

ISSN 1995-1191

# ВЕСТНИК

ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ  
И ИСКУССТВЕННЫХ  
ОРГАНОВ



Russian Journal  
of Transplantology  
and Artificial Organs

ТОМ XXIII

№3–2021

# ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ



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

УЧРЕДИТЕЛИ: ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ  
ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ  
«РОССИЙСКОЕ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»  
ФГБУ «НМИЦ ТИО ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»  
МИНЗДРАВА РОССИИ

ФГАОУ ВО ПЕРВЫЙ МГМУ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА  
МИНЗДРАВА РОССИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

2021. Том XXIII. № 3

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

**Главный редактор – С.В. Готье**  
(Москва, Россия), академик РАН, д. м. н.,  
профессор (редактор раздела «Организация  
трансплантологической помощи»)

**Заместитель главного редактора – О.П. Шевченко**  
(Москва, Россия), д. м. н., профессор  
(редактор раздела «Трансплантомика»)

**Ответственный секретарь – Е.А. Стаханова**  
(Москва, Россия), к. б. н.  
E-mail: stahanova.ekaterina@mail.ru

**Технический секретарь – Н.Ш. Бегмуродова**  
(Москва, Россия).  
E-mail: edr.begmurodova@gmail.com

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

- С.Ф. Багненко** (Санкт-Петербург, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**Л.С. Барбараш** (Кемерово, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**А.В. Васильев** (Москва, Россия) – член-корреспондент РАН, д. б. н., профессор  
**Л.А. Габбасова** (Москва, Россия) – д. м. н.  
**Г. Данович** (Лос-Анжелес, США) – профессор  
**М.Г. Иткин** (США, Филадельфия) – профессор  
**В.А. Порханов** (Краснодар, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**Л.М. Рошаль** (Москва, Россия) – 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  
**М.Ш. Хубутия** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**А.М. Чернявский** (Новосибирск, Россия) – д. м. н., профессор  
**В.П. Чехонин** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**Е.В. Шлякто** (Санкт-Петербург, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор  
**П.К. Яблонский** (Санкт-Петербург, Россия) – д. м. н., профессор

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

SHUMAKOV NATIONAL MEDICAL RESEARCH CENTER  
OF TRANSPLANTOLOGY AND ARTIFICIAL ORGANS  
I.M. SECHENOV FIRST MOSCOW STATE MEDICAL UNIVERSITY  
(SECHENOV UNIVERSITY)

2021. Vol. XXIII. № 3

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 (*editor of the section  
«Organization of transplant care»*)

**Deputy Chief Editor – O.P. Shevchenko**  
(Moscow, Russia), MD, PhD, professor  
(*editor of the section «Transplantomics»*)

**Scientific Editor – E.A. Stakhanova**  
(Moscow, Russia), PhD.  
E-mail: stahanova.ekaterina@mail.ru

**Technical Editor – N.Sh. Begmurodova**  
(Moscow, Russia).  
E-mail: edr.begmurodova@gmail.com

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

## EDITORIAL COUNCIL

- S.F. Bagnenko** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**L.S. Barbarash** (Kemerovo, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**A.V. Vasiliev** (Moscow, Russia) – PhD, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences  
**L.A. Gabbasova** (Moscow, Russia) – MD, PhD  
**G. Danovich** (Los Angeles, USA) – MD, PhD, professor  
**M.G. Itkin** (Philadelphia, USA) – MD, professor  
**V.A. Porkhanov** (Krasnodar, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**L.M. Roshal** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor  
**G.T. Sukhikh** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**V.A. Tkathuk** (Moscow, Russia) – PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**M.Sh. Khubutiya** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences  
**A.M. Chernyavskiy** (Novosibirsk, Russia) – MD, PhD, professor  
**V.P. Chehonin** (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

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

**С.А. Борзенко** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор  
**А.В. Ватазин** (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  
**Н.Ф. Климусева** (Екатеринбург, Россия) – д. м. н.  
**О.Н. Котенко** (Москва, Россия) – к. м. н.  
**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. (редактор раздела «Донорство органов»)  
**Б.Л. Миронков** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор (редактор раздела «Смежная дисциплина»)  
**Ю.П. Островский** (Минск, Республика Беларусь) – академик НАНБ, д. м. н., профессор  
**Ки Донг Пак** (Сеул, Южная Корея) – профессор  
**Я.Л. Поз** (Москва, Россия) – к. м. н. (редактор раздела «Заместительная почечная терапия»)  
**В.Н. Попцов** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор  
**О.Н. Резник** (Санкт-Петербург, Россия) – д. м. н.  
**О.О. Руммо** (Минск, Республика Беларусь) – член-корреспондент НАНБ, д. м. н., профессор  
**Р.Ш. Сaitгареев** (Москва, Россия) – д. м. н., профессор  
**В.И. Севастьянов** (Москва, Россия) – д. б. н., профессор (редактор раздела «Регенеративная медицина и клеточные технологии»)  
**С.М. Хомяков** (Москва, Россия) – к. м. н.  
**О.М. Цирульникова** (Москва, Россия) – д. м. н. (редактор раздела «Клиническая трансплантология»)  
**А.О. Шевченко** (Москва, Россия) – член-корреспондент РАН, д. м. н., профессор (редактор раздела «Трансплантация сердца и вспомогательное кровообращение»)

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» включен ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России в перечень российских рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты исследований в рамках диссертаций, представляемых к защите в диссертационный совет ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России

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

## EDITORIAL BOARD

**C.A. Borzenok** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor  
**A.V. Vatazin** (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, professor  
**V.M. Zakharevich** (Moscow, Russia) – MD, PhD  
**G.P. Itkin** (Moscow, Russia) – PhD, professor  
**P.J. Kaliciński** (Warsaw, Poland) – MD, PhD, professor  
**N.F. Klimusheva** (Ekaterinburg, Russia) – MD, PhD  
**O.N. Kotenko** (Moscow, Russia) – MD, PhD  
**J. Lerut** (Brussels, Belgium) – MD, PhD, professor  
**G. Massard** (Strasbourg, France) – MD, PhD, professor  
**I.A. Miloserdov** (Moscow, Russia) – MD, PhD  
**M.G. Minina** (Moscow, Russia) – MD, PhD (editor of the section «Organ donation»)  
**B.L. Mironkov** (Moscow, Russia), MD, PhD, professor (editor of the section «Related subjects»)  
**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  
**I.L. Poz** (Moscow, Russia), MD, PhD (editor of the section «Renal replacement therapy»)  
**V.N. Poptsov** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor  
**O.N. Reznik** (Saint Petersburg, Russia) – MD, PhD  
**O.O. Rummo** (Minsk, Belarus) – MD, PhD, professor, corresponding member of National Academy of Sciences of Belarus  
**R.Sh. Saitgareev** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor  
**V.I. Sevastianov** (Moscow, Russia) – PhD, professor (editor of the section «Regenerative medicine and cellular technology»)  
**S.M. Khomyakov** (Moscow, Russia) – MD, PhD  
**O.M. Tsurulnikova** (Moscow, Russia) – MD, PhD, (editor of the section «Clinical transplantology»)  
**A.O. Shevchenko** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, corresponding member of Russian Academy of Sciences (editor of the section «Heart transplantation and assisted circulation»)

«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 included by the Federal State Budgetary Institution «Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs» of the Ministry of Health of Russia in the list of Russian peer-reviewed scientific publications in which the main results of research should be published within the framework of dissertations submitted for defense to the dissertation council of Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

«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](mailto:vestniktranspl@gmail.com)  
Интернет-сайт журнала: <http://journal.transpl.ru>  
Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>

### Address for correspondence:

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

Подписной индекс в каталоге ООО «Прессинформ» («Газеты и журналы») – 80248

# СОДЕРЖАНИЕ

## СТРАНИЦА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

V национальный конгресс трансплантологов с международным участием  
*С.В. Готье*

Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2020 году. XIII сообщение регистра Российского трансплантологического общества  
*С.В. Готье, С.М. Хомяков*

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

Первый в Российской Федерации опыт пересадки печени и почек, полученных от доноров с внегоспитальной остановкой кровообращения: обобщение 3-летних результатов

*О.Н. Резник, А.Е. Скворцов, В.С. Дайнеко, И.В. Логинов, А.А. Кутенков, С.С. Комедев, В.М. Теплов, Д.О. Кузьмин, А.Н. Ананьев, И.В. Ульянкина, Д.В. Гоголев, А.А. Кукушкин, М.Е. Малышев, А.А. Бойков, В.Е. Савелло, А.Н. Морозов, С.Ф. Багненко*

Билиарная реконструкция при трансплантации печени у детей весом до 15 кг; сравнение методов «проток в проток» и гепатикоюностомии на петле по Ру  
*S.M. Dehghani, M. Ataollahi, F. Salimi, K. Kazemi, S. Gholami, I. Shahramian, F. Parooie, M. Salarzaei, A. Aminisefat*

Успешные клинические случаи реконструктивно-пластических лапароскопических операций на мочеточнике трансплантированной почки  
*Д.А. Сайдюлаев, С.В. Садовников, Р.Г. Биктимиров, П.М. Гаджиева, И.А. Милосердов*

Особенности нервно-психического развития детей с билиарной атрезией после трансплантации печени  
*А.В. Сыркина, И.Е. Пашкова, А.Р. Монахов, О.В. Силина, Е.В. Чеклецова, С.Ю. Олешкевич, И.Б. Комарова, О.М. Цирульников*

МикроРНК-27 и -339 при фиброзе миокарда трансплантированного сердца: анализ диагностической значимости  
*О.П. Шевченко, Д.А. Великий, С.О. Шарапченко, О.Е. Гичкун, А.В. Марченко, А.А. Улыбышева, В.С. Павлов, Н.П. Можейко, Н.Н. Колоскова, А.О. Шевченко*

# CONTENTS

## EDITORIAL

6 5th National Congress of Transplant Surgeons featuring international participants  
*S.V. Gautier*

8 Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2020. 13<sup>th</sup> Report from the Registry of the Russian Transplant Society  
*S.V. Gautier, S.M. Khomyakov*

## ORGAN TRANSPLANTATION

35 First Russian experience in liver and kidney transplantation from donors with out-of-hospital cardiac arrest: 3 years' results  
*O.N. Reznik, A.E. Skvortsov, V.S. Daineko, I.V. Loginov, A.A. Kutenkov, S.S. Komedeve, V.M. Teplov, D.O. Kuzmin, A.N. Ananiev, I.V. Uliankina, D.V. Gogolev, A.A. Kukushkin, M.E. Malyshev, A.A. Boykov, V.E. Savello, A.N. Morozov, S.F. Bagnenko*

50 Liver transplantation in pediatric patients under 15-kg; duct-to-duct vs. Roux-en-Y hepaticojejunostomy biliary anastomoses  
*S.M. Dehghani, M. Ataollahi, F. Salimi, K. Kazemi, S. Gholami, I. Shahramian, F. Parooie, M. Salarzaei, A. Aminisefat*

61 Laparoscopic ureteral reconstruction in a kidney transplant: successful clinical cases  
*D.A. Saydulaev, S.V. Sadovnikov, R.G. Biktimirov, P.M. Gadzhieva, I.A. Miloserdov*

66 Neuropsychological development of children with biliary atresia after liver transplantation  
*A.V. Syrkin, I.E. Pashkova, A.R. Monakhov, O.V. Silina, E.V. Chekletsova, S.Yu. Oleshkevich, I.B. Komarova, O.M. Tsurulnikova*

73 Diagnostic value of microRNA-27 and -339 in heart transplant recipients with myocardial fibrosis  
*O.P. Shevchenko, D.A. Velikiy, S.O. Sharapchenko, O.E. Gichkun, A.V. Marchenko, A.A. Ulybysheva, V.S. Pavlov, N.P. Mozheiko, N.N. Koloskova, A.O. Shevchenko*

## ДОНОРСТВО ОРГАНОВ

Оценка эффективности разработанного перфузионного раствора для нормотермической *ex vivo* перфузии легких по сравнению со Steen Solution™ (экспериментальное исследование)  
*С.В. Готье, О.М. Цирульникова, И.В. Пашков, Н.В. Грудинин, Д.О. Олешкевич, Д.М. Бондаренко, Н.П. Можейко, А.А. Карпов, Н.С. Буненков*

## РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Сравнительное исследование хондрогенеза мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека при культивировании на коллагенсодержащих носителях в условиях *in vitro*

*Ю.Б. Басок, А.М. Григорьев, Л.А. Кирсанова, А.Д. Кириллова, А.М. Суббот, А.В. Цветкова, Е.А. Немец, В.И. Севастьянов*

Формирование монослоя эндотелиальных клеток на поверхности сосудистого протеза малого диаметра в условиях потока

*М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.О. Кривкина, Т.В. Глушкова, В.В. Севостьянова, А.Г. Кутихин, Л.В. Антонова*

Экспрессия тканевых ингибиторов металлопротеиназ типа 1 и 2 в створках эксплантированных биопротезов клапанов сердца – новая патогенетическая параллель между структурной дегенерацией клапана и кальцинирующим аортальным стенозом

*А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, Е.А. Овчаренко*

Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на морфофункциональное состояние изолированной почки крысы

*А.Е. Гордеева, М.Г. Шараров, В.И. Новоселов*

Ксеногенная лимфоцитарная РНК стимулирует физиологическую регенерацию скелетных мышц

*Н.В. Тишевская, Е.С. Головнева, Р.В. Галлямутдинов, А.А. Позина, Н.М. Геворкян*

Клетки Сертоли: иммуномодулирующие свойства, способы выделения и культивирования

*Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая*

Дедифференцировка зрелых крысиных гепатоцитов в длительно пролиферирующие печеночные прогениторные клетки

*А.М. Григорьев, И.В. Холоденко, А.Ю. Лупатов, Р.В. Холоденко, Л.А. Кирсанова, Ю.Б. Басок, К.Н. Ярыгин, В.И. Севастьянов*

## ORGAN DONATION

82 Evaluation of the efficacy of a novel perfusion solution for normothermic *ex vivo* lung perfusion compared with Steen solution™ (animal experimental study)

*S.V. Gautier, O.M. Tsirulnikova, I.V. Pashkov, N.V. Grudinin, D.O. Oleshkevich, D.M. Bondarenko, N.P. Mozheiko, A.A. Karpov, N.S. Bunenkov*

## REGENERATIVE MEDICINE AND CELL TECHNOLOGIES

90 Comparative study of chondrogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells when cultured in collagen-containing media under *in vitro* conditions

*Y.B. Basok, A.M. Grigoriev, L.A. Kirsanova, A.D. Kirillova, A.M. Subbot, A.V. Tsvetkova, E.A. Nemets, V.I. Sevastianov*

101 Endothelial cell monolayer formation on a small-diameter vascular graft surface under pulsatile flow conditions

*M.Yu. Khanova, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva, E.O. Krivkina, T.V. Glushkova, V.V. Sevostianova, A.G. Kutikhin, L.V. Antonova*

115 Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases type 1 and type 2 in the leaflets of explanted bioprosthetic heart valves: a new pathogenetic parallel between structural valve degeneration and calcific aortic stenosis

*A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, L.A. Bogdanov, E.A. Ovcharenko*

122 The effect of exogenous peroxiredoxin 6 on the morphofunctional state of isolated rat kidney

*A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, V.I. Novoselov*

134 Xenogeneic lymphocytic RNA stimulates skeletal muscle regeneration

*N.V. Tishevskaya, E.S. Golovneva, R.V. Gallyamutdinov, A.A. Pozina, N.M. Gevorkyan*

142 Sertoli cells: immunomodulatory properties, methods of isolation and culture

*N.N. Skaletskiy, G.N. Skaletskaya*

148 Mature rat hepatocyte dedifferentiation into long-lived proliferating hepatic progenitor cells

*A.M. Grigoriev, I.V. Kholodenko, A.Y. Lupatov, R.V. Kholodenko, L.A. Kirsanova, Y.B. Basok, K.N. Yarygin, V.I. Sevastianov*

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Толерантность и минимизация иммуносупрессивной терапии после трансплантации печени  
*О.А. Герасимова, В.В. Боровик, Н.В. Марченко, И.И. Тилеубергенов*

Иммуносенесценция как причина индивидуализированной иммуносупрессивной терапии при трансплантации почки  
*В.А. Федулкина, А.В. Ватазин, А.В. Кильдюшевский, А.Б. Зулкарнаев, Д.В. Губина, М.П. Федулкина*

Роль полиморфизма гена трансформирующего фактора роста  $\beta 1$  в развитии осложнений после трансплантации солидных органов  
*Р.М. Курабекова, О.Е. Гичкун, С.В. Мещеряков, О.П. Шевченко*

Лимфообращение и сердечная недостаточность  
*Г.П. Иткин, М.Г. Иткин*

Механизмы развития и факторы риска возникновения злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов  
*А.В. Никулин, И.В. Пашков, Я.С. Якунин*

## ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ ЭДУАРДА ИЗРАИЛЕВИЧА ГАЛЬПЕРИНА

## ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ АЛЕКСЕЯ СЕРГЕЕВИЧА ИВАНОВА

## 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

## REVIEWS

162 Tolerance and minimization of immunosuppressive therapy after liver transplantation  
*O.A. Gerasimova, V.V. Borovik, N.V. Marchenko, I.I. Tileubergenov*

171 Immunosenescence as a reason for individualized immunosuppressive therapy in kidney transplantation  
*V.A. Fedulkina, A.V. Vatazin, A.V. Kildyushevskiy, A.B. Zulkarnayev, D.V. Gubina, M.P. Fedulkina*

180 The role of TGF- $\beta 1$  gene polymorphisms in the development of post-transplant complications  
*R.M. Kurabekova, O.E. Gichkun, S.V. Meshcheryakov, O.P. Shevchenko*

186 Lymphatic circulation and heart failure  
*G.P. Itkin, M.G. Itkin*

192 Post-transplant malignancies in solid organ recipients: development mechanisms and risk factors  
*A.V. Nikulin, I.V. Pashkov, Y.S. Yakunin*

## 198 CONGRATULATION TO EDUARD GALPERIN

## 199 CONGRATULATION TO ALEXEY IVANOV

## INFORMATION

201 Instructions to authors

206 On scientific and medical personnel training at Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs

## V НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ

## 5TH NATIONAL CONGRESS OF TRANSPLANT SURGEONS FEATURING INTERNATIONAL PARTICIPANTS

*Выпуск очередного номера нашего журнала приурочен к открытию V Российского национального конгресса с международным участием «Трансплантация и донорство органов». Это значимое событие современной научной, медицинской и общественной жизни России вновь пройдет в очном режиме при участии представителей органов государственной власти, руководителей здравоохранения, общественных организаций, российских и зарубежных лидеров клинической медицины и биомедицинской науки.*



*The next issue of our journal is timed to coincide with the opening of the 5th National Congress of Transplant Surgeons themed «Organ Transplantation and Donation». The congress will be featuring international participants and guests. This event, which is significant in the modern scientific, medical and social life of Russia, will again be held physically. Expected to actively participate at the event are government authorities, heads in the healthcare industry, public organizations, Russian and foreign*

*leaders in clinical medicine and biomedical science.*

*Пандемия, вызванная коронавирусной инфекцией, внесла свои коррективы не только в нашу медицинскую деятельность, но и в привычный ритм жизни как в нашей стране, так и за рубежом. Главные силы трансплантологического сообщества были направлены на исследования, посвященные лечению и предупреждению тяжелых осложнений у реципиентов, перенесших трансплантацию солидных органов, и больных тяжелыми хроническими заболеваниями с терминальной стадией поражения жизненно важных органов в условиях пандемии COVID-19. Мы получили неоценимый опыт, и в рамках конгресса пройдет конференция, посвященная вопросам трансплантологической помощи пациентам с новой коронавирусной инфекцией.*

*Disruptions caused by the COVID-19 pandemic have fundamentally changed many things not only in our medical activities, but also in our everyday life both in our country and overseas. The transplantation community has channeled its main efforts towards research on treatment and prevention of severe complications in solid organ recipients and patients with end-stage chronic diseases affecting vital organs amidst the COVID-19 pandemic. We have gained invaluable experience and knowledge so far, and the Congress will be featuring a conference devoted to provision of transplant care to COVID-19 patients.*

*Среди основных тем конгресса – трансплантация органов педиатрическим пациентам: обсуждение организационных и правовых аспектов; обмен опытом и уникальными клиническими наблюдениями в области транспланта-*

*Among the main topics of the Congress are «Pediatric Organ Transplantation: Discussion of Organizational and Legal Aspects», «Exchange of Experience and Unique Clinical Cases in Pediatric Transplantation of Heart, Kidney and Liver», and «Development of Artificial Organs».*

ции сердца, почек, печени детям; разработка искусственных органов.

В этом году мы отмечаем 90-летие Валерия Ивановича Шумакова, заложившего основы отечественной трансплантологии и более 33 лет бесменно возглавлявшего НИИ трансплантологии и искусственных органов. Ему принадлежит ведущая роль в становлении клинической трансплантологии в нашей стране, в разработке, создании и внедрении в клиническую практику искусственных органов (клапанов сердца, кардиостимуляторов, искусственного сердца и др.). Именно Валерий Иванович явился инициатором организации и проведения первых всероссийских форумов трансплантологов, ставших традиционной площадкой для обмена опытом и научными достижениями в области трансплантологии и создания искусственных органов, консолидации врачей и ученых на пути развития медицинской науки и внедрения ее достижений в практику.

В память о нашем учителе ежегодно проводятся всероссийские конференции «Шумаковские чтения», посвященные наиболее актуальным проблемам трансплантологии. В рамках V Всероссийского конгресса трансплантологов состоится XII Шумаковские чтения «Педиатрическая трансплантация: возможности сегодня и завтра».

С уважением,  
академик РАН С.В. Готье



*This year we are celebrating the 90th anniversary of the birth of Valery Shumakov, the founding father of transplantology in Russia, who laid the foundations for organ transplants. For over 33 years, he headed the Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs. Professor Shumakov played a leading role in the development of clinical transplantology in our country. He was a central figure in the development and creation of artificial organs (heart valves, pacemakers, artificial heart and others) and their introduction into clinical practice. Valery Shumakov was the person that initiated the organization and conduct of the first National Forum of Transplantologists, which subsequently became the traditional platform for exchange of experience and scientific achievements in the field of transplantology and creation of artificial organs, for consolidation of doctors and scientists on the path to medical science development and for implementation of relevant achievements in practice.*

*National conference «Shumakov Readings» is held annually in memory of our great teacher. It is dedicated to the most pressing problems in transplantology. The 12th Shumakov Readings «Pediatric Transplantation: Opportunities Today and Tomorrow» will be held as part of the 5th National Congress of Transplant Surgeons.*

Sincerely,  
Sergey Gautier  
Member, Russian Academy of Sciences

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-8-34

# ДОНОРСТВО И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2020 ГОДУ

## XIII сообщение регистра Российского трансплантологического общества

С.В. Готье<sup>1, 2</sup>, С.М. Хомяков<sup>1</sup>

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

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

**Цель.** Провести мониторинг состояния и тенденций в развитии донорства и трансплантации органов в РФ по данным 2020 г. **Материалы и методы.** Проведено анкетирование руководителей центров трансплантации. Контроль данных осуществлялся по информационной системе учета Минздрава России. Выполнен сравнительный анализ полученных данных в динамике лет, между отдельными субъектами РФ, между центрами трансплантации. **Результаты.** По данным регистра, в 2020 г. в РФ функционировали 44 программы трансплантации почки, 29 – печени и 16 – сердца. Лист ожидания трансплантации почки в 2020 г. включал примерно 11,5% от общего числа 60 000 пациентов, получающих диализ. Уровень донорской активности в 2020 г. составил 3,9 на 1 млн населения, при этом доля мультиорганных изъятий составила 74,6%, среднее число органов, полученных от одного эффективного донора – 2,9. В 2020 г. частота трансплантации почки составила 7,7 на 1 млн населения, показатель трансплантации печени – 3,8 на 1 млн населения; показатель трансплантации сердца – 1,7 на 1 млн населения. В 2020 году число трансплантаций в РФ на фоне эпидемии новой коронавирусной инфекции COVID-19 снизилось на 19,2% – до 13,4 на 1 млн населения. На территории Москвы и Московской области в 2020 г. функционировали 13 из 14 центров трансплантации, которые выполнили 66,3% от всех трансплантаций почки и 72,4% от всех экстраренальных трансплантаций. Число пациентов с трансплантированными органами в РФ превышает 130 на 1 млн населения. **Заключение.** В 2020 году, несмотря на эпидемию новой коронавирусной инфекции COVID-19 и связанные с этим ограничительные меры, центры трансплантации продолжали выполнять трансплантации органов, работать с листом ожидания и наблюдать пациентов с трансплантированными органами. Однако снизилось число эффективных доноров (–22,9%) и число трансплантаций органов (–19,2%), ориентировочно до уровня 2017 г. В 2021 году центрам трансплантации при поддержке органов здравоохранения предстоит восстанавливать объемы трансплантационной помощи с учетом реальной потребности населения и донорского ресурса. Фактор COVID-19, включая вакцинацию населения, а также финансовое обеспечение трансплантационных программ будут определяющими в формировании тенденции развития трансплантационной помощи и органного донорства в субъектах РФ в перспективе 1–2 года.

*Ключевые слова:* донорство органов, трансплантация почки, печени, сердца, легких, поджелудочной железы, центр трансплантации, лист ожидания, регистр, COVID-19.

**Для корреспонденции:** Хомяков Сергей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (903) 150-89-55. E-mail: profkom\_transpl@mail.ru

**Corresponding author:** Sergey Khomyakov. Address: 1, Schukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (903) 150-89-55. E-mail: profkom\_transpl@mail.ru

# ORGAN DONATION AND TRANSPLANTATION IN THE RUSSIAN FEDERATION IN 2020

## 13<sup>th</sup> Report from the Registry of the Russian Transplant Society

S.V. Gautier<sup>1, 2</sup>, S.M. Khomyakov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to monitor the current trends and developments in organ donation and transplantation in the Russian Federation based on the 2020 data. **Materials and methods.** Heads of organ transplant centers were surveyed through questionnaires. Data control was done using the information accounting system of the Russian Ministry of Health. Between separate federal subjects of the Russian Federation and between transplantation centers, comparative analysis of data obtained over years was performed. **Results.** Based on data retrieved from the 2020 Registry, 44 kidney, 29 liver and 16 heart transplantation programs were functioning in the Russian Federation in 2020. The kidney transplant waitlist in 2020 included about 11.5% of the total 60,000 patients receiving dialysis. Organ donation activity in 2020 was 3.9 per million population, with a 74.6% multi-organ procurement rate and an average of 2.9 organs being procured from one effective donor. In 2020, there were 7.7 kidney transplants per million population, 3.8 liver transplants per million population and 1.7 heart transplants per million population. Same year, the number of transplant surgeries performed in the Russian Federation fell by 19.2% to 13.4 per million population against the background of the outbreak caused by the new coronavirus disease COVID-19. The city of Moscow and the Moscow region in 2020 accounted for 13 out of the 14 functioning organ transplantation centers, performing 66.3% of all kidney transplants and 72.4% of all extrarenal transplants in the country. The number of organ recipients in the Russian Federation have exceeded 130 per million population. **Conclusion.** In 2020, despite the new coronavirus disease COVID-19 pandemic and accompanying restrictive measures, transplant centers continued to perform organ transplants, run a waiting list and monitor organ recipients. However, the number of effective donors (–22.9%) and organ transplants (–19.2%) decreased, tentatively to the 2017 levels. In 2021, transplant centers with support from health authorities will have to restore the volume of transplant care with consideration to the real needs of the population and the donor resource. The COVID-19 factor, including vaccination of the population, as well as financial support to transplantation programs, will be decisive in shaping the trend of transplantation care and organ donation in the federal subjects of the Russian Federation in the coming 1–2 years.

*Keywords: organ donation, kidney, liver, heart, lung, pancreas transplantation, transplant center, waiting list, registry, COVID-19.*

### ВВЕДЕНИЕ

Мониторинг состояния и тенденций развития донорства и трансплантации органов в России в форме регистра проводится под эгидой профильной комиссии по трансплантологии Минздрава России и Российского трансплантологического общества, предыдущие сообщения были опубликованы в 2009–2020 гг. [1–11].

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

С 2016 г. регистр используется в качестве инструмента контроля качества и полноты сбора данных в информационной системе учета донорских органов

и тканей человека, доноров и реципиентов, действующей в соответствии с приказом Минздрава России от 8 июня 2016 г. № 355н.

Ежегодные сообщения регистра – это не только статистические данные за отчетный период, но и их системный анализ с оценкой существующего положения дел в трансплантологии, проблем, тенденций и перспектив дальнейшего развития данной отрасли здравоохранения.

С 2019 г. регистр применяется для мониторинга реализации ведомственной целевой программы «Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации», утвержденной приказом Минздрава России от 4 июня 2019 г. № 365.

Сбор данных для регистра осуществляется путем анкетирования ответственных лиц всех центров трансплантации в Российской Федерации. Сравнительный анализ полученных данных проводится в динамике лет, между отдельными регионами, цент-

рами трансплантации и с данными международных регистров.

Рабочая группа выражает благодарность всем постоянным и новым участникам регистра, предоставившим данные, а также Министерству здравоохранения Российской Федерации и ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт организации и информатизации здравоохранения» Минздрава России.

### ЦЕНТРЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ И ЛИСТЫ ОЖИДАНИЯ

В Российской Федерации центры трансплантации расположены в 32 субъектах РФ с общим населением 99,3 млн человек (рис. 1).

В 2020 году, несмотря на эпидемию новой коронавирусной инфекции COVID-19 и связанные с этим ограничительные меры, большинство из 60 функционирующих центров трансплантации продолжали оказывать трансплантационную помощь населению; 11 медицинских организаций, в которых располагаются центры трансплантации, приостанавливали на разные сроки оказание трансплантационной помощи в связи с перепрофилированием (табл. 1).

Трансплантация почки осуществлялась в 44 центрах, трансплантация печени – в 29, трансплантация сердца – в 16, трансплантация поджелудочной железы – в 3, трансплантация легких – в 3, трансплантация тонкой кишки – в 1.

Из 60 центров трансплантации: 19 – это учреждения федерального подчинения, включая 11 учреждений Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2 учреждения Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 4 учреждения Федерального медико-биологического агентства, 2 учреждения Министерства обороны России; 41 – это учреждения субъектов РФ.

В листе ожидания трансплантации почки в течение 2020 г. в РФ состояло 6929 потенциальных реципиентов, то есть 11,5% от общего числа пациентов, получающих лечение гемо- и перитонеальным диализом (приблизительно 60 000). Из них 1433 были включены в лист ожидания в 2020 г. впервые. Показатель смертности в период ожидания трансплантации почки в РФ в 2020 г. составил 1,8% (125 пациентов).

В листе ожидания трансплантации печени в течение 2020 г. состояло 2237 потенциальных реципиентов, из них 780 были включены в лист ожидания впервые в 2020 году. Показатель смертности в период ожидания трансплантации печени в РФ в 2020 г. составил 5,5% (124 пациента).

В листе ожидания трансплантации сердца в течение 2020 г. состояло 708 потенциальных реципиентов, из них 303 были включены в лист ожидания впервые в 2020 году. Показатель смертности в период ожидания трансплантации сердца в России составил 7,5% (53 пациента).

В период 2012–2020 гг. в РФ по мере увеличения числа трансплантаций органов наблюдается увеличение числа пациентов в листах ожидания: трансплантации почки почти в 2 раза, печени – в 4,6 раза и сердца – в 1,8 раза, при этом средние сроки ожидания трансплантации органов практически не изменились. Смертность в листах ожидания в 2012–2019 гг. имеет тенденцию к снижению, в 2020 г. с учетом эпидемии COVID-19 была выше, чем в 2019 г.

В табл. 2 представлены данные о числе потенциальных реципиентов в листах ожидания в центрах трансплантации.

В 2020 году в России было выполнено 1960 трансплантаций, или 13,4 на 1 млн населения, из них 258 пересадок органов детям (табл. 3 и 4).

