбор этого варианта введения был обусловлен прежде всего возможностью определения судьбы введенной ТИК ПЖ путем гистологического изучения места имплантации (пульпы селезенки).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение тканеинженерной конструкции поджелудочной железы

Животных-доноров (1–3-дневные новорожденные кролики) доставляли из специализированного питомника Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». ТИК ПЖ приготавливали путем совместной инкубации флотирующих островкоподобных культур (ФОК), полученных из поджелудочной железы новорожденных кроликов с помощью разработанного нами метода [4], и биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ). В качестве БМКГ использовали отечественный *Сферо*[®]ГЕЛЬ [5].

Наблюдение за формированием ТИК проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS 100 путем почти ежедневного мониторинга, и значимые изменения фиксировали с помощью цифровой фотокамеры.

Сбор ТИК ПЖ проводился непосредственно перед имплантацией с использованием культурального скребка.

Подготовка животных с экспериментальным сахарным диабетом

Крыс-самцов линии Вистар массой тела 200–240 г доставляли из питомника лабораторных животных Федерального государственного унитарного предприятия «Опытно-производственное хозяйство «Манихино». Экспериментальный сахарный диабет

1-го типа вызывали с помощью дробного введения стрептозотоцина (70 мг/кг – по 12 мг/кг в течение 5 дней подряд), которое, по нашим данным [6], обеспечивает стойкий диабетический статус животных. Все манипуляции с животными проводили согласно 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). Постпрандиальную гликемию в капиллярной крови крыс определяли с помощью глюкометра One Touch Ultra (Life Scan Johnson & Johnson, США).

Из 16 крыс со стрептозотоциновым СД сформировали две группы: 1-я – 8 животных, которым не проводили никакого лечения (контроль) и 2-я – 8 животных, которым осуществляли внутриселезеночную имплантацию ТИК ПЖ (опыт).

Техника имплантации ТИК ПЖ

Каждой из крыс 2-й группы вводился образец ТИК ПЖ, тканевый компонент которой содержал ФОК, полученные из 10 ПЖ новорожденных кроликов.

Образец ТИК ПЖ вводили подопытным наркотизированным животным (золетил внутривентриально в дозе 20 мг на 1 кг массы тела) следующим образом. После срединной лапаротомии селезенка осторожно выводилась в область операционной раны и помещалась на стерильную марлевую салфетку. С помощью силиконового катетера ТИК ПЖ в виде клеточно-гелевой композиции, суспендированной в

1,0–1,5 мл среды 199, забирали *ex tempore* в шприц объемом 2 мл. После отсоединения катетера на его место надевали инъекционную иглу диаметром не менее 1 мм. Иглой осторожно неглубоко прокалывали поверхность селезенки, и суспензию с ТИК ПЖ вводили медленно в пульпу органа. Для остановки кровотечения и предотвращения выхода введенных клеток место инъекции на 2–3 минуты плотно закрывали стерильным марлевым тампоном. Селезенку с имплантатом аккуратно возвращали в полость брюшины. Затем брюшную стенку послойно зашивали и операционную рану обрабатывали раствором йода.

Гистологические исследования

Контрольное изучение парафиновых срезов образцов ФОК проводили путем окраски гематоксилином и эозином, а также с помощью иммуногистохимического и иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к инсулину.

Иссеченные фрагменты селезенки крыс-реципиентов, соответствующие предположительно месту введения ТИК ПЖ, фиксировали в формалине. После обработки указанного материала и приготовления парафиновых блоков готовили срезы, которые окрашивали классическими красителями (гематоксилин и эозин), а также по Маллори.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Формирование ТИК ПЖ

Данные морфологического исследования ФОК как тканевого компонента ТИК ПЖ показали их хорошую морфологическую сохранность с наличием гормонсекретирующих β -клеток (рис. 1–3).

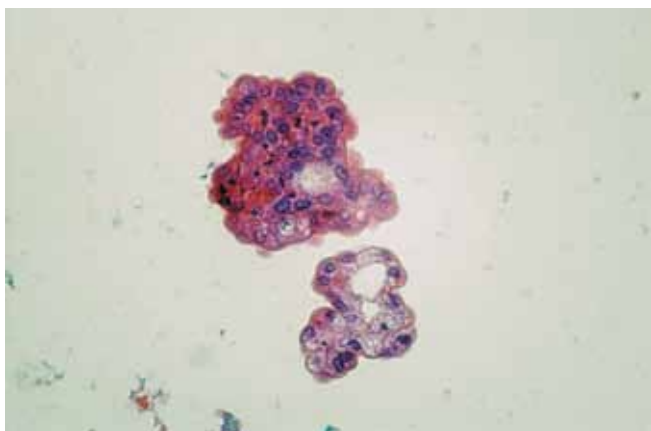


Рис. 1. Флотирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы новорожденных кроликов, 10-й день инкубации. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 1. Flotation islet-like pancreatic cultures of newborn rabbits, 10th day of incubation. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

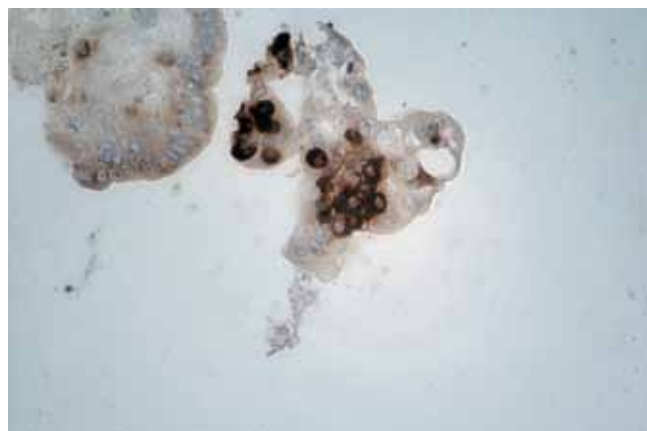


Рис. 2. Флотирующие островковоподобные культуры поджелудочной железы новорожденных кроликов, 10-й день инкубации. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину. $\times 200$

Fig. 2. Flotation islet-like pancreatic cultures of newborn rabbits, 10th day of incubation. Immunohistochemical staining with insulin antibodies. $\times 200$

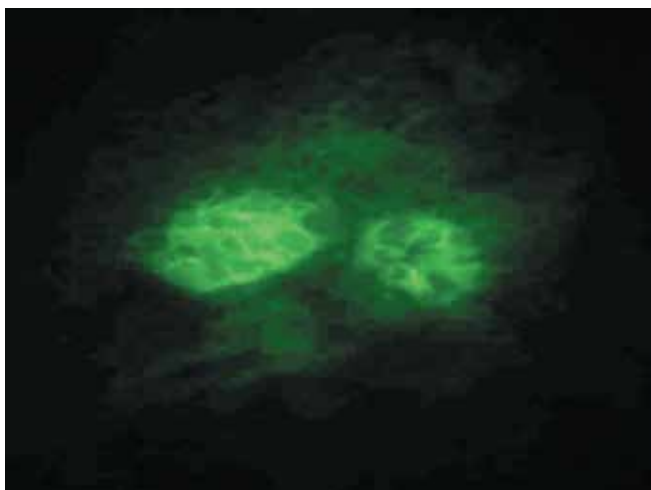


Рис. 3. Свечение гранул инсулина во флотирующих островковоподобных культурах поджелудочной железы. Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к инсулину. $\times 200$

Fig. 3. Glow insulin granules in flotation islet-like pancreatic cultures. Immunofluorescence staining with insulin antibodies. $\times 200$

После того как в течение 8–10 суток происходило формирование ФОК, проводилась их инкубация с биоматриксом (БМКГ). В процессе совместной инкубации ФОК оседали на дно культурального флакона, равномерно покрытого биоматриксом. Контакт с последним оказывал благоприятное влияние на культуры. Происходило успешное прикрепление их к БМКГ (рис. 4) с последующим образованием однослойных зон роста вокруг места адгезии ФОК, что свидетельствовало о хороших матричных свойствах БМКГ относительно ФОК. В результате сокультивирования ФОК и биоматрикса *in vitro* происходило формирование ТИК ПЖ (рис. 5).

Наблюдение за состоянием животных и результаты определения гликемии

В группе № 1 (контрольная диабетическая) через 2 недели после введения стрептозотоцина у всех 8 животных отмечались характерные клинические признаки сахарного диабета: потеря массы тела, полидипсия, полиурия, вялость, пожелтение и выпадение шерсти. Столь выраженному диабетическому статусу соответствовали высокие уровни гликемии – от 22,5 до 32,4 ммоль/л (табл. 1). Ни у одной из крыс этой группы не было отмечено тенденции к существенному снижению гипергликемии, что свидетельствовало о надежности примененной в данном исследовании модели сахарного диабета 1-го типа. При этом две крысы (№ 17 и № 24) с наиболее высокими уровнями гипергликемии за время наблюдения погибли на фоне крайнего истощения.

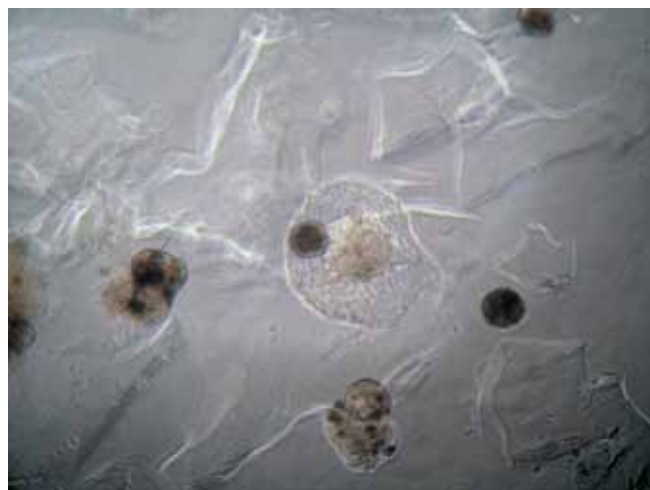


Рис. 4. Прикрепление флотирующих островковоподобных культур к матриксу. Инвертированный микроскоп. $\times 40$

Fig. 4. Attachment of flotation islet-like cultures to matrix. The inverted microscope. $\times 40$

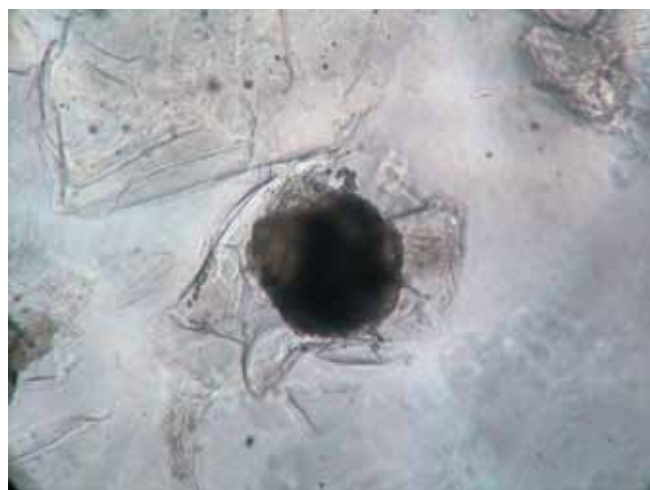


Рис. 5. Формирование тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. Инвертированный микроскоп. $\times 100$

Fig. 5. Formation of pancreatic tissue engineering construct. The inverted microscope. $\times 100$

Во 2-й группе (опыт) предтрансплантационный уровень гликемии через 2 недели после последней инъекции стрептозотоцина был почти таким же, как в эти же сроки у контрольных диабетических животных (табл. 2). Однако уже через неделю после имплантации ТИК ПЖ была отмечена отчетливая тенденция к уменьшению гипергликемии, и еще через неделю средний уровень гликемии у крыс-реципиентов оказался достоверно сниженным ($p < 0,05$), опустившись до 17,1 ммоль/л. На этом сроке трех животных с относительно умеренным снижением гипергликемии (№ 13, 19 и 21) подвергли эвтаназии

Таблица 1

**Изменения гликемии (ммоль/л) у крыс контрольной группы (№ 1)
(стрептозотоциновый сахарный диабет без лечения)**

**Changes in glycemia (mmol/L) in control group rats (№ 1)
(streptozotocin diabetes mellitus without treatment)**

№ крысы	Недели до (–) и после (+) имплантации в группе № 2						
	–2	–1	0	+1	+2	+3	+4
2	25,1	23,3	22,0	24,5	23,9	22,5	25,4
5	26,2	24,4	26,3	25,1	24,8	25,0	25,4
6	22,5	23,7	24,1	23,2	23,4	22,8	23,6
9	26,9	27,4	26,0	28,5	27,9	27,5	26,4
17	32,4	>33,3	>33,3	гибель			
23	27,7	30,0	28,7	27,3	28,1	25,5	26,4
24	31,8	32,5	>33,3	>33,3	>33,3	гибель	
29	28,1	28,5	26,1	27,2	27,9	27,5	28,4
М	27,6	27,1	25,9	25,8	25,4	25,5	26,2

Таблица 2

**Изменения гликемии (ммоль/л) у крыс 2-й группы после имплантации
тканеинженерной конструкции поджелудочной железы в пульпу селезенки**

**Changes in glycemia (mmol/L) in rats of the 2nd group following implantation
of pancreatic tissue-engineering construct into spleen pulp**

№ крысы	Недели до (–) и после (+) имплантации						
	–2	–1	0	+1	+2	+3	+4
3	25,2	23,9	24,3	19,8	16,4	17,7	14,0
4	29,6	25,8	25,7	19,2	15,3	13,9	14,1
11	20,3	21,6	22,0	19,9	12,8	14,9	12,5
13	26,9	23,2	26,5	24,9	18,4	эвт.	
19	27,7	23,1	26,0	21,4	16,1	эвт.	
20	24,4	28,6	31,1	26,6	14,7	15,8	16,4
21	25,3	24,7	27,2	22,1	21,9	эвт.	
28	33,1	32,2	31,1	28,2	21,1	21,4	21,0
М	26,5	24,9	25,5	22,8	17,1	16,7	15,6

с целью гистологического изучения фрагмента селезенки, куда предположительно был введен образец ТИК ПЖ. За остальными крысами-реципиентами наблюдение было продолжено до 4 недель после имплантации. Хотя ни у одной из подопытных крыс не произошло нормализации концентрации глюкозы в крови, не было отмечено и возврата гликемии к высокому дотрансплантационному уровню. При этом у всех животных 2-й группы практически исчезли выраженные клинические признаки диабетического статуса, началась медленная, но устойчивая прибавка массы тела, в том числе у крысы № 28, у которой до трансплантации был наиболее высокий уровень гликемии (31,1 ммоль/л). По-видимому, снижение концентрации глюкозы в крови на 1/3 позволило животному адаптироваться к ежедневной относительно высокой гликемии и сохранить жизнеспособность. До окончания постимплантационного наблюдения клиническая ремиссия диабетического статуса у животных 2-й группы сохранялась.

**Данные гистологических исследований
селезенки крыс-реципиентов**

Результаты морфологического изучения селезенки крыс-реципиентов представляли особый интерес, так как появилась возможность в определенной степени выяснить судьбу ТИК ПЖ, имплантированной крысам с экспериментальным сахарным диабетом 1-го типа. При этом сначала для выявления постимплантационного состояния ТИК ПЖ в ближний срок после ее введения (2 недели) 3 крысы 2-й группы были подвергнуты эфтаназии с целью последующего гистологического исследования селезенки. У одной из этих крыс (№ 21), у которой гипергликемия снизилась незначительно (см. табл. 2), структуры, похожие на имплантаты, выявлены не были, однако определялись признаки травматизации пульпы селезенки в виде ее разрывов. По-видимому, в процессе введения суспензии, содержащей ТИК ПЖ, через разрывы, сделанные инъекционной иглой, часть имплантата вышла за пределы селезенки и попала в неблагопри-

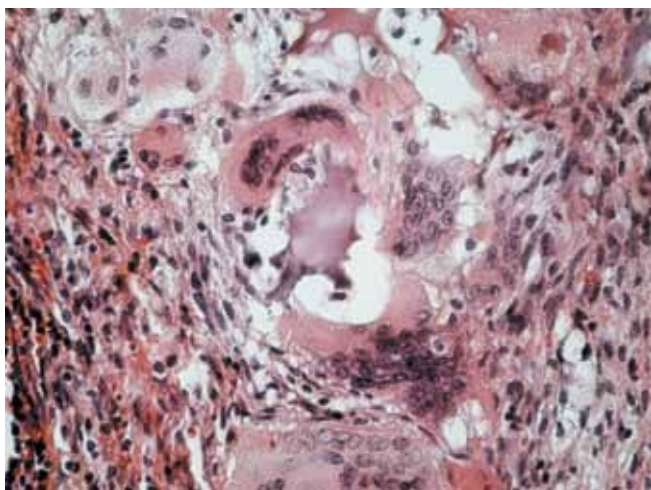


Рис. 6. Селезенка крысы № 19 через 2 недели после интрапульпарной имплантации ТИК ПЖ. В центре – резорбирующийся фрагмент БМКГ с фестончатыми краями, окруженный группами лейкоцитов. $\times 200$

Fig. 6. Spleen from the Rat No 19 in 2 weeks after intrapulpary implantation of pancreatic tissue engineering construct (PTEC). In the center – resorbable fragment of biopolymeric microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCG) with festonized edges, surrounded by groups of leukocytes. $\times 200$

ятные условия, не позволившие введенным островковым клеткам проявить себя в достаточной мере.

У крысы № 19, с более выраженным снижением гипергликемии, были выявлены структурные образования, которые можно отнести к фрагментам имплантированной ТИК ПЖ (рис. 6), так как они содержали как группы эпителиальных (островковых) клеток, так и остатки биоматрикса, окруженные группами лейкоцитов, которые, по-видимому, принимали активное участие в резорбции БМКГ. У крысы № 21, подвергшейся эвтаназии также через 2 недели после введения ТИК ПЖ, были обнаружены участки пульпы селезенки с умеренно выраженной лейкоцитарной инфильтрацией вокруг группы островковоподобных структур и с формированием нежной соединительно-тканной капсулы (рис. 9, 10), которая, возможно, образовалась в процессе резорбции остатков имплантированного биоматрикса.

По окончании эксперимента – через 4 недели после имплантации ТИК ПЖ – у двоих крыс-реципиентов (№ 4 и № 11) удалось обнаружить островковоподобные имплантаты эпителиальных клеток (рис. 9, 10). При этом у обоих животных к моменту эвтаназии отмечалось снижение гликемии по сравнению с доимплантационным уровнем практически вдвое, при отсутствии характерных клинических проявлений диабетического статуса.

Важно отметить, что при этом не было выявлено гистологических признаков клеточной иммунной реакции на имплантированный в составе ТИК ПЖ



Рис. 7. Селезенка крысы № 21 через 2 недели после интрапульпарной имплантации ТИК ПЖ. В центре – группы островковоподобных структур и остатки биоматрикса. Окрасивание гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 7. Spleen from the rat No 21 in 2 weeks after intrapulpary implantation of PTEC. In the center – groups of islet-like structures and residues of biomatrix. Hematoxylin and eosin staining. $\times 100$



Рис. 8. То же. Окрасивание по Маллори. $\times 200$

Fig. 8. The same. Mallory staining. $\times 200$

клеточный ксенотрансплантат при полном отсутствии остатков биоматрикса. По-видимому, к исходу 4-й недели после имплантации ТИК ПЖ в пульпу селезенки полностью завершалась резорбция БМКГ и исчезала сопутствовавшая этому процессу лейкоцитарная реакция. Возможно, сохранявшийся определенное время биоматрикс переключал в какой-то степени иммунную реакцию селезенки на себя и позволял ксеногенным островковоподобным структурам длительно выживать и функционировать в организме чужеродного реципиента. В то же время входившие в состав ТИК ПЖ культуры островковых клеток сами

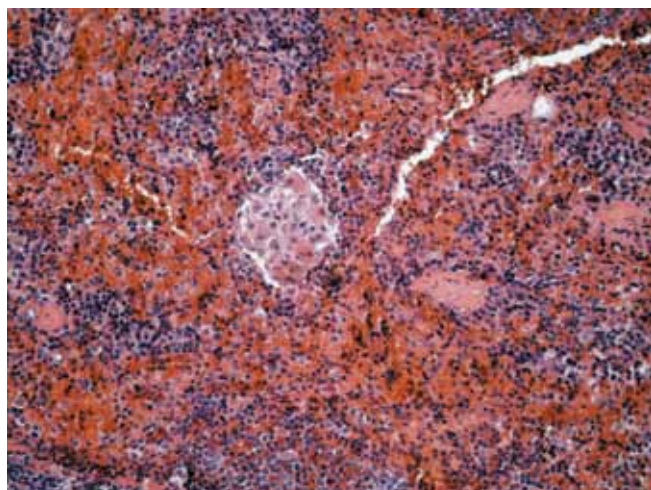


Рис. 9. Селезенка крысы № 4 через 4 недели после интрапульпарной имплантации ТИК ПЖ. В центре – эпителиальная островковоподобная структура без признаков деструкции и клеточной иммунной реакции при отсутствии остатков БМКГ. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 9. Spleen from the rat No 4 in 4 weeks after intrapulparary implantation of PTEC. In the center is epithelial islet-like structure with no signs of destruction and cellular immune response in the absence of BMCG residues. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

по себе, как было показано ранее, обладают существенно сниженной иммуногенностью [7].

Таким образом, опыты по внутриселезеночной имплантации тканеинженерной конструкции поджелудочной железы, состоящей из флотирующих островковоподобных культур и биodeградируемого микрогетерогенного коллагенсодержащего матрикса, крысам со стрептозотоциновым сахарным диабетом подтвердили ее морфологическую сохранность и функциональную активность в условиях *in vivo*. Однако гипогликемизирующее действие имплантации ТИК ПЖ в селезенку оказалось менее выраженным по сравнению с внутрибрюшинным введением аналогичных образцов ТИК ПЖ, которое было осуществлено нами ранее [4]. По-видимому, такое различие можно объяснить тем, что при имплантации образца ТИК ПЖ в полость брюшины все его количество попадает в место назначения, что обеспечивается дополнительным промыванием шприца и инъекционной иглы с целью введения остатков клеточно-гелевой суспензии. Однако при введении в пульпу селезенки количество вводимого образца ТИК ПЖ естественным образом ограничено, и попытки увеличить объем имплантата чреваты разрывами органа и обратного выхода суспензии. Поэтому масса и функциональная способность внутриселезеночного и внутрибрюшинного имплантата может существенно различаться. В то же время в настоящем исследовании в определенной степени достигнута

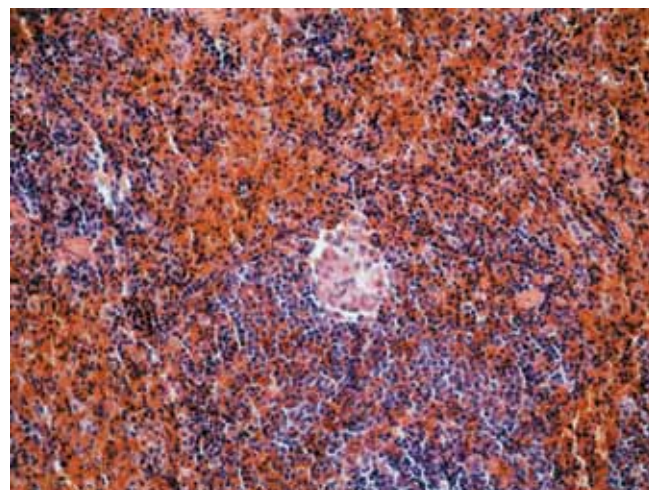


Рис. 10. Селезенка крысы № 11 через 4 недели после интрапульпарной имплантации ТИК ПЖ. В центре – островковоподобная структура без признаков деструкции и клеточной иммунной реакции. Окрашивание гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 10. Spleen from the rat No 11 in 4 weeks after intrapulparary implantation of PTEC. In the center is an islet-like structure with no signs of destruction and cellular immune response. Hematoxylin and eosin staining. $\times 200$

основная его цель, достижение которой не могло быть реализовано при внутрибрюшинном введении ТИК ПЖ. Если отыскать введенный за несколько недель до эвтаназии имплантат в полости брюшины нереально, то его обнаружение в пульпе селезенки крыс-реципиентов вполне возможно. Проведенный гистологический анализ позволил определить, что через 2 недели после внутриселезеночной имплантации ТИК ПЖ происходила активная резорбция биоматрикса, а еще через 2 недели он полностью рассасывался и имплантат сохранялся в виде островковоподобных структур. Их морфологическая целостность и отсутствие признаков клеточной иммунной реакции позволили объяснить полученный антидиабетический эффект функционированием островковых клеток, входивших в состав ТИК ПЖ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev.* 2011; 79–118. doi: 10.1152/physrev.00003.2010.
2. Lind M, Svensson A-M, Kosiborod M. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 371: 1972–1982. doi: 10.1056/NEJMoa1408214.

3. *Pellegrini S, Cantarelli E, Sordi V, Nano R, Piemonti L.* The state of the art of islet transplantation and cell therapy in type 1 diabetes. *Acta Diabetol.* 2016: 683–691. doi: 10.1007/s00592-016-0847-z.
4. *Скалецкая ГН, Севастьянов ВИ.* Экспериментальная модель тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. *Трансплантология: итоги и перспективы.* Том IX. 2017 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2018: 283–299. *Skaletskaya GN, Sevastianov VI.* Eksperimentalnaya model tkaneinzhenernoy konstruksii podzheludochnoy zhelezy. *Transplantologia: itogi i perspektivy.* Tom IX. 2017 god / Pod red. S.V. Gautier. M.–Tver': Triada. 2018: 283–299.
5. *Севастьянов ВИ, Перова НВ.* Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент РФ № 2433828 (2010). *Sevastianov VI, Perova NV.* Inyeksionniy geterogenniy biopolimerniy gidrogel dla zamestitelnoy regenerativnoy khirurgii i sposoby ego polucheniya. Patent RF 2433828 (2010).
6. *Севастьянов ВИ., Шагидулин МЮ, Скалецкий НН, Перова Н., Довжик ИА, Готье СВ.* Доклинические исследования безопасности и эффективности БМКП для регенерации суставного хряща, печени и поджелудочной железы. *Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов* / Под ред. акад. В.А. Ткачука. М.: МГУ, 2017: 187–255. *Sevastianov VI, Shagidulin MYu, Skaletskiy NN, Perova NV, Dovzhik IA, Gautier SV.* Doklinicheskiye issledovaniya bezopasnosti i effektivnosti BMKP dla regeneratsii sustavnogo khrashcha, pecheni i podzheludochnoy zhelezy. *Metodicheskiye rekomendatsii po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy biomeditsinskykh kletochnykh produktov* / Pod red. akad. V.A. Tkachuka. M.: MGU, 2017: 187–255.
7. *Богданова НБ, Абрамов ВЮ, Скалецкий НН, Петрова ИА, Пушкова ИА, Баранова НВ, Бубенцова ГН.* Исследование фиксации сывороточных иммуноглобулинов человека на культивированных островковых клетках поджелудочной железы кролика. *IV Всероссийский съезд трансплантологов.* М., 2008: 227–228. *Bogdanova NB, Abramov VYu, Skaletskiy NN, Petrova IA, Pushkova IA, Bubentsova GN.* Issledovanie fiksatsii syvorotochnykh immunoglobulinov cheloveka na kultivirovannykh ostrovkovykh kletkah podzheludochnoy zhelezy. *IV Vserossiyskiy s'yezd transplantologov.* M., 2008: 227–228.

*Статья поступила в редакцию 7.02.2020 г.
The article was submitted to the journal on 7.02.2020*

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-142-156

МОДЕЛЬ БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КРУПНОМ ЛАБОРАТОРНОМ ЖИВОТНОМ

М.Н. Егорихина, Д.Я. Алейник, Ю.П. Рубцова, И.Н. Чарыкова, А.А. Стручков, А.А. Ежеская, В.И. Загреков, Л.Н. Соснина, Е.В. Загайнова

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

Цель: разработать модель биомедицинского клеточного продукта, согласующуюся со стратегией «гомологичный препарат» на основе протоколов подготовки клеточной составляющей и скаффолда-носителя для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). **Материалы и методы.** Биомедицинские клеточные продукты – эквиваленты кожи (ЭК) формировали с использованием криопреципитата плазмы крови здоровых доноров и мезенхимальных стволовых клеток (MSCs) жировой ткани человека. Для формирования модельных эквивалентов кожи (мЭК) использовали криопреципитат плазмы крови свиней и MSCs жировой ткани свиней. Наблюдение за состоянием клеток в культуре и в составе эквивалентов проводили с использованием методов светлого поля, фазового контраста (Leica DMI 3000B) и флуоресцентной микроскопии (имиджер Cytoation 5; BioTek, USA). Скаффолды эквивалентов тестировали на цитотоксичность (МТТ-тест, метод прямого контакта). Характеристику плотности распределения клеток проводили авторским способом (Пат. № 2675376 РФ). **Результаты.** Разработан модельный эквивалент кожи (мЭК) для проведения доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). В мЭК замещены компоненты, переходящие из алогенных условий в ксеногенные при трансплантации животному. Представлен комплексный подход для подготовки мЭК, включающий забор первичного биоматериала свиньи, выделение и характеристику MSCs жировой ткани, подготовку скаффолда-носителя, соответствующего стратегии «гомологичный препарат». Проведена оценка цитотоксичности скаффолда мЭК. Показано, что мЭК обеспечивает аналогичную эквиваленту кожи (ЭК) механическую поддержку клеток и сопоставимое развитие клеточных событий при культивировании. **Вывод.** Разработана модель биомедицинского клеточного продукта, согласующаяся со стратегией «гомологичный препарат» для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье). Представлен комплексный подход, для разработки модельного эквивалента основанный на протоколах подготовки и тестирования клеточной составляющей, скаффолда-носителя и готового модельного эквивалента.

Ключевые слова: эквивалент кожи, скаффолд, мезенхимальные стволовые клетки, доклинические исследования, гомологичная модель.

BIOMEDICAL CELL PRODUCT MODEL FOR PRECLINICAL STUDIES CARRIED OUT ON A LARGE LABORATORY ANIMAL

M.N. Egorikhina, D.Ya. Aleinik, Yu.P. Rubtsova, I.N. Charykova, A.A. Struchcov, A.A. Ezhevskaya, V.I. Zagrekov, L.N. Sosnina, E.V. Zagaynova

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Objective: to develop a model of a biomedical cell product that is consistent with the «homologous drug» strategy based on protocols for preparing the cell component and scaffold carrier for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). **Materials and methods.** Biomedical cell products and skin equivalents (SE), were formed using plasma cryoprecipitate prepared from blood plasma of healthy donors and mesenchymal stem cells (MSCs) of human adipose tissue. Cryoprecipitate from pig blood plasma and human adipose tissue-derived MSCs were used

Для корреспонденции: Егорихина Марфа Николаевна. Адрес: 603600, Нижний Новгород, ул. Семашко, д. 22. Тел. (903) 657-09-59. E-mail: egorikhina.marfa@yandex.ru

For correspondence: Egorikhina Marfa Nikolaevna. Address: 22, Semashko str., Nizhny Novgorod, 603600, Russian Federation. Tel. (903) 657-09-59. E-mail: egorikhina.marfa@yandex.ru

to form model skin equivalents (mSE). Bright-field microscopy, phase-contrast microscopy (Leica DMI 3000B) and fluorescence microscopy (Cytation 5 imager; BioTek, USA) were used to monitor the state of cells in the culture and in the composition of the equivalents. Scaffolds for equivalents were tested for cytotoxicity (MTT test, direct contact method). The cell distribution density was characterized by author's method (Patent No. 2675376 of the Russian Federation). **Results.** An mSE was developed for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). In the mSE, components that change from halogen to xenogenic conditions during transplantation to the animal were replaced. A comprehensive approach to preparing mSE was presented. It includes sampling of primary pig biomaterial, extraction and characterization of adipose tissue-derived MSCs, preparation of a scaffold carrier for the corresponding «homologous drug» strategy. Cytotoxicity of the mSE scaffold was evaluated. It was shown that mSE provides mechanical support (similar to SE) to cells, as well as comparable development of cellular events during cultivation. **Conclusion.** A model of a biomedical cell product was developed. This model is consistent with the «homologous drug» strategy for preclinical studies on a large laboratory animal (pig). The paper presented a comprehensive approach to developing a model equivalent based on protocols for preparation and testing of the cellular component, the scaffold carrier and the ready-to-use model equivalent.

Keywords: skin equivalent, scaffold, mesenchymal stem cells, preclinical studies, homologous model.

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные модели *in vivo* для тестирования новых методов лечения остаются золотым стандартом на доклинических этапах разработки лекарств и новых продуктов тканевой инженерии. В настоящее время наиболее распространено проведение доклинических исследований *in vivo* на мелких лабораторных животных, таких как мыши, крысы и кролики. В то же время не вызывают сомнения преимущества использования моделей крупных животных, которые обусловлены наличием у них органов, по размеру и фенотипу сопоставимых с человеческими. Последнее дает возможность применять оборудование и методики, которые разработаны и используются у людей для имплантации, ведения наблюдения и анализа результатов применения продуктов тканевой инженерии в доклинических исследованиях на животных [1]. Длительные сроки жизни крупных лабораторных животных позволяют проводить продолжительные исследования. Результаты исследований на животных, имеющих близкие к человеку физиологические параметры и сопоставимые темпы метаболизма, могут быть с достаточной степенью достоверности экстраполированы на людей.

При выборе животной модели для исследования биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) необходимо уделять особое внимание видоспецифическим особенностям животных и назначению БМКП. Например, при проведении исследований БМКП, предназначенных для восстановления поврежденных или утраченных кожных покровов, следует учитывать существование огромного разнообразия видов животных, отличающихся по структуре и анатомии кожи. Межвидовые анатомические и гистологические различия кожи имеют важнейшее значение при подборе модели животного со структурой кожи, близкой или аналогичной коже человека [2]. Относительно недавно свинья получила широкое признание в качестве модели для изучения восстановления

кожных покровов человека, поскольку анатомическая и физиологическая структура кожи свиньи очень похожа на человеческую. В противовес свободнокожим животным (к ним относят кроликов, крыс, мышей), у свиней, как и у человека, имеется сильная связь дермы с фасцией [3]. Толщина и строение эпидермиса и дермы свиньи сопоставимы с таковыми у людей [4]. Еще одна важная черта сходства в строении кожи человека и свиньи – это отсутствие густого шерстяного покрова. Паттерны эпидермальных ферментов, кератиновые белки, гистологическое расположение дермального коллагена IV, фибронектина и виментина, время оборота эпидермальной ткани кожи свиньи и человека имеют высокую степень сопоставимости [5]. Кроме того, ориентация и распределение кровеносных сосудов в дерме свиньи аналогичны распределению сосудов в коже человека [6]. Поэтому многие специалисты считают, что свинья является наиболее релевантной животной моделью для исследования эффективности применения эквивалентов кожи и изучения заживления ран.

В то же время при проектировании дизайна доклинических исследований следует учитывать не только физиологическую близость выбранной модели животного, но и имеющиеся отличия. Например, известно, что иммунная система свиней достаточно близка к человеческой. Однако она имеет и ряд существенных отличий [7]. А. Summerfield et al. (2015) показали, что иммунокомпетентные клетки кожи свиньи также обладают комплексом характеристик, отличающих их от человеческих [8]. Развитие регенеративного процесса кожных покровов неразрывно связано с работой иммунной системы. Еще более значим иммунный ответ при трансплантации в область раневого дефекта продуктов тканевой инженерии. Общеизвестно, что продукты тканевой инженерии не являются инертными, а обладают высокой биологической активностью. Последняя может быть связана как с клеточным компонентом,

так и с неклеточным компонентом (искусственным внеклеточным матриксом/скаффолдом). Наличие биологической активности неизменно приводит к вопросу о гистосовместимости и иммуногенности таких продуктов. При разработке тканеинженерных конструкторов наличие гистосовместимости и гипоиммуногенности учитываются относительно организма человека. Так, например, часто одним из ключевых компонентов БМКП являются мезенхимальные стволовые клетки (Mesenchymal Stem Cells – MSCs). Они обладают рядом свойств, стимулирующих развитие регенеративного процесса поврежденных тканей, и характеризуются гипоиммуногенностью, связанной с отсутствием рецепторов HLA класса II и иммуномодулирующим действием MSCs [9]. Последнее расширяет потенциал применения таких конструкторов в аллогенных условиях. Однако при проведении доклинических исследований на животных моделях продукты тканевой инженерии из аллогенных условий переходят в ксеногенные, что априори повышает риск развития конфликта организма реципиента с имплантируемым конструктором. Поэтому при проведении доклинических исследований необходимо учитывать наличие филогенетических различий даже при использовании очень близкой к человеку модели животного. При проведении доклинических исследований, направленных на доказательство эффективности применения БМКП, с целью минимизации отрицательных результатов, обусловленных реакцией организма на ксеногенный компонент, разрабатываемые продукты могут быть модифицированы в направлении стратегии «гомологичный препарат». В связи с этим актуальны разработки моделей гомологичных БМКП для определенных видов лабораторных животных.

Цель исследования: разработать модель биомедицинского клеточного продукта, согласующуюся со стратегией «гомологичный препарат» на основе протоколов подготовки клеточной составляющей и скаффолда-носителя для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Общие принципы работы

Все манипуляции по выделению и культивированию клеток, работы с кровью и ее производными, работы по формированию и культивированию гидрогелевых скаффолдов проводили в помещении класса С в стерильных условиях ламинаров (класс А) в лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Ростовые среды в процессе культивирования клеток и гидрогелевых скаффолдов регулярно контролировали на стерильность, контаминацию микоплазмами и вирусами, наличие грибковой флоры. Протокол исследования был одоб-

рен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и утвержден ученым советом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Каждый человек, включенный в исследование, представил добровольное информированное согласие.

1.2. Получение первичного донорского материала

В качестве источника человеческой плазмы крови использовали периферическую кровь 3 здоровых добровольцев. Кровь забиралась утром натощак из кубитальной вены в полимерные контейнеры «RAVIMED» (Польша) с раствором гемоконсерванта CPDA-1®. Плазму крови выделяли путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин. После центрифугирования проводили отбор плазмы крови. Полученную плазму крови замораживали и хранили при температуре –40 °С. В качестве исходного материала для получения мезенхимальных стволовых клеток использовали жировую ткань, полученную в процессе косметических операций в отделении реконструктивной и пластической хирургии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Материал был получен от трех молодых женщин, средний возраст которых составил 29,3 года (от 20 до 34 лет).

1.3. Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток человека

Мезенхимальные стволовые клетки человека выделяли из жировой ткани человека (Human Adipose-derived Stem Cells – hASCs) с помощью тепловой ферментативной обработки коллагеназой (Sigma-Aldrich, Германия) и культивировали в полной ростовой среде (среда α – MEM, 20% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), глутамин, антибиотики пенициллин/стрептомицин) при абсолютной влажности, +37 °С, 5% CO₂ (CO₂-инкубатор, Sanyo, Япония). Были использованы среды и реактивы фирмы Gibco® (UK), пластик фирмы Costar (США). По достижении субконфлюэнтного монослоя (60–70%) культуру пересеивали. Для экспериментов использовали культуры 3–4-го пассажа. В работе использовали hASCs с подтвержденным дифференцировочным потенциалом в адипогенном, остогенном и хондрогенном направлении. Жизнеспособность клеток перед введением в эксперимент составляла 98–99%. Иммунофенотип клеток был характерен для мезенхимальных стволовых клеток (MSCs): клетки экспрессировали CD 90, CD 105, CD 73, CD 44, CD 10 и не экспрессировали CD 45, CD 14, CD 34, HLA DR, что соответствовало критериям, определенным Международным обществом по клеточной терапии для мезенхимальных стволовых клеток.

1.4. Оценка концентрации и жизнеспособности клеток в культуре

Концентрацию и жизнеспособность клеток подсчитывали с помощью счетчика клеток Countes (Invitrogen, США) используя прижизненный краситель трипановый синий (Sigma-Aldrich, Германия).

1.5. Определение иммунофенотипа мезенхимальных стволовых клеток человека

Перед началом эксперимента определяли фенотип клеток с помощью панели моноклональных антител CD 90 FITC, CD 105 PE, CD 73 PE, CD 44 FITC, CD 45 PC5, CD 34 PC7, CD 14 PC5, CD 10 PC7, HLA-DR PC7 (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на проточном цитофлуориметре BD FACS CANTO II (Becton Dickinson, США).

1.6. Забор материала для получения мезенхимальных стволовых клеток свиньи и плазмы крови свиньи

В качестве тестовой культуры использовали мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани свиньи (Pig Adipose-derived Stem Cells – pASCs). Для разработки модельного эквивалента кожи использовали плазму крови свиньи. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (протокол № 8). Все процедуры работы с животными проводились в условиях вивария в операционной с соблюдением правил асептики и антисептики и требований European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (N 123 of 18 March 1986; ETS No. 170, June 22, 1998, Strasbourg).

В качестве источника pASCs использовали трех поросят породы Ландрас (возраст 8 недель, вес 13–15 кг, женского пола). Животные вводились в эксперимент после прохождения карантина в течение 14 дней. До начала операции животных тщательно мыли с использованием мыльного раствора. В операционной за 10–20 минут до начала общего обезболивания выполняли премедикацию внутримышечным введением препарата «КсилаВет» (Pharmamagist Ltd, Венгрия). Операцию забора материала проводили под сочетанным обезболиванием: после внутривенного введения Пропофола (B-Braun, Германия) животных интубировали, поддержание анестезии осуществляли Севораном (Abbott, UK). При проведении обезболивания использовали наркозный аппарат Fabius CS (Dräger Medical GmbH, Германия), мониторинг частоты пульса и насыщения артериаль-

ной крови кислородом проводили монитором Nihon Kohden (Япония).

Операционное поле последовательно обрабатывали 5% спиртовым раствором йода, затем 70% этиловым спиртом. Для получения MSCs жировой ткани забирали подкожно-жировую клетчатку в области спины животного в объеме 10–30 см³. Забор тканей производили с использованием электродерматомы ACCULAN® 3Ti Dermatome GA 670 (Braun, Германия). С операционного поля последовательно электродерматомом снимали слой кожи и верхний слой подкожно-жировой клетчатки (1,2 мм). После этого забирали образцы подкожно-жировой клетчатки (толщина лоскута 1,2 мм, ширина лоскута до 10 мм; глубина залегания слоя до 2,4 мм). Образцы подкожно-жировой клетчатки многократно тщательно промывали для удаления примесей крови в растворе Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Sigma, Германия).

Забор крови для получения плазмы крови проводили из бедренной вены. Катетеризацию вены проводили под контролем УЗИ (SonoSite SLL Ultrasound System, USA). Кровь забирали в контейнеры «RAVIMED» (Польша) с раствором гемоконсерванта CPDA-1®. Процедура выделения плазмы крови свиньи соответствовала процедуре выделения плазмы крови человека, описанной в разделе 1.2. Эвтаназия осуществлялась путем воздушной эмболии под наркозом.

1.7. Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток свиньи

Клетки из жировой ткани выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки 0,2% раствором коллагеназы I типа (Sigma, USA) в течение часа. После этого клетки культивировали в полной ростовой среде в культуральных флаконах 25 см². Для работы использовали среды и реактивы фирмы Gibco® (UK), пластик фирмы Costar (США). Первую смену ростовой среды проводили через 72 часа. В последующем смену среды проводили дважды в неделю. После формирования субконфлюэнтного монослоя (60–70%) культуру пересеивали. В экспериментах использовали культуры 3–4-го пассажа. Культивирование клеток на всех этапах проходило в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при 37 °C, 5% CO₂, абсолютной влажности.

1.8. Оценка дифференцировочного потенциала

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки применяли набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, США).

1.9. Определение иммунофенотипа клеток свиньи

Определение иммунофенотипа клеток свиньи проводили методом многоцветного анализа с помощью прямой реакции иммунофлуоресценции. В работе использовали панель моноклональных антител CD 44 FITC, CD 90 PerCP-Cy5.5, CD 10 PC7, CD 45 PE (Becton Dickinson, США) с соответствующими изотипическими контролями на цитофлуориметре FACS CANTO II (Becton Dickinson, USA). Настройка параметров измерения была выполнена однократно и стандартизирована при помощи частиц для проверки и настройки прибора BD™CST & T Beads (BD Cytometer Setup and Tracking Beads). Окрашенные клетки инкубировали 30 минут и отмывали для дальнейшего определения иммунофенотипа. Результаты выражали как долю клеток, несущих соответствующий маркер (в процентах).

1.10. Формирование БМКП (эквивалентов кожи / гидрогелевых скаффолдов)

Для формирования БМКП – эквивалентов кожи (ЭК) / гидрогелевых скаффолдов (Пат. № 2653434 РФ... от 11.04.2017; [10]) использовали плазму крови, полученную от здоровых доноров. Замороженную плазму крови размораживали при +2 °С и центрифугировали при +4 °С в течение 15 мин при 1500 об/мин для осаждения криопреципитата. Далее отбирали 85% супернатанта от первоначального объема замороженной плазмы крови. Криопреципитат термостатировали при 37 °С до полного его растворения. Определяли количество фибриногена в плазме крови, криопреципитате плазмы крови и в супернатанте. Криопреципитат стандартизовали по количеству фибриногена до конечной концентрации 6 г/л. Для стандартизации использовали супернатант с низким содержанием фибриногена, оставшийся после выделения криопреципитата. Для формирования эквивалентов кожи / гидрогелевых скаффолдов использовали пул криопреципитата плазмы крови от трех доноров.

Для ПЭГилирования белковой части криопреципитата использовали PEG-NHS (Sigma-Aldrich, Германия). К ПЭГилированному криопреципитату добавляли 2% раствор уксуснокислого коллагена I типа (коллаген, выделенный из шкур трески (Пат. № 2567171 РФ... от 06.10.2014) [11]), предварительно нейтрализованного NaOH. К полученному композиту добавляли раствор гентамицина – 0,28 мг/мл композита (Therma Fisher, США). Затем в состав композита вводили суспензию клеток (hASCs) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в соотношении 7 : 1 соответственно. Концентрация клеток – $1,2 \times 10^5$ на 1 мл композита. Полученный композит переносили в форму – чашку Петри диаметром 3,5 см, предвари-

тельно обработанную силиконом. Для полимеризации композита в него вводили тромбин-кальциевую смесь: 80 МЕ/мл бычьего тромбина (Sigma-Aldrich, Германия) в 1% растворе CaCl₂.

Полученные эквиваленты кожи (ЭК) выдерживали в форме в течение 20 минут при температуре +22–25 °С. Затем их перемещали в культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) и заливали 6 мл полной ростовой среды. Культуральные чашки с ЭК переносили в CO₂-инкубатор (37 °С, с увлажненной атмосферой и 5% содержанием CO₂) и культивировали в течение 6 суток со сменой ростовой среды дважды в неделю [12].

С целью формирования модельного эквивалента кожи (мЭК) в составе ЭК при его формировании криопреципитат плазмы крови человека и hASCs замещали криопреципитатом плазмы крови свиньи и rASCs. Методика получения криопреципитата плазмы крови свиньи (пул от трех животных) и метод формирования мЭК были идентичны методикам получения криопреципитата плазмы крови человека и формирования ЭК.

Исследования п. 1.12.1 и п. 1.12.2 проводили на бесклеточных гидрогелевых скаффолдах, сформированных на основе криопреципитата плазмы крови человека или на основе криопреципитата плазмы крови свиней. Скаффолды формировались согласно вышеописанному способу и в тех же условиях. При формировании бесклеточных скаффолдов суспензию клеток в PBS замещали равным объемом PBS. В исследованиях использовали образцы бесклеточных гидрогелевых скаффолдов непосредственно после изготовления.

1.11. Микроскопия

Состояние культур клеток человека и клеток свиньи оценивали в динамике на всех этапах культивирования. Для наблюдения за состоянием клеток в структуре гидрогелевых скаффолдов использовали метод светлого поля и фазового контраста. Микроскопию и видеоархивирование проводили с помощью инвертированного микроскопа «Leica DMI 3000B», оснащенного программой визуализации изображений LAZ.V.4.3.

Для визуализации клеток и подтверждения их жизнеспособности в структуре скаффолдов использовали флуоресцентную микроскопию, выполненную на имиджере Cyation 5 (BioTek, США). Для визуализации жизнеспособных клеток использовали Calcein AM (catalog № 564061, BD). Для визуализации ядер клеток использовали Hoechst 3334 (США). Окраска производилась в соответствии с протоколом производителя.

1.12. Исследование влияния гидрогелевых скаффолдов на культуру hASCs

1.12.1. Оценка цитотоксичности – МТТ-тест

Испытуемые образцы – бесклеточные гидрогелевые скаффолды (6 образцов скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови человека – скаффолд ЭК и 6 образцов скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови свиней – скаффолд мЭК; диаметр образцов 33 мм, толщина – 2 мм). Каждый образец помещали в культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) и заливали 6 мл полной ростовой среды. Образцы в среде помещали в CO₂-инкубатор и инкубировали при стандартных условиях 1 сутки (3 шт. скаффолдов ЭК, 3 шт. скаффолдов мЭК) и 8 суток (3 шт. скаффолдов ЭК, 3 шт. скаффолдов мЭК) для получения экстракта. В контрольные сроки (1 сутки, 8 суток) экстракт над образцами отбирали.

hASCs в концентрации 1×10^5 /мл засеивали на лунки плоскодонного 96-луночного планшета и культивировали в ростовой среде с 2% эмбриональной телячьей сывороткой при 37 °C, 5% CO₂ и абсолютной влажности в течение 3 дней. После 3 дней культивирования ростовая среда над клетками заменялась экстрактом от образцов и ростовой средой с 2% эмбриональной телячьей сывороткой в концентрации 0 : 1; 1 : 0; 1 : 1; 1 : 2; 1 : 4; 1 : 8 соответственно. Через 24 часа культивирования с экстрактом проводили МТТ-тест. Оптическую плотность регистрировали при 540 нм на анализаторе Sunrise (Австрия).