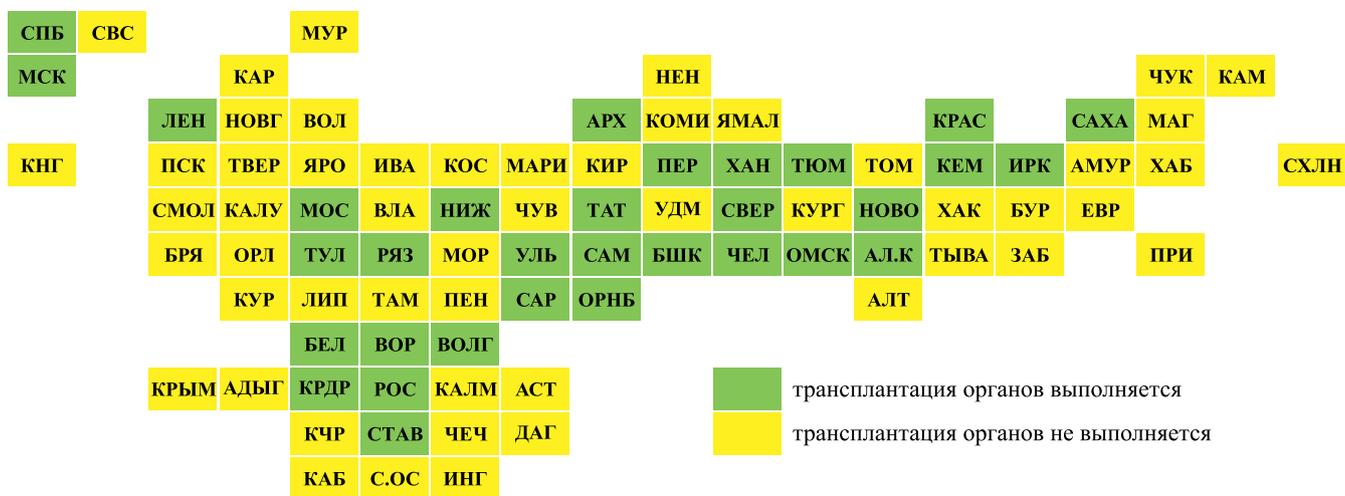


Рис. 1. География центров трансплантации органов в РФ в 2020 году

Fig. 1. Geography of organ transplant centers in Russia in 2020

Таблица 1

**Участие медицинских организаций (центров трансплантации) в оказании медицинской помощи пациентам с подозрением или установленным диагнозом COVID-19**

**Participation of medical organizations (transplant centers) in the provision of medical care to patients with suspicion or an established diagnosis COVID-19**

№	Центр трансплантации, регион, федеральный округ	Участие медицинской организации в оказании медицинской помощи пациентам с подозрением или установленным диагнозом COVID-19	Перефилирование хирургического отделения, в котором выполняются трансплантации органов, с остановкой выполнения трансплантаций органов
1	2	3	4
1	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, Москва, ЦФО	да	нет
2	Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, Волжский, ЮФО	нет	нет
3	«Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина» – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» МЗ РФ, Москва, ЦФО	да	да
4	ФГБУ «Российская детская клиническая больница» МЗ РФ, Москва, ЦФО	нет	нет
5	ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Москва, ЦФО	нет	нет
6	ФГБУ «Государственный научный центр РФ – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва, ЦФО	да	нет
7	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ, Москва, ЦФО	нет	нет
8	ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва, ЦФО	нет	нет
9	ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ», Москва, ЦФО	да	нет
10	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ», Москва, ЦФО	нет	нет
11	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, ЦФО	да	нет
12	ГБУЗ г. Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, ЦФО	нет	нет
13	ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Московская область, ЦФО	да	да
14	ФГБУ «Федеральный клинический центр высоких медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (КБ № 119), Московская область, ЦФО	да	да
15	ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневого» Минобороны России, Московская область, ЦФО	нет	нет
16	ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», Белгород, ЦФО	нет	нет
17	БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», Воронеж, ЦФО	да	нет
18	ГУЗ ТО «Тульская областная клиническая больница», Тула, ЦФО	да	да
19	ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань, ЦФО	да	нет
20	ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница», Ставрополь, СКФО	да	нет

1	2	3	4
21	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» ДЗ КК, Краснодар, ЮФО	да	нет
22	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» ДЗ КК, Краснодар, ЮФО	да	нет
23	ГБУЗ «Волжский областной уронефрологический центр», Волжский, ЮФО	нет	нет
24	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону, ЮФО	да	нет
25	ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, СЗФО	нет	нет
26	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, СЗФО	да	нет
27	ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, СЗФО	да	нет
28	ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, СЗФО	да	нет
29	ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург, СЗФО	да	нет
30	ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», Санкт-Петербург, СЗФО	нет	нет
31	СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург, СЗФО	да	да
32	ГБУЗ Архангельской области «Первая городская клиническая больница им. Е.Е. Волоевич», Архангельск, СЗФО	да	нет
33	ГБУ РС(Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», Якутск, ДФО	да	да
34	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, Новосибирск, СФО	нет	нет
35	ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск, СФО	да	нет
36	ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, СФО	да	нет
37	ГБУЗ «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», Кемерово, СФО	да	нет
38	ГАУЗ «Областная клиническая больница скорой медицинской помощи им. М.А. Подгорбунского», Кемерово, СФО	да	нет
39	ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Иркутск, СФО	да	нет
40	БУЗОО «Омская городская клиническая больница № 1 им. Кабанова А.Н.», Омск, СФО		
41	КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Барнаул, СФО	да	нет
42	ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии», Красноярск, СФО	нет	нет
43	ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск, СФО	да	да
44	КГБУ «Красноярская клиническая больница», Красноярск, СФО	да	нет
45	ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург, УФО	да	нет
46	ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск, УФО	нет	нет
47	ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», Тюмень, УФО	да	нет
48	БУ «Окружная клиническая больница», Ханты-Мансийск, УФО	да	да
49	ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Самара, ПФО	нет	нет
50	ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» МЗ РФ, Саратов, ПФО	да	да
51	ГУЗ «Областная клиническая больница», Саратов, ПФО	да	да
52	ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород, ПФО	да	нет
53	ГБУЗ НО «Специализированная кардиохирургическая клиническая больница», Нижний Новгород, ПФО	нет	нет
54	ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань, ПФО	да	нет
55	ГАУЗ «Межрегиональный клинко-диагностический центр», Казань, ПФО	нет	нет
56	ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова», Уфа, ПФО	да	нет
57	ГБУЗ «Республиканский кардиологический диспансер», Уфа, ПФО	нет	нет
58	ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая больница», Пермь, ПФО	да	нет
59	ГУЗ «Ульяновский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи им. заслуженного врача России Е.М. Чучкалова», Ульяновск, ПФО	да	нет
60	ГБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1», Оренбург, ПФО	да	да

Таблица 2

Листы ожидания трансплантации органов в субъектах РФ в 2020 году  
Waiting lists for organ transplantation in the regions of the Russian Federation in 2020

1	Российская Федерация														ДФО																
	ЦФО				ЮФО				СКФО		СЗФО					СФО				УФО				ПФО							
Федеральный округ, регион, численность населения в 2020 г. (млн чел.)* Вид трансплантации	Москва и Московская область	Белгородская область	Воронежская область	Тульская область	Краснодарский край	Волгоградская область	Ростовская область	Ставропольский край	Санкт-Петербург и Ленинградская область	Архангельская область без Ненецкого АО	Новосибирская область	Кемеровская область	Иркутская область	Омская область	Алтайский край	Красноярский край	Свердловская область	Тюменская область без автономных округов	Ханты-Мансийский АО – Югра	Челябинская область	Самарская область	Саратовская область	Нижегородская область	Республика Татарстан	Республика Башкортостан	Оренбургская область	Пермский край	Ульяновская область	Республика Саха (Якутия)		
		12,6	1,5	2,3	1,1	1,5	5,7	2,5	4,2	2,8	5,4	1,1	2,8	2,6	2,4	1,9	2,3	2,8	4,3	1,5	1,7	3,4	3,1	2,4	3,2	3,9	4,0	1,9	2,6	1,2	1,0
	7,7								1,9																						
2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
<b>ПОЧКА</b>																															
Число центров трансплантации	46	12	1	1	1	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Количество пациентов, включенных в ЛЮ впервые в течение 2020 г.	1433	736	6	7	0	5	41	0	30	9	66	4	40	27	19	15	20	49	25	10	13	26	27	15	35	44	2	112	4	0	
Общее количество пациентов в ЛЮ в течение 2020 г.	6929	2555	48	102	32	15	397	110	122	9	328	70	144	136	70	113	110	189	235	78	153	163	253	123	510	300	241	114	112	35	62
Количество пациентов в ЛЮ на 31.12.20 г.	5680	1894	43	86	24	7	372	91	78	0	267	68	120	94	50	87	94	160	224	63	147	146	203	112	486	251	197	110	110	34	62
Количество пациентов в ЛЮ, умерших в течение 2020 г.	125	22	1	9	0	2	0	0	7	0	0	1	1	3	0	25	0	1	2	4	2	13	3	4	10	9	6	0	0	0	0
<b>ПЕЧЕНЬ</b>																															
Число центров трансплантации	31	6	1	0	1	0	2	0	1	1	4	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Количество пациентов, включенных в ЛЮ впервые в течение 2020 г.	780	473	2	0	0	0	5	0	55	4	32	0	66	9	18	4	7	16	12	6	4	11	2	0	23	20	11	0	0	0	0
Общее количество пациентов в ЛЮ в течение 2020 г.	2237	886	68	0	5	0	51	0	171	4	233	0	101	68	19	4	49	41	109	6	7	38	2	0	202	61	96	0	0	0	16

Окончание табл. 2

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32			
Количество пациентов в ЛЮ на 31.12.20 г.	1554	437	64	0	4	0	41	0	140	0	209	0	59	59	5	4	45	26	92	2	4	31	2	0	190	39	85	0	0	0	16			
Количество пациентов в ЛЮ, умерших в течение 2020 г.	124	56	3	0	0	0	2	0	16	0	0	0	8	0	0	0	0	3	15	1	2	5	0	0	6	2	5	0	0	0	0			
<b>СЕРДЦЕ</b>																																		
Число центров трансплантации	18	4	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
Количество пациентов, включенных в ЛЮ впервые в течение 2020 г.	304	157	4	1	0	0	19	0	9	0	34	0	19	16	0	0	7	9	14	0	0	1	0	0	0	0	8	6	0	0	0	0		
Общее количество пациентов в ЛЮ в течение 2020 г.	709	317	14	1	0	0	42	0	25	0	48	0	49	67	0	0	9	35	50	0	0	10	0	0	0	16	26	0	0	0	0	0		
Количество пациентов в ЛЮ на 31.12.20 г.	404	164	12	0	0	0	22	0	17	0	19	0	25	46	0	0	7	18	34	0	0	8	0	0	0	11	21	0	0	0	0	0		
Количество пациентов в ЛЮ, умерших в течение 2020 г.	53	11	1	0	0	0	1	0	2	0	7	0	9	11	0	0	0	3	5	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0		
<b>ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА</b>																																		
Число центров трансплантации	4	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Количество пациентов, включенных в ЛЮ впервые в течение 2020 г.	14	10	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Общее количество пациентов в ЛЮ в течение 2020 г.	114	110	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Количество пациентов в ЛЮ на 31.12.20 г.	98	95	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Количество пациентов в ЛЮ, умерших в течение 2020 г.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<b>ЛЕГКИЕ</b>																																		
Число центров трансплантации	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Количество пациентов, включенных в ЛЮ впервые в течение 2020 г.	46	45	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Общее количество пациентов в ЛЮ в течение 2020 г.	94	93	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Количество пациентов в ЛЮ на 31.12.20 г.	76	76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Количество пациентов в ЛЮ, умерших в течение 2020 г.	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\* – <http://www.gks.ru>.

Таблица 3

### Донорство и трансплантация органов в РФ в 2020 году

#### Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2020

Показатель	Количество (абс.)	Показатель на 1 млн населения*
<b>Донорство органов</b>		
Всего доноров органов	890	6,1
Посмертные доноры	564	3,9
Живые (родственные) доноры	326	2,2
<b>Трансплантация органов</b>		
Всего пересажено органов, <i>из них несовершеннолетним</i>	1960 256	13,4
Почка, в т. ч. трупная от живого донора <i>из них несовершеннолетним</i>	1124 967 157 119	7,7 6,6 1,1
Печень, в т. ч. трупная от живого донора <i>из них несовершеннолетним</i>	559 390 169 131	3,8 2,7 1,2
Сердце <i>из них несовершеннолетним</i>	251 6	1,7
Поджелудочная железа	16	0,1
Легкие <i>из них несовершеннолетним</i>	11 0	0,1
Тонкая кишка <i>из них несовершеннолетним</i>	1 0	0,0

\* – Численность населения РФ в 2020 г. – 146,2 млн чел. (www.gks.ru).

\* – The total population in Russia was estimated at 146,2 million people in 2020 (www.gks.ru).

Из-за роста заболеваемости COVID-19 в субъектах РФ в ряде субъектов РФ были перепрофилированы медицинские организации, в которых функционируют центры трансплантации, для оказания медицинской помощи пациентам с подозрением или с установленным диагнозом COVID-19. Весной 2020 г. вводились известные ограничения на передвижение граждан, ограничения плановых консультаций и госпитализаций граждан.

Влияние фактора COVID-19 и связанных с этим ограничительных мер отражает ежемесячная статистика трансплантаций органов в 2020 г. (рис. 2, 3).

В 2020 году высокотехнологичная медицинская помощь по трансплантации органов финансировалась в полном объеме. По данным Федерального регистра по оказанию высокотехнологичной медицинской помощи, в 2020 г. за счет средств системы обязательного медицинского страхования, предусмотренных для оказания высокотехнологичной медицинской помощи по профилю «трансплантация», было выполнено 1842 (94,0%) трансплантации органов (в 2019 г. – 2119; 87,3%), рис. 4.

С 2010 г., когда в регистр был включен данный показатель, число трансплантаций органов, выполняемых за счет средств высокотехнологичной медицинской помощи по профилю «трансплантация», увеличилось в 2,3 раза, при этом доля трансплантаций органов, выполненных за счет указанных средств, возросла на 35,8%.

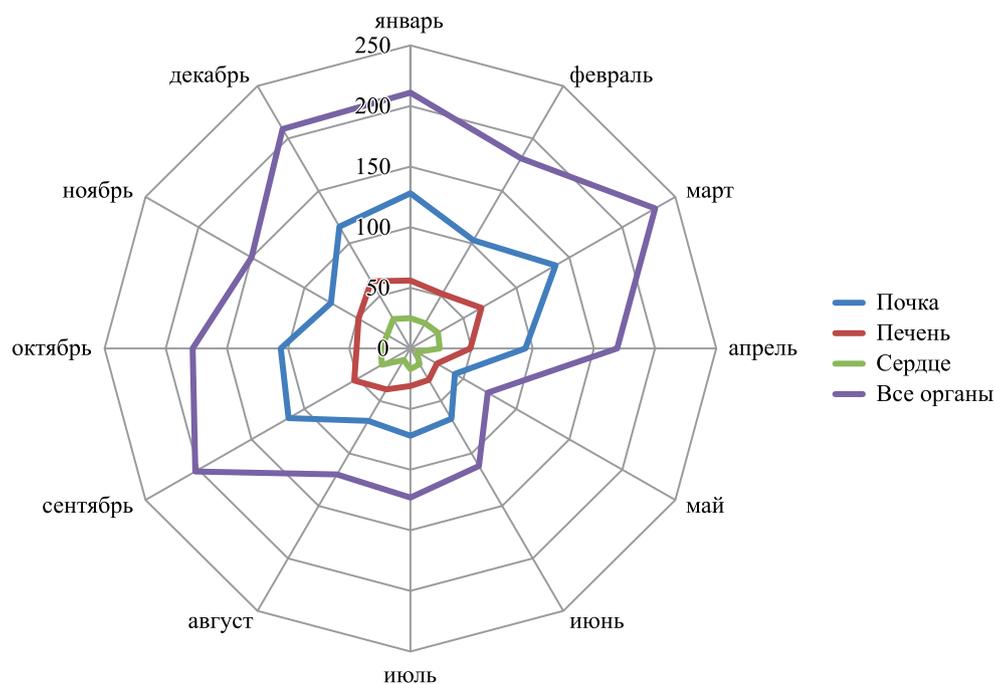


Рис. 2. Число трансплантаций органов по месяцам в 2020 году

Fig. 2. Number of organ transplants by month in 2020

Таблица 4

**Трансплантационная активность центров РФ в 2020 году**  
**Transplantation activity in the Russian Federation in 2020**

№	Центр трансплантации, регион, федеральный округ	Всего	Почка (всего)	Почка трупная	Почка родственная	Печень (всего)	Печень трупная	Печень родственная	Сердце	Поджелудочная железа	Легкие	Комплекс «сердце-легкие»	Тонкая кишка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, <b>Москва, ЦФО</b>	563	198	134	64	165	57	108	190	2	6	2	0
2	Филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, <b>Волжский, ЮФО</b>	8	8	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
3	«Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина» – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» МЗ РФ, <b>Москва, ЦФО</b>	28	28	22	6	0	0	0	0	0	0	0	0
4	ФГБУ «Российская детская клиническая больница» МЗ РФ, <b>Москва, ЦФО</b>	30	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», <b>Москва, ЦФО</b>	21	13	6	7	8	1	7	0	0	0	0	0
6	ФГБУ «Государственный научный центр РФ – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, <b>Москва, ЦФО</b>	59	12	10	2	47	10	37	0	0	0	0	0
7	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ, <b>Москва, ЦФО</b>	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
8	ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, <b>Москва, ЦФО</b>	34	34	8	26	0	0	0	0	0	0	0	0
9	ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ», <b>Москва, ЦФО</b>	110	75	75	0	35	35	0	0	0	0	0	0
10	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии ДЗМ», <b>Москва, ЦФО</b>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», <b>Москва, ЦФО</b>	333	198	196	2	118	117	1	1	13	2	0	1
12	ГБУЗ г. Москвы «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы», <b>Москва, ЦФО</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», <b>Московская область, ЦФО</b>	54	36	35	1	17	14	3	1	0	0	0	0
14	ФГБУ «Федеральный клинический центр высоких медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (КБ № 119), <b>Московская область, ЦФО</b>	8	8	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15	ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневого» Минобороны России, <b>Московская область, ЦФО</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	ОГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Святителя Иоасафа», <b>Белгород, ЦФО</b>	5	4	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0
17	БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», <b>Воронеж, ЦФО</b>	8	7	7	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	ГУЗ ТО «Тульская областная клиническая больница», <b>Тула, ЦФО</b>	6	6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
19	ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», <b>Рязань, ЦФО</b>	9	8	8	0	1	1	0	0	0	0	0	0
20	ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница», <b>Ставрополь, СКФО</b>	13	9	9	0	4	3	1	0	0	0	0	0
21	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» ДЗ КК, <b>Краснодар, ЮФО</b>	33	22	22	0	7	7	0	4	0	0	0	0
22	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 2» ДЗ КК, <b>Краснодар, ЮФО</b>	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
23	ГБУЗ «Волжский областной уронефрологический центр», <b>Волжский, ЮФО</b>	19	19	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0
24	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», <b>Ростов-на-Дону, ЮФО</b>	56	37	37	0	15	14	1	3	1	0	0	0
25	ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	17	0	0	0	17	17	0	0	0	0	0	0
26	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	18	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0
27	ФГБУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» МЗ РФ, <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	18	15	9	6	2	2	0	0	0	1	0	0
28	ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	22	20	20	0	2	2	0	0	0	0	0	0
29	ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	3	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
31	СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», <b>Санкт-Петербург, СЗФО</b>	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	ГБУЗ Архангельской области «Первая городская клиническая больница им. Е.Е. Волосевич», <b>Архангельск, СЗФО</b>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	ГБУ РС(Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», <b>Якутск, ДФО</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, <b>Новосибирск, СФО</b>	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
35	ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», <b>Новосибирск, СФО</b>	57	23	21	2	34	24	10	0	0	0	0	0
36	ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», <b>Кемерово, СФО</b>	7	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0

Окончание табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
37	ГБУЗ «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», <b>Кемерово, СФО</b>	39	39	38	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38	ГАУЗ «Областная клиническая больница скорой медицинской помощи им. М.А. Подгорбунского», <b>Кемерово, СФО</b>	9	0	0	0	9	9	0	0	0	0	0	0
39	ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», <b>Иркутск, СФО</b>	34	20	19	1	14	14	0	0	0	0	0	0
40	БУЗОО «Омская городская клиническая больница № 1 им. Кабанова А.Н.», <b>Омск, СФО</b>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	КГБУЗ «Краевая клиническая больница», <b>Барнаул, СФО</b>	20	16	16	0	4	4	0	0	0	0	0	0
42	ФГБУ «Федеральный центр сердечно-сосудистой хирургии», <b>Красноярск, СФО</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», <b>Красноярск, СФО</b>	14	12	12	0	2	2	0	0	0	0	0	0
44	КГБУ «Красноярская клиническая больница», <b>Красноярск, СФО</b>	29	16	16	0	10	10	0	3	0	0	0	0
45	ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», <b>Екатеринбург, УФО</b>	17	9	9	0	5	5	0	3	0	0	0	0
46	ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», <b>Челябинск, УФО</b>	7	4	4	0	2	2	0	1	0	0	0	0
47	ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», <b>Тюмень, УФО</b>	14	11	11	0	3	3	0	0	0	0	0	0
48	БУ «Окружная клиническая больница», <b>Ханты-Мансийск, УФО</b>	5	4	4	0	1	1	0	0	0	0	0	0
49	ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, <b>Самара, ПФО</b>	47	47	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» МЗ РФ, <b>Саратов, ПФО</b>	8	8	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0
51	ГУЗ «Областная клиническая больница», <b>Саратов, ПФО</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, <b>Нижний Новгород, ПФО</b>	20	14	8	6	6	5	1	0	0	0	0	0
53	ГБУЗ НО «Специализированная кардиохирургическая клиническая больница», <b>Нижний Новгород, ПФО</b>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
54	ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», <b>Казань, ПФО</b>	60	40	34	6	20	20	0	0	0	0	0	0
55	ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», <b>Казань, ПФО</b>	4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
56	ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова», <b>Уфа, ПФО</b>	44	38	38	0	6	6	0	0	0	0	0	0
57	ГБУЗ «Республиканский кардиологический диспансер», <b>Уфа, ПФО</b>	4	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
58	ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая больница», <b>Пермь, ПФО</b>	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
59	ГУЗ «Ульяновский областной клинический центр специализированных видов медицинской помощи им. заслуженного врача России Е.М. Чучалова», <b>Ульяновск, ПФО</b>	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
60	ГБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1», <b>Оренбург, ПФО</b>	4	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Итого</b>		<b>1960</b>	<b>1124</b>	<b>967</b>	<b>157</b>	<b>559</b>	<b>390</b>	<b>169</b>	<b>249</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

Нормативы финансовых затрат на единицу объема предоставления высокотехнологичной медицинской помощи по профилю «трансплантация» в 2020 году составили:

- для трансплантации почки, поджелудочной железы, почки и панкреатодуоденального комплекса, тонкой кишки, легких – 950,896 тыс. руб.;
- для трансплантации сердца, печени – 1206,336 тыс. руб.;

– для трансплантации комплекса «сердце–легкие» – 1723,623 тыс. руб.  
(Постановление Правительства РФ от 7 декабря 2019 года № 1610).

### ДОНОРСТВО ОРГАНОВ

В 2020 году донорские программы осуществлялись в 31 (из 85) субъекте РФ с населением 98,3 млн человек. В Пермском крае, Ульяновской области и

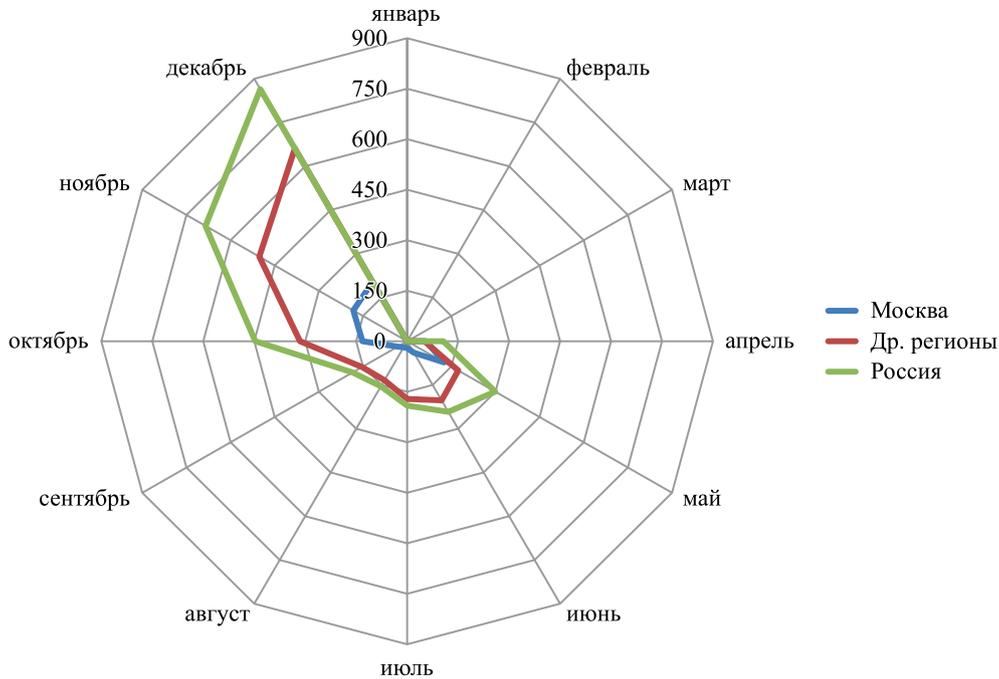


Рис. 3. Заболеваемость COVID-19 по месяцам в 2020 году

Fig. 3. COVID-19 incidence by month in 2020

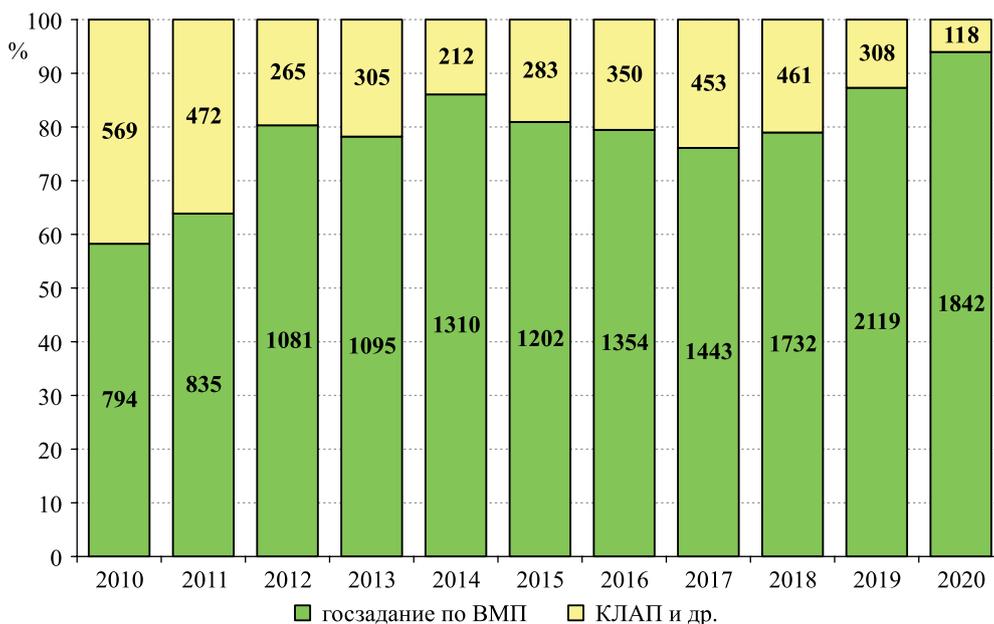


Рис. 4. Финансирование трансплантаций органов в РФ в 2010–2020 г.

Fig. 4. Funding for Organ Transplants in the Russian Federation in 2010–2020

Саратовской области выполнялись только трансплантации почки от живого родственного донора.

Число эффективных посмертных доноров в 2020 г. составило 564, или 3,9 на 1 млн населения (табл. 5).

В 2020 году в части больниц, участвующих в донорском обеспечении центров трансплантации, отделения реанимации и интенсивной терапии были перепрофилированы для оказания медицинской помощи пациентам с тяжелым течением COVID-19.

Прошедший год продолжил тенденцию увеличения доли эффективных доноров органов старше 60 лет, в 2020 г. она превысила 20%. Доноров-мужчин было 73,0%; доноров-женщин – 27%. Возрастная структура эффективных доноров органов представлена на рис. 5.

Донорская активность в расчете на численность населения регионов, реализующих донорские программы (95,9 млн), составила 5,9 на 1 млн населения (табл. 6, 7). Стабильно высокий показатель донорской активности европейского уровня сохранился в Москве (20,9), также устойчиво сохранялись показатели в Кемеровской области (10,0), Самарской области (7,5), Иркутской области (6,7). Ленинградской области (6,1). На долю Москвы и Московской области в 2020 г. приходится 50,3% (284) эффективных доноров.

В 2020 году продолжилось расширение практики констатации смерти мозга. Число эффективных доноров с диагнозом «смерть мозга» составило 547, их доля в общем пуле эффективных доноров составила 97,0% (в 2019 г. – 94,5%), рис. 6.

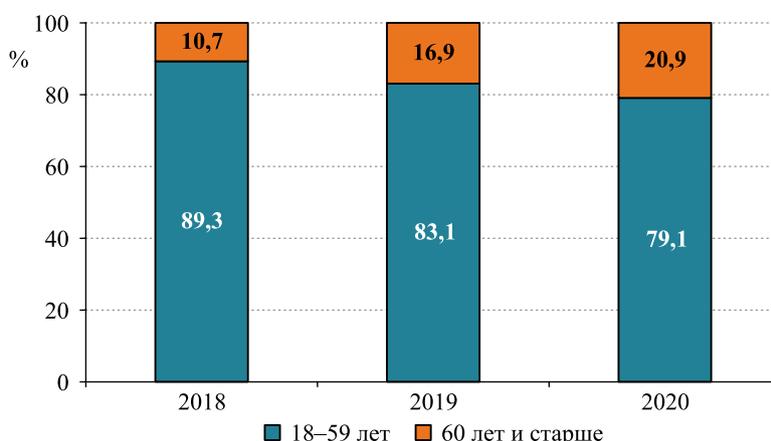


Рис. 5. Возрастная структура эффективных доноров органов в 2018–2020 гг.

Fig. 5. Age structure of effective organ donors in 2018–2020

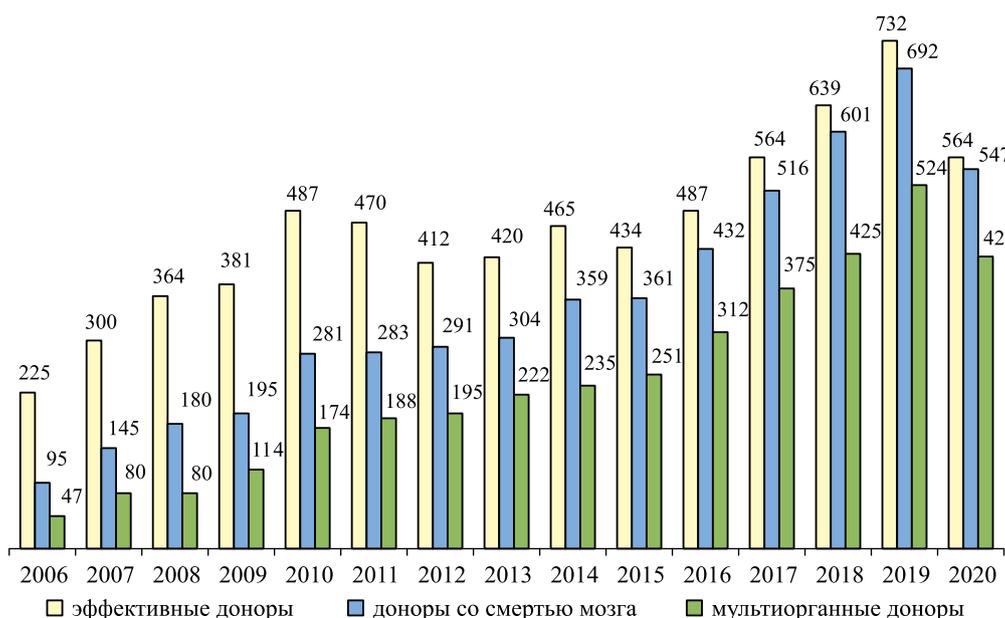


Рис. 6. Структура эффективных доноров органов в РФ в 2006–2020 гг.