1.12.2. Оценка цитотоксичности – метод прямого контакта

Использовали образцы гидрогелевых бесклеточных скаффолдов диаметром 15 мм, толщиной 2 мм (9 образцов скаффолдов ЭК и 9 образцов скаффолдов мЭК). Образцы переносили на культуру hASCs и заливали 5 мл полной ростовой среды. hASCs за 24 часа до начала эксперимента высевали на культуральные чашки (Corning 60 мм × 15 мм; США) с плотностью 20 тыс./см². hASCs с образцами скаффолдов культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях. Контролем служила культура hASCs, культивируемая в тех же условиях и той же концентрации, но без образцов. В контрольные сроки (24, 72, 144 часа) оценивали состояние hASCs (морфология, плотность, жизнеспособность). По окончании эксперимента (через 144 часа культивирования с образцами) определяли иммунофенотип клеток (п. 1.5).

1.12.3. Сравнительное исследование трехмерного культивирования hASCs в ЭК и скаффолде мЭК

Для проведения исследования были сформированы ЭК (5 образцов) и мЭК (5 образцов) соглас-

но способу, описанному в разделе 1.7, с введением в состав композита hASCs. Образцы помещали в культуральные чашки с полной ростовой средой и культивировали до 6 суток в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях.

1.13. Характеристика плотности распределения клеток в эквивалентах

Для характеристики плотности распределения клеток в эквивалентах от исследуемых образцов (ЭК – 5 образцов; мЭК – 5 образцов) при помощи шаблона отделяли фрагменты площадью 0,64 см². Количество клеток определяли путем подсчета ядер через 24 часа с момента формирования ЭК и мЭК. Для этого выделенные фрагменты образцов переносили в 24 луночный планшет Black VisiplateTMTC (Wallac Oy, Финляндия). Далее проводили анализ количества клеток согласно способу количественного анализа клеточной составляющей скаффолда (Пат. № 2675376 РФ...от 17.07.2017 [13]). Способ включает прижизненное окрашивание ядер клеток в скаффолде с применением Hoechst 3334 (USA), флуоресцентную микроскопию с применением функции Z-stack (имиджер Cytation 5 с программным обеспечением Gen 5 Imedge+; BioTek, USA). Анализировали по 5 микрофотографий с каждого образца, снятых с разных полей зрения (увеличение: объектив 4×, окуляр 10×) на произвольных участках в толще образцов. Регистрировали объекты на участках в 530 мкм по оси Z. Для характеристики плотности распределения клеток в ЭК и мЭК анализировали сшитые Z-stack микрофотографии с подсчетом количества ядер клеток и последующим пересчетом количества клеток на 1 мм³.

1.14. Статистический анализ

Результаты исследований обработаны методами непараметрической статистики с применением критериев Манна–Уитни и парных сравнений Вилкоксона, при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ

2.1. Характеристика pASCs

После выделения клеток из жировой ткани их адгезия к пластику фиксировалась через 24 часа. Как правило, к 6–10-му дню клетки формировали субконфлюэнтный монослой (60–70%). После формирования субконфлюэнтного монослоя культуры пересеивали. На протяжении всего периода наблюдения клетки, выделенные и из жировой ткани свиньи, были морфологически однородными, характерной фибробластоподобной формы и хорошо распластывались на пластике. Клетки характеризовались четкими контурами, выраженными отростками, формирующими межклеточные контакты. По центру

клеток фиксировались овальные ядра с плотными ядрышками.

При проведении оценки дифференцировочного потенциала культивированных клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, на 6–7-е сутки после введения дифференцировочной среды в клетках фиксировали появление жировых вакуолей, окрашивающихся специфическим красителем Oil Red. При дальнейшем культивировании в дифференцировочной среде количество клеток с жировыми вакуолями возрастало (рис. 1, б). Об остеогенной дифференцировке сви-

детельствовало появление солей кальция в клетках, которые окрашивались специфическим красителем ализариновым красным (рис. 1, г). На 13–15-е сутки остеогенная дифференцировка подтверждалась при окрашивании клеток, выделенных из жировой ткани, на остеокальцин. Образование типичных для хондрогенной дифференцировки небольших сфероидов (pellet) фиксировали в пробирках уже через сутки после добавления среды ДМЕМ/F12 с дифференцировочной добавкой. В образовавшихся сфероидах

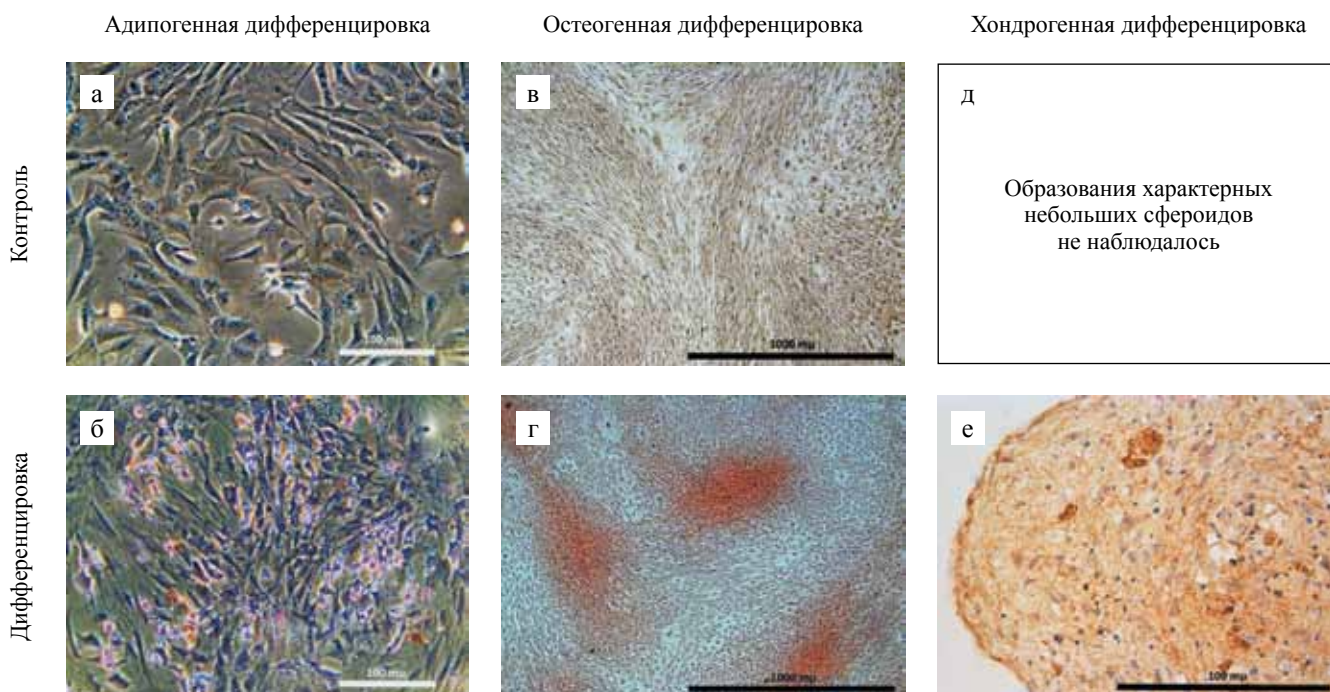


Рис. 1. Дифференцировка pASCs: а – контроль – культура pASCs третьего пассажа без использования дифференцирующей среды, субконфлюэнтный монослой образован типичными фибробластоподобными клетками, в клетках контрольной культуры образование жировых вакуолей не фиксируется; б – опыт – культура pASCs после культивирования в дифференцирующей среде, в клетках культуры четко определяются жировые вакуоли, что демонстрирует способность pASCs к адипогенной дифференцировке; в – контрольная культура pASCs представлена в виде субконфлюэнтного монослоя, образованного морфологически идентичными веретенообразными клетками, отложения кальция отсутствуют; г – культура pASCs экспериментальной серии после культивирования в специальной дифференцирующей среде, культура представляет собой субконфлюэнтный монослой, отчетливо визуализируются отложения кальция; е – окрашивание в сфероиде, сформированном культурой pASCs после культивирования в хондрогенной дифференцировочной среде отложений коллагена II типа поликлональными антителами (Abcam, ab34712), образование небольших сфероидов и отложение в них клетками коллагена II типа указывает на хондрогенную дифференцировку pASCs. а, б – окраска Oil Red, объектив 20×, окуляр 10×, фазовый контраст; в, г – окраска ализариновым красным, объектив 5×, окуляр 10×, световая микроскопия; е – объектив 40×, окуляр 10×, световая микроскопия

Fig. 1. Differentiation of pASCs. а, б – Adipogenic differentiation of pASCs, Oil Red stain, (15 days of cultivation; objective lens 20×, eyepiece 10×; phase contrast): а – control – culture of third passage pASCs without using a differentiating medium, the subconfluent monolayer is formed by typical fibroblast-like cells. In the cells of the control culture, the formation of fat vacuoles is not fixed; б – experience – culture of pASCs after cultivation in a differentiating medium. Fat culture vacuoles are clearly defined in culture cells stained with a specific Red Oil stain. The data obtained demonstrate the ability of pASCs to adipogenic differentiation; в, г – Osteogenic differentiation of pASCs. Osteogenic differentiation of pASCs, stained with alizarin red (15 days of cultivation; objective lens 5×, eyepiece 10×, light microscopy): в – the control culture of pASCs is presented as a subconfluent monolayer formed by morphologically identical spindle-shaped cells, with no calcium deposits; г – Culture pASCs of the experimental series after cultivation in a special differentiating medium. The culture is a subconfluent monolayer. Calcium deposits are clearly visualized, which are stained with a differentiating dye, alizarin red; е – Chondrogenic differentiation of ASCs. Staining of type II collagen deposits in the pellet with polyclonal antibodies (Abcam, ab34712; cell nuclei stained with hematoxylin and eosin (Sigma-Aldrich, Germany); objective lens 40×, eyepiece 10×). Ball formation and deposition of type II collagen in them indicates chondrogenic differentiation of ASCs

на 6-е сутки с помощью поликлональных антител фиксировали отложение коллагена II типа (рис. 1, е).

Фенотип клеток культур определяли в процессе роста культур со 2-го и до 6-го пассажа. В процессе исследования отмечено, что панлейкоцитарный антиген CD 45 на клетках, выделенных из жировой ткани, не определялся на всех этапах исследования (менее 1%). Выраженность экспрессии CD 44 на 2-м пассаже составляла в среднем 56%. В процессе роста культуры процент клеток, экспрессирующих CD 44, увеличивался и к шестому пассажу достигал 99,7%. Типичный маркер MSCs CD 90 экспрессировали на 2-м пассаже около 75% клеток. В процессе роста количество клеток, экспрессирующих CD 90, возрастало и к шестому пассажу составляло около 90% (рис. 2, а). Количество клеток, экспрессирующих CD 10, от пассажа к пассажу во всех культурах возрастало и к шестому пассажу составляло около 70%. Таким образом, фенотип клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, можно представить как CD 90+, CD 44+, CD 10+, CD 45–, что соответствует фенотипу MSCs.

Фенотип ASCs, полученных от нескольких животных (рис. 2, б), и динамика изменений экспрессии основных маркеров были аналогичны. Фиксировалось нарастание экспрессии CD 44 и CD 90 до 3–4-го пассажа. На более поздних сроках экспрессия

этих маркеров оставалась на неизменно высоком уровне. Анализ экспрессии CD 10 показал, что выраженность экспрессии этого антигена продолжала увеличиваться вплоть до 6 пассажа. Экспрессия CD 45 клетками оставалась неизменно на крайне низком уровне (менее 1%).

2.2. Сравнительное исследование влияния гидрогелевых скаффолдов на культуру hASCs

Сравнительное исследование цитотоксичности бесклеточных гидрогелевых скаффолдов на основе криопреципитата плазмы крови человека (скаффолд ЭК) и на основе криопреципитата плазмы крови свиньи (скаффолд мЭК) показало отсутствие цитотоксического действия на МСК человека (табл. 1). Анализ результатов МТТ-теста выявил выраженное стимулирующее действие экстракта, полученного от исследуемых бесклеточных скаффолдов, на пролиферативную активность hASCs. Так, под действием экстракта, отобранного после первых суток инкубации от скаффолдов ЭК, количество метаболически активных клеток в культуре увеличивалось более чем в 1,5 раза по сравнению с контролем. Аналогичный эффект наблюдался под действием экстракта от скаффолдов ЭК, после 8 суток инкубации. Под действием экстракта, который был отобран от скаффолдов мЭК

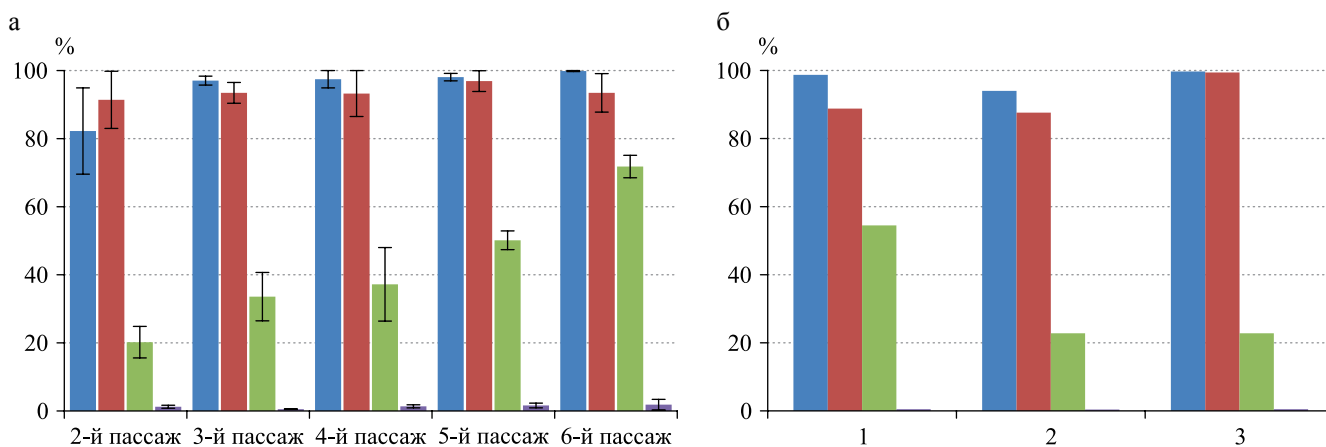


Рис. 2. Экспрессия маркеров дифференцировки на pASCs: а – пример изменения фенотипа клеток от одного из экспериментальных животных в процессе культивирования – от пассажа к пассажу прослеживается нарастание количества клеток, экспрессирующих CD 44 (синий), CD 90 (красный), CD 10 (зеленый). Количество клеток в культуре pASCs, экспрессирующих CD 45 (фиолетовый), было менее 1% в течение всего периода культивирования; б – сравнительная диаграмма фенотипа MSCs, выделенных из жировой ткани трех различных животных (3-й пассаж). Во всех экспериментальных культурах количество клеток, экспрессирующих CD 44 (синий), превышало 90%, CD 90 (красный) – 87% и CD 10 (зеленый) – 22%. Экспрессия панлейкоцитарного антигена CD 45 на клетках исследуемых культур составляла менее 1%

Fig. 2. Expression of differentiation markers on pASCs: а – is an example of a change in the phenotype of cells from one of the experimental animals during cultivation – from passage to passage there is an increase in the number of cells expressing CD 44 (blue), CD 90 (red), CD 10 (green). The number of cells in the culture of pASCs expressing CD 45 (purple) was less than 1% over the entire cultivation period; б – a comparative diagram of the phenotype of MSCs extracted from adipose tissue from three different animals (passage 3). In all experimental cultures, the number of cells expressing CD 44 (blue) exceeded 90%, CD 90 (red) – 87% and CD 10 (green) – 22%. The expression of the panleukocyte antigen CD 45 on the cells of the studied cultures was less than 1%

Таблица 1

Исследование цитотоксичности бесклеточных гидрогелевых скаффолдов**Cytotoxicity study of cell-free hydrogel scaffolds**

Отбор экстракта	Скаффолд	Контроль 0 : 1	Экстракт 1 : 0	Экстракт 1 : 1	Экстракт 1 : 2	Экстракт 1 : 4	Экстракт 1 : 8
1-е сутки	ЭК	0,341 ± 0,007	0,518 ± 0,011*	0,537 ± 0,026*	0,442 ± 0,020*	0,423 ± 0,020*	0,334 ± 0,007
	мЭК	0,322 ± 0,011	0,568 ± 0,026*	0,442 ± 0,029*	0,403 ± 0,014*	0,370 ± 0,011*	0,393 ± 0,016*
8-е сутки	ЭК	0,327 ± 0,010	0,519 ± 0,021*	0,512 ± 0,014*	0,437 ± 0,011*	0,371 ± 0,020	0,348 ± 0,022
	мЭК	0,282 ± 0,006	0,557 ± 0,032*	0,505 ± 0,025*	0,405 ± 0,022*	0,364 ± 0,016*	0,323 ± 0,017

Примечание. * – $p < 0,05$, сравнение с контролем, критерий Вилкоксона; ■ – $p < 0,05$, сравнение ЭК с мЭК, критерий Манна–Уитни.

Note. * – $p < 0.05$, comparison with control, Wilcoxon test; ■ – $p < 0.05$, comparison of skin equivalent with modal skin equivalent, Mann–Whitney test.

Таблица 2

Сравнительное исследование влияния на культуру hASCs бесклеточного модельного эквивалента кожи**Comparative study of the effect on hASCs culture of cell-free model skin equivalent**

Время культивирования	Плотность клеток ($\times 10^3/\text{см}^2$)	Абсолютное число клеток ($\times 10^3$)	Жизнеспособность клеток (% жизнеспособных клеток)
Контроль			
24 часа	26,73 ± 1,17	534,67 ± 23,33	98,70 ± 0,15
72 часа	39,47 ± 1,81	789,48 ± 36,15	99,52 ± 0,18
144 часа	40,64 ± 0,95	812,81 ± 18,94	99,58 ± 0,10
Скаффолд ЭК			
24 часа	27,894 ± 0,90	557,89 ± 17,97	99,25 ± 0,31
72 часа	39,29 ± 1,47	785,81 ± 29,30	99,55 ± 0,18
144 часа	45,17 ± 2,34	902,35 ± 46,95	99,63 ± 0,12
Скаффолд мЭК			
24 часа	27,96 ± 1,05	559,11 ± 21,03	99,77 ± 0,15
72 часа	38,68 ± 2,36	773,59 ± 47,14	99,13 ± 0,10
144 часа	42,51 ± 1,97	850,12 ± 39,34	99,65 ± 0,16

(1-е, 8-е сутки инкубации), количество метаболически активных клеток возрастало более чем в 1,8 раза по сравнению с контролем. Разведение экстрактов приводило к снижению их стимулирующего эффекта. В то же время даже при разведении экстрактов в два раза количество метаболически активных клеток статистически значимо возрастало по сравнению с контролем. При сравнении действия экстрактов от бесклеточных скаффолдов ЭК и мЭК на культуру hASCs значимых различий по результатам МТТ-теста выявлено не было.

При культивировании hASCs человека в присутствии бесклеточных гидрогелевых скаффолдов ЭК и мЭК отрицательного влияния скаффолдов на культуру hASCs выявлено не было. Плотность клеток в культуре и их абсолютное количество в опытных культуральных чашках (скаффолд ЭК, скаффолд мЭК) статистически значимо не отличались от контроля на всех сроках исследования (табл. 2). Клетки в опытных культуральных чашках и контрольных чашках хорошо распластывались на пластике и

формировали субконфлюэнтный слой. hASCs были морфологически однородны, характерной фибробластоподобной формы с четкими контурами, выраженными отростками, клетки формировали межклеточные контакты. Все клетки характеризовались высокой жизнеспособностью (табл. 2). Фенотип клеток из контрольных и опытных культуральных чашек после окончания эксперимента не отличался и соответствовал фенотипу MSCs. Клетки экспрессировали CD 90, CD 105, CD 73, CD 44, CD 10 и не экспрессировали CD 45, CD 34, CD 14, CD HLA DR.

hASCs жировой ткани человека, инкапсулированные в скаффолды ЭК и мЭК, при трехмерном культивировании характеризовались одинаковой активностью. Так, уже через 24 часа клетки проявляли активную матрикс-клеточную адгезию и начинали выбрасывать клеточные отростки (рис. 3, а, б). В процессе дальнейшего культивирования наблюдался динамичный трехмерный рост клеток с формированием множественных отростков и межклеточных контактов. На шестые сутки в скаффолдах ЭК и мЭК

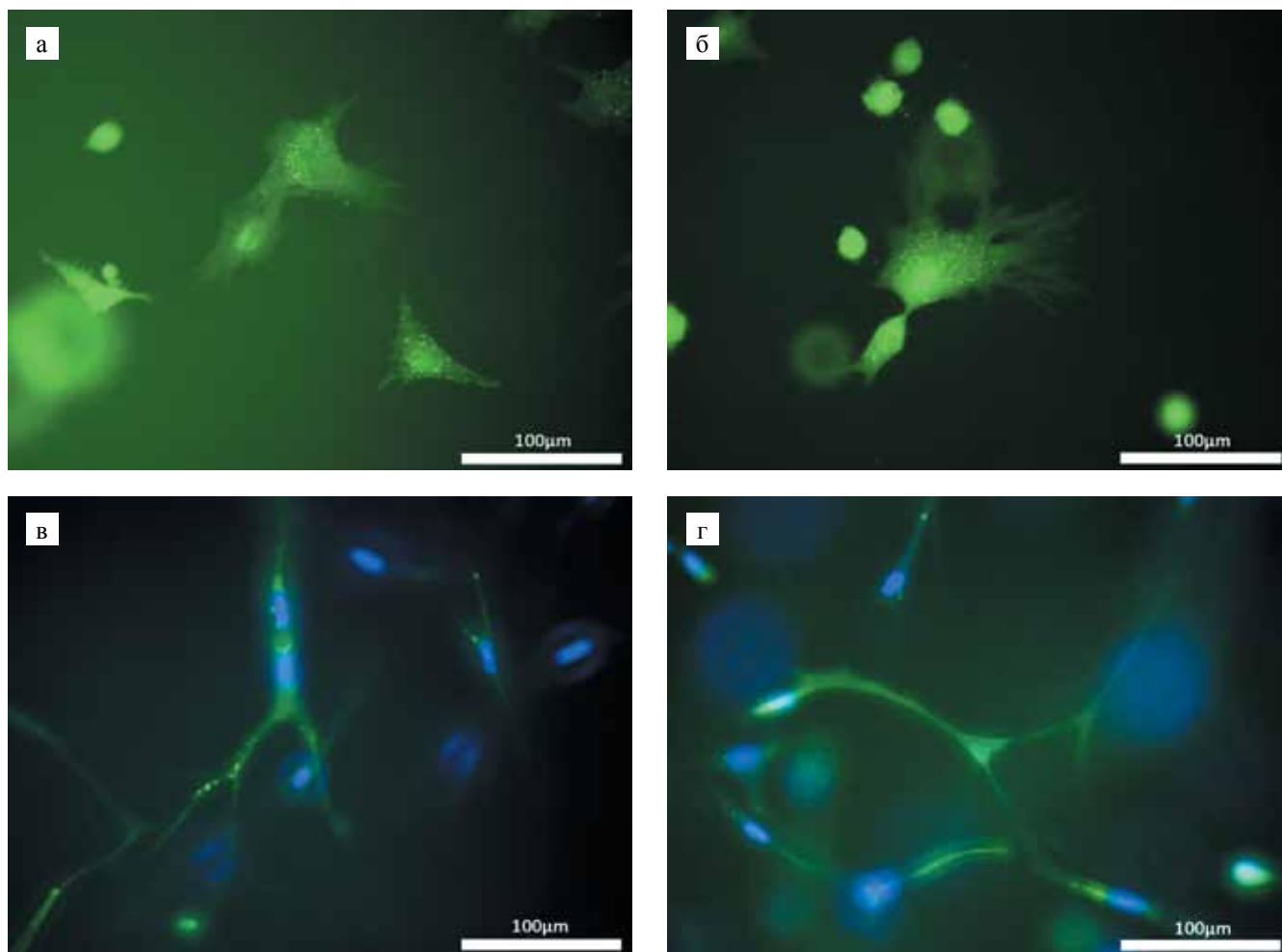


Рис. 3. Культивирование hASCs в ЭК (а, в) и скаффолде на основе криопреципитата плазмы крови свиньи (б, г). Клеточные события при культивировании hASCs в ЭК и в скаффолде на основе криопреципитата плазмы крови свиньи имели аналогичный характер: а, б – 24 часа культивирования: клетки расправляются, выбрасывают клеточные отростки; в, г – 6-е сутки культивирования: трехмерный рост клеток с формированием множественных отростков и межклеточных контактов. Флуоресцентная микроскопия: специфическим флуоресцентным красителем Calcein AM (зеленый) окрашиваются жизнеспособные клетки; б, г – ядра клеток (синий) окрашены флуорохромом Hoechst 3334. *Примечание.* Вне фокуса клетки и ядра, лежащие в других слоях трехмерной структуры скаффолдов ЭК и мЭК (относительно слоя, в котором клетки в фокусе)

Fig. 3. Cultivation of hASCs in Skin Equivalents (а, в) and scaffold based on pig blood plasma cryoprecipitate (б, г). Cellular events during cultivation of hASCs in skin equivalents and in a scaffold based on pig blood plasma cryoprecipitate were of a similar nature: а, б – 24 hours of cultivation: the cells flatten, eject cell processes; в, г – 6th day of cultivation: three-dimensional cell growth with the formation of multiple processes and intercellular contacts. Fluorescence microscopy: Calcein AM specific fluorescent dye (green) stains viable cells; б, г – cell nuclei (blue) are stained with Hoechst 3334 fluorochrome. *Note.* Out of focus are cells and nuclei lying in other layers of the three-dimensional structure of skin equivalent scaffolds and MSE (regarding the layer in which the cells are in focus)

фиксировали формирование и развитие клеточной сети (рис. 3, в, г). Жизнеспособность клеток, культивируемых в скаффолдах ЭК и мЭК, подтверждена окрашиванием Calcein AM.

2.3. Сравнительная характеристика ЭК и мЭК

Модельные эквиваленты кожи, сформированные на основе криопреципитата плазмы крови свиньи с rASCs, имели характеристики, аналогичные эквива-

лентам кожи, сформированным на основе криопреципитата плазмы крови человека и hASCs. ЭК и мЭК представляли собой формоустойчивую, эластичную, прозрачную, гидрогелевую структуру (рис. 4, а, б). Клетки были распределены относительно равномерно по всей структуре эквивалентов, как в ЭК, так и в мЭК (рис. 4, в, г). Количество клеток, определяемое на 1 мм³ через 24 часа после формирования эквивалентов, статистически значимо не отличалось в ЭК и мЭК и составляло $135,70 \pm 24,78$ и $124,93 \pm 22,81$ соответственно.

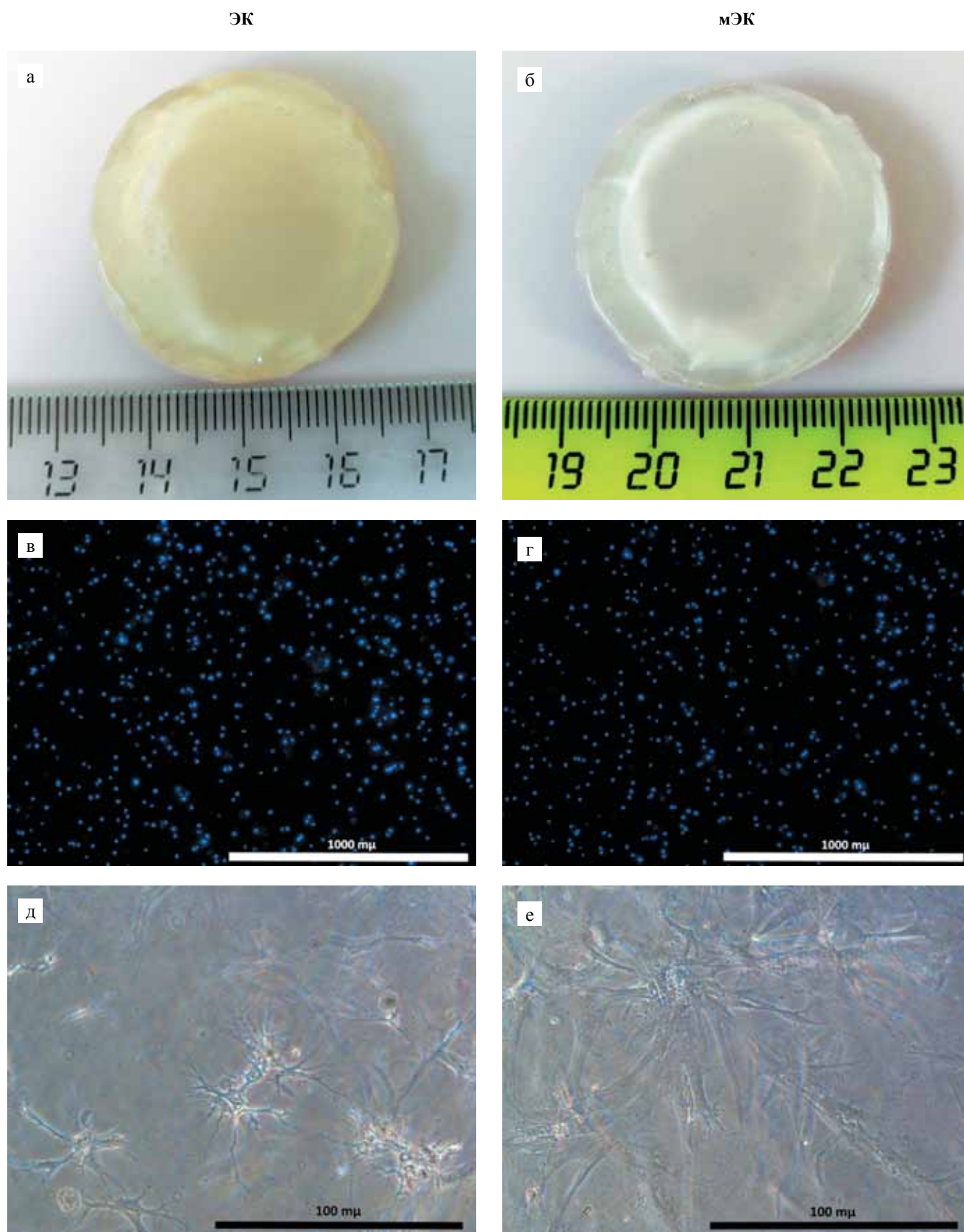


Рис. 4. ЭК и мЭК: а, б – внешний вид эквивалентов; в, г – ядра клеток, флуоресцентная микроскопия: сшитые микрофотоснимки z-стек (530 мкм), ядра клеток (синий) окрашены специфическим флуорохромом Hoechst 3334; д, е – MSCs, культивируемые в эквивалентах (3-и сутки культивирования; фазовый контраст, объектив 40×, окуляр 10×)

Fig. 4. Skin equivalents and model skin equivalents: а, б – is the appearance of the equivalents; в, г – cell nuclei, fluorescence microscopy: crosslinked microphotographs z-stack (530 μm), cell nuclei (blue) stained with specific Hoechst 3334 fluorochrome; д, е – MSCs cultured in equivalents (3 days of cultivation; phase contrast, objective lens 40×, eyepiece 10×)

В процессе культивирования ЭК и мЭК значимых различий в развитии клеточных событий выявлено не было. Через 24 часа после формирования эквивалентов наблюдали матрикс-клеточную адгезию, начало формирования клеточных отростков и распластывание клеток. В процессе дальнейшего культивирования МСК жировой ткани человека и МСК жировой ткани свиньи проявляли активный трехмерный рост (рис. 4, д, е). Клетки формировали разнонаправленные множественные отростки и межклеточные контакты, что в дальнейшем приводило к организации клеточной сети.

3. ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биомедицинских клеточных продуктов неизбежно связана с прохождением этапов доклинических исследований на лабораторных животных. В то же время проведение исследований на крупных лабораторных животных является менее распространенной практикой, чем проведение исследований на мелких лабораторных животных, таких как грызуны. В связи с этим при подготовке протоколов исследований не всегда имеется возможность опереться на аналогичные работы и в полной мере руководствоваться стандартными или общепринятыми методами.

Для разработки комплексного подхода к формированию модели БМКП, согласующейся со стратегией «гомологичный препарат», для доклинических исследований на крупном лабораторном животном (свинье) в качестве объекта исследований был выбран эквивалент кожи. Основными составляющими эквивалента кожи, представленного в этой работе, являются криопреципитат плазмы крови человека, коллаген трески I типа, бычий тромбин и мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани человека. Криопреципитат плазмы крови и hASCs в составе ЭК находятся в аллогенных условиях по отношению к реципиенту (человеку). При использовании ЭК в исследованиях на модели свиньи эти компоненты перейдут из аллогенных условий в ксеногенные по отношению к реципиенту-модели (свинье). Известно, что одни и те же клеточные продукты и продукты тканевой инженерии могут иметь значительно более высокую иммуногенность в ксеногенных условиях по сравнению с аллогенными. В ряде экспериментальных исследований было показано, что результаты использования ксеногенных MSCs значительно уступают результатам, полученным при использовании аллогенных или аутогенных клеток, и могут приводить к развитию негативных явлений. Например, P. Niemeyer et al. (2010) обнаружили, что в группе животных, получавших лечение ксеногенными MSCs, результаты регенерации костной ткани были хуже по всем исследуемым параметрам по сравнению с группой животных, получавшей лечение аутогенными MSCs [14]. Для того чтобы из-

бежать в будущем, при проведении доклинических исследований, искажения результатов, связанных с видоспецифическим иммунным ответом, мы разработали модель эквивалента кожи для проведения доклинических исследований на свиньях. Исходя из соответствия стратегии «гомологичный препарат», при разработке модельного эквивалента кожи в составе ЭК при его формировании было необходимо заместить криопреципитат плазмы крови человека и hASCs на криопреципитат плазмы крови свиньи и pASCs. Морской коллаген и бычий тромбин, входящие в состав ЭК, по нашему мнению, не требовали замещения, в связи с тем что являются ксеногенными компонентами как по отношению к человеку, так и по отношению к свинье.

Проведя анализ литературы, мы не обнаружили общепринятого протокола по выделению, культивированию и характеристике pASCs. Нами были подготовлены и апробированы относительно простые в реализации и подходящие для экспериментальной работы протоколы, основные положения которых изложены в п. 1.6–1.9 раздела «Материалы и методы». Представленные подходы дают возможность провести забор биоматериала определенной области жировой ткани, что позволяет получать однородный первичный материал и стандартизовать технику забора тканей. Использование дерматома позволяет получить лоскуты жировой ткани с определенной глубины. Толщина лоскутов (до 1,2 мм) упрощает обработку первичного материала, не требуя грубой первичной механической гомогенизации или дополнительных манипуляций для формирования тонких лоскутов до этапа механической дезагрегации, как, например, при заборе больших объемов жировой ткани [15].

Выбранные подходы позволили провести характеристику клеток, полученных из жировой ткани свиньи, по основным параметрам, необходимым для их идентификации и использования в экспериментальной работе: жизнеспособность, морфология, дифференцировочный потенциал, иммунофенотип. Полученные нами данные по выделению и характеристике MSCs из жировой ткани свиньи, как и приведенные в литературе [16,17], демонстрируют способность pASCs к остеогенной, адипогенной и хондрогенной дифференцировке, проявлению типичных морфологических характеристик и определенного иммунофенотипа.

Одним из основных компонентов представленного в работе ЭК является криопреципитат плазмы крови. В модельном ЭК криопреципитат плазмы крови человека замещали криопреципитатом плазмы крови свиньи. Манипуляции, связанные с выделением плазмы крови свиньи и подготовкой криопреципитата, технологически полностью соответствовали тем, которые использовались при подготовке криопре-

ципитата плазмы крови человека для формирования ЭК. В основу способа формирования ЭК заложена реакция ферментативного гидролиза, осуществляемая в присутствии тромбина. Основным структурообразующим белком при формировании скаффолда ЭК является фибриноген криопреципитата плазмы крови, количество которого в композите более чем в 22 раза превышает количество коллагена. Таким образом, процесс формирования ЭК имитирует процесс свертывания крови. Свертывающая система крови свиней не имеет кардинальных отличий от свертывающей системы крови человека [18]. Исходя из этого при формировании мЭК мы использовали тот же способ, что и при формировании ЭК. Возможность использования мЭК в доклинических исследованиях предполагает, что мЭК не должны иметь принципиальных отличий в своих свойствах по сравнению с ЭК. Для проверки этого положения была проведена сравнительная оценка цитотоксичности и влияния на культуру hASCs бесклеточных скаффолдов ЭК и мЭК, выступающих в качестве скаффолда-носителя клеток. Данные МТТ-теста подтвердили отсутствие цитотоксичности скаффолдов мЭК. Результаты МТТ-теста показали, что количество метаболически активных клеток в присутствии экстрактов от скаффолдов ЭК и мЭК значительно возрастало. Эти данные свидетельствуют о повышении пролиферативной активности клеток в присутствии скаффолдов. Оба скаффолда сформированы на основе криопреципитата плазмы крови. В плазме крови человека и в плазме крови свиньи содержится достаточно много биологически активных веществ (аминокислоты, белки, микроэлементы и прочее) [19]. Известно, что концентрация многих биологически активных веществ (БАВ) в криопреципитате плазмы крови значительно выше, чем в плазме крови [20]. Компоненты плазмы крови могут принимать непосредственное участие в регуляции клеточного роста. Так, например, в плазме крови присутствуют катионы кальция. M.N. Lee et al. показали, что повышение в культуральной среде концентрации Ca^{2+} приводит к повышению пролиферативной активности MSCs [21]. В образцах скаффолдов исследуемых эквивалентов также присутствует экзогенный кальций, входящий в состав тромбин-кальциевой смеси, используемой при изготовлении скаффолдов. Таким образом, выявленный стимулирующий эффект, вероятнее всего, связан с действием биологически активных веществ, экстрагируемых из скаффолдов.

Результаты теста прямого контакта подтвердили отсутствие отрицательного воздействия скаффолдов ЭК и мЭК на жизнеспособность, адгезию, морфологию, пролиферацию и иммунофенотип hASCs. В то же время результаты этого теста не показали стимулирующего действия бесклеточных скаффолдов на пролиферацию hASCs. Вероятнее всего, это объяс-

няется низкой концентрацией БАВ, вымываемых из скаффолдов в этом эксперименте. Известно, что при культивировании клеток наличие и концентрация БАВ в культуральной среде во многом определяет рост культуры [22]. Так, при постановке МТТ-теста экстракт отбирали от скаффолдов диаметром 33 мм, инкубируемых в 6 мл среды. При постановке теста на биосовместимость были использованы образцы скаффолдов диаметром 15 мм и 5 мл среды. При этом количество клеток, на которые действовали БАВ, выделяемые образцами, в МТТ-тесте было значительно меньше по сравнению с количеством клеток в тесте прямого контакта. Таким образом, результаты теста прямого контакта можно в определенной мере сопоставить с результатами МТТ-теста с высоким разведением экстракта (1 : 8). При высоком разведении экстракта количество метаболически активных клеток мало отличалось от контроля, а результаты действия экстракта на клетки были сопоставимы с культивированием клеток в ростовой среде.

Известно, что мезенхимальные стволовые клетки, инкапсулированные в гидрогелевые скаффолды, проявляют трехмерный рост [23]. Для того чтобы выяснить, в какой мере мЭК-скаффолд обеспечивает трехмерный рост клеток и насколько клеточные события в мЭК будут сопоставимы с ЭК, одни и те же культуры hASCs инкапсулировали в оба вида скаффолдов. hASCs, инкапсулированные в скаффолды, поддерживали жизнеспособность и проявляли трехмерный рост. Оба скаффолда являются гидрогелями. Известно, что гидрофильная природа гидрогелей облегчает обмен питательными веществами и продуктами жизнедеятельности между клетками в условиях трехмерной структуры, способствуя поддержанию высокой жизнеспособности клеток [24]. Клеточные события, наблюдаемые в скаффолдах ЭК и мЭК, не имели значимых отличий в период наблюдения. Известно, что жизнеспособность, рост, морфология, миграция, пролиферативная активность и т. д. во многом определяются составом и структурой скаффолда [25]. Последнее позволяет предполагать, что состав и структура скаффолдов ЭК и мЭК, влияющие на поведение клеток, сопоставимы.

Последнее положение также подтверждают данные, полученные при формировании ЭК и мЭК. Так, известно, что свойства скаффолда, как механически поддерживающей структуры для клеток, определяются его внутренней архитектурой. При формировании ЭК и мЭК клетки распределялись относительно равномерно по всей структуре эквивалентов с одинаковой плотностью. Структуры ЭК и мЭК сформированы прежде всего фибриновой сетью. Самосборка фибриновых волокон зависит от концентрации фибриногена, тромбина и кальция [26]. Данные литературы свидетельствуют о том, что ПЭГилирование белка также оказывает значитель-

ное влияние на формирующиеся фибриновые волокна [27]. В состав композита для формирования скаффолдов также входит коллаген. Коллаген различного происхождения достаточно широко применяется в скаффолд-технологиях и хорошо зарекомендовал себя в качестве структурообразующего биополимера для формирования моно- и поликомпонентных скаффолдов [28, 29]. Таким образом, используемый при формировании эквивалентов коллаген также может принимать участие в образовании структуры ЭК и мЭК. В то же время концентрации и соотношения вышеперечисленных компонентов при создании мЭК были такими же, как и при формировании ЭК. Трехмерное культивирование рASCs в составе мЭК подтвердило сопоставимость клеточных событий, развивающихся в мЭК с ЭК.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что условия формирования эквивалентов (состав, соотношение и концентрации основных компонентов, участвующих в образовании структуры, методический подход) позволяют получить структуры, аналогичным образом осуществляющие механическую поддержку клеток и позволяющие создать сопоставимые условия для размещения и взаимодействия MSCs.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлен комплексный подход при разработке модели биомедицинского клеточного продукта на примере эквивалента кожи для проведения доклинических исследований на крупном лабораторном животном, учитывающий стратегию «гомологичный препарат». При подготовке модельного БМКП компоненты ЭК (разработанного для применения у человека), переходящие из алогенных условий в ксеногенные, при трансплантации животному были замещены. Подтверждено соответствие характеристик клеток, выделенных из жировой ткани свиньи, требованиям, предъявляемым к MSCs. В перспективе комплекс методов и подходов, использованных в работе для выделения, культивирования и характеристики рASCs, получения свиной плазмы может быть полезен при проведении работ, основанных на использовании клеток животных, например, при разработке протоколов для ксенотрансплантации клеток и конструкций на их основе. Показано отсутствие цитоксичности бесклеточного скаффолда мЭК. Подтверждено, что скаффолд мЭК обеспечивает аналогичные со скаффолдом ЭК условия для размещения и трехмерного роста клеток. Клеточные события, развивающиеся в процессе культивирования мЭК и ЭК, также были сопоставимы. Следовательно, мЭК на основе криопреципитата плазмы крови свиньи и рASCs может быть использован при проведении исследований на крупных лабораторных животных (свиньях) в качестве модели соответствующей стра-

тегии «гомологичный препарат». Мы надеемся, что комплекс методов и алгоритм работы, использованные при разработке модельного эквивалента, будут полезны при подготовке и проведении доклинических исследований подобных биомедицинских клеточных продуктов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. La Francesca S, Aho JM, Barron MR, Blanco EW, Soliman S, Kalenjian L et al. Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells. *Sci Rep.* 2018; 8: 4123. doi: 10.1038/s41598-018-22401-x.
2. Lin C, Chiu P, Hsueh Y, Shieh S, Wu C, Wong T et al. Regeneration of rete ridges in Lanyu pig (*Sus scrofa*): Insights for human skin wound healing Short running title: Full-thickness wound healing in the Lanyu Pig. *Exp Dermat.* 2019; 4: 472–479. doi: 10.1111/exd.13875.
3. Davidson JM. Animal models for wound repair. *Arch Dermatol Res.* 1998; 290: S1–S11.
4. Hammond SA, Tsonis C, Sellins K, Rushlow K, Scharton-Kersten T, Colditz I, Glenn GM. Transcutaneous immunization of domestic animals: Opportunities and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 43: 45–55. doi: 10.1016/S0169-409X(00)00076-4.
5. Wollina U, Berger U, Mahrle G. Immunohistochemistry of porcine skin. *Acta Histochem.* 1991; 90: 87–91. doi: 10.1016/S0065-1281(11)80166-2.
6. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. Perspective article. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen Med.* 2001; 9: 66–76.
7. Mair KH, Sedlak C, Käser T, Pasternak A, Levast B, Gerner W et al. The porcine innate immune system: An update. *Dev Comp Immunol.* 2014; 45: 321–343. doi: 10.1016/j.dci.2014.03.022.
8. Summerfield A, Meurens F, Ricklin ME. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol Immunol.* 2015; 66: 14–21. doi: 10.1016/j.molimm.2014.10.023.
9. Wang M, Yuan Q, Xie L. Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int.* 2018: 1–12. doi: 10.1155/2018/3057624.
10. Егорихина МН, Левин ГЯ, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ, Соснина ЛН. Пат. 2653434 РФ, МПК C12N 5/00. Способ создания биорезорбируемого клеточного скаффолда на основе фибрина плазмы крови. Заявка: 2017112424, 11.04.2017. Оpubл. 08.05.2018; Бюл. № 13. Егорихина МН, Левин ГЯ, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ, Соснина ЛН. Patent. 2653434 RU, Int. Cl. C12N 5/00. Method for creating a bioresorbable cellular scaffold based on fibrin of blood plasma. Application: 2017112424, 11.04.2017. Bull. 2018: 13.

11. Семеньева ЛЛ, Астанина МВ, Кузнецова ЮЛ, Валетова НБ, Гераскина ЕВ, Таранкова ОА. Пат. 2567171 РФ, МПК C08H 1/06, A23J 1/04. Способ получения уксусной дисперсии высокомолекулярного рыбного коллагена. Заявка: 2014140300/13, 06.10.14. Оpubл. 10.11.15; Бюл. № 31. *Semenycheva LL, Astanina MV, Kuznetsova JL, Valetova NB, Geras'kina EV, Tarankova OA. Patent. 2567171 Int. Cl. C08H 1/06, A23J 1/04. Method for production of acetic dispersion of high molecular fish collagen. Bull. 2015: 31.*
12. Егорихина МН, Левин ГЯ, Алейник ДЯ, Чарыкова ИН, Рубцова ЮП, Соснина ЛН, Давыденко ДВ. Скаффолд для замещения дефектов кожи на основе естественных биополимеров. *Успехи современной биологии.* 2018; 138 (3): 273–282. *Egorikhina MN, Levin GYa, Aleinik DYa, Charykova IN, Rubtsova YuP, Sosnina LN, Davydenko DV. Scaffold for Substitution of Skin Defects Based on Natural Biopolymers. Biol Bull Rev. 2018; 137: 273–282. [In Russ, English abstract]. doi: 10.7868/S0042132418030055.*
13. Егорихина МН, Чарыкова ИН, Алейник ДЯ. Пат. 2675376 РФ, МПК G01N 33/52. Способ количественного анализа клеточной составляющей скаффолда. Заявка: 2017125696, 17.07.2017; Оpubл. 19.12.2018; Бюл. № 35. *Egorikhina MN, Charykova IN, Aleinik DYa. Patent № 2675376 The Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/52. Method of quantitative analysis of cellular components of scaffold. Application: 2017125696, 17.07.2017, Bull. 2018.*
14. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp NP, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. *Acta Biomater.* 2010; 6: 900–908. doi: 10.1016/j.actbio.2009.09.007.
15. Chen Y, Liu H, Chang Y, Cheng Y, Mersmann HJ, Kuo W, Ding S. Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Porcine Subcutaneous Adipose Tissues. *J Vis Exp.* 2016; 109: e53886. doi: 10.3791/53886.
16. Jeon BG, Bharti D, Lee WJ, Jang SJ, Park JS, Jeong GJ, Rho GJ. Comparison of mesenchymal stem cells isolated from various tissues of isogenic minipig. *Animal Cells Syst (Seoul).* 2015; 19: 407–416. doi: 10.1080/19768354.2015.1089323.
17. Qu CQ, Zhang GH, Zhang LJ, Yang GS. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In vitro Cell. Dev Biol Anim.* 2007; 43: 95–100. doi: 10.1007/s11626-006-9008-y.
18. Sondeen JL, De Guzman R, Amy Polykratis I, Dale Prince M, Hernandez O, Cap AP, Dubick MA. Comparison between human and porcine thromboelastograph parameters in response to *ex vivo* changes to platelets, plasma, and red blood cells. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013; 24: 818–829. doi: 10.1097/MBC.0b013e3283646600.
19. Schmidt JA, Rinaldi S, Scalbert A, Ferrari P, Achaintre D, Gunter MJ et al. Plasma concentrations and intakes of amino acids in male meat-eaters, fish-eaters, vegetarians and vegans: A cross-sectional analysis in the EPIC-Oxford cohort. *Eur J Clin Nutr.* 2016; 70: 306–312. doi: 10.1038/ejcn.2015.144.
20. Nascimento B, Goodnough LT, Levy JH. Cryoprecipitate therapy. *Br J Anaesth.* 2014; 113: 922–934. doi: 10.1093/bja/aeu158.
21. Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH et al. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med.* 2018; 50: 142. doi: 10.1038/s12276-018-0170-6.
22. Gharibi B, Hughes FJ. Effects of Medium Supplements on Proliferation, Differentiation Potential, and *in vitro* Expansion of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012: 771–782. doi: 10.5966/sctm.2010-0031.
23. Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods.* 2016; 13: 405–414. doi: 10.1038/nmeth.3839.
24. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001; 101: 1869–1879. doi: 10.1021/cr000108x.
25. Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-pour Z, Vojdani Z, Sani M, Latifi M, Talaei-Khozani T. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017; 71: 372–380. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.001.
26. Weisel JW, Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys J.* 1992; 63: 111–128. doi: 10.1016/S0006-3495(92)81594-1.
27. Shpichka AI, Koroleva AV, Deiwick A, Timashev PS, Semenova EF, Moiseeva IY et al. Evaluation of the vasculogenic potential of hydrogels based on modified fibrin. *Cell tissue biol.* 2017; 11: 81–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1134/S1990519X17010126>.
28. Subhan F, Ikram M, Shehzad A, Ghafoor A. Marine Collagen: An Emerging Player in Biomedical applications. *J Food Sci Technol.* 2015; 52: 4703–4707. doi: 10.1007/s13197-014-1652-8.
29. Lausch AJ, Chong LC, Uludag H, Sone ED. Multiphasic Collagen Scaffolds for Engineered Tissue Interfaces. *Adv Funct Mater.* 2018; 28: 1–9. doi: 10.1002/adfm.201804730.