Fig. 6. Structure of effective organ donors in the Russian Federation in 2006–2020

Таблица 5

**Показатели, связанные с донорской активностью в регионах РФ в 2020 г.**  
**The indicators connected with the organ donation activity in the regions of the Russian Federation in 2020**

№ пп.	Регион	Центр координации органного донорства, регион	Население (млн)		Число донорских газ		Эффективные доноры (абс., на 1 млн населения)		в т.ч. с диагнозом «Смерть мозга» (абс., %)		в т.ч. мультиорганные доноры (абс., %)		Всего заготовлено органов	в т.ч. заготовлено почек	Коэффициент «количество органов / количество почек»	Процент заготовлено почек	
			4	5	6	7	8	9	10	11	12	13					14
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
1	Москва	Московский координационный центр органного донорства, Москва (ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы»)	12,6	17	263	20,9	260	98,9	219	83,3	857	457	3,3	86,9			
2	Московская область	ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Москва	7,5	33	21	2,8	21	100,0	20	95,2	54	42	2,6	100,0			
3	Белгородская область	ГБУЗ «Белгородская областная клиническая больница Свяителя Иоасафа», Белгород	1,5	1	2	1,3	2	100,0	1	50,0	5	4	2,5	100,0			
4	Воронежская область	ГБУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», Воронеж	2,3	10	4	1,7	4	100,0	1	25,0	9	7	2,3	87,5			
5	Тульская область	ГБУЗ ТО «Тульская областная клиническая больница», Тула	1,5	1	3	2,0	3	100,0	3	100,0	11	6	3,7	100,0			
6	Рязанская область	ГБУ РО «Рязанская областная клиническая больница», Рязань	1,1	1	6	5,5	6	100,0	5	83,3	19	12	3,2	100,0			
7	Краснодарский край	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» ДЗ КК, Краснодар	5,6	2	13	2,3	13	100,0	9	69,2	35	22	2,7	84,6			
8	Волгоградская область	ГБУЗ «Волжский областной уронефрологический центр», Волжский	2,5	11	10	4,0	10	100,0	0	0,0	20	20	2,0	100,0			
9	Ростовская область	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону	4,2	1	18	4,3	18	100,0	14	77,8	53	35	2,9	97,2			
10	Ставропольский край	ГБУЗ СК «Ставропольская краевая клиническая больница», Ставрополь	2,8	1	13	4,6	13	100,0	11	84,6	37	26	2,8	100,0			
11	Санкт-Петербург	Центр органного и тканевого донорства, Санкт-Петербург (ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе»)	5,4	14	25	4,6	25	100,0	22	88,0	69	33	2,8	66,0			
12	Ленинградская область	ГБУЗ «Ленинградская областная клиническая больница», Санкт-Петербург	1,8	1	11	6,1	11	100,0	7	63,6	29	22	2,6	100,0			

Окончание табл. 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
13	Архангельская область	ГБУЗ Архангельской области «Первая ГКБ им. Е.Е. Волоосевич», Архангельск	1,1	1	1	0,9	1	100,0	1	100,0	3	2	3,0	100,0
14	Новосибирская область	ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск	2,8	10	15	5,4	15	100,0	11	73,3	32	15	2,1	50,0
15	Кемеровская область	ГБУЗ «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», Кемерово	2,7	15	27	10,0	18	66,7	17	63,0	70	44	2,6	81,5
16	Иркутская область	ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Иркутск	2,4	1	16	6,7	15	93,8	13	81,3	32	19	2,0	59,4
17	Омская область	БУЗОО «Омская городская клиническая больница № 1 им. Кабанова А.Н.», Омск	1,9	2	2	1,1	2	100,0	1	50,0	3	2	1,5	50,0
18	Алтайский край	КГБУЗ «Краевая клиническая больница», Барнаул	2,3	1	9	3,9	9	100,0	9	100,0	27	18	3,0	100,0
19	Красноярский край	КГБУ «Красноярская клиническая больница», Красноярск	2,9	12	10	3,4	10	100,0	9	90,0	29	17	2,9	85,0
20	Свердловская область	ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург	4,3	8	6	1,4	6	100,0	5	83,3	19	11	3,2	91,7
21	Челябинская область	ГБУЗ «Челябинская областная клиническая больница», Челябинск	3,5	1	3	0,9	3	100,0	2	66,7	9	6	3,0	100,0
22	Тюменская область	ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», Тюмень	1,5	1	5	3,3	5	100,0	3	60,0	14	10	2,8	100,0
23	Ханты-Мансийский автономный округ – Югра	БУ «Окружная клиническая больница», Ханты-Мансийск	1,7	8	3	1,8	3	100,0	2	66,7	8	6	2,7	100,0
24	Самарская область	ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» МЗСР РФ, Самара	3,2	5	24	7,5	20	83,3	4	16,7	52	48	2,2	100,0
25	Саратовская область	ГУЗ «Областная клиническая больница», Саратов	2,4	1	0	0,0	0	–	0	–	0	0	–	–
26	Нижегородская область	ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» ФМБА России, Нижний Новгород	3,2	9	5	1,6	5	100,0	4	80,0	16	8	3,2	80,0
27	Республика Татарстан	ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань	3,9	2	21	5,4	21	100,0	19	90,5	57	34	2,7	81,0
28	Республика Башкортостан	ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Кувагова», Уфа	4,1	12	18	4,4	18	100,0	6	33,3	46	36	2,6	100,0
29	Оренбургская область	МБУЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 1», Оренбург	2,0	2	1	0,5	1	100,0	1	100,0	3	2	3,0	100,0
30	Республика Саха (Якутия)	ГАУ РС (Я) «Республиканская больница № 1 – Национальный центр медицины», Якутск	1,0	1	0	0,0	0	–	0	–	0	0	–	–
31	Ведомственная программа ФМБА России	ФГБУ ГНЦ «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва	–	28	1	–	1	100,0	0	0,0	1	0	1,0	0,0
32	Ведомственная программа ФМБА РФ	ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России», Красноярск	–	5	8	–	8	100,0	2	25,0	17	14	2,1	87,5
		<b>Всего</b>	<b>146,2</b>	<b>218</b>	<b>564</b>	<b>3,9</b>	<b>547</b>	<b>97,0</b>	<b>421</b>	<b>74,6</b>	<b>1636</b>	<b>978</b>	<b>2,9</b>	<b>86,7</b>

В стране отсутствуют донорские программы, не использующие протокол диагностики смерти человека на основании диагноза «смерть мозга». В 24 субъектах РФ донорские программы работали только с донорами с диагнозом «смерть мозга». В Кемеровской области, которая отстает по данному показателю от других регионов, отмечается последовательное увеличение доли доноров со смертью мозга: 2018 г. – 36,7%, 2019 г. – 47,5%; 2020 г. – 66,7%.

В 2020 году всего было выполнено 421 мультиорганный изъятие, доля мультиорганных изъятий при этом составила 74,6%. Для сравнения: в 2019 году их доля составила – 71,8%. 16 донорских программ были реализованы с высокой долей мультиорганных изъятий (более 70%), причем 4 из них с результатом 100%.

Вклад донорских программ Москвы и Московской области по числу мультиорганных доноров в 2020 году составил 239, или 56,8% от общего числа мультиорганных доноров в стране.

Среднее количество органов, полученное от одного донора, осталось на уровне 2019 и 2018 годов и составило 2,9. Лучшие значения этого показателя наблюдались, как и прежде, в регионах, где проводится трансплантация экстраренальных органов и (или) осуществляется межрегиональная координация: Тульская область (3,7), Москва (3,3), Рязанская область (3,2), Свердловская область (3,2), Нижегородская область (3,2). Низкий показатель зафиксирован в Омской (1,5), Волгоградской (2,0) и Иркутской (2,0) областях.

Таблица 6

**Рейтинг регионов по донорской активности в 2020 году**  
**Rating of regions by donor activity in 2020**

Субъект РФ (Регион)	Население в 2020 г., млн	Число эффективных доноров на 1 млн населения		Рейтинг		Изм. № в рейтинге
		2020 г.	2019 г.	2020 г.	2019 г.	
Москва	12,6	20,9	22,0	1	1	нет
Кемеровская область	2,7	10,0	14,8	2	2	нет
Самарская область	3,2	7,5	7,8	3	7	+4
Иркутская область	2,4	6,7	6,7	4	8	+4
Ленинградская область	1,8	6,1	3,9	5	19	+14
Рязанская область	1,1	5,5	11,8	6	3	-3
Новосибирская область	2,8	5,4	8,2	7	6	-1
Республика Татарстан	3,9	5,4	3,8	8	20	+12
Воронежская область	2,3	5,4	3,5	9	22	+13
Санкт-Петербург	5,4	4,6	9,8	10	4	-6
Ставропольский край	2,8	4,6	1,1	11	29	+18
Республика Башкортостан	4,1	4,4	5,9	12	9	-3
Ростовская область	4,2	4,3	5,0	13	13	нет
Волгоградская область	2,5	4,0	4,0	14	18	+4
Красноярский край*	2,9	3,4	4,5	15	15	нет
Тюменская область	1,5	3,3	8,7	16	5	-11
Московская область	7,5	2,8	5,5	17	12	-5
Краснодарский край	5,6	2,3	4,1	18	17	-1
Тульская область	1,5	2,0	1,3	19	27	+8
ХМАО – Югра	1,7	1,8	2,9	20	25	+5
Республика Саха (Якутия)	1	1,7	3,0	21	24	+3
Нижегородская область	3,2	1,6	3,8	22	21	-1
Алтайский край	2,3	1,6	3,5	23	23	нет
Свердловская область	4,3	1,4	5,6	24	10	-14
Белгородская область	1,5	1,3	2,7	25	26	+1
Омская область	1,9	1,1	1,1	26	30	+4
Архангельская область	1,1	0,9	4,5	27	14	-13
Челябинская область	3,5	0,9	1,1	28	28	нет
Оренбургская область	2	0,5	5,5	29	11	-18
Саратовская область	2,4	0,0	4,2	30	16	-14
Россия (85 субъектов РФ)	146,2	3,9	5,0	–	–	

\* Без учета донорской программы ФСКНЦ ФМБА, Красноярск.

\* Excluding the donor program FSRCC under FMBA, Krasnoyarsk.

Таблица 7

Динамика числа посмертных доноров органов в период 2006–2020 гг.

Deceased organ donors (effective donors) in 2006–2020

№ пп.	Регион	2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020			
		Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)	Число эффективных доноров	Изменение за год (абс.)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31			
1	Москва	87	126	+39	135	+9	136	+1	151	+15	151	+15	135	-16	111	-24	125	+14	151	+26	142	-9	183	+41	195	+12	218	+23	277	+59	263	-14	
2	Московская область	24	45	+21	59	+14	52	-7	71	+19	82	+11	61	-21	56	-5	51	-5	44	-7	39	-5	39	-5	75	+36	68	-7	41	-27	21	-20	
3	Белгородская область		2	+2	3	+1	2	-1	5	+3	6	+1	3	-3	1	-2	2	5	5	+3	4	-1	4	4	4	4	0	4	0	4	0	2	-2
4	Воронежская область	6	2	-4	8	+6	2	-6	0	-2	1	+1	6	+5	6	0	5	-1	7	+2	4	-3	4	4	8	+7	8	8	0	4	4	-4	
5	Тульская область																											2	+2	3	+1		
6	Рязанская область																								2	+2	13	+11	6	-7			
7	Краснодарский край						3	+3	39	+36	52	+13	42	-10	41	-1	23	-18	25	+2	24	-1	19	-5	20	+1	23	+3	13	-10			
8	Волгоградская область	5	0	-5	11	+11	15	+4	16	+1	17	+1	19	+2	15	-2	18	+3	8	-10	8	0	8	0	9	9	0	10	+1	10	0		
9	Ростовская область																		1	+1	7	+6	7	13	19	+6	21	+2	18	-3			
10	Ставропольский край																								2	+2	3	+1	13	+10			
11	Санкт-Петербург	30	45	+15	47	+2	47	0	41	-6	34	-7	22	-12	13	-9	23	+10	31	+8	29	-2	31	+2	34	+3	53	+19	25	-28			
12	Ленинградская область	12	8	-4	11	+3	11	0	13	+2	10	-3	10	0	10	0	9	-1	7	-2	12	+5	11	-1	15	+4	7	-8	11	+4			
13	Архангельская область																								5	+5	5	0	1	-4			

Окончание табл. 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
14	Новосибирская область	17	11	-6	18	+7	29	+11	35	+6	25	-10	20	-4	17	-3	11	-6	14	+3	9	-5	14	+5	17	+3	23	+6	15	-8	
15	Кемеровская область	16	13	-3	18	+5	18	0	22	+4	12	-10	26	+14	26	0	31	+5	28	-3	34	+6	22	-12	30	+8	40	+10	27	-13	
16	Иркутская область				4	+4	6	+2	10	+4	9	-1	8	-1	6	-2	9	+3	4	-5	3	-1	2	-1	7	+5	16	+9	16	0	
17	Омская область	10	15	+5	13	-2	19	+6	19	0	14	-5	11	-3	14	+3	16	+2	11	-5	4	-7	4	0	3	-1	2	-1	2	0	
18	Алтайский край														3	+3	5	+2	4	-1	4	0	8	+4	8	0	8	0	9	+1	
19	Красноярский край																3	+3	6	+3	18	+12	27	+9	16	прим.	13	-3	10	-3	
20	Свердловская область	14	13	-1	12	-1	13	+1	14	+1	15	+1	14	-1	18	+4	23	+5	18	-5	15	-3	22	+7	24	+2	24	0	6	-18	
21	Челябинская область								6	+6	2	-4	7	+5	6	-1	10	+4	9	-1	11	+2	8	-3	4	-4	4	0	3	-1	
22	Тюменская область																						4	+4	13	+9	13	0	5	-8	
23	ХМАО – Югра																						3	+3	4	+1	5	+1	3	-2	
24	Самарская область	4	17	+13	24	+7	18	-6	20	+2	21	+1	19	-2	21	+2	20	-1	18	-2	26	+8	28	+2	23	-5	25	+2	24	-1	
25	Саратовская область														4	+4	7	+3	7	0	7	0	7	0	8	+1	10	+2	0	-10	
26	Нижегородская область						7	+7	11	+4	12	+1	10	-2	8	-2	12	+4	10	-2	11	+1	10	-1	12	+2	12	0	5	-7	
27	Республика Татарстан		3	+3	1	-2	3	+2	12	+9	16	+4	9	+7	6	-3	6	0	4	-2	1	-3	3	+2	4	+1	15	+11	21	+6	
28	Республика Башкортостан								2	+2	7	+5	14	+7	18	+4	19	+1	14	+5	20	+6	22	+2	20	-2	24	+4	18	-6	
29	Оренбургская область																		3	+3	8	+5	9	+1	8	-1	11	+3	1	-10	
30	Республика Саха (Якутия)																				2	+2	4	+2	4	0	3	-1	0	-3	
31	ФМБА, Москва														6	+6	11	+5	14	+3	16	+2	9	-7	5	-4	1	-4	1	0	
32	ФМБА, Красноярск																									24	прим.	16	-8	8	-8
	ИТОГО в РФ	225	300	+75	364	+64	381	+17	487	+106	470	-17	412	-58	420	+8	465	+45	434	-31	499	+53	565	+78	639	+74	732	+93	564	-168	

Примечание. Донорская активность ФСКНЦ ФМБА, Красноярск, представлена в виде отдельной программы.

Note. Donor activity of FSRC under FMBA, Krasnoyarsk, is presented as a separate program.

В 2020 г. показатель использования донорских почек составил 86,7%. В 17 регионах этот показатель находился в оптимальном диапазоне значений 90–100%, в 7 регионах – между 80–90% и в 4 программах составил менее 80% (Санкт-Петербург – 66,0%; Новосибирская область – 50,0%; Иркутская область – 59,4%; Омская область – 50,0%).

Таким образом, при снижении на фоне эпидемии числа эффективных доноров показатели эффективности работ по донорству, а именно доля доноров с диагнозом «смерть мозга», доля мультиорганных доноров, среднее число органов, трансплантированных от одного эффективного донора, не ухудшились. Случаев передачи COVID-19 от донора реципиенту не зафиксировано.

В 2020 году число изъятий органов от живых родственников доноров составило 326, или 36,6% от общего числа изъятий 890.

### ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ПОЧКИ

В 2020 году всего было выполнено 1124 трансплантации почки (7,7 на 1 млн населения), рис. 7.

Число трансплантаций почки от посмертного донора в 2020 г. составило 967, или 6,6 на 1 млн населения. Число трансплантаций почки от живого родственного донора составило 157, или 1,1 на 1 млн населения.

В табл. 8 и на рис. 8 представлены центры трансплантации почки, в которых было сделано наибольшее число пересадок почки по итогам 2020 года.

Рейтинг прежде всего демонстрирует лидерство и устойчивость трансплантационных программ веду-

щих центров трансплантации в столице, что, в свою очередь, является следствием эффективной работы МКЦОД. Также следует отметить положительную динамику развития трансплантационных программ Самарской области и Ростовской области. Негативное влияние COVID-19 в большей степени отразилось на показателях Кемеровской области, Санкт-Петербурга, Московской области. Общая трансплантационная активность в представленных 10 ведущих центрах трансплантации почки составляет 750.

В 2020 г. лишь 3 центра трансплантации почки выполнили более 50 операций за год – это НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (206), НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (198) и ГКБ им. С.П. Боткина (75). От 30 до 49 операций за год сделали 8 центров, еще 10 центров выполнили от 15 до 29, остальные 23 центра, или 52,3% – менее 15 трансплантаций почки.

В 2020 году 20 центров из 44 выполняли родственные трансплантации почки, всего было проведено 157 трансплантаций, 72 из них в НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова. Средняя частота использования прижизненного донорства почки в 2020 г. составила 13,4% от общего числа трансплантаций почки (в 2019 г. – 12,4%).

Трансплантации почки детям (несовершеннолетним) в 2020 г. выполнялись в 8 центрах, всего было проведено 119 пересадок почки (2019 г. – 101), из них 114 (94,2%) в Москве, в том числе в НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (48), в НМИЦ здоровья детей (34), в РДКБ (30), рис. 9.



Рис. 7. Трансплантация почки в РФ в 2006–2020 гг.

Fig. 7. Kidney transplantation in the Russian Federation in 2006–2020

## ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ЭКСТРАРЕНАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

В 2020 г. была выполнена 251 трансплантация сердца (1,7 на 1 млн населения), из них 6 пересадок детям (несовершеннолетним). Трансплантации сердца выполнялись в 16 центрах.

На долю НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (Москва) приходится 75,7% (190) от общего числа

трансплантаций сердца в РФ. Программа трансплантации сердца в данном центре продолжает определять уровень доступности данного вида трансплантационной помощи в стране.

Если в 2019 году 7 центров трансплантации сделали 10 и более трансплантаций сердца, то в 2020 году только 2 – это НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (190) и НМИЦ им. В.А. Алмазова (18). НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина (Новосибирск), НИИ СП им.

Таблица 8

**Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций почки**  
**The medical organizations – leaders in terms of number of kidney transplants performed**

Ранг	Центры – лидеры по числу трансплантаций почки	Число пересадок почки в 2020 г.
1	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, Москва	206
2	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва	198
3	ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ», Москва	75
4	ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Самара	47
5	ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань	40
6	ГБУЗ «Кемеровская областная клиническая больница им. С.В. Беляева», Кемерово	39
7	ГБУЗ «Республиканская клиническая больница им. Г.Г. Куватова», Уфа	38
8	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону	37
9	ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Московская область	36
10	ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Минздрава России, Москва	34
	<b>ИТОГО</b>	<b>750</b>
	66,7% от общего числа пересадок почки в РФ (1124)	

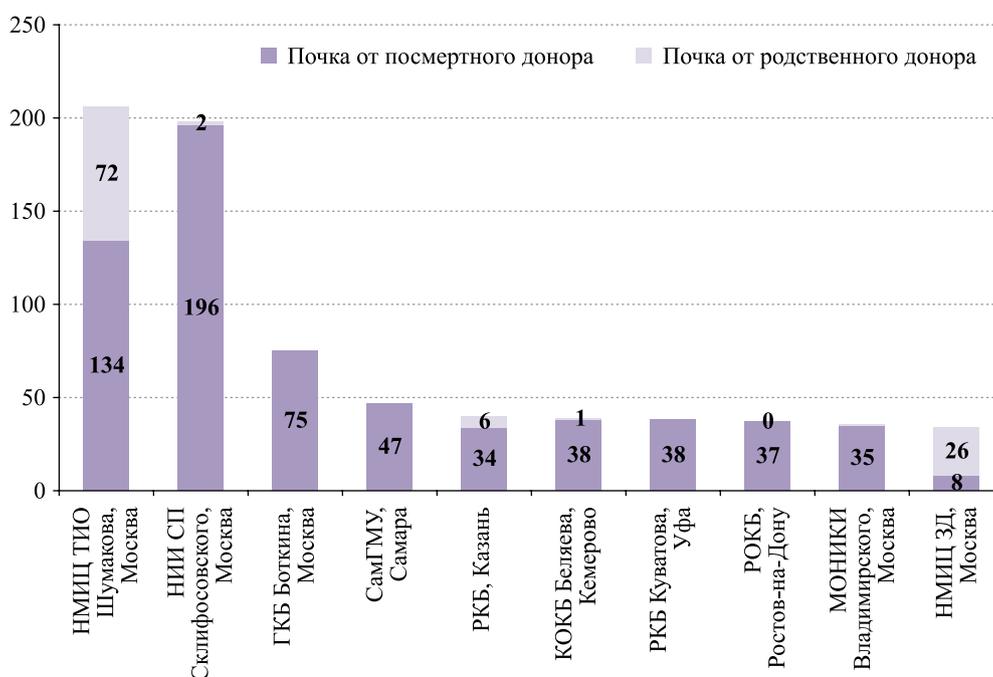


Рис. 8. Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций почки

Fig. 8. The medical organizations – leaders in terms of number of kidney transplants performed

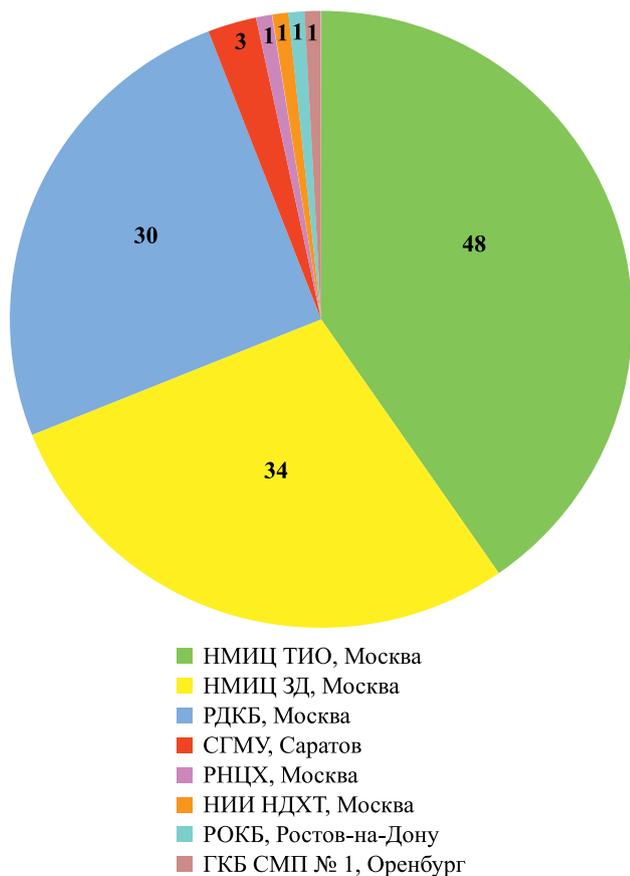


Рис. 9. Трансплантация почки детям (несовершеннолетним) в РФ в 2020 году

Fig. 9. Pediatric kidney transplantation in the Russian Federation in 2020

Н.В. Склифосовского (Москва), Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского (Краснодар), СОКБ № 1 (Екатеринбург), НИИ КП ССЗ (Кемерово) в условиях эпидемии сохранить трансплантационную активность не смогли.

Трансплантации легких в 2020 г. выполнялись в 3 центрах трансплантации, всего было выполнено 9 пересадок легких: в НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова – 6 пересадок легких, в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского – 2 пересадки, СПГМУ им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург) – 1. В НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова также было сделано 2 трансплантации комплекса «сердце–легкие».

В табл. 9 и на рис. 10 представлены центры трансплантации торакальных органов, в которых было сделано наибольшее число пересадок сердца и легких по итогам 2020 года.

В 2020 г. всего было выполнено 559 трансплантаций печени (3,8 на 1 млн населения). Трансплантации печени выполнялись в 29 центрах.

В 2020 г. была открыта новая программа трансплантации печени – в ГБУЗ ТО «Областная клиническая больница № 1», Тюмень, сделано 3 пересадки печени от посмертного донора. В РКБ Казани наблюдается активизация трансплантационной программы печени, число пересадок в 2020 г. в сравнении с 2019 г. увеличилось на 53,8% – до 20. В 2020 г. 6 центров трансплантации выполнили 20 и более пересадок печени каждый: НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (165); НИИ СП им. Н.В. Склифосов-

Таблица 9

**Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций торакальных органов**  
**Medical organizations – leaders in terms of number of thoracic organ transplantations performed**

Ранг	Центры – лидеры по числу трансплантаций сердца	Число пересадок сердца в 2020 г.
1	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, Москва	190
2	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург	18
3	ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово	7
4	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е.Н. Мешалкина» МЗ РФ, Новосибирск	5
5	ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» ДЗ КК, Краснодар	4
6	ГАУЗ «Межрегиональный клинико-диагностический центр», Казань	4
7	ГБУЗ «Республиканский кардиологический диспансер», Уфа	4
8	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» МЗ РФ, Москва	3
9	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону	3
10	КГБУ «Красноярская клиническая больница», Красноярск	3
	ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1», Екатеринбург	3
	<b>ИТОГО</b>	<b>244</b>
	98,0% от общего числа пересадок сердца в РФ (249)	

ского (118); ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна (47); ГКБ им. С.П. Боткина (35); ГНОКБ (34); РКБ, Казань (20).

Доля центров трансплантации Москвы (6) в трансплантации печени в 2020 г. составила 69,8% (390 пересадок); в 2019 г. – 64,4% (376 пересадок).

В табл. 10 и на рис. 11 представлены центры трансплантации печени, в которых было сдела-

но наибольшее число пересадок печени по итогам 2020 года.

Рейтинг демонстрирует относительную устойчивость программ в представленных ведущих центрах трансплантации печени; больше других негативное влияние фактора COVID-19 отразилось на активности ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая

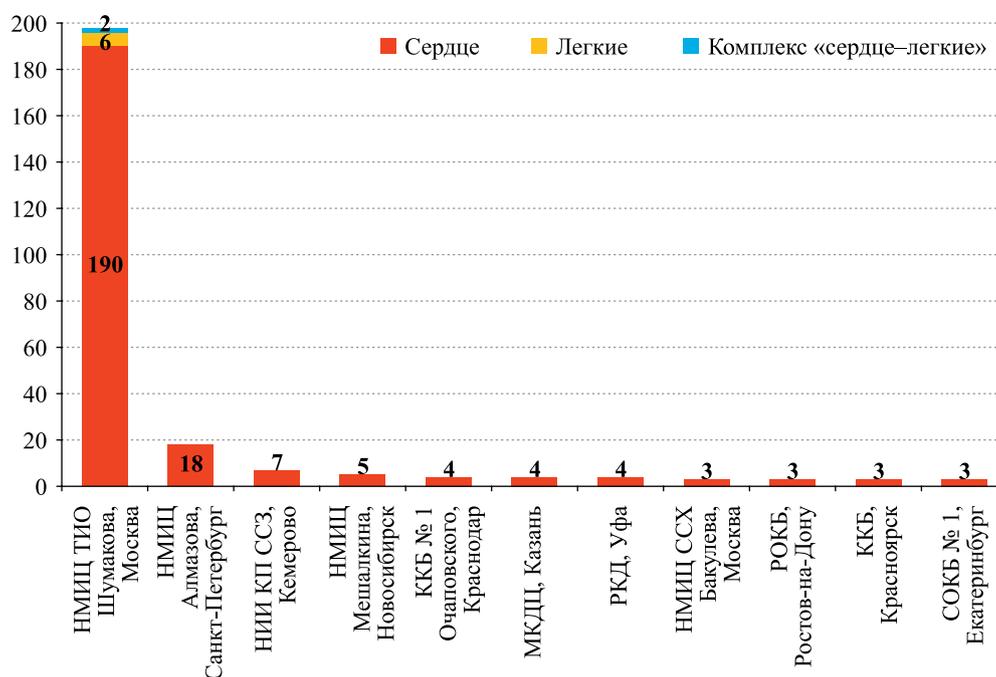


Рис. 10. Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций торакальных органов

Fig. 10. Medical organizations – leaders in terms of number of thoracic organ transplantations performed

Таблица 10

**Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций печени**  
**Medical organizations – leaders in terms of number of liver transplantations performed**

Ранг	Центры – лидеры по числу трансплантаций печени	Число пересадок печени в 2020 г.
1	ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» МЗ РФ, Москва	165
2	ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва	118
3	ФГБУ «Государственный научный центр РФ – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва	47
4	ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина ДЗМ», Москва	35
5	ГБУЗ НСО «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск	34
6	ГАУЗ «Республиканская клиническая больница МЗ РТ», Казань	20
7	ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», Московская область	17
8	ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. акад. А.М. Гранова» МЗ РФ, Санкт-Петербург	17
9	ГБУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону	15
10	ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница», Иркутск	14
	<b>ИТОГО</b>	<b>482</b>
	86,2% от общего числа пересадок печени в РФ (559)	

больница № 1» (Екатеринбург). Общая трансплантационная активность составляет 482, что оказалось больше, чем было в рейтинге 2019 г. (474, +8).

Родственные трансплантации печени осуществлялись в 9 центрах, доля трансплантаций от живых родственных доноров составила 169 (30,2%). В 2019 г. было 8 центров, которые выполнили 147 родственных пересадок печени (25,2%).

В 2020 г. была выполнена 131 пересадка печени детям (в основном раннего возраста); в 2019 г. – 113. Трансплантации печени детям выполнялись в 3 центрах: НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (120), РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (8) и ГНОКБ (3).

Трансплантации поджелудочной железы в 2020 г. осуществлялись в 3 центрах трансплантации: НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова (2), НИИ СП им. Н.В. Склифосовского (13), РОКБ, Ростов-на-Дону (1). Всего было сделано 16 пересадок поджелудочной железы (в 2019 г. – 10), из них вместе с почкой – 16.

Таким образом, число экстраренальных трансплантаций в 2020 г. составило 836, или 42,6% от общего числа трансплантаций 1960. За период наблюдения с 2006 г. (106) число трансплантаций экстраренальных органов в РФ увеличилось на 730 (в 7,9 раза), рис. 12. Доля экстраренальных трансплантаций от общего числа трансплантаций увеличилась при этом на 26,7%.

Вклад центров трансплантации Москвы и Московской области в трансплантацию экстраренальных

органов остается определяющим и в 2020 г. составил 605 пересадок (72,4%).

В табл. 11 представлены данные о динамике числа трансплантаций органов в РФ за 2006–2020 гг.

### ПАЦИЕНТЫ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫМИ ОРГАНАМИ

Согласно данным Федерального регистра в РФ, в 2020 г. было 19 097 пациентов с трансплантированными органами (130,6 на 1 млн населения); из них после трансплантации почки – 12 563 (85,9 на 1 млн), после трансплантации печени – 3489 (23,9 на 1 млн), после трансплантации сердца – 1524 (10,4 на 1 млн). С 2013 г. (за 7 лет) число пациентов с трансплантированными органами в РФ увеличилось на 1044 (123,3%).

Сведения о числе пациентов с трансплантированными органами в РФ с 2013 г. по 2020 г. из Федерального регистра Минздрава России (см. Распоряжение Правительства РФ от 23 октября 2017 г. № 2323-р; Постановление Правительства РФ № 404 от 26.04.2012 г.), представлены в табл. 12.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В прошедшем году трансплантационная помощь оказалась под сильным негативным влиянием принципиально новой проблемы, а именно эпидемии коронавирусной инфекции COVID-19. Особенности и результаты работы центров трансплантации в 2020 году связаны именно с этим фактором. И основной вывод, который должен быть сделан по ито-

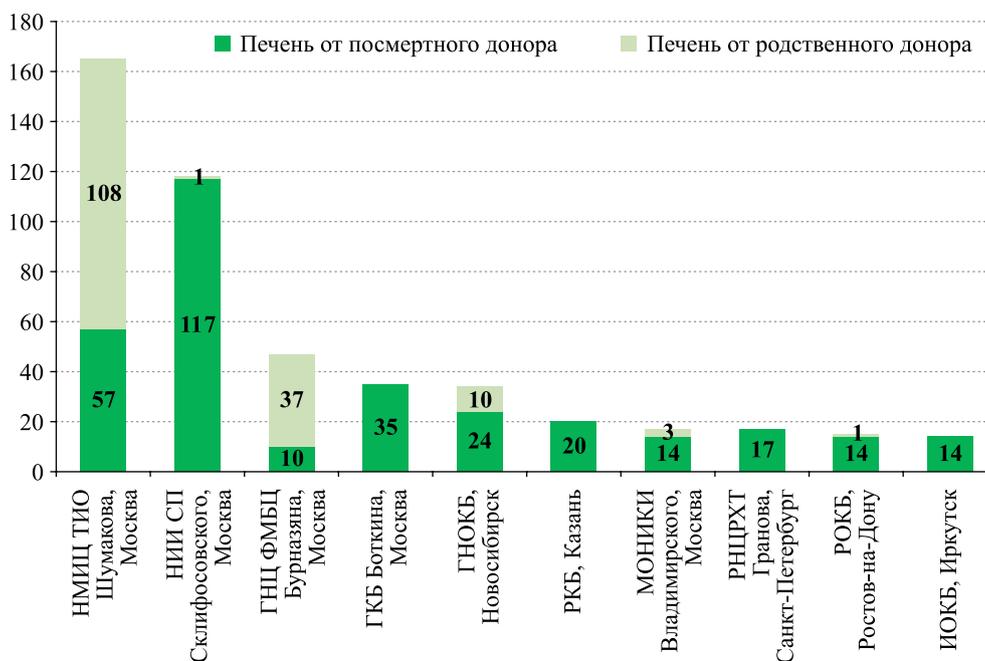


Рис. 11. Медицинские организации – лидеры по числу трансплантаций печени

Fig. 11. Medical organizations – leaders in terms of number of liver transplantations performed

гам 2020 года, заключается в том, что COVID-19 по общему правилу не должен рассматриваться в качестве основания для остановки трансплантационных и донорских программ. Эпидемия COVID-19 накладывает определенные ограничения, усложняет работу трансплантологов, но не делает ее невозможной.

В 2020 году в стране снизилось число доноров органов и число трансплантаций органов. Однако большинство центров не прекращали своей работы, и трансплантации органов по мере возможности выполнялись, также велась работа с листами ожидания и с пациентами после трансплантации.

Москва продемонстрировала устойчивость региональной системы координации органного донорства к фактору COVID-19, что во многом смягчило падение итоговых показателей донорской и трансплантационной активности по стране в целом.

Из положительных тенденций развития трансплантационной помощи в РФ, которые сохранились в 2020 году, следует отметить следующее:

- увеличение числа трансплантаций органов детям (+13,6%);
- увеличение доли эффективных доноров с диагнозом «смерть мозга» (97,0%);
- увеличение числа трансплантаций части печени от живого родственного донора (+15,0%);
- расширение географии донорских и трансплантационных программ (Тулльская областная клиническая больница – трансплантация почки от посмертного донора; Областная клиническая больница № 1 в Тюмени – трансплантация печени от посмертного донора);

– открытие филиала ФГБУ «НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава России в г. Волжский (Волгоградская область).

Что касается прогноза, очевидно, что реализация донорских и трансплантационных программ в 2021 году зависит от уровня заболеваемости коронавирусной инфекцией COVID-19 и от результатов вакцинации населения. Потребность, а именно число пациентов в листах ожидания центров трансплантации, продолжает год от года увеличиваться. Поэтому базовой задачей 2021 года и последующих лет будет являться восстановление и дальнейшее увеличение числа трансплантаций органов в соответствии с потребностью населения и потенциалом донорства. Следует отметить, что продолжает действовать ведомственная целевая программа «Донорство и трансплантация органов в РФ», утвержденная приказом Минздрава России от 4 июня 2019 г. № 365. Программа предусматривает к 2024 году увеличение числа трансплантаций органов до 25,2 на 1 млн населения; числа регионов, в которых выполняются трансплантации, – до 42; числа центров трансплантации – до 80. Фактор COVID-19 не должен рассматриваться организаторами и специалистами здравоохранения в качестве основания для игнорирования указанного документа.

В таких условиях особая ответственность лежит на главных внештатных специалистах-трансплантологах органов здравоохранения субъектов РФ. Это их задача привлечь внимание руководителей здравоохранения к трансплантационной программе, обосновать ее необходимость и целесообразность, защитить

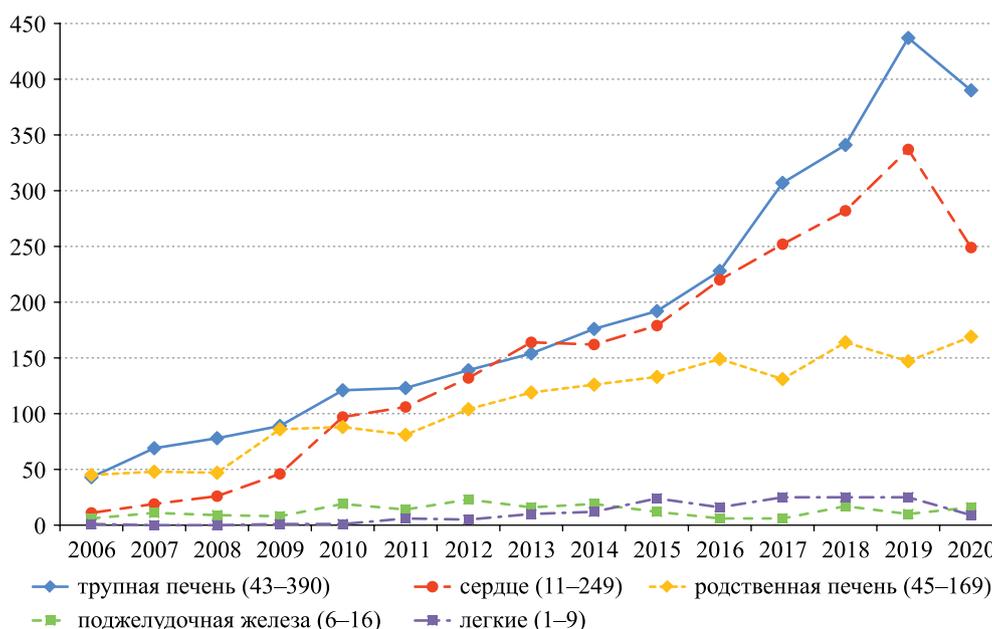


Рис. 12. Трансплантация экстрапочечных органов в 2006–2020 гг.

Fig. 12. Extrarenal solid organ transplantation in 2006–2020

Таблица 11

Трансплантация органов в России в период 2006–2020 гг.  
Organ transplantation in the Russian Federation in 2006–2020

№ п/п	Орган	2006		2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020	
		Абс. число	Изменение за год																												
1	Почка всего	556	+110	666	+116	830	+48	1037	+207	975	-62	941	-34	935	-6	1026	+91	945	-81	1084	+139	1175	+91	1361	+186	1473	+112	1124	-349		
2	в том числе трупная	417	+110	527	+110	666	+29	867	+201	796	-71	746	-50	747	+1	836	+89	755	-81	852	+97	974	+122	1161	+187	1290	+129	967	-323		
3	от живого	139	0	139	+6	156	+11	170	+14	179	+9	195	+16	188	-7	190	+2	190	0	232	+42	201	-31	200	-1	183	-17	157	-26		
4	родствен-ного донора	88	+29	117	+8	175	+50	209	+34	204	-5	243	+39	272	+29	302	+30	325	+23	378	+53	438	+60	505	+67	584	+79	559	-25		
5	в том числе трупная	43	+26	69	+9	89	+11	121	+32	123	+2	139	+16	154	+15	176	+22	192	+16	229	+37	307	+78	341	+34	437	+96	390	-47		
6	от живого	45	+3	48	-1	86	+39	88	+2	81	-7	104	+23	119	+15	126	+7	133	+7	149	+16	131	-18	164	+33	147	-17	169	+22		
7	родствен-ного донора	11	+8	19	+7	46	+20	97	+51	106	+9	132	+26	164	+32	162	-2	179	+17	220	+41	252	32	282	+30	335	+53	249	-86		
8	Сердце	6	+5	11	-2	8	-1	19	+11	14	-5	23	+9	14	-9	19	+5	12	-7	6	-6	6	0	17	+11	10	-7	16	+6		
9	Подже-лудочная железа	1	-1	0	0	1	+1	1	0	6	+5	5	-1	10	+5	12	+2	14	+2	16	+2	25	+9	25	0	23	-2	9	-14		
10	Легкие									2	+2	2	0	1	-1	0	-1	0	0	0	0	0	0	3	+3	2	-1	2	0		
11	Комплекс «сердце–легкие»																														
	Тонкая кишка																														
	Всего	662	+151	813	+129	1060	+118	1363	+303	1307	-56	1345	+38	1400	+55	1522	+122	1485	-37	1704	+219	1896	+192	2193	+297	2427	+234	1960	-467		

**Число пациентов с трансплантированными органами в РФ в 2013–2020 гг.  
Number of patients with transplanted organs in the Russian Federation in 2013–2020**

Код МКБ-Х	Число пациентов в регистре, чел.															
	2013 г.		2014 г.		2015 г.		2016 г.		2017 г.		2018 г.		2019 г.		2020 г.	
	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)	абс.	изм. (%)
Z94.0 Наличие трансплантированной почки	6651	12,8	7502	8164	8,8	9063	11,0	9658	6,6	10 851	12,4	11 880	9,5	12 563	5,7	
Z94.1 Наличие трансплантированного сердца	416	25,0	520	639	22,9	803	25,7	952	18,6	1164	22,3	1355	16,4	1524	12,5	
Z94.2 Наличие трансплантированного легкого	2	50,0	3	4	33,3	5	25,0	8	60,0	28	250,0	26	-7,1	24	-7,7	
Z94.4 Наличие трансплантированной печени	1150	22,3	1406	1649	17,3	1948	18,1	2152	10,5	2632	22,3	3032	15,2	3489	15,1	
Z94.8 Наличие других трансплантированных органов и тканей (костного мозга, кишечника, поджелудочной железы)	334	39,8	467	654	40,0	808	23,5	909	12,5	1135	24,9	1344	18,4	1497	11,4	
<b>ИТОГО</b>	<b>8553</b>	<b>15,7</b>	<b>9898</b>	<b>11 110</b>	<b>12,2</b>	<b>12 627</b>	<b>13,7</b>	<b>13 679</b>	<b>8,3</b>	<b>15 810</b>	<b>15,6</b>	<b>17 637</b>	<b>11,6</b>	<b>19 097</b>	<b>8,3</b>	

права пациентов, нуждающихся в трансплантации органов, на доступную и качественную медицинскую помощь.

В 2021 году НМИЦ ТИО им. акад. В.И. Шумакова продолжит оказывать всестороннюю методическую помощь органам здравоохранения и центрам трансплантации, обучать специалистов из субъектов РФ, осуществлять выездные аудиты, проводить телемедицинские консультации в режиме 24/7, вести мониторинг донорских и трансплантационных программ.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Состояние органного донорства и трансплантации в России по итогам 2009 года. *Трансплантология 2009: итоги и перспективы*. Вып. I / Под ред. С.В. Готье. –М.–Тверь: Триада, 2010: 8–20. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2009. *Transplantology 2009: results and prospects*. Vol. I / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2010: 8–20.
2. Развитие органного донорства и трансплантации в Российской Федерации в 2006–2010 гг. *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том II. 2010 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2011: 18–32. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2006–2010. *Transplantology: results and prospects*. Vol. II. 2010 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2011: 18–32.
3. Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2011 году (IV сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том III. 2011 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2012: 14–37. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2011 (IV report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. III. 2011 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2012: 14–37.
4. Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2012 году (V сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том IV. 2012 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2013: 8–28. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2012. (V report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. IV. 2012 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2013: 8–28.
5. Органное донорство и трансплантация в Российской Федерации в 2013 году (VI сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том V. 2013 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2014: 32–57. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2013 (VI report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. V. 2013 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2014: 32–57.
6. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2014 году (VII сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том VI. 2014 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2015: 44–75. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2014 (VII report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. VI. 2014 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2015: 44–75.
7. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2015 году (VIII сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том VII. 2015 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2016: 38–71. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2015 (VIII report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. VII. 2015 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2016: 38–71.
8. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2016 году (IX сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том VIII. 2016 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2017: 33–66. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2016 (IX report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. VIII. 2016 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2017: 33–66.
9. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2017 году (X сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том IX. 2017 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2018: 26–63. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2017 (X report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. IX. 2017 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2018: 26–63.
10. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2018 году (XI сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том X. 2018 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2019: 46–85. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2018 (XI report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. X. 2018 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2019: 46–85.
11. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2019 году (XII сообщение национального регистра Российского трансплантологического общества). *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том XI. 2019 год / Под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада, 2020: 52–93. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2019 (XII report of National Registry). *Transplantology: results and prospects*. Vol. XI. 2019 / Ed. by S.V. Gautier. М.–Tver: Triada, 2020: 52–93.

*Статья поступила в редакцию 16.07.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 16.07.2021*

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-35-49

# ПЕРВЫЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ОПЫТ ПЕРЕСАДКИ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ДОНОРОВ С ВНЕГОСПИТАЛЬНОЙ ОСТАНОВКОЙ КРОВООБРАЩЕНИЯ: ОБОБЩЕНИЕ 3-ЛЕТНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ

О.Н. Резник<sup>1-3</sup>, А.Е. Скворцов<sup>3</sup>, В.С. Дайнеко<sup>1, 2</sup>, И.В. Логинов<sup>1</sup>, А.А. Кутенков<sup>1, 2</sup>, С.С. Комедев<sup>2</sup>, В.М. Теплов<sup>2</sup>, Д.О. Кузьмин<sup>1, 2</sup>, А.Н. Ананьев<sup>1, 2</sup>, И.В. Ульянкина<sup>1, 2</sup>, Д.В. Гоголев<sup>1, 2</sup>, А.А. Кукушкин<sup>1</sup>, М.Е. Малышев<sup>1</sup>, А.А. Бойков<sup>4</sup>, В.Е. Савелло<sup>1</sup>, А.Н. Морозов<sup>2</sup>, С.Ф. Багненко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>4</sup> СПб ГБУЗ «Городская станция скорой медицинской помощи», Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Введение.** В мегаполисах использование для пересадки органов, полученных от умерших в результате внезапной внегоспитальной остановки кровообращения, является одним из перспективных путей решения проблемы дефицита донорских органов. В Санкт-Петербурге впервые была апробирована модель перехода от поддержки жизни экстракорпоральной мембранной оксигенацией (ЭКМО) пациентов после внегоспитальной остановки кровообращения к ЭКМО-жизнеобеспечению органов потенциальных доноров. **Материалы и методы.** С целью реализации программы на базе стационарного отделения неотложной помощи Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени И.П. Павлова были организованы круглосуточные команды ЭКМО и трансплантации, налажено взаимодействие с Санкт-Петербургской городской станцией скорой медицинской помощи. Разработан, одобрен этическим комитетом и внедрен в клиническую практику первый в России и в международной практике протокол работы с потенциальными донорами, доставленными из дома после внезапной остановки кровообращения. В период с 2017-го по 2020 год в стационарное отделение скорой медицинской помощи доставлено 67 пациентов с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения. В 4 (5,97%) случаях мероприятия расширенной сердечно-легочной реанимации с целью спасения жизни были успешны, а 11 (16,42%) пациентов стали эффективными донорами. Летальность среди этой группы больных без последующего факта посмертного донорства составила 77,61% (52 пациента). **Результаты.** Трансплантация печени от асистолических доноров (АСД), восстановление кровообращения у которых проводилось с помощью ЭКМО (ЭКМО-АСД), выполнена 5 реципиентам, находившимся в тяжелом состоянии на фоне печеночной недостаточности. В одном (20%) случае имела место тяжелая дисфункция трансплантата печени в течение 33 суток с последующим полным восстановлением функции. Пересадка почки была выполнена 22 пациентам. Немедленная функция трансплантата имела место у 10 (45,45%), отсроченная – у 12 (54,55%) пациентов. Выживаемость почечных трансплантатов составила 86,4%, реципиентов почечного трансплантата – 95,5%, реципиентов печеночного трансплантата – 80%, период наблюдения составил  $24,1 \pm 7,15$  месяца. **Вывод.** Применение ЭКМО для спасения жизни пациентов с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения может быть реализовано в условиях высокой степени организации и синхронизации работы городской станции скорой медицинской помощи и отделения экстренной медицинской помощи многопрофильного стационара. При неудачном исходе сердечно-легочной реанимации с помощью ЭКМО (ЭКМО-СЛР) возможен запуск донорской программы – ЭКМО-АСД. Результаты трансплантации печени и почек от ЭКМО-АСД в долгосрочной перспективе соответствуют таковым при использовании органов от доноров со смертью мозга.

**Для корреспонденции:** Резник Олег Николаевич. Адрес: 192242, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3. Тел. (921) 935-51-91. E-mail: onreznik@gmail.com

**Corresponding author:** Oleg Reznik. Address: 3, Budapest str., St.-Petersburg, 192242, Russian Federation. Phone: (921) 935-51-91. E-mail: onreznik@gmail.com

Широкое внедрение новой модели донорства органов позволит увеличить доступность трансплантационной помощи.

*Ключевые слова:* доноры с внегоспитальной необратимой остановкой сердца, асистолические доноры, экстракорпоральная мембранная оксигенация, ЭКМО-СЛР, ЭКМО-АСД, трансплантация печени, трансплантация почки.

## FIRST RUSSIAN EXPERIENCE IN LIVER AND KIDNEY TRANSPLANTATION FROM DONORS WITH OUT-OF-HOSPITAL CARDIAC ARREST: 3 YEARS' RESULTS

O.N. Reznik<sup>1-3</sup>, A.E. Skvortsov<sup>3</sup>, V.S. Daineko<sup>1, 2</sup>, I.V. Loginov<sup>1</sup>, A.A. Kutenkov<sup>1, 2</sup>, S.S. Komedelev<sup>2</sup>, V.M. Teplov<sup>2</sup>, D.O. Kuzmin<sup>1, 2</sup>, A.N. Ananiev<sup>1, 2</sup>, I.V. Uliankina<sup>1, 2</sup>, D.V. Gogolev<sup>1, 2</sup>, A.A. Kukushkin<sup>1</sup>, M.E. Malyshev<sup>1</sup>, A.A. Boykov<sup>4</sup>, V.E. Savello<sup>1</sup>, A.N. Morozov<sup>2</sup>, S.F. Bagnenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dzhanelidze St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>3</sup> Mechnikov North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>4</sup> City Ambulance Station, St. Petersburg, Russian Federation

**Introduction.** In megacities, the use of organs obtained from those who died as a result of sudden out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) for transplantation is one of the promising ways of addressing the problem of organ donor shortage. In St. Petersburg, the model of transition from life support via extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) of patients after OHCA to ECMO life support for organs of potential donors was tested for the first time.

**Materials and methods.** In order to implement the program, round-the-clock ECMO and transplantation teams were organized at the inpatient emergency ward of Pavlov First St. Petersburg State Medical University. Interaction with the St. Petersburg City Emergency Station, St. Petersburg was established. The protocol of work with potential donors brought to the hospital after a sudden circulatory arrest was developed, approved by the ethics committee, and implemented in clinical practice. This was the first in Russia and in international practice. Between 2017 and 2020, 67 patients with sudden OHCA were brought to the inpatient emergency ward. In 4 (5.97%) cases, advanced cardiovascular life support was successful, and 11 (16.42%) patients became effective donors. Mortality among this group of patients without subsequent postmortem donation was 77.61% (52 patients). **Results.** Liver transplantation from non-heart-beating donors (NHBDs) whose blood circulation was restored by ECMO (ECMO NHBD) was performed in 5 recipients who were in severe condition against the background of liver failure. In 1 (20%) case, there was severe liver allograft dysfunction for 33 days with subsequent complete restoration of function. Kidney transplantation was performed in 22 patients. Immediate graft function occurred in 10 (45.45%), while delayed function occurred in 12 (54.55%) patients. Kidney graft survival was 86.4%, kidney graft recipient survival was 95.5%, liver graft recipient survival was 80%, and the follow-up period was  $24.1 \pm 7.15$  months.

**Conclusion.** The use of ECMO to save the lives of patients with sudden OHCA can be implemented in conditions of a high degree of organization and synchronization of the work of the city emergency medical station and the emergency department of a multidisciplinary hospital. If cardiopulmonary resuscitation with ECMO (ECMO CPR) fails, it is possible to launch the ECMO NHBD donor program. Long-term outcomes of liver and kidney transplantation from ECMO NHBD are consistent with those using organs from brain-dead donors. Widespread implementation of the new organ donation model will increase the availability of transplant care.

*Keywords:* out-of-hospital irreversible cardiac arrest donors, non-heart-beating donors, extracorporeal membrane oxygenation, ECMO CPR, ECMO NHBD, liver transplantation, kidney transplantation.

### ВВЕДЕНИЕ

Основным направлением современной трансплантологии является разработка новых стратегий решения проблемы дефицита донорских органов [1–3]. Использование органов, полученных у погибших в результате внезапной внегоспитальной остановки

кровообращения (асистолические доноры, АСД) является одним из перспективных направлений в рамках решения данной проблемы [4, 5]. Наш собственный [6] и европейский опыт применения протоколов работы с АСД показал эффективность и отсутствие серьезных различий в результатах трансплантаций,

по сравнению с результатами пересадок почки, полученных от доноров со смертью мозга [7–10].

Экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО) для экстренного восстановления кровообращения – это инвазивный метод экстракорпоральной сердечно-легочной реанимации (ЭКМО-СЛР), который был предложен для пациентов с остановкой сердечной деятельности с целью возобновления и поддержания кровообращения в организме при остановке сердца [11, 12]. ЭКМО используется при остановке сердечной деятельности с 1976 года после внедрения переносных аппаратов искусственного кровообращения с питанием от батарей [13]. Применение этого метода восстановления кровообращения в течение ряда лет ограничивалось применением только для определенных групп пациентов: после операции на открытом сердце, подвергшихся глубокой гипотермии и передозировке наркотиками [14–16]. Миниатюризация устройств экстракорпорального восстановления кровообращения, использование перфузионных контуров с гепаринизированным покрытием и методы чрескожной канюляции магистральных сосудов позволили расширить клинический спектр использования этого метода [17–21]. Проведенные клинические исследования показали эффективность раннего применения ЭКМО для улучшения прогнозов у пациентов при продолжительной остановке сердца, возникающей как в стационарных (внутригоспитальная остановка сердца), так и внебольничных условиях (внегоспитальная остановка сердца) [22–23].

В рекомендациях Международного комитета по реанимации прямо указывается, что ЭКМО может улучшить результаты лечения пациентов с остановкой сердечной деятельности по сравнению со стандартным протоколом СЛР в случаях кардиогенного шока и остановки сердца, где из анамнеза известна кардиологическая патология, поддающаяся немедленной инвазивной коррекции [24]. Американской кардиологической ассоциацией было выработано предложение о том, чтобы ЭКМО-СЛР рассматривалась в качестве варианта оказания помощи для стационарных пациентов с остановкой сердечной деятельности, когда время отсутствия кровотока минимальное, а состояние, приведшее к остановке сердечной деятельности, обратимо (например, гипотермия или наркотическая интоксикация) или поддается лечению методом реваскуляризации миокарда или трансплантации сердца [25]. В любом случае использование ЭКМО в клинической практике предполагает принятие довольно сложных медицинских решений в условиях, когда пациент находится в критическом состоянии и его спасение полностью зависит от успешности действий медицинской бригады.

Эффективность применения ЭКМО для оживления пациентов с остановкой сердечной деятельности

объясняет интерес к применению данной технологии и с целью реализации донорских программ. Наиболее известен так называемый «испанский протокол» – donor from the street – успешно реализованный в крупных городах Испании [1, 27, 33].

Ишемически-реперфузионная травма неизбежно сопровождается процессом получения донорских органов от АСД. Патологические процессы, возникающие при ишемии-реперфузии, могут быть минимизированы с помощью последовательного применения непрямого автоматического массажа сердца и переключения на восстановление и поддержание кровообращения в организме умершего пациента с помощью ЭКМО, что было доказано рядом наших предшествующих работ [6, 32, 50].

В данной статье представлены 3-летние результаты трансплантации органов, полученных от доноров с внегоспитальной необратимой остановкой кровообращения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основной действующей бригадой «скорой помощи» (СП) стал организационный протокол, в первую очередь направленный на спасение жизни пациента с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения, который был утвержден локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» (протокол № 46 от 22.09.2017). Обсуждение и утверждение протокола согласовано с Санкт-Петербургской городской станцией скорой медицинской помощи. Учитывая радикальное влияние на результаты реализации реанимационных мероприятий временного фактора, в работе были задействованы те подстанции скорой помощи Петроградского района Санкт-Петербурга, в зону ответственности которых входила территория вблизи от ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» (ПСПбГМУ).

Согласно протоколу, по прибытию к пациенту с внезапной остановкой сердечной деятельности, бригадой скорой помощи (СП) проводился комплекс реанимационных мероприятий, включающий подключение кардиомассажера Lucas II («Jolife AB», Швеция), и проведение искусственной вентиляции легких (ИВЛ). Учитывая локализацию программы в пределах только Петроградского района Санкт-Петербурга, бригаде СП в случаях своевременного оповещения удавалось прибыть к пациенту и начать проведение реанимационных мероприятий в течение 7–10 ( $7,3 \pm 4,1$ ) минут от момента получения вызова, и доставить в стационар в течение 50–70 ( $57 \pm 12,8$ ) минут. На фоне продолжающегося непрямого массажа сердца с помощью аппарата Lucas II реанимируемого доставляли в стационарное отделение скорой медицинской помощи ПСПбГМУ (СОСМП), где помимо реанимационного отделения с целью

реализации данной программы была организована круглосуточная работа команды ЭКМО.

Каждому пациенту, в зависимости от конкретной клинической ситуации, в полном необходимом объеме проводились мероприятия жизнеобеспечения (Life support procedure) с момента прибытия «скорой помощи» и продолжались в реанимационном отделении стационара.

Инициация протокола ЭКМО производилась в первую очередь с целью спасения жизни пациента

и в рамках процедур «life support» на основании разработанных и принятых в ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. И.П. Павлова» критериев (табл. 1).

В условиях реанимации СОСМП пункционным способом, под УЗИ-контролем или «открыто», канюлировались бедренная артерия и вена (артериальная с «Люэр-портом» 17 Fg и бикавальная венозная 30/33 Fg канюли) (рис. 1). Выполнялось подключение к заранее заполненному перфузионному контуру. Для проведения ЭКМО использовались центрифужный

Таблица 1

**Критерии инициации протокола ЭКМО**  
**Criteria for the initiation of ECMO Protocol**

Догоспитальный этап	Стационарное отделение скорой медицинской помощи (СОСМП)	Команда ЭКМО
Возраст (18–75 лет)	Повторная оценка комплекса догоспитальных критериев	Диаметр бедренных сосудов не менее 5,5–6 мм по данным УЗИ
Желудочковая фибрилляция или тахикардия (ЖТ/ЖФ) без эффекта от ЭИТ (не менее трех разрядов)	СО <sub>2</sub> на выдохе (по прибытии в ОСМП) >10 мм рт. ст.	Время от момента вызова бригады СМП до момента помещения пациента на стол ОСМП около 60 минут
Получившие Амиодарон 300 мг	РаО <sub>2</sub> >50 мм рт. ст. или О <sub>2</sub> Sat >85%	В случае если критерии СОСМП не соответствуют постановке и подключению бедренных канюль на фоне СЛР Синхронизация с аппаратом Lucas
Техническая возможность подключения аппарата Lucas	Лактат менее 15 ммоль/л	Перевод в отделение РХМДЛ, оценка результатов ангиографии
Отсутствие неизлечимых заболеваний (онкология 4-й ст., терминальные заболевания печени, почек, сердца и т. п.)		
Информация об отказе от интубации и СЛР		
Отсутствие продолжающегося кровотечения		
Отсутствие травм		



Рис. 1. Подключение аппарата для ЭКМО к бедренным сосудам донора (опытный образец ППА «Ex-Stream») в условиях кабинета рентгенэндоваскулярной диагностики и лечения

Fig. 1. Connection of the ECMO device to the donor’s femoral vessels (prototype of the PPA Ex-Stream) in the conditions of the X-ray endovascular diagnostics and treatment operating room

насос RotaFlow (Maquet, Германия), опытный образец аппарата для экстренного восстановления кровообращения «Ex-Stream» (ТрансБиоТек, Россия, применение опытного портативного перфузионного аппарата одобрено локальным этическим комитетом ПСПБГМУ). Использовались перфузионные трубки (Keweі, Китай), центрифужная головка RotaFlow (и для Maquet, Германия, и для «Ex-Stream», ТрансБиоТек, Россия), мембранный оксигенатор (Keweі/Oxygenator Keweіadult, Китай), лейкоцитарный фильтр (LeukoGuard 6, Pall, Terumo, США) (рис. 2, 3). Контур первоначально заполнялся раствором натрия гидрокарбоната, физиологическим раствором, коллоидным раствором, антибиотиком, гепарина сульфатом, фибринолитиком, метилпреднизолоном (табл. 2). Принятые стандартные перфузионные характеристики для ЭКМО: скорость потока – 2,5–3,5 л/мин, среднее артериальное давление – 80–100 мм Нг, поток кислорода через оксигенатор 3–4 л/мин. Контроль и коррекция лабораторных показателей осуществлялись каждый час.

После проведения расширенных мероприятий СЛР, включая ЭКМО-СЛР, в случаях их неэффективности (атоническая кома, зрачки широкие, отсутствие реакции на свет, на ЭКГ при остановке аппарата Lucas изолиния) констатировалась смерть по общепринятым критериям. Умершему, подходящему по критериям донорства, по прошествии «периода бездействия» (no-touch-period, 20 мин) через центральный венозный доступ вводилось 10 000 Ед гепарина сульфата и возобновлялась ЭКМО-процедура с целью поддержания жизнеспособности органов. Таким образом, осуществлялся трансфер от процедуры жизнеобеспечения к процедуре сохранения органов умершего донора.

Решения о выполнении трансплантации органов от доноров с внегоспитальной остановкой кровообращения и определении их пригодности основывались на оценке временных параметров, эффективности ЭКМО, данных инструментальных и лабораторных исследований. Каждому пациенту выполнялась спи-

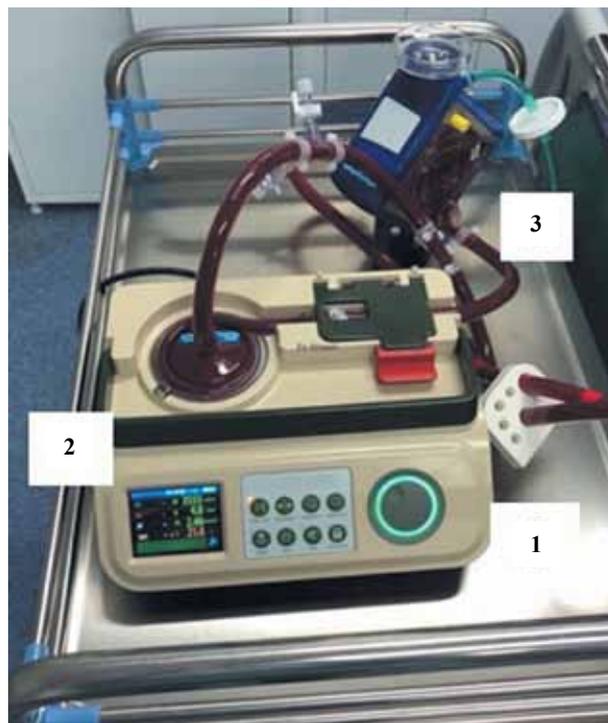


Рис. 2. Вид перфузионного контура для ЭКМО донора (1 – опытный образец портативного перфузионного аппарата «Ex-Stream», 2 – центрифужная головка, 3 – оксигенатор и артериальный фильтр) в «красной зоне» стационарного отделения СМП

Fig. 2. General view of the perfusion circuit for the ECMO donor (1 – prototype of the «Ex-Stream» PPA, 2 – centrifuge head, 3 – oxygenator and arterial filter) in the «red zone» of the inpatient department of the EMC

ральная компьютерная томография (СКТ) с внутривенным контрастированием (Ультравист 370 или Омнипак 350, 100 мл, болюсное введение) с целью оценки перфузии органов.