Статья поступила в редакцию 24.10.2019 г.

The article was submitted to the journal on 24.10.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-157-164

ФОРМИРОВАНИЕ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОЙ КУЛЬТИ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА С ПОМОЩЬЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА И АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

Е.А. Горбунова, О.И. Кривошеина, Л.Р. Мустафина

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Российская Федерация

Цель: в эксперименте *in vivo* изучить морфологические особенности формирования опорно-двигательной культы глазного яблока с помощью тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови. **Материалы и методы.** Выполнена серия экспериментов на 54 половозрелых крысах породы Wistar весом 200–250 г, которые в зависимости от вида оперативного вмешательства были разделены на 3 группы: 1-я группа ($n = 18$) – животным после эвисцероэнуклеации формировали опорно-двигательную культю глазного яблока путем имплантации в склеральный мешок тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови; 2-я группа ($n = 18$) – опорно-двигательную культю глаза формировали путем имплантации никелида титана в склеральный мешок; 3-я группа ($n = 18$) – опорно-двигательную культю формировали с помощью имплантата из биоматериала «Аллоплант». **Результаты.** Установлено, что у животных 1-й группы на 7-е сутки после операции удельный объем соединительной ткани был в 7,9 раза ($p_U = 0,048$) выше, чем у животных 2-й группы и в 15,8 раза ($p_U = 0,039$) выше, чем у животных 3-й группы. На 14-е сутки после операции объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у крыс 1-й группы достигал наибольшего значения по сравнению с таковым у крыс остальных групп. Численная плотность новообразованных сосудов в опорно-двигательной культе глазного яблока у крыс 1-й группы, начиная с 14-х суток после операции и до завершения эксперимента (21-е сутки), статистически значимо превышала таковую у животных остальных групп. При этом на 21-е сутки у крыс 1-й группы данный показатель в 4,0 раза ($p_U = 0,001$) был выше, чем у животных 2-й группы, и в 9,8 раза ($p_U = 0,0003$) выше, чем у животных 3-й группы. **Заключение.** Имплантация тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови в склеральный мешок после эвисцероэнуклеации в эксперименте *in vivo* сопровождается ускоренным созреванием соединительной ткани и интенсивной васкуляризацией в опорно-двигательной культе глазного яблока, что обеспечивает прочную фиксацию имплантата и снижает риск его отторжения.

Ключевые слова: моноклеарные лейкоциты крови, опорно-двигательная культя глазного яблока, тканеинженерная конструкция, никелид титан, клеточные технологии.

FORMATION OF EYEBALL ORBITAL STUMP USING TITANIUM NICKELIDE TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCT AND AUTOLOGOUS BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES

E.A. Gorbunova, O.I. Krivosheina, L.R. Mustafina

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Objective: to study the morphological features of formation of the eyeball orbital stump using a titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes *in vivo*. **Materials and methods.** Experiments were performed on 54 sexually mature Wistar rats weighing 200–250 g. The animals

Для корреспонденции: Горбунова Евгения Александровна. Адрес: 634028, Томск, Московский тракт, 89-105. Тел. (905) 992-08-22. E-mail: ea.gorbunova@yandex.ru

For correspondence: Gorbunova Evgeniya Aleksandrovna. Address: 89-105, Moscow highway, Tomsk, 634028, Russian Federation. Tel. (905) 992-08-22. E-mail: ea.gorbunova@yandex.ru

were divided into 3 groups, depending on type of surgical intervention: group 1 ($n = 18$) consisted of animals in which eyeball orbital stump was formed after evisceroenucleation through implantation of a titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes in the scleral sac; group 2 ($n = 18$) – the eyeball orbital stump was formed through implantation of titanium nickelide tissue-engineered construct in the scleral sac; group 3 ($n = 18$) – orbital stump was formed using an Alloplant implant. **Results.** It was established that in group 1 rats, on day 7 following surgery, the specific volume of connective tissue was 7.9 times ($p_U = 0.048$) higher than in group 2 rats and 15.8 times ($p_U = 0.039$) higher than in group 3 rats. On day 14 after surgery, the volume of connective tissue in the eyeball orbital stump of group 1 rats reached the highest value compared to that in the other groups. The numerical density of newly formed vessels in the eyeball orbital stump of group 1 rats, starting from day 14 after surgery up to the end of experiment (day 21), was statistically significantly higher than that in the other groups. Moreover, on day 21, this indicator was 4.0 times ($p_U = 0.001$) higher in group 1 rats than in group 2 rats and 9.8 times ($p_U = 0.0003$) higher than in group 3 rats. **Conclusion.** Implantation of titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes into the scleral sac after evisceroenucleation in an *in vivo* experiment leads to accelerated maturation of the connective tissue and intensive vascularization in the eyeball orbital stump. This ensures strong fixation of the implant and reduces risk of rejection.

Keywords: blood mononuclear leukocytes, eyeball orbital stump, tissue-engineered construct, titanium nickelide, cell technology.

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря достижениям современной офтальмологии лечение многих тяжелых заболеваний органа зрения становится все более эффективным, однако в ряде случаев, несмотря на проводимые лечебные мероприятия, не удается сохранить глазное яблоко как орган [1, 2]. Необходимо отметить, что около 75% энуклеаций выполняется без формирования опорно-двигательной культи и имплантации орбитального вкладыша [2, 3]. Это, в свою очередь, приводит к развитию анофтальмического синдрома. Клиническая картина данного осложнения характеризуется западением орбито-пальпебральной борозды, деформацией век, птозом и неполным смыканием глазной щели [1, 4]. Лечение анофтальмического синдрома представляет собой трудоемкий и многоэтапный процесс, направленный на восстановление объема конъюнктивальной полости и других анатомических структур, а также восполнение дефицита объема тканей орбиты с помощью имплантата из инертного, биосовместимого материала [1, 3, 5]. К настоящему времени существует целый ряд материалов, предлагаемых в качестве орбитального имплантата. Некоторые из них – такие как хрящ, гидроксиапатит, углеродные композиты – достаточно широко применяются в орбитальной хирургии, другие же, например, тантал, керамика, инъекционный гидрогель, монокристаллический силикон, имеют ограниченное применение как из-за высокой стоимости, так и большого числа осложнений [1, 3, 5].

На современном этапе возрос интерес офтальмохирургов к пористым материалам, структура которых обеспечивает достаточно быстрое врастание окружающих тканей, способствуя тем самым прочной фиксации имплантата в орбите. Однако и при использовании пористых материалов, особенно в отдален-

ные сроки, возможно развитие таких осложнений, как обнажение имплантата, его инфицирование и отторжение. Возможное решение проблемы – использование клеточных технологий при орбитальной имплантации [6–12].

Цель исследования: в эксперименте *in vivo* изучить морфологические особенности формирования опорно-двигательной культи глазного яблока с помощью тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 54 половозрелых крысах-самцах породы Wistar (54 глаза) весом 200–250 г, полученных из вивария ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России. Перед экспериментом всех животных выдерживали на протяжении недельного карантинного срока в условиях вивария на обычном пищевом режиме. Протокол проведения экспериментальных исследований утвержден локальным этическим комитетом ГОУ ВПО «СибГМУ» Росздрава от 29.11.2010 г., регистрационный номер № 1715.

В зависимости от планируемого вида оперативного вмешательства крысы были разделены на 3 группы: 1-я группа ($n = 18$) – животным после эвисцероэнуклеации (удаление роговицы и содержимого глазного яблока) одного из глаз формировали опорно-двигательную культи глазного яблока путем имплантации в склеральный мешок тканеинженерной конструкции из никелид титанового имплантата и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови; 2-я группа ($n = 18$) – крысам после эвисцероэнуклеации формировали опорно-двигательную культи путем помещения в склеральный мешок имплантата из никелида титана; 3-я группа ($n = 18$) – после эвисцероэнуклеации крысам формировали

опорно-двигательную культю глазного яблока с помощью имплантата из биоматериала «Аллоплант».

Имплантат из никелида титана изготавливается из нити пористого никелида титана марки ТН-10 толщиной 100 мкм (сертификат соответствия № РОСС RU ЛЯ79НО93 37 от 15.04.2011 г.) [13] и имеет округлую форму диаметром 4–5 мм. Имплантат производится на базе НИИ медицинских материалов (руководитель – д. т. н., профессор В.Э. Гюнтер).

Имплантат из биоматериала «Аллоплант» (производства ФГУ «ВЦГиПХ», г. Уфа) изготавливается из подкожно-жировой клетчатки подошвы человека и имеет округлую форму диаметром 5 мм.

Мононуклеарные лейкоциты из крови экспериментального животного выделяли непосредственно перед операцией методом фракционирования на разделяющем растворе фиколл-верографин (плотность 1,067–1,077 г/мл). Чистота клеток составляла 96–98%, окрашенных (погибших) клеток было 1,5–2%, что не превышало допустимое (не более 3%) количество.

В условиях операционной под эфирным наркозом всем животным трех групп (54 крысы) выполняли эвисцерознуклеацию одного из глаз с последующим помещением в склеральный мешок глазного яблока соответствующего имплантата. Животным 1-й группы (18 крыс) в структуру имплантата из никелида титана вводили 0,1 мл свежевыделенной суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови (клеточная плотность 200 тыс. клеток/мл). В послеоперационном периоде всем животным трех групп в конъюнктивальную полость оперированного глаза закапывали раствор Тобрамицина 6 раз в день.

Общая продолжительность эксперимента составила 21 сутки. В ходе эксперимента на 1, 3, 7, 14, 21-е сутки после операции проводили наружный осмотр, биомикроскопию оперированных глаз с оценкой состояния конъюнктивы век и опорно-двигательной культи глазного яблока, краев операционной раны и швов, а также наличия и характера отделяемого в конъюнктивальной полости.

На 7, 14, 21-е сутки после операции из эксперимента выводили по 6 крыс из каждой группы с удалением опорно-двигательной культи оперированного глазного яблока, фиксацией полученного материала и окраской гематоксилин-эозином, по методу Ван-Гизона для световой микроскопии под 200-, 300- и 400-кратным увеличением. Забой экспериментальных животных на всех этапах эксперимента осуществляли с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Обработка данных

В ходе морфометрии срезов с использованием программы ImageJ 1.50i производили подсчет

моно- и полинуклеарных лейкоцитов, плазмоцитов, определяли объем стромы и численную плотность новообразованных сосудов в процентах. Статистический анализ результатов проводили с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 20. Нормальность распределения показателей проверяли при помощи закона Колмогорова–Смирнова. Анализ переменных, имеющих нормальное распределение, осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – стандартная ошибка среднего. При несоответствии распределения данных нормальному закону распределения использовали непараметрический критерий – тест Манна–Уитни (p_U). Статистически значимыми различия считали при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сутки после операции у животных всех трех групп (54 крысы) в ходе наружного осмотра отмечались умеренный отек и гиперемия конъюнктивы век и опорно-двигательной культи оперированного глазного яблока, которые постепенно уменьшались к 3–4-м суткам. Сформированная культя глазного яблока у всех экспериментальных крыс (100%) имела округлую форму и была умеренно подвижна. По данным биомикроскопии, края операционной раны в области швов были адаптированы, в конъюнктивальной полости оперированных глаз у крыс обнаруживалось незначительное количество отделяемого слизистого характера. На протяжении всего эксперимента (21 сут) у животных трех групп не выявлено ни одного случая обнажения или отторжения имплантата, помещенного в склеральный мешок оперированного глазного яблока.

Согласно результатам световой микроскопии, у животных 1-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцерознуклеации и имплантации в склеральный мешок глаза тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови в полости опорно-двигательной культи глазного яблока обнаруживались обширные скопления мононуклеарных лейкоцитов ($6259,0 \pm 1646,0$ клетки в 1 мм^2 среза) (рис. 1), небольшое количество плазмоцитов ($443,6 \pm 200,5$ клетки в 1 мм^2 среза) и единичные полиморфно-ядерные лейкоциты – ПМЛ ($344,9 \pm 165,1$ клетки в 1 мм^2 среза). Вокруг имплантата из никелида титана выявлялись множественные очаговые скопления незрелых фибробластов. Тонкие коллагеновые волокна были умеренно отечны, располагались рыхло. Между волокнами обнаруживались новообразованные сосуды (табл., рис. 1).

У животных 2-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцерознуклеации и имплантации в склеральный мешок имплантата из никелида титана в

полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживались диффузная, равномерная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация ($1916,6 \pm 495,3$ клет-

ки в 1 мм^2 среза) и небольшое количество незрелых фибробластов, а также выявлялись отечные, рыхло расположенные вокруг имплантата коллагеновые

Таблица

Количественное соотношение стромы и новообразованных сосудов в 1 мм^2 среза опорно-двигательной культы глазного яблока у животных в зависимости от вида имплантата, $M \pm m, p_U$

The quantitative ratio of new vessels and stroma in 1 mm^2 slice of the orbital stump in animals depending on the type of the implant, $M \pm m, p_U$

Сроки эксперимента	Объем стромы, % (n = 10)			Численная плотность сосудов, % (n = 10)		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
7-е сутки	$0,158 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,027$	$0,02 \pm 0,014$	$0,01 \pm 0,006$
14-е сутки	$95,0 \pm 2,1$ $p_1 = 0,0002$; $p_2 = 0,0001$	$0,3 \pm 0,14$	$0,2 \pm 0,11$	$5,0 \pm 2,1$ $p_1 = 0,04$; $p_2 = 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$
21-е сутки	$79,1 \pm 3,4$ $p_2 = 0,0005$	$94,7 \pm 1,9$	$5,3 \pm 1,9$	$21,6 \pm 3,1$ $p_1 = 0,001$; $p_2 = 0,0003$	$5,3 \pm 1,9$	$2,2 \pm 1,2$

Примечание. p_1 – уровень значимости различий по сравнению с данными 2-й группы; p_2 – уровень значимости различий по сравнению с данными 3-й группы; M – выборочное среднее значение; m – ошибка среднего.

Note. p_1 – the level of significance of differences compared with the data of the 2nd group; p_2 – the level of significance of differences compared with the data of the 3rd group; M – the sample mean; m – the average error.

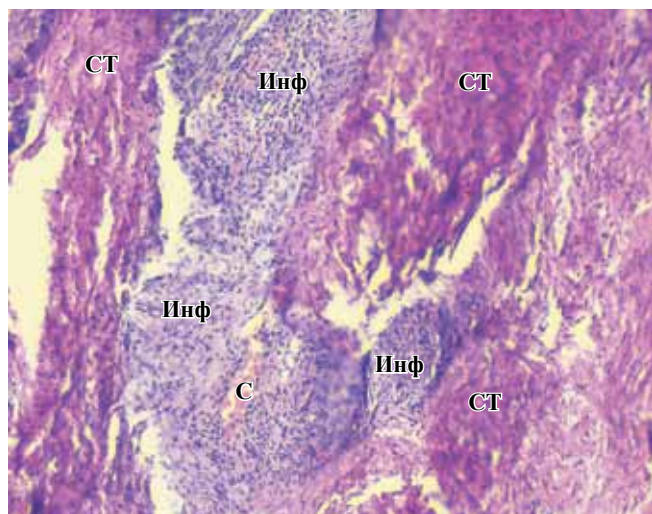


Рис. 1. Разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, очаговая мононуклеарная инфильтрация и новообразованные сосуды в опорно-двигательной культы глазного яблока крысы 1-й группы на 7-е сутки после эвисцеронуклеации с имплантацией тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов. СТ – соединительная ткань, Инф – клеточная инфильтрация, С – сосуды. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 1. Growth of loose fibrous connective tissue, focal mononuclear infiltration and newly formed vessels in the orbital stump of the 1st group of animals on the 7th day after evisceronucleation with implantation of a tissue-engineering construction from titanium nickelide and suspension of autologous blood mononuclear cells. СТ – connective tissue, Инф – cell infiltration, С – vessels. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 400$

волокна. Среди волокон выявлялись единичные новообразованные сосуды (табл., рис. 2).

У животных 3-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцеронуклеации и имплантации в склеральный мешок имплантата из биоматериала «Аллоплант» полость опорно-двигательной культы глазного яблока была заполнена жировой тканью, между дольками которой обнаруживались единичные мононуклеарные лейкоциты ($111,5 \pm 41,8$ клетки в 1 мм^2 среза), небольшое количество ПМЛ ($9,6 \pm 4,8$ клетки в 1 мм^2 среза), тонкие коллагеновые волокна (рис. 3) и единичные новообразованные сосуды (табл.).

На 14-е сутки после операции у животных 1-й группы (6 крыс) в полости опорно-двигательной культы глазного яблока отмечалось обширное разрастание волокнистой соединительной ткани. Коллагеновые волокна располагались более упорядоченно, чем на 7-е сутки. Между волокнами выявлялись скопления мононуклеарных лейкоцитов ($9093,8 \pm 891,0$ клетки в 1 мм^2 среза). Вокруг имплантата из никелида титана обнаруживались новообразованные сосуды (табл.), большинство из которых начинало дифференцироваться в артериолы и венулы.

У животных 2-й группы (6 крыс) на 14-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока наблюдалось разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани со значительным отеком и умеренно выраженной лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией ($4744,0 \pm 928,0$ клетки

в 1 мм^2 среза). Между коллагеновыми волокнами обнаруживались тонкостенные капилляры, появлялись отдельные артериолы и венулы (табл.).

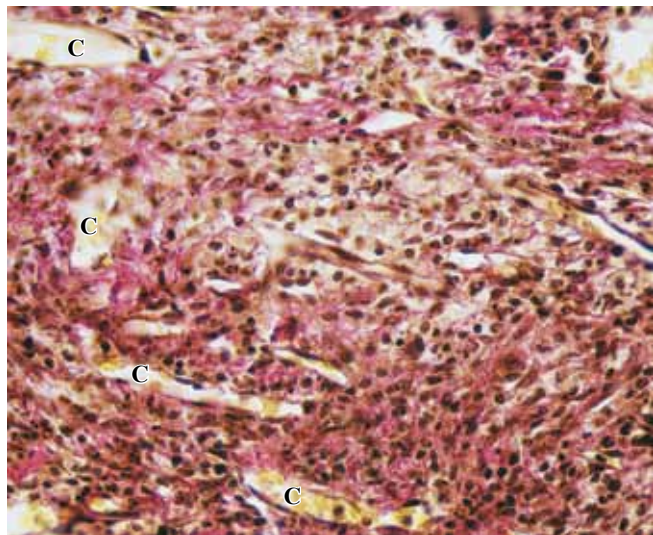


Рис. 2. Диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация и единичные новообразованные сосуды в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 2-й группы на 7-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией никелида титана. С – сосуды. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. $\times 300$

Fig. 2. Diffuse lymphocytic leukocyte infiltration and single newly formed vessels in the orbital stump of the 2nd group of animals on the 7th day after evisceration with implantation of titanium nickelide. C – vessels. Stained with hematoxylin and pikrofuksin by the method of Van-Giezon. $\times 300$

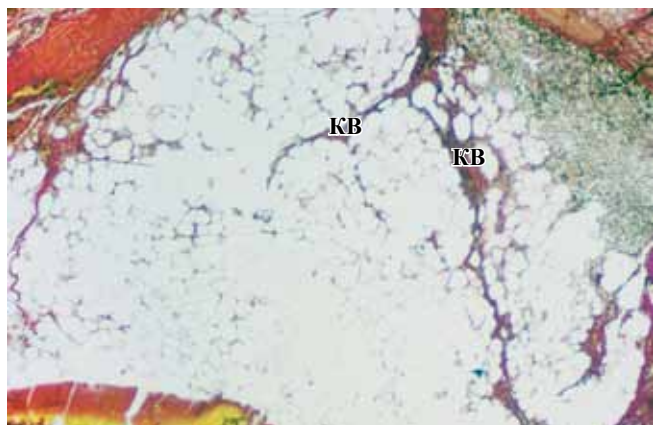


Рис. 3. Тонкие единичные коллагеновые волокна между дольками жировой ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 3-й группы на 7-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией биоматериала «Аллоплант». KB – коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 3. Thin, single collagen fibers between the segments of adipose tissue in the orbital stump of the 3rd group of animals on the 7th day after evisceration with implantation of biomaterial «Alloplant». KB – collagen fibers. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$

У животных 3-й группы (6 крыс) на 14-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока между жировыми дольками имплантата из биоматериала «Аллоплант» отмечались незначительная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация ($103,6 \pm 49,4$ клетки в 1 мм^2 среза) и разрастание тонких коллагеновых волокон. Вокруг имплантата обнаруживались единичные новообразованные сосуды (табл.).

На 21-е сутки после операции у животных 1-й группы (6 крыс) в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась зрелая соединительная ткань. Толстые пучки коллагеновых волокон располагались компактно и упорядоченно (рис. 4). Вокруг имплантата из никелида титана выявлялись мелкоочаговые скопления мононуклеарных лейкоцитов ($4386,3 \pm 498,1$ клетки в 1 мм^2 среза) и большое число новообразованных сосудов (табл.).

У животных 2-й группы (6 крыс) на 21-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась рыхлая соединительная ткань с тонкими коллагеновыми волокнами, неупорядоченно расположенными вокруг имплантата из никелида титана. Между пучками коллагеновых волокон выявлялись диффузная мононуклеарная инфильтрация ($2020,6 \pm 562,8$ клетки в 1 мм^2 среза) и небольшое число новообразованных сосудов (табл., рис. 5).

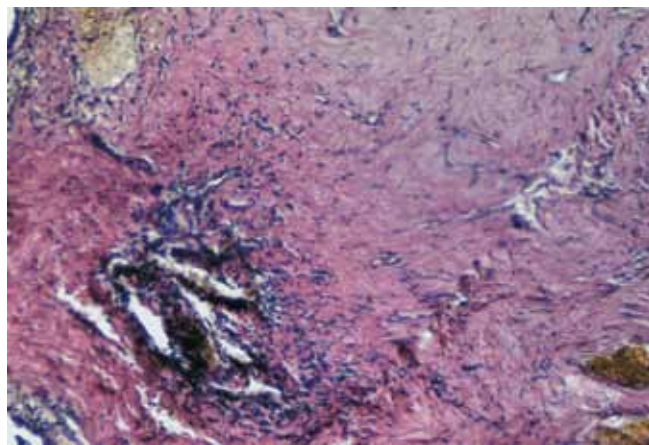


Рис. 4. Упорядоченно расположенные пучки коллагеновых волокон в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 1-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. $\times 300$

Fig. 4. Orderly arranged bundles of collagen fibers in the orbital stump of the 1st group of animals on the 21st day after evisceration with implantation of a tissue-engineering construction from titanium nickelide and suspension of autologous blood mononuclear cells. Stained with hematoxylin and pikrofuksin by the method of Van-Giezon. $\times 300$

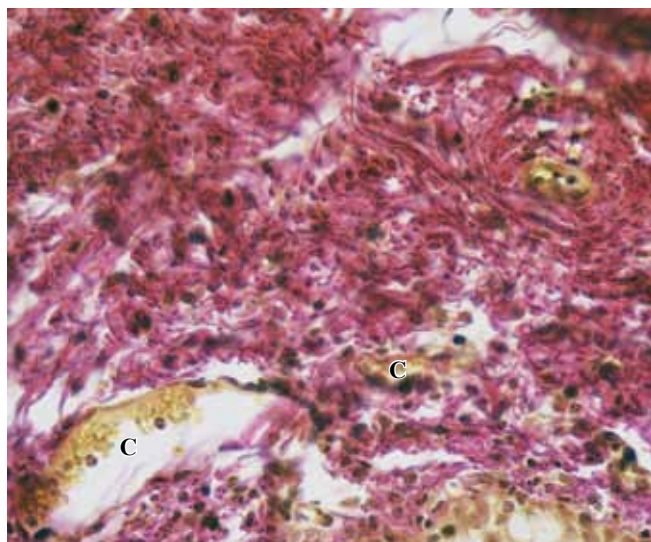


Рис. 5. Рыхло расположенные пучки коллагеновых волокон и умеренно полнокровные сосуды в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 2-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией никелида титана. С – сосуды. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона. $\times 400$

Fig. 5. Loosely arranged bundles of collagen fibers and moderately full-blooded vessels in the orbital stump of the 2nd group of animals on the 21st day after evisceration with implantation of titanium nickelide. С – vessels. Stained with hematoxylin and picrofuchsin by the method of Van-Gieson. $\times 400$

У животных 3-й группы (6 крыс) на 21-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась жировая ткань, между дольками отмечались незначительная мононуклеарная инфильтрация ($106,1 \pm 43,5$ клетки в 1 мм^2 среза) и рыхлая соединительная ткань (рис. 6). Вокруг имплантата из биоматериала «Аллоплант» выявлялись единичные умеренно полнокровные сосуды (табл.).

По данным морфометрии, в клеточном составе опорно-двигательной культы глазного яблока у крыс всех трех групп на протяжении всего эксперимента (21 сут) преобладала популяция мононуклеарных лейкоцитов. При этом у животных 1-й группы с имплантатом из тканеинженерной конструкции численность клеток данной популяции в ходе эксперимента статистически значимо превышала таковую у животных остальных групп. Так, на 7-е сутки после операции число мононуклеарных лейкоцитов в культе глазного яблока у крыс 1-й группы в 3,3 раза ($p_U = 0,034$) превышало данный показатель у животных 2-й группы с имплантатом из никелида титана и в 56,1 раза ($p_U = 0,0002$) – у животных 3-й группы с имплантатом из биоматериала «Аллоплант». На 14-е сутки численность клеток данной популяции в культе глазного яблока у крыс 1-й группы превышала

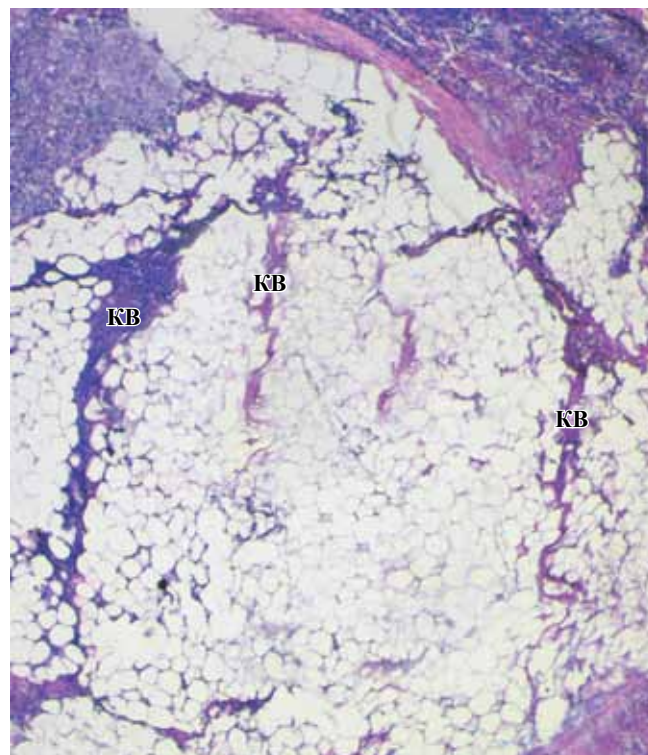


Рис. 6. Рыхлые коллагеновые волокна между дольками жировой ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 3-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией биоматериала «Аллоплант». КВ – коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Fig. 6. Loose collagen fibers between the segments of adipose tissue in the orbital stump of the 3rd group of animals on the 21st day after evisceration with implantation of biomaterial «Alloplant». КВ – collagen fibers. Stained with hematoxylin and eosin. $\times 200$

таковую у крыс 2-й группы в 1,9 раза ($p_U = 0,01$), у крыс 3-й группы – в 87,7 раза ($p_U = 0,0001$), на 21-е сутки – в 2,2 раза ($p_U = 0,02$) и 41,3 раза ($p_U = 0,0002$) соответственно. Выявленная закономерность объясняется как непосредственным введением суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов крови в тканеинженерную конструкцию при формировании опорно-двигательной культы глазного яблока у крыс 1-й группы, так и дополнительной миграцией клеток данной популяции вследствие индуцирующего влияния экзогенно введенных мононуклеаров.

Удельный объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы с имплантатом из тканеинженерной конструкции, начиная с 7-х суток после операции и на протяжении всего эксперимента, также статистически значимо превышал таковой у животных остальных групп. Так, на 7-е сутки после оперативного вмешательства у крыс 1-й группы данный показатель был в 7,9 раза ($p_U = 0,048$) выше, чем у животных 2-й группы с имплантатом из никелида ти-

тана и в 15,8 раза ($p_U = 0,039$) выше, чем у животных 3-й группы с имплантатом из биоматериала «Аллоплант» (табл.). На 14-е сутки после операции объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы достигал наибольшего значения по сравнению с таковым у животных других групп.

На 21-е сутки после операции у животных 1-й группы в ходе морфометрии выявлено уменьшение объема стромы опорно-двигательной культи глазного яблока в 1,2 раза ($p_U = 0,0019$) по сравнению с показателем на 14-е сутки (табл.), что обусловлено созреванием соединительной ткани в культе глазного яблока. У животных же 2-й группы объем стромы опорно-двигательной культи глаза на 21-е сутки, напротив, достигал наибольшего значения как по сравнению с исходными данными, так и по сравнению с таковыми у крыс остальных групп (табл.). Однако в соединительной ткани культи у всех животных 2-й группы (6 крыс) при световой микроскопии обнаруживались признаки незрелости. У животных 3-й группы, хотя объем стромы опорно-двигательной культи глаза на 21-е сутки после операции и превысил таковой на 14-е сутки в 26,5 раза, тем не менее его уровень имел наименьшее значение по сравнению с показателями у крыс остальных групп (табл.).

Численная плотность новообразованных сосудов в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы, начиная с 14-х суток после операции и до завершения эксперимента (21-е сутки), статистически значимо превышала таковую у крыс остальных групп (табл.). При этом на 21-е сутки у крыс 1-й группы данный показатель в 4,0 раза ($p_U = 0,001$) был выше, чем у животных 2-й группы и в 9,8 раза ($p_U = 0,0003$) – у животных 3-й группы (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, мононуклеарные лейкоциты крови благодаря синтезу и секреции большого числа цитокинов (интерлейкины – ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, фактор некроза опухоли, фактор роста эндотелия сосудов) стимулируют миграцию мононуклеаров, ПМЛ и фибробластов, ускоряют пролиферацию фибробластов и эндотелиоцитов, воздействуют на систему комплемента и продукцию коллагена [14–16]. Вероятно, благодаря функциональной кооперации мононуклеарных лейкоцитов, экзогенно вводимых в структуру имплантата из никелида титана, помещенного в опорно-двигательную культю глазного яблока крысы, и дополнительно мигрирующих под их влиянием клеток, обеспечивающих развитие воспалительно-репаративной реакции, происходит быстрая смена клеточных фаз и ускоряется переход воспаления в фазу репарации [7, 15]. При этом наблюдается быстрое – в течение 21 суток – созревание

соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крыс и ускоренный, начиная с 14-х суток, неоваскулогенез.

Необходимо отметить, что использование никелида титана в качестве основы имплантата благодаря пористой структуре материала существенно облегчает прорастание имплантата фиброваскулярной тканью. Это, в свою очередь, обеспечивает его прочное удержание в полости культи глаза экспериментального животного и значительно снижает риск обнажения и отторжения имплантата [15, 16]. В ходе проведенного эксперимента *in vivo* при использовании имплантата из никелида титана (36 крыс, 36 глаз) в послеоперационном периоде не выявлено ни одного осложнения (инфицирование, отторжение имплантата). Согласно же литературным данным [1, 2, 4], риск развития послеоперационных осложнений при применении орбитальных имплантатов из различных синтетических материалов составляет от 4 до 38%.

Кроме того, имплантат, изготовленный из никелида титана, благодаря упруго-эластичным свойствам материала обеспечивает стабильную форму опорно-двигательной культи глазного яблока животного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имплантация тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов крови в склеральный мешок крыс после эвисцерознуклеации в эксперименте *in vivo* сопровождается ускоренным созреванием соединительной ткани и интенсивной васкуляризацией в опорно-двигательной культе глазного яблока, что обеспечивает прочную фиксацию имплантата и снижает риск его отторжения. Полученные результаты являются перспективными для клинических исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Schmitzer S, Simionescu C, Alexandrescu C, Burcea M. The Anophthalmic Socket – Reconstruction Options. *Journal of Medicine and Life*. 2014; 7 (Spec Iss 4): 23–29.
2. Бараш АН, Шаршакова ТМ, Малиновский ГФ. Медико-социальные проблемы при анофтальмическом синдроме. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015; 44 (2): 4–7. Barash AN, Sharshakova TM, Malinovskij GF. Mediko-social'nye problemy pri anoftal'micheskom syndrome. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. 2015; 44 (2): 4–7.
3. Лузянина ВВ. Особенности офтальмопластики для глазного протезирования. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016; 3 (65): 32–36. Luz'janina VV. Osobennosti oftal'moplastiki dlja glaznogo protezirovaniya.

- Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. 2016; 3 (65): 32–36. doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2016.3.32–36.
4. Bohman E, Roed Rassmusen ML, Kopp ED. Pain and discomfort in the anophthalmic socket. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014; 25 (5): 455–460. doi: 10.1097/ICU.0000000000000069.
 5. Иволгина ИВ. Особенности применения различных имплантатов при формировании опорно-двигательной культы после энуклеации. *Вестник ТГУ*. 2015; 20 (3): 577–579. Ivolgina IV. Osobennosti primeneniya razlichnyh implantatov pri formirovanii oporno-dvigatel'noj kul'ti posle jenukleacii. *Vestnik TGU*. 2015; 20 (3): 577–579.
 6. Мезен НИ. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2014: 62. Mezen NI. Stvolovye kletki: ucheb.-metod. posobie. Minsk: BGMU, 2014: 62.
 7. Гилевич ИВ, Поляков ИС, Порханов ВА, Чехонин ВП. Морфологический анализ биологической совместимости аутологических костных мононуклеарных клеток с синтетическим каркасом на основе полиэтилентерефталата. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163 (3): 388–392. Gilevich IV, Polyakov IS, Porkhanov VA, Chekhonin VP. Morphological Analysis of Biocompatibility of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells with Synthetic Polyethylene Terephthalate Scaffold. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 163 (3): 400–404. [In Russ, English abstract]. doi: 10.1007/s10517-017-3813-z.
 8. Лычиков АН, Осипов ББ, Скуратов АГ, Призенцов АА. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015; 45 (3): 4–9. Lyzikov AN, Osipov BB, Skuratov AG, Prizencov AA. Stvolovye kletki v regenerativnoj medicine: dostizheniya i perspektivy. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. 2015; 45 (3): 4–9.
 9. Рябов СИ, Звягинцева МА, Осидак ЕО, Смирнов ВА. Коллагеновый имплантат и мононуклеарные клетки пуповинной крови позволяют восстановить движение задних конечностей после удаления участка спинного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164 (9): 377–380. Rjabov SI, Zvjaginceva MA, Osidak EO, Smirnov VA. Kollagenovyy implantat i mononuklearnye kletki pupovinnoj krovi pozvoljajut vosstanovit' dvizhenie zadnih konechnostej posle udalenija uchastka spinного mozga. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2017; 164 (9): 377–380.
 10. Суббот АМ, Каспарова ЕА. Обзор подходов к клеточной терапии в офтальмологии. *Вестник офтальмологии*. 2015; 5: 74–81. Subbot AM, Kasparova EA. Obzor podhodov k kletочноj terapii v oftal'mologii. *Vestnik oftal'mologii*. 2015; 5: 74–81.
 11. Bedian L, Rodriguez AMV, Vargas GH, Parra-Saldivar R, Iqbal HM. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review. *Int J Biol Macromol*. 2017; 98: 837–846. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.048.
 12. Li MD, Atkins H, Bubela T. The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med*. 2014 Jan; 9 (1): 27–39. doi: 10.2217/rme.13.80.
 13. Гюнтер ВЭ, Ходоренко ВН, Чекалкин ТЛ, Олесова ГЦ, Дамбаев ПГ, Сысолятин НГ и др. Медицинские материалы с памятью формы. Томск: МИЦ, 2011: 534. Gjunter VJe, Hodorenko VN, Chekalkin TL, Olesova GC, Dambaev PG, Sysoljatin NG i dr. Medicinskie materialy s pamjat'ju formy. Tomsk: MIC, 2011: 534.
 14. Еричев ВП, Петров СЮ, Суббот АМ, Волжанин АВ, Германова ВН, Карлова ЕВ. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней. *Национальный журнал «Глаукома»*. 2017; 16 (1): 87–101. Erichev VP, Petrov SY, Subbot AM, Volzhanin AV, Germanova VN, Karlova EV. Role of cytokines in the pathogenesis of eye diseases. *National Journal «Glaucoma»*. 2017; 16 (1): 87–101. [In Russ, English abstract].
 15. Хлусов ИА, Нечаев КА, Дворниченко МВ, Хлусова МЮ, Рязанцева НВ, Савельева ОВ и др. Молекулярные механизмы реакции стромальных стволовых клеток и мононуклеарных лейкоцитов крови на кратковременный контакт с искусственными материалами. *Вестник науки Сибири*. 2012; 1: 321–327. Hlусov IA, Nechaev KA, Dvornichenko MV, Hlусova MJu, Rjazanceva NV, Savel'eva OV i dr. Molekuljarnye mehanizmy reakcii stromal'nyh stvolovyh kletok i mononuklearnyh lejkocitov krovi na kratkovremennyj kontakt s iskusstvennymi materialami. *Vestnik nauki Sibiri*. 2012; 1: 321–327.
 16. Атькова ЕЛ, Рейн ДА, Ярцев ВД, Суббот АМ. Влияние цитокина TGF-бета и других факторов на процесс регенерации. *Вестник офтальмологии*. 2017; 4: 89–96. At'kova EL, Rejn DA, Jarcev VD, Subbot AM. Vlijanie citokina TGF-beta i drugih faktorov na process regeneracii. *Vestnik oftal'mologii*. 2017; 4: 89–96.

Статья поступила в редакцию 1.11.2018 г.
The article was submitted to the journal on 1.11.2018

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-165-173

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ТКАНЕВЫХ ЭКВИВАЛЕНТОВ В ЛЕЧЕНИИ НЕКОТОРЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ

Е.М. Фоминых^{1, 2}, В.Н. Митрофанов³, О.П. Живцов³, А.А. Стручков³, В.Ф. Зубрицкий¹,
Ю.Н. Лебедева⁴, Е.А. Воротеляк^{5, 6}, Ю.В. Суханов^{5, 6}

¹ Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств», Москва, Российская Федерация

² ФКУЗ «МСЧ МВД России по г. Москве», Москва, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

⁴ Главный клинический госпиталь МВД РФ, Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН», Москва, Российская Федерация

⁶ ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Хронические раны являются распространенной и социально значимой проблемой во всем мире. Золотым стандартом лечения хронических ран является аутодермопластика, однако ее выполнение не всегда возможно у довольно большой группы больных, в том числе из-за высокого риска отторжения аутодермотрансплантата, дефицита донорского материала, нежелания пациента подвергать себя хирургической операции с часто непредсказуемым результатом. Возможным решением проблемы является использование эквивалентов кожи из аллогенного донорского материала. Использование аллогенных (донорских) человеческих клеток позволит восполнить дефицит донорских ресурсов пациента, выполнить закрытие раневого дефекта без нанесения пациенту дополнительного повреждения. В настоящей статье представлен обзор применения в клинических исследованиях и реальной клинической практике зарубежных и отечественных биомедицинских клеточных продуктов. Сделаны выводы об эффективности рассмотренных биомедицинских клеточных продуктов в лечении хронических ран, дана оценка проведенным исследованиям, даны рекомендации по наиболее эффективному использованию аллогенных дерматотропных биомедицинских клеточных продуктов.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты, дерматотропные препараты, биоинженерные конструкции, эквиваленты кожи, ожоги, диабетические язвы, диабетическая стопа, ММСК, кератиноциты.

Для корреспонденции: Воротеляк Екатерина Андреевна. Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 26.
Тел. (903) 503-87-05. E-mail: vorotelyak@yandex.ru

For correspondence: Vorotelyak Ekaterina Andreevna. Address: 26, Vavilova str., Moscow, 119334, Russian Federation.
Tel. (903) 503-87-05. E-mail: vorotelyak@yandex.ru

TISSUE EQUIVALENT TRANSPLANTATION IN THE TREATMENT OF CERTAIN SKIN INJURIES

E.M. Fominykh^{1, 2}, V.N. Mitrofanov³, O.P. Zhivtsov³, A.A. Struchkov³, V.F. Zubritskiy¹, Yu.N. Lebedeva⁴, E.A. Vorotelyak^{5, 6}, Yu.V. Sukhanov^{5, 6}

¹ Moscow State University of Food Production, Moscow, Russian Federation

² Medical unit of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

³ Privolzhskiy Research Medical University, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

⁴ Main Clinical Hospital of the Ministry of Internal Affairs of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

⁵ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

⁶ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Chronic ulcers are a common and socially significant problem worldwide. Autodermoplasty is the gold standard treatment for chronic ulcers. However, it is not always possible to perform this surgical procedure for a rather large group of patients, due to some reasons, which include high risk of autodermotransplant rejection, lack of donor material, and patient's unwillingness to undergo surgery with an often unpredictable result. A potential solution to the problem is to use skin equivalents from allogeneic donor material. The use of allogeneic (donor) human cells makes it possible to fill the deficit of the patient's donor resources and close wound without causing additional injury to the patient. This paper provides an overview of the application of foreign and domestic biomedical cell products in clinical trials and real clinical practice. We draw conclusions on the efficiency of the considered biomedical cell products in the treatment of chronic ulcers, evaluate the conducted research, and make recommendations on the most efficient use of allogeneic dermatotropic biomedical cell products.

Keywords: biomedical cell products, dermatotropic products, bioengineered constructs, skin equivalents, burns, diabetic ulcers, diabetic foot, multipotent mesenchymal stromal cells, keratinocytes.

Несмотря на то что проблемой затрудненной эпителизации поверхностных ран хирургия занимается с момента своего возникновения, она далека от решения. Данное утверждение иллюстрируется большой распространенностью хронических ран среди пациентов, поступающих в отделения гнойной хирургии [1].

Целью настоящего обзора является обобщение известной практики лечения повреждения кожных покровов, главным образом хронических ран, с помощью продуктов, содержащих живые клетки человека, в России – биомедицинских клеточных продуктов (БМКП).

Прежде всего следует отметить, что в определениях терминов и понятий, относящихся к повреждениям кожи, имеются некоторые особенности. В России распространены термины «трофическая язва» и «длительно не заживающая рана». Трофической язвой может называться дермальный дефект, возникший вследствие заболевания и с длительностью существования более трех месяцев [2], длительно не заживающей раной – любой раневой дефект, возникший вследствие травмы (в том числе операционной), с низкой скоростью репарации. Как видно, критерии нечеткие, и разделение типов ран никак не влияет на объем и последовательность лечебно-диагностических мероприятий.

Большинство зарубежных исследователей в своей практике пользуются исключительно понятием «длительно не заживающая рана»; этот термин относится к следующим патологическим процессам: трофические язвы нижних конечностей, диабетические язвы, пролежни, незаживающие раны, раны, развившиеся на месте травмы или оперативного вмешательства, а также в результате отморожения, термического, химического поражения кожного покрова [3]. FDA указывает, что хронической является любая рана, которая не заживает в течение 30 дней при адекватном лечении [4].

Обобщение этих разных по этиологии и патогенезу процессов является вполне оправданным, если рассматривать их в аспекте клинических проявлений и процессов, происходящих на клеточном и субклеточном уровнях [3]. Исследуя морфологические изменения в биопсионных материалах, взятых из хронических ран разных типов, Федоров и соавт. указали, что любая хроническая рана (вне зависимости от этиологии) характеризуется схожими морфофункциональными нарушениями [5]. Прежде всего функционирование клеточных элементов в ране приобретает характер патологического, нарушаются процессы синтеза и ремоделирования внеклеточного матрикса, становится невозможным образование базальной мембраны и миграция кератиноцитов. Эти изменения включают в себя преобладание клеток мо-

ноцитарно-макрофагального ряда в воспалительном инфильтрате в сочетании с недостаточным количеством Т-хелперов/Т-супрессоров; снижение содержания коллагена III типа с накоплением тенацина и плазменной формы фибронектина, изменением типичной локализации ламинина, минимальным количеством миофибробластов в области раневого дефекта; изменения со стороны медиаторных систем, регулирующих ход воспалительно-репаративной реакции: обнаружены повышенное накопление провоспалительных цитокинов (IL-1 β , MIP-1 α /MIP-1 β) и нарушение их нормального соотношения, отсутствие фиброгенных факторов роста (TGF- β 1, bFGF) в сочетании с повышенной активностью матриксной металлопротеиназы-9 в области раны [2]. Всегда имеются признаки хронического воспаления. Также хроническая рана характеризуется низким ангиогенным ответом тканей [6], что препятствует неоваскуляризации и заживлению.

Таким образом, длительно не заживающая или хроническая рана – дермальный дефект, образовавшийся вследствие внешнего воздействия (механические, термические, химические повреждения) или оперативного вмешательства, существующий более 30 дней, с низкой тенденцией к самостоятельному заживлению, характеризующийся наличием определенных изменений, которые препятствуют репарации, создавая самоподдерживающуюся систему, функционирующую по принципу «порочного круга». Обнаружение этих гистологических и иммуногистохимических признаков позволяет верифицировать хроническую рану, однако четких морфологических критериев установления диагноза «хроническая рана» в настоящее время нет.

Диабетическая нейротрофическая язва стопы является одной из наиболее типичных хронических ран [7, 8]. Незаживающий характер диабетической язвы объясняется как нарушениями фазы воспаления и очищения раны, так и фазы пролиферации [9].

Логично, что восстановить нарушения процессов пролиферации может трансплантация полноценной кожи или ее элементов – межклеточного матрикса (далее скаффолд), клеток кожи и дермы.

Золотым стандартом лечения хронических ран является аутодермопластика, однако ее выполнение не всегда возможно у достаточно большой группы больных, в том числе из-за высокого риска отторжения аутодермотрансплантата от раневой поверхности, дефицита донорского материала, нежелания пациента подвергать себя хирургической операции с часто непредсказуемым результатом. Особенно неудовлетворительны результаты у пациентов с нейропатическими ранами на фоне синдрома диабетической стопы.

В качестве альтернативы собственной коже предложены различные коллагеновые повязки, однако они значительно уступают в эффективности аллогенным

(взятым от донора) клеточным перевязочным материалам и тем более при трансплантации своей кожи [4]. Однако коллагеновые формообразующие повязки могут быть использованы как средство подготовки к трансплантации клеточных структур или как основа для создания различных трехмерных конструкций. Скаффолд тканеинженерных заменителей кожи располагается внутри раневого дефекта, играет роль биологической повязки, обеспечивая защиту от обезвоживания, инвазии микроорганизмов, проникновения токсинов. Затем он встраивается в раневое ложе за счет естественных механизмов заживления ран, таких как воспаление, клеточная инфильтрация нейтрофилами, макрофагами и фибробластами, происходит неоваскуляризация скаффолда. Биосовместимость матрицы-носителя может быть усилена путем добавления в его структуру фибробластов, которые способны ускорять процессы восстановления кожного покрова. Дермальные фибробласты продуцируют все основные компоненты межклеточного матрикса – коллаген, гликозаминогликаны, протеоглики, а также отвечают за непрерывный процесс ремоделирования матрикса. Фибробласты являются активным клеточным компонентом, способны структурировать коллаген дермы, стимулировать рост грануляционной ткани в ране и секретировать ряд факторов роста, способствующих развитию неоваскулярной сети, образованию базальной мембраны и миграции клеточных элементов, что ускоряет регенерацию кожи. Однако такая композиция приводит к заполнению раневого дефекта, не восстанавливая эпителий.