Абсолютными противопоказаниями к использованию медицинской технологии были приняты следующие:

- 1) наличие у донора инфекций: ВИЧ, HBs, HCV, RW (исследование гемотрансмиссивных инфекций проводилось на автоматическом иммунофлюо-

Таблица 2

**Первичное заполнение контура ЭКМО**  
**Primary filling of the EKMO contour**

Группа препаратов	Препараты, использованные согласно протоколу	Дозировка (объем)
Кристаллоидные растворы	Натрия хлорид 0,9%	Основа заполнения контура
	Натрия гидрокарбонат 5%	
Коллоидный раствор	Гелофузин	500 мл
Фибринолитик	Стрептокиназа	1,5 млн Ед
Антибиотик	Цефозолин	2,0 г
Антикоагулянт	Гепарина сульфат	10 000 Ед
Метилпреднизолон	Солу-Медрол	1000 мг

- ресцентном анализаторе Abbott Architect i2000sr диагностическими наборами Abbott);
- 2) сведения о заболеваниях почек, печени, злокачественных новообразованиях, гнойно-воспалительных процессах в брюшной полости, забрюшинном пространстве, генерализованных инфекциях;
  - 3) наличие прямых или косвенных свидетельств употребления наркотических веществ (следы инъекций, татуировки, анамнестические указания и т. д.);
  - 4) выраженный атеросклероз периферических сосудов донора, который исключает проведение адекватной перфузии;
  - 5) нарушение целостности сосудистого русла донора, продолжающееся кровотечение, массивная кровопотеря;
  - 6) длительность процедуры ЭКМО после СЛР более 4 суток (признаки полиорганной недостаточности);
  - 7) макроскопические изменения донорского органа, исключающие его последующее применение для

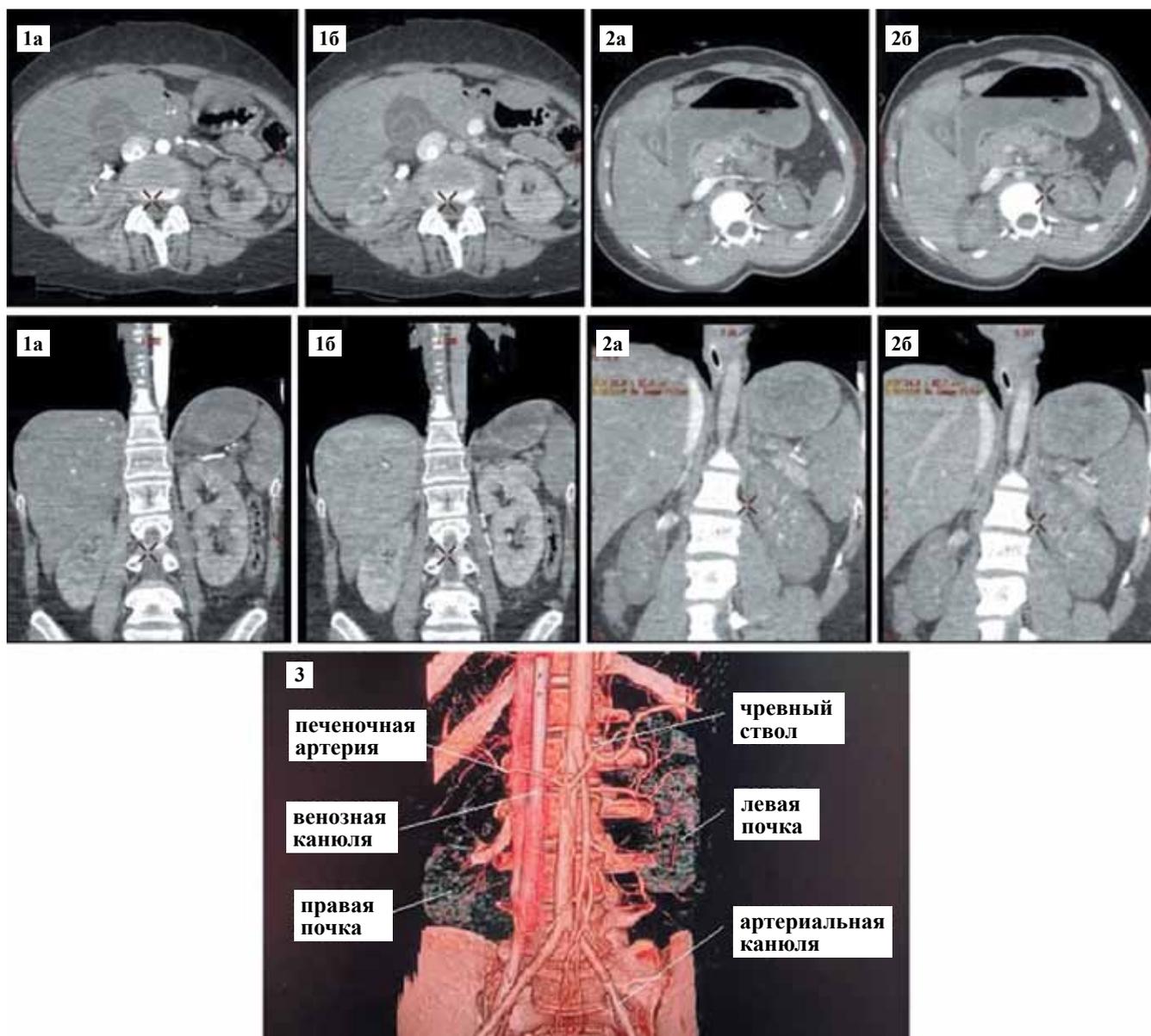


Рис. 3. Результаты выполнения СКТ с внутривенным контрастированием потенциальному донору во время проведения ЭКМО: 1 – удовлетворительная перфузия печени, почек (1а – артериальная фаза, 1б – венозная фаза); 2 – отсутствие перфузии (2а – артериальная фаза, 2б – венозная фаза); 3 – 3D-реконструкция, артериальная фаза, удовлетворительная перфузия абдоминального региона

Fig. 3. Results of performing CT with intravenous contrast to a potential donor during ECMO: 1 – satisfactory perfusion of the liver, kidneys (1а – arterial phase, 1б – venous phase); 2 – no perfusion (2а – arterial phase, 2б – venous phase); 3 – 3D reconstruction, arterial phase, satisfactory perfusion of the abdominal region

трансплантации (признаки тромбоза, выраженный цианоз, каменистая плотность и др.);

8) отсутствие удовлетворительной перфузии органов при СКТ-ангиографии (рис. 3).

Были разработаны и приняты относительные противопоказания к донорству в форме балльной системы (5 и более баллов – отказ от донорства):

- 1) период от остановки сердечной деятельности до начала реанимационных мероприятий бригадой скорой медицинской помощи (более 20 мин) (1 балл);
- 2) период тепловой ишемии  $\geq 120$  мин (механический непрямой массаж сердца до момента начала ЭКМО),  $pO_2$  менее 50 мм рт. ст. (1 балл);
- 3) наличие у донора расширенных критериев: возраст (старше 50 лет), сахарный диабет, гипертоническая болезнь, артериальная гипертензия в анамнезе, системные заболевания (псориаз, аутоиммунные заболевания) и т. д. (по 1 баллу за каждую патологию);
- 4) диагностированное повреждение органов брюшной полости, забрюшинного пространства (1 балл);
- 5) протеинурия, пиурия, макрогематурия, бактерии, споры грибов в осадке мочи (1 балл);
- 6) отсутствие диуреза в течение 2 и более часов (1 балл);
- 7) уровень креатинина сыворотки крови 0,25 ммоль/л и выше (1 балл);
- 8) срок нахождения в «красной зоне» более 6 часов и в ОРИТ более 72 часов (1 балл).

После признания органов донора предварительно пригодными к эксплантации, получения разрешения судебно-медицинского эксперта и администрации стационара донора подавали в операционную. В условиях продолжающейся ЭКМО выполнялась лапаротомия, выделение аорты, подвздошных сосудов, нижней полой вены. Холодовая перфузия изолированного абдоминального региона раствором Кустодиола (Dr. Franz Kohler Chemie GmbH, Германия, температура 4 °С, 15 литров) проводилась через люэр-порт артериальной канюли, которая ранее использовалась для ЭКМО. Далее выполнялось изъятие почек и печени по стандартной методике.

Аллотрансплантация почек и ортотопическая трансплантация печени, полученных от доноров с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения, выполнялись с использованием стандартных, принятых в стационаре операционных методик, схем медикаментозной и иммуносупрессивной терапии.

## КЛИНИЧЕСКИЙ ПРИМЕР

*Пациентка Н., 27 лет, в 00.00 на станции метро внезапная потеря сознания, остановка сердечной деятельности, до прибытия «скорой помощи» выполнялся непрямой массаж сердца. На момент*

*прибытия линейной бригады (00.15) находилась в состоянии клинической смерти. Проведены мероприятия расширенной СЛР (электро-импульсная терапия 200 Дж № 5, подключение реанимационного аппарата для проведения кардиомассажа Lucas 2 (Швеция), ИВЛ, адреналин 12 мл суммарно, кордарон 400 мг). На фоне продолжающегося аппаратного непрямого массажа сердца через 62 минуты после остановки сердца доставлена в стационарное отделение скорой медицинской помощи. Исходные данные пациентки: рост 165 см, вес 60 кг, лактат – 15 ммоль/л, гемоглобин 107 г/л,  $pO_2$  – 37 мм рт. ст.,  $pCO_2$  – 55,6 мм рт. ст., атоническая кома, на ЭКГ – изолиния (при отключении аппарата Lucas II). Учитывая стойкую асистолию, атоническую кому, значение лактата более 15 ммоль/л, в соответствии с протоколом ЭКМО в объем мероприятий СЛР включено не было. После проведения полного комплекса СЛР в течение 30 минут аппарат непрямого массажа сердца был отключен, констатирована биологическая смерть (01.32).*

*Спустя 20 минут от момента констатации биологической смерти, учитывая возможность реализации протокола органного донорства, возобновлена работа аппарата Lucas II. Под контролем УЗИ выполнена канюляция правых бедренных сосудов, начата перфузия ЭКМО. Перфузионные характеристики: скорость потока – 2,5–3,5 л/мин, среднее артериальное давление – 85–105 мм рт. ст., поток кислорода через оксигенатор 3–4 л/мин. При обследовании на фоне проведения ЭКМО противопоказаний к донорству не выявлено (по принятой шкале относительных противопоказаний – 2 балла), органы признаны предварительно пригодными для трансплантации. После получения разрешения судебно-медицинского эксперта и администрации стационара в условиях операционной выполнено изъятие печени и двух почек по принятой методике. Общая длительность ЭКМО составила 343 минуты.*

*Реципиентом печени стала пациентка М., 55 лет, с диагнозом: «хронический неverifiedированный гепатит с исходом в цирроз печени; Чайлд-Пью класс С; MELD 19; портальная гипертензия, варикозное расширение вен пищевода 2-й степени; асцит; печеночная энцефалопатия». Операция была выполнена по стандартной методике Piggy-Back. Беспеченочный период – 50 мин, период вторичной тепловой ишемии – 30 минут, время холодной ишемии – 435 минут. Функция трансплантата немедленная. Дренажи удалены на 4–5-е сутки после операции, переведена в отделение на 5-е сутки после трансплантации. Длительность госпитализации составила 23 койко-дня, пациентка выписана с удовлетворительно функционирующим трансплантатом. Лабораторные показатели спустя 18 месяцев*

после трансплантации: АСТ – 35 Ед/л, АЛТ – 41 Ед/л, билирубин – 19 мкмоль/л.

Операции трансплантации полученных почек были выполнены последовательно иммунологически совместимым реципиентам.

1. Пациент Р., 27 лет, с диагнозом: «хронический гломерулонефрит, морфологически не верифицированный; нефросклероз; заместительная почечная терапия программным гемодиализом с 2016 года». Функция трансплантата отсроченная, проведено 6 процедур гемодиализа. Пациент выписан на 24-е сутки с удовлетворительно функционирующим трансплантатом. Лабораторные показатели через 18 месяцев после трансплантации: креатинин – 0,189 ммоль/л, мочевины – 10,8 ммоль/л.
2. Пациент П., 34 года, с диагнозом: «хронический гломерулонефрит, морфологически не верифицированный; нефросклероз; заместительная почечная терапия программным гемодиализом с 2007 года». Функция трансплантата отсроченная, проведена 1 процедура гемодиализа. Пациент выписан на 24-е сутки с удовлетворительно функционирующим трансплантатом. Лабораторные показатели через 18 месяцев после трансплантации: креатинин – 0,169 ммоль/л, мочевины – 11,2 ммоль/л.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В период с 2017-го по 2020 год в рамках программы в отделение скорой медицинской помощи доставлено 67 пациентов с внегоспитальной остановкой кровообращения. В 4 (5,97%) случаях были эффективны мероприятия расширенной СЛР и ЭКМО с целью спасения жизни (пациенты выписаны без неврологического дефицита), 11 (16,42%) стали эффективными донорами. Средний возраст доставленных пациентов с внегоспитальной остановкой сердца составил 50,3 ± 16,7 года. Структура результатов проведения расширенной СЛР и ЭКМО представлена на рис. 4.

Трансплантация почки от указанных доноров была выполнена 22 пациентам. Средний возраст реципиентов составил 46,8 ± 11,6 года. Время от начала холодной перфузии до реперфузии трансплантата составило 570,4 ± 179,6 мин, вторичной тепловой ишемии – 34,2 ± 6,42 мин. Немедленная функция трансплантата имела место в 10 (45,45%) случаях. Среднее число процедур гемодиализа в случаях отсроченной функции составило 4,2 ± 3,2 процедуры, восстановление функции трансплантата почки произошло на 12–15-е сутки. В 2 (9,1%) случаях трансплантации почки трансплантат был удален в связи с острым кризом отторжения и тромбозом почечной вены в первые 3 суток после трансплантации.

Трансплантация печени была выполнена 5 пациентам с циррозом печени различной этиологии (аутоиммунный гепатит, первичный склерозирующий холангит, хронический вирусный гепатит С и т. д.) в тяжелом состоянии, обусловленном терминальной печеночной недостаточностью и ее осложнениями (тяжелая печеночная энцефалопатия, портальная гипертензия и т. д.). Средний возраст больных составил 55,4 ± 10,1 года, значение MELD 18,6 ± 7,9, Чайлд-Пью класс С. Длительность периода холодной ишемии составила в среднем 380 ± 36,7 мин, тепловой ишемии – 52 ± 10,3 мин. Имел место 1 (20%) случай тяжелой дисфункции трансплантата в течение 33 суток после пересадки с последующим полным восстановлением функции. Один летальный исход был обусловлен тотальным тромбозом воротной вены и печеночной артерии на вторые сутки после трансплантации у пациентки с гепатоцеллюлярным раком на фоне хронического вирусного гепатита С.

Период наблюдения пациентов, которым выполнена трансплантация органов от АСД, составил от 14 до 34 (24,1 ± 7,15) месяцев. Функция трансплантатов на протяжении периода наблюдения удовлетворительная. Динамика основных лабораторных показателей, отражающих функцию трансплантатов, представлена на рис. 5–8.

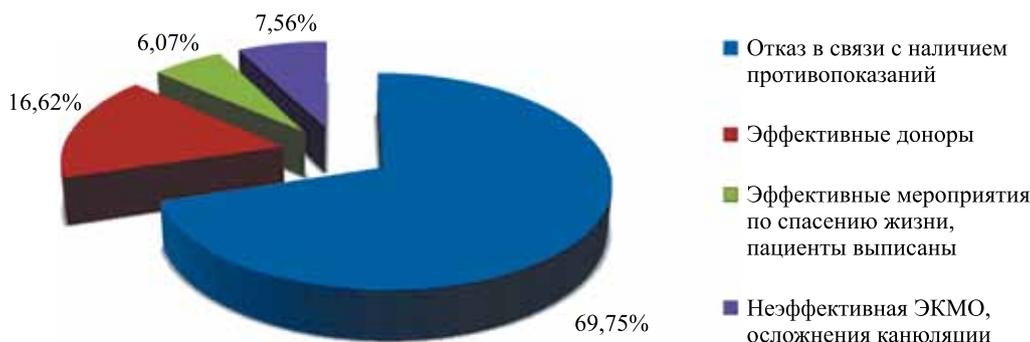


Рис. 4. Структура результатов проведения расширенной ЭКМО-СЛР

Fig. 4. Structure of the results of extended ECMO-Life Support Procedure

Среди поздних осложнений (в период от 1 до 34 месяцев от момента трансплантации) частота кризов отторжения почечных трансплантатов составила 10% (2), трансплантатов печени – 25% (1). Причиной криза отторжения печени явилось нарушение пациентом режима приема иммуносупрессивной терапии, успешно купирован введением глюкокортикоидов. Среди поздних осложнений трансплантации печени также в одном случае имела место ишемическая стриктура билиарного анастомоза, выполнено эндо-

скопическое стентирование зоны анастомоза. Ранние и поздние осложнения трансплантации почки и печени представлены в табл. 3.

Выживаемость трансплантатов почки составила 86,4%, реципиентов почечного трансплантата – 95,5%, печеночного трансплантата – 80% (рис. 9). Один летальный исход реципиента почки спустя 23 месяца после пересадки был обусловлен тяжелым течением новой коронавирусной инфекции COVID-19.

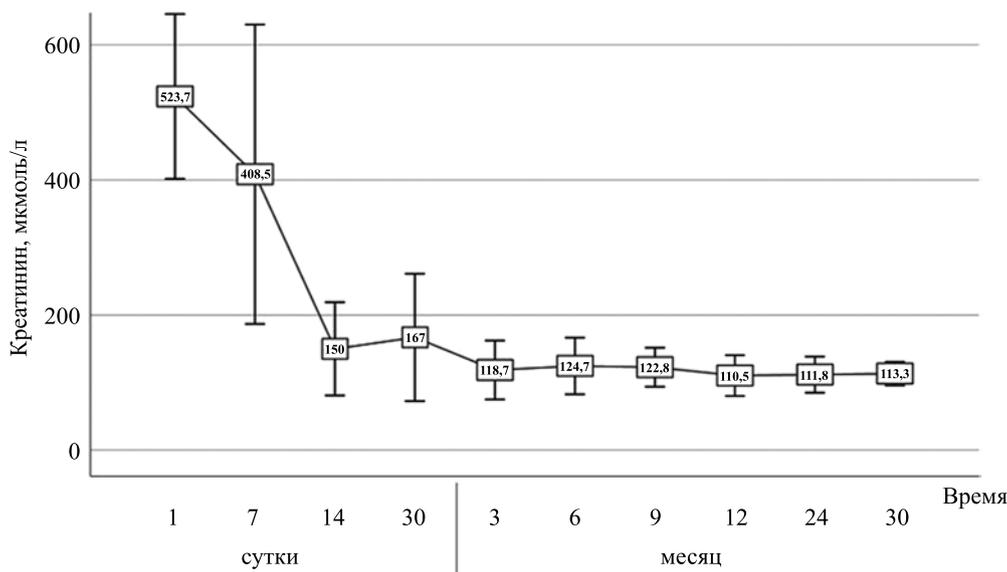


Рис. 5. Динамика средних значений креатинина в течение периода наблюдения реципиентов почечного трансплантата (95% ДИ)

Fig. 5. Dynamics of mean creatinine values during the follow-up period of kidney transplant recipients (95% CI)

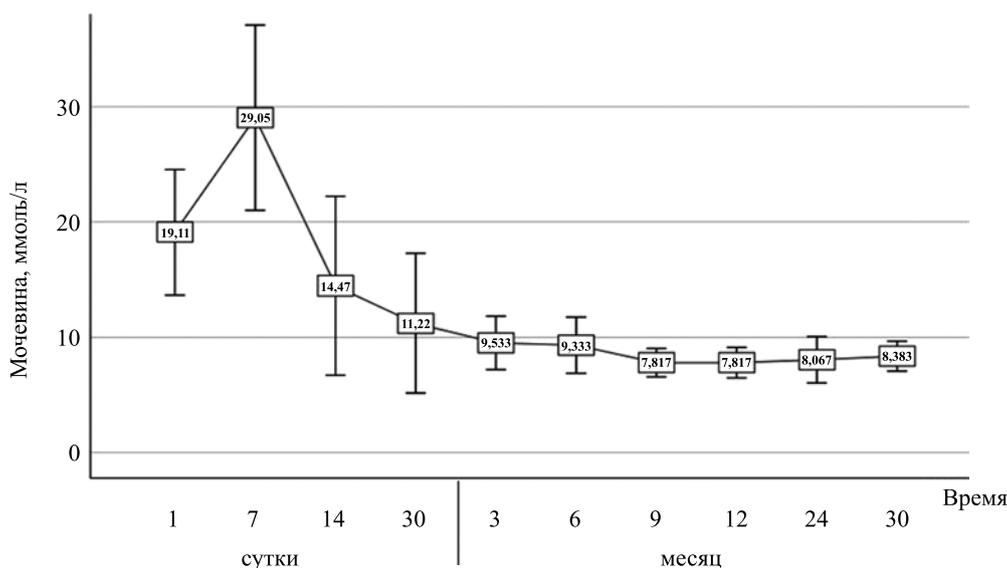


Рис. 6. Динамика средних значений мочевины в течение периода наблюдения реципиентов почечного трансплантата (95% ДИ)

Fig. 6. Dynamics of average urea values during the follow-up period of kidney transplant recipients (95% CI)

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В Испании на долю асистолических доноров приходится от 24 до 28% донорской активности, в зависимости от центра [33]. В России, как и в других странах, потенциальными донорами также могут считаться пациенты, у которых внезапно возникает остановка сердца и дыхания вне больницы и для которых попытки реанимации оказались безуспешными [34]. Новым в организации работы донорской

службы является оперативное взаимодействие команды трансплантологов и специалистов, пытающихся спасти жизнь пациентам с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения с помощью сочетания обычных средств реанимации и экстренного применения экстракорпоральной мембранной оксигенации. С одной стороны, наличие средств «поддержки жизни» (life-support technology) в отделении скорой медицинской помощи позволяет уве-

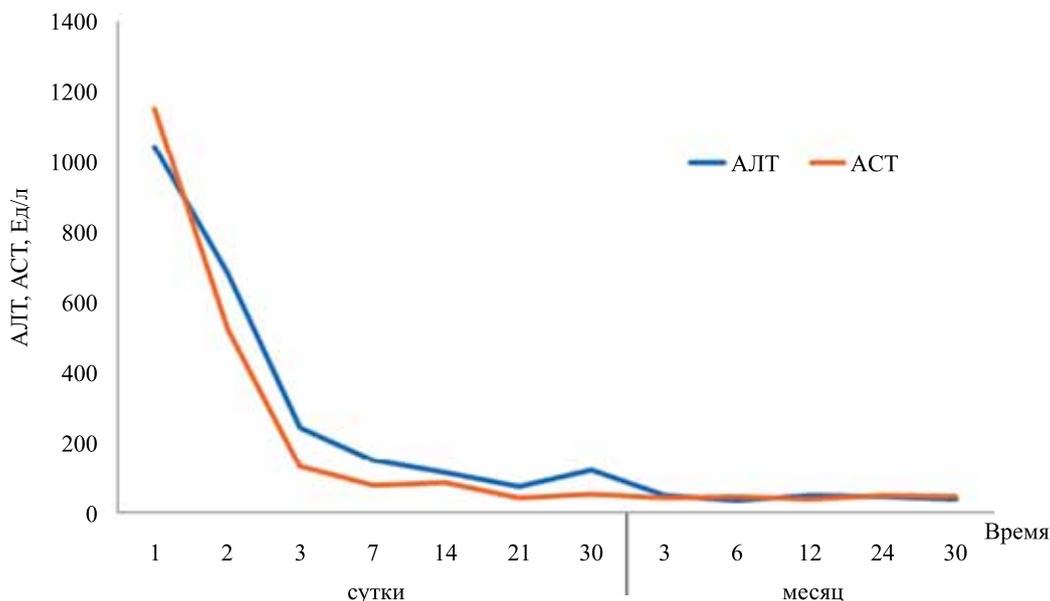


Рис. 7. Динамика средних значений АЛТ, АСТ (Ед/л) в течение периода наблюдения реципиентов печеночного трансплантата

Fig. 7. Dynamics of the mean values of ALT and AST (units/L) during the follow-up period of liver transplant recipients

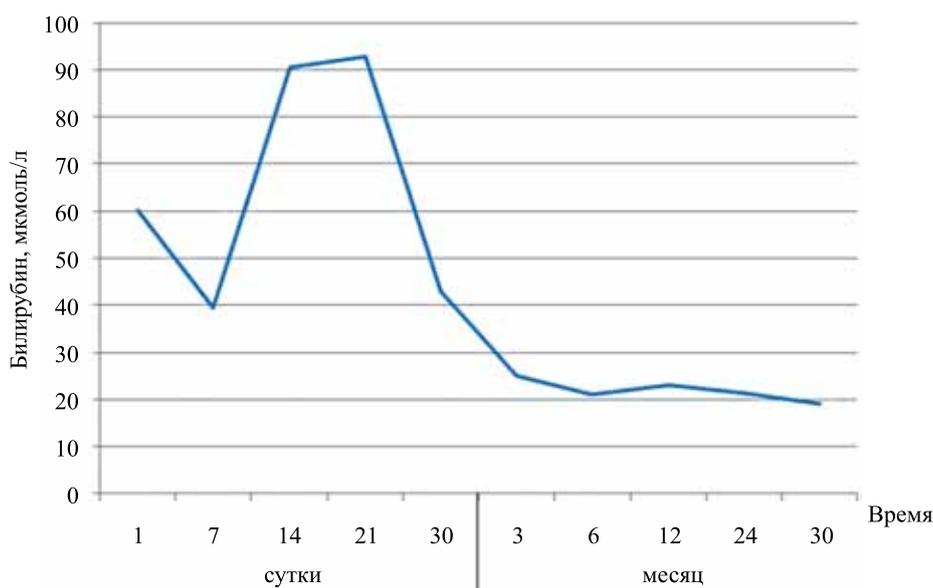


Рис. 8. Динамика средних значений билирубина (мкмоль/л) в течение периода наблюдения реципиентов печеночного трансплантата

Fig. 8. Dynamics of average bilirubin values (mmol/L) during the follow-up period of liver transplant recipients

личить выживаемость пациентов, реанимация которых в прошлом даже не проводилась бы, а в случаях неэффективности мероприятий по спасению жизни умершего – минимизировать ишемическое повреждение ставших, таким образом, донорскими органов и инициировать трансплантационную программу [6, 26–27].

В нашем случае наиболее значимой представляется проблема определения возможности перехода «реанимационных мероприятий» в «донорский протокол» (например, как констатировать смерть человека, у которого не работает сердце, но сохранено кровообращение за счет использования аппарата

его внешней механической поддержки; можно ли использовать классические критерии «смерти мозга» для констатации смерти пациента, находящегося на «искусственном» кровообращении). Необходимо дальнейшее совершенствование перфузионных программ для спасения жизни пациентов, как в случаях внезапной остановки сердца, так и с терминальными стадиями хронических заболеваний находящихся в листах ожидания [26, 27].

«Внегоспитальные» асистолические доноры подвергаются, по крайней мере, двум критическим периодам отсутствия кровообращения (от остановки сердца до начала реанимационных мероприятий и

Таблица 3

**Осложнения трансплантации почки, печени от АСД**  
**Complications of kidney and liver transplantation from ASD**

	Трансплантация печени (n = 5)	Трансплантация почки (n = 22)
Функция трансплантата:		
Отсроченная	1 (20%)	10 (45,45%)
Немедленная	3 (60%)	10 (45,45%)
Ранние осложнения (в течение 1 месяца с момента трансплантации)	n = 5	n = 22
Тромбоз сосудов трансплантата	1 (20%)	1 (4,55%)
Острый криз отторжения трансплантата	–	1 (4,55%)
Длительная ранняя дисфункция трансплантата	1 (20%)	1 (4,55%)
Летальность	1 (20%)	–
Поздние осложнения (1–34 месяца с момента трансплантации)	n = 4	n = 20
Криз отторжения трансплантата в срок	1 (25%)	2 (10%)
Стриктура билиарного анастомоза	1 (25%)	–
Летальность	–	1 (5%)

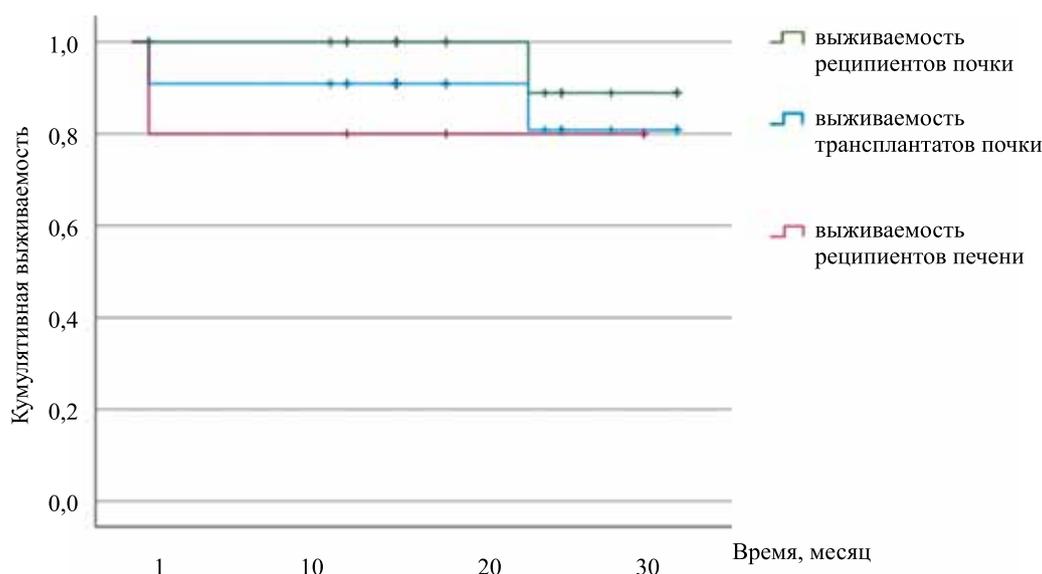


Рис. 9. Кумулятивная выживаемость трансплантатов почки и реципиентов, получивших донорские органы от АСД (95% ДИ)

Fig. 9. Cumulative survival of kidney transplants and recipients who received donated organs from ASD (95% CI)

во время «no-touch» периода, или т. н. период бездействия), длительность которых, в свою очередь, определяет принципиальную возможность использования их органов и оказывает существенное влияние на результаты последующих трансплантаций [35].

Все аппаратные методики возобновления кровообращения в теле донора можно назвать общепринятым термином «экстракорпоральная мембранная оксигенация» (ЭКМО), или, что более точно – «экстракорпоральная поддержка жизни», в нашем же случае – *восстановление и поддержание жизни органов в теле умершего человека*.

Отмечается устойчивая тенденция использования для органов, полученных от данной категории доноров, аппаратов для этапного, следующего за эксплантацией проведения *ex vivo* перфузии для диагностики, селекции и лечения [28–31].

Одним из наиболее важных факторов, влияющих на эффективность реализации программ как помощи пациентам с «внегоспитальной» внезапной остановкой кровообращения, так и при «внегоспитальном» донорстве органов, следует считать промежуток времени от момента остановки кровообращения и дыхания до начала реанимационных мероприятий. При этом необходимо принимать во внимание только СЛР, выполняемую врачами скорой медицинской помощи или с использованием внешних механических систем для непрямого массажа сердца (аппаратная СЛР). Так, если этот интервал был более 20 минут или длительность его не известна, в протоколе ПСПБГМУ такие пациенты не рассматривались в качестве потенциальных доноров. По нашим данным, средняя длительность такого периода составила  $7,5 \pm 2,4$  минуты. В доступных нам данных об итальянском и испанском протоколах использования АСД этот период был не более 15 минут [36].

В некоторых странах внедрение данного донорского протокола ограничено самой возможностью проведения каких-либо манипуляций с телом умершего после констатации биологической смерти. В Испании и США требуется получение согласия родственников на выполнение канюляции бедренных сосудов в целях донорства после констатации смерти человека, что в некоторых случаях значительно усложняет реализацию протокола (невозможность связаться с родственниками или отсутствие связи с родственниками в течение длительного периода времени) [37]. В так называемом Нью-Йоркском протоколе транспортировку потенциального донора в донорский стационар планировалось осуществлять отдельной бригадой [38]. При этом в Италии часть манипуляций, а именно пункция бедренных сосудов потенциального донора и введение антикоагулянтов, может быть выполнена уже на этапе транспортировки в стационар с места происшествя [39]. Ситуация усложняется при реализации сразу двух протоколов: СЛР с использованием автомеханических систем

вспомогательного кровообращения и оксигенации (ЭКМО-СЛР) и программы «внегоспитального» асистолического донорства. Использование дополнительных внешних устройств вспомогательного кровообращения при СЛР до момента констатации смерти зачастую создает дополнительные трудности в «валидации» потенциального донора, а при наличии признаков безуспешности реанимации требует констатации смерти мозга на фоне продолжающегося вспомогательного кровообращения [40]. Хотя недавний опыт Португалии показал, что обе программы могут успешно сосуществовать [41].

Другим, не менее важным фактором является время «no-touch» периода («период бездействия») – период от момента остановки кровообращения до констатации биологической смерти. Длительность его варьирует от двух до 20 минут отсутствия какой-либо ЭКГ-активности на мониторе [42]. Что касается протокола ПСПБГМУ работы с асистолическими донорами, такой промежуток не определен и не регламентирован, в связи с чем нами был принят наибольший допустимый временной промежуток в 20 минут, что, на наш взгляд, исключает этические противоречия в вопросе констатации и необратимости биологической смерти пациента при исчерпанности всех средств его реанимации.

В большинстве протоколов, доступных нам по данным иностранной литературы, общее время определяемой как недостаточной перфузии внутренних органов на фоне работы аппарата автоматического непрямого массажа сердца ограничено 150 минутами [43, 44]. В целом анализ международных результатов трансплантаций органов от «внегоспитальных» доноров показал, что допустимое общее время тепловой ишемии для почек составляет до 360 минут, печень – до 140 минут, легких – до 240 минут [45]. Учитывая недостаточность перфузии органов при непрямом массаже сердца, время его проведения было обозначено нами как время первичной тепловой ишемии, оно было отнесено к значимым отягощающим факторам и ограничивалось до «допустимых» 120 минут автоматического кардиомассажа.

Особое место в реализации данных протоколов имеет общая гепаринизация и канюляция сосудов для перфузии. Так, по данным итальянских авторов, как уже было упомянуто ранее, разрешено использование гепарина и установка интродьюсеров (но не канюль) в просвет бедренных сосудов до момента констатации смерти пациента [39]. Введение антикоагулянтов до момента констатации смерти при работе с данной категорией доноров (на этапе транспортировки потенциального донора в стационар) сопряжено с возможными фатальными осложнениями (внутричерепное кровоотечение, гемоторакс, внутрибрюшное кровоотечение и т. п.), что само по себе может остановить инициацию донорского протокола. Исходя из нашего опыта, введение гепарина до момента смерти

может быть оправдано только при осуществлении СЛР с использованием экстренного применения вспомогательного кровообращения с ЭКМО для спасения жизни пациентов с внезапной сердечной смертью. В то же время установку интродьюсеров в просвет сосудов необходимо осуществлять как можно раньше, так как отсутствие пульсации в артериях повышает вероятность технических ошибок на этапе канюляции сосудов донора. Использование механических устройств для непрямого массажа сердца и аппарата искусственной вентиляции может значительно сократить общее время тепловой ишемии и повысить процент использования и выживаемость трансплантатов [46].

Канюляция сосудов до момента наступления смерти позволяет сократить время тепловой ишемии и в то же время вызывает этические опасения у зарубежного профессионального трансплантационного сообщества из-за вероятности восстановления мозгового кровотока пациента после констатации его биологической смерти [47]. В связи с этим практически повсеместно за рубежом используется тот или иной способ изоляции абдоминального региона перфузии (при нормотермической региональной (абдоминальной) перфузии – НРП) – раздувание баллона в просвете аорты выше диафрагмы или наложение лигатуры на аорту после выполнения быстрой лапаротомии.

Мы не применяли установку баллона в просвет аорты, так как считаем период «бездействия» 20 минут достаточным, чтобы обеспечить подтверждение необратимости остановки кровообращения при наличии таковой, а также исключить вероятность восстановления некоторой части функций головного мозга. Исключение из протоколов окклюзирующих баллонов аорты позволяет нам смело предположить получение уже в ближайшем будущем возможность использовать сердце и легкие от асистолических доноров для клинической пересадки [48].

Несмотря на неоднократные эксперименты на животных, в которых была показана эффективность использования тромболитиков, а также наш клинический опыт применения тромболитиков (Стрептокиназы, Альтеплазы) при абдоминальной нормотермической перфузии *in situ*, в настоящее время отсутствуют сообщения о включении данной группы препаратов в протоколы работы с «внегоспитальными» донорами [6, 49, 50]. Такая же ситуация наблюдается и с применением механической и фармакологической лейкоредукции в организме донора. Рутинное использование лейкоцитарных фильтров описано при проведении изолированной перфузии легких, где была показана взаимосвязь лейкоредукции и частоты первичной дисфункции легочных трансплантатов [51]. По нашему мнению, на сегодняшний день эти неотъемлемые компоненты перфузионных протоколов недооценены, и они

имеют значительный потенциал в плане улучшения функционального состояния органов от асистолических доноров до момента трансплантации, а по сути, донорский терапевтический потенциал ЭКМО сводится к нулю без их применения.

Подводя итог обсуждения, необходимо сказать, что «внегоспитальные» доноры при использовании аппаратного обеспечения являются полноценным донорским ресурсом, не только в отношении почечных трансплантатов, но и таких донорских органов, как печень, поджелудочная железа, легкие. В недавнем европейском исследовании по оценке эффективности различных путей посмертного донорства в 2016 году использование «внегоспитальных» асистолических доноров составило 75% по сравнению с 91% от «контролируемых» асистолических доноров и 93% от доноров со смертью мозга [35]. Так, за 15-летний период в Испании было выполнено 1713 операций по пересадке почек, 158 операций по пересадке печени и 86 операций по пересадке легких от данных доноров. Эти результаты достигнуты при довольно высоком уровне отказов от пересадки таких органов (45% почек и 62% печени), в основном из-за неэффективной перфузии. При этом актуальная выживаемость трансплантатов почек в течение года составила 87%, несмотря на увеличение частоты отсроченной функции трансплантатов (78%) и ранней дисфункции трансплантатов (7%) по сравнению со стандартными донорами со смертью мозга. Эти результаты были подтверждены позднее как несколькими отдельными испанскими центрами, так и результатами французских и итальянских исследований [52].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянная технологизация медицинской отрасли приводит к внедрению высокотехнологичных методов в практику медицины критических состояний и жизнеобеспечения. Велением времени является имплементация технологий использования механических кардиомассажеров в работе скорой медицинской помощи и ЭКМО в условиях СОСМП, в первую очередь с целью повышения эффективности и результативности реанимационных мероприятий. Наличие в арсенале реаниматологов и широкое применение портативных перфузионных устройств для проведения ЭКМО в сочетании с расширенными реанимационными мероприятиями позволяет добиться выживания 5,92% пациентов с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения. В случае неэффективности мероприятий по спасению жизни такая медицинская технология позволяет осуществить трансфер к процедуре сохранения органов умершего донора и реализации донорской программы в 16,47% случаев. Результаты трансплантации органов от асистолических доноров, восстановление кровообращения у которых проводилось с помощью ЭКМО, в долгосрочной перспективе практически не

отличаются от исхода трансплантации от доноров, у которых диагностирована смерть мозга. Таким образом, повсеместная, широкая технологизация реаниматологической помощи, применение перфузионных технологий и портативной перфузионной техники в рамках процедуры life support потенциально позволяет сохранить жизнь пациентам с внезапной внегоспитальной остановкой кровообращения и обладает впечатляющим потенциалом расширения пула донорских органов.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Matesanz R, Mahillo B, Alvarez Mar Carmona M. International figures on donation and transplantation – 2013. *Newsletter Transplant*. Spain: Organizaci3n Nacional de Trasplantes (ONT) – 2014.
2. <http://www.eurotransplant.org/>, доступ 03.01.2021.
3. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2017 году. X собрание 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 2015. 10th report of National Register. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (2): 6–28. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2018-2-6-28.
4. Sánchez-Fructuoso AI, Prats D, Torrente J et al. Renal transplantation from non-heart beating donors: a promising alternative to enlarge the donor pool. *J Am Soc Nephrol*. 2000; 11: 350–358.
5. IOM: Organ Donation: Opportunities for Action. Washington, DC: National Academies Press; 2006.
6. Reznik ON, Bagnenko SF, Skvortsov AE. Uncontrolled Donors with Controlled Reperfusion after Sixty Minutes of Asystole: A Novel Reliable Resource for Kidney Transplantation. *PloS One*. 2013; 8–5: e64209.
7. Rudich SM, Kaplan B, Magee JC et al. Renal transplantations performed using non-heart-beating organ donors: going back to the future? *Transplantation*. 2002; 74: 1715–1720.
8. Kokkinos C, Antcliffe D, Nanidis T et al. Outcome of kidney transplantation from non-heart-beating versus heart-beating cadaveric donors. *Transplantation*. 2007; 83: 1193–1199.
9. Borry P, van Reusel W, Roels L, Schotsmans P. Donation after Uncontrolled Cardiac Death (uDCD): a review of the debate from a European perspective. *J Law Med Ethics*. 2008; 36: 752–759.
10. Blackstock MJ, Ray DC. Organ donation after circulatory death: an update. *Eur J Emerg Med*. 2014; 21: 324–329.
11. Abrams D et al. Extracorporeal membrane oxygenation in cardiopulmonary disease in adults. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014; 63.25 Part A: 2769–2778.
12. Carroll BJ et al. Clinical features and outcomes in adults with cardiogenic shock supported by extracorporeal membrane oxygenation. *The American journal of cardiology*. 2015; 116.10: 1624–1630.
13. Mattox KL, Beall AC. Resuscitation of the moribund patient using portable cardiopulmonary bypass. *The Annals of thoracic surgery*. 1976; 22.5: 436–442.
14. Rousou JA et al. Emergency cardiopulmonary bypass in the cardiac surgical unit can be a lifesaving measure in postoperative cardiac arrest. *Circulation*. 1994; 90.5 Pt 2: II280–II284.
15. Walpoth BH et al. Accidental deep hypothermia with cardiopulmonary arrest: extracorporeal blood rewarming in 11 patients. *European Journal of Cardio-thoracic surgery*. 1990; 4.7: 390–393.
16. Mégarbane B et al. Emergency feasibility in medical intensive care unit of extracorporeal life support for refractory cardiac arrest. *Intensive care medicine*. 2007; 33.5: 758–764.
17. Nichol G et al. Systematic review of percutaneous cardiopulmonary bypass for cardiac arrest or cardiogenic shock states. *Resuscitation*. 2006; 70.3: 381–394.
18. Guenther S et al. Percutaneous extracorporeal life support for patients in therapy refractory cardiogenic shock: initial results of an interdisciplinary team. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2014; 18.3: 283–291.
19. Chamogeorgakis T et al. Outcomes of axillary artery side graft cannulation for extracorporeal membrane oxygenation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2013; 145.4: 1088–1092.
20. Grasselli G et al. Percutaneous vascular cannulation for extracorporeal life support (ECLS): a modified technique. *The International journal of artificial organs*. 2010; 33.8: 553–557.
21. Avalli L et al. Percutaneous left-heart decompression during extracorporeal membrane oxygenation: an alternative to surgical and transeptal venting in adult patients. *Asaio Journal*. 2011; 57.1: 38–40.
22. Cardarelli MG, Young AJ, Griffith B. Use of extracorporeal membrane oxygenation for adults in cardiac arrest (E-CPR): a meta-analysis of observational studies. *Asaio Journal*. 2009; 55.6: 581–586.
23. Morimura N et al. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation for out-of-hospital cardiac arrest: a review of the Japanese literature. *Resuscitation*. 2011; 82.1: 10–14.
24. Biarent D. International Liaison Committee on Resuscitation.: 2005 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Circulation*. 2005; 112.22: 1–136.
25. ECC Committee. 2005 American Heart Association guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation*. 2005; 112.24 Suppl: IV1–IV203.
26. Childress JF. Organ donation after circulatory determination of death: lessons and unresolved controversies. *J Law Med Ethics*. 2008; 36: 766–771.
27. Rodriguez-Arias D, Deballon IO. Protocols for uncontrolled donation after circulatory death. *Lancet*. 2012; 379: 1275–1276.

28. Hosgood SA, Patel M, Nicholson ML. The conditioning effect of ex vivo normothermic perfusion in an experimental kidney model. *J Surg Res*. 2013; 182: 153–160.
29. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H et al. Liver transplantation after ex vivo normothermic machine preservation: a phase I (first-in-man) clinical trial. *Am J Transplant*. 2016; 16: 1779–1787.
30. Van Raemdonck D, Neyrinck A, Cypel M, Keshavjee S. Ex vivo lung perfusion. *Transpl Int*. 2015; 28 (6): 643–656.
31. Ardehali A, Esmailian F, Deng M et al. Ex vivo perfusion of donor hearts for human heart transplantation (PROCEED II): a prospective, open-label, multicentre, randomised non-inferiority trial. *Lancet*. 2015; 385: 2577–2584.
32. Скворцов АЕ. Применение экстракорпоральной нормотермической аппаратной перфузии у асистолических доноров почек: Дис. ... канд. мед. наук. М., 2010. Skvortsov AE. Primenenie ekstrakorporal'noy normotermicheskoy apparatnoy perfuzii u asistolicheskikh donorov pochek: Dis. ... kand. med. nauk. M., 2010.
33. Miñambres E, Rubio JJ, Coll E, Domínguez-Gil B. Donation after circulatory death and its expansion in Spain. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018 Feb; 23 (1): 120–129. doi: 10.1097/MOT.0000000000000480. PMID: 29120882.
34. Lomero M, Gardiner D, Coll E, Haase-Kromwijk B, Proccaccio F, Immer F et al. European Committee on Organ Transplantation of the Council of Europe (CD-P-TO). Donation after circulatory death today: an updated overview of the European landscape. *Transpl Int*. 2020; 33: 76–88.
35. Ortega-Deballon I, Hornby L, Shemie SD. Protocols for uncontrolled donation after circulatory death: a systematic review of international guidelines, practices and transplant outcomes. *Crit Care*. 2015; 19: 268.
36. Zanierato M, Dondossola D, Palleschi A, Zanella A. Donation after circulatory death: possible strategies for in-situ organ preservation. *Minerva Anesthesiol*. 2020 Sep; 86 (9): 984–991. doi: 10.23736/S0375-9393.20.14262-7. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32251572.
37. Jericho Bg. Organ Donation after circulatory Death: Ethical issues and international Practices. *Anesth Analg*. 2019; 128: 280–285.
38. Wall SP, Kaufman BJ, Gilbert AJ et al. NYC UDCDD Study Group. Derivation of the uncontrolled donation after circulatory determination of death protocol for New York City. *Am J Transplant*. 2011; 11: 1417–1426.
39. Giannini A, Abelli M, Azzoni G, Biancofiore G, Citterio F, Geraci P et al. Working group on DCD of Italian society of anesthesiology, analgesia and intensive care (SIAARTI); Italian society for organ transplantation. «Why can't I give you my organs after my heart has stopped beating?» an overview of the main clinical, organisational, ethical and legal issues concerning organ donation after circulatory death in Italy. *Minerva Anesthesiol*. 2016; 82: 359–368.
40. Bein T, Müller T, Citerio G. Determination of brain death under extracorporeal life support. *Intensive Care Med*. 2019 Mar; 45 (3): 364–366. doi: 10.1007/s00134-018-05510-z. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30627781.
41. Roncon-Albuquerque R Jr, Gaião S, Figueiredo P et al. An integrated program of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) assisted cardiopulmonary resuscitation and uncontrolled donation after circulatory determination of death in refractory cardiac arrest. *Resuscitation*. 2018; 133: 88–94.
42. Jericho Bg. Organ Donation after circulatory Death: Ethical issues and international Practices. *Anesth Analg*. 2019; 128: 280–285.
43. Domínguez-gil B, Duranteau J, Mateos A, Núñez Jr, Cheisson G, Corral E et al. Uncontrolled donation after circulatory death: European practices and recommendations for the development and optimization of an effective programme. *Transpl Int*. 2016; 29: 842–859.
44. Savier E, Dondero F, Vibert E, Eyraud D, Brisson H, Riou B et al. Donation after cardiac Death study group. First experience of liver transplantation with type 2 donation after cardiac death in France. *Liver Transpl*. 2015; 21: 631–643.
45. Zanierato M, Dondossola D, Palleschi A, Zanella A. Donation after circulatory death: possible strategies for in situ organ preservation. *Minerva anesthesiol*. 2020; 86: 984–991. doi: 10.23736/s0375-9393.20.14262-7.
46. Miñambres E, Suberviola B, Guerra C, Lavid N, Lassalle M, González-Castro A, Ballesteros MA. Experience of a Maastricht type II non heart beating donor program in a small city: preliminary results. *Med Intensiva*. 2015 Oct; 39 (7): 433–441. English, Spanish. doi: 10.1016/j.medint.2014.09.007. Epub 2014 Nov 29. PMID: 25444059.
47. Dalle Ave AL, Shaw DM, Bernat JL. Ethical issues in the use of extracorporeal membrane oxygenation in controlled donation after circulatory determination of death. *Am J Transplant*. 2016; 16: 2293–2299.
48. Tsui SSL, Oniscu GC. Extending normothermic regional perfusion to the thorax in donors after circulatory death. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017; 22: 245–250.
49. Demos DS, Iyengar A, Bryner BS, Gray BW, Hoffman HR, Cornell MS et al. Successful Porcine Renal Transplantation After 60 Minutes of Donor Warm Ischemia: Extracorporeal Perfusion and Thrombolytics. *ASAIO J*. 2015 Jul-Aug; 61 (4): 474–479. doi: 10.1097/MAT.0000000000000228. PMID: 25851315; PMCID: PMC4486602.
50. Reznik O, Skvortsov A, Loginov I, Ananyev A, Bagnenko S, Noysyuk Y. Kidney from uncontrolled donors after cardiac death with one hour warm ischemic time: resuscitation by extracorporeal normothermic abdominal perfusion «in situ» by leukocytes-free oxygenated blood. *Clin Transplant*. 2011; 25 (4): 511–516.
51. Divithotawela C, Cypel M, Martinu T, Singer LG, Binnie M, Chow CW et al. Long-term outcomes of lung transplant with ex vivo lung Perfusion. *JaMa Surg*. 2019; 154: 1143–1150.
52. Sanchez-Escuredo A, Diekmann F, Revuelta I et al. An mTOR-inhibitor-based protocol and calcineurin inhibitor (CNI)-free treatment in kidney transplant recipients from donors after cardiac death: good renal function, but high incidence of conversion to CNI. *Transpl Int*. 2016; 29: 362–368.

Статья поступила в редакцию 4.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 4.06.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-50-60

## БИЛИАРНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ У ДЕТЕЙ ВЕСОМ ДО 15 КГ; СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ «ПРОТОК В ПРОТОК» И ГЕПАТИКОЕЮНОСТОМИИ НА ПЕТЛЕ ПО РУ

S.M. Dehghani<sup>1</sup>, M. Ataollahi<sup>1</sup>, F. Salimi<sup>1</sup>, K. Kazemi<sup>1</sup>, S. Gholami<sup>1</sup>, I. Shahramian<sup>2</sup>, F. Parooie<sup>2</sup>, M. Salarzaei<sup>2</sup>, A. Aminisefat<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Pediatric Gastroenterology and Hepatology Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

Трансплантация печени – эффективный способ лечения острой и хронической печеночной недостаточности и метаболических заболеваний печени, позволяющий обеспечить хорошее качество жизни более чем 80% реципиентов. Мы поставили задачу оценить результаты использования методов «проток в проток» и гепатикоюностомии на петле по Ру при трансплантации печени детям весом менее 15 кг. **Материалы и методы.** В это одноцентровое ретроспективное исследование включали детей массой менее 15 кг, которым была проведена трансплантация печени в Центре трансплантации органов больницы при Ширазском университете медицинских наук с 2009-го по 2019 г. За 10 лет пациентам была проведена 181 трансплантация с билиарной реконструкцией методом «проток в проток» (группа 1) и гепатикоюностомией на петле кишечника, выключенной по Ру (группа 2). Все данные получены из медицинских записей пациентов, протоколов операций и данных послеоперационного наблюдения. Для анализа использовали программное обеспечение SPSS-V21. **Результаты исследования.** Из всех пациентов 94 больным проведена реконструкция желчевыводящих путей методом «проток в проток» (группа 1), в 87 случаях проводили гепатикоюностомию на петле по Ру (группа 2). Средний возраст пациентов составил  $2,46 \pm 1,5$  года. Наиболее часто показанием к операции являлась атрезия желчевыводящих путей (32%). Самым частым осложнением после хирургического вмешательства в обеих группах была инфекция. Осложнения со стороны сердечно-легочной системы значительно чаще наблюдались в группе 2 (24,1% против 4,3%) ( $p < 0,001$ ). Инфекционные осложнения также значительно чаще отмечены в группе 2. **Заключение.** В нашем исследовании выявлена достаточно высокая частота послеоперационных инфекционных осложнений, которые встречались чаще у пациентов, которым проводили гепатикоюностомию на петле по Ру. За исключением осложнений со стороны желчевыводящих путей, которые в основном наблюдались в группе «проток в проток», другие осложнения чаще встречались в группе гепатикоюноанастомоза на петле по Ру.

*Ключевые слова:* трансплантация печени, реконструкция желчевыводящих путей «проток в проток», гепатикоюностомия на петле по Ру, осложнения операций на желчевыводящих путях.

## LIVER TRANSPLANTATION IN PEDIATRIC PATIENTS UNDER 15-KG; DUCT-TO-DUCT VS. ROUX-EN-Y HEPATICOJEJUNOSTOMY BILIARY ANASTOMOSES

S.M. Dehghani<sup>1</sup>, M. Ataollahi<sup>1</sup>, F. Salimi<sup>1</sup>, K. Kazemi<sup>1</sup>, S. Gholami<sup>1</sup>, I. Shahramian<sup>2</sup>, F. Parooie<sup>2</sup>, M. Salarzaei<sup>2</sup>, A. Aminisefat<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Shiraz Transplant Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> Pediatric Gastroenterology and Hepatology Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran

**Back ground.** Liver transplantation is an effective treatment for acute or chronic liver failure and metabolic liver disease, which is associated with good quality of life in over 80 percent of recipients. We aimed to evaluate outcome

**Corresponding author:** Iraj Shahramian, Full Professor of Pediatric Gastroenterology and Hepatology, Pediatric Gastroenterology and Hepatology Research Center, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran.  
Tel/fax: +985432239031. E-mail: ir\_buper@yahoo.com

of duct-to-duct vs. Roux-en-Y hepaticojejunostomy biliary anastomoses in pediatric liver transplant recipients below 15-kg. **Methods.** In this single-center retrospective study, all children less than 15 kg that have undergone liver transplantation at Nemazee Hospital Organ Transplant Center affiliated with Shiraz University of Medical Sciences from 2009 till 2019, were enrolled. Over a 10-yr period, 181 liver transplants were performed in patients with two techniques including duct-to-duct (Group 1) vs. Roux-en-Y hepaticojejunostomy biliary anastomoses (Group 2). All data was collected from patients' medical records, operative notes, and post-transplant follow up notes. Data was analyzed by SPSS software V21. **Results.** Overall, 94 patients had duct to duct anastomosis (group 1) and 87 cases had Roux-en-Y hepaticojejunostomy (group 2). The mean age of the patients was  $2.46 \pm 1.5$ . The most common underlying diseases was biliary atresia (32%). The most prevalent complication after the surgery was infection in both groups. cardiopulmonary problems were significantly higher in group 2 (24.1% vs 4.3%) ( $p < 0.001$ ). The rate of infection was significantly higher in group 2, as well. **Conclusion.** Our study showed a relatively high rate of post-operative infection which was the most among patients who had undergone Roux-en-Y hepaticojejunostomy. Except from biliary complications which were mostly observed in DD group, other complications were more common among Roux-en-Y group.

*Keywords: liver transplantation, duct-to-duct biliary reconstructions, Roux-en-Y hepaticojejunostomy, Biliary complications.*

## ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени (ТП) – общепринятый способ лечения острой и хронической печеночной недостаточности, а также метаболических заболеваний печени. Выживаемость после ТП значительно повысилась в развитых странах, что уменьшило настороженность в отношении этого метода лечения в мире. Появление новых иммуносупрессивных препаратов, совершенствование техники операции и способов консервации органов, разработка специальных сопутствующих методик анестезии и реанимации привели к значительному улучшению выживаемости пациентов. У детей и их семей появился шанс вернуться к нормальной жизни. Большинство детей после успешной трансплантации печени достигают нутритивной реабилитации и могут вести нормальный образ жизни. Многие из них достигают половой зрелости и имеют нормальную фертильность. Трансплантация печени у детей получила развитие в последние десятилетия. Разработка методов пересадки трансплантатов уменьшенного размера и трансплантации от живых доноров значительно снизила уровень смертности у детей, страдающих заболеваниями печени в терминальной стадии [1, 2]. Однако, несмотря на продолжающееся совершенствование хирургической техники, после операций на желчевыводящих путях по-прежнему часто (от 10 до 50%) встречаются такие связанные со значительной смертностью осложнения, как подтекание из желчных протоков и анастомоза и стриктуры [3, 4]. Хотя связанные с желчевыводящими путями осложнения трансплантации печени у детей не коррелируют с уменьшением выживаемости пациентов, они значительно влияют на течение послеоперационного периода, увеличивают продолжительность пребывания в стационаре, необходимость оперативного и других видов вмешательств, а иногда и повторной трансплантации. Билиарный анастомоз называют ахилле-

совой пятой ортотопической трансплантации печени [5]. Такие осложнения, как подтекание, стриктура, свищ, инфекция и формирование камней в желчных протоках, привели к необходимости разработки технически новых методов. Первые реконструкции желчных протоков выполнялись путем петлевой холедохоюностомии и гепатикоеюностомии на петле, выключенной по Ру, желчный пузырь использовали в качестве кондуита. В 1980-х годах наиболее популярной техникой стала холедохо-холедохостомия «проток в проток» через Т-образную трубку. В течение последних двух десятилетий основным методом реконструкции стал анастомоз «проток в проток» без Т-образной трубки. С появлением в 1990-х годах трансплантации печени от живого донора начали выполнять реконструкцию желчных путей без кишечного анастомоза [5]. Гепатикоеюностомия на петле по Ру являлась стандартным методом операции при трансплантации печени от живого донора, недостатками этого метода являются относительно продолжительное время операции и более высокий риск контаминации из-за формирования анастомоза с петлей кишки, выключенной по Ру. Теоретически реконструкция желчных протоков «проток в проток» имеет некоторые преимущества по сравнению с гепатикоеюностомией по Ру, а именно отсутствие манипуляций на желудочно-кишечном тракте, меньшая длительность операции и легкость эндоскопического доступа к месту анастомоза в случае возникновения осложнений. Это стандартный метод выбора для выполнения билиарного анастомоза при трансплантации печени от посмертного донора. Использование техники билиарной реконструкции «проток в проток» при трансплантации печени от живого донора позволяет избежать внекишечного анастомоза, сформировать более физиологичные, чем при анастомозе на петле по Ру, желчевыводящие пути, а сохранение функции сфинктера нижней части желчного протока

может уменьшить риск рефлюкса кишечного содержимого в желчные пути. Билиарная реконструкция «проток в проток» является стандартной техникой при трансплантации печени у взрослых. С другой стороны, распространенность атрезии желчных протоков и технические сложности, связанные с небольшим размером и хрупкостью протока реципиентов детского возраста, привели к гораздо большему распространению гепатикоеюностомии на петле по Ру.

Техника трансплантации печени требует дальнейшего совершенствования, и перед специалистами стоит много нерешенных проблем. Эволюция методов трансплантации печени привела к улучшению результатов лечения пациентов. В литературе недостаточно данных о результатах использования двух рассматриваемых методов реконструкции желчевыводящих путей при трансплантации печени [10]. Целью этого исследования было сравнить результаты билиарной реконструкции «проток в проток» и гепатикоеюностомии на петле по Ру у детей – реципиентов печени с массой тела менее 15 кг.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В это одноцентровое ретроспективное исследование были включены дети массой менее 15 кг, которым проводили трансплантацию печени в Центре трансплантации органов больницы при Ширазском университете медицинских наук в период с 2009-го по 2019 г. За 10-летний период выполнена 181 трансплантация с реконструкцией желчеотведения методами «проток в проток» (группа 1) и гепатикоеюностомии на петле по Ру (группа 2). Данные были получены из электронной медицинской документации: проанализированы такие характеристики, как возраст, история заболевания, детали операции трансплантации, послеоперационное наблюдение. Информация о послеоперационном периоде включала выживаемость пациента и трансплантата. Данные были выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Для статистического анализа использовали точный критерий Фишера, t-критерий Стьюдента и логранговый критерий. За статистически значимые принимали значения  $p < 0,05$ . Все реципиенты печени с полным или частичным трансплантатом имели массу тела менее 15 кг. Данные были собраны из медицинских карт пациентов, протоколов операций, послеоперационного наблюдения. Анализировали такие демографические характеристики, как возраст, пол, вес, а также первичный диагноз, балл по шкале PELD (шкала оценки терминальной стадии заболевания печени у детей), наличие ранее проведенных вмешательств на желчных путях, тип и вес трансплантата, тип донора, дата трансплантации, продолжительность ишемии трансплантата, продолжительность операции, наличие желчных и сосудистых осложнений. Пациентов разделили на две группы в зависи-

мости от типа выполненного во время трансплантации билиарного анастомоза: реконструкция «проток в проток» и реконструкция желчных путей методом гепатикоеюностомии на петле, выключенной по Ру. Анастомоз «проток в проток» преимущественно выполняли во всех случаях, когда оперирующий хирург считал это технически выполнимым. Были зарегистрированы осложнения со стороны желчевыводящих путей, такие как подтекание из желчных протоков, стриктуры или развитие холангита. Подтекание из желчных протоков из участков анастомоза диагностировали на основании холангиограмм; осложнение считалось серьезным, если для его устранения требовалось какое-либо дальнейшее вмешательство. Стриктуры желчных путей диагностировали на основании динамики ферментов печени, указывающей на холестаза, и холангиограммы, демонстрирующей наличие стриктуры. Холангит предполагали у любого пациента, у которого развивалась лихорадка или наблюдались повышенные уровни лейкоцитов и билирубина. Сосудистые осложнения включали тромбоз или стриктуру печеночной артерии. Оба сосудистых осложнения первоначально были диагностированы с помощью ультразвуковой доплерографии с последующим подтверждением стеноза артерии с помощью ангиограммы. Также учитывалась смертность в обеих группах. Для сравнения обеих групп в основном использовались t-критерий Стьюдента и хи-квадрат Пирсона. Дальнейший статистический анализ проводился с использованием точного критерия Фишера с расширением Фримена–Халтона, когда это было необходимо.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Дооперационные характеристики пациентов

Из общего числа пациентов 94 была выполнена билиарная реконструкция с выполнением анастомоза «проток в проток» (группа 1), и в 87 случаях была выполнена гепатикоеюностомия на петле по Ру. Впоследствии из исследования исключили 46 человек из группы 1 и 43 человека из группы 2. Средний возраст пациентов составил  $2,468 \pm 1,5711$  года (0,5–10), а их средний вес составил  $10,403 \pm 2,5501$  кг (4–15). Наиболее частыми заболеваниями, потребовавшими проведения операции, были атрезия желчевыводящих путей (32%), PFC – прогрессирующий внутрипеченочный холестаза (17,1%), тирозинемия (16%) и синдром Криглера–Найяра (10,5%). Наиболее частым осложнением перед операцией среди наших пациентов являлся асцит – с частотой 8,8%. Средний балл по шкале PELD в группе 1 и группе 2 перед операцией составлял  $15,19 \pm 8,9$  и  $19,64 \pm 6,9$  соответственно. Из 94 пациентов группы 1 в 44 случаях пациентам проведена трансплантация части печени,

в 23 – сплит-трансплантация, а в 27 – целого органа. В группе 2 – 61, 13 и 12 пациентов соответственно. В группе 1 донором чаще всего являлся посмертный донор, а в группе 2 – матери пациентов. Полные предоперационные характеристики пациентов приведены в табл. 1.

**Показатели в послеоперационном периоде**

Наиболее часто используемыми иммуносупрессивными препаратами в обеих группах были преднизолон и такролимус. По нашим данным, пациенты группы 1 значительно чаще нуждались а преднизолоне, такролимусе и микофенолате, чем пациенты группы 2 (p < 0,05). Наиболее частыми осложнениями в обеих группах были инфекционные. Сердечно-легочные осложнения значительно чаще встречались в группе 2 (24,1% в сравнении с 4,3%) (p < 0,001). Частота инфекционных осложнений была значительно выше также в группе 2. Частота осложнений, связанных с желчными путями, была выше в груп-

пе 1, но различие не было статистически значимым. Из повторных вмешательств реже всего выполняли дренирование, а наиболее распространенными хирургическими процедурами были эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатикография и гепатикоеюностомия на петле по Ру после техники «проток в проток», обе с распространенностью 7%. Наиболее частыми причинами смерти были инфекция (9,2%), сепсис (8,3%) и отторжение (6,1%) (табл. 2).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Несмотря на то что наиболее распространенным типом билиарного анастомоза является гепатикоеюностомия «проток в проток», все еще ведутся дискуссии о безопасности этого метода в педиатрии [11–13]. Некоторые исследователи предлагают в качестве метода выбора гепатикоеюностомию на петле по Ру, поскольку она связана с меньшей частотой образования стриктур и более высокой частотой приживления трансплантата. Данных об использовании этих методов у детей недостаточно. Поскольку наиболее

Таблица 1

**Предоперационные характеристики пациентов**

Предоперационные характеристики		Группа 1	Группа 2
Пол мужской/женский		54/40	47/40
Возраст		2,829 ± 1,5551 (0,5–8)	2,078 ± 1,5018 (0,5–10)
Вес		11,178 ± 2,3343 (6–15)	9,567 ± 2,5209 (4–15)
Балл по шкале PELD		15,19 ± 8,9	19,64 ± 6,9
Тип донора	Мать	26	29
	Отец	16	27
	Посмертный донор	49	25
	Дядя или тетя	3	6
Тип трансплантата	Часть печени	44	61
	Сплит-трансплантация	23	13
	Целая печень	27	12
Заболевание	PFIC	31 (17,1%)	
	Внутрипеченочный холестаз	2 (1,1%)	
	Синдром Криглера–Найяра	19 (10,5%)	
	Тирозинемия	29 (16%)	
	Агрезия желчевыводящих путей	58 (32%)	
	Криптогенный	9 (5%)	
	НСС (гепатоцеллюлярная карцинома)	3 (1,7%)	
	Аутоиммунный гепатит	4 (2,2%)	
	Гиперхолестеринемия	6 (3,3%)	
	Неонатальный гепатит	6 (3,3%)	
	Киста холедоха	2 (1,2%)	
Иные*	12 (6,6%)		
Осложнения	Энцефалопатия	3 (1,7%)	
	Желудочно-кишечное кровотечение	4 (2,2%)	
	Асцит	16 (8,8%)	
	Гепаторенальный синдром (HRS)	1 (0,6%)	
	Гепатопульмональный синдром (HPS)	1 (0,6%)	

Примечание. \* – Заболевания, такие как гепатит, болезнь Кароли, болезни накопления гликогена, гепатобластома, синдром Алажилия, MSUD (болезнь кленового сиропа) и метилмалоновая ацидемия.