Подобные размышления привели к созданию гетерогенной группы продуктов, которые призваны обеспечивать полное закрытие раны путем реконструкции дефекта кожи и взять на себя функцию недостающего слоя кожи. Идеальный кожный эквивалент будет способствовать ускорению неоваскуляризации, ремоделированию внеклеточного матрикса, формированию грануляционной ткани и регенерации кожи. Кожный эквивалент должен приводить к образованию новых сосудов и созреванию неоваскулярной сети, что приводит к уменьшению воспалительного процесса, эффективному заживлению с меньшим рубцеванием и контракцией раны.

В Российской Федерации в настоящий момент разработаны, изучены в лабораторных условиях, а до недавнего времени в рамках апробации применялись в клинической практике для лечения пациентов с длительно незаживающими ранами некоторые аллогенные эквиваленты кожи.

Живой эквивалент кожи человека (ЖЭК) [10]. В исследовании А.Н. Ивашкина (2009 г.) для лечения хронических ран изучался живой эквивалент кожи, который представляет собой гелеобразную субстанцию, включающую синтетическую сетчатую основу, в его трехмерной структуре распределены фибро-

бласти, поверхность покрыта кератиноцитами [3]. С использованием ЖЭК было проведено лечение больных с раневыми дефектами кожных покровов, не заживавшими как минимум в течение 1 месяца: 22 пациента в основной группе, контрольная группа составила 20 пациентов. Группы пациентов были сопоставимы по возрасту, тяжести сопутствующей патологии, первоначальной площади раневого дефекта (в основной группе она составляла $29,5 \pm 3,5$ см, в контрольной – $31,1 \pm 3,6$ см). Различия в размерах дефектов внутри группы не превышали 15%. Скорость уменьшения площади раневой поверхности в основной группе была в 2 раза выше, чем в контрольной. Большинству больных с длительно не заживающими ранами (81,8% наблюдений) производилась однократная пластика ЖЭК. У большинства больных основной группы к концу 4-й недели наступило заживление (16,7%) или значительное уменьшение размеров ран (41,7%). Через 25 дней в контрольной группе размеры ран сократились менее чем на 40%. У 20% пациентов полной эпителизации не наступило и в более поздние сроки. Перед включением пациентов в исследование гистологическое и иммуногистохимическое верифицирование хронической раны не выполнялось. Выполнялось гистологическое исследование биоптата ран на 5, 10, 20-е сутки исследования после начала лечения в основной и контрольной группах. В основной группе с 5-х суток отмечались гистологические признаки начала процесса контракции раны, созревание грануляционной ткани. На 10-е сутки выявлялась зрелая грануляционная ткань, напоминающая по строению нормальную дерму, в то же время сохранялась воспалительная инфильтрация. На 20-е сутки в биоптатах основной группы отмечались признаки активно протекающей реэпителизации раны, подлежащая ткань по своей структуре напоминала нормальную дерму, воспалительная инфильтрация в большинстве случаев была минимальной. В биоптатах контрольной группы таких выраженных признаков заживления не отмечалось, длительно сохранялись воспалительные явления. Таким образом, несмотря на отсутствие описания методологии выполнения проведенного исследования и небольшой объем выборки, можно сделать вывод о значимой клинической эффективности ЖЭК, поскольку он изучался на сопоставимых группах с эквивалентными размерами раневых дефектов и обнаруженная динамика уменьшения площади раневой поверхности в основной группе по сравнению с контрольной подтверждена результатами гистологического исследования, где четко прослеживается преобладание репаративных процессов в группе лечения живым эквивалентом кожи.

Дермальный эквивалент (две модификации: в коллагеновом геле и на основе фибрина плазмы крови или фибриногена). Дермальный эквивалент содержит аллогенные дермальные фибробласты, заключенные

в коллагеновый гель. В исследовании Коцловой и соавт. по оценке эффективности и безопасности дермального эквивалента в лечении ран при СДС были включены 60 пациентов с гранулирующими ранами, длительностью существования более 6 недель, которые не уменьшились на 50% и более после 2 недель стандартного лечения [11, 12]. Основная группа состояла из 40 пациентов, контрольная – из 20. У всех пациентов были поверхностные язвы без признаков инфицирования, часть пациентов была с признаками ишемии (1А, 1С по Техасской классификации). Внутри групп отмечался значительный разброс размеров раневых дефектов: от 1 до 25 см². Гистологическая верификация хронической раны не выполнялась, в публикациях не сообщалось о гистологическом исследовании биоптатов ран в процессе лечения в группах. Исследователями отмечено, что ишемия значительно сокращала скорость эпителизации, раны меньшего размера заживали быстрее, раны более 12 см² требовали повторной аппликации в сроки от 3 до 4 месяцев от начала лечения. У 25% пациентов основной группы не удалось достичь заживления в течение полутора лет в основном за счет отсутствия заживления у пациентов с ишемией. Средние сроки полного заживления в основной группе составили от 1 до 3 месяцев (в среднем 67 ± 11 суток), полное заживление было достигнуто у 65% пациентов основной группы. При этом не указано, сколько процентов пациентов имели полное заживление раны через 1 месяц после аппликации. Проведенное исследование было ограничено малым размером выборки, изучаемые группы были разнородны по размеру раневого дефекта и количеству пациентов, отсутствовало описание выбранной методологии исследования и способов оценки и сопоставления показателей в таких разнородных группах. Приведена средняя скорость эпителизации в группах через 1 и 2 месяца, при этом не приведена динамика заживления в группах. Таким образом, на основании опубликованного исследования сложно сделать однозначный вывод об истинном влиянии дермального эквивалента на заживление ран.

По данным Varkey et al., по состоянию на 2015 год были зарегистрированы следующие дерматотропные БМКП, содержащие клетки человека (табл. 1) [14].

Следует отметить, что из 16 продуктов, содержащих клетки человека, перечисленных в этих двух обзорах, 9 продуктов (медицинских изделий) являются аутологичными, а 4 изделия изготавливаются с использованием клеточного материала, полученного от новорожденных. Согласно российскому законодательству, в производстве БМКП несовершеннолетние не могут быть донорами клеток, за исключением случаев изготовления аутологичных продуктов.

Среди перечисленных заменителей кожи зарегистрированы для лечения хронических ран: Apligraf®, Dermagraft®, TransCyte®, OrCel®, StrataGraft® пред-

Таблица 1

Список зарегистрированных дерматотропных БМКП по состоянию на 2015 год

Cell products for skin healing approved by 2015

Продукт	Состав	Комментарии
TransCyte®	Нейлоновая сетка с неонатальными фибробластами крайней плоти человека, которые разрушаются перед пересадкой	Временная раневая повязка, после которой будет размещен аутоотрасплантат
Dermagraft®	Биоабсорбируемая матрица из полигалактиновой сетки, засеянная неонатальными фибробластами человека и подвергнутая криоконсервации	Матрица облегчает реэпителизацию собственными кератиноцитами пациента
Apligraf®	Гель из бычьего коллагена, засеянный фибробластами из крайней плоти новорожденных и кератиноцитами	Раневая повязка с двумя различными типами клеток
OrCel®	Матрица из коллагена I типа, засеянная фибробластами из крайней плоти новорожденных и кератиноцитами	Раневая повязка с двумя различными типами клеток
Epicel®	Листы аутологичных кератиноцитов, прикрепленные к пропитанной вазелином марлевой подложке	Раневая повязка с аутологичными клетками
StrataGraft®	Полнослойный заменитель кожи с дермальным и полностью дифференцированным эпидермальным слоями	Изготавливается из иммортализованных естественным путем клеточной линии кератиноцитов NIKS; содержит два разных типа клеток
Tiscover® (A-skin)	Аутологичная полнослойная культивируемая кожа для лечения хронических, устойчивых к лечению ран	Состоит из двух различных типов клеток
Permaderm®	Аутологичная тканеинженерная кожа, состоящая из эпидермальных и дермальных клеток	Состоит из двух различных типов клеток
denovoDerm™	Аутологичный заменитель дермы	Следует использовать в сочетании с расщепленными кожными трансплантатами
denovoSkin™	Аутологичный полнослойный заменитель, состоящий из дермального и эпидермального слоев	Состоит из двух различных типов клеток

назначен для лечения тяжелых, глубоких ожогов, находится на III фазе клинических исследований и ожидает утверждения FDA в 2020 г. Один тип клеток – аллогенные фибробласты – содержат TransCyte® и Dermagraft®. БМКП, содержащие аллогенные кератиноциты и фибробласты, представлены продуктами Apligraf®, OrCel®, которые широко распространены и доступны к продаже, а также StrataGraft®, который проходит клинические испытания.

Ниже представлены результаты некоторых клинических исследований БМКП.

Apligraf® (Organogenesis, USA). В многоцентровом рандомизированном клиническом исследовании (РКИ) с 72 пациентами сравнили результаты использования Apligraf® вместе со стандартной терапией и только стандартной терапии в лечении диабетических язв. Наблюдалось существенное уменьшение времени до полного закрытия в основной группе (51,5%) по сравнению с контрольной (26,3%) к 12-й неделе [15]. В многоцентровом РКИ с 208 пациентами, произвольно разделенными для лечения язв Graftskin® (старое название Apligraf®) или смоченной физиологическим раствором марлей, 56% пациентов достигли полного ранозаживления по сравнению с 38% в контрольной группе к 12-й неделе. Кривая Каплана–Мейера до полного заживления также была

существенно ниже для Graftskin (65 дней) по сравнению с контролем (90 дней). Остеомиелит и ампутации нижних конечностей гораздо реже происходили в экспериментальной группе [16].

Dermagraft® (Shire Regenerative Medicine, Inc., USA). Проведено многоцентровое РКИ использования у 314 пациентов с хроническими диабетическими язвами Dermagraft® и традиционной терапии. На 12-й неделе у 30,0% пациентов из основной группы раны полностью закрылись по сравнению с 18,3% в контрольной группе. Хотя появление неблагоприятных эффектов было похожим у обеих групп, в основной группе 19,0% пациентов испытали связанные с язвами побочные заболевания (инфекция, остеомиелит, целлюлит) по сравнению с 32,5% в контрольной [17]. Клиническое исследование на 28 пациентах с хроническими диабетическими язвами (дольше 6 нед.) сравнивало вмешательство с использованием Dermagraft® с контролем (только марля, увлажненная физиологическим раствором). К 12-й неделе 71,4% язв было вылечено в основной группе и 14,3% – в контрольной. Раны закрывались существенно быстрее в основной группе [18].

В рандомизированном, слепом исследовании DOLCE по сравнению различий между бесклеточными, клеточными (Dermagraft®) матрицами и стандарт-

ным лечением диабетических язв заменители кожи показали преимущество [19]. В многоцентровом клиническом исследовании Dermagraft® при лечении язв у 62 пациентов после хирургической обработки пациентов перевязывали влажной марлей или повязками из вспененного полиуретана еженедельно. К 12-й неделе у 44% пациентов наблюдалось полное закрытие ран, 52% вылечились к 20-й неделе. Медиана составила 13 нед. Dermagraft® показал себя безопасным и эффективным в лечении незаживающих диабетических язв [20]. Многоцентровое РКИ проводили для оценки ранозаживления у 50 пациентов с диабетическими язвами. Пациентов разбили случайным образом на четыре группы (три отдельные дозировки Dermagraft® и одна контрольная группа). Была получена дозозависимая кривая: язвы, лечившиеся наиболее высокой дозой Dermagraft®, заживали существенно лучше по сравнению с традиционными методами: 50% язв с Dermagraft® и 8% в контрольной группе полностью зажили [21].

TransCyte® (Shire Regenerative Medicine, Inc., USA). Проведено клиническое исследование с использованием TransCyte® и сульфадиазина серебра у 11 пациентов с парными расположениями ран. Раны, которые подвергали действию TransCyte®, заживали гораздо быстрее до состояния реэпителизации (11,14 против 18,4 сут). Наблюдение за ранами показало, что на 3, 6 и 12-й месяц они заживали с существенно меньшим гипертрофическим рубцеванием по сравнению с лечением сульфадиазином серебра [22].

OrCel® (Forticell Bioscience, USA). Для изучения продукта для лечения хронических ран были проведены исследования на пациентах с незаживавшими венозными и диабетическими язвами. Данные клинических испытаний, оценивающих эффективность OrCel® для лечения венозных язв, показали, что у 50% пациентов после применения OrCel® произошло полное закрытие раны на 12-й неделе по сравнению с 31% субъектов, получавших только стандартную терапию. У пациентов с применением OrCel® среднее время излечения составило 77 дней, тогда как для контрольной группы невозможно было определить среднее время заживления, так как многие язвы не эпителизировались полностью. Результаты пилотного исследования OrCel® при лечении диабетической язвы показывают, что у 47% пациентов в экспериментальной группе полное закрытие дефекта фиксировалось на 12-й неделе по сравнению с 23% пациентов, получавших только стандартную терапию. В ноябре 1999 года OrCel® приняла участие в пилотном исследовании для 40 пациентов с диабетическими язвами стоп, используя обновленную версию продукта. По представленным данным для 16 пациентов установлено, что через 12 недель 56% пациентов, получавших лечение OrCel®, достигли полного закрытия раны по сравнению с 29% паци-

ентов, получавших стандартную помощь в этом исследовании [23].

OrCel® похож на Apligraf®, поскольку он содержит как фибробласты, так и кератиноциты, полученные из крайней плоти новорожденных, но в качестве матрицы использует коллагеновую губку с коллагеном I типа [24]. Он используется для восполнения дефектов минус-ткань в ране, где он выполняет роль матрицы для миграции собственных клеток пациента. В исследовании, в котором непосредственно сравнивали OrCel® с Biobrane™ для лечения неполнослойных донорских ран, обработанные OrCel® участки имели более высокие скорости заживления и уменьшали образование рубцов. Улучшение заживления объясняется наличием коллагеновой губки в сочетании с цитокинами и факторами роста, продуцируемыми жизнеспособными аллогенными клетками [11].

Следует отметить, что при отборе клинических исследований для оценки их качества FDA выбрал весьма ограниченное число исследований: рассматривались 95, отобрано 18 [4]. Среди рассмотренных продуктов для лечения хронических ран были отобраны исследования Apligraf® и Dermagraft®, методологическое качество которых значительно выделяло исследования этих продуктов среди остальных. Отмечено, что методология изучения Apligraf® была лучше, чем Dermagraft®. По данным систематического Кокрановского обзора, Apligraf® показал статистически значимое положительное влияние на полное закрытие язвы [25]. Эти данные позволяют считать, что аллогенные клеточные продукты Apligraf® и Dermagraft® наиболее убедительно доказали свое влияние на заживление хронических ран.

Nathoo et al. для лечения хронических ран рекомендуют рассмотреть композитные аллогенные заменители кожи в лечении ран длительностью существования более 4–6 недель, для остальных хронических ран – бесклеточные аллогенные заменители кожи, заменители дермы, ксенографты [26]. Однако использование биоинженерных заменителей кожи, по мнению Garwood et al., может зависеть от способности заменителя синтезировать компоненты дермы [27]. Авторы выделяют дермоиндуктивные (Apligraf®, Dermagraft® и др.) и дермокондуктивные (дермозамещающие) продукты (Integra™ и др.). С точки зрения авторов, выбор продукта должен определяться глубиной раны: при наличии поверхностных ран глубиной до подкожной клетчатки рекомендовано использование дермоиндуктивного продукта. При повреждении подкожной клетчатки и глубже лежащих тканей следует рассмотреть дермокондуктивный продукт; в случае отсутствия формирования неодермы следует рассмотреть аутодермопластику.

Несмотря на то что закон «О биомедицинских клеточных продуктах» № 180-ФЗ вступил в действие с января 2017 года, до настоящего времени в РФ дер-

Таблица 2

**Список разрешенных к клиническому применению дерматотропных БМКП
по состоянию на 2018 год**

Cell products approved for clinical use for skin healing by 2018

Название	Состав	Комментарии
JACE® (J-TEC)	Аутологичный культивированный эпидермис	Для лечения тяжелых ожогов (Япония), на рынке с 2007 года
KeraHeal-Allo™ (KeraSkin, Biosolution Co., Ltd.)	Композитный клеточный продукт – спрей (аллогенные кератиноциты кожного происхождения в термочувствительном гидрогеле)	Для глубоких ожогов 2-й степени (Корея), на рынке с 2015 года
Kaloderm® (Tego Science, Inc)	Аллогенные кератиноциты (клеточный пласт)	Для глубоких ожогов 2-й степени (на рынке с 2005 года) и диабетической язвы стопы (Корея) (на рынке с 2010 года)
KeraHeal® (Biosolution Co., Ltd.)	Аутологичные кератиноциты	Для лечения глубоких ожогов 2-й степени, которые покрывают более 30% поверхности тела, и ожогов 3-й степени, которые покрывают более 10% поверхности тела (Корея), на рынке с 2006 года
Holoderm® (Tego Science, Inc)	Аутологичные кератиноциты	Для глубоких ожогов 2-й степени, которые покрывают более 30% поверхности тела, и ожогов 3-й степени, которые покрывают более 10% поверхности тела (Корея), на рынке с 2002 года
StrataGraft® (Mallinckrodt plc).	Продукт с аутологичными кожными клетками	Для лечения глубоких ожогов (США), на рынке с 2017 года

матотропные БМКП промышленно не производятся, и пока разрешенных к клиническому применению продуктов нет.

Учитывая количество БМКП в мире, которые были постепенно одобрены и в некоторых случаях отозваны в последние годы, Международное общество клеточной и генной терапии (ISCT) представило краткий ежегодный отчет о клеточных продуктах, разрешенных к клиническому применению в различных странах [13]. Авторы сообщают, что этот список может быть не исчерпывающим, и насколько им известно, по состоянию на сентябрь 2018 года в Бразилии, Гонконге, Израиле, Малайзии, Сингапуре и Тайване не было разрешено продавать клеточные, тканевые продукты и продукты для генной терапии. Так, по сведениям ISCT, на сентябрь 2018 года в мире разрешены к клиническому применению 6 дерматотропных продуктов, отвечающих критериям БМКП в России (табл. 2).

Следует отметить, что в новом списке отсутствуют многие продукты из списка 2015 года, а БМКП под названием StrataGraft® по составу коренным образом отличается от варианта 2015 года. Все это указывает на то, что рынок БМКП в мире, в том числе дерматотропных, по сути, находится на стадии формирования.

ВЫВОДЫ

Изучение опыта использования различных эквивалентов кожи позволяет утверждать, что использование БМКП в лечении хронических ран демонстрирует их преимущества. Как установлено, собственные

клеточные и внеклеточные элементы в хронической ране у пациентов патологически изменяются, их физиологические функции нарушаются. В хронических ранах снижена интенсивность процессов репарации, в связи с чем необходимо вносить клеточные элементы извне, одновременно замещая дефицит массива тканей в случае глубоких полнослойных ран.

Трансплантация собственной кожи не является надежным способом лечения и нередко оказывается неудачной, что для ряда ситуаций неприемлемо. Большинству таких пациентов для успешной пролиферации необходимы клеточные и неклеточные элементы извне, в составе клеточного продукта. При этом фибробласты или мезенхимные стволовые клетки должны являться обязательным компонентом БМКП как центрального элемента процесса репарации, способствующего неоваскулогенезу, ремоделированию внеклеточного матрикса, синтезу базальной мембраны и миграции кератиноцитов. У пациентов с сахарным диабетом 2-го типа должны использоваться продукты, содержащие кератиноциты, поскольку хроническая гипергликемия изменяет морфологию клеток, снижает клеточную пролиферацию и ингибирует дифференцировку кератиноцитов.

Изучение доступных литературных источников позволяет сделать вывод, что использование дерматотропных БМКП с биодеградируемыми структурами коллагена является перспективным, но иногда отсутствие сравнительных клинических исследований и единого протокола существенно снижает ценность отдельных клинических наблюдений.

Следует отметить, что при использовании дерматотропных БМКП сама рана должна быть адекватно подготовлена. Подготовка к аппликации является требованием для всех БМКП перед применением для обеспечения наилучшего результата. Комплексное лечение, очищение раны, включая хирургическую обработку, уменьшение инфекционной нагрузки, разгрузка пораженной конечности, ежедневный уход с оценкой динамики течения раневого процесса способны создать предпосылки для успешного использования БМКП в лечении хронических ран.

При финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках ПНИЭР по теме «Разработка технологии производства, хранения и применения биомедицинских клеточных продуктов для лечения ран», уникальный идентификатор проекта RFMEFI61017X0012.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Agale SV. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis, and management. *Ulcers*. 2013; 2013: 1–9.
2. Хрупкин ВИ, Зубрицкий ВФ, Ивашкин АН, Артемьев АА, Фоминых ЕМ. Дерматопластика раневых дефектов. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009: 192. *Khrupkin VI, Zubritskiy VF, Ivashkin AN, Artem'ev AA, Fominykh EM. Dermatoplastika ranevykh defectov*. M.: GEOTAR-Media, 2009: 192.
3. Ивашкин АН. Восстановление эпителиальных тканей с использованием криоконсервированных жизнеспособных дермотрансплантатов и живого эквивалента кожи [диссертация]. М., 2009. *Ivashkin AN. Vosstanovlenie epiteliial'nykh tkaney s ispolzovaniem kriokonservirovannykh zhiznesposobnykh dermotransplantatov i zhivogo ekvivalenta kozhi*. [Dissertation]. M., 2009.
4. Snyder DL, Sullivan N, Schoelles KM. Technology Assessment Program Prepared for: Agency for Healthcare Research and Quality. Skin Substitutes for Treating Chronic Wounds. Technology Assessment Report: 540 Gaither Road Rockville, Maryland 20850 (FDA) (December 18, 2012).
5. Федоров ДН, Васильев АВ, Иванов АА. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика репаративных процессов в длительно не заживающих ранах. *Архив патологии*. 2002; 1: 8–11. *Fedorov DN, Vasil'ev AV, Ivanov AA. Morfologicheskaya i immunogistokhimicheskaya kharakteristika reparativnykh protsessov v dlitel'no ne zazhivayushchikh ranakh*. *Arkhiv patologii*. 2002; 1: 8–11.
6. Brem H, Sheehan P, Rosenberg HJ, Schneider JS, Boulton AJM. Evidence-based protocol for diabetic foot ulcers. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117 (7S): 193–209.
7. Mat Saad AZ, Khoo TL, Halim AS. Wound bed preparation for chronic diabetic foot ulcers. *ISRN Endocrinology*. 2013; 1–9.
8. Karr JC. Bilayered skin-substitute technology for the treatment of diabetic foot ulcers: current insights. *Chronic Wound Care Management and Research*. 2017; 4: 7–16.
9. Loots MAM, Lamme EN, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Cultured fibroblasts from chronic diabetic wounds on lower extremity (non-insulin-dependent diabetes mellitus) show disturbed proliferation. *Arch Dermatol Res*. 1999; 291 (2–3): 93–9.
10. Терских ВВ, Васильев АВ, Роговая ОС, Киселева ЕВ, Дашининаев ЭБ, Ивашкин АН. Клеточный имплантат для восстановления дефектов кожного покрова. Патент РФ № 106528. 29.12.2010. *Terskikh VV, Vasil'ev AV, Rogovaya OS, Kiseleva EV, Dashini-maev EB, Ivashkin AN. Kletochnyi implantat dlya vosstanovleniya defektov kozhnogo pokrova*. RF Patent № 106528. 29.12.2010.
11. Коцлова АА, Биниенко МА, Галileeва АН, Юдинцева НМ, Шеянов СД, Давыденко ВВ и др. Сравнительная оценка эффективности применения эквивалента дермального при нейропатической и нейроишемической формах синдрома диабетической стопы. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2016; 20 (3): 62–71. *Kotslova AA, Binienko MA, Galileeva AN, Yudinseva NM, Sheyanov SD, Davydenko VV et al. Sravnitel'naya otsenka effektivnosti primeneniya ekvivalenta dermal'nogo pri neyropaticheskoy i neyroishe-micheskoy formakh sindroma diabeticheskoy stopy*. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2016; 20 (3): 62–71.
12. Коцлова АА, Биниенко МА, Юдинцева НМ, Блинова МИ, Власов ТД, Давыденко ВВ. Опыт применения дермального эквивалента в комплексном лечении синдрома диабетической стопы. *Московский хирургический журнал*. 2016; 5 (51): 27–33. *Kotslova AA, Binienko MA, Yudinseva NM, Blinova MI, Vlasov TD, Davydenko VV. Opyt primeneniya dermal'nogo ekvivalenta v kompleksnom lechenii sindroma diabeticheskoy stopy*. *Moskovskiy khirurgicheskiy zhurnal*. 2016; 5 (51): 27–33.
13. Cuende N, Rasko JEJ, Koh MBC, Dominici M, Ikonomou L. Cell, tissue and gene products with marketing authorization in 2018 worldwide. *Cytotherapy*. 2018; 20 (11): 1401–1413.
14. Varkey M, Ding J, Tredget EE. Advances in skin substitutes – potential of tissue engineered skin for facilitating anti-fibrotic healing. *Funct Biomater*. 2015; 6 (3): 547–563.
15. Edmonds M. European and Australian Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study Group. Apligraf in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. *Int J Low Extrem Wounds*. 2009; 8 (1): 11–18.
16. Veves A, Falanga V, Armstrong DG, Sabolinski ML. Apligraf Diabetic Foot Ulcer Study. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care*. 2001; 24 (2): 290–295.
17. Marston WA, Hanft J, Norwood P, Pollak R. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care*. 2003; 26 (6): 1701–1705.
18. Hanft JR, Surprenant MS. Healing of chronic foot ulcers in diabetic patients treated with a human fibroblast-derived dermis. *J Foot Ankle Surg*. 2002; 41 (5): 291–299.

19. Lev-Tov H, Li CS, Dahle S, Isseroff RR. Cellular versus acellular matrix devices in treatment of diabetic foot ulcers: study protocol for a comparative efficacy randomized controlled trial. *Trials*. 2013; 14 (1): 8.
20. Warriner RA, Cardinal M. Human fibroblast-derived dermal substitute: results from a treatment investigational device exemption (TIDE) study in diabetic foot ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2011; 24 (7): 306–311.
21. Gentzkow GD, Iwasaki SD, Hershon KS, Mengel M, Prendergast JJ, Ricotta JJ et al. Use of Dermagraft, a cultured human dermis, to treat diabetic foot ulcers. *Diabetes Care*. 1996; 19 (4): 350–354.
22. Noordenbos J, Doré C, Hansbrough JF. Safety and efficacy of TransCyte for the treatment of partial-thickness burns. *J Burn Care Rehabil*. 1999; 20 (4): 275–281.
23. Ehrenreich M., Ruszczak Z. Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Eng*. 2006; 12 (9): 2407–2424.
24. Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mozingo D. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns*. 2003; 29 (8): 837–841.
25. Santema TBK, Poyck PPC, Ubbink DT. Systematic review and meta-analysis of skin substitutes in the treatment of diabetic foot ulcers: Highlights of a Cochrane systematic review. *Wound Repair Regen*. 2016; 24 (4): 737–744.
26. Nathoo R, Howe N, Cohen G. Skin substitutes: an overview of the key players in wound management. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2014; 7 (10): 44–48.
27. Garwood CS, Steinberg JS, Kim PJ. Bioengineered alternative tissues in diabetic wound healing. *Clin Podiatr Med Surg*. 2015; 32 (1): 121–133.

Статья поступила в редакцию 16.07.2019 г.
The article was submitted to the journal on 16.07.2019

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

ВЕСТНИК
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ

80248
(индекс издания)

количество комплектов	
-----------------------	--

на 2020 год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда

(почтовый индекс)

(адрес)

Кому

(фамилия, инициалы)

Ф. СП-1

ВЕСТНИК
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ
И ИСКУССТВЕННЫХ
ОРГАНОВ

ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА
на журнал **80248**
(индекс издания)

пв	место	ли-тер
----	-------	--------

на 2020 год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда

(почтовый индекс)

(адрес)

Кому

(фамилия, инициалы)

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-174-183

ГЛОБАЛЬНЫЙ ДЕФИЦИТ ДОНОРСКИХ ОРГАНОВ: АНАЛИЗ НАЦИОНАЛЬНЫХ СТРАТЕГИЙ САМООБЕСПЕЧЕНИЯ

*О.Н. Резник^{1, 2}, Д.В. Михель³*¹ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Российская Федерация² ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Российская Федерация³ ФГБОУ ВО «Российская академия народного хозяйства и государственной службы при Президенте Российской Федерации», Москва, Российская Федерация

С позиций социально-гуманитарного знания в статье анализируется проблема глобального дефицита донорских органов. Рассматриваются основные представления международного медицинского сообщества о дефиците органов и основные предложения по его преодолению. Особое внимание уделяется трем наиболее показательным национальным стратегиям самообеспечения донорскими органами – американской, испанской и иранской. Обсуждается вопрос о влиянии культурных различий и фактора социально-экономического неравенства на сложившиеся практики донорства органов на примере Мексики, Турции, Пакистана и Бангладеш.

Ключевые слова: дефицит донорских органов, ВОЗ, национальные стратегии самообеспечения, США, Испания, Иран, Мексика, Турция, Пакистан, Бангладеш.

GLOBAL ORGAN SHORTAGE: AN ANALYSIS OF NATIONAL SELF-SUFFICIENCY STRATEGIES

*O.N. Reznik^{1, 2}, D.V. Mikhel³*¹ I.I. Dzhanelidze St. Petersburg Research Institute of Emergency Care, St. Petersburg, Russian Federation² I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation³ Russian Presidential Academy of National Economy and Public Administration, Moscow, Russian Federation

From the standpoint of socio-humanitarian knowledge, the paper analyzes the problem of global organ shortage. The basic ideas of the international medical community about organ shortage and the main proposals for overcoming it are considered. Special emphasis is placed on the three most revealing national self-sufficiency strategies adopted by donor agencies – American, Spanish and Iranian strategies. The issue of influence of cultural differences and socio-economic inequality on established organ donation practices is discussed using Mexico, Turkey, Pakistan and Bangladesh as examples.

Keywords: organ shortage, WHO, national self-sufficiency strategies, USA, Spain, Iran, Mexico, Turkey, Pakistan, Bangladesh.

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс в области трансплантационной медицины, связанный с развитием методов хирургического вмешательства, послеоперационной реабилитации и использованием эффективных иммуносупрессивных препаратов, привел к тому, что пересадки органов стали рутинной медицинской практикой в клиниче-

ских учреждениях по всему миру. Вследствие этого уже с 1990-х гг. главной проблемой, препятствующей эффективно предоставлять трансплантационную медицинскую помощь нуждающимся в ней пациентам, стал дефицит донорских органов. Это явление носит не страновой, а глобальный характер. Феномен глобального дефицита органов требует специального

Для корреспонденции: Резник Олег Николаевич. Адрес: 192242, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3.
E-mail: onreznik@gmail.com

For correspondence: Reznik Oleg Nikolaevich. Address: 3, Budapeshtskaya str., St. Petersburg, 192242, Russian Federation.
E-mail: onreznik@gmail.com

изучения, как и дефицит органов в пределах конкретной национальной юрисдикции.

В рамках предлагаемой статьи планируется обсудить следующие вопросы:

- Что представляет собой дефицит органов с точки зрения международного медицинского сообщества?
- Какие стратегии преодоления дефицита органов предлагаются в настоящее время?
- Как на практики самообеспечения органов влияют культурные различия и социально-экономическое неравенство?

ВОЗ О ДЕФИЦИТЕ ОРГАНОВ

С момента, когда трансплантация органов стала превращаться в успешное средство спасения человеческих жизней, международное медицинское сообщество в лице ВОЗ начало проявлять самое пристальное внимание к различным вопросам, касающимся организации практик трансплантаций и донорства. В 1987 г. 40-я Всемирная ассамблея здравоохранения приняла решение разработать «Руководящие принципы для трансплантаций человеческих органов», в которых бы подчеркивались достигнутый в сфере трансплантаций прогресс и несовместимость торговли органами от живых доноров с базовыми гуманистическими ценностями, Всеобщей декларацией прав человека и духом Устава ВОЗ [1].

В 1991 г. ВОЗ одобрила «Руководящие принципы по трансплантации человеческих органов» [2], в которых отмечалось наличие дефицита донорских органов и утверждалось, что «спрос никогда не будет удовлетворен предложением». Особое внимание обращалось на проблему торговли органами от неродственных доноров и выражалась серьезная озабоченность судьбами различных уязвимых групп, которые становятся жертвами этой торговли. С целью пресечения этой торговли выдвигались следующие принципы: 1) органы следует получать прежде всего от умерших доноров; 2) живые доноры должны быть генетически связаны с реципиентами; 3) не должно быть купли или продажи органов [3].

В дальнейшем ВОЗ неоднократно возвращалась к вопросу о дефиците органов, неизменно связывая его с проблемами коммерческого трафика органов, который рассматривался как серьезное препятствие для нормального развития трансплантации во всем мире. Так, в 2004 г. 57-я Всемирная ассамблея здравоохранения, учитывая уже наработанный опыт и новые тенденции в практике трансплантации, рекомендовала переработать «Руководящие принципы» 1991 года. Специальное внимание обращалось не только на торговлю органами, но и на такое явление, как трансплантационный туризм. Говоря о «все большей нехватке имеющегося человеческого материала для трансплантации», ВОЗ также признала,

что «трансплантация включает в себя не только медицинские, но и юридические и этические аспекты и затрагивает экономические и психологические проблемы» [4].

В марте 2007 г. в Женеве состоялась вторая Глобальная консультация по вопросам трансплантации, на которой ВОЗ представила план обновления «Руководящих принципов», а также было решено создать Глобальный форум по трансплантации под руководством ВОЗ для содействия и поддержки развивающихся стран, приступающих к проведению программ по трансплантации, и работы по созданию единой координирующей системы для клеток, тканей и органов. Во время женевской консультации было отмечено, что в 2005 г. году в мире было пересажено 66 000 почек, но это удовлетворило лишь 10% всех потребностей. Кроме того, сообщалось, что посредством трансплантационного туризма осуществлялось 10% глобальной практики в области трансплантации. Эксперты ВОЗ подчеркивали, что «решающее значение для того, чтобы общество могло воспользоваться теми преимуществами, которые может предоставить трансплантация как терапия», имеют «качество, безопасность, эффективность и прозрачность» [5].

Многие из идей, озвученных во время Глобальной консультации в 2007 г., были представлены в рамках Стамбульской декларации 2008 года, посвященной вопросам предотвращения торговли органами и трансплантационного туризма. В тексте декларации было выражено несколько важных подходов к рассматриваемому вопросу. «Всем странам необходимы правовая и профессиональная базы для управления процессами донорства и трансплантации органов, также как и надзорная система, гарантирующая безопасность донора и реципиента, соблюдение стандартов и запрещение деятельности, противоречащей этическим принципам». «Каждая страна должна гарантировать развитие и осуществление программ, предупреждающих дефицит донорских органов, и обеспечивать своим гражданам предоставление донорских органов для трансплантации в пределах своего населения или за счет региональной кооперации». Авторы декларации призывали всех участников международного общения расширить «терапевтический потенциал посмертного донорства», «минимизировать использование живых доноров», устранять «недоверие, барьеры и неправильные представления, мешающие развитию эффективного посмертного донорства», улучшать инфраструктуру здравоохранения. В рамках декларации было сформулировано шесть принципов, один из которых гласил: «Страны, регионы и сопредельные области должны пытаться достигнуть самообеспечения в органном донорстве, обеспечивая достаточное количество органов для своих жителей, используя также региональную кооперацию» [6].

В 2010 г. 63-я Всемирная ассамблея здравоохранения одобрила новые «Руководящие принципы», в которых нашли воплощение идеи Стамбульской декларации. Особое внимание было вновь уделено проблемам трансплантационного туризма и торговли органами, которая ставилась в тесную связь с незаконной торговлей людьми. В одиннадцати предложенных мировому сообществу принципах подчеркивались необходимость законного получения органов от доноров, четкое разделение ролей и обязанностей между лечащими врачами и трансплантологами, приоритет посмертного донорства над прижизненным, а в рамках прижизненного – родственного над неродственным, запрещение получения донорских органов от несовершеннолетних, кроме тех случаев, что разрешены законом, безвозмездный характер донорства, в равной мере одинаковость заботы о здоровье как реципиентов, так и доноров, прозрачность и подконтрольность всех процедур, связанных с донорством и трансплантацией, обеспечение личной автономности и конфиденциальности доноров и реципиентов [7].

Опираясь на принципы Стамбульской декларации и 63-й Всемирной ассамблеи, ведущие эксперты ВОЗ вскоре опубликовали специальный текст, призывающий правительства всех стран добиваться более строгого контроля в достижении самообеспечения в сфере органного донорства и трансплантации. Авторы публикации специально подчеркивали «необходимость новой парадигмы национального самообеспечения» и вновь утверждали, что «каждая страна или регион должны стремиться к обеспечению достаточного количества органов от своего собственного населения, руководствуясь этическими принципами ВОЗ». Опубликованный материал также содержал в себе разнообразную информацию о том, как обстоит дело с самообеспечением донорскими органами в различных странах мира [8].

В целом на протяжении конца 1980-х – начала 2010-х гг. ВОЗ постоянно придерживалась той линии поведения, которая была нацелена на решение проблемы глобального дефицита органов. Постепенно пришло осознание того, что преодолению дефицита мешает много явлений – рассогласованность национального законодательства о донорстве и трансплантации, недобросовестность некоторых участников мирового трансплантационного сообщества, торговля органами и трансплантационный туризм. Практически с самого начала также было осознано наличие серьезных различий между развитыми и развивающимися странами в организации ими эффективных и справедливых систем донорства, а также выявлены противоречия по вопросам приемлемости использования умерших или живых доноров и отношения к купле-продаже органов. Признавая эти различия и противоречия, ведущие эксперты ВОЗ, тем не менее, все более утверждают во мнении, что

преодоление дефицита органов должно стать общей целью для всех участников международного общения, а средством для этого должна быть деятельность по самообеспечению донорскими органами в масштабах каждой страны или региона.

НАЦИОНАЛЬНЫЕ СТРАТЕГИИ САМООБЕСПЕЧЕНИЯ

Неустрашимый дефицит органов не только остается постоянной темой для осмысления со стороны международного медицинского сообщества, но и отправной точкой для выработки различных стратегий по его преодолению. Предложенная ВОЗ концепция национального самообеспечения органами является рамочной, но у каждой страны или группы стран могут быть собственные подходы к ее практической реализации. Ниже будут рассмотрены некоторые наиболее известные стратегии самообеспечения донорскими органами.

Американская стратегия

Наряду с Советским Союзом США были одним из пионеров в области пересадки органов, и в этой стране создана одна из первых в мире успешных систем органного донорства, которая позволила осуществлять заготовку органов в национальном масштабе и оперативно перераспределять их между медицинскими учреждениями. В 1968 г. там появилась первая организация, профессионально занимающаяся донорством органов – NEOB (New England Organ Bank), в штате которой состояли особые специалисты, занимающиеся выявлением доноров в находящихся в этом регионе больницах, их ведением после диагностики смерти мозга, получением согласия на изъятие органов у родственников донора и их психологической поддержкой, получением и транспортировкой органов, контролем качества выполняемых работ, организацией информационных кампаний для общественности, контактами со СМИ и т. д. Вслед за NEOB появились еще 57 таких же организаций, занимающихся заготовкой органов (Organ Procurement Organizations) [9, 10].

Важный шаг был сделан в 1984 г., когда Конгресс принял Национальный закон о трансплантации органов (National Organ Transplant Act), после чего Министерство здравоохранения и социального обслуживания поручило специально назначенной группе из 25 специалистов – Task Force on Organ Procurement and Transplantation – упорядочить работу всех региональных OPOs. Благодаря этому была создана единая национальная система трансплантации и донорства – OPTN (Organ Procurement and Transplantation Network), все звенья которой связаны в единую компьютеризированную сеть. Администрированием этой сети и всей OPTN с 1986 г. стала заниматься не-

коммерческая научно-образовательная организация UNOS (United Network for Organ Sharing), надзор над которой взял на себя Департамент трансплантации Министерства здравоохранения США. Организационно UNOS включает в себя все трансплантационные центры и OPOs, управляемые через Совет директоров и специальные комитеты [11, 12].

Наряду с общенациональными организациями OPTN и UNOS в США в те же самые годы был начат процесс создания региональных объединений, которые включали в себя трансплантационные центры, центры заготовки органов, представителей местного бизнеса и медицинской администрации штата и были ориентированы на то, чтобы вывести деятельность по получению и распределению органов на более высокий уровень, добиться материальной заинтересованности от вовлеченных в нее медицинских учреждений, а также оптимизировать отбор кандидатов на получение органов, в особенности таких дефицитных, как трансплантационные органы. Наиболее известным из таких региональных объединений стал OSOTC (Ohio Solid Organ Transplantation Consortium), созданный в штате Огайо в 1984 г. [13].

В связи с ростом количества медицинских решений о проведении лечения посредством трансплантации и увеличением спроса на донорские органы американская национальная система органного донорства уже в начале 1990-х гг. начала работать с перегрузками, и это потребовало последующей ее адаптации к новым вызовам. Начав борьбу за увеличение источников донорских органов, американские специалисты наряду с донорами со смертью мозга стали более активно использовать доноров с расширенными критериями, маргинальных доноров, доноров с остановкой сердца, а также стали более широко привлекать различные категории прижизненных доноров. В 2000-е гг. в профессиональный язык американских врачей-трансплантологов вошли такие понятия, как «прижизненные неродственные доноры», «прижизненные доноры, состоящие в правовой и эмоциональной связи с реципиентами», «целенаправленные и нецеленаправленные прижизненные доноры», «доноры – добрые самаритяне» [14, 15].

Стремление использовать весь спектр возможностей для получения новых органов позволяет считать американскую стратегию самообеспечения одной из самых агрессивных в мире. Примечательно, что термин «агрессивная заготовка органов», который начал продвигаться в научной литературе в середине 2000-х гг., предназначается для обозначения тактики «агрессивного манипулирования (management) телом донора с целью получения максимального количества органов для трансплантации» [16]. Однако представляется, что это понятие верно не только для характеристики конкретных медицинских ситуаций, но и для общей тенденции, сложившейся в американ-

ской трансплантационной медицине: использовать максимум имеющихся возможностей и создавать новые возможности.

Испанская стратегия

С 1990 г. наиболее успешный опыт самообеспечения донорскими органами демонстрирует Испания, где под руководством нефролога Рафаэля Матесанца в 1989 г. была создана Национальная организация по трансплантациям (Organización Nacional de Trasplantes), возглавившая всю работу по органному донорству на основе новой модели получения донорских органов – трансплантационной координации. Впервые в мире в Испании была налажена практика, когда выявление потенциальных доноров и их ведение было поручено особым специалистам – трансплантационным координаторам, чья деятельность осуществлялась на строго подотчетной и оплачиваемой основе. Назначаемые из числа больничных врачей, прежде всего из числа врачей отделений интенсивной терапии (реанимации), трансплантационные координаторы смогли обеспечить эффективное взаимодействие между лечащими врачами и трансплантационными бригадами, тогда как в прежние десятилетия это не удавалось. Была выстроена вся цепочка трансплантационной координации – от больничного до регионального и национального уровня, а также продуманы все технические и логистические аспекты быстрого получения доступа к донорам и донорским органам. Признавая значимость прижизненного донорства, испанские специалисты, тем не менее, сосредоточились на улучшении работы в сфере организации посмертного донорства, и уже в течение нескольких лет страна вышла на первое место в мире по этим показателям. Вследствие этого ВОЗ признала опыт Р. Матесанца и его коллег образцовым и рекомендовала его остальным странам.

Кроме работы по улучшению ситуации с донорством органов в своей стране испанские специалисты также активно включились в сферу международной экспертно-аналитической и пропагандистской деятельности по вопросам органного донорства. При участии испанской Национальной организации стали публиковаться различные общеевропейские и международные документы по донорству органов – руководящие принципы, статистическая информация, декларации, директивы. Благодаря настойчивым усилиям Р. Матесанца впервые в мире в испанское уголовное законодательство была введена статья, запрещающая торговлю органами и строго наказывающая лиц, покупающих органы за границей. Называя трансплантационный туризм преступной и аморальной деятельностью, Р. Матесанц при этом указал на то, что почву для его существования создают сами врачи, прежде всего в развитых странах – США, Япо-

нии, Израиле и странах Европы, поддерживающие своих пациентов, которые отправляются на поиски органов [17].

Испанская национальная стратегия самообеспечения, предполагающая активную пропаганду идеи посмертного донорства среди населения с привлечением СМИ, церкви и учреждений образования, тем не менее, уступает американской в степени агрессивности. Так, испанские врачи-трансплантологи почти вдвое реже, чем их американские коллеги, используют потенциал прижизненного донорства и почти не используют возможности прижизненного неродственного донорства (в 2017 г. было проведено всего 14 пересадок почки от неродственных доноров, что составило 0,3 случая на каждый миллион населения, тогда как в США было выполнено 1124 такие операции, или 3,5 случая на миллион) [18]. Тем не менее среди испанских специалистов идея «агрессивной заготовки органов» также встречает поддержку. Примером этого служит предложение Диего Грации – наиболее авторитетного испанского медицинского философа и биоэтика – перейти от концепции добровольного альтруистического пожертвования к концепции обязательного гражданского долга передавать свои органы после смерти. По его мнению, «органы умерших людей являются общественным благом», и поэтому распоряжаться ими должен не автономный индивид, а так называемый «супер-пользователь» (*supererogatory*) – все общество в целом или государство. Д. Грация называет такой подход «радикальным решением» проблемы дефицита органов, но подчеркивает, что правовые основания для этого пока отсутствуют [19].

Иранская стратегия

Еще одна стратегия самообеспечения связана с легализацией платных форм получения донорских органов. Официально она осуществляется лишь в одной стране – Иране, где она была введена в 1988 г. сразу после окончания ирано-иракской войны и в условиях международной политической изоляции. Не вполне ясен вопрос о роли авторитарного теократического режима в принятии этой модели донорской системы в этом исламском государстве, но вполне возможно, что выбор в пользу легализации купли-продажи органов был своего рода реакцией на отвергнутые Ираном ценности западной либеральной демократии и всего, что с этим ассоциируется. Как бы то ни было, легализация купли-продажи органов сыграла важную роль в развитии национальной трансплантационной программы. Покупателем всех донорских органов в Иране стало государство, что сняло целый ряд вопросов морально-этического и правового порядка. Большинство иранских специалистов оценивает эту модель как абсолютно пра-

вомерную и справедливую [20, 21], хотя ни ВОЗ, ни большинство западных специалистов не считают ее таковой.

Принятие платной модели приобретения донорских органов (почек) позволило Ирану всего через десять лет избавиться от длинных очередей в больничных листах ожидания, а также покончить с нелегальной торговлей органами. С введением платной системы доноры почек стали получать за проданный орган по 3500 долларов (в конце 1990-х гг.), хотя позднее стоимость органа стала сокращаться – 1265 в 2002 г. и 900 в 2011 г. Кроме того, правительство предоставило донорам бесплатную медицинскую страховку. Поддержав куплю-продажу органов, иранское государство добилось существенного сокращения средств на высокотехнологичную медицинскую помощь: сократились расходы на содержание пациентов в центрах диализа. Как западные, так и иранские специалисты уделяют внимание вопросу о мотивах, которыми руководствуются иранские граждане, продающие свои органы. Считается, что эти мотивы смешанные – как финансовые, так и альтруистические. При этом продажа органов не является делом только бедных людей. По разным оценкам, доля совершенно неграмотных людей, продающих свои органы, варьируется от 2,7 до 29%, тогда как количество людей со школьным образованием (сроком 6–12 лет) колеблется от 71 до 90,8%. В 2000 г. в Иране был принят закон, позволяющий использовать органы от пациентов с зарегистрированной смертью мозга, и к началу 2010-х гг. число полученных почек от таких доноров составило 12%. Тем не менее основным источником донорских органов в начале 2010-х гг. в Иране продолжали оставаться неродственные живые доноры [22–25].

При сравнении иранской стратегии самообеспечения с американской и испанской нетрудно увидеть, что она явным образом сфокусирована на использовании потенциала прижизненных неродственных доноров. Однако у нас нет оснований говорить о заложенной в ней идеологии «агрессивной заготовки органов». В отличие от своих американских и испанских коллег иранские врачи-трансплантологи, очевидно, не используют весь спектр существующих возможностей в сфере донорства. Представляется, что их выбор предопределен господствующими культурными нормами исламского общества, где значительная часть населения настороженно относится к практике посмертного изъятия органов.