распространенным типом осложнений, сопровождающих эту процедуру, являются осложнения со стороны желчевыводящих путей, некоторые исследования были сосредоточены на этом типе осложнений. По данным некоторых небольших исследований, частота осложнений со стороны желчевыводящих путей после оптимизации техники формирования анастомоза «проток в проток» при трансплантации печени у детей составляет 28,6–47,7% [14, 15]. Между тем соответствующая частота для взрослых составляет 26,9% [16]. Более свежее исследование показало, что частота осложнений со стороны желчевыводящих путей составляет 12,7% в группе из 298 детей, ко-

торым была проведена трансплантация печени от живого донора, 75% из которых выполнен анастомоз «проток в проток» [17]. Частота этого осложнения была ниже у пациентов, которым выполняли гепатикоюностомию на петле по Ру (12,6%) в сравнении с группой, которой выполнен анастомоз методом «проток в проток» (20,2%). Как бы то ни было, эта разница не была статистически значимой. В этом исследовании помимо обсуждавшихся в ранних работах наиболее часто встречающихся билиарных осложнений также рассматривали и сравнивали другие осложнения использованных способов реконструкции желчеотведения. Наиболее частым осложнени-

Таблица 2

**Послеоперационные характеристики пациентов**

Послеоперационные характеристики пациентов		Группа 1	Группа 2
Потребовалась иммуносупрессивная терапия	Преднизолон	91 (96,8%)	70 (80,5%)
	Циклоспорин	3 (3,2%)	4 (4,6%)
	Такролимус	87 (92,6%)	67 (77%)
	Микофенолата мофетил	22 (23,4%)	9 (10,3%)
	Сиролимус	1 (1,1%)	1 (1,1%)
Осложнения	Осложнения со стороны желчевыводящих путей	19 (20,2%)	11 (12,6%)
	Сосудистые осложнения	9 (9,6%)	11 (12,6%)
	Инфекция	36 (38,3%)	49 (56,3%)
	Асцит	3 (3,2%)	7 (8%)
	Судороги	4 (4,35)	8 (9,2%)
	Нарушение работы почек	2 (2,1%)	6 (6,9%)
	Сердечно-легочные нарушения	4 (4,3%)	21 (24,1%)
	Острое отторжение	23 (24,5%)	16 (18,4%)
Хроническое отторжение	2 (2,1%)	1 (1,1%)	
Необходимость устранения стриктуры желчевыводящих путей	Не требовалось	167 (92,3%)	
	Чрескожная чреспеченочная холангиография	4 (2,2%)	
	Эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография	7 (3,9%)	
	Информация отсутствует	3 (1,7%)	
Необходимость хирургического восстановления	Не требовалось	171 (94,5%)	
	Восстановительная операция «проток в проток»	1 (0,6%)	
	Гепатикоюностомия на петле по Ру после операции «проток в проток»	7 (3,9%)	
	Информация отсутствует	2 (1,1%)	
Необходимость дренирования	Не требовалось	179 (98,9%)	
	Информация отсутствует	2 (1,1%)	
Причина смерти	Кровотечение	3 (1,7%)	
	Первично не функционирующий трансплантат	6 (3,3%)	
	Некроз печени	2 (1,1%)	
	Легочная патология	5 (2,8%)	
	Отторжение	11 (6,1%)	
	Сепсис	15 (8,3%)	
	Почечная недостаточность	3 (1,7%)	
	Судороги	1 (6%)	
	Пневмония	7 (3,9%)	
	Остановка сердца	9 (5%)	
	Инфекция	4 (9,2%)	
	Посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание	9 (5%)	
	Прочее	12 (6,6%)	
Информация отсутствует	4 (2,2%)		

ем обоих методов была инфекция. Несмотря на то что иммунодепрессанты в основном использовались у пациентов группы с билиарной реконструкцией «конец в конец», инфекционные осложнения чаще наблюдались среди пациентов, которым выполняли гепатикоеюностомию с петлей, выключенной по методу Ру, что может быть связано с большей продолжительностью операции. Наше исследование показало, что инфекционные осложнения после операции развились у 38% пациентов группы 1 и 56% группы 2. В частности, около 15% наших пациентов умерли либо от инфекции, либо от сепсиса. Частота острого и хронического отторжения была выше в группе 1, однако эта разница не была статистически значимой. Одним из наиболее частых сосудистых осложнений у пациентов после трансплантации печени является тромбоз печеночной артерии (ТПА), который способствует развитию осложнений со стороны желчевыводящих путей. Некоторые исследования продемонстрировали, что при трансплантации печени у взрослых частота ТПА при билиарной реконструкции с выключением петли методом Ру была выше, чем при формировании анастомоза «проток в проток». Авторы расценили гепатикоеюностомию на петле по Ру как фактор риска ТПА [18]. Исследования у детей также выявили более высокий риск ТПА при билиарной реконструкции с выключением петли по Ру (9%), чем при пластике анастомозом «проток в проток» (3,3%) [19], что соотносится с результатами нашего исследования. Частота сосудистых осложнений при гепатикоеюностомии на петле по Ру составила 12,6% в сравнении с 9,6% в группе с наложением анастомоза «проток в проток». Одной из причин, которые могли привести к такой разнице, является то, что реконструкция по Ру приводит к компрессии артериального анастомоза [19].

В этом исследовании рассматривали также сердечно-легочные осложнения, которым в ранних исследованиях уделяли меньше внимания. Некоторые исследования показали, что частота дыхательной недостаточности после гепатикоеюностомии на петле по Ру составляет около 10% [20]. Kawachi et al. также продемонстрировали в своем исследовании, что у одного пациента (10%) развилась идиопатическая сердечная недостаточность после операции гепатикоеюностомии на петле по Ру, а легочные осложнения наблюдались также у 1 пациента (10%) которому выполнен анастомоз «проток в проток» [21]. В на-

шем исследовании сердечно-легочные осложнения были выше в группе 2 (24,1%) в сравнении с группой 1 (4,3%). Эта разница являлась статистически значимой ( $p < 0,001$ ). Наши данные подтверждаются исследованием Stilling et al., включавшем 139 взрослых пациентов с повреждением желчных протоков после холецистэктомии, которым была выполнена восстановительная операция гепатикоеюностомии на петле по Ру. Авторы сообщают, что у 12% пациентов развились сердечно-легочные осложнения в течение 1 месяца после операции [22]. S.V. McDiarmid et al. в 2003 г. исследовали трансплантацию печени у детей. Их исследование показало, что долгосрочные перспективы детей, которым проводится трансплантация печени, вероятно, будут ограничены донорским пулом, побочными эффектами иммунодепрессантов и потенциальным развитием посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания или других опухолей [1]. T. Kimura et al. в своем исследовании, выполненном в 2006 г., на основании трех наблюдений продемонстрировали, что в детской трансплантации печени от живого родственного донора реконструкция желчных путей методом «проток в проток» оказалась возможным и безопасным методом [6]. Y. Shirouzu et al. сравнивали результаты гепатикоеюностомии на петле по Ру и анастомоза «проток в проток» в 2008 г. Их результаты показали, что их хирургическая техника с использованием билиарной реконструкции «проток в проток» у реципиентов весом не более 10 кг дает превосходные результаты с низкой частотой осложнений со стороны желчевыводящих путей, включая подтекание и стриктуры [2].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование показало относительно высокую частоту послеоперационной инфекции, максимальной среди пациентов, которым проводилась гепатикоеюностомия на петле по Ру. За исключением осложнений со стороны желчевыводящих путей, которые в основном наблюдались в группе с билиарным анастомозом «проток в проток», другие осложнения чаще встречались в группе гепатикоеюностомии на петле по Ру.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Статья поступила в редакцию 26.01.2021 г.*

## INTRODUCTION

Liver transplantation (LT) is an established curative therapy for acute or chronic liver failure or liver metabolic disease. Survival after LT has improved significantly in developed countries and this has increased the awareness of this treatment modality in the developing world. The development of newer immunosuppressive drugs, refinements in operative technique, improved organ preservation, advances in allied service specially anesthesia and intensive care have contributed to a dramatic improvement in the survival of these patients. It is essential to encourage both the child and the family to return to a normal life as far as possible. Most of the children who survive liver transplantation will achieve nutritional rehabilitation and a normal lifestyle. Most will enter puberty normally, and fertility is normal. Pediatric liver transplantation has been evolving over recent decades. The developments in reduced sized grafts and living donor liver transplants have significantly reduced mortality rates for pediatric patients suffering from end-stage liver disease [1, 2]. However, despite continuous improvements in surgical techniques, biliary complications including leakage from biliary radicals, anastomotic leaks, and strictures are still associated with significant morbidity and mortality occurring with an incidence of 10% to 50% [3, 4]. Although transplant-related biliary complications are not associated with decreased patient survival in pediatrics, these complications do cause considerable morbidity, increased length of stay, need for increased operative and non-operative interventions, and occasionally re-transplantation. Historically, the biliary anastomosis has been termed the Achilles heel of orthotopic liver transplantation [5]. Complications such as leakage, stricture, fistula, infection, and cast formation led to the evolution of new technical methods. Early biliary reconstructions were performed using loop choledochojunostomy and Roux-en-Y hepaticojunostomy, as well as using the gallbladder as a conduit. In the 1980s, duct-to-duct choledocho-choledochostomy drainage over a T-tube became the most popular technique. During the past two decades, duct-to-duct anastomosis without a T-tube has become the primary method of reconstruction. With the advent of living donor liver transplantation in the 1990s, reconstruction without enteric anastomosis has been performed (5). Although Roux-en-Y hepaticojunostomy has been the standard procedure in LDLT, the disadvantages of this technique are a comparatively long operative time and higher risk of contamination due to construction of the Roux-en-Y limb. Theoretically, Duct-to-duct biliary reconstruction has some benefits when it is compared with the Roux-en-Y procedure, namely no manipulation of the gastrointestinal tract, a shorter operative time and allowing for easy endoscopic access to the anastomotic site if complications arise. It is the standard technique of choice for biliary anastomosis in cadaveric liver

transplantation. When the duct-to-duct technique can be employed for LDLT, an extra-intestinal anastomosis can be avoided, the continuity is more physiologic than that of RYHJ, and preservation of the sphincter function of the lower bile duct may reduce the risk of enteric reflux into the biliary tract. Also, Duct-to-duct biliary reconstruction is mostly the standard technique in adult liver transplantation. On the other hand, the predominance of biliary atresia along with the technical challenges related to the small size and fragility of recipient's duct in the pediatric age population have made Roux-en-Y hepaticojunostomy far more common. There are still a lot to learn and there are future challenges to improve liver transplantation techniques. The evolution of the field of liver transplantation has resulted in improved patient outcomes. A paucity of data exists for the outcomes of these two techniques [10]. The aim of this study was to compare the outcomes of duct-to-duct vs. Roux-en-Y hepaticojunostomy biliary anastomoses in pediatric liver transplant recipients below 15-kg.

## METHODS

In this single-center retrospective study, all children less than 15 kg that have undergone liver transplantation at Nemazee Hospital Organ Transplant Center affiliated with Shiraz University of Medical Sciences from 2009 till 2019, were enrolled. Over a 10-yr period, 181 liver transplants were performed in patients with two techniques including duct-to-duct (Group 1) vs. Roux-en-Y hepaticojunostomy biliary anastomoses (Group 2). The electronic medical record was used to collect patients' characteristics including age, medical history, details of transplantation surgery, and postoperative hospital course. Postoperative information collected included patient and graft survival. Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation. Fisher's exact test, unpaired *t* tests, and the log-rank test were used for statistical analysis. *P* values less than 0.05 were regarded as significant. All liver recipients, of a whole or partial liver graft, weighing less than 15 kg were included. All data were collected from patients' medical records, operative notes, and post-transplant follow up notes. Demographic data such as age, sex, weight, primary diagnosis, PELD (pediatric end-stage liver disease) score, previous biliary tract surgeries, type and weight of graft, type of donor, date of transplantation, graft ischemia time, operative time, biliary and vascular complications were collected. Patients were divided into two groups based on the type of biliary anastomosis done during surgery: duct-to-duct biliary reconstruction and Roux-en-Y hepaticojunostomy biliary reconstruction. Duct-to-duct biliary anastomosis was preferably performed whenever it was thought to be technically feasible by the operating surgeon. Biliary complications including biliary leaks, strictures, or development of cholangitis were recorded. Biliary leaks from anastomotic sites were diagnosed based on cholangio-

grams and were considered as significant complications if any further intervention was deemed to be necessary. Biliary strictures were diagnosed based on cholestatic trend of liver enzymes suggestive of a stricture in addition to a confirmatory cholangiogram demonstrating the presence of a stricture. Cholangitis was considered in any patient developing fever or raised level of white cell count with elevated bilirubin. Vascular complications consisted of hepatic artery thrombosis or stricture. Both vascular complications were initially diagnosed by Doppler ultrasound with further confirmation of arterial stenosis by angiogram. Mortality rate of two groups were also considered. Student's t-test and Pearson's chi-square were primarily used to compare both groups. Further statistical analysis was performed using Fisher's exact test with the Freeman-Halton extension when appropriate.

**RESULTS**

**Pre-operative characteristics of the patients**

Overall, 94 patients had duct to duct anastomosis (group 1) from which 46 expired and 87 cases had Roux-

en-Y hepaticojejunostomy (group 2) from which 43 cases passed away. The mean age of the patients was  $2.468 \pm 1.5711$  year (0.5–10) and their mean weight was  $10.403 \pm 2.5501$  Kg (4–15). The most common underlying diseases were biliary atresia (32%), PFIC (17.1%) tyrosinemia (16%) and Crigler-Najjar (10.5%). The most common complication before the surgery was ascites with a prevalence of 8.8% in our patients. The mean PELD scores in group 1 and 2 before surgery were  $15.19 \pm 8.9$  and  $19.64 \pm 6.9$  respectively. Out of 94 patients in group 1, 44 underwent partial liver transplantation, 23 experienced split transplantation and 27 had whole organ transplantation. The corresponding numbers in the group 2 were 61, 13, and 12 patients. The most common donor relation in group one was DD and in group 2, mothers were the most donors. The complete pre-operative characteristics of patients are listed in table 1.

**Post-operative characteristics**

Prednisolone and Tacrolimus were the most required immunosuppressive used in both groups. Our data show-

Table 1

**Pre-operative characteristics of patients**

Pre-operative characteristics		Group 1	Group 2
Male/Female		54/40	47/40
Age		$2.829 \pm 1.5551$ (0.5–8)	$2.078 \pm 1.5018$ (0.5–10)
Weight		$11.178 \pm 2.3343$ (6–15)	$9.567 \pm 2.5209$ (4–15)
PELD score		$15.19 \pm 8.9$	$19.64 \pm 6.9$
Donor Relation	Mother	26	29
	Father	16	27
	DD	49	25
	Uncle or Aunt	3	6
Graft type	Partial	44	61
	Split	23	13
	Whole organ	27	12
Underlying disease	PFIC	31 (17.1%)	
	Intrahepatic Cholestasis	2 (1.1%)	
	Crigler-Najjar	19 (10.5%)	
	Tyrosinemia	29 (16%)	
	Biliary Atresia	58 (32%)	
	Cryptogenic	9 (5%)	
	HCC	3 (1.7%)	
	Autoimmune Hepatitis	4 (2.2%)	
	Hypercholesterolemia	6 (3.3%)	
	Neonatal Hepatitis	6 (3.3%)	
	Choledochal Cyst	2 (1.2%)	
Other*	12 (6.6%)		
Complications	Encephalopathy	3 (1.7%)	
	GI bleeding	4 (2.2%)	
	Ascites	16 (8.8%)	
	Hepatorenal Sx	1 (0.6%)	
	Hepatopulmonary sx	1 (0.6%)	

Note. \* Other: the underlying diseases which contain problems like hepatitis, Caroli, glycogen storage disease, Hepatoblastoma, Alagille syndrome, MSUD and Methylmalonic acidemia.

ed that the patients who need Prednisolone, Tacrolimus and Mycophenolate in group 1 were significantly more than group 2 (P value <0.05). The most prevalent complication after the surgery was infection in both groups. cardiopulmonary problems were significantly higher in group 2 (24.1% vs 4.3%) (p < 0.001). The rate of infection was significantly higher in group 2, as well. Although the rate of biliary complications was higher in the group 1, this difference was not statistically significant. The least needed re-operation was drainage of the collection and the most prevalent surgical procedures were ERCP and Roux-en-Y Hepaticojejunostomy after Duct to Duct, both with the prevalence of 7%. The most

common causes of death were infection (9.2%), sepsis (8.3%) and rejection (6.1%) (table 2).

**DISCUSSION**

Despite the fact that the most common type of biliary anastomosis is duct to duct hepaticojejunostomy biliary anastomosis, there is still discussion about the safety of this method in pediatrics [11–13]. Some studies suggested Roux-en-Y hepaticojejunostomy as the method of choice as it is associated with lower stricture formation and higher graft survival. There are not enough reports on using these methods in children. As the most prevalent type of complication followed by this procedure is

Table 2

**Post-operative characteristics of patients**

Post-operative characteristics		Group 1	Group 2
Immunosuppressive treatment requirement	Prednisolone	91 (96.8)	70 (80.5)
	Cyclosporine	3 (3.2)	4 (4.6)
	Tacrolimus	87 (92.6)	67 (77)
	Mycophenolate	22 (23.4)	9 (10.3)
	Sirolimus	1 (1.1)	1 (1.1)
Complications	Biliary Complications	19 (20.2)	11 (12.6)
	Vascular Complications	9 (9.6)	11 (12.6)
	Infection	36 (38.3%)	49 (56.3%)
	Ascites	3 (3.2%)	7 (8%)
	Convulsions	4 (4.35)	8 (9.2%)
	Renal problems	2 (2.1%)	6 (6.9%)
	Cardiopulmonary problem	4 (4.3%)	21 (24.1%)
	Acute Rejection	23 (24.5%)	16 (18.4%)
	Chronic rejection	2 (2.1%)	1 (1.1%)
Bile duct dilatation requirement	No Need	167 (92.3%)	
	PTC	4 (2.2%)	
	ERCP	7 (3.9%)	
	Missing	3 (1.7%)	
Need for surgical repair	No Need	171 (94.5%)	
	Duct to Duct repair	1 (0.6%)	
	Roux-en-Y Hepaticojejunostomy after Duct to Duct	7 (3.9%)	
	Missing	2 (1.1%)	
Need for drainage of the collection	No Need	179 (98.9%)	
	Missing	2 (1.1%)	
Cause of death	Bleeding	3 (1.7%)	
	PNF	6 (3.3%)	
	Liver Necrosis	2 (1.1%)	
	Pulmonary Problems	5 (2.8%)	
	Rejection	11 (6.1%)	
	Sepsis	15 (8.3%)	
	Renal Failure	3 (1.7%)	
	Convulsion	1 (6%)	
	Pneumonia	7 (3.9%)	
	Cardiac arrest	9 (5%)	
	Infection	4 (9.2%)	
	PTLD	9 (5%)	
	Other	12 (6.6%)	
	Missing	4 (2.2%)	

biliary complication, some studies focused on this type of complication. The biliary complication rate after optimizing duct to duct anastomosis has been reported to be around 28.6–47.7% in children based on some earlier small reports [14, 15]. Meanwhile, the corresponding rate for adults was reported 26.9% [16]. However, A more recent study indicated a 12.7% rate of biliary complication in a group of 298 LDLT pediatrics, 75% of which had undergone duct to duct anastomosis [17]. The prevalence of this complication was lower in patients who have undergone Roux-en-Y surgery (12.6%) compared with the duct to duct anastomosis group (20.2%). However, this difference was not significant.

In this study, in addition to biliary complication, which is the most common complication discussed in previous studies, other complications related to these procedures were also discussed and compared. The most prevalent complication in both techniques was infection. Despite the fact that most of our immunosuppressive agents were mostly used in the DD group, the rate of infection was higher among Roux-en-Y patients which can be related to the higher length of the operation time. Our study indicated that around 38% OF DD group and 56% of Roux-en-Y group developed infection after surgery. More specifically, about 15% of our patients died either from infection or sepsis. Acute and chronic rejections both showed higher rates among DD group. However, these differences were not significant. One of the most common vascular complications in liver transplant patients is Hepatic artery thrombosis (HAT), which has been identified as a cause of biliary complication. Some studies have shown that the incidence of HAT in Roux-en-Y reconstruction was higher than DD anastomosis in adult liver transplantation and have identified Roux-en-Y surgery as a risk factor for HAT [18]. Studies in children have also found the higher rates of HAT in Roux-en-Y reconstruction (9%) than its prevalence in DD anastomosis group (3.3%), which was consistent with our study [19]. The prevalence of vascular complications in Roux-en-Y surgery group was 12.6% compared with 9.6% in DD group. One of the reasons that might cause this difference is that Roux-en-Y construction leads to compression of the arterial anastomosis [19]. The cardiopulmonary complication was also one of the significant complications in this study that has been less noticed in previous studies. Some studies have shown a prevalence of respiratory failure following Roux-en-Y hepaticojejunostomy is about 10% [20]. Kawachi et al. also showed in their study that one patient (10%) had idiopathic cardiac failure following Roux-en-Y surgery and pulmonary complications observed in one patient (10%) who have undergone duct to duct anastomosis [21]. In this study, cardiopulmonary complications were higher in Roux-en-Y surgery group (24.1%) compared with the duct to duct anastomosis group (4.3%). This difference was statistically significant ( $p < 0.001$ ). Our finding is supported

by Stilling et al's study on 139 adult patients who had bile duct injury during cholecystectomy and underwent repaired Roux-en-Y hepaticojejunostomy. They reported that 12% of patients developed cardiopulmonary complications in less than a month after surgery [22]. S.V. McDiarmid et al. in 2003 investigated the liver transplantation in children. Their study revealed that a long-term outlook for children receiving liver transplantation is likely to be limited by donor supply, the side effects of immunosuppressive drugs and the potential development of post transplantation lymphoproliferative disease or other tumors [1]. T. Kimura et al. in their study which was performed in 2006 about Feasibility of duct-to-duct biliary reconstruction in pediatric living related liver transplantation (Report of three cases) demonstrated that duct-to-duct biliary reconstructions in pediatric seemed to be feasible and safe [6]. Y. Shirouzu et al. compared the outcome of Roux-en-Y hepaticojejunostomy and duct-to-duct anastomosis in 2008. Their results showed that their surgical technique using DD in recipients weighing no more than 10 kg produced excellent outcomes with a low incidence of biliary complications, including leakage and stricture [2].

## CONCLUSION

Our study showed a relatively high rate of post-operative infection which was the most among patients who had undergone Roux-en-Y hepaticojejunostomy. Except from biliary complications which were mostly observed in DD group, other complications were more common among Roux-en-Y group.

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. McDiarmid SV. Current status of liver transplantation in children. *Pediatr Clin North Am.* 2003; 50: 1335–1374.
2. Shirouzu Y, Okajima H, Ogata S et al. Biliary reconstruction for infantile living donor liver transplantation: Roux-en-Y hepaticojejunostomy or duct-to-duct choledochocholedochostomy? *Liver Transpl.* 2008; 14: 1761–1765.
3. Kling K, Lau H, Colombani P. Biliary complications of living related pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2004; 8: 178–184.
4. Kirimlioglu V, Tatli F, Ince V et al. Biliary complications in 106 consecutive duct-to-duct biliary reconstruction in right lobe living donor liver transplantation performed in 1 year in a single center: A new surgical technique. *Transplant Proc.* 2011; 43: 917–920.
5. Carmody IC, Romano J, Bohorquez H et al. Novel Biliary Reconstruction Techniques During Liver Transplantation. *Ochsner J.* 2017; 17 (1): 42–45.
6. Kimura T, Hasegawa T, Ihara Y et al. Feasibility of duct-to-duct biliary reconstruction in pediatric living related liver transplantation: Report of three cases. *Pediatr Transplant.* 2006; 10: 248–251.

7. Okajima H, Inomata Y, Asonuma K et al. Duct-to-duct biliary reconstruction in pediatric living donor liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2005; 9: 531–533.
8. Ishiko T, Egawa H, Kasahara M et al. Duct-to-duct biliary reconstruction in living donor liver transplantation utilizing right lobe graft. *Ann Surg*. 2002; 236: 235–240.
9. Sugawara Y, Makuuchi M, Sano K et al. Duct-to-duct biliary reconstruction in living-related liver transplantation. *Transplantation*. 2002; 73: 1348–1350.
10. Shaheen MF, Alabdulkarim MS, Hamsho MM et al. Outcome of duct-to-duct vs. Roux-en-Y hepaticojejunostomy biliary anastomoses in below 15-kg pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2014; 18 (8): 831–838.
11. Shirouzu Y, Okajima H, Ogata S et al. Biliary reconstruction for infantile living donor liver transplantation: Roux-en-Y hepaticojejunostomy or duct-to-duct choledochocholedochostomy? *Liver Transpl*. 2008; 14: 1761–1765.
12. Oliveira P. Biliary complications after paediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2010; 14: 437–438.
13. Heffron Tg, Smallwood Ga, Ramcharan T et al. Duct-to-duct biliary anastomosis for patients with sclerosing cholangitis undergoing liver transplantation. *Transplant Proc*. 2003; 35: 3006–3007.
14. Tanaka H, Fukuda A, Shigeta T, Kuroda T, Kimura T, Sakamoto S, Kasahara M. Biliary reconstruction in pediatric live donor liver transplantation: duct-to-duct or Roux-en-Y hepaticojejunostomy. *Journal of pediatric surgery*. 2010 Aug 1; 45 (8): 1668–1675.
15. Sakamoto S, Egawa H, Ogawa K, Ogura Y, Oike F, Ueda M et al. The technical pitfalls of duct-to-duct biliary reconstruction in pediatric living-donor left-lobe liver transplantation: The impact of stent placement. *Pediatric transplantation*. 2008 Sep; 12 (6): 661–665.
16. Coelho JC, Leite LD, Molena A, Freitas AC, Matias JE. Biliary complications after liver transplantation. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2017 Jun; 30 (2): 127–131.
17. Harputluoglu M, Demirel U, Caliskan AR, Selimoglu A, Bilgic Y, Aladag M et al. Endoscopic treatment of biliary complications after duct-to-duct biliary anastomosis in pediatric liver transplantation. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2019 Nov; 404 (7): 875–883.
18. Baker TB, Zimmerman MA, Goodrich NP, Samstein B, Pomfret EA, Pomposelli JJ et al. Biliary reconstructive techniques and associated anatomic variants in adult living donor liver transplantations: The adult-to-adult living donor liver transplantation cohort study experience. *Liver Transplantation*. 2017 Dec; 23 (12): 1519–1530.
19. Kutluturk K, Sahin TT, Karakas S, Unal B, Bag HG, Akbulut S et al. Early Hepatic Artery Thrombosis After Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation proceedings*. 2019 May 1; 51 (4): 1162–1168. Elsevier.
20. Shirouzu Y, Okajima H, Ogata S, Ohya Y, Tsukamoto Y, Yamamoto H et al. Biliary reconstruction for infantile living donor liver transplantation: Roux-en-Y hepaticojejunostomy or duct-to-duct choledochocholedochostomy? *Liver transplantation*. 2008 Dec; 14 (12): 1761–1765.
21. Kawachi S, Shimazu M, Wakabayashi G, Hoshino K, Tanabe M, Yoshida M et al. Biliary complications in adult living donor liver transplantation with duct-to-duct hepaticocholedochostomy or Roux-en-Y hepaticojejunostomy biliary reconstruction. *Surgery*. 2002 Jul 1; 132 (1): 48–56.
22. Stilling NM, Fristrup C, Wettergren A, Ugianskis A, Nygaard J, Holte K et al. Longterm outcome after early repair of iatrogenic bile duct injury. A national Danish multicentre study. *Hpb*. 2015 May 1; 17 (5): 394–400.

The article was submitted to the journal on 26.01.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-61-65

## УСПЕШНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ СЛУЧАИ РЕКОНСТРУКТИВНО-ПЛАСТИЧЕСКИХ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКИХ ОПЕРАЦИЙ НА МОЧЕТОЧНИКЕ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКИ

Д.А. Сайдулаев<sup>1</sup>, С.В. Садовников<sup>1</sup>, Р.Г. Биктимиров<sup>3</sup>, П.М. Гаджиева<sup>1</sup>,  
И.А. Милосердов<sup>1, 2</sup>

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

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

<sup>3</sup> ФГБУ «Федеральный клинический центр высоких медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Химки, Российская Федерация

Лечение стриктур мочеточника в отдаленном посттрансплантационном периоде является сложной хирургической задачей. Представлены успешные клинические случаи применения разработанных реконструктивно-пластических лапароскопических методов коррекции стриктуры мочеточника на трех уровнях (в области лоханки, на протяжении мочеточника, в области анастомоза), показавшие свою клиническую эффективность: менее травматичны, без нежелательных событий в раннем и отдаленном послеоперационных периодах, ускоренная реабилитация реципиентов после операции.

*Ключевые слова:* стриктура мочеточника, лапароскопия, трансплантация почки, урология.

## LAPAROSCOPIC URETERAL RECONSTRUCTION IN A KIDNEY TRANSPLANT: SUCCESSFUL CLINICAL CASES

D.A. Saydulaev<sup>1</sup>, S.V. Sadovnikov<sup>1</sup>, R.G. Biktimirov<sup>3</sup>, P.M. Gadzhieva<sup>1</sup>, I.A. Miloserdov<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Federal Clinical Center for High-Tech Medicine, Khimki, Russian Federation

Treatment of ureteral strictures in the long-term post-transplant period is a complex surgical procedure. We present successful clinical cases of developed laparoscopic ureteral stricture reconstruction methods at three levels (in the pelvis, along the ureter, in the anastomosis area). These methods have shown their clinical efficacy: they are less traumatic, there are no adverse events in the early and long-term postoperative periods, and there is accelerated rehabilitation of recipients after surgery.

*Keywords:* ureteral stricture, laparoscopy, kidney transplantation, urology.

### ВВЕДЕНИЕ

Стриктура мочеточника является распространенным урологическим осложнением после трансплантации почки (3–12,6%), особенно в отдаленном послеоперационном периоде, что может быть причиной

длительного периода госпитализации после операции и повторных хирургических вмешательств [1].

По данным различных источников, причинами развития стриктур мочеточника являются аномалии строения, такие как наличие нескольких питающих почечных артерий, избыточная протяженность, не-

Для корреспонденции: Сайдулаев Джабраил Азизович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (903) 750-00-85. E-mail: sdzhabrail@yandex.ru

Corresponding author: Dzhabrail Saydulaev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (903) 750-00-85. E-mail: sdzhabrail@yandex.ru

достаточное кровоснабжение мочеточника, фиброзирование окружающих тканей, возраст донора старше 65 лет, длительность холодовой ишемии, отсроченная функция трансплантата, формирование пузырно-мочеточникового анастомоза без стентирования [2, 3]. Описаны отдельные случаи развития стриктур мочеточника трансплантата почки в сочетании с тубулоинтерстициальным нефритом, вызванным цитомегаловирусной инфекцией [4].

В зависимости от расположения и протяженности стриктур (в 73% случаях – в дистальной части, в 12% – в средней, в 15% – в проксимальной) наиболее распространенными методами их лечения являются бужирование, эндоскопическое рассечение холодным ножом, баллонная дилатация или хирургическая коррекция зоны стриктуры мочеточника трансплантата [2, 5].

Лапароскопическая коррекция урологических осложнений на трансплантированной почке редко используется в клинической практике из-за сложности выполнения данной техники. Несмотря на это, обладает значительными преимуществами по сравнению с остальными методами лечения: лучшая визуализация, возможность прецизионной идентификации всех структур, что, в свою очередь, выражается в ускоренной реабилитации реципиентов почки после операции [5–7].