Три приведенных выше примера не исчерпывают всего разнообразия существующих сегодня национальных стратегий самообеспечения донорскими органами, но при этом их можно считать весьма показательными. Американская стратегия «агрессивной заготовки органов» в силу той роли, которую играет в мире американская трансплантационная медицина,

во многом является образцом для других стран, хотя и не признана в качестве таковой ВОЗ. Стремление использовать весь спектр существующих возможностей в привлечении донорских ресурсов является нормой, которой руководствуется медицинское сообщество большинства развитых стран. Испанская стратегия самообеспечения, признанная ВОЗ в качестве образцовой модели, тоже имеет много приверженцев, в том числе, по-видимому, и потому, что ей свойственна меньшая агрессивность. Иранская же стратегия официально не имеет аналогов за пределами этой страны, но устойчивый интерес к ней и обилие публикаций о роли иранского опыта, похоже, уготовили и этой стратегии шанс на сохранение в будущем.

КУЛЬТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ И СОЦИАЛЬНО-ЭКОНОМИЧЕСКОЕ НЕРАВЕНСТВО

Международное медицинское сообщество в лице ВОЗ связывает возможности развития трансплантаций и сокращение дефицита донорских органов прежде всего с увеличением масштабов посмертного донорства. При этом эксперты ВОЗ справедливо указывают на то, что в некоторых частях мира сама идея посмертного донорства вызывает «культурное сопротивление». Речь идет в первую очередь о странах Азии, Латинской Америки и Африки, т. е. в основном о развивающихся странах. Признавая это, ВОЗ настаивает на важности «качественных исследований для понимания «немедицинских» причин этого сопротивления» [26, 27].

Мексика

Среди развивающихся стран Латинской Америки случай наиболее явного влияния культуры на донорские практики демонстрирует Мексика. Страна с преобладанием католического населения также управляется правительством, которое на протяжении многих десятилетий пытается проводить в жизнь политику модернизации, но при этом находится в положении безнадежно отстающего от своего северного соседа, США. В стране достаточно высоко развита трансплантационная медицина, и по общему количеству пересадок почки Мексика в 2017 г. занимала четвертое место среди всех стран Латинской Америки: 24,5 трансплантации на миллион населения. Между тем наиболее часто осуществляются пересадки с использованием живых доноров, тогда как посмертное донорство развито очень слабо. По уровню использования посмертных донорских органов Мексика занимает одно из последних мест в регионе, зато по количеству пересадок почек с использованием живых доноров она уверенно занимает первое место: 17,3. При этом общее количество трансплантаций почек от

умерших доноров вдвое с лишним меньше: 7,2 [18]. В стране не существует запрета на использование доноров со смертью мозга, однако низкий уровень развития посмертного донорства обусловлен прежде всего культурными особенностями местной жизни.

Медицинский антрополог М. Кроули-Матока предложила одно из самых интересных объяснений мексиканского феномена. В своем многолетнем исследовании она оттолкнулась от одного случая, который можно считать парадигмальным. Родители одного юноши, которому требовалась пересадка почки, отправились в Германию, на родину его матери. Там и врачи, и родня по материнской линии стали настаивать на том, чтобы провести пересадку от умершего донора. Однако семья приняла другое решение и вернулась в Мексику, где немецкая мать пожертвовала сыну собственную почку. Этот поступок не только получил одобрение со стороны мексиканской родни и врачей, но и был воспринят всеми как совершенно оправданный и закономерный: женщина-мать, родившая ребенка, в случае необходимости всегда должна пожертвовать ему часть своего тела.

Согласно выводам исследовательницы, данная логика тесно связана с представлениями о сексуальности. Если зачатие ребенка всегда является следствием половой связи, и следовательно, следствием моральной нечистоты женщины-матери, то деторождение предстает как моральное искупление. То же касается и прижизненного донорства почки: оно выступает материнским искуплением за плотский грех. Размышляя над этой логикой, исследовательница обратилась также к особенностям мексиканской религиозности, которая, в сущности, сложилась еще в XVI в., когда древняя Мексика была завоевана европейцами. Именно в этот период, после морального унижения, которому подверглись коренные мексиканцы, они впервые приняли религию своих завоевателей – католицизм. Примечательно, что источником религиозного чувства коренных жителей страны стал образ Девы Марии Гваделупской, которая с тех пор является наиболее почитаемым христианским символом в Новом Свете. В образе мексиканской Мадонны соединились черты материнской жертвенности и культурно-религиозный выбор самих мексиканцев, которые с середины XVI в. превратились в единую нацию коренных жителей и их завоевателей. Кроме того, по мысли Кроули-Матока, в общественном сознании мексиканцев глубоко укоренился и еще один женский образ, Малинче – индианки знатного рода, которая была в качестве рабыни отдана правителю ацтеков, а затем подарена им предводителю конкистадоров Эрнану Кортесу. Став наложницей Кортеса, она также стала и лучшей его шпионкой, которая помогла испанцам завоевать Мексику. Если довести до логического завершения обе эти значимые для современных мексиканцев истории, то становится

более понятным и тезис о естественности материнской жертвы. Всякая женщина-мать в Мексике – это сначала Малинче, предательница своего народа, совершающая плотский грех с врагом, а затем – Дева Мария Гваделупская, мать Божества, приносящая искупительную жертву [28, 29].

Для большинства мексиканцев неприемлемой является идея посмертного донорства. Кроули-Матока связывает это с верой мексиканцев в посмертное воскресение и их представлениями о том, что тело после смерти должно оставаться целым, без повреждений. Но наряду с аргументами, относящимися к сфере духовной культуры, по мысли исследовательницы, важную роль также играют и факторы материально-культурного порядка. В частности, она отмечает неразвитость материальной инфраструктуры мексиканских больниц, отсутствие в большинстве из них палат реанимации и очевидную нехватку аппаратов искусственной вентиляции легких. Кроме того, в стране не хватает специалистов, способных поставить достоверный диагноз «смерть мозга».

В работе Кроули-Матока показано также, что естественность материнского донорства для мексиканцев хорошо согласуется с имеющимися фактами, хотя в отдельных случаях может показаться, что это не так. В частности, собранная исследовательницей статистика показывает, что значительно чаще, чем матери, донорами друг для друга становятся братья и сестры. За двенадцать лет наблюдений было выявлено 168 случаев жертвования органов сестрами и 160 случаев – братьями (всего 328 случаев). В свою очередь, дети жертвовали органы для родителей 63 раза (31 раз – дочери и 32 – сыновья), а родители для детей 76 раз (46 – матери и 30 – отцы). Супруги жертвовали органы друг для друга 42 раза, причем 35 раз – жены для мужей и только 7 – мужья для жен. Такое же неравномерное распределение донорских органов между полами, как между супругами, наблюдается и между братьями и сестрами. Сестры для братьев выступали донорами 93 раза, а братья для сестер вдвое меньше, 46 раз. Более охотно сиблинги жертвовали своими органами для родственников того же пола: братья для братьев – 115 раз, сестры для сестер – 46 раз. Несмотря на то что все эти факты, приводимые Кроули-Матока, говорят о несколько большей жертвенности мексиканских женщин, чем мексиканских мужчин [28], мы склонны акцентировать внимание на главном выводе всей ее работы: в Мексике донорство органов по целому ряду причин является делом семейным. Именно семья, поскольку она является опорой для всех своих членов, является главным потребителем донорских органов. Мексиканцам не свойствен крайний индивидуализм. Хотя одни члены семьи с готовностью жертвуют свои органы для других, но, в сущности, дело всегда идет о том, чтобы обеспечить не столько выживание ин-

дивида, сколько семьи. Все органы так или иначе перераспределяются в рамках семейной структуры, и действует моральная экономия семейного выживания.

В целом можно считать, что большинство обществ с традиционными взглядами, или развивающихся обществ, с большей готовностью признает прижизненное донорство, чем посмертное. В отличие от европейцев и североамериканцев, которые придерживаются рационалистических представлений о человеке, подавляющее большинство населения развивающихся стран отвергает материалистические воззрения на тело и душу. На Западе человек мыслится как разумное существо, а органом разума считается мозг. Если мозг умирает, то умирает и сам человек. Не то же самое в традиционных обществах, где смерть мозга вовсе не есть смерть человека. В пространстве живого религиозного сознания смерть есть всегда нечто большее, переход в новое состояние, как и сам человек, чье тело даже в его посмертном состоянии мыслится как святыня и собственность Высшего Существа.

Турция

Турция – крупная страна, где на протяжении почти векового периода у власти находится светское правительство, а большинство населения исповедует ислам, причем половина в весьма умеренной форме. Географическое положение делает ее наполовину европейской страной, и это примечательным образом связано с той политикой модернизации, которую власти осуществляют в самых разных аспектах хозяйственной и культурной жизни. Опыт Турции свидетельствует о том, что большинство населения неохотно соглашается с возможностью использования органов человека после его смерти. Данные за 2017 г. свидетельствуют о крайне низком уровне донорской активности для случаев пересадки сердца, легких и поджелудочной железы, т. е. органов, которые можно изъять только у мертвого донора. Напротив, количество трансплантаций с использованием доли печени от живого донора достаточно высоко – 13,5 человека на миллион населения, а количество изъятий почки от живого донора – 32,8 человека на миллион населения; это один из самых высоких показателей в мире (в Европе такие же показатели только в Нидерландах). При этом уровень активности для посмертного донорства почки в Турции весьма невысокий – 8,6 (в Европе ниже только в православных Греции, Болгарии, Сербии и Молдавии, а также в России) [18].

Специальные исследования показывают, что преобладание традиционных взглядов в турецком обществе сказалось на неудачах национальной трансплантационной программы в 1990-е гг. Поощряя различные формы модернизации, турецкое

правительство тогда же инициировало создание сети частных клиник для представителей среднего класса и богатых иностранцев, в которых начали пересаживать органы. Это неминуемо привело к эксцессам в практике приобретения донорских органов. Как показано в исследовании А. Санала, на рубеже 1990-х и 2000-х гг. в частных турецких клиниках распространилась подпольная торговля органами, в которую оказались вовлечены некоторые местные доктора. Источниками органов становились трупы бедняков, умерших в психиатрических лечебницах, лица, покончившие самоубийством, и жертвы крупных землетрясений. Нередко донорские органы приобретались у бедняков, которых специально привозили в турецкие клиники из Индии, Ирака и других мест. Оценивая масштабы скандала в турецкой трансплантационной медицине этого времени, Санал называет его значительным, а предприимчивых турецких докторов, вроде печально известного «доктора S.», называет «техно-Робин Гудами», которые участвуют перераспределении дефицитных богатств (органов) от бедных к богатым [30, 31]. Турции – по крайней мере, до 2010-х гг. – не удалось создать прозрачную систему органного донорства, а все существующие практики донорства население воспринимало скептически.

Пакистан

Пакистан – одна из наиболее быстро развивающихся стран в Азии. Здесь также у власти находится светское правительство, поддерживаемое военными, а многомиллионное население исповедует ислам. Трансплантационная программа, осуществляемая в стране с 1985 г., связана исключительно с прижизненным донорством. В начале 2000-х гг. доля пациентов с тяжелыми формами заболеваний почек достигала 100 человек на каждый миллион населения, при этом в стране ежегодно проводилось порядка 600–700 операций. Посмертное донорство отсутствует, поскольку законодательно запрещены трансплантации, связанные с использованием доноров со смертью мозга. При этом, хотя мусульманское духовенство и ученые из мусульманских академических центров признают, что посмертное донорство не противоречит исламу, в массовом религиозном сознании оно отвергается и воспринимается как надругательство над мертвым телом. Не создает оснований для развития посмертного донорства и господство в сознании населения семейно-ориентированного коллективизма, который подавляет всякую автономию личности и ее права. В Пакистане успешно работает крупный трансплантационный центр – Sindh Institute of Urology and Transplantation, организаторам которого удалось адаптировать к своим интересам культурные ценности пакистанцев: в нем осуществляются пересадки

почек только от родственных доноров, и активно поощряется мысль, что донорство есть моральная обязанность каждого человека перед членом своей семьи. При этом явно выраженный дефицит донорских органов толкает многих пакистанцев к тому, чтобы искать возможность получить трансплантационную помощь за границей [32–34].

Медицинское сообщество в лице ВОЗ и СМИ уже четверть века настойчиво говорит о глобальном дефиците органов, и этот дефицит действительно существует там, где осуществляются трансплантации. Однако парадоксальным образом этот дефицит может принимать разные проявления. В странах Южной Азии, прежде всего в Индии, а также Шри-Ланка и Бангладеш, на протяжении длительного времени наблюдается дефицит иного рода – «не дефицит органов, а дефицит пациентов» [35]. Целый ряд исследований последних лет, которые были проведены медицинскими антропологами, указывает на то, что на практики донорства может накладывать большой отпечаток не только культурная среда, но и социально-экономическая ситуация.

Бангладеш

Бангладеш – одна из самых бедных стран в мире. Из 150 миллионов ее населения 78% живут менее чем на два доллара США в день. В начале 2000-х гг. она присвоила себе печальную славу еще одного «мирового базара органов». Ее столица, Дакка – это место, где число желающих продать свои органы (почку, роговицу глаза, часть печени) неизмеримо превышает число тех, кто готов их купить. Именно поэтому стоимость продаваемых органов имеет тенденцию снижаться, а циничные и предприимчивые брокеры и покупатели органов бесстыдно обманывают бедняков, желающих их продать.

Медицинский антрополог М. Монируззаман в середине 2000-х гг. предпринял длительное исследование в Дакке, в ходе которого ему удалось собрать интервью с тридцатью местными мужчинами и тремя женщинами, продавшими свой орган, а также пообщаться с врачами-урологами и нефрологами, участвующими в трансплантациях. Полученные сведения нельзя назвать иначе как удручающими. Почти все люди, продавшие свои органы, остались разочарованными. В большинстве случаев покупатели органов даже не заплатили им всю обещанную сумму – около 1400 долларов. У всех после операции на теле остался огромный шрам, которого могло бы не быть, если бы операция делалась лапароскопическим методом. Почти никто не получил должной медицинской помощи после изъятия органа и после очень быстрой выписки из больницы был вынужден вернуться в совершенно антисанитарные условия. У большинства начались проблемы со здоровьем, а

также серьезные психологические проблемы. У некоторых в силу всего этого вскоре распался брак. Совершенно никто не смог воспользоваться деньгами, чтобы хоть как-то улучшить свою жизнь, а многим их не хватило даже на покрытие всех долгов. Доноры, продавшие свои почки, неизменно вспоминали о дне своей операции как о самом черном дне жизни. Один из тех, с кем беседовал ученый, сказал, что чувствует себя после операции «человеком лишь наполовину» [36, 37].

Национальный закон о трансплантации органов в Бангладеш был принят в 1999 г., и согласно этому закону, в стране официально запрещена торговля органами. За нарушение закона преступникам грозит крупный штраф и тюремный срок. Однако в реальности за это никого не преследуют, а объявления о готовности купить тот или иной донорский орган регулярно встречаются в пяти крупнейших газетах страны. По мнению Монируззамана, применительно к Бангладеш даже сам термин «донорство» выглядит неуместно. Органы здесь не дарят, а продают в открытую. Все это является не только следствием нищеты огромных масс населения, но и того, что антрополог называет «бионасилием». Наиболее богатые покупатели органов предпочитают вывозить своих «доноров» за границу, обычно в Индию или Сингапур, и уже там делать операцию. Те, кто не так богат, пользуются услугами местных больниц, таких как больница медицинского университета Шейха Муджиба в Дакке. Самые же богатые летят самолетом в Америку, везя с собой купленный орган. Горячо одобряемая мировым медицинским сообществом альтруистическая философия, согласно которой жизнь одних людей может быть спасена за счет жизни других, здесь выглядит совершенно иначе: жизнь богатых продлевается за счет жизни бедных. По замечанию Н. Шейпер-Хьюз, в современном глобальном мире вслед за капиталами донорские органы также перемещаются из бедных стран в богатые, с Юга на Север, из третьего мира в первый мир; имеет место «медицинский апартеид» [38, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концепт «дефицит донорских органов» прочно вошел в профессиональный дискурс трансплантационной медицины и стал своеобразным отражением текущего кризиса той философии, что лежит в основе современной трансплантационной практики. Это философия альтруизма, которая впервые была разработана еще в XIX в. О. Контом. Руководствуясь философией альтруистического донорства, представители трансплантационной медицины предлагают и остальным членам общества разделить идеалы этой философии – добровольность, безвозмездность, солидарность и т. д. Однако ситуация с глобальным дефицитом органов явно указывает на

то, что в этом вопросе между профессионалами и обществом консенсус не всегда достигается. Общество не обязательно принимает философию (этику) альтруистического донорства, во всяком случае в полном объеме. Данное обстоятельство делает необходимым более обстоятельное изучение того, как общество относится к донорству органов. В этой связи глобальная проблема дефицита донорских органов не может рассматриваться только как проблема профессионального медицинского сообщества. Она требует междисциплинарного изучения, совместной работы врачей и ученых-гуманитариев.

Публикация подготовлена в рамках поддержанного РНФ научного проекта № 17-18-01444, 2019 год.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. World Health Assembly Resolution 40.13. Development of guiding principles for human organ transplants, 4–15 May 1987. [Online]. Available: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s15559e/s15559e.pdf> (Accessed: 14.08.2019).
2. World Health Assembly Resolution 44.25. Human organ transplantation, 6–16 May 1991. [Online]. Available: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s15559e/s15559e.pdf> (Accessed: 14.08.2019).
3. Capron A. 1991 Guiding principles: roots and implications. *Ethics. Access and safety in tissue and organ transplantation: issues of global concern*. Madrid, Spain, 6–9 October 2003. Report. Geneva: WHO, 2004: 9. [Online]. Available: http://www.who.int/transplantation/en/Madrid_Report.pdf?ua=1 (Accessed: 14.08.2019).
4. World Health Assembly Resolution 57.18. Human organ and tissue transplantation, 22 May 2004. [Online]. Available: http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA57/A57_R18-en.pdf. (Accessed: 1.08.2019).
5. WHO proposes global agenda on transplantation. WHO. Media centre. 30 March 2007. [Online]. Available: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr12/en/> (Accessed: 1.08.2019).
6. The declaration of Istanbul on organ trafficking and transplant tourism (2008 edition). [Online]. Available: https://www.declarationofistanbul.org/images/Policy_Documents/2008_Edition_of_the_Declaration_of_Istanbul_Final.pdf (Accessed: 1.08.2019).
7. World Health Assembly Resolution 63.22, WHO guiding principles on human cell, tissue and organ transplantation, 21 May 2010. [Online]. Available: https://www.who.int/transplantation/Guiding_PrinciplesTransplantation_WHA63.22en.pdf (Accessed: 1.08.2019).
8. Delmonico FL, Dominguez-Gil B, Matesanz R, Noel L. A call for government accountability to achieve national self-sufficiency in organ donation and transplantation. *Lancet*. 2011; 378: 1414–1418.

9. Mone TD. The business of organ procurement. *Current opinion of organ transplantation*. 2002; 7: 60–64.
10. Our OPOs: New England organ bank. New England donor services: organ and tissue donation. [Online]. Available: <https://neds.org/our-opos/> (Accessed: 26.08.2019).
11. Fox RC, Swazey JP. Spare parts: organ replacement in American society. Oxford, 1992: 3–30.
12. Kaserman DL, Barnett AH. The US organ procurement system: a prescription for reform. Washington, DC, 2002: 8, 12, 13.
13. Schulak JA, Bohnengel A, Hanto DW et al. The Ohio solid transplantation consortium: a 15-year experience. *Transplantation review*. 1999; 13 (3): 135–147.
14. Adams PL, Cohen DJ, Danovitch GM et al. The non-directed live-kidney donor: ethical considerations and practice guidelines. *Transplantation*. 2002; 74 (4): 582–590.
15. Henderson AJZ, Landolt MA, McDonald MF et al. The living anonymous kidney donor: lunatic or saint? *American journal of transplantation*. 2003; 3:203–213.
16. Salim A et al. Aggressive organ donor management significantly increases the number of organs available for transplantation. *Journal of trauma*. 2005; 58 (5): 991–994.
17. Matesanz R, Dominguez-Gil B, Coll E et al. How Spain Reached 40 deceased organ donors per million population. *American journal of transplantation*. 2017; 20: 1–8.
18. Newsletter transplant. International figures on donation and transplantation 2017. Strasbourg, 2018; 23.
19. Gracia D. Prior consent of deceased and family permission. *Ethics. Access and safety in tissue and organ transplantation: issues of global concern*. Madrid, Spain, 6–9 October 2003. Report. Geneva: WHO, 2004: 10–11.
20. Jahromi AH, Fry-Revere S, Bastani B. A revised Iranian model of organ donation as an answer to the current organ shortage crisis. *Iranian journal of kidney diseases*. 2015; 9 (5): 354–360.
21. Ghods AJ. The history of organ donation and transplantation in Iran. *Experimental and clinical transplantation*. 2014; 12 (1) Supplement: 38–41.
22. Zargooshi J. Iranian kidney donors: motivations and relations with recipients. *Journal of urology*. 2001; 165 (2): 386–392.
23. Zargooshi J. Quality of life Iranian kidney «donors». *Journal of urology*. 2001; 166 (5): 1790–1799.
24. Ghods AJ, Savaj S. Iranian model of paid and regulated living-unrelated kidney donation. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2006; 1 (6): 1136–1145.
25. Mahdavi-Mazdeh M. The Iranian model of living renal transplantation. *Kidney international*. 2012; 82: 627–634.
26. Groth C-G. Global activity and developments in organ transplantation. *Ethics. access and safety in tissue and organ transplantation: issues of global concern*. Madrid, Spain, 6–9 October 2003. Report. Geneva: WHO, 2004: 6. [Online]. Available: http://www.who.int/transplantation/en/Madrid_Report.pdf?ua=1 (Accessed: 14.08.2019).
27. Moazam F. Paucity of Cadaveric Kidneys: A Sociocultural Issue. *Ethics. access and safety in tissue and organ transplantation: issues of global concern*. Madrid, Spain, 6–9 October 2003. Report. Geneva: WHO, 2004: 12. [Online]. Available: http://www.who.int/transplantation/en/Madrid_Report.pdf?ua=1 (Accessed: 14.08.2019).
28. Crowley-Matoka M. Domesticating organ transplant: familial sacrifice and national aspiration in Mexico. Durham: Duke university press, 2016.
29. Crowley-Matoka M, Lock M. Organ transplantation in a globalized world. *Mortality: promoting the interdisciplinary study of death and dying*. 2006; 11 (2): 172.
30. Sanal A. «Robin Hood» of techno-turkey or organ trafficking in the state of ethical beings. *Culture, medicine, and psychiatry*. 2004; 28: 281–309.
31. Karakayali H, Haberal M. The history and activities of transplantation in Turkey. *Transplantation proceedings*. 2005; 37: 2905–2908.
32. Moazam F. Bioethics and organ transplantation in a Muslim society: a study in culture, ethnography, and religion. Bloomington: Indiana University Press, 2006.
33. Moazam F, Moazam Zaman R, Jafarey AM. Conversations with kidney vendors in Pakistan. *Hastings center report*. 2009; 39 (3): 29–44.
34. Moazam F, Jafarey AM. Pakistan's experience with kidney transplantation and trade: a call for international solidarity. *Indian journal of medical ethics*. 2014; 11 (3): 156–162.
35. Cohen L. Where it hurts: Indian material for an ethics of organ transplantation. *Daedalus*. 1999; 128 (4): 156.
36. Moniruzzaman M. Living cadavers in Bangladesh: bioviolence in the human organ bazaar. *Medical anthropology quarterly*. 2012; 26 (1): 69–91.
37. Moniruzzaman M. Domestic organ trafficking: between biosecurity and bioviolence. *Bioinsecurity and vulnerability*, eds. Chen N., Sharp L. Santa Fe, NM: School of advanced research press, 2014: 195–215.
38. Scheper-Hughes N. Theft of life: the globalization of organ stealing rumours. *Anthropology today*. 1996; 12 (3): 3–11.
39. Scheper-Hughes N. The global traffic in human organs. *Current anthropology*. 2000; 41 (2): 191–224.

Статья поступила в редакцию 21.11.2019 г.
The article was submitted to the journal on 21.11.2019

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-184-195

ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

В.Е. Загайнов^{1, 2}, А.В. Мелешина¹, К.Г. Корнева^{1, 3}, С.А. Васенин², Е.В. Загайнова¹

¹ ФГБУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, Нижний Новгород, Российская Федерация

² ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России», Нижний Новгород, Российская Федерация

³ ГБУЗ Нижегородской области «Городская клиническая больница № 13 Нижнего Новгорода», Нижний Новгород, Российская Федерация

В обзор включены результаты ретроспективных и проспективных клинических зарубежных и отечественных исследований и рекомендаций по проблеме применения трансплантационных технологий для лечения сахарного диабета I типа и панкреатогенного диабета при хроническом панкреатите и панкреатоприивных состояниях. Изложены современные данные о распространенности сахарного диабета и современных методах инсулинотерапии. Рассмотрены результаты трансплантации поджелудочной железы и островков Лангерганса при первичных инсулинозависимых состояниях. Представлен анализ технологии выделения и аутотрансплантации островков после панкреатэктомии при хроническом панкреатите и доброкачественных (опухолевых) заболеваниях.

Ключевые слова: поджелудочная железа, сахарный диабет I-го типа, панкреатогенный сахарный диабет, трансплантация поджелудочной железы, островков Лангерганса.

TRANSPLANTATION TECHNOLOGIES FOR TREATMENT OF CARBOHYDRATE METABOLISM DISORDERS

V.E. Zagainov^{1, 2}, A.V. Meleshina¹, K.G. Korneva^{1, 3}, S.A. Vasenin², E.V. Zagaynova¹

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russian Federation

² Privolzhsky District Medical Center, Nizhny Novgorod, Russian Federation

³ City Clinical Hospital No. 13, Nizhny Novgorod, Russian Federation

The review includes results of retrospective and prospective clinical studies (foreign and national) and guidelines on the use of transplantation technologies for treatment of type 1 diabetes and pancreatogenic diabetes in chronic pancreatitis and pancreatic conditions. Modern data on prevalence of diabetes and modern insulin delivery methods are presented. Results of transplantation of pancreas and islets of Langerhans in primary insulin-dependent conditions are considered. Analysis of the technology for isolation and autotransplantation of islets after pancreatectomy in chronic pancreatitis and benign tumor diseases are given.

Keywords: pancreas, type 1 diabetes, pancreatogenic diabetes, pancreas transplantation, islets of Langerhans.

ВВЕДЕНИЕ

Панкреатоприивные состояния включают сахарный диабет 1-го типа (СД 1-го типа) и панкреатогенный сахарный диабет (ПСД).

В основе СД 1-го типа лежит аутоиммунная деструкция β-клеток с развитием абсолютной инсулиновой недостаточности. Данное заболевание яв-

ляется значимой медико-социальной проблемой по нескольким причинам. Заболеваемость СД 1-го типа имеет тренд на ежегодное увеличение. Общая численность пациентов с СД в РФ на 01.01.2019 г. составила 4 584 575 (3,12% населения РФ), в том числе: СД1 – 256,2 тыс. В настоящее время средняя распространенность СД1 в РФ составляет 174,4 на 100 тыс. населения. В течение 2018 г. выявлено 10 805 новых

Для корреспонденции: Загайнов Владимир Евгеньевич. Адрес: 603109, Нижний Новгород, ул. Ильинская, 14. Тел. (951) 906-65-43. E-mail: zagainov@gmail.com

For correspondence: Zagainov Vladimir Evgenievich. Address: 14, Ilyinskaya str., Nizhny Novgorod, 603109, Russian Federation. Tel. (951) 906-65-43. E-mail: zagainov@gmail.com

случаев СД 1-го типа [1]. Подавляющее большинство пациентов – дети и молодые люди в возрасте до 30 лет. Нарушения углеводного обмена со временем приводят к развитию острых фатальных или хронических инвалидизирующих осложнений сахарного диабета [2]. По данным федерального регистра сахарного диабета, при СД 1-го типа диабетическая полинейропатия регистрируется у 33,6% пациентов, диабетическая ретинопатия – у 27,2% пациентов, нефропатия – у 20,1%, диабетическая макроангиопатия – у 12,1% пациентов, синдром диабетической стопы – у 4,3%, ИБС – у 3,5%, цереброваскулярные нарушения – у 1,5%, инфаркт миокарда – у 1,1% пациентов. Представленные показатели определены по данным обращаемости. При активном скрининге частота таких осложнений, безусловно, будет увеличиваться [3]. Пациенты с СД 1-го типа имеют ограниченные возможности для адаптации и самореализации. Лечение требует огромных расходов на дорогостоящие препараты и средства самоконтроля. Оптимистический анализ на основе российской выборки исследования показал, что средние годовые затраты на 1 пациента с СД 1-го типа составили 81,1 тыс. руб. Затраты на лечение пациентов с имеющимися хроническими осложнениями и не достигающими целевых значений уровня гликированного гемоглобина значительно выше, чем у пациентов без осложнений с компенсированным диабетом [4]. Не вызывает сомнения, что предотвращение или замедление прогрессирования осложнений сахарного диабета может быть достигнуто адекватным долгосрочным контролем уровня гликемии. В настоящее время единственным доступным методом лечения остается пожизненная инсулинотерапия. Несмотря на появление фармакокинетически более адаптированных препаратов инсулина, индивидуальных средств самоконтроля уровня глюкозы крови (глюкометры и системы непрерывного мониторингования в режиме реального времени), а также устройств для введения инсулина (инсулиновые шприц-ручки и инсулиновые помпы), достичь стабильных гликемических показателей удается далеко не всегда. Колебания гликемии в течение суток, эпизоды гипер- и гипогликемии наблюдаются практически у всех пациентов, что связано с различиями потребности в инсулине в зависимости от питания, физических нагрузок и многих других факторов, которые трудно предусмотреть или контролировать. Создание замкнутого контура «искусственная поджелудочная железа» на основе обратной связи между уровнем текущей гликемии и дозой вводимого инсулина находится только в стадии клинических испытаний.

Панкреатогенный сахарный диабет (ПСД) является следствием утери паренхимы поджелудочной железы в результате хронического рецидивирующего панкреатита, перенесенного панкреонекроза, частичной или тотальной панкреатэктомии. В контексте дан-

ного обзора сделан акцент на пациентов, перенесших панкреатэктомию по поводу хронического болевого рецидивирующего панкреатита или доброкачественных опухолей поджелудочной железы. В отличие от СД 1-го типа, при котором избирательно разрушаются β -клетки, при ПСД наблюдается дефицит не только инсулина, но и других островковых гормонов, регулирующих метаболизм глюкозы. Несмотря на редкое развитие кетоацидоза и умеренную гипергликемию, данные пациенты подвержены лабильному течению сахарного диабета с высокой вариабельностью гликемии и повторными тяжелыми гипогликемиями, что снижает их распознавание. Частота хронических микро- и макрососудистых осложнений при СД 1-го типа и ПСД одинакова.

Перспективным вариантом замещения утраченной инсулинпродуцирующей функции может быть применение трансплантационных технологий. Достижение эугликемического состояния позволит пациентам с панкреатопривными состояниями исключить негативное влияние гипергликемии – пускового механизма развития осложнений, и самое главное, уменьшить вероятность развития тяжелых, порой фатальных, гипогликемических состояний [5].

АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Поджелудочная железа человека – железистый орган, включает экзокринную и эндокринную части.

Экзокринная часть поджелудочной железы представлена панкреатическими ацинусами и системой выводных протоков.

Эндокринная часть поджелудочной железы образована лежащими между ацинусами панкреатическими островками (островки Лангерганса). Островки Лангерганса содержат 20–25% α -клеток, продуцирующих глюкагон, и 75–80% β -клеток, синтезирующих и депонирующих инсулин, D-клеток, вырабатывающих соматостатин, VIP-клеток – вазоинтестинальный пептид и PP-клеток – панкреатический полипептид. С возрастом в поджелудочной железе происходит изменение между ее экзокринной и эндокринной частями в сторону уменьшения эндокринного компонента – числа островков.

В поджелудочной железе насчитывается около 1 000 000 островков, представляющих собой компактные скопления упорядоченных в гроздь или тяжи секреторных клеток. Клетки слоями окружают капилляры островков, находясь в тесном контакте с сосудами.

ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

1. Трансплантация поджелудочной железы

Патогенетически обоснованным методом лечения СД1 является трансплантация β -клеток в составе ор-

гана или изолированно в виде клеточной суспензии. Несмотря на множество экспериментов на животных, первая успешная трансплантация поджелудочной железы в сочетании с одновременной трансплантацией почки была проведена W.D. Kelly и R. Lillehei в Университете Миннесоты в 1966 году. До 1980 года операция считалась экспериментальной. Активный интерес к трансплантации поджелудочной железы вернулся в конце 1970-х на фоне совершенствования иммуносупрессивной терапии, а также техники операции [6].

В России симультанная трансплантация целой поджелудочной железы и почки от посмертного донора впервые была выполнена академиком В.И. Шумаковым в 1987 г. [7]. Успешная трансплантация фрагмента железы от живого родственного донора осуществлена С.В. Готье [8].

В Российской Федерации насчитывается 44 центра трансплантологии, однако только в четырех выполняется трансплантация поджелудочной железы. В 2018 году было выполнено 17 трансплантаций поджелудочной железы [9].

Важными факторами успешного функционирования трансплантата поджелудочной железы являются отбор реципиента, оценка донора и донорского органа. Первичный отбор основан на совместимости по группе крови и на отрицательном результате реакции cross-match. Важное значение для длительного функционирования трансплантата имеет количество совпадений по HLA [10].

A. Gruessner et al. по результатам 445 трансплантаций показали, что возраст донора более 45 лет, ожирение – значимые факторы развития осложнений: тромбоза магистральных сосудов, внутрибрюшной инфекции и несостоятельности панкреатодигестивного анастомоза [11]. Сходные данные демонстрируются отечественными авторами [9].

Абсолютными противопоказаниями к выполнению трансплантации поджелудочной железы являются функциональные нарушения сердечно-сосудистой системы: низкая фракция сердечного выброса, нестабильная ИБС, психические заболевания, некомплаентность, активный инфекционный процесс и злокачественные новообразования [12].

Основным критерием, определяющим вариант трансплантации (изолированно или симультанно), служит наличие диабетической нефропатии. Показанием к одномоментной трансплантации поджелудочной железы и почки является снижение клиренса креатинина менее 40 мл/мин, или дисфункция ранее пересаженной почки. Изолированная трансплантация поджелудочной железы показана больным сахарным диабетом I типа без тяжелой нефропатии. Обязательный критерий отбора – преобладание угрозы для жизни пациента с осложненным диабетом в виде тяжелых гипогликемий над возможными последствиями длительной иммуносупрессии.

Для больных сахарным диабетом I типа с пересаженной ранее почкой последующая трансплантация поджелудочной железы оправдана с точки зрения профилактики нефропатии трансплантата и улучшения качества жизни. Также аргументом в пользу трансплантации поджелудочной железы после трансплантации почки является сформированный и устоявшийся к этому времени протокол иммуносупрессии, что способствует оптимальной физиологической и психологической адаптации пациента к предстоящей операции. Необходимым условием для проведения трансплантации поджелудочной железы является стабильная функция ранее пересаженной почки (клиренс креатинина >50 мл/мин).

Технические аспекты выполнения трансплантации поджелудочной железы в различных трансплантационных центрах обладают общими принципами: обеспечение адекватного артериального кровоснабжения поджелудочной железы и сегмента двенадцатиперстной кишки, свободного венозного оттока от трансплантата и обеспечение панкреатической экзокринной секреции [13].

На фоне развития трансплантационных технологий и схем иммуносупрессии наблюдается существенное увеличение выживаемости, как трансплантатов, так и реципиентов. Выполнение симультанной трансплантации у больных сахарным диабетом статистически значимо увеличивает выживаемость реципиентов и трансплантата почки по сравнению с изолированной трансплантацией почки [14].

Выживаемость реципиентов в течение первого года после трансплантации поджелудочной железы составляет более 95%, 3-летняя выживаемость – 90%, Однолетняя выживаемость трансплантата достигает 85% при симультанной трансплантации комплекса «поджелудочная железа – почка», 79% – при изолированной трансплантации поджелудочной железы [15] и 78–83% – при трансплантации поджелудочной железы после трансплантации почки [16].

Таким образом, симультанная трансплантация поджелудочной железы и почки является эффективным методом лечения пациентов с СД I-го типа, осложненного терминальной почечной недостаточностью.

2. Трансплантация островков поджелудочной железы

Существенным ограничением увеличения количества трансплантаций поджелудочной железы является неудовлетворительное ее качество от посмертных доноров. При этом отсутствуют объективные критерии оценки качества органокомплекса. По данным регистра Германии, три четверти причин отказа от трансплантации субъективны [17].

При отказе от пересадки целого органа разработаны технологии выделения островковых клеток с

целью их последующей трансплантации пациентам с инсулин-дефицитными нарушениями углеводного обмена.

В 1977 году в Миннесоте была выполнена первая успешная трансплантация островковых клеток (ТОК).

В целом ряде стран (Канада, Австралия, Великобритания, Швейцария, Норвегия и др.) пересадка островковых клеток является стандартом медицинской помощи, «не требующим дальнейшего научного обоснования» [18].

До 2000 года, по данным мирового регистра, лишь у 12,5% пациентов зугликемия после трансплантации поджелудочной железы сохранялась больше 1 недели, и только у 8,5% пациентов функция сохранялась через год.

В 2000 году вышла статья профессора Shapiro с соавторами из Эдмонта, где были представлены данные о том, что все 7 пациентов, которым ТОК была выполнена по внедренному протоколу, сохраняли полную зугликемию на срок от 6 до 12 месяцев [19]. Основные пункты эдмонтонского протокола остаются общепринятыми и в настоящее время.

1. Тщательная селекция реципиентов. Основной группой пациентов, которым показана ТОК, являются больные с так называемым «ломким» СД 1-го типа (brittle diabetes), при котором почти невозможно надежно контролировать уровень глюкозы, а постоянные колебания от тяжелой гипергликемии к критической гипогликемии значительно ускоряют инвалидизацию пациентов и существенно сокращают их жизнь.
2. Очень большая доза взвеси островковых клеток. Стандартным правилом до введения эдмонтонского протокола было: 1 донор – 1 реципиент. Доза, рекомендуемая протоколом, составляет не менее 10 000 IEQ/кг с дополнительными введениями при снижении функции, что требует применения 2–3 трансплантатов на каждого реципиента.
3. Современные режимы иммуносупрессии. Схема бесстероидной терапии, а также индукция с применением IL-1, IL-2 ингибиторов показали отличные результаты и при ТОК.

В настоящее время клиника в Эдмонтоне продолжает оставаться ведущим научным учреждением в области ТОК при СД 1. Лучшие исходы ТОК отмечаются в центрах, максимально точно придерживающихся стандартов процедуры, установленных в Эдмонтоне [20].

Согласно упомянутому исследованию, среди 48 пациентов в протоколе через 1 год зугликемия отмечалась в 87,5%, через 2 года – в 72% случаев. Через 2 года после ТОК средний уровень HbA_{1c} составлял 5,6%. Не отмечалось случаев смерти, вызванной процедурой ТОК. Получены данные о 50% 5-летней эффективности ТОК в ряде центров, что сближает результаты с трансплантацией цельной ПЖ. Из со-

временных достижений, значительно улучшивших результаты ТОК, следует отметить применение индукции анти-CD52-антителами (алемтузумаб) и ингибитора ФНО (этанерсепт) для подавления воспалительной реакции после ТОК.

Перспективна технология биоактивной инкапсуляции островков в пористую пептидно-фрагментированную альгинатную структуру. Поры позволяют клеткам получать кислород и питательные вещества и свободно секретировать гормоны в окружающую среду. Капсула защищает островки от воздействия иммунокомпетентных клеток, что снимает необходимость проведения иммуносупрессивной терапии и профилактирует окружающее фиброзирование. Идет активный поиск возможностей дополнения внеклеточного матрикса поджелудочной железы, стволовых клеток, нанотранспортеров кислорода внутрь капсулы для повышения эффективности и длительности ее функционирования.

Донорский этап (ТОК)

Количество полученных островков и их качество в значительной мере зависят от возраста, ИМТ донора и продолжительности холодовой ишемии.

Большинство центров проводит рутинное обследование доноров с повышенным индексом массы тела на нарушения толерантности к глюкозе, поскольку известно, что ожирение часто ассоциируется с СД 2-го типа.

Пролонгированное больше 6–8 часов время холодовой ишемии оказывает отрицательное влияние на дозу и качество полученного изолята островковых клеток. Предпочтительно использование UW-раствора для консервации, что не исключает и применения раствора НТК.

Согласно данным ряда исследователей, у возрастных доноров (51–56 лет) проще получить адекватную дозу клеточного изолята (83% против 37% у доноров 19–28 лет), однако секреторные возможности этих островков значительно ниже. Доноров молодой возрастной группы принято считать «идеальными», но следует принимать во внимание технически более сложную процедуру приготовления изолята за счет выраженности фиброзных структур железы.

Сразу после введения островковых клеток 70–80% их массы оказываются нежизнеспособными даже при соблюдении строгих критериев отбора доноров, аналогичных таковым при пересадке целого органа [21].

При изоляции островковых клеток в Эдмонтоне были применены последние технологические достижения того времени:

- расщепление поджелудочной железы с помощью ферментов-коллагеназ последнего поколения (либеразы);
- выделение клеток автоматическим методом, предложенным в 1988 г. профессором Рикорди; данный

метод позволяет минимизировать травматизацию клеток и значительно повысить их концентрацию на выходе и степень чистоты изолята;

- применение компьютеризированного клеточно-сепаратора, позволяющего извлечь изолят от фрагментов стромы, экзокринных клеток и т. д.

На сегодняшний день жесткие требования к подготовке материала для ТОК в ряде стран приводят к созданию единых лабораторий, обслуживающих несколько центров, для поддержания высоких стандартов GMP и экономии ресурсов.

Техника выделения островков

Процесс изоляции и сохранения островков начинается уже в ходе эксплантации (минимальная травматизация, быстрое системное и местное охлаждение поджелудочной железы).

Целью этапа обработки ПЖ является освобождение островков от окружающего экстрацеллюлярного матрикса. Это достигается комбинацией механического и ферментативного «переваривания» железы. Вначале убирается внешний жир, при этом особое внимание обращают на сохранение целостности капсулы органа. Следом канюлируется панкреатический проток и вводится раствор коллагеназы, что позволяет в течение 10 минут вызвать вздутие железы и отделить островки от окружающей экзокринной ткани. Участки ПЖ, не подвергнувшиеся перерастяжению, не подходят для дальнейшей обработки. Затем ПЖ разрезается на несколько частей и помещается в камеру Рикорди. В этой закрытой системе поддерживается постоянная рециркуляция теплого раствора, содержащего коллагеназу, а с помощью пустотелых металлических шариков происходит механическая фрагментация ткани железы и процеживание ее через экран с порами в 500 мкм. Если процесс переваривания не прекращается после того, как большинство островков освобождены, происходит их быстрое повреждение коллагеназой. В настоящее время чаще всего используют смесь Liberase NH производства Roche. Недостатком этой смеси является использование клостридиальных коллагеназ, и хотя риски передачи возбудителя ничтожны, такие опасения существуют. Альтернативные смеси, в том числе имеющие возможность регулировки коллагеназной активности, проходят апробации.

После окончания диссоциации островков необходимо их очищение. Известно, что введение в воротную вены большого количества изолята приводит к серьезным осложнениям, вплоть до летальных (тромбоз, эмболия). Очищение островков основано на разности плотности островковых и экзокринных клеток. При помещении в среду с известной плотностью и центрифугировании островковые клетки, как менее плотные, занимают верхний слой среды. Только полностью автоматизированная система сепарации центрифужного типа позволяет получить

фракцию островковых комплексов высокой степени очистки ($\geq 70\%$) [22].

Очищенные островки с помощью автоматических счетчиков подсчитываются в островковых эквивалентах, где 1 эквивалент равен островку диаметром 150 мкм. Для оценки жизнеспособности островков проводится микроскопия. Функциональность оценивается с помощью проб на инсулин, а также введением мышам с СД. Оценка на мышинной модели обладает самой высокой корреляцией с клиническим эффектом ТОК, но занимает много времени и в настоящее время почти не применяется. Стерильность устанавливают с помощью тестов на наличие аэробных и анаэробных бактериальных культур, а также на микоплазму и эндотоксин [23]. Согласно классическому эдмонтонскому протоколу, введение изолята выполнялось немедленно после приготовления. Однако хранение культуры клеток в течение определенного времени позволяет оптимизировать логистику (подготовка реципиента, индукция иммуносупрессии, транспортировка изолята) и снизить иммуногенность среды.

В случае неполного ответа проводятся дополнительные инфузии, что требует дополнительных доз на каждого реципиента [24].

Техника введения

Изучено несколько локаций введения островков: под капсулу почки, в большой сальник, переднюю камеру глаза. Однако на сегодняшний день стандартным методом в клинической практике является внутрипортальное введение островковых клеток, преимуществами которого являются его малоинвазивность и безопасность. Кровотечения и порталный тромбоз, самые грозные осложнения этой операции, встречаются с частотой менее 10% и очень редко являются фатальными.

Реакция островков на имплантацию

С помощью позитронно-эмиссионной томографии установлено, что сразу после внутрипортального введения 50–70% островков теряет жизнеспособность. Поэтому необходимо использование взвеси от 2–3 доноров [25, 26].

Основное повреждение островков после введения происходит за счет патологических процессов, развивающихся в организме реципиента. Наиболее изученным последствием внутрипортального введения островков является мгновенная кровь-опосредованная воспалительная реакция (The instant blood-mediated inflammatory reaction, IBMIR), представляющая собой иммунный ответ, развивающийся сразу после пересадки и реализующийся образованием тромбов и инфильтрацией тучными клетками и макрофагами [27, 28]. Микротромбы, состоящие из тромбоцитов, нейтрофилов и моноцитов, появляются уже через

5 минут после инфузии островков [29, 30]. Реакция инициируется коагуляционным каскадом, пик которого приходится на 6–12 часов после инфузии островков [31].

Также происходит активация комплемента. Внутри и на поверхности островков определяются C1q, C4, C3, C5b-9 , IgG, IgM, что приводит к образованию анафилотоксинов C3a и C5a. Набор цитокинов стимулирует миграцию и активизацию воспалительных клеток. Активированный тромбин вызывает секрецию эндотелиальными клетками факторов адгезии, таких как Р селектин, в результате происходит агрегация тромбоцитов. Эндотелиальные клетки секретируют провоспалительные интерлейкины IL-6 и IL-8, которые помогают миграции нейтрофилов и макрофагов в очаг. Моноциты и макрофаги помогают поддерживать воспалительный ответ.

Островковые клетки, перенесшие стресс, вызванный гипоксией и травмой при изоляции, провоцируют воспаление секрецией TF и экспрессией провоспалительных факторов: HMGB, IFN γ , IL-6, IL-8, IL-1 β , IFN γ -induced protein, MCP, фактора некроза опухолей (TNF), ядерного фактора каппа-B (NF- κ B), оксид азота и других [32, 33].

Поиск путей снижения воспалительной реакции показал положительный эффект применения гепарина и низкомолекулярного декстран сульфата. Исследуется применение других препаратов: никотинамида, ингибиторов тромбина, ингибиторов комплемента sCR1, ингибиторов C5a. Изучаются альтернативные пути защиты островков путем ПЭГилирования и покрытия тучными клетками. В клинической практике рутинно и повсеместно в настоящее время используется только гепарин [34–36].

Ишемическо-реперфузионное повреждение (ИРП) островков сложно охарактеризовать из-за отсутствия возможности проведения биопсии. Степень его может быть косвенно выявлена и оценена по транзитному повышению уровня АСТ и АЛТ, которое наблюдается у половины реципиентов и достигает пика к концу первой недели после ТОК. Системное влияние ИРП после ТОК выражено слабо, однако локально оно достоверно способствует ранней потере жизнеспособности островков [37, 38]. Нативные островковые клетки очень хорошо оксигенируются, потребляя 5–15% кислорода, протекающего через поджелудочную железу, с напряжением кислорода около 40 мм рт. ст. В условиях культуры большие островковые комплексы страдают от гипоксии, которая вызывает центральные некрозы и апоптоз. В течение первых дней после внутрипортальной инфузии островки оксигенируются только с помощью диффузии в портальной системе с низким напряжением кислорода, что усугубляется коагуляционным каскадом при IBMIR. Необходимо 7–14 дней, чтобы развилась автономная функциональная система кровоснабжения за счет новообразованных капил-

ляров. Даже через 3 месяца напряжение кислорода не превышает 5 мм рт. ст. Причем гипоксия не зависит только от внутрипортального расположения островков, исследования по внедрению островковых клеток в более кровоснабжаемые зоны показали те же результаты [39, 40].

Имеются данные о положительном влиянии циклов блокирования и восстановления портального кровотока (ишемическое прекодиционирование), которое оказывает защитное воздействие и на печень, и на островки.

Иммуносупрессия при ТОК

Стандартные схемы иммуносупрессии, применявшиеся в конце 90-х, начале 2000-х годов, включали ингибиторы кальциневрина (циклоспорин и такролимус) и стероиды (преднизолон) в достаточно больших дозировках. Эти препараты позволяют провести эффективную профилактику отторжения, но обладают целым рядом побочных эффектов, в том числе токсичностью по отношению к островковым клеткам. Коллективом Шапиро была успешно применена схема бесстероидной иммуносупрессии со снижением дозы такролимуса благодаря применению индукции даклизумабом (антитела к рецепторам интерлейкина) и добавлению к протоколу лечения препарата сиролимус (ингибитора пролиферации).

Оценка эффективности ТОК

В настоящее время, по мере накопления опыта, намечалась смена парадигмы в оценке эффективности ТОК. Ранее целью ТОК являлись достижение и максимальная продолжительность инсулинонезависимости. В настоящее время ТОК рассматривается как лечение недостаточной функции β -клеток, независимо от этиологии, если у пациента наблюдается лабильное течение СД с проблемными гипогликемиями или гипергликемиями, несмотря на соблюдение оптимизированной медицинской помощи. Использование инсулина после трансплантации поджелудочной железы или островковых клеток не свидетельствует о потере функции трансплантата. Для поддержания гликемического уровня пациентам могут потребоваться низкие дозы экзогенного инсулина, нормализующие уровень глюкозы крови, который возможно достичь, когда часть потребности в инсулине обеспечивается эндогенно из функционирующего трансплантата.

Оптимальная функция трансплантата β -клеток определяется наличием почти нормального гликемического профиля, оцениваемого по уровню гликированного гемоглобина (HbA1c) 6,5% или менее, отсутствием тяжелой гипогликемии, отсутствием потребности в экзогенном инсулине и увеличением по сравнению с предтрансплантационным уровнем С-пептида.

Хорошая функция трансплантата β -клеток заключается в снижении суточной потребности в инсулине на 50% (должна составлять $<0,5$ ЕД на кг массы тела в сутки) при условии адекватного контроля гликемии ($HbA_{1c} < 7\%$) и увеличении по сравнению с предтрансплантационными показателями уровня С-пептида (должно быть не менее $0,5$ нг/мл).

Пограничная функция трансплантата β -клеток определяется неспособностью достичь целевого уровня HbA_{1c} менее $7,0\%$, возникновением любой тяжелой гипогликемии или менее чем на 50% снижением потребности в инсулине, несмотря на увеличение по сравнению с предтрансплантационным уровнем С-пептида.

Если до трансплантации было документально подтверждено снижение осведомленности о гипогликемии, наличие частых тяжелых гипогликемий или выраженной лабильности гликемии, которые после трансплантации улучшились, тогда целесообразно считать, что трансплантат β -клеток оказывает клиническое воздействие. Клинически преимущества поддержания и контроля функции трансплантата β -клеток могут перевешивать риски иммуносупрессии.

При отсутствии доказательств клинического улучшения, даже при повышении количественного уровня С-пептида после операции, пограничный и недостаточный β -клеточный трансплантат считаются клинически не успешными.

В настоящее время в мире накоплен опыт более 60 000 трансплантаций ПЖ и 4000 ТОК. Сравнительные характеристики процедур представлены в таблице.

Таблица

Сравнительные характеристики трансплантации поджелудочной железы и островков Лангерганса

Comparative characteristics of pancreas and Islets transplantation

Обобщенный опыт	Трансплантация поджелудочной железы	Трансплантация островковых клеток
	Более 60 000	Более 4000
Инсулинонезависимость		
1 год	90%	60–80%
5 лет	70%	25–50%
Функция (С-пептид 5 лет)	70%	70%
Лучшие варианты сочетания	SPK > PAK > PTA	SIK, IAK, ITA equivalent
Характер операции	Обширная лапаротомия	Интервенционная радиология
Осложнения	Тяжелые	Редко
Летальность	4–6%	Отсутствуют

Таким образом, технология ТОК при тщательном соблюдении протокола обладает хорошей эффективностью для коррекции инсулинозависимых нарушений углеводного обмена, профилактики тяжелых гипогликемий и практически не уступает по эффективности трансплантации целого органа при большей безопасности и доступности.

Панкреатогенный сахарный диабет

После критического уменьшения массы паренхимы поджелудочной железы развивается панкреатогенный сахарный диабет (ПСД), имеющий отличия от СД1. Причинами потери критической массы островков могут быть тотальная панкреатэктомия, панкреонекроз, хронические фиброзирующие заболевания, атрофия железы вследствие хронического воспаления, опухоли.

Особенности ПСД определяются отсутствием функции не только β -клеток, но и остальных эндокринных клеток поджелудочной железы. В результате дефицита панкреатического полипептида наблюдается печеночная инсулинорезистентность и повышение продукции глюкозы печенью. Однако в условиях эндогенной гиперинсулинемии повышается чувствительность периферических тканей к инсулину, что способствует снижению уровня глюкозы крови. Отсутствие секреции глюкагона и нарушение секреции кишечных инкретинов также снижают ее уровень, повышая риск развития гипогликемических состояний [41]. Гипогликемические состояния наблюдаются у 79% пациентов, а тяжелые гипогликемии с потерей сознания – у 41% [42].

Несмотря на редкое развитие кетоацидоза и умеренную гипергликемию, пациенты с ПСД подвержены лабильному течению с высокой вариабельностью гликемии и повторными тяжелыми гипогликемиями. Частота хронических микро- и макрососудистых осложнений одинакова при СД 1-го типа и ПСД.

Один из сдерживающих факторов при планировании панкреатэктомии – это сомнения в комплаентности пациента и приверженности его к последующему пожизненному лечению ПСД.

Ауто трансплантация островков после тотальной панкреатэктомии

В настоящее время процедура ТОК в силу своей безопасности может рассматриваться как инструмент коррекции нарушений углеводного обмена при планировании операций, связанных с тотальным удалением поджелудочной железы (панкреатэктомией).

Панкреатэктомия показана пациентам в связи с необратимыми распространенными заболеваниями поджелудочной железы. Опубликованы данные о применении ауто-ТОК после удаления поджелудочной железы по поводу доброкачественных опухолей, травмы, артериовенозных мальформаций. Возмож-

ность ауто-ТОК при протоковой аденокарциноме и протоковых папиллярных муцинозных опухолях в настоящее время является спорной и требует дальнейшего изучения [43].

Аутотрансплантация клеток островкового аппарата при хроническом болевом панкреатите

Технология лечения хронического болевого панкреатита путем тотальной панкреатэктомии с последующей ауто-ТОК активно развивается. При аутотрансплантации отсутствует необходимость применения протокола иммуносупрессии, что снимает негативные последствия иммуносупрессивной терапии после ТОК.

Выполненная впервые в 1977 году Sutherland et al. (Университет Миннесоты, США) панкреатэктомия с аутотрансплантацией островковых клеток позволила пациенту избавиться от болей и находиться в состоянии эугликемии в течение 6 лет, после чего он умер от причин, не связанных с основным заболеванием. Такой результат вызвал большой интерес в мире, и к настоящему времени совокупный опыт составляет более тысячи операций [44]. Основной контингент пациентов для процедуры TRIAT – лица с хроническим болевым панкреатитом, нуждающиеся в постоянном обезболивании.

Распространенность хронического панкреатита (ХП) достаточно велика. Ежегодно в США, в зависимости от региона, выявляется 4–12 новых случаев на 100 000 населения. В европейских странах частота хронического панкреатита колеблется от 4 до 40 случаев на 100 000 населения [45–47]. В России заболеваемость хроническим панкреатитом составляет до 30 новых случаев на 100 000 человек [48].

Идиопатический панкреатит является вторым по частоте и обусловлен в основном генетическими причинами – ассоциирован с мутациями в генах PRSS1, CFTR, SPINK1 и CTRC [49, 50].

Наиболее выраженное клиническое проявление ХП – постоянная или перемежающаяся боль в верхних отделах живота, которая наблюдается у 85–90% пациентов и приводит к значительному снижению качества жизни, вплоть до постоянного назначения наркотических препаратов [43, 51, 52].

При консервативном ведении пациентов с ХП препаратами выбора являются анальгетики, преимущественно опиоидного ряда. Они хорошо подавляют боль, но вызывают зависимость, а при длительном приеме приводят к развитию множества тяжелых побочных эффектов. В США, где терапия опиоидами наиболее широко распространена, ежегодно регистрируется 26 000 случаев смерти от последствий употребления опиоидов, назначенных врачами [53].

Тотальная панкреатэктомия с аутотрансплантацией островков поджелудочной железы наиболее эффективна у больных с нерасширенным протоком

поджелудочной железы и у пациентов с наследственным панкреатитом [54].

Большинство исследователей солидарны в том, что при наличии показаний операция должна быть выполнена как можно раньше. Предшествующие дренирующие операции на поджелудочной железе и длительное течение панкреатита значительно влияют на получаемую дозу и качество островковых клеток [55].

В основе указанного метода лечения заложено тотальное удаление поджелудочной железы как источника стойкого болевого синдрома с последующей аутотрансплантацией островков, чаще всего в воротную вену [56]. Количество подобных оперативных вмешательств в последнее время имеет стойкую тенденцию к увеличению [57–59]. Абсолютное большинство центров демонстрируют нулевую летальность после операции, при общем анализе она не превышает 1% [60, 61]. Результаты подобных вмешательств оцениваются на основании изменения качества жизни: исчезновения болевого синдрома и снижения потребности в опиоидах, профилактике гипогликемий. Достижение инсулинонезависимости не является самоцелью [62].

Число пациентов, избавившихся от наркотической зависимости после панкреатэктомии с аутотрансплантацией островков, варьирует от 35 до 100% (в среднем выше 60%) в период наблюдения 12–24 месяца. Остальные пациенты отмечали значительное снижение дозы опиоидов и переход с ежедневного приема обезболивающих на эпизодическое. Результаты проведенного анализа шкалы боли показали изменение значения с 60–100 (из 100) баллов до 8–20 в течение 1 года. Этот эффект может сохраняться длительное время. Примерно 73% пациентов сохраняют независимость от анальгетиков более 5 лет [60].

Несмотря на то что независимость от инсулина не бывает длительно устойчивой, у 15–41% пациентов эугликемия продолжается в течение 6–12 месяцев.

В настоящее время считается, что операция показана пациентам, которые удовлетворяют следующим пяти критериям [61, 62].

1. Хронический панкреатит с болевым синдромом продолжительностью более 6 месяцев при наличии одного из следующих признаков:

- наличие кальцинатов поджелудочной железы при КТ;
- не менее двух из перечисленных далее признаков: 4 и более критерия из 9 по данным эндоскопической ультрасонографии; изменения протокового аппарата и паренхимы поджелудочной железы при МРХПГ; изменения в эндоскопическом тесте функции поджелудочной железы (пиковое значение $\text{Hco}_2 \leq 80 \text{ mM}$);
- диагноз хронического панкреатита, подтвержденный патогистологическим исследованием;

- соответствующий анамнез и документально подтвержденный наследственный панкреатит (мутация гена PRSS1)
- или
- наличие рецидивирующих приступов острого панкреатита в анамнезе (более одного эпизода приступа характерных болей в сочетании с изменениями при инструментальных исследованиях и/или трехкратным и более повышением сывороточной амилазы или липазы).
2. Один из следующих признаков:
- ежедневная потребность в наркотических анальгетиках;
 - снижение качества жизни, связанное с болевым синдромом (невозможность посещать учебное заведение, неоднократные госпитализации, невозможность совершать деятельность, соответствующую возрасту).
3. Подтвержденный в настоящее время или не вылеченный панкреатит без явной причины.
4. Отсутствие эффекта от медикаментозной терапии и эндоскопических методик лечения.
5. Адекватное функционирование островков (отсутствие диабета или положительный С-пептид).

Пациентам с СД на фоне отрицательного С-пептида, удовлетворяющим критериям 1–4, показано выполнение тотальной панкреатэктомии без ауто-трансплантации.

Относительными противопоказаниями считаются [57]:

- существующий СД 1-го типа или ПСД;
- стеатогепатит;
- тромбоз воротной вены;
- портальная гипертензия;
- наличие продольной панкреатикоеюностомии в анамнезе;
- висцеральная гиперальгезия;
- психологическая дезадаптация.

При оценке кандидата для процедуры панкреатэктомии с ауто-трансплантацией островков необходимо учитывать, что возрастные изменения, прием алкоголя, курение, диабет и ожирение могут вызывать жировое перерождение и фиброз поджелудочной железы в сочетании с болевым синдромом под маской хронического панкреатита [63]. При этом длительный прием наркотических анальгетиков может привести к функциональным изменениям кишечника и ЦНС, которые трудно поддаются диагностике и лечению, но могут оказать влияние на результаты оперативного вмешательства [64, 65]. Доказано, что отдаленные результаты хирургического лечения пациентов с наследственным хроническим панкреатитом достоверно лучше, чем у больных, злоупотреблявших алкоголем [74, 75].

Важным фактором предоперационного обследования является оценка эндокринной функции подже-

лудочной железы даже при отсутствии подтвержденного диабета. Тест на толерантность к глюкозе легко воспроизводим, но его результаты не коррелируют с объемом непораженного островкового аппарата [68]. Более эффективным для косвенной оценки объема функционирующего островкового аппарата является метод оценки секреции инсулина и С-пептида, индуцированного аргинином [69].

Лечение пациента с хроническим панкреатитом является очень дорогостоящим [70]. При этом проведенные на территории Великобритании исследования показали экономическую эффективность тотальной панкреатэктомии с трансплантацией островкового аппарата в сравнении с традиционными методами лечения хронического панкреатита [71].

Мультицентровый клинический протокол трансплантации островков «07», принятый в настоящее время, включает в себя следующие компоненты, необходимые в послеоперационном периоде после ауто-трансплантации [72]:

- тимоглобулин;
- ингибитор TNF-альфа (этанерцепт);
- гепаринизация;
- инсулинотерапия в течение 8 недель периоперационного периода;
- такролимус и сиролимус как в эдмонтонском протоколе [73–75].

Результатом проведения панкреатэктомии с ауто-трансплантацией островков является улучшение качества жизни пациентов. Большинство пациентов избавляется от выраженного болевого синдрома. По данным разных авторов, до 79% пациентов после операции не нуждаются в применении наркотических анальгетиков [62, 76]. Кроме того, в отдаленном послеоперационном периоде в значительном числе случаев пациентам не требуется инсулинотерапия [77, 78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сахарный диабет 1-го типа и панкреатогенный сахарный диабет являются огромной социальной проблемой во всем мире. Единственно доступный массовый способ контроля гликемии – это введение экзогенного инсулина. Совершенствование инсулинотерапии, создание новых удобных во введении и генетически «близких» инсулинов, помповая терапия остаются лишь симптоматическим лечением, не лишенным определенных недостатков, таких как развитие инвалидизирующих осложнений и фатальных гипогликемий.

Трансплантационные технологии для лечения тяжелых инсулинозависимых нарушений углеводного обмена перспективны в связи с высокой эффективностью и безопасностью. Преимуществом использования трансплантационных технологий является наличие тонкой биологической обратной связи

уровня глюкозы сыворотки и выработки инсулина β -клетками.

Общий дефицит донорских органов и недостаточное качество получаемых поджелудочных желез для трансплантации диктуют необходимость развития технологии ТОК. Анализ трансплантации целого органа и взвеси островков показывает сходную эффективность при большей безопасности процедуры ТОК. Первые достижения в области биоактивной инкапсуляции островков дают процедуре значительные преимущества, связанные с отсутствием иммуносупрессивной терапии. Инкапсуляция также позволяет добиться длительной функциональной активности островков.

В Российской Федерации необходимы действия для юридической легитимизации процедуры ТОК (введение островков Лангерганса в перечень органов и тканей для трансплантации).

Технологии алло- и ауто трансплантации клеточных культур островков поджелудочной железы схожи и являются производными одного протокола. Целесообразно создание специализированных и сертифицированных лабораторий для выделения и хранения островков. Технические особенности выполнения панкреатэктомии не представляют трудностей для врачей специализированного панкреатологического центра. Внедрение протокола панкреатэктомии с ауто трансплантацией островков позволит улучшить результаты лечения большому контингенту больных с хроническим панкреатитом.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РФ (государственное задание по теме «Создание технологии инкапсуляции островков поджелудочной железы для компенсации абсолютных инсулин-дефицитных состояний»).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Шестакова МВ, Викулова ОК, Железнякова АВ, Исаков МА, Дедов ИИ. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: что изменилось за последнее десятилетие? *Терапевтический архив*. 2019; 10: 4–13. Shestakova MV, Vikulova OK, Zheleznyakova AV, Isakov MA, Dedov II. Epidemiologiya sakharnogo diabeta v Rossiyskoy Federatsii: chto izmenilos' za poslednee desyatiletie? *Terapevticheskiy arkhiv*. 2019; 10: 4–13.
2. Patterson C, Guariguata L, Dahlquist G et al. Diabetes in the young – a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 diabetes. *Diabetes research and clinical practice*. 2014; 103: 161–175.
3. Дедов ИИ, Шестакова МВ, Викулова ОК. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным Федерального регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет*. 2017; 20 (1): 13–41. Dedov II, Shestakova MV, Vikulova OK. Epidemiologiya sakharnogo diabeta v Rossiyskoy Federatsii: kliniko-statisticheskiy analiz po dannym Federal'nogo registra sakharnogo diabeta. *Sakharnyy diabet*. 2017; 20 (1): 13–41.
4. Дедов ИИ, Омеляновский ВВ, Шестакова МВ и др. Сахарный диабет как экономическая проблема в Российской Федерации. *Сахарный диабет*. 2016; 19 (1): 30–43. Dedov II, Omel'yanovskiy VV, Shestakova MV i dr. Sakharnyy diabet kak ekonomicheskaya problema v Rossiyskoy Federatsii. *Sakharnyy diabet*. 2016; 19 (1): 30–43.
5. Aghazadeh Y, Nostro MC. Cell Therapy for Type 1 Diabetes: Current and Future Strategies. *Curr Diab Rep*. 2017; 17: 37.
6. Gruessner AC, Gruessner RW. Pancreas transplantation for patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus in the United States: a registry report. *Gastroenterol Clin North Am*. 2018; 47 (2): 417–441.
7. Шумаков ВИ, Игнатенко СН, Петров ГН и др. Трансплантация почки и поджелудочной железы больным инсулинозависимым сахарным диабетом. *Хирургия*. 1991; 7: 3–8. Shumakov VI, Ignatenko SN, Petrov GN i dr. Transplantatsiya pochki i podzheludochnoy zhelezy bol'nym insulinozavisimym sakharnym diabedom. *Khirurgiya*. 1991; 7: 3–8.
8. Готье СВ. Трансплантация дистального фрагмента поджелудочной железы от родственного донора. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2005; 3: 30–31. Gautier SV. Transplantatsiya distal'nogo fragmenta podzheludochnoy zhelezy ot rodstvennogo donora. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2005; 3: 30–31.
9. Готье СВ, Азуманов СВ. Трансплантация поджелудочной железы в лечении пациентов с сахарным диабетом 1-го типа: технические аспекты ее выполнения. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2017; 19 (3): 70–80. Gautier SV, Azumanov SV. Transplantatsiya podzheludochnoy zhelezy v lechenii patsientov s sakharnym diabedom 1-go tipa: tekhnicheskie aspekty ee vypolneniya. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2017; 19 (3): 70–80.
10. Kandaswamy R, Stock PG, Gustafson SK et al. OPTN/SRTR 2016 Annual data report: Pancreas. *Am J Transplant*. 2018; 18 (Suppl. 1): 114–171.
11. Gruessner AC, Laftavi MR, Pankewycz O et al. Simultaneous pancreas and kidney transplantation – is it a treatment option for patients with type 2 diabetes mellitus? An analysis of the international pancreas transplant registry. *Curr Diab Rep*. 2017; 17 (6): 44.
12. Dean PG, Kukla A, Stegall MD et al. Pancreas transplantation. *BMJ*. 2017; 357: 1321.
13. Gruessner AC, Gruessner RW. Pancreas transplantation for patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus in the United States: a registry report. *Gastroenterol Clin North Am*. 2018; 47 (2): 417–441.
14. Lombardo C, Perrone VG, Amorese G et al. Update on pancreatic transplantation on the management of diabetes. *Minerva Med*. 2017; 108 (5): 405–418.

15. Dholakia S, Mittal S, Quiroga I et al. Pancreas transplantation: past, present, future. *Am J Med.* 2016; 129 (7): 667–673.
16. Niederhaus SV. Pancreas transplant alone. *Curr Opin Organ Transpl.* 2015; 20 (1): 115–120.
17. Drewitz P, Loss M, Loss J, Apfelbacher CJ. Predictors of non-transplantation of adult donor organs – an observational study using routine data from Eurotransplant. *BMC Health Services Research.* 2014; 14: 584.
18. Antonioli B, Galuzzi M. Islet transplantation 30 years after the first transplants. *Semin Pediatr Surg.* 2014; 23 (2): 83–90.
19. Shapiro AJ, Lakey JT et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343 (4): 230–238.
20. Hering BJ, Clarke WR, Bridges ND et al. Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care.* 2016; 39: 1230–1240.
21. Gill RG, Bishop NH. Clinical islet transplantation: where immunity and metabolism intersect? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012; 19 (4): 249–254.
22. Яковец НМ, Назарова ЕА, Кривенко СИ и др. Первый опыт выделения островковых комплексов поджелудочной железы человека для аллогенной трансплантации при сахарном диабете 1-го типа. *Медицинский журнал.* 2013; 4: 119–122. Yakovets NM, Nazarova EA, Krivenko SI i dr. Pervyy opyt vydeleniya ostrovkovykh kompleksov podzheludochnoy zhelezy cheloveka dlya allogennoy transplantatsii pri sakharanom diabete 1-go tipa. *Meditsinskiy zhurnal.* 2013; 4: 119–122.
23. Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro SP et al. Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Arch Endocrinol Metab.* 2015; 59 (2): 161–70.
24. Gamble A, Pepper AR, Bruni A, Shapiro AM. The journey of islet cell transplantation and future development. *Islets.* 2018; 10 (2): 80–94.
25. Liu Y, Song B, Ran X et al. Molecular imaging of pancreatic islet transplantation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2014; 122 (2): 79–86.
26. Eriksson O, Selvaraju R, Eich T et al. Positron emission tomography to assess the outcome of intraportal islet transplantation. *Diabetes.* 2016; 65 (9): 2482–2489.
27. Delaune V, Berney T, Lacotte S, Toso C. Intraportal islet transplantation: the impact of the liver microenvironment. *Transpl Int.* 2017; 30 (3): 227–238.
28. Citro A, Cantarelli E, Pellegrini S et al. Anti-Inflammatory Strategies in Intrahepatic Islet Transplantation. *Transplantation.* 2018; 2 (240): 102.
29. Ramnath RD, Maillard E, Jones K et al. In vitro assessment of human islet vulnerability to instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) and its use to demonstrate a beneficial effect of tissue culture. *Cell Transplant.* 2015; 24 (12): 2505–2512.
30. Citro A, Cantarelli E, Piemonti L. Anti-inflammatory strategies to enhance islet engraftment and survival. *Curr Diab Rep.* 2013; 13 (5): 733–744.
31. Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA et al. Evidence for autologous islet transplantation. *Am J Transplant.* 2014; 14: 428–437.
32. Wang S, Zhao Z, Cong Z, Suo G. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is activated in an instant blood-mediated inflammatory reaction after intraportal islet transplant. *Exp Clin Transplant.* 2014; 12 (1): 62–66.
33. Abecassis A, Schuster R, Shahaf G et al. α 1-antitrypsin increases interleukin-1 receptor antagonist production during pancreatic islet graft transplantation. *Cell Mol Immunol.* 2014; 11: 377–386.
34. Markmann JF. Isolated pancreatic islet transplantation: a coming of age. *Am J Transplant.* 2016; 16 (2): 381–382.
35. Xiao X, Fischbach S, Song Z et al. Transient suppression of TGF β receptor signaling facilitates human islet transplantation. *Endocrinology.* 2016; 157 (4): 1348–1356.
36. Itoh T, Nitta T, Nishinakamura H, Kojima D et al. HMGB1-Mediated Early Loss of Transplanted Islets Is Prevented by Anti-IL-6R Antibody in Mice. *Pancreas.* 2015; 44: 166–171.
37. Monti P, Vignali D, Piemonti L. Monitoring inflammation, humoral and cell-mediated immunity in pancreas and islet transplants. *Curr Diabetes Rev.* 2015; 11 (3): 135–143.
38. Balamurugan AN, Naziruddin B, Lockridge A et al. Islet product characteristics and factors related to successful human islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999–2010. *Am J Transplant.* 2014; 14: 2595–2606.
39. Cantarelli E, Citro A, Pellegrini S et al. Transplant Site Influences the Immune Response After Islet Transplantation: Bone Marrow Versus Liver. *Transplantation.* 2017; 101: 1046–1055.
40. Phelps EA, Headen DM, Taylor WR et al. Vasculogenic bio-synthetic hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials.* 2013; 34 (19): 4602–4611.
41. Scavini M, Dudnani E, Pasquale V et al. Diabetes after pancreatic surgery: novel issues. *Curr Diab Rep.* 15 (4) 2015.
42. Parsaik A, Murad M, Sathananthan F et al. Metabolic and target organ outcomes after total pancreatectomy: Mayo Clinic experience and meta-analysis of the literature. *Clin Endocrinol.* 2010 Dec; 73 (6): 723–731.
43. Renaud F, Chetboun M, Thevenet J. Safety of Islet Autotransplantation After Pancreatectomy for Adenocarcinoma. *Transplantation.* 2019 Jan; 103 (1): 177–181.
44. Trikudanathan G, Navaneethan U, Vege SS. Modern treatment of patients with chronic pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2012; 41 (1): 63–76.
45. Chinnakotla S, Beilman GJ, Dunn TB et al. Factors predicting outcomes after a total pancreatectomy and islet autotransplantation. Lessons learned from over 500 cases. *Ann Surg.* 2015; 262 (4): 610–622.
46. Bellin MD, Freeman ML, Gelrud A et al. Total pancreatectomy and islet autotransplantation in chronic pancreatitis: recommendations from Pancreas Fest. *Pancreatology.* 2014; 14 (1): 27–35.
47. Yadav D, Timmons L, Benson JT et al. Incidence, prevalence and survival of chronic pancreatitis: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2011; 106: 2192–2199.

48. Загайнов ВЕ, Евтихов РМ и др. Хронический осложненный панкреатит. 2012. *Zagaynov VE, Evtikhov RM i dr. Khronicheskiy oslozhnennyy pankreatit*. 2012.
49. Muniraj T, Aslanian HR, Farrell J et al. Chronic pancreatitis, a comprehensive review and update. Part I: epidemiology, etiology, risk factors, genetics, pathophysiology, and clinical features. *Disease-a-month*. 2014; 60: 530–550.
50. Braganza JM, Lee SH, McCloy RF, McMahon MJ. Chronic pancreatitis. *Lancet*. 2011; 377 (9772): 1184–1197.
51. Mullady DK, Yadav D, Amann ST, O'Connell MR, Barmada MM, Elta GH et al. Type of pain, pain-associated complications, quality of life, disability and resource utilization in chronic pancreatitis: a prospective cohort study. *Gut*. 2011; 60: 77–84.
52. Blair R, Burkhart K, Hirose M et al. Laparoscopic total pancreatectomy with islet autotransplantation for chronic pancreatitis. *J Vis Surg*. 2016; 2: 121–127.
53. Paisley P, Kinsella J. Pharmacological management of pain in chronic pancreatitis. *Scottish Medical Journal*. 2014; 59 (1): 71–79.
54. Bellin MD, Gelrud A, Arreaza-Rubin G et al. Total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Ann Surg*. 2015; 261 (1): 21–29.
55. Takita M, Lara LF, Naziruddin B et al. Effect of the duration of chronic pancreatitis on pancreas islet yield and metabolic outcome following islet autotransplantation. *J Gastrointest Surg*. 2015; 19: 1236–1246.
56. Bellin MD, Balamurugan AN, Pruett TL et al. No islets left behind: islet autotransplantation for surgery-induced diabetes. *Curr Diab Rep*. 2012; 12: 580–586.
57. Witkowski P, Savari O, Matthews JB. Islet autotransplantation and total pancreatectomy. *Adv Surg*. 2014; 48: 223–233.
58. Savari O, Golab K, Wang LJ et al. Preservation of beta cell function after pancreatic islet autotransplantation: University of Chicago experience. *Am Surg*. 2015; 81: 421–427.
59. Ali NS, Walsh RM. Total pancreatectomy with islet cell autotransplantation: update and outcomes from major centers. Current Treat Options. *Gastroenterology*. 2014; 12: 350–358.
60. Fan CJ, Hirose K, Walsh CM et al. Laparoscopic total pancreatectomy with islet autotransplantation and intraoperative islet separation as a treatment for patients with chronic pancreatitis. *JAMA Surg*. 2017; 152: 550–556.
61. Zureikat AH, Nguyen T, Boone BA et al. Robotic total pancreatectomy with or without autologous islet cell transplantation: replication of an open technique through a minimal access approach. *Surg Endosc*. 2015; 29: 176–183.
62. Sutherland DE, Radosevich DM, Bellin MD et al. Total pancreatectomy and islet autotransplantation for chronic pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 2012; 214: 409–424.
63. Sato T, Ito K, Tamada T et al. Age-related changes in normal adult pancreas: MR imaging evaluation. *Eur J Radiol*. 2012; 81: 2093–2098.
64. Pasricha PJ. Unraveling the mystery of pain in chronic pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9: 140–151.
65. Woolf CJ. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*. 2011; 152: 2–15.
66. Chinnakotla S, Radosevich DM, Dunn TB et al. Long-term outcomes of total pancreatectomy and islet autotransplantation for hereditary/genetic pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 2014; 218: 530–543.
67. Dunderdale J, McAuliffe JC, McNeal SF et al. Should pancreatectomy with islet cell autotransplantation in patients with chronic alcoholic pancreatitis be abandoned? *J Am Coll Surg*. 2013; 216: 591–596.
68. Lundberg R, Beilman GJ, Dunn TB et al. Metabolic assessment prior to total pancreatectomy and islet autotransplant: utility, limitations and potential. *Am J Transplant*. 2013; 13: 2664–2671.
69. Robertson RP, Bogachus LD, Oseid E et al. Assessment of beta-cell mass and alpha- and beta-cell survival and function by arginine stimulation in human autologous islet recipients. *Diabetes*. 2015; 64 (2): 565–572.
70. Hall TC, Garcea G, Webb MA et al. The socio-economic impact of chronic pancreatitis: a systematic review. *J Eval Clin Pract*. 2014; 20: 203–207.
71. Garcea G, Pollard CA, Illouz S, Webb M, Metcalfe MS, Dennison AR. Patient satisfaction and cost-effectiveness following total pancreatectomy with islet cell transplantation for chronic pancreatitis. *Pancreas*. 2013; 42: 322–328.
72. Rickels MR, Liu C, Shlansky-Goldberg RD et al. Improvement in beta-cell secretory capacity after human islet transplantation according to the CIT07 protocol. *Diabetes*. 2013; 62: 2890–2897.
73. Johannesson B et al. Toward beta cell replacement for diabetes. *The EMBO Journal*. 2015; 34 (7): 841–855.
74. Meier RPH, Andrey DO, Sun P et al. Pancreas preservation fluid microbial contamination is associated with poor islet isolation outcomes – a multi-centre cohort study. *Transpl Int*. 2018.
75. Desai CS, Khalid KM, Ma X et al. Effect of liver histopathology on islet cell engraftment in the model mimicking autologous islet cell transplantation. *Islets*. 2017; 9 (6): 140–149.
76. Wilson GC, Sutton JM, Salehi M et al. Surgical outcomes after total pancreatectomy and islet cell autotransplantation in pediatric patients. *Surgery*. 2013; 154: 777–783.
77. Ahmad SA, Lowy AM, Wray CJ et al. Factors associated with insulin and narcotic independence after islet autotransplantation in patients with severe chronic pancreatitis. *J Am Coll Surg*. 2005; 201: 680–687.
78. Solomina J, Golebiewska J, Kijeka MR et al. Pain control, glucose control, and quality of life in patients with chronic pancreatitis after total pancreatectomy with islet autotransplantation: a preliminary report. *Transplantation Proceedings*. 2017; 49: 2333–2339.

Статья поступила в редакцию 16.01.2020 г.
The article was submitted to the journal on 16.01.2020

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-196-208

ФИБРИН – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ СОСУДИСТОЙ ИНЖЕНЕРИИ

В.Г. Матвеева, М.Ю. Ханова, Л.В. Антонова, Л.С. Барбараши

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Российская федерация

В данном обзоре свойства фибрина рассматриваются с позиции возможности использования в тканевой сосудистой инженерии (ТСИ). Аутологичный фибрин является одним из самых доступных биополимеров, поскольку с помощью несложных методик может быть получен из периферической крови. В обзоре даны описание и сравнительная характеристика методов и подходов получения фибринового геля. Способности фибрина поддерживать адгезию и миграцию, служить биологической клеточной нишей, контролировать ангиогенез, накапливать и дозированно высвобождать факторы роста являются уникальными и крайне полезными в ТСИ. Огромный потенциал формования позволяет получать сложные трехмерные формы, использовать фибрин как самостоятельный каркас или в качестве модифицирующего покрытия/пропитки. Фибриновые гели способны к полной биодegradации с помощью фибринолиза, но этот процесс должен хорошо контролироваться и быть предсказуемым. В обзоре обсуждаются основные способы регуляции скорости фибринолиза, а также возможные побочные эффекты такого воздействия. Низкая механическая прочность является главным ограничением использования фибрина в качестве основного каркаса в сосудистых протезах. В работе представлены возможные варианты повышения прочностных свойств фибриновой матрицы и дана оценка их эффективности. С учетом всех уникальных свойств и особенностей фибрин вполне может стать основой для идеального полностью аутологичного тканеинженерного сосудистого протеза малого диаметра.

Ключевые слова: тканевая сосудистая инженерия, фибрин, клеточный носитель, биополимер, аутологичный тканеинженерный сосудистый протез, фибринолиз, механическая прочность, имплантация.

FIBRIN – A PROMISING MATERIAL FOR VASCULAR TISSUE ENGINEERING

V.G. Matveeva, M.U. Khanova, L.V. Antonova, L.S. Barbarash

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

This review looks at the use of fibrin in vascular tissue engineering (VTE). Autologous fibrin is one of the most affordable biopolymers because it can be obtained from peripheral blood by simple techniques. A description and comparative analysis of the methods and approaches for producing fibrin gel is provided. The ability of fibrin to promote cell attachment and migration, survival and angiogenesis, to accumulate growth factors and release them in a controlled manner, are unique and extremely useful in VTE. Fibrin gels can serve as a three-dimensional matrix molded in different sizes and shapes to be applied in a variety of ways, including as a scaffold, coating, or impregnation material. Fibrin's high porosity and biodegradability allows controllable release of growth factors, yet fibrinolysis must be tightly regulated to avoid side effects. We discuss the main methods of regulating the rate of fibrinolysis, as well as possible side effects of such exposure. Low mechanical strength is the main limitation in using fibrin as a scaffold for vascular tissue engineering. Possible options for increasing the strength properties of fibrin matrix and evaluating their effectiveness are presented. We propose that unique biocompatibility and ideal biodegradation profile of fibrin justify its use as a scaffold material for developing an ideal fully autologous small-diameter tissue-engineered vascular graft.

Keywords: vascular tissue engineering, fibrin, cell carrier, biopolymer, autologous tissue-engineered vascular graft, fibrinolysis, mechanical strength, implantation.

Для корреспонденции: Матвеева Вера Геннадьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, д. 6. Тел. (906) 927-66-01. E-mail: matveeva_vg@mail.ru

For correspondence: Matveeva Vera Gennadievna. Address: 6, Sosnoviy blv., Kemerovo, 650002, Russian Federation. Tel. (906) 927-66-01. E-mail: matveeva_vg@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Продолжается активный поиск идеального материала для тканевой сосудистой инженерии (ТСИ). Разработанные синтетические материалы, такие как дакрон или политетрафторэтилен (PTFE), полиэтилентерефталат (PET), с успехом используются в реконструкции сосудов большого диаметра, но малопригодны для создания протезов сосудов малого диаметра (менее 6 мм) по причине гипертрофии интимы и тромбоза вследствие неполной эндотелизации, низкой скорости кровотока и несовпадения комплаентности (диаметра сосуда и его адаптивных реакций на изменение артериального давления) [1]. Отсутствие эффективных протезов сосудов малого диаметра актуализирует поиск оригинальных стратегий, новых материалов и их модификаций.

Понимание значимости нормальных физиологических реакций сосудистой стенки в профилактике и борьбе с тромбозами, гиперплазией и воспалением сформировало целое направление в ТСИ, связанное с имитацией структуры и функции нативной артериальной стенки при разработке сосудистых протезов нового поколения. Среди наиболее перспективных подходов в ТСИ, связанных с максимальной имитацией внеклеточного матрикса (ВКМ) в сочетании с биологической функциональностью продукта, следует отметить заселение клетками биогелей и технологию биодеградируемых каркасов. В этих направлениях фибрин вызывает у исследователей особый интерес, поскольку он обладает набором уникальных характеристик, которые делают его практически идеальным природным биологическим материалом для ТСИ [2].

Фибрин формируется на конечном этапе коагуляционного каскада и представляет собой натуральную биодеградируемую матрицу. Биоматериалы на основе фибрина обладают идеальной биосовместимостью, имеют высокое сродство к различным биологическим поверхностям, контролируемой биодеградации посредством фибринолиза, при этом продукты биодеградации нетоксичны [3].

В настоящее время фибриновый гель активно используется в клинике для гемостатических целей, закрытия раневой поверхности и в качестве герметика. В ТИ ведутся поиски в области создания фибриновых матриксов в офтальмологии (восстановление склеры [4] и хрусталика [5]), в неврологии (восстановление нервных сплетений и периферических нервов [6]), в травматологии и ортопедии (восстановление хряща [7]), при создании искусственной кожи [8] и т. д. Будучи натуральным физиологическим каркасом, он поддерживает ангиогенез и репарацию тканей [9]. Волокна фибрина содержат сайты клеточной адгезии, которые создают платформу для адгезии, миграции и пролиферации клеток, условия для формирования

полноценной ткани [10]. Трехмерная пористая структура фибрина поддерживает миграцию клеток внутри каркаса и их жизнедеятельность благодаря диффузии питательных веществ и кислорода внутрь фибринового каркаса и удалению отработанных продуктов [11]. Фибрин является самым доступным из всех полимеров. Фибриновые гели достаточно просто и в короткие сроки могут быть получены из собственной крови пациентов. Сформированные на его основе аутологичные скаффолды не имеют риска переноса различных патогенов и запуска иммунной реакции организма на инородное тело. Далее более подробно будут освещены свойства и особенности фибрина, имеющие принципиальное значение для ТСИ.

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

Фибрин – продукт полимеризации фибриногена как конечный этап коагуляционного каскада. Фибриноген представляет собой гетеродимер гликопротеина, который состоит из 3 пар идентичных цепей (α , β и γ). На первом этапе под действием фермента тромбина образуются активные одиночные молекулы фибрин-мономера, способные к полимеризации и формированию нитей фибрина (рис. 1). Ионы кальция служат ключевыми кофакторами в ферментативном превращении фибриногена в фибрин. На этом этапе фибрин растворяется в 5М мочеvine, поэтому он получил название растворимого фибрина.

Одновременно тромбин активирует XIII фактор, который в присутствии ионов кальция (Ca^{2+}) образует латеральные ковалентные связи между D-доменами фибриновых мономеров. Латеральная агрегация фибриновых волокон приводит к их утолщению и повышению упруго-деформативных свойств [12]. Общие механические свойства фибрина определяются структурными особенностями на уровне молекул, отдельных волокон, а также разветвленности волокон в сети фибрина [13, 14]. Внесение XIII фактора в достаточной концентрации позволяет получить фибрин с хорошими биомеханическими свойствами [15, 16]. Высокая концентрация XIII также катализирует сшивание белков клеточной адгезии, что способствует повышению адгезионных свойств фибрина [17].

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕЦИПИТАТА ФИБРИНОГЕНА И ФИБРИНОВОГО ГЕЛЯ

Аутологичный преципитат фибриногена получают из плазмы крови с помощью физических и химических методов. Криопреципитация относится к физическим методам преципитации и описана во многих источниках. При этом протоколы сильно отличаются по времени и температуре заморозки, а также температуре и времени оттаивания, количеству циклов заморозки–оттаивания. Химические методы в

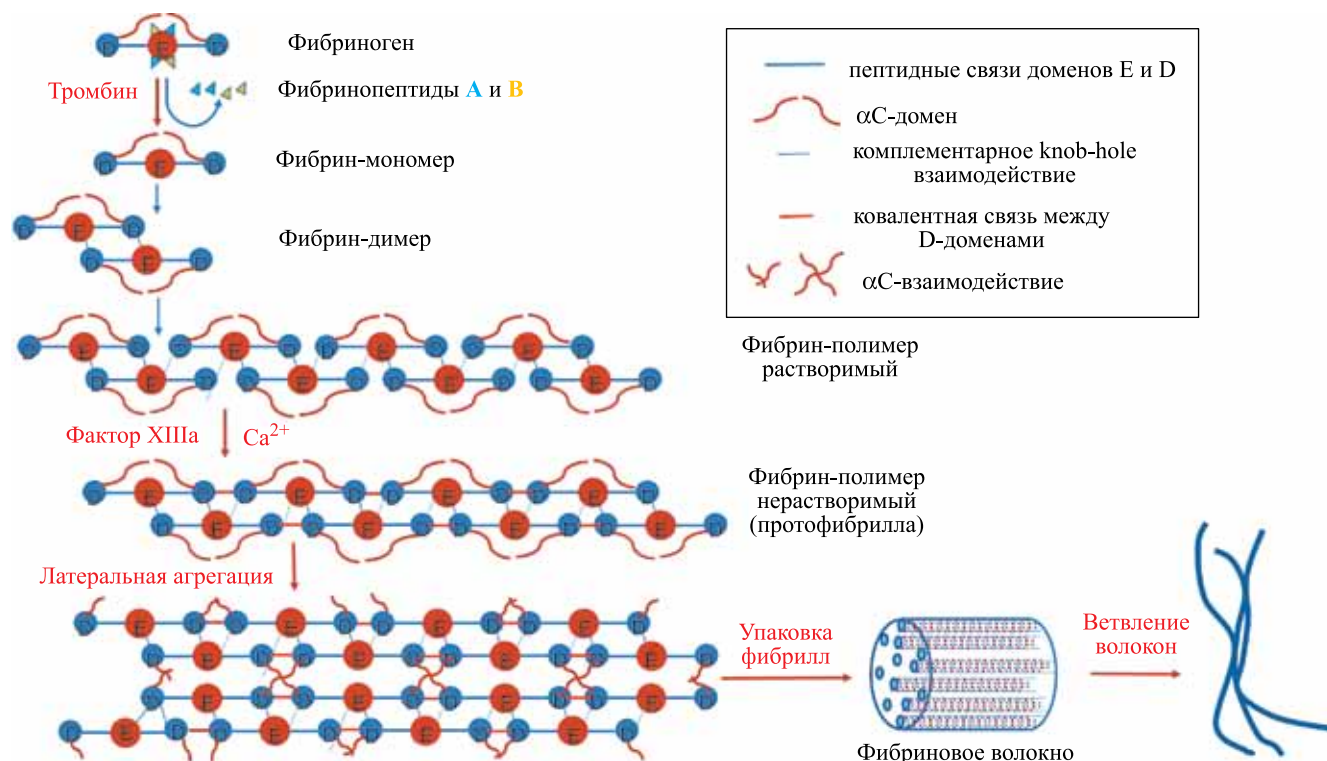


Рис. 1. Принципиальная схема полимеризации фибрина. Тромбин отщепляет от фибриногена фибринопептиды А и В, после чего открываются комплементарные участки на доменах E и D для взаимодействия knob-hole. На этом этапе образуются олигомеры, которые удлиняются и формируют двухцепочечные растворимые фибрин-полимеры. Под действием XIIIa фактора в присутствии ионов кальция образуются ковалентные связи между D-доменами смежных мономеров фибрина. Сначала попарно сшиваются γ-цепи, далее α-цепи. На этом этапе фибрин-полимер становится нерастворимым и приобретает механическую прочность. Далее двухцепочечные молекулы фибрина (протофибриллы) латерально агрегируют, образуя волокна, процесс усиливается за счет αC-взаимодействий D-доменов. Удлинение и утолщение фибриновых волокон сопровождается их разветвлением, в результате выстраивается трехмерная фибриновая сеть

Fig. 1. Schematic diagram of the fibrin polymerization. Thrombin cleaves fibrinopeptides A and B from fibrinogen, after which the complementary regions on domains E and D open for knob-hole interaction. At this stage, the oligomers lengthen and form two-stranded soluble fibrin polymers. XIIIa factor in the presence of calcium ions covalently cross-links the D domains of neighboring fibrin monomers. Factor XIIIa crosslinks or ligates γ-chains more rapidly than α-chains. At this stage, the fibrin polymer becomes insoluble and obtain mechanical strength. Further, two-stranded fibrin molecules (protofibrils) laterally aggregate to make fibers, the process is enhanced by αC-interactions of D-domains. Elongation and thickening of fibrin fibers occurs at the same time with branching, as a result a three-dimensional fibrin network is formed

основном включают преципитацию аммония сульфатом и этанолом, также используют их сочетание [18, 19]. Фавориты методов преципитации (этаноловая, аммония сульфат и криопреципитация), по данным различных источников, отличаются, поскольку критерии оценок различны. В одних случаях преимущество отдается этаноловому методу, поскольку в преципитате выше концентрация фибриногена и меньше время, затраченное на его получение [20]. В других случаях лидером называют криопреципитацию, поскольку при достаточно высокой концентрации фибриногена механические свойства полученного фибрина выше [21], что связывают с частичной денатурацией белков при добавлении этанола или аммония сульфата с дальнейшим формированием неполноценных связей между фибрин-мономерами и рыхлости фибринового сгустка. Поэтому в зави-

симости от конечной цели используют различные технологии получения преципитата фибриногена.

В большинстве исследований фибриновый гель получают из преципитата фибрина путем внесения аутологичного или коммерческого тромбина и CaCl₂ [22, 23]. Tomomi Hasegawa и коллегами разработана и представлена бестромбиновая технология получения фибрина из фибриногена [24]. В данном варианте используется полимеризующая смесь, которая в сравнении с тромбином обладает низкой тромбогенностью, а при сравнении с коммерческим тромбином не активирует иммунный ответ [25].

ЕСТЕСТВЕННАЯ И КОНТРОЛИРУЕМАЯ БИОДЕГРАДАЦИЯ ФИБРИНА

Фибриновые гели обладают преимуществом полностью биodeградируемого полимера с возможнос-

тью регуляции скорости деградации. В нормальной биологической среде нити фибрина деградируют с помощью фибринолиза. В процессе фибринолиза неактивный плазминоген под действием внешней (тканевой активатор плазминогена (tPA) и активатор плазминогена типа урокиназы (uPA) и внутренней (XIIa фактор, калликреин) ферментативной активации превращается в протеолитически активный фермент плазмин [26] (рис. 2). Плазмин асимметрично расщепляет фибрин на отдельные фрагменты: «ранние» крупномолекулярные продукты фибринолиза фрагменты X и Y и «поздние» фрагменты D и E. Фибринолиз вызывает деградацию фибринового геля с формированием нетоксичных продуктов, однако внутренняя нестабильность фибрина рассматривается как основная трудность при его использовании в качестве основного каркасного материала или покрытия ТИ конструкций [27]. Помимо плазмينا в деградации фибрина участвуют различные протеазы, в частности, важная роль в этом процессе отводится матриксным металлопротеиназам мембранного типа (MT-MMP) [28].

С возможностью регуляции скорости фибринолиза напрямую связан успех имплантации ТИС. В естественных условиях фибрин разлагается в течение нескольких дней или недель, при этом скорость фибринолиза зависит от структуры фибрина, особенностей сшивки и содержания ингибиторов

протеаз [29]. Долгосрочная стабильность и механическая целостность матрицы играют важную роль для клеток, которым необходимо определенное время и достаточная прочность каркаса, чтобы ремоделировать матрицу. Фибриновые матрицы постепенно заменяются зрелым коллагеном, который синтезируют клетки, заселившие толщу и поверхность матрицы (фибробласты, ЭК/ЭПК и ГМК) [27, 30].

Для контроля над процессом деградации фибрина используют два подхода: дополнительная поперечная сшивка нитей фибрина и применение ингибиторов фибринолиза [31]. Дополнительная поперечная сшивка нитей фибрина достигается с помощью XIII фактора, который кроме латерального ковалентного связывания между γ - и α -цепями фибрина осуществляет перекрестное сшивание с фибрином таких молекул как $\alpha 2$ -антиплазмин, TAFI (активируемый тромбином ингибитор фибринолиза), PAI-2 (ингибитор активации плазминогена 2 типа), что стабилизирует фибриновую сеть и повышает устойчивость сшитого фибрина к фибринолизу [32, 33].

При создании фибриновых покрытий и каркасов на основе фибрина в качестве протеолитического ингибитора в основном используют апротинин, а в качестве фибринолитического ингибитора ϵ -аминокапроновую кислоту (ЭАКК). Вопрос влияния данных ингибиторов на жизнедеятельность, пролиферативную и функциональную активность

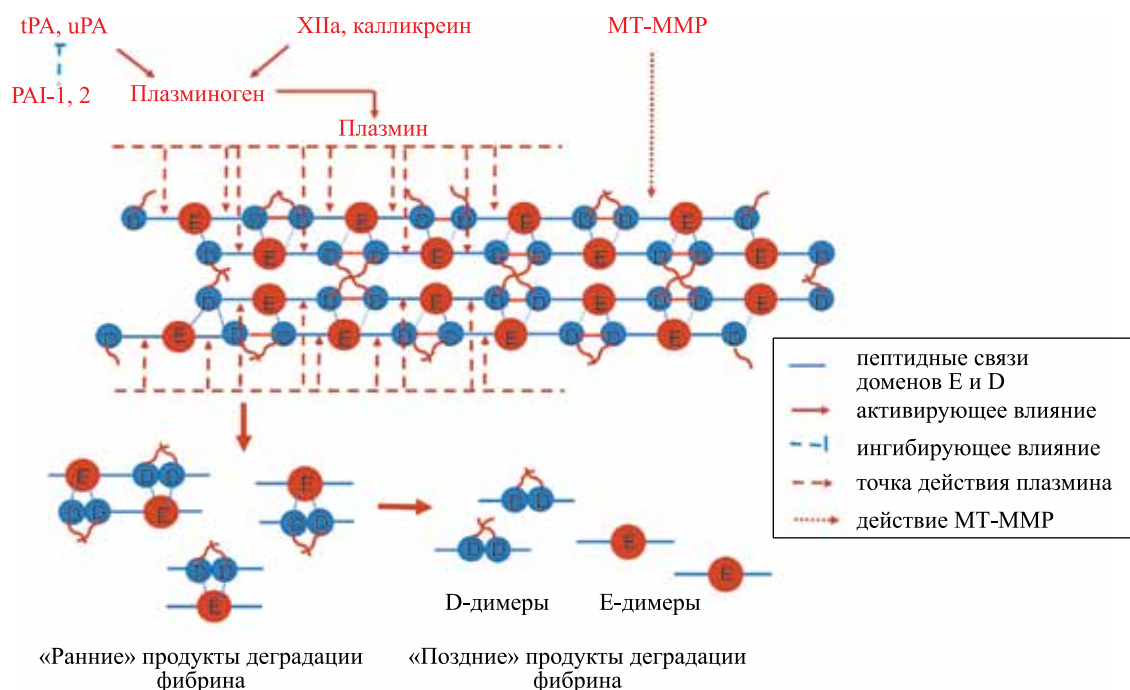


Рис. 2. Принципиальная схема фибринолиза. MT-MMP – матриксные металлопротеиназы мембранного типа; tPA – тканевой активатор плазминогена; uPA – урокиназный активатор плазминогена; PAI – ингибитор активатора плазминогена; D – D-домен; E – E-домен

Fig. 2. Schematic diagram of fibrinolysis. MT-MMP – membrane-type matrix metalloproteinases; tPA – tissue plasminogen activator; uPA – urokinase plasminogen activator; PAI – plasminogen activator inhibitor; D – D-domain; E – E-domain

клеток весьма важен, поскольку от этого зависит эффективность синтеза коллагена и формирование полноценной ткани. К сожалению, на этот вопрос пока нет однозначного ответа. Имеются сообщения как о положительном влиянии ингибиторов на жизнедеятельность клеток [34], так и о неблагоприятных результатах [30] и отсутствии эффектов вообще [35]. В работе Grassl et al. протестирован широкий диапазон концентраций ЭАКК и показано отсутствие влияния на синтез коллагена ГМК, заселенных на фибриновую трубчатую конструкцию [35]. Противоположные результаты представлены Mol et al. [30], в которых использование ЭАКК ингибировало формирование ВКМ, но не препятствовало пролиферации миофибробластов (МФБ) вены человека. Эти выводы были основаны на гистологической оценке тканевых конструкций после культивирования образцов в статических условиях от 2 до 6 недель. Коллагеновые волокна в образцах с ЭАКК не определялись на всех сроках культивирования. Исследователи предполагают, что ингибирующий эффект ЭАКК на формирование коллагеновых волокон связан с тем, что ЭАКК является синтетическим аналогом лизина и может выступать в качестве конкурентного остатка, блокирующего ковалентное сшивание молекул коллагена.

Также нет единого мнения среди ученых в отношении влияния апротинина на жизнедеятельность клеток. Описано как усиление синтеза коллагена МФБ и потенцирование развития тканей при увеличении концентрации апротинина [34], так и отсутствие его влияния на формирование клетками ВКМ, в частности на синтез коллагена IV типа и ламинина [36]. По мнению Mühleder et al. [36], стабилизация фибрина с помощью апротинина вызывает нарушение ангиогенеза и формирования трубчатых 3D-структур. Механизм данного эффекта авторы связывают с ингибированием фибринолиза. Тем не менее прямого влияния апротинина на ангиогенные свойства ЭК не обнаружено, поскольку в случае культивирования клеток без фибрина присутствие апротинина в питательной среде усиливает ангиогенез [37]. Описано влияние различных концентраций апротинина на вазореактивные (контрактильность/дилатация) и механические свойства ТИ протезов сосудов малого диаметра на основе фибрина [38]. По данным Swartz et al., апротинин повышает плотность заселения клеток и физико-механические свойства ТИС, но лишь за счет сохранения структуры фибриновой матрицы. Отмечено разнонаправленное влияние апротинина на вазореактивность ТИС. С одной стороны, он усиливает способность ТИС к вазодилатации, но одновременно снижает рецептор-опосредованную и нереперторную вазоконстрикцию [38].

Столь разноречивые мнения о влиянии ингибиторов фибринолиза на свойства фибрина и поведение

клеток не позволяют сформировать однозначные выводы и требуют дальнейшего всестороннего изучения.

ФИБРИН КАК КЛЕТОЧНЫЙ НОСИТЕЛЬ, ВОЗМОЖНОСТЬ РЕГУЛЯЦИИ ЕГО СВОЙСТВ

Важным моментом ТСИ является разработка трехмерного каркаса, имитирующего ВКМ, который способствует адгезии, пролиферации, миграции клеток и формированию полноценной ткани. Фибрин имитирует ВКМ и оказывает не только физическую поддержку клеток, но и действует как биомиметическая ниша, индуцируя биохимические и биофизические сигналы, регулирующие поведение клеток. Трехмерная фибриновая матрица имеет нанометрическую волокнистую структуру, которая включает микропористость и макропористость. Поры обеспечивают клеткам доставку питательных веществ и возможность миграции и колонизации [39]. Известно, что фибрин поддерживает экспансию, миграцию и пролиферацию различных типов клеток, включая ЭК [40], ЭПК [39], фибробласты [41], МФБ [11], мезенхимальные стволовые клетки (МСК) [42]. Структура и физико-механические свойства фибринового геля зависят от концентрации фибриногена и тромбина [39, 43]. При низкой активности или концентрации тромбина нет полного отделения фибринопептидов А и В от фибриногена, соответственно, не формируются полноценные нити фибрина и увеличивается время полимеризации, что сильно влияет на прочность матрикса. В случаях достаточной концентрации или активности тромбина размер пор и проницаемость фибринового носителя зависит от концентрации фибриногена. Так, увеличение концентрации фибриногена в диапазоне от 5 до 20 мг/мл снижает размер пор и проницаемость матрицы, но повышает ее прочность и жесткость [39, 43]. Однако слишком мелкие поры препятствуют миграции клеток в толщу матрикса и ухудшают их рост и выживаемость за счет снижения проницаемости и перфузии питательных веществ. Для ЭК, располагающихся на поверхности матрикса, изменения размера пор не оказывают столь значимого влияния на жизнедеятельность. Поэтому в зависимости от целей и задач оптимальная концентрация фибриногена должна подбираться индивидуально.

Kurniawan et al. показали, что буфер, который ранее считали инертным, значительно влияет на самосборку фибрина и проницаемость геля [44]. Буферные агенты, контролирующие pH среды, не влияют на первоначальную сборку фибрин-мономеров в протофибриллы, но сильно препятствуют дальнейшей латеральной ассоциации протофибрилл в более толстые волокна фибрина. Опосредованное буфером нарушение связывания протофибрилл вызывает заметное снижение проницаемости фибри-

новых сетей, но не оказывает значимого эффекта на модуль упругости [44].

Кроме концентрации фибриногена, фибрина и рН буфера на структурные свойства фибрина влияет концентрация ионов кальция (Ca^{2+}). Фибриновые гели с конечной концентрацией фибриногена 25 мг/мл и выше, концентрацией Ca^{2+} 20 мМ и рН между 6,8 и 9 обладают прозрачностью и стабильностью [27]. При использовании компонентов фибрина вне этих диапазонов формируется мутный гель, который полностью деградирует в течение нескольких недель.

Оптимальное соотношение фибриноген/тромбин позволяет получать фибрин, который поддерживает рост ЭПК и их дифференцировку в направлении эндотелиального фенотипа с высокими ангиогенными свойствами [39]. Отмечено преимущество фибринового носителя по сравнению с фибронектиновым. Показано, что жизнеспособность, дифференцировка и ангиогенные свойства ЭПК на фибрине выше по сравнению с фибронектином. Кроме того, фибрин способен поддерживать функционально активными большее количество клеток в течение более длительного времени [39].

Распределение и распространение клеток на матрицах является важным аспектом для эффективного формирования ткани. Известно, что высокая однородность распределения клеток обуславливает высокий синтез белков ВКМ [30]. Поэтому принципиальное значение имеет иерархичность и равномерность распределения клеток по всему объему скаффолда. В работе T. Aker et al. показано [11], что сокультуры ЭК и МФБ человека при заселении на композитную матрицу, состоящую из фибрина и каркаса из полилактина, формировали иерархическую структуру с равномерным монослоем ЭК на поверхности и проникновении МФБ в толщу каркаса, соответственно структуре нативного сосуда. Миграция клеток с сохранением их жизнеспособности, по данным авторов, составляет 519 ± 27 мкм. В более глубоких слоях фибрина живых клеток не было обнаружено, что связывают с недостаточным снабжением кислородом и питательными веществами. Другие исследования показали трехмерное распространение заселенных фибробластов в фибрине на глубину до 3 мм [30, 45]. Средняя толщина стенки коронарной артерии человека имеет диапазон от 390 до 1300 мкм, следовательно, максимальная глубина, обеспечивающая жизнеспособность МФБ в фибриновой матрице, позволит создать сосуд малого диаметра. Таким образом, фибриновый гель как клеточный носитель в зависимости от типа клеток обеспечивает их иерархичное и равномерное распределение, способствует свободной миграции и пролиферации на поверхности и внутри матрицы. Это позволит быстро и эффективно заселить фибрин и сформировать компактный состав. Кроме того, клеточный синтез белков ВКМ

внутри матрицы предотвращает вымывание растворимых компонентов и обуславливает созревание ВКМ в короткие сроки.

Хорошая эластичность фибринового геля является еще одним важным аспектом его эффективности как клеточного носителя. Эластичность определяет функциональные характеристики клеток, влияет на динамику ангиогенеза, регулирует миграцию и силу тракции клеток [46]. Фибрин обладает как эластичными, так и вязкими свойствами, которые напрямую связаны с деформацией сдвига. В свою очередь, деформация сдвига индуцирует запуск комплекса сигнальной механотрансдукции, регулирующей адаптацию клеток к их физическому окружению. Фибриновые волокна необычайно растяжимы и эластичны [47], что выгодно отличает фибрин от других белковых волокон [48].

ФИБРИН КАК НЕПОСРЕДСТВЕННЫЙ РЕГУЛЯТОР АНГИОГЕНЕЗА

В процессе заживления раны фибриновый сгусток не только ограничивает кровопотерю, но обеспечивает высвобождение ряда факторов, стимулирующих формирование новых кровеносных сосудов. Классическая модель заживления ран признает активную роль клеток, которые влияют на поведение других клеток посредством сигнальной трансдукции, но при этом ВКМ отводится пассивная роль основы [49, 50]. В настоящее время доказано, что фибриновая матрица принимает прямое участие в регуляции ангиогенеза, колонизации и инвазии клетками [51]. Структура матрицы содержит не только сайты для связывания клеточных интегринов, но также определяет скорость и степень протеолитической деградации матрицы, вызываемой непосредственно самими клетками [52]. Фактором, регулирующим и контролирующим колонизацию и инвазию фибрина ЭК, является фибринолиз, который в свою очередь определяется активностью металлопротеиназной и плазминовой системы [51]. Гемостаз и ангиогенез являются двумя взаимосвязанными физиологическими процессами, которые действуют сбалансированно и гармонично для восстановления микроциркуляции после повреждения сосудов [50]. Непосредственно после травмы чрезвычайно важно предотвратить чрезмерное кровотечение, и для этого необходима эффективная коагуляция. Начало ангиогенеза на этой стадии непродуктивно и преждевременно, поскольку новообразованные сосуды хрупки и нестабильны [53]. Поэтому процессы тромбообразования и ангиогенеза строго контролируются, и ангиогенез запускается только после того, как гемостаз был благополучно завершен. Доказательства непосредственного влияния фибрина на ангиогенез представлены в работе Hadjipanayi et al. [54]. Фибрин связывает многие про-

и антиангиогенные факторы, высвобождающиеся после коагуляции (трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), тромбоцитарный фактор 4 (PF4), тромбоспондин 1 (TSP1) [55], и принимает прямое участие в контролируемом высвобождении этих факторов и регуляции ангиогенеза. Механизм тонкой регуляции тесно связан с процессом фибринолиза и гемостаза. На ранних этапах фибриновый сгусток выполняет гемостатическую функцию и контролируемо высвобождает ангиогенные ингибиторы, при этом с помощью хемотаксических факторов способствует привлечению и миграции ЭК. На этапе сформированного фибринового сгустка и активации фибринолитических процессов фибрин дозированно повышает высвобождение проангиогенных факторов и снижает выход антиангиогенных, формируя условия для эффективного ангиогенеза.

ФИБРИН КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ФАКТОРОВ РОСТА

Фибрин является самостоятельным регулятором поведения клеток. Во время морфогенеза и заживления тканей высвобождение ростовых факторов (РФ) из ВКМ имеет решающее значение для привлечения клеток, регуляции зональности их распределения и передачи сигналов [56, 57]. При этом для правильного формирования ткани высвобождение РФ должно быть точно сбалансировано.

Фибриноген и фибрин через гепарин-связывающий домен способны неспецифически с высокой афинностью связывать и длительно удерживать РФ различных семейств (PDGF, VEGF, FGF, TGF- β) [55, 58]. Не связанные с фибриногеном/фибрином РФ быстро элюируют из фибриновой матрицы, тогда как связанные длительно удерживаются и медленно высвобождаются. Неспецифическое высокоафинное сродство фибрина к РФ играет важную роль в восстановлении поврежденных тканей, поскольку фибрин действует как резервуар для доставки ростовых факторов, способствуя репарации и заживлению.

Замедления процесса высвобождения РФ можно добиться путем прессования фибрина, что одновременно увеличивает плотность каркаса и повышает физико-механические свойства конструкции [53]. Другой способ повысить содержание РФ в фибрине связан с использованием богатой тромбоцитами плазмы при изготовлении матрицы. Тромбоциты содержат большое количество РФ, таких как PDGF, TGF- β 1 и TGF- β 2, FGF, VEGF и инсулиноподобный фактор роста (IGF), которые стимулируют пролиферацию клеток, ремоделирование матрикса и ангиогенез [54]. Использование тромбоцитарного концентрата при формировании фибриновой матрицы

является интересным вариантом для оптимизации заживления тканей [55], но не подходит для создания протезов сосудов, поскольку усиливает тромбогенность конструкции. Кроме физиологической способности фибрина связывать и высвобождать РФ фибриновый гель/матрикс позволяет инкорпорировать факторы роста, биоактивные пептиды и белки [56], что открывает дополнительные возможности направленной дифференцировки и влияния на жизнедеятельность заселенных клеток.

ВАЗОРЕАКТИВНОСТЬ ТИС НА ОСНОВЕ ФИБРИНА

Идеальный ТИС-протез должен адаптироваться к изменяющимся условиям кровотока, т. е. проявлять вазореактивность. Основным элементом вазореактивности являются ГМК, которые способны отвечать на контрактильные и дилатационные стимулы. Благодаря контрактильным свойствам и правильному радиальному расположению сосудистых ГМК не только создаются условия для повышения прочности и стабильности каркаса, но и приобретается вазореактивность всей конструкции. Swartz et al. изучали свойства ТИС малого диаметра на основе фибрина, заселенного ГМК и ЭК [32]. Способность ТИС к констрикции и расслаблению оценивали после воздействия различных вазоактивных веществ на кольцевые сегменты конструкции. Значительную механическую прочность и вазореактивность ТИС достигали уже через 2 недели созревания в статических условиях. После имплантации продолжался процесс ремоделирования с повышением механической прочности и сосудистой реактивности.

ФИБРИН ПОВЫШАЕТ СОПРОТИВЛЕНИЕ КЛЕТОК К НАПРЯЖЕНИЮ СДВИГА

ЭК играют решающую роль в биологии сосудов и выполняют различные функции: служат селективным барьером проницаемости, участвуют в регуляции тромбообразования и тромболизиса, адгезии тромбоцитов, модуляции тонуса сосудов, регуляции иммунного и воспалительного ответа, механотрансдукции. Потеря ЭК вызывает локальную активацию патофизиологического каскада, приводящего к гиперплазии неоинтимы [59]. Поэтому формирование и поддержание функционального, атромбогенного эндотелиального монослоя является ключевым требованием при создании ТИС.

В физиологических условиях ЭК подвергаются сложному механическому воздействию, которое включает напряжение сдвига, давление и радиальное растяжение. Известно, что более 70% ЕС, заселенных на синтетический каркас, смываются в течение первых 20 минут после имплантации и этот процесс усугубляется при повышении уровня напря-

жения сдвига [60]. Покрытие конструкции адгезивными белками дает возможность ЭК противостоять потоку. В качестве адгезивных белков используют фибронектин, коллаген, желатин, цельный ВКМ и фибрин. Наиболее полная сравнительная характеристика эффективности удержания клеток на поверхности сосудистого протеза, покрытого различными видами адгезивных белков, представлена в работе Chlupáč et al. [23]. Исследователи тестировали способность к удержанию ЭК человека на коммерческих протезах из PET с коллагеном I типа и таких же протезах, дополнительно покрытых ламинином, фибрином и фибрином/фибронектином. Эффективность заселения клеток через 4 часа внутриаминного культивирования в условиях ротации составила 22–30% от внесенного количества и существенно не различалась в протезах с покрытием и без покрытия. После 3-дневного созревания заселенных протезов в статичных условиях их помещали в биореактор. Значительная и прогрессирующая во времени потеря клеток наблюдалась на коммерческом и покрытом ламинином протезах. При тех же условиях с поверхности протезов, обработанных фибрином и фибрином/фибронектином, происходила менее значимая потеря клеток, а к 120 мин отмечался даже рост их количества. Повышение содержания ЭК на поверхности, обработанной фибрином или фибрином/фибронектином, исследователи связывают с началом пролиферации клеток.

В адгезии к фибронектину и фибрину вовлечены интегриновые рецепторы $\alpha v \beta 3$ и $\alpha 5 \beta 1$ [61], которые играют решающую роль в адаптации ЭК к гемодинамическим усилиям, их активация запускает внутриклеточную передачу сигналов и изменение экспрессии генов, активирующих ангиогенез и пролиферацию [62]. Указанные рецепторы не задействованы при адгезии ЭК к коллагену и ламинину [61], что подчеркивает преимущество взаимодействия ЭК с фибрином для формирования желаемых клеточных ответов. Способность фибрина удерживать ЭК при напряжении сдвига не зависит от вида полимерной основы (PET, PTFE, ePTFE), а также способа использования фибрина (покрытие для полимеров или как самостоятельный каркас) [63]. Полностью фибриновые скаффолды также позволяют получать эндотелизацию высокой плотности и поддерживать монослой в условиях физиологически значимого напряжения сдвига [63].

К сожалению, покрытие трансплантатов адгезивными белками (ВКМ, плазмой или фибронектином) помимо улучшения адгезии ЭК способствует адгезии и агрегации тромбоцитов и повышению риска тромбообразования. В сравнении с цельным ВКМ и желатином фибрин демонстрирует меньшую активацию и адгезию тромбоцитов на поверхности, и соответственно, меньшую тромбогенность [64].

Таким образом, фибрин является материалом выбора для поддержания эндотелизации ТИС в условиях пульсирующего кровотока.

ФОРМОВАНИЕ ФИБРИНА

Полимеризация фибрина происходит в течение определенного промежутка времени, что имеет свои положительные аспекты при создании ТИ-конструкций. Существуют различные технологии изготовления скаффолдов: заливка формы для создания трехмерной пористой структуры и пропитывание каркаса для модификации или для формирования фибринового покрытия.

В первом варианте в желаемую форму заливают компоненты фибрина, позволяющие им полимеризоваться, и далее готовую конструкцию высвобождают из формы. Благодаря первоначальной текучести смеси компонентов при формировании фибрина возможно получение точных и сложных форм, например, клапаны и сложные сосуды с боковыми ответвлениями [65]. Свойство текучести позволяет пропитывать различные виды каркасов, что создает на поверхности стабильный фибриновый слой и придает конструкции новые желательные свойства [23]. Кроме того, введение культуры клеток в состав суспензии или раствора перед смешиванием и полимеризацией благоприятствует равномерному распределению клеток в залитых матрицах. Благодаря исключительно благоприятным свойствам фибрина для заселения клеток и дальнейшего ремоделирования в организме активно разрабатываются технологии изготовления фибриновых протезов сосудов малого диаметра с помощью заливки [15].

Однако использование только фибрина в качестве основы ТИС наталкивается на главную проблему – недостаточную механическую прочность фибриновых гелей, для того чтобы противостоять физиологической динамической нагрузке *in vivo*.

НИЗКАЯ МЕХАНИЧЕСКАЯ ПРОЧНОСТЬ ФИБРИНА, ВАРИАНТЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ

Применяемые техники повышения механической прочности фибриновых гелей включают два направления: повышение прочностных свойств непосредственно самого фибрина и создание каркаса или гибридизация с полимерами/тканями.

Воздействие на фибрин с целью улучшения прочностных характеристик включает несколько вариантов: повышение концентрации фибриногена и тромбина (описано выше), сшивание волокон фибрина XIIIa фактором, уплотнение структуры фибрина с помощью центробежной силы или компрессии, заселение фибрина клетками при последующем созревании в биореакторе или статике. В работах по созданию ТИС используют как отдельные, так и сочетание нескольких методов [15, 16].

Сшивание XIIIa фактором не только препятствует фибринолизу, но и увеличивает прочностные характеристики фибринового сгустка. С помощью XIIIa фактора возможно повышение модуля упругости волокон фибрина более чем в 8 раз и предела прочности в 4,5 раза [12, 16].

Улучшению физико-механических свойства фибринового сгустка в определенной степени способствует механическое воздействие во время полимеризации. Под действием непрерывных колебательных сил достаточной интенсивности формируется более жесткая и прочная фибриновая матрица по сравнению с аналогичными матрицами, не подвергнутыми механическому давлению [66]. Thomas Aрег и группа исследователей представили технологию высокоскоростного центробежного формования, благодаря которой значительно увеличивалась биомеханическая стабильность фибриновых трубчатых каркасов при увеличении скорости вращения пресс-формы от 1000 до 15 000 об/мин [15]. Основной принцип центробежного формования связан с удалением избыточной жидкости, составляющей более 80% объема фибриновой матрицы, происходящее при этом уплотнение фибринового сгустка способствует увеличению сшивания фибриновых волокон. Замечено, что изолированное центробежное формование менее эффективно, чем сочетание аналогичных параметров центробежной силы и сшивание XIIIa фактором. Более того, введение ЭК и ГМК в состав фибрина наряду с добавлением XIIIa фактора дополнительно повышает прочность трубчатой фибриновой конструкции [15].

Заселение фибробластами, ГМК и ЭК фибриновой конструкции способствует укреплению стенки за счет формирования клеточных взаимодействий, синтеза белков ВКМ. Однако для улучшения физико-механических свойств после заселения клетками *in vitro* должен пройти период созревания конструкции в статических или динамических условиях. Условия пульсирующего потока ускоряют и повышают эффективность созревания фибриновых конструкций. Кондиционирование в условиях пульсирующего биореактора фибринового каркаса, заселенного фибробластами, за 7 недель усиливает прочность конструкции до параметров нативной артерии [67].

Недостаточная прочность и жесткость фибриновых матриц тесно перекликается с проблемой усадки фибрина [65]. Воздействие пульсирующего потока на заселенную клетками фибриновую конструкцию снижает процент усадки фибрина [68]. Пульсирующий поток стимулирует экспрессию белков цитоскелета, выравнивает заселенные клетки по направлению потока, а также значительно увеличивает синтез и накопление белков ВКМ, это повышает прочностные и упругие свойства матрицы, активиру-

ет ремоделирование и создает резистентный каркас, препятствующий усадке [68].

Формирование укрепляющего полимерного каркаса или армирующей сетки в фибриновой основе не только улучшает прочностные характеристики, но и сокращает период созревания фибриновой конструкции. Так, создание быстро разлагающегося каркаса из полигликолевой кислоты с поли-4-гидроксипропаном на фибриновой основе, заселенной МФБ, снизило время подготовки до 4 недель [69]. Через 4 недели динамической деформации *in vitro* механические характеристики ТИС приобрели показатели, сопоставимые с внутренней маммарной артерией (давление на разрыв 903 ± 123 мм рт. ст.). Более короткий период подготовки описан при усилении стенки аутологичного фибринового сосудистого протеза, заселенного МФБ, армирующей сеткой из поливинилиденфторида (PVDF) [70]. За 2 недели пребывания конструкции в условиях биореактора с физиологическими параметрами скорости потока и градиента давления удалось повысить среднюю прочность удерживания шва до 6,3 N, а прочность на разрыв до 236 мм рт. ст. Одновременно в матрице фибринового геля отмечалось хорошее развитие тканей и высокое сходство с нативными сосудами.

Армированные фибриновые ТИС малого диаметра после имплантации показывают очень обнадеживающие результаты: высокую проходимость, отсутствие кальцификации и аневризм, признаки активного ремоделирования стенки (присутствие ГМК и зрелых аутологичных белков ВКМ) и формирование монослоя ЭК на внутренней поверхности протеза [71].

При изготовлении сосудистых протезов все большую популярность завоевывает метод электроспиннинга, позволяющий формировать наноразмерные волокна и создавать пористую структуру каркаса. Предложен вариант изготовления фибринового каркаса, укрепленного ультратонкой волокнистой оболочкой из поли-ε-капролактона (PCL) с использованием электроспиннинга, который дает возможность за 1 неделю получить готовый к имплантации протез сосудов малого диаметра [72]. Через неделю имплантации мышам эти протезы приобрели прочностные свойства, аналогичные нативной артерии. Опосредованное фибрином клеточное ремоделирование, стабильная интима, обильное отложение матрикса с организованными слоями коллагена и эластиновыми волокнами формировались уже с 4-й недели имплантации. Графты показали высокую проходимость, низкие тромбогенность и склонность к кальцификации. Данная технология имеет многообещающую перспективу развития, но требует дополнительных исследований на крупных животных с удлинением сроков имплантации.

Концепция гибридных скаффолдов, сочетающих в себе преимущества натуральных и синтетических материалов, очень привлекательна и кажется эффективной. Покрытия на поверхности полимеров и децеллюляризованных тканей призваны создать сайты клеточной адгезии и повысить биосовместимость, при этом фибриновому покрытию уделяется большое внимание. В данной технологии формообразование и основную механическую нагрузку несет полимерный каркас или децеллюляризованная ткань, а фибриновое покрытие создает на поверхности биосовместимый слой, что облегчает клеточную инвазию и рост. Хорошая проникающая способность фибринового геля, крепкое сцепление с рельефной или пористой поверхностью после полимеризации позволяют использовать фибрин в качестве покрытия или пропитки каркасов из различных полимерных материалов или ксеногенной ткани [23, 71, 73]. В качестве полимерной основы биомиметического гибридного каркаса с биологическими свойствами фибрина используют пористый PCL [74], полилактид [71], PET [23], PTFE/дакрон [75]. Для сохранения механических свойств и улучшения биосовместимости разрабатывают биологические композитные каркасы на основе децеллюляризованных артерий, покрытых фибриновым гелем [73]. Предлагается изготавливать гибридный каркас путем нанесения аэрозольного фибринового геля на внутреннюю и наружную поверхности децеллюляризованных артерий с последующим заселением клетками (МФБ и ЭК). При этом способе децеллюляризованные волокна сонной артерии оказываются тесно переплетены с волокнами фибринового геля, а слои прочно связаны между собой. Полученные гибридные каркасы/сосудистые трансплантаты и нативные артерии демонстрируют схожие физико-механические характеристики [73].

Таким образом, уплотненный и армированный фибрин, а также гибридные варианты каркасов являются потенциальными основами для создания эффективных протезов сосудов малого диаметра.

ВОЗМОЖНОСТЬ СОЗДАНИЯ АУТОЛОГИЧНОГО ПРОТЕЗА НА ОСНОВЕ ФИБРИНА

Одной из главных целей в ТСИ является создание полностью аутологичного протеза сосудов малого диаметра. Открытие сосудистых ЭПК позволяет получать чистые культуры аутологичных ЭК даже от пациентов с ССЗ. ЭПК могут быть получены из собственной периферической крови. Увеличение количества ЭПК в ответ на сосудистое механическое повреждение, гипоксию и ишемию расширяет возможность выделения ЭК из крови, которая представляет собой наиболее доступный, постоянный и неистощимый источник аутологичных колоние-

формирующих ЭК (КФЭК) (Endothelial Colony Forming Cells – ECFCs) [76, 77]. Кроме того, из крови возможно изолировать колониеформирующие ГМК (КФГМК) (Late Outgrowth Smooth Muscle Cells – LOSMC) [78, 79], необходимые для заселения стенки сосудистого протеза.

Aper et al. удалось получить полностью аутологичный ТСИ-протез, объединив все три составляющие: фибриновый каркас, КФЭК и КФГМК [15]. Для получения высококомпактного фибринового матрикса с удовлетворительными физико-механическими свойствами использовали сшивание XIIIa фактором, высокоскоростное центробежное формование, заселение КФЭК и гладкомышечными клетками КФГМК, которые были изолированы из периферической крови. Конструкция имплантировалась овцам сроком на 1 и 6 месяцев. В результате активного ремоделирования стенки протеза через 6 месяцев имплантации сформировалась структура, схожая с нативной артерией. Фибрин был замещен вновь синтезированными белками ВКМ, обнаружено врастание клеток и капилляров из окружающей ткани в имплантированные сегменты, в итоге биомеханические свойства стали соответствовать свойствам нативной артерии. Несмотря на очевидный успех, прочностные свойства протезов до имплантации не в полной мере соответствовали нативной артерии, и одна из овец умерла от разрыва протеза в процессе операции. Возможным решением проблемы может стать дополнительное введение этапа созревания фибриновой заселенной конструкции в условиях биореактора, что несколько увеличит время подготовки конструкции к имплантации. Тем не менее результаты вселяют надежду, что из доступных источников собственных клеток и тканей пациента могут быть получены функциональные, полностью аутологичные сосудистые протезы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фибрин является перспективным материалом в ТСИ. Он имеет огромный потенциал формования, позволяющий получать сложные трехмерные формы. Фибриновый каркас обладает уникальными инструментами для адгезии, миграции и удержания клеток в условиях напряжения сдвига, способен контролировать ангиогенез, накапливать и дозированно высвобождать факторы роста. Возможность контролировать биodeградацию и морфобиологические свойства фибрина позволяют подбирать и сохранять требуемые характеристики. Перечисленные преимущества фибрина в сочетании с доступностью источника и отсутствием иммунного ответа после имплантации делают его идеальным каркасом для создания ТИС-графтов. Фибриновый гель обладает внутренним потенциалом, превосходя во многом другие матричные материалы, за исключением механической прочности. Во всем мире продолжаются поиски способов

повышения механической прочности фибриновых матриц, при этом технология гибридных скаффолдов или армирования фибрина может стать одним из вариантов решения данной проблемы. Кроме того, на основе фибрина возможно создание полностью аутологичного ТИ-сосудистого протеза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Best C, Strouse R, Hor K et al. Toward a patient-specific tissue engineered vascular graft. *J Tissue Eng.* 2018; 9: 2041731418764709. doi: 10.1177/2041731418764709.
2. Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. *The Scientific World Journal* 2015; Article ID 685690: 10 p. doi: 10.1155/2015/685690.
3. Park CH, Woo KM. Fibrin-Based Biomaterial Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1064: 253–261. doi: 10.1007/978-981-13-0445-3_16.
4. Scalcione C, Ortiz-Vaquerezas D, Said DG, Dua HS. Fibrin glue as agent for sealing corneal and conjunctival wound leaks. *Eye (Lond).* 2018; 32 (2): 463–466. doi: 10.1038/eye.2017.227.
5. Mohan S, John B, Rajan M et al. Glued intraocular lens implantation for eyes with inadequate capsular support: Analysis of the postoperative visual outcome. *Indian J Ophthalmol.* 2017; 65 (6): 472–476. doi: 10.4103/ijo. IJO_375_16.
6. Bhatnagar D, Bushman JS, Murthy NS et al. Fibrin glue as a stabilization strategy in peripheral nerve repair when using porous nerve guidance conduits. *J Mater Sci Mater Med.* 2017; 28 (5): 79. doi: 10.1007/s10856-017-5889-4.
7. de Barros CN, Miluzzi Yamada AL et al. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair – Experimental study and preliminary results. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015; 241 (13): 1410–1415. doi: 10.1177/1535370215597192.
8. Reddy KS, Chittoria RK, Babu P et al. Effectiveness of Fibrin Glue in Adherence of Skin Graft. *J Cutan Aesthet Surg.* 2017; 10 (2): 72–75. doi: 10.4103/JCAS. JCAS_100_16.
9. Morin KT, Tranquillo RT. In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel. *Exp Cell Res.* 2013; 319 (16): 2409–2417. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.06.006.
10. Podolnikova NP, Yakovlev S, Yakubenko VP et al. The interaction of integrin α IIb β 3 with fibrin occurs through multiple binding sites in the α IIb β -propeller domain. *J Biol Chem.* 2014; 289 (4): 2371–2383. doi: 10.1074/jbc. M113.518126.
11. Aper T, Teebken OE, Steinhoff G, Haverich A. Use of a fibrin preparation in the engineering of a vascular graft model. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004; 28: 296–302. doi: 10.1016/j.ejvs.2004.05.016.
12. Collet JP, Moen JL, Veklich YI et al. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood.* 2005; 106 (12): 3824–3830. doi: 10.1182/blood-2005-05-2150.
13. Lim BB, Lee EH, Sotomayor M, Schulten K. Molecular basis of fibrin clot elasticity. *Structure.* 2008; 16: 449–459. doi: 10.1016/j.str.2007.12.019.
14. Liu W, Carlisle CR, Sparks EA, Guthold M. The mechanical properties of single fibrin fibers. *J Thromb Haemost.* 2010; 8: 1030–1036. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03745.x.
15. Aper T, Wilhelmi M, Gebhardt C et al. Novel method for the generation of tissue-engineered vascular grafts based on a highly compacted fibrin matrix. *Acta Biomater.* 2016; 29: 21–32. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.012.
16. Dickneite G, Metzner HJ, Kroez M et al. The importance of factor XIII as a component of fibrin sealants. *J Surg Res.* 2002; 107 (2): 186–195.
17. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (8): 1894–1904. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.
18. Siedentop KH, Harris DM, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive. *Laryngoscope.* 1985 Sep; 95 (9 Pt 1): 1074–1076.
19. Ayman E Ismail. Purification of fibrinogen from human plasma. *Thromb Res.* 1987; 46 (1): 19–27. doi: 10.1016/0049-3848(87)90203-9.
20. Weis-Fogh US. Fibrinogen prepared from small blood samples for autologous use in a tissue adhesive system. *Eur Surg Res.* 1988; 20 (5–6): 381–389. doi: 10.1159/000128789.
21. Aper T, Kolster M, Hilfiker A et al. Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012; 2: 3. doi: 10.4172/2155-9538.1000115.
22. Almelkar SI, Patwardhan AM, Divate SA et al. Fibrin matrix supports endothelial cell adhesion and migration in culture. *OA Biology.* 2014; 2 (1): 5.
23. Chlupáč J, Filová E, Riedel T et al. Attachment of human endothelial cells to polyester vascular grafts: pre-coating with adhesive protein assemblies and resistance to short-term shear stress. *Physiol Res.* 2014; 63 (2): 167–177.
24. Hasegawa T, Okada K, Takano Y et al. Thrombin-free fibrin coating on small caliber vascular prostheses has high antithrombogenicity in rabbit model. *Artif Organs.* 2005; 29 (11): 880–886. doi: 10.1111/j.1525-1594.2005.00151.x.
25. Hasegawa T, Okada K, Takano Y et al. Autologous fibrin-coated small-caliber vascular prostheses improve antithrombogenicity by reducing immunologic response. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 133 (5): 1268–1276, 1276.e1. doi: 10.1016/j.jtcvs.2006.12.049.
26. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews.* 2015; 29 (1): 17–24. doi: 10.1016/j.blre.2014.09.003.
27. Eyrych D, Brandl F, Appel B et al. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials.* 2007; 28: 55–65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.027.
28. Hotary KB, Yana I, Sabeh F et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-

- MMP-dependent and -independent processes. *J Exp Med*. 2002; 195 (3): 295–308. doi: 10.1084/jem.20010815.
29. Linnes MP, Ratner BD, Giachelli CM. A fibrinogen-based precision microporous scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007; 28 (35): 5298–5306. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.020.
 30. Mol A, van Lieshout MI, Dam-de Veen CG et al. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2005; 26 (16): 3113–3121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.007.
 31. Schneider-Barthold C, Baganz S, Wilhelmi M et al. Hydrogels based on collagen and fibrin – frontiers and applications. *BioNanoMaterials*. 2016; 17 (1–2): 3–12. doi: 10.1515/bnm-2015-0025.
 32. Ritchie H, Lawrie LC, Crombie PW et al. Crosslinking of plasminogen activator inhibitor 2 and α 2-antiplasmin to fibrin(ogen). *J Biol Chem*. 2000; 275: 24915–24920. doi: 10.1074/jbc.M002901200.
 33. Valnickova Z, Enghild JJ. Human procaryboxypeptidase U, or thrombinactivable fibrinolysis inhibitor, is a substrate for transglutaminases: evidence for transglutaminase-catalyzed cross-linking to fibrin. *J Biol Chem*. 1998; 273: 27220–27224.
 34. Ye Q, Zund G, Benedikt P et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000; 17: 587–591. doi: 10.1016/s1010-7940(00)00373-0.
 35. Grassl ED, Oegema TR, Tranquillo RT. A fibrin-based arterial media equivalent. *J Biomed Mater Res*. 2003; A 66: 550–561. doi: 10.1002/jbm.a.10589.
 36. Mühleder S, Pill K, Schupper M et al. The role of fibrinolysis inhibition in engineered vascular networks derived from endothelial cells and adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018; 12; 9 (1): 35. doi: 10.1186/s13287-017-0764-2.
 37. Koutsoumpa M, Hatzia Apostolou M, Mikelis C et al. Aprotinin stimulates angiogenesis and human endothelial cell migration through the growth factor pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Eur J Pharmacol*. 2009; 602: 245–249. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.11.046.
 38. Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 288: H1451–H146070. doi: 10.1152/ajp-heart.00479.2004.
 39. Barsotti MC, Magera A, Armani C et al. Fibrin acts as biomimetic niche inducing both differentiation and stem cell marker expression of early human endothelial progenitor cells. *Cell Prolif*. 2011; 44: 33–48. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00715.x.
 40. Almelkar SI, Patwardhan AM, Divite SA et al. Fibrin matrix supports endothelial cell adhesion and migration in culture. *OA Biology*. 2014; 14: 2 (1): 5.
 41. Pajorova J, Bacakova M, Musilkova J et al. Morphology of a fibrin nanocoating influences dermal fibroblast behavior. *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 3367–3380. doi: 10.2147/IJN.S162644.
 42. Voss A, McCarthy MB, Allen D et al. Fibrin Scaffold as a Carrier for Mesenchymal Stem Cells and Growth Factors in Shoulder Rotator Cuff Repair. *Arthrosc Tech*. 2016; 5 (3): e447–e451. doi: 10.1016/j.eats.2016.01.029.
 43. Chiu CL, Hecht V, Duong H et al. Permeability of three-dimensional fibrin constructs corresponds to fibrinogen and thrombin concentrations. *Biores Open Access*. 2012; 1 (1): 34–40.
 44. Kurniawan NA, van Kempen TH, Sonneveld S et al. Buffers Strongly Modulate Fibrin Self-Assembly into Fibrous Networks. *Langmuir*. 2017; 27; 33 (25): 6342–6352.
 45. Jockenhoevel S, Chalabi K, Sachweh JS et al. Tissue engineering: complete autologous valve conduit – a new moulding technique. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2001a; 49: 287–290.
 46. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*. 2005; 310: 1139–1143.
 47. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA et al. Fibrin fibers have extraordinary extensibility and elasticity. *Science*. 2006; 313: 634.
 48. Guthold M, Liu W, Sparks EA et al. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers. *Cell Biochem Biophys*. 2007; 49: 165–181.
 49. Feng X, Tonnesen MG, Mousa SA, Clark RA. Fibrin and collagen differentially but synergistically regulate sprout angiogenesis of human dermal microvascular endothelial cells in 3-dimensional matrix. *Int J Cell Biol*. 2013; 2013: 231279. doi: 10.1155/2013/231279 PMID: 23737792.
 50. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49 (1): 35–43. doi: 10.1159/000339613 PMID: 22797712.
 51. Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood*. 2003; 101: 1810–1817.
 52. Van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann NY Acad Sci*. 2001; 936: 426–437.
 53. Monroe DM, Hoffman M. The clotting system – a major player in wound healing. *Haemophilia*. 2012; 18 (5): 11–16.
 54. Hadjipanayi E, Kuhn PH, Moog P et al. The Fibrin Matrix Regulates Angiogenic Responses within the Hemostatic Microenvironment through Biochemical Control. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0135618.
 55. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110 (12): 4563–4568.
 56. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2009; 17 (2): 153–162.
 57. Martino MM, Tortelli F, Mochizuki M et al. Engineering the growth factor microenvironment with fibronectin domains to promote wound and bone tissue healing. *Sci Transl Med*. 2011; 3 (100): 100ra189. doi: 10.1126/scitranslmed.3002614.
 58. Martino MM, Hubbell JA. The 12th–14th type III repeats of fibronectin function as a highly promiscuous growth

- factor-binding domain. *FASEB J.* 2010; 24 (12): 4711–4721. doi: 10.1096/fj.09-151282.
59. Patel SD, Waltham M, Wadoodi A et al. The role of endothelial cells and their progenitors in intimal hyperplasia. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2010; 4 (2): 129–141. doi: 10.1177/1753944710362903.
 60. Wong CS, Sgarioto M, Owida AA et al. Polyethylene-terephthalate provides superior retention of endothelial cells during shear stress compared to polytetrafluoroethylene and pericardium. *Heart Lung Circ.* 2006; 15: 371–377. doi: 10.1016/j.hlc.2006.08.002.
 61. Post A, Wang E, Cosgriff-Hernandez E. A Review of Integrin-Mediated Endothelial Cell Phenotype in the Design of Cardiovascular Devices. *Ann Biomed Eng.* 2019; 47: 366. doi: 10.1007/s10439-018-02171-3.
 62. Schaufler V, Czichos-Medda H, Hirschfeld-Warnecken V et al. Selective binding and lateral clustering of $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha v \beta 3$ integrins: Unraveling the spatial requirements for cell spreading and focal adhesion assembly. *J Cell adhesion & migration.* 2016; 10 (5): 505–515. doi: 10.1080/19336918.2016.1163453.
 63. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Endothelialization and flow conditioning of fibrin-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng.* 2006b; 34: 971–985.
 64. Al-Maawi S, Herrera-Vizcaino C, Dohle E et al. Homogeneous pressure influences the growth factor release profiles in solid platelet-rich fibrin matrices and enhances vascular endothelial growth factor release in the solid platelet-rich fibrin plugs. *Int. J. Growth Factors and Stem Cells in Dentistry.* 2018; 1 (1): 8–16.
 65. Moreira R, Neusser C, Kruse M et al. Tissue-Engineered Fibrin-Based Heart Valve with Bio-Inspired Textile Reinforcement. *Advanced Healthcare Materials.* 2016; 5 (16): 2113–2121.
 66. Munster S, Jawerth LM, Fabry B, Weitz DA. Structure and mechanics of fibrin clots formed under mechanical perturbation. *J Thromb Haemost.* 2013; 11: 557–560.
 67. Syedain ZH, Meier LA, Bjork JW et al. Implantable arterial grafts from human fibroblasts and fibrin using a multi-graft pulsed flowstretch bioreactor with noninvasive strength monitoring. *Biomaterials.* 2011; 32: 714–722.
 68. Flanagan TC, Cornelissen C, Koch S et al. The *in vitro* development of autologous fibrin-based tissue-engineered heart valves through optimised dynamic conditioning. *Biomaterials.* 2007; 28 (23): 3388–3397.
 69. Stekelenburg M, Rutten M, Snoeckx CM et al. Dynamic Straining Combined with Fibrin Gel Cell Seeding Improves Strength of Tissue-Engineered Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Engineering. Part A.* 2009; 15 (5): 1081–1089.
 70. Tschoeke B, Flanagan TC, Cornelissen A et al. Development of a composite degradable/nondegradable tissue-engineered vascular graft. *Artif Organs.* 2008; 32: 800–809.
 71. Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS et al. Fibrin-poly(lactide)-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials.* 2010; 31 (17): 4731–4739.
 72. Morgan BE, Ginn B, Fukunishi T et al. Regenerative and durable small-diameter graft as an arterial conduit. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019; 116 (26): 12710–12719.
 73. Zhijuan He, Xu Ma, Yan Wang et al. Decellularized Fibrin Gel-Covered Canine Carotid Artery: A Completely Biological Composite Scaffold for Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Graft. *J Biomaterials and Tissue Engineering.* 2018; 8 (3): 336–346. doi: 10.1166/jbt.2018.1745.
 74. Pankajakshan D, Krishnan VK, Krishnan LK. Functional stability of endothelial cells on a novel hybrid scaffold for vascular tissue engineering. *Biofabrication.* 2010; 2 (4): 041001. doi: 10.1088/1758-5082/2/4/041001.
 75. Sreerekha PR, Krishnan LK. Cultivation of endothelial progenitor cells on fibrin matrix and layering on dacron/polytetrafluoroethylene vascular grafts. *Artif Organs.* 2006; 30 (4): 242–249.
 76. Matveeva V, Khanova M, Sardin E et al. Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 2; 19 (11). pii: E3453. doi: 10.3390/ijms19113453.
 77. Paschalaki KE, Randi AM. Recent Advances in Endothelial Colony Forming Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Front Med (Lausanne).* 2018; 5: 295. doi: 10.3389/fmed.2018.00295.
 78. Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ et al. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002; 106 (10): 1199–1204. doi: 10.1161/01.cir.0000031525.61826.a8.
 79. Kolster M, Wilhelmi M, Schrimpf C, Hilfiker A, Haverich A, Aper T. Outgrowing endothelial and smooth muscle cells for tissue engineering approaches. *J Tissue Eng.* 2017; 8: 2041731417698852. doi: 10.1177/2041731417698852.

Статья поступила в редакцию 22.08.2019 г.

The article was submitted to the journal on 22.08.2019

КЛИНИЧЕСКИЕ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И ЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫБОРА РЕЦИПИЕНТА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ТРУПНЫХ ДОНОРСКИХ ПОЧЕК

А.В. Ватазин, А.Б. Зулькарнаев, В.А. Степанов

ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

Решение о трансплантации почки конкретному пациенту реализуется посредством двух последовательных решений: о включении пациента в лист ожидания и конкурентном выборе пациента для трансплантации среди нескольких кандидатов. Оба этих решения осуществляются в условиях наличия множества конкурирующих приоритетов и требуют мультидисциплинарного подхода. В статье проводится сравнительный анализ принципов ведения листа ожидания и селекции пары «донор–реципиент» в России, Европе (Eurotransplant) и США (UNOS). Селекция пары «донор–реципиент» реализуется по традиционной иерархической схеме решающих правил. В отличие от Eurotransplant и UNOS в России нет единых стандартов оценки качества донорского органа. Распространенный и в значительной мере неопределенный принцип *old for old* должен быть гармонично вписан в общую канву распределения донорских почек. Вторым отличием отечественной системы распределения донорских почек является выбор в пользу кандидата с меньшей степенью сенсibilизации. Данный принцип синергично с большой частотой положительной перекрестной пробы в значительной мере снижает доступность трансплантации для высоко сенсibilизированных кандидатов. Качество донорского органа и безусловный приоритет высокосенсibilизированных кандидатов являются концептуальными основополагающими принципами распределения органов в США и Европе. В условиях дефицита донорских почек выбор реципиента всегда носит конкурентный характер. Выбор кандидата может быть основан на пациент-ориентированном (выбор в пользу кандидата, у которого трансплантация в наибольшей степени снизит риск смерти; пример – «экстренный» лист ожидания) или альтернативном – утилитарном подходе (выбор в пользу кандидата с наибольшей прогнозируемой продолжительностью жизни). Однако радикальная приверженность одному из этих подходов неизбежно снижает доступность трансплантации почки для определенной категории пациентов. Для обоснованного выбора реципиента необходимо соотнесение таких факторов, как коморбидность, продолжительность ожидания, возраст, гистосовместимость и качество донорской почки, что позволит добиться зыбкого баланса между утилитарностью и пациент-ориентированностью. Принципы формирования листа ожидания и система эффективного распределения донорских органов иностранных авторитетных организаций не могут быть просто копированы и воспроизведены в России. Необходима их адаптация и валидация для локальной популяции пациентов. Объективные трудности такого анализа диктуют необходимость решения ее в национальном масштабе. Это будет способствовать обеспечению справедливого распределения донорских органов всем нуждающимся пациентам и получение наилучших результатов трансплантаций. Кроме того, это позволит в наиболее полной мере реализовать потенциал донорских органов. **Выводы.** Конъюнктура трансплантологической и нефрологической помощи в нашей стране постепенно меняется. Это определяет необходимость адаптации и стандартизации подходов к распределению почек, полученных от трупных доноров, для обеспечения равной доступности трансплантации для разных пациентов и наиболее полной реализации их потенциала. Выведение распределения органов из зоны ответственности локальных координационных советов, внедрение единой политики распределения донорских органов и выбора конкретного реципиента позволит снизить субъективность принимаемых решений, и возможно, улучшить результаты трансплантации.

Ключевые слова: трансплантация почки, лист ожидания, донор, реципиент, коморбидность, гистосовместимость, распределение органов.

Для корреспонденции: Зулькарнаев Алексей Батыргараевич. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корпус 6. Тел. (916) 705-98-99. E-mail: 7059899@gmail.com

For correspondence: Zulkarnaev Alexey Batyrgaraevich. Address: block 6, 61/2, Schepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation. Tel. (916) 705-98-99. E-mail: 7059899@gmail.com

CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND ETHICAL ASPECTS OF SELECTING A RECIPIENT FOR CADAVER KIDNEY TRANSPLANTATION

V.A. Vatazin, A.B. Zulkarnaev, V.A. Stepanov

M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

The decision to choose a particular patient for kidney transplantation is made through two consecutive decisions: decision to include the patient on the waiting list and decision to select a patient competitively among several candidates for transplant. Both decisions are taken amidst many competing priorities and require a multidisciplinary approach. This paper provides comparative analysis of the principles of maintaining a waitlist and selecting a donor–recipient pair in Russia, Europe (Eurotransplant) and the USA (UNOS). *Donor–recipient pair is selected* based on the traditional hierarchical scheme of decision rules. Unlike Eurotransplant and UNOS, there are no uniform standards in Russia for assessing the quality of a donor organ. The widespread and largely vague «old for old» principle should be harmoniously fitted into the general outline of donor kidney distribution. The second difference in the national distribution system of donor kidneys is the choice in favor of a candidate with a lesser degree of sensitization. With high frequency of positive cross-test, this principle, in a synergistic manner, greatly reduces the availability of transplantation for highly sensitized candidates. The quality of donor organ and unconditional priority on highly sensitized candidates are the conceptual fundamental principles of organ distribution in the US and Europe. Under donor kidney shortage, selecting a recipient is always competitive. The choice of a candidate can be based on a patient-oriented approach (a choice in favor of the candidate whose transplantation will most likely reduce the risk of death; for example, an «emergency» waiting list) or an alternative – a utilitarian approach (choosing the candidate with the longest predictable life expectancy). However, radical commitment to one of these approaches inevitably reduces availability of kidney transplantation for a specific category of patients. For a justified choice of recipient, it is necessary to correlate such factors as comorbidity, waiting time, age, histocompatibility and quality of donor kidney. This would achieve a shaky balance between utilitarian approach and patient-oriented approach. The principles of creating a waiting list and a system for efficient distribution of donor organs practiced by foreign organizations cannot be simply copied and reproduced in Russia. It is necessary to adapt and validate such principles for the local patient population. The objective difficulties of such an analysis dictate the need to address it on a national scale. This would ensure equitable distribution of donor organs to all patients in need and obtain the best transplant results. Moreover, this would make it possible to achieve the full potential of donor organs. *Conclusions.* The situation in transplantological and nephrological care in Russia is gradually changing. This determines the need to adapt and standardize approaches to allocation of cadaveric donor kidneys in order to ensure equal access to transplantation for different patients and fullest realization of their potential. Removing organ distribution from the area of responsibility of local coordination councils, introducing a unified policy for distribution of donor organs and choosing a specific recipient will reduce the subjectivity of decisions and, possibly, improve transplantation results.

Keywords: kidney transplantation, waiting list, donor, recipient, comorbidity, histocompatibility, organ distribution.

Согласно Стамбульской декларации [1], трансплантация органов, являясь одним из чудес двадцатого века и сияющим символом человеческой солидарности, продолжает спасать и улучшать жизни сотен тысяч пациентов по всему миру. Общеизвестно, что аллотрансплантация почки (АТП) – оптимальный метод заместительной почечной терапии (ЗПТ). Действительно, крупными исследованиями подтверждено, что этот метод ЗПТ обеспечивает полную медико-социальную реабилитацию пациентов и лучшее качество жизни [2], а главное – обеспечивает наибольшую выживаемость пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) [3–5]. Это справедливо для общей популяции пациентов с ХБП, однако практикующий врач неизбежно сталкивается с необходи-

мостью перейти от общего к частному, а именно – определить оптимальный метод ЗПТ для конкретного пациента. Мы оставим без рассмотрения преимущества и недостатки гемодиализа и перитонеального диализа и сосредоточимся на подходах к выбору кандидатов на трансплантацию почки, уделив особое внимание аспектам, актуальным для нашей страны. Как справедливо сказано в европейских клинических рекомендациях по наилучшей клинической практике по обследованию и наблюдением за донором и реципиентом при трансплантации донорских почек [6], «уход за пациентами после трансплантации почек требует особых знаний в таких областях медицины, как нефрология, иммунология, фармакология, эндокринология, инфекционные болезни и кардиология».

Это, с одной стороны, свидетельствует о необходимости мультидисциплинарного подхода к ведению кандидатов на трансплантацию и реципиентов почечного трансплантата, с другой – о потенциальной возможности присутствия множества противоречивых конкурирующих приоритетов.

Выбор в пользу АТП реализуется в виде двух последовательных решений: включение пациента в лист ожидания и селекция пары донор–реципиент определением конкретного кандидата на трансплантацию. Наиболее сложным представляется нам второе решение.

В России в рутинной клинической практике при трансплантации почки, помимо группы крови, учитывают несоответствия по трем парам лейкоцитарных антигенов человека (HLA – human leukocyte antigens) первого (HLA-A, -B) и второго (HLA-DR) классов, а именно – количество антигенов донора, отсутствующих у реципиента [7] (с приоритетом минимального количества несовпадения по антигенам DR-локуса). Поскольку практически каждый центр трансплантации в нашей стране имеет небольшой, обособленный лист ожидания, возможности выбора оптимального кандидата с учетом тканевой совместимости значительно ограничены. В результате в большинстве случаев врач получает список пациентов, которые равнозначны с точки зрения тканевой совместимости (равное количество HLA-несовпадений). Нет сомнений в том, что, выбирая кандидата на трансплантацию, врач движим исключительно гуманистическими побуждениями. Вместе с тем этот выбор не так однозначен, как может показаться с первого взгляда, и неизбежно порождает этическую дилемму.

На конец 2016 года 5050 пациентов было включено в лист ожидания трансплантации почки. За 2017 год выполнено 1175 трансплантаций почки и включено в лист ожидания 1925 пациентов. Таким образом, с учетом умерших и выбывших по разным причинам на конец 2017 года в листе ожидания было уже 5531 пациент [8]. Очевидно, что в условиях такого дефицита выбор реципиента всегда носит конкурентный характер.

Выбор реципиента может быть основан на одном из двух подходов. Первый подход – пациент-ориентированный. Основной принцип – снижение риска смерти *на момент трансплантации*. Для реализации этого подхода риск смерти после АТП соотносится с риском смерти при продолжении лечения диализом. Пациент, имеющий больший *относительный* риск смерти, выбирается реципиентом. В соответствии с этим принципом, например, трансплантацию выполняют пациенту, который дольше находится в листе ожидания. При этом, как мы показали ранее [9], увеличение продолжительности ожидания сопряжено с ухудшением коморбидного фона. Кроме того,

в соответствии с этим принципом формируется так называемый экстренный лист ожидания (типичным примером являются пациенты с исчерпанными возможностями формирования сосудистого доступа при невозможности конверсии ЗПТ на перитонеальный диализ). При благоприятном исходе трансплантации продолжительность жизни пациента может быть длительной, в то время как продолжение лечения гемодиализом сопряжено с высоким риском скорой смерти. Таким образом, выполнение трансплантации позволяет многократно снизить риск смерти, в то время как стабильный пациент с хорошей функциональной артериовенозной фистулой приобретет значительно меньшую выгоду от АТП.

Пациент-ориентированный подход способствует снижению смертности на диализе (разумеется, среди пациентов в листе ожидания), поскольку увеличение риска смерти пропорционально увеличивает вероятность трансплантации. Однако рост вероятности трансплантации по мере увеличения риска смерти носит не монотонный характер: пациент может быть исключен из листа ожидания, если риск трансплантации превысит риск смерти на диализе. Однако учитывая конкуренцию за донорский орган, этот подход неизбежно сказывается и на остальных пациентах в листе ожидания. В результате увеличивается среднее время ожидания для всех оставшихся кандидатов, поскольку длительно ожидающий кандидат будет иметь приоритет перед кандидатом с меньшим сроком ожидания. Это закономерно способствует снижению прогнозируемой продолжительности жизни остальных кандидатов, а также снижению общей выживаемости реципиентов после АТП (поскольку данный подход способствует накоплению пула реципиентов с меньшей прогнозируемой продолжительностью жизни). Положительным аспектом данного подхода является значительное увеличение доступности трансплантации у пациентов с отягощенным коморбидным фоном. Однако одновременно снижается вероятность трансплантации у пациентов с лучшим коморбидным фоном (эта вероятность возрастет по мере увеличения времени в листе ожидания). Общий принцип данного подхода можно выразить словами «трансплантация как способ спасения жизни».

Второй, альтернативный подход может быть обозначен как утилитарный. Согласно ему предпочтение отдается кандидату, имеющему наибольшую прогнозируемую продолжительность жизни. Это способствует увеличению общей выживаемости реципиентов, а также сокращению среднего времени ожидания трансплантации. При этом данный подход значительно снижает вероятность трансплантации для пациентов с низкой прогнозируемой продолжительностью жизни (поскольку они с большой вероятностью могут не дожить до трансплантации или быть исключенными из листа ожидания в связи с

ухудшением коморбидного фона) и может увеличить смертность больных на диализе (из-за накопления пула пациентов в худшем состоянии, тогда так пациенты в лучшем состоянии получают трансплантат). Общий принцип данного подхода можно выразить словами «обеспечение максимально эффективного с утилитарной точки зрения использования донорских органов».

Таким образом, на практике нередко врач оказывается перед нелегким выбором: выполнить трансплантацию пациенту с большим риском смерти, тем самым несколько ухудшив прогноз у пациента с меньшим риском. Или наоборот: отдать предпочтение пациенту с большей прогнозируемой продолжительностью жизни, тем самым значительно повышая риск смерти пациента в худшем состоянии. Радикальная приверженность каждому из этих альтернативных подходов неизбежно снижает доступность трансплантации для определенной категории пациентов.

В условиях дефицита донорских органов такая дилемма возникает неизбежно. Очевидно, что необходим компромисс между этими подходами для обеспечения зыбкого равновесия между двумя этическими принципами: потенциальной выгодой для здоровья кандидата и справедливостью распределения органов. Обратимся к опыту зарубежных коллег – крупным системам распределения донорских органов Eurotransplant – ET (Европа) и United Network for Organ Sharing – UNOS (США).

Система распределения донорских органов в ET реализуется при помощи двух программ: почки доноров моложе 65 лет – Eurotransplant kidney allocation system (ETKAS), почки доноров в возрасте 65 и более лет – Eurotransplant Senior Program (ESP) [10]. Алгоритм ETKAS подразумевает ранжирование кандидатов в рамках совместимости по группе крови (по соответствующим схемам) с учетом следующих критериев: уровень сенсibilизации (panel-reactive antibody – PRA), тканевая совместимость (HLA-A, -B, -DR), время ожидания, вероятность HLA-несоответствия (mismatch probability) и регион изъятия. Данный алгоритм предназначен в первую очередь для обеспечения наилучшей иммунной совместимости донора (посмертного) и реципиента, в то же время он учитывает и время ожидания трансплантации.

Алгоритм ESP использован главным образом для уменьшения времени консервации и оптимизации использования органов «возрастных» доноров. Органы распределяются последовательно на локальном, региональном и национальном уровне без учета HLA-фенотипа донора среди неиммунизированных реципиентов 65 лет и старше и ранжируются на основе срочности и времени ожидания. Иммунизированные (имеющие предрасполагающие анти-HLA антитела) пациенты включаются в распределение по программе приемлемых несоответствий (acceptable mismatch),

которая допускает иногруппную трансплантацию. Трансплантация по системам ETKAS и ESP, согласно политике ET, подразумевает только трансплантацию при совпадении группы крови донора и реципиента по системе AB0.

Таким образом, концепция old for old не только была успешно реализована, но и гармонично вписана в общую канву распределения донорских почек. Это, с одной стороны, увеличило доступность трансплантации пожилым пациентам, а с другой стороны, способствовало увеличению вероятности молодому реципиенту получить орган от молодого донора. Краткосрочные результаты после внедрения алгоритма ESP (в 1999 году) были многообещающими за счет значительного сокращения продолжительности консервации (за счет преимущественного распределения органов по этой программе на локальном уровне) [11]. Долгосрочные результаты подтвердили, что цель программы достигнута: доступность трансплантации для пожилых увеличилась, время ожидания трансплантации и продолжительность консервации сократились, частота отсроченной функции трансплантата уменьшилась. При этом у пожилых реципиентов несколько увеличилась частота кризов отторжения и уменьшилась выживаемость трансплантатов по сравнению с реципиентами этой же возрастной группы, получившими почки от более молодых доноров [12]. Тем не менее выживаемость реципиентов была выше, чем выживаемость пациентов этой же возрастной группы, находящихся в листе ожидания [13, 14].

Таким образом, ключевым критерием распределения донорских органов в ET является возраст донора и сенсibilизация кандидатов. Это в первую очередь определяет выбор алгоритма, по которому будет выбран реципиент.

В США система распределения донорских органов с общим листом ожидания внедрена в 1977 году. Одним из основных критериев выбора реципиента была продолжительность диализа. Увеличение потребности в донорских органах привело к необходимости использования почек от доноров с расширенными критериями (expanded criteria donor – ECD). К ним были отнесены доноры 60 лет и старше, а также доноры 50–59 лет при наличии по крайней мере одного из следующих критериев: креатинин сыворотки более 1,5 мг/дл, смерть вследствие цереброваскулярных причин или артериальная гипертензия в анамнезе. Трансплантаты, полученные от таких доноров, имели на 70% больший риск утраты функции [15]. При этом доля трансплантатов, полученных от ECD, в 2005 году составляла 17% от всех посмертных доноров [16]. При включении в лист ожидания пациент делал выбор в отношении возможности трансплантации ему почки от ECD. Почки, полученные от ECD, распределялись среди

пациентов, давших согласие на участие в этой программе, в следующей последовательности: пациенты с отсутствием HLA-несовпадений на национальном уровне, все остальные пациенты на местном, региональном и национальном уровнях с учетом длительности ожидания, но не HLA-совместимости [17].

Целью этого было стремление сократить время ожидания трансплантации. Как показали крупные исследования, пожилые пациенты имели низкую продолжительность жизни и высокий риск смерти с функционирующим трансплантатом. В то же время более молодые пациенты с длительным временем жизни после трансплантации «переживали» срок функционирования трансплантата, возвращались на диализ и ожидали повторную трансплантацию [18]. Это усугубляло дефицит донорских органов. Назрела необходимость оптимизации системы распределения донорских органов.

Американская национальная концепция распределения почек 2008 года [19] помимо совместимости по HLA была основана на трех основных критериях: продолжительности диализа, показателе панель-реактивных антител (panel-reactive antibody – PRA) и показателе дополнительных лет жизни, полученных благодаря трансплантации (life years from transplant – LYFT). Именно внедрение расчетного показателя LYFT стало концептуальным компонентом эволюции системы распределения. LYFT определяется как разница в прогнозируемой продолжительности жизни при двух альтернативных вариантах развития событий, в одном из которых пациенту будет выполнена трансплантация почки в данный момент *от конкретного донора* (совокупная продолжительность жизни с функционирующим трансплантатом, а также после утраты его функции и возобновления лечения диализом), а в другом – пациент продолжит лечение диализом. Также важной инновацией было то, что при расчете этого показателя косвенно учитывалось качество жизни: при расчете для продолжительности жизни на диализе (в обоих вариантах развития событий) применялся понижающий коэффициент (0,8) [20].

Изменения произошли и в системе оценки качества донорских органов. На смену бинарной классификации (стандартные доноры / доноры с расширенными критериями) пришла непрерывная шкала. Донорские почки ранжировались в соответствии с метрикой, именуемой «индекс риска донора почек» (kidney donor risk index – KDRI) [21], косвенно отражающей потенциал продолжительности их функционирования. Этот индекс помимо других критериев также включал в себя и HLA-совместимость. На распределение донорских почек с наибольшей прогнозируемой продолжительностью функционирования в большей мере (80%) влияет показатель LYFT, в меньшей мере (20%) – продолжительность диализа,

а также PRA. По мере ухудшения качества донорских почек линейно меняется и приоритет факторов. Донорские почки с наименьшей прогнозируемой продолжительностью функционирования распределяются только с учетом продолжительности диализа и PRA. [22] Таким образом, кандидаты с наибольшей ожидаемой продолжительностью жизни получили приоритет в распределении почек с наибольшей потенциальной выживаемостью. Длительно ожидающие на диализе пациенты, напротив, получили приоритет при распределении почек с небольшой ожидаемой продолжительностью функционирования. В результате в равной степени увеличивается доступность трансплантации для обеих категорий пациентов.

Основными аргументами критиков существующей системы распределения органов была ее сложность, а также низкая доступность трансплантации для высокосенсибилизированных кандидатов. Критике также подверглась и концепция расчета LYFT. Несмотря на изящество теоретических конструкций и доказанную при разработке информативность этой оценки, опыт ее применения показал недостаточную точность прогноза, что связывали с ограниченным количеством предикторов, используемых при расчете [23]. Например, при расчете LYFT не учитывается риск кардиоваскулярных событий (хотя такая возможность рассматривалась при разработке способа расчета этого показателя [20]). При этом известно, что сердечно-сосудистые заболевания – основная причина смерти пациентов с ХБП 5-й стадии [4, 5]. Реципиентам почечного трансплантата также свойствен более высокий риск смерти от сердечно-сосудистых заболеваний, чем в общей популяции [24] (хотя и в меньшей степени, чем у пациентов на диализе) [4, 25–27]. Таким образом, два кандидата, сопоставимых по критериям, участвующим в расчете LYFT, могут иметь значительно различающийся прогноз.

Следующим этапом развития системы распределения в США для наиболее полного использования потенциала донорских почек стал отказ от LYFT и KDRI в пользу расчета значительно более простого показателя – посттрансплантационной выживаемости (expected post transplant survival – EPTS). При этом качество донорских почек оценивалось при помощи нового индекса – «профиля донора почек» (kidney donor profile index – KDPI) [28, 29].

При расчете KDPI учитывается возраст, рост, вес, этническая принадлежность доноров, наличие артериальной гипертензии и диабета в анамнезе, причина смерти, уровень креатинина в сыворотке крови, статус гепатита С. При расчете показателя EPTS учитывается возраст реципиента, наличие диабета, предыдущие трансплантации органов в анамнезе, продолжительность диализа.

Алгоритм выбора реципиента реализован по традиционной иерархической схеме решающих правил. При этом начальным звеном является качество донорского органа – KDPI: на основе значения этого показателя почки относились к одной из четырех категорий, каждая из которых имела свою последовательность выбора реципиента. Данная система имеет два ключевых принципа. Первый состоит в том, что показатель EPTS рассчитывается только при распределении почек наилучшего качества (при значении KDPI $\leq 20\%$). Таким образом, обеспечивается равномерность доступности трансплантации.

Второй ключевой принцип – бескомпромиссный приоритет высокосенсибилизированных кандидатов (значение PRA 98–100%) и кандидатов, не имеющих HLA-несовпадений по A-, B- и DRB1-локусам HLA (этот принцип соблюдается при распределении почек с любым значением KDPI) [18, 20, 30].

При распределении почек кандидаты ранжируются в соответствии с количеством баллов, начисляемых в соответствии с продолжительностью диализа, значением PRA, совместимостью по HLA-DRB1-локусу. Также дополнительные баллы начисляются детям и пациентам, ставшим прижизненными донорами. Как и в предыдущей системе распределения почек, кандидаты на сочетанную трансплантацию (почка и экстраренальный орган) имеют приоритет.

Важной особенностью данной системы является возможность иногруппной трансплантации трупных почек кандидатам с отсутствием HLA-несовпадений.

Внедрение в 2014 году новой системы распределения донорских органов привело к небольшому, но статистически значимому увеличению продолжительности консервации (с 15,8 до 16,8 часа), снижению среднего возраста реципиентов (с 55 до 52 лет), увеличению силы корреляции возраста донора и реципиента (с 0,35 до 0,38), снижению доли реципиентов без HLA-несовпадений (с 8,5 до 4,5%), снижению доли реципиентов старше 30 лет (с 19,4 до 15,0%). При этом значительно увеличилась доля реципиентов со значением PRA 100% (с 1,0 до 10,3%) [31]. Вместе с тем на 81,7% увеличилось количество реципиентов моложе 40 лет и на 65,8% снизилось количество реципиентов старше 65 лет, получивших трансплантат со значением KDPI $\leq 20\%$ [32].

Долгосрочные результаты внедрения данной системы еще предстоит оценить: неизвестно, как изменится выживаемость реципиентов и трансплантатов, а также доля реципиентов, умерших с функционирующим трансплантатом. Однако это одна из наиболее продуманных и сбалансированных систем распределения донорских органов в мире.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ СИСТЕМЫ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ТРУПНЫХ ДОНОРСКИХ ПОЧЕК В РОССИИ

Российские национальные рекомендации по формированию и ведению листа ожидания трансплантации трупного органа, а также алгоритму подбора оптимальной пары донор–реципиент [7, 33] имеют своей целью обеспечение справедливого распределения донорских органов всем нуждающимся пациентам и получение наилучших результатов трансплантаций. Согласно этому документу, селекция пары донор–реципиент осуществляется с учетом совместимости по группе крови по системе AB0, статуса неотложности, антропометрических параметров и срока пребывания в листе ожидания.

Первичная селекция пары осуществляется на основе группы крови (по системе AB0) и результата перекрестной лимфоцитарной пробы (cross-match). На втором этапе пациенты ранжируются на основе наличия ургентного статуса или необходимости одномоментной трансплантации комплекса органов (такие пациенты имеют безусловный приоритет). На третьем этапе выбор реципиента осуществляется на основе гистосовместимости с приоритетом минимального количества несовпадений по локусу DR. Далее приоритет пациентов определяется «наличием предсуществующих антител». При этом вопреки принципам ET и UNOS реципиенты, не имеющие (или имеющие малый уровень) предсуществующих антител, имеют преимущество над пациентами с наличием предсуществующих антител (или их высоким уровнем). На заключительном этапе кандидаты ранжируются в соответствии с длительностью пребывания в листе ожидания (длительно ожидающие кандидаты имеют приоритет). Российская политика подразумевает распределение трупных почек только при совпадении по группе крови.

Основным, начальным этапом распределения донорских органов и в США (UNOS), и в Европе (ET) для несенсибилизированных кандидатов является качество донорского органа. Если в Европе в основу положен возраст донора, то в США это комплексный показатель. Внедрение подобного показателя (или хотя бы бинарного признака, как в ET) мы считаем эффективной мерой (возможно, самой необходимой на данном этапе развития трансплантации почки в России), которая будет способствовать повышению доступности трансплантации. Пациенты с сахарным диабетом, пожилые пациенты, пациенты с отягощенным коморбидным фоном не должны быть ограничены в доступе к трансплантации. Справедливость – основополагающий этический принцип любой системы распределения донорских органов. С другой стороны, это обеспечит наиболее эффективное распределение органов, позволив в полной

мере реализоваться потенциалу донорских почек. Пациенты с наибольшим прогнозируемым временем жизни должны получить почки наилучшего качества. Данный подход обеспечит оптимальный баланс между пациент-ориентированным и утилитарным подходом к распределению.

Очевидно, что для внедрения этого подхода необходима разработка системы оценки качества донорского органа и комплексная оценка состояния потенциального реципиента. Недавним исследованием было показано, что это не может быть достигнуто в результате простого копирования системы распределения органов: например, современная система распределения органов, успешно реализованная и эффективно функционирующая в США, может иметь сомнительную эффективность в Европе [34].

Должны быть определены наиболее важные факторы, оказывающие влияние на качество донорского органа, *актуальные для пула доноров в нашей стране*. Такими факторами могут быть: наличие сахарного диабета, артериальной гипертензии, возраст донора, функциональное состояние почек, причина смерти донора, тип донора (донор с бьющимся сердцем / асистолический донор). При этом анамнестические данные не всегда доступны. Почки, полученные от таких доноров, могут быть отнесены к отдельной категории. В таком случае оценка качества почек проводится исключительно на основании данных инструментальных и лабораторных обследований, типа донора, причины смерти и возраста.

Наиболее сложной представляется нам оценка состояния реципиента. Во-первых, приоритезация реципиентов может быть основана или на расчете показателя прогнозируемой продолжительности жизни, или на потенциальной выгоде от трансплантации (аналоги EPTS и LYFT). Как правило, такая оценка получена в результате определения регрессионного уравнения, описывающего зависимость между некоторым исходом и набором предикторов с наилучшей аппроксимацией. Набор предикторов определяется биологической важностью оцениваемых характеристик и ограничен, с одной стороны, качеством оценки этих показателей, а с другой – актуальностью их для изучаемой популяции.

Отсутствие противопоказаний к трансплантации не единственный критерий, определяющий необходимость трансплантации почки пациенту с ХБП 5-й стадии (но при этом основной, определяющий ее возможность). Вторым необходимым условием является уверенность, что трансплантация приведет к увеличению прогнозируемой продолжительности жизни или ее качества. Это может быть достигнуто в результате, например, исследования связи количественной оценки коморбидного фона и результатов трансплантации в сопоставлении с результатами лечения диализом, и самое главное, возможности ее

применения для индивидуального прогноза. Ранее нами было показано [9], что ухудшение коморбидного фона в результате длительного ожидания сопровождается повышением смертности реципиентов после трансплантации. Это вызывает сомнения в целесообразности трансплантации почки, поскольку она не приводит к значимому улучшению прогноза по сравнению с продолжением лечения диализом.

Эвальвация коморбидного фона имеет большое значение для индивидуальной оценки рисков (интерес пациента) и при разработке политики распределения органов (интерес координирующего органа) и приоритезации кандидатов (интерес трансплантолога). Если при включении в лист ожидания решение может быть принято на основании ряда бинарных признаков (например, наличие/отсутствие системного инфекционного процесса, злокачественных новообразований или инфаркта миокарда в недавнем прошлом), то для сопоставления коморбидного фона реципиента с качеством донорского органа может потребоваться оценка в ординальной или интервальной шкале (в силу условности шкал оценки коморбидного фона возможность измерения состояния здоровья в абсолютной шкале – шкале отношений – представляется крайне сомнительной даже при условии обеспечения приемлемой эквидистантности).

Расчет прогнозируемой продолжительности жизни представляется (аналог EPTS) нам более наглядной и сбалансированной оценкой для пациентов с *хорошим прогнозом*. При очевидной условности этой оценки она может носить дискретный характер (например, менее 10 лет, 10–20 лет, более 20 лет). В то же время это может снижать вероятность трансплантации для пациентов в худшем состоянии. В свою очередь показатель, представляющий потенциальную выгоду от трансплантации (аналог LYFT) при небольших сроках наблюдения с большей вероятностью будет отдавать предпочтение *более тяжелым пациентам* [20], у которых *абсолютное* значение предполагаемой продолжительности увеличится в меньшей степени по сравнению со значительным *относительным* увеличением продолжительности жизни в случае трансплантации по сравнению с продолжением лечения диализом. Это вызвано тем, что пациенты с небольшой продолжительностью жизни реализуют потенциал LYFT вскоре после трансплантации, тогда как пациенты с большой ожидаемой продолжительностью жизни реализуют потенциал LYFT в более поздние сроки (спустя 10–15 лет).

Примером могут быть пациенты с сахарным диабетом. Известно, что реципиенты с диабетом имеют значительно меньшую ожидаемую продолжительность жизни, чем пациенты без диабета [3–5]. Вместе с тем молодые пациенты с сахарным диабетом могут иметь исключительную выгоду от трансплантации почки по сравнению с пациентами этой же возраст-

ной группы без диабета [18, 20]. Это обусловлено чрезвычайно высокой смертностью этих пациентов на диализе.

Другим примером могут быть пациенты, нуждающиеся в срочной трансплантации: срок жизни после трансплантации может возрасть в несколько раз по сравнению с вариантом развития событий, если они останутся на лечении диализом. Однако поскольку пациенты из обоих примеров будут иметь относительно небольшую прогнозируемую продолжительность жизни в целом, целесообразно будет выполнить трансплантацию почки, функциональный потенциал которой будет израсходован раньше, чем потенциал почек лучшего качества. Для наиболее полного раскрытия потенциала донорских почек необходимо внедрение научно обоснованной системы соотношения суррогатной оценки состояния пациента с качеством органа, дополняющей в значительной мере неопределенный принцип *old for old*.

Таким образом, качество донорского органа должно быть ключевым аспектом распределения. При прогнозируемой продолжительности жизни, например менее 10 лет, почки могут быть распределены с учетом максимальной выгоды от трансплантации, при большей продолжительности жизни – с учетом посттрансплантационной выживаемости.

Важным фактором также представляется нам оценка приверженности лечению (когнитивные нарушения, несоблюдение предписаний лечащего врача, пропуск сеансов диализа и др.). Данный фактор также должен быть учтен при приоритизации кандидатов.

В настоящее время у нас нет четкого представления, как такие факторы, как коморбидный фон, гистосовместимость, срок ожидания и возраст реципиента, должны быть вписаны в канву системы распределения. Нам представляется, что на разных сроках ожидания (следует учитывать не продолжительность ожидания в листе, а общую продолжительность лечения диализом) приоритет этих факторов меняется, причем, нелинейно. Ранее нами были получены убедительные доказательства в пользу этого факта: по мере увеличения продолжительности диализа возрастает значимость коморбидности [9]. Вполне вероятно, что при длительном ожидании потенциальная выгода от трансплантации значительно снижается даже в случае минимального количества HLA-несовпадений. В пользу этого предположения имеются и другие подтверждения [35].

Добавляет сложности также и тот факт, что стоит ожидать значимого эффекта взаимодействия различных факторов, которое может быть нелинейно связано с вероятностью исхода. Например, очевидно, что по мере увеличения возраста и ухудшения коморбидного фона постепенно (и можно даже предположить, что линейно) возрастает риск смерти пациента. При

этом по мере увеличения срока ожидания коморбидный фон будет ухудшаться (а значит, риск смерти – возрастет) с большим темпом у пожилых пациентов по сравнению с молодыми [36]. Таким образом, даже эти три фактора (возраст, коморбидный фон и срок ожидания) порождают необходимость включения в регрессионную модель их взаимодействия с соответствующими коэффициентами. Добавление такого важного фактора, как наличие или отсутствие диабета, еще в большей мере усложняет анализ (очевидно, что ухудшение коморбидного фона у пациентов с диабетом происходит с большим темпом, чем у пациентов без диабета). Тем не менее данная проблема, вероятно, все же может быть решена. Если проанализировать регрессионное уравнение, применяемое для расчета показателя EPTS [37], несколько предикторов как раз представлены взаимодействием факторов. Вместе с тем потребный большой объем первичных данных и необходимость в обязательной внешней валидации модели определяют необходимость решения данной проблемы в национальном масштабе. Нами уже несколько лет планомерно ведется подобная работа на основе созданной ретроспективной базы данных. Вместе с тем ограниченность в ресурсах и объеме клинического материала, а также локальный ее характер свидетельствуют об определенной субъективности оценок: результат (проект схемы селекции пары донор–реципиент) может быть актуален только для нашего региона.

Кроме этого, важным аспектом работы, в значительной мере определяющим возможность практического применения ее результатов, является локализация расчета PRA, а также вероятности приемлемых несовпадений у сенситизированных реципиентов. Расчет может быть основан на результатах локального пула пациентов или на доступных данных из открытых источников [38, 39] о популяционных частотах антигенов в соответствующем регионе. Эти оценки также могут значимо влиять на определение приоритета кандидатов.

Вероятность трансплантации (без учета фактора коморбидности) – это стохастическая величина. Важным фактором, который теоретически может оказывать влияние на приоритет кандидатов, может быть популяционная частота антигенов, составляющих фенотип и учитываемых при селекции пары. Вполне вероятно, что кандидаты, имеющие редкий HLA-фенотип, могут длительно ожидать трансплантацию [40–42]. В то же время срок ожидания может компенсировать влияние этого фактора, в случае если будет установлено, что при достижении определенного срока ожидания приоритет гистосовместимости по HLA снижается в пользу других клинических факторов (например, коморбидного фона).

Недостатком отечественной системы распределения донорских почек является отсутствие единого

листа ожидания, что в значительной мере препятствует выбору оптимального с точки зрения тканевой совместимости реципиента. Учитывая территориальные особенности нашей страны, лист ожидания может быть общим в рамках объединения усилий нескольких центров трансплантации (не просто на уровне федеральных округов, а именно по территориальному принципу). Вероятность получения центром донорского органа (под конкретного пациента) определялась бы в первую очередь величиной локального пула кандидатов на трансплантацию и была бы ограничена способностью выполнения определенного количества операций. При этом вероятность выполнения трансплантации при получении донорской почки определяется качеством ведения листа ожидания (наличие актуальных сведений о состоянии кандидата). Помимо определения политики распределения органов, необходимо сопоставить влияние сроков консервации на долгосрочную выживаемость трансплантатов различного качества с той выгодой, которую может обеспечить трансплантация с хорошим иммунологическим фоном. Возможно, это будет оправдано только для кандидатов на трансплантацию со значениями PRA, близкими к 100%.

Тот факт, что при современной системе распределения органов несенсибилизированные кандидаты имеют приоритет перед сенсибилизированными, безусловно, ограничивает доступность трансплантации. Вероятно, это вызвано тем, что десенсибилизация пациентов, которые имеют предсуществующие анти-HLA антитела и ожидают трансплантацию трупной почки, не является системной практикой. Улучшить результаты трансплантации при наличии предсуществующих антител может внедрение виртуальной перекрестной пробы с учетом наличия общих эпитопов [43–45]. Определение приемлемых несоответствий может значительно улучшить результаты трансплантации почек сенсибилизированным кандидатам [46, 47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Трансплантация почки, бесспорно, остается оптимальным методом заместительной почечной терапии для подавляющего большинства пациентов. Конъюнктура трансплантологической и нефрологической помощи в нашей стране постепенно меняется. Это определяет необходимость адаптации и стандартизации подходов к распределению почек, полученных от трупных доноров, для обеспечения равной доступности трансплантации для разных пациентов и наиболее полной реализации их потенциала. Выведение распределения органов из зоны ответственности локальных координационных советов, внедрение единой политики распределения донорских органов и выбора конкретного реципиента позволит снизить

субъективность принимаемых решений, и возможно, улучшить результаты трансплантации.

Работы были выполнены с использованием средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МД-2253.2018.7.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Participants in the International Summit on Transplant Tourism and Organ Trafficking Convened by the Transplantation Society and International Society of Nephrology in Istanbul, Turkey, April 30 – May 2, 2008. The declaration of Istanbul on organ trafficking and transplant tourism. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 3375–3380. doi: 10.1093/ndt/gfn553.
2. Purnell TS, Auguste P, Crews DC, Lamprea-Montealegre J, Ohufade T, Greer R et al. Comparison of life participation activities among adults treated by hemodialysis, peritoneal dialysis, and kidney transplantation: a systematic review. *Am J Kidney Dis*. 2013; 62 (5): 953–973. doi: 10.1053/j.ajkd.2013.03.022.
3. ERA-EDTA-reg.org [Internet]. European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association (ERA–EDTA) Registry Annual Report 2017. 2018; Available at: <https://www.era-edta-reg.org/files/annual-reports/pdf/AnnRep2017.pdf>.
4. USRDS.org [Internet]. United States Renal Data System. 2018 USRDS annual data report. Volume 2 – End-stage Renal Disease (ESRD) in the United States: Chapter 5: Mortality. 2019; Available at: https://www.usrds.org/2018/download/v2_c05_Mortality_18_usrds.pdf.
5. Бикбов БТ, Томилина НА. Заместительная терапия терминальной хронической почечной недостаточности в Российской Федерации в 1998–2013 гг. Отчет по данным общероссийского регистра заместительной почечной терапии Российского диализного общества. Часть первая. *Нефрология и диализ*. 2015; 17 (3, приложение): 5–111. Бикбов БТ, Томилина НА. Renal replacement therapy for ESRD in Russian Federation, 1998–2013 Report of the Russian Renal Replacement Therapy Registry. Part 1. *Nefrologiya i dializ [Nephrology and dialysis]*. 2015; 17 (3, supplement): 5–111. [In Russ, English abstract]. doi: 10.28996/1680-4422-2017-4suppl-1-95.
6. European Renal Best Practice Transplantation Guideline Development Group. ERBP Guideline on the Management and Evaluation of the Kidney Donor and Recipient. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28 Suppl 2: ii1–71. doi: 10.1093/ndt/gft218.
7. Transpl.ru [Интернет]. Профессиональная ассоциация: Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Национальные клинические рекомендации: посмертное донорство органов. 2016.

- Доступно по ссылке: http://transpl.ru/files/rto/possmertnoe_dnorstvo_organov.pdf. Transpl.ru [Internet]. Professional Association: Russian public organization of transplantologists «Russian transplant society». National clinical guidelines: postmortal organ donation. 2016. [In Russ] Available at: http://transpl.ru/files/rto/possmertnoe_dnorstvo_organov.pdf.
8. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2017 году. X сообщение регистра Российского трансплантологического общества. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (2): 6–28. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in russian federation in 2017. 10th report of the national registry. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (2): 6–28. [In Russ, English abstract]. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2018-2-6-28>.
 9. Ватазин АВ, Зулкарнаев АБ, Степанов ВА. Анализ выживаемости пациентов в листе ожидания трансплантации почки с позиции конкурирующих рисков. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 35–45. Vatazin AV, Zulkarnaev AB, Stepanov VA. Survival analysis of patients in the waiting list for kidney transplantation in terms of competing risks. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (1): 35–45. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-35-45.
 10. Eurotransplant.org [Internet]. Eurotransplant Manual – version 8.0. Chapter 4: Kidney (ETKAS and ESP). 2018; Available at: <https://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=H4+Kidney+March+20191.pdf>.
 11. Smits JM, Persijn GG, van Houwelingen HC, Claas FH, Frei U. Evaluation of the Eurotransplant Senior Program. The results of the first year. *Am J Transplant*. 2002; 2 (7): 664–670.
 12. Frei U, Noeldeke J, Machold-Fabrizii V, Arbogast H, Margreiter R, Fricke L et al. Prospective age-matching in elderly kidney transplant recipients – a 5-year analysis of the Eurotransplant Senior Program. *Am J Transplant*. 2008; 8 (1): 50–57. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.02014.x.
 13. Jay CL, Washburn K, Dean PG, Helmick RA, Pugh JA, Stegall MD. Survival benefit in older patients associated with earlier transplant with high kdpi kidneys. *Transplantation*. 2017; 101 (4): 867–872. doi: 10.1097/TP.0000000000001405.
 14. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16 (6): 1859–1865. doi: 10.1681/ASN.2004121092.
 15. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation*. 2002; 15; 74 (9): 1281–1286. doi: 10.1097/00007890-200211150-00014.
 16. Port FK, Dykstra DM, Merion RM, Wolfe RA. Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004. *Am J Transplant*. 2005; 5 (4 Pt 2): 843–849. doi: 10.1111/j.1600-6135.2005.00831.x.
 17. Rosengard BR, Feng S, Alfrey EJ, Zaroff JG, Emond JC, Henry ML et al. Report of the Crystal City meeting to maximize the use of organs recovered from the cadaver donor. *Am J Transplant*. 2002; 2 (8): 701–711.
 18. Stegall MD, Stock PG, Andreoni K, Friedewald JJ, Leichtman AB. Why do we have the kidney allocation system we have today? A history of the 2014 kidney allocation system. *Hum Immunol*. 2017; 78 (1): 4–8. doi: 10.1016/j.humimm.2016.08.008.
 19. Asts.org [Internet]. The OPTN/UNOS Kidney Transplantation Committee. Kidney Allocation Concepts. Request for Information. Issued by: The Organ Procurement and Transplantation Network and United Network for Organ Sharing Kidney Transplantation Committee. Circulated for consideration September 24, 2008 through December 18, 2008. Available from: <https://ast.org/docs/default-source/optn-unos/proposed-kidney-allocation-concepts-rfi-september-24-2008.pdf?sfvrsn=8>.
 20. Wolfe RA, McCullough KP, Schaubel DE, Kalbfleisch JD, Murray S, Stegall MD et al. Calculating life years from transplant (LYFT): methods for kidney and kidney-pancreas candidates. *Am J Transplant*. 2008; 8 (4 Pt 2): 997–1011. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02177.x.
 21. Rao PS, Schaubel DE, Guidinger MK, Andreoni KA, Wolfe RA, Merion RM et al. A comprehensive risk quantification score for deceased donor kidneys: the kidney donor risk index. *Transplantation*. 2009; 27; 88 (2): 231–236. doi: 10.1097/TP.0b013e3181ac620b.
 22. Wolfe RA, McCullough KP, Leichtman AB. Predictability of survival models for waiting list and transplant patients: calculating LYFT. *Am J Transplant*. 2009; 9 (7): 1523–1527. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02708.x.
 23. Stock PG. Balancing multiple and conflicting allocation goals: a logical path forward. *Am J Transplant*. 2009; 9 (7): 1519–1522. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02715.x.
 24. Seoane-Pillado MT, Pita-Fernández S, Valdés-Cañedo F, Seijo-Bestilleiro R, Pérttega-Díaz S, Fernández-Rivera C et al. Incidence of cardiovascular events and associated risk factors in kidney transplant patients: a competing risks survival analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017; 17 (1): 72. doi: 10.1186/s12872-017-0505-6.
 25. Glicklich D, Vohra P. Cardiovascular risk assessment before and after kidney transplantation. *Cardiol Rev*. 2014; 22 (4): 153–162. doi: 10.1097/CRD.000000000000012.
 26. Stoumpos S, Jardine AG, Mark PB. Cardiovascular morbidity and mortality after kidney transplantation. *Transpl Int*. 2015; 28 (1): 10–21. doi: 10.1111/tri.12413.
 27. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C. Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev*. 2015; 20 (3): 259–272. doi: 10.1007/s10741-014-9460-9.
 28. Chopra B, Sureshkumar KK. Changing organ allocation policy for kidney transplantation in the United States. *World J Transplant*. 2015; 5 (2): 38–43. doi: 10.5500/wjt.v5.i2.38.
 29. OPTN.transplant.hrsa.gov [Internet]. A Guide to Calculating and Interpreting the Kidney Donor Profile Index (KDPI). Updated: May 15, 2019. Available at: https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1512/guide_to_calculating_interpreting_kdpi.pdf.

30. *Israni AK, Salkowski N, Gustafson S, Snyder JJ, Friedewald JJ, Formica RN et al.* New national allocation policy for deceased donor kidneys in the United States and possible effect on patient outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2014; 25 (8): 1842–1848. doi: 10.1681/ASN.2013070784.
31. *Massie AB, Luo X, Lonze BE, Desai NM, Bingaman AW, Cooper M et al.* Early changes in kidney distribution under the new allocation system. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27 (8): 2495–2501. doi: 10.1681/ASN.2015080934.
32. *Wang CJ, Wetmore JB, Israni AK.* Old versus new: Progress in reaching the goals of the new kidney allocation system. *Hum Immunol.* 2017; 78 (1): 9–15. doi: 10.1016/j.humimm.2016.08.007.
33. Transpl.ru [Интернет]. Профессиональная ассоциация: Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». Национальные клинические рекомендации: трансплантация почки. 2016. Доступно по ссылке: http://transpl.ru/files/rto/transpl_pochki.pdf. Transpl.ru [Internet]. Professional Association: Russian public organization of transplantologists «Russian transplant society». National clinical guidelines: kidney transplantation. 2016. [In Russ] Available at: http://transpl.ru/files/rto/transpl_pochki.pdf.
34. *Schulte K, Klasen V, Vollmer C, Borzikowsky C, Kunzendorf U, Feldkamp T.* Analysis of the eurotransplant kidney allocation algorithm: How should we balance utility and equity? *Transplant Proc.* 2018; 50 (10): 3010–3016. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.08.040.
35. *Smits JM, van Houwelingen HC, De Meester J, Persijn GG, Claas FH.* Analysis of the renal transplant waiting list: application of a parametric competing risk method. *Transplantation.* 1998; 15; 66 (9): 1146–1153. doi: 10.1097/00007890-199811150-00006.
36. *Bouaoun L, Villar E, Ecochard R, Couchoud C.* Excess risk of death increases with time from first dialysis for patients on the waiting list: implications for renal allograft allocation policy. *Nephron Clin Pract.* 2013; 124 (1–2): 99–105. doi: 10.1159/000355549.
37. OPTN.transplant.hrsa.gov [Internet]. OPTN policies (last updated 10/01/2019). 2019. Available at: https://optn.transplant.hrsa.gov/media/1200/optn_policies.pdf.
38. Bioinformatics.bethematchclinical.org [Internet]. The National Marrow Donor Program Database. Available at <https://bioinformatics.bethematchclinical.org/>.
39. Allele frequencies.net [Internet]. The Allele Frequency Net Database. Available at <http://www.allelefrequencies.net>.
40. *Vranic GM, Ma JZ, Keith DS.* The role of minority geographic distribution in waiting time for deceased donor kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2014; 14 (11): 2526–2534. doi: 10.1111/ajt.12860.
41. *Leffell MS, Cherikh WS, Land G, Zachary AA.* Improved definition of human leukocyte antigen frequencies among minorities and applicability to estimates of transplant compatibility. *Transplantation.* 2007; 83 (7): 964–972.
42. *Favoino B, Frugis Caggianelli L, Mininni D, Nitti M, Battaglia M, Ditunno P et al.* Rare phenotype and transplantability in cadaveric kidney transplant. *Transplant Proc.* 2004; 36 (3): 479–480.
43. *Piazza A, Ozzella G, Poggi E, Caputo D, Manfreda A, Adorno D.* Virtual crossmatch in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2014; 46 (7): 2195–2198. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.07.053.
44. *Jackson AM.* The Virtual Crossmatch: An Essential Tool for Transplanting Sensitized Patients. *Clin Transpl.* 2014; 131–136.
45. *Duquesnoy RJ.* Are we ready for epitope-based HLA matching in clinical organ transplantation? *Transplantation.* 2017; 101 (8): 1755–1765. doi: 10.1097/TP.0000000000001667.
46. *Claas FH, Witvliet MD, Duquesnoy RJ, Persijn GG, Doxiadis II.* The acceptable mismatch program as a fast tool for highly sensitized patients awaiting a cadaveric kidney transplantation: short waiting time and excellent graft outcome. *Transplantation.* 2004; 27; 78 (2): 190–193. doi: 10.1097/01.tp.0000129260.86766.67.
47. *Heidt S, Haasnoot GW, Claas FHJ.* How the definition of acceptable antigens and epitope analysis can facilitate transplantation of highly sensitized patients with excellent long-term graft survival. *Curr Opin Organ Transplant.* 2018; 23 (4): 493–499. doi: 10.1097/MOT.0000000000000545.

*Статья поступила в редакцию 17.10.2019 г.
The article was submitted to the journal on 17.10.2019*

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^{1, 2}, А.В. Аксенова¹, А.А. Улыбышева^{1, 3}, Н.П. Можейко¹, Е.А. Никитина¹, В.И. Орлов¹, Е.А. Стаханова¹, А.О. Шевченко^{1, 2}

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

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

³ 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^{1, 2}, A.V. Aksyonova¹, A.A. Ulybysheva^{1, 3}, N.P. Mozheiko¹, E.A. Nikitina¹, V.I. Orlov¹, E.A. Stakhanova¹, A.O. Shevchenko^{1, 2}

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

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

³ 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 (*Objective*),

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 (*keywords*) 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). 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

Готьё 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, Цирульников ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА (2008), 246 с. Gautier SV, Konstantinov BA, Tsi-rulnikova OM. Transplantatsiya pecheni. M.: MIA (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

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: **Objective, 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 ...%, $p =$ ».*

Keywords

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). 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

**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).

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 17.04.20.

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, Бежавский пер., 46.

Заказ