Развитие лапароскопических технологий в трансплантологии предоставило новые возможности для лечения урологических осложнений после трансплантации почки. Накопленный многолетний уникальный опыт ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России позволяет предложить

различные виды разработанных лапароскопических операций для коррекции обструктивных нарушений мочевыводящих путей трансплантированной почки.

**Цель работы:** представить успешные клинические случаи применения разработанных различных методик лапароскопической коррекции стриктуры на мочевыводящих путях трансплантата почки.

## ОПИСАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ СЛУЧАЕВ

### Клинический случай № 1

#### Лапароскопическая коррекция стриктуры лоханочно-мочеточникового сегмента трансплантированной почки

В 2013 году пациентке П. 42 лет с хроническим гломерулонефритом выполнена трансплантация почки от посмертного донора. Ротация трансплантата почки сдавлением мочеточника на уровне лоханочно-мочеточникового сегмента (особенность – высокое отхождение мочеточника от лоханки трансплантата) была выявлена в раннем послеоперационном периоде (рис. 1). Пациентке неоднократно устанавливали нефростомы и стентировали мочеточник с целью восстановления уродинамики, проводилась комбинированная антибактериальная терапия, однако, несмотря на это, сохранялись рецидивы инфекции мочевыводящих путей. В декабре 2017 года выполнена лапароскопическая коррекция стриктуры лоханочно-мочеточникового сегмента трансплантированной почки.

Под общей анестезией в брюшную полость в параумбиликальной области установили 10-мм троакары, далее ввели лапароскоп, проведена ревизия



Рис. 1. Ротация трансплантата и высокое отхождение мочеточника от лоханки: А – почечная артерия; Б – баллон нефростомической трубки; В – лоханка; Г – мочеточник; Д – лоханочно-мочеточниковый сегмент (зона стриктуры)

Fig. 1. Rotation of the graft and high discharge of the ureter from the pelvis: А – renal artery; Б – balloon of a nephrostomy tube; В – pelvis; Г – ureter; Д – pelvic-ureteric segment (stricture zone)

брюшной полости. Установили 5-мм троакары в левой и правой подвздошной областях. Аппаратом Harmonic® (США) рассечена брюшина над трансплантатом. Прецизионной техникой выделена и визуализирована зона лоханочно-мочеточникового сегмента с высоким отхождением мочеточника и перегибом мочеточника под острым углом в данной области. Максимально осторожно, учитывая тесное расположение сосудистой ножки трансплантата, мобилизована лоханка и проксимальный отдел мочеточника почечного трансплантата. Лоханка трансплантата рассечена на протяжении 1,5–2 см, с переходом разреза на мочеточник, который также рассечен в его верхней трети на протяжении 1,5–2 см. Задняя стенка почечной лоханки сшита с задней стенкой мочеточника монофиламентной нитью. В просвет мочеточника трансплантата антеградно установили мочеточниковый стент. Передняя стенка почечной лоханки сшита с передней стенкой мочеточника монофиламентной нитью. Контроль гемостаза проведен по окончании операции. Брюшная полость дренирована.

Стент мочеточника удален через 6 недель после выполнения пластики лоханочно-мочеточникового сегмента. Послеоперационных осложнений не было. В течение 41 месяца после операции рецидива стриктуры и несостоятельности анастомоза выявлено не было. Рецидивов инфекции также не отмечено.

## Клинический случай № 2 Лапароскопическая коррекция стриктуры среднего отдела мочеточника трансплантированной почки

В 2016 году пациенту Г. 24 лет с терминальной стадией почечной недостаточности в исходе быстро прогрессирующего гломерулонефрита выполнена трансплантация почки от посмертного донора без стентирования мочеточника. Функция трансплантата была отсроченной. Нарастание дилатации чашечно-лоханочной системы через 2 недели после операции потребовало дренирования трансплантата путем нефростомии. Антеградное стентирование мочеточника не увенчалось успехом. В феврале 2017 года выполнена лапароскопическая коррекция среднего отдела мочеточника трансплантата (рис. 2).

Под общей анестезией в брюшную полость установлен 10 мм троакар в параумбиликальной области, далее введен лапароскоп, проведена ревизия брюшной полости. В правой и левой подвздошных областях установлены 10-мм и 5-мм троакары.

Мочеточник трансплантата мобилизован аппаратом (Harmonic®, США) в пределах здоровых тканей, дистальный конец клипирован. Далее выполнена ипсилатеральная нефрэктомия с сохранением дистального отдела мочеточника. Сформирован уретероуретероанастомоз со стентированием мочеточника. Контроль гемостаза проведен по окончании операции. Выполнено дренирование брюшной полости.

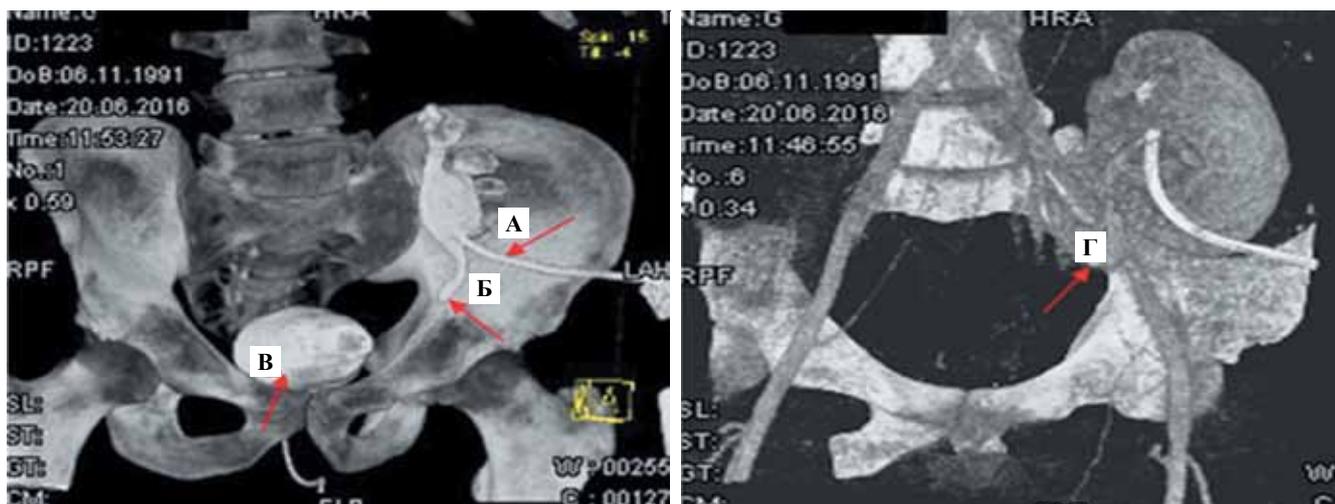


Рис. 2. Стриктура мочеточника трансплантата почки в среднем сегменте: А – нефростомическая трубка (антеградная пиелоуретерография); Б – мочеточник трансплантата (зона стриктуры); В – мочевой пузырь (цистография); Г – почечная артерия

Fig. 2. Stricture of the graft ureter in the middle segment: А – nephrostomy tube (antegrade pyeloureterography); Б – graft ureter (stricture zone); В – bladder (cystography); Г – renal artery

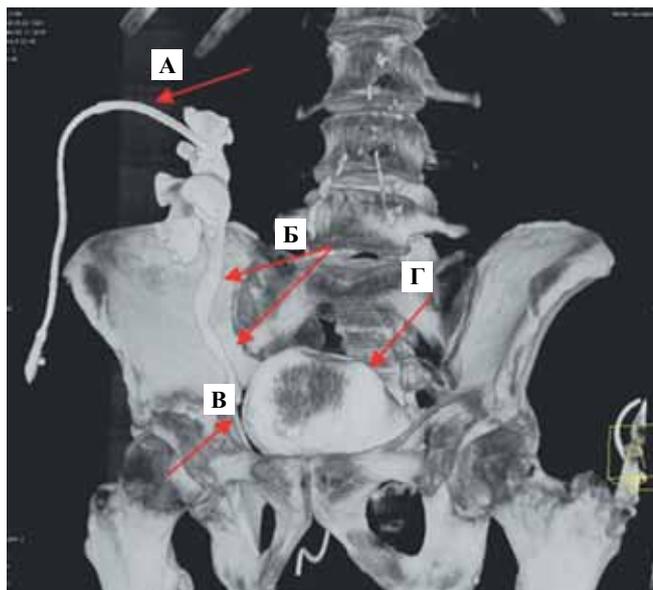


Рис. 3. Стриктура уретероцистоанастомоза: А – нефростомическая трубка (антеградная пиелоуретерография); Б – мочеточник трансплантата; В – пузырно-мочеточниковый анастомоз (зона стриктуры); Г – мочевого пузыря (цистография)

Fig. 3. Ureterocystoanastomosis stricture: A – nephrostomy tube (antegrade pyeloureterography); Б – graft ureter; В – vesicoureteral anastomosis (stricture zone); Г – bladder (cystography)

*Срок нахождения стента в мочеточнике после реконструкции составил 42 дня. Рецидивов инфекции, нарушения уродинамики в послеоперационном периоде не отмечено. Срок наблюдения за пациентом после операции составил 52 месяца, при этом рецидива стриктуры выявлено не было.*

### Клинический случай № 3 Лапароскопическая коррекция стриктуры уретероцистоанастомоза трансплантированной почки

*В 2016 году пациенту К. 55 лет с хронической болезнью почек неясной этиологии выполнена трансплантация почки от посмертного донора. При амбулаторном наблюдении через шесть месяцев отмечалось нарастание гидронефроза, возникла дисфункция трансплантата, что потребовало дренирования трансплантата почки путем нефростомии. Далее реципиенту было выполнено бужирование и стентирование мочеточника трансплантата почки. Рецидив стриктуры пузырно-мочеточникового анастомоза произошел через три месяца после удаления стента (рис. 3). Возникла необходимость повторной нефростомии в связи с развившейся дисфункцией трансплантата. В ноябре 2016 года выполнена лапа-*

*роскопическая коррекция пузырно-мочеточникового анастомоза.*

*Под общей анестезией в брюшную полость установлен 10-мм троакар в параумбиликальной области, далее введен лапароскоп, проведена ревизия брюшной полости. В левой подвздошной области и в правом подреберье установлены 5-мм троакары.*

*В области трансплантата брюшина рассечена аппаратом (Harmonic®, США). Мобилизован мочевой пузырь в проекции подвздошных сосудов, мочеточник трансплантата выделен из рубцовой ткани и отсечена его фиброзно-измененная часть. Сформирован уретероцистоанастомоз со стентированием мочеточника. Контроль гемостаза проведен по окончании операции. Брюшная полость дренирована.*

*Срок нахождения стента в мочеточнике после реконструкции составил 28 дней. Урологические, инфекционные осложнения после операции отсутствовали. Срок наблюдения за пациентом после операции составил 55 месяцев, при этом рецидива стриктуры выявлено не было.*

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на накопленный опыт, трансплантация почки сопровождается развитием урологических осложнений, в т. ч. стриктур мочеточника, которые неблагоприятно влияют на выживаемость трансплантата, качество жизни реципиента.

Реконструктивно-пластические лапароскопические операции на мочевыводящих путях трансплантированной почки на различных уровнях (в области лоханки, на протяжении мочеточника, в области анастомоза) по сравнению с открытыми хирургическими вмешательствами являются менее травматичными, в послеоперационном периоде пациент минимально нуждается в обезболивающих препаратах, происходит ранняя активизация больного, сокращаются сроки госпитализации, снижен риск развития нежелательных послеоперационных осложнений (инфицирование послеоперационной раны, послеоперационные вентральные грыжи) [8–10].

Представленные клинические случаи показали эффективность применения реконструктивно-пластических лапароскопических методов коррекции мочевыводящих путей трансплантата почки.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Сайдуллаев ДА, Милосердов ИА, Готье СВ. Профилактика и хирургические методы лечения урологических осложнений у реципиентов почки. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019;

- 21 (3): 166–173. Saydulaev DA, Miloserdov IA, Gautier SV. Prevention and surgical treatment of urological complications in kidney transplant recipient. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 166–173. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-3-166-173>.
2. Zavos G, Pappas P, Karatzas T, Karidis NP, Bokos J, Stravodimos K et al. Urological complications: analysis and management of 1525 consecutive renal transplantations. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40 (5): 1386–1390. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.03.103.
  3. Minkovich M, Famure O, Li Y, Ghanekar A, Selzner M, Kim SJ, Lee JY. Ureteral strictures post-kidney transplantation: Trends, impact on patient outcomes, and clinical management. *Canadian Urological Association journal*. 2021 Mar 18. doi: 10.5489/cuaj.7003.
  4. Bae SH, Chung BH, Park YK, Jo K, Kim Y-S, Choi BS. Cytomegalovirus induced interstitial nephritis and ureteral stenosis in renal transplant recipient. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012; 27: 470–473. doi: 10.3904/kjim.2012.27.4.470.
  5. Ghosh B, Jain P, Pal DK. Managing Mid and Lower Ureteral Benign Strictures: The Laparoscopic Way. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques. Part A*. 2018; 28 (1): 25–32. doi: 10.1089/lap.2017.0256.
  6. Berli JU, Montgomery JR, Segev DL, Ratner LE, Maley WR, Cooper M et al. Surgical management of early and late ureteral complications after renal transplantation: techniques and outcomes. *Clinical Transplantation*. 2015; 29 (1): 26–33.
  7. Arpali E, Al-Qaoud T, Martinez E, Redfield III RR, Leverson GE, Kaufman DB et al. Impact of ureteral stricture and treatment choice on long-term graft survival in kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2018; 18 (8): 1977–1985.
  8. Трушкин РН, Лубенников АЕ, Колесников НО. Лапароскопический уретеро-уретероанастомоз мочеточника трансплантированной почки с собственным мочеточником реципиента по поводу протяженной стриктуры. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2017; 1: 116–119. Trushkin RN, Lubennikov AE, Kolesnikov NO. Laparoskopicheskiy uretero-ureteroanastomoz mochetochnika transplantirovannoy pochki s sobstvennym mochetochnikom recipienta po povodu protyazhennoj striktury. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2017; 1: 116–119.
  9. Hao YC, Hou XF, Zhao L, Xiao CL, Liu Z, Zhang F, Ma LL. Laparoscopic ureterovesical reimplantation for ureteral stricture after renal transplantation. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2018 Aug 18; 50 (4): 705–710.
  10. Ghosh B, Jain P, Pal DK. Managing Mid and Lower Ureteral Benign Strictures: The Laparoscopic Way. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2018 Jan; 28 (1): 25–32. doi: 10.1089/lap.2017.0256.

Статья поступила в редакцию 1.08.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 1.08.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-66-72

## ОСОБЕННОСТИ НЕРВНО-ПСИХИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ДЕТЕЙ С БИЛИАРНОЙ АТРЕЗИЕЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

А.В. Сыркина<sup>1</sup>, И.Е. Пашкова<sup>1</sup>, А.Р. Монахов<sup>1, 3</sup>, О.В. Силина<sup>1</sup>, Е.В. Чеклецова<sup>1</sup>,  
С.Ю. Олешкевич<sup>1</sup>, И.Б. Комарова<sup>2</sup>, О.М. Цирульников<sup>1, 3</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

**Актуальность.** Билиарная атрезия – наиболее частое показание к трансплантации печени в детском возрасте. Трансплантация печени позволила принципиально повысить выживаемость детей с билиарной атрезией. Исследования исходов развития детей в основном ограничиваются малыми выборками, а в РФ отсутствуют полностью. **Цель:** определить когнитивные исходы у детей, перенесших одноэтапное или двухэтапное хирургическое лечение билиарной атрезии. **Материалы и методы.** 83 ребенка были разделены на группы: 36 детям проведена трансплантация без предшествующих хирургических вмешательств (группа 1), 47 детей прошли паллиативный этап портоэнтеростомии по Касаи (группа 2). Критерии включения: возраст на момент трансплантации до 24 мес., отсутствие неврологической патологии в анамнезе. Все дети осматривались до трансплантации и в период 1, 3, 6 и 12 мес. после трансплантации печени. Оценка психомоторного развития проводилась с использованием Шкалы психомоторного развития по Гриффитс для детей до 24 месяцев (перевод Е.С. Кешишян), Шкалы интеллектуального развития по Гриффитс для детей от 2 до 8 лет и Модифицированного теста на аутизм, пересмотренного, для детей 16–30 мес. **Результаты.** Все дети на момент трансплантации имели задержку развития. До 50% детей имели признаки кахексии, окружность плеча была менее 3-го перцентиля. Только у двух детей была выявлена явная печеночная энцефалопатия в виде угнетения сознания. После трансплантации печени 94% детей группы 1 восстановили дооперационный уровень психомоторного развития, и только 68% в группе 2 достигли этих успехов. Через 3 и 6 мес. после трансплантации около 80% детей группы 1 демонстрировали нормальное психомоторное развитие, тогда как в группе 2 – только 61%. К 12 мес. после трансплантации печени разница между группами стала более очевидной: 83,3% детей группы 1 и только 53,2% детей группы 2 развивались по возрасту. Разница между группами была статистически значимой ( $p < 0,05$ ). **Заключение.** Дети получившие одноэтапное лечение билиарной атрезии, перенесшие трансплантацию печени, имеют лучшие показатели нервно-психического развития в течение года после операции по сравнению с детьми с двухэтапным хирургическим лечением.

*Ключевые слова:* трансплантация печени, билиарная атрезия, портоэнтеростомия по Касаи, психоневрологическое развитие, когнитивное развитие.

**Для корреспонденции:** Сыркина Алла Владиславовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (903) 769-16-08. E-mail: AllaSyrk@gmail.com

**Corresponding author:** Alla Syrkina. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (903) 769-16-08. E-mail: AllaSyrk@gmail.com

# NEUROPSYCHOLOGICAL DEVELOPMENT OF CHILDREN WITH BILIARY ATRESIA AFTER LIVER TRANSPLANTATION

A.V. Syrkina<sup>1</sup>, I.E. Pashkova<sup>1</sup>, A.R. Monakhov<sup>1, 3</sup>, O.V. Silina<sup>1</sup>, E.V. Chekletsova<sup>1</sup>, S.Yu. Oleshkevich<sup>1</sup>, I.B. Komarova<sup>2</sup>, O.M. Tsirulnikova<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

**Background.** In young children, the most common liver disease leading to transplantation is biliary atresia. Liver transplantation has fundamentally improved the survival rate of children with biliary atresia. Studies on developmental outcomes in children are mostly limited to small samples; there are no such studies in the Russian Federation. **Objective:** to determine the cognitive outcomes in children undergoing one-stage or two-stage surgical treatment of biliary atresia. **Materials and Methods.** 83 children were divided into groups: 36 children underwent transplantation without previous surgical interventions (group 1), 47 children underwent the Kasai palliative portoenterostomy (group 2). Inclusion criteria: 24 months of age or younger at the moment of transplantation, no medical history of neurological pathology. All children were examined before transplantation and at 1, 3, 6 and 12 months after liver transplantation. Psychomotor development was assessed using the Griffiths Psychomotor Development Scale for children under 24 months (translated by E.S. Keshishian), the Griffiths Intellectual Development Scale for children aged 2 to 8 years, and the Modified Checklist for Autism in Toddlers, Revised, for children 16-30 months old. **Results.** All children had developmental delays at the time of transplantation. Up to 50% of the children had signs of cachexia, with a shoulder circumference of less than 3 percentile. Only two children showed obvious hepatic encephalopathy in the form of depressed consciousness. After liver transplantation, 94% of group 1 children recovered their preoperative psychomotor development levels, and only 68% in group 2 made these gains. At 3 and 6 months after transplantation, about 80% of group 1 children showed normal psychomotor development, whereas in group 2, only 61% did. By 12 months after liver transplantation, the difference between the groups was more evident: 83.3% of group 1 children and only 53.2% of group 2 children were developing according to age. The difference between the groups was statistically significant ( $p < 0.05$ ). **Conclusion.** Children who received one-stage treatment of biliary atresia and underwent liver transplantation have better neuropsychological development within a year after surgery than children with two-stage surgical treatment.

*Keywords:* liver transplantation, biliary atresia, Kasai portoenterostomy, neuropsychological development, cognitive development.

Трансплантация печени за последние десятилетия стала «золотым стандартом» лечения детей с терминальными стадиями болезней печени [1]. Среди показаний к трансплантации печени билиарная атрезия – наиболее частое в детском возрасте [1, 2]. До начала хирургического лечения продолжительность жизни детей с билиарной атрезией не превышала 2 лет [3]. Выживаемость детей с нативной печенью после портоэнтеростомии по Касаи, по данным российских источников, в течение года составляет 82,7%, в течение 5 лет – 42,1% [4]. Это согласуется с зарубежными данными Marie-Odile Serinet (2009) о 5-летней выживаемости детей после операции по Касаи – 37,9% [3].

Впервые трансплантация печени по поводу билиарной атрезии ребенку 3 лет произведена в 1953 г. пионером ортотопической трансплантации печени человека Thomas E. Starzl [5]. Это событие принципиально изменило выживаемость детей с билиарной атрезией.

У детей с билиарной атрезией формируется билиарный цирроз на первом году жизни, в период активной миелинизации проводящих путей центральной нервной системы, что сопряжено с рисками нарушения психомоторного развития. Существующие осложнения цирроза печени, такие как портальная гипертензия, печеночно-клеточная недостаточность, печеночная энцефалопатия, вносят свой вклад в нарушение нервно-психического развития у детей. Показатели выживаемости улучшаются с каждым годом, тогда как о развитии детей и когнитивных исходах информации мало. Исследования проводятся на небольших выборках, по которым трудно объективно судить о прогнозах развития. В Российской Федерации подобные исследования отсутствуют.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании принимали участие дети с билиарной атрезией, оперированные в НМИЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика

В.И. Шумакова с января 2019-го по май 2020 г., всего 94 ребенка. Из них 87 детей соответствовали критериям включения, а именно: возраст на момент выполнения родственной ортотопической трансплантации (РОТ) печени до 2 лет, не отягощенный неврологический анамнез.

Из исследования были исключены пятеро детей старше двух лет и двое детей, перенесших спонтанное внутримозговое кровоизлияние в дооперационном периоде (табл. 1).

За время наблюдения умерло 4 пациента, что составило 4,16% от общего числа детей в исследовании, среди причин смерти синдром полиорганной недостаточности в 3 случаях и инфекционно-токсический шок в 1 случае.

Таким образом, завершили исследование 83 ребенка, из них 36 детей, трансплантированных без предшествующих операций и 47 детей, прошедших паллиативный этап портоэнтеростомии по Касаи в возрасте 1–3 мес. Распределение детей по группам представлено в табл. 2.

Оценка уровня нервно-психического развития проводилась всем детям до операции, а также через 1, 3, 6 и 12 мес. после трансплантации печени. Для оценки использовались следующие шкалы: Шкала психомоторного развития по Гриффитс (перевод Е.С. Кешишян) для детей до 24 месяцев [6], Шкала интеллектуального развития по Гриффитс (GMDS) от 2 до 8 лет [7] и Модифицированный тест на аутизм для детей, пересмотренный (M-CHAT-R, 2009. D. Robins, D. Fein, M. Barton, перевод на русский язык: А. Steinberg, I. Shpitsberg) для детей 16–30 мес. [8].

В соответствии со шкалами Гриффитс проводилась балльная оценка по пяти субшкалам: «моторика», «социальная адаптация», «слух и речь», «глаза и руки», «способность к игре». По каждой из субшкал присваивалось определенное количество баллов в соответствии с уровнем развития той или иной области. Сумма баллов по пяти субшкалам отражала общее развитие ребенка на момент оценки. Уровень развития мог соответствовать возрасту и иметь отклонения. Для объективного сравнения степени отклонения нервно-психического развития

Таблица 1

**Дети с билиарной атрезией, перенесшие внутримозговое кровоизлияние до трансплантации печени**  
**Children with biliary atresia who suffered intracerebral hemorrhage before liver transplantation**

	Пациент 1	Пациент 2
Возраст кровоизлияния	3 мес.	4 мес.
Вид кровоизлияния	Нетравматическое внутримозговое полушарное	Травматическое внутримозговое полушарное, ушиб головного мозга, линейный перелом левой теменной кости
Лечение	Хирургическое	Хирургическое
Последствия	Спастический гемипарез, структурная эпилепсия, задержка психомоторного развития	Спастический гемипарез, задержка психомоторного развития
Возраст на момент РОТ печени	9 мес.	6 мес.
Противосудорожные на момент РОТ печени	Да	Да
Осложнения РОТ печени	Нет	Нет

Таблица 2

**Характеристики пациентов: в группе 1 – без паллиативного этапа портоэнтеростомии по Касаи, в группе 2 – с паллиативным этапом портоэнтеростомии по Касаи**

**Characteristics of patients: in group 1 – without the palliative stage of portenterostomy according to Kasai, in group 2 – with the palliative stage of portenterostomy according to Kasai**

	Группа 1	Группа 2
Всего	36	47
Жен.	20	27
Муж.	16	20
Средний возраст на момент операции	6,5 мес.	9,1 мес.
Количество детей с окружностью плеча <3-го перцентиля	17 (47%)	23 (48%)
PELD (среднее значение)	23	28,5
Средний уровень развития до операции	Задержка развития на 1–3 мес.	Задержка развития более чем на 3 мес.
Печеночная энцефалопатия	1	1

детей разного возраста от нормы выделили 3 категории: общий уровень развития соответствует возрасту, развитие задержано в пределах 3 месяцев от нормального, развитие задерживается более чем на 3 мес. от нормального. При дальнейших оценках развития в 1, 3, 6 и 12 мес. после РОТ печени мы также использовали эти категории для формирования статистических массивов данных.

Модифицированный тест на аутизм для детей, пересмотренный (М-СНАТ-R) проводился всем детям 16–30 мес., в соответствии с рекомендациями теста. С помощью алгоритма подсчета выставлялся итоговый балл, который соответствовал низкому, среднему или высокому риску расстройств аутистического спектра у ребенка.

Статистический анализ с использованием непараметрических методов обработки данных, таких как критерий согласия Пирсона (хи-квадрат), коэффициент корреляции, проводился в программе STATISTICA 12.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Все дети, вне зависимости от прохождения паллиативного этапа портоэнтеростомии, на дооперационном этапе трансплантации печени имели задержку развития, обусловленную тяжестью билиарного цирроза и его осложнений. Дети до операции имели дефицит веса и критически низкие показатели окружности плеча. Почти половина детей в каждой из групп демонстрировала снижение длины окружности плеча ниже 3-го перцентиля, что говорит о кахексии и саркопении. Только у двух детей отмечались признаки явной печеночной энцефалопатии в виде угнетения сознания.

После родственной ортотопической трансплантации печени первая оценка уровня психомоторного развития проводилась через 1 мес. после операции. Большинство детей, 94%, из группы 1 восстановили дооперационный уровень развития в течение 2–4 недель, тогда как только 68% детей из группы 2 восстановили дооперационный уровень развития. Уровень послеоперационных осложнений был выше в группе детей, перенесших паллиативную операцию портоэнтеростомии по Касаи, однако это статистически не влияло на исходы развития детей через 1 мес. после трансплантации печени ( $p < 0,05$ ).

Через 3 мес. после трансплантации печени оценивался прирост, в первую очередь, моторных навыков. В группе 1 отмечался стремительный набор детьми моторных навыков, и 80,5% из них демонстрировали норму развития. В группе 2 нормативные показатели были достигнуты только у 61%.

Через 6 мес. после трансплантации дети в обеих группах замедлили темпы прироста навыков. Дети группы 2 не демонстрировали улучшения в развитии, те же 61% детей укладывались в нормальные интер-

валы моторики и психоречевого развития. В группе 1 – 88,9% детей соответствовали возрастным темпам развития.

Через 12 мес. после трансплантации печени различия между группами увеличились значительно. Дети группы 1 уверенно набирали моторные и психоречевые навыки, 83,3% демонстрировали нормальное развитие. Тогда как дети группы 2 отставали от сверстников почти в половине случаев. Только 53,2% детей оценивались в возрастных рамках развития.

Через 12 мес. после трансплантации печени в 1-й группе 6 детей (16,7%) отмечали задержку развития менее 3 мес., из них 1 ребенок демонстрировал задержку психоречевого развития без признаков аутизма, 2 ребенка имели признаки аутизма (4 и 9 баллов по шкале М-СНАТ-R, средний и высокий риск соответственно), а также 1 ребенок демонстрировал неаутистический регресс развития, остальные дети имели темповую задержку экспрессивной речи.

Во 2-й группе 8 детей демонстрировали задержку развития более 3 мес. и 14 детей имели задержку менее 3 мес. – всего 22 ребенка (46,8%). Из них 7 детей (14,9%) имели средний или высокий риск аутизма по шкале М-СНАТ-R, 4 ребенка (8,5%) – задержку речи с низким риском расстройств аутистического спектра (менее 2 баллов по шкале М-СНАТ), остальные 11 детей (23,4%) демонстрировали разные степени речевых нарушений: от темповой задержки развития экспрессивной речи до недоразвития речи. На рис. 1 и 2 представлена динамика развития детей в группе 1 и группе 2 соответственно.

В группе 2 количество детей с нарушениями развития было статистически значимо в сравнении с детьми группы 1, которые имеют лучшие когнитивные исходы ( $p < 0,05$ ).

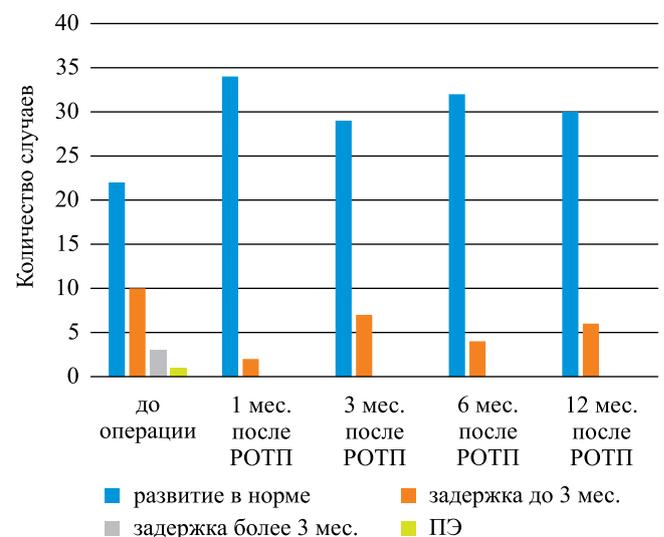


Рис. 1. Развитие детей группы 1

Fig. 1. Development of children group 1

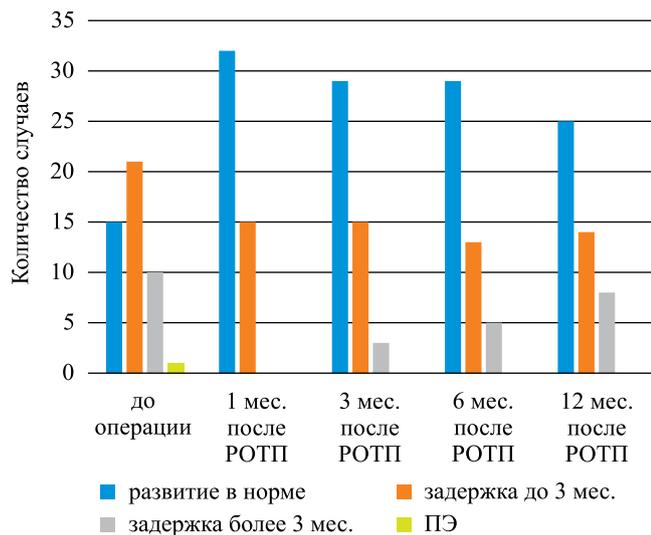


Рис. 2. Развитие детей группы 2

Fig. 2. Development of children group 2

## ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство исследований когнитивного статуса детей с билиарной атрезией, выживших после портоэнтеростомии по Касаи, говорят о существующей проблеме нарушений развития. На роль предикторов нарушений развития в разное время претендовали: продолжительность болезни, дефицит витамина E, белково-энергетическая недостаточность [9, 10], сывороточный альбумин и билирубин [11], рост и окружность плеча [12]. Ни один из предикторов не доказал свое преимущество.

Дети с билиарной атрезией, выжившие с нативной печенью после гепатопортоэнтеростомии, в исследовании Squires et al. (2020) с участием 148 детей, подвергались повышенному риску задержки нервного развития в возрасте 12 и 24 месяцев. Асцит был значимым предиктором задержки развития. У пациентов с неудачной портоэнтеростомией вероятность нарушения нервно-психического развития более чем в 4 раза выше, чем у пациентов с успешной портоэнтеростомией [13]. Портальная гипертензия была предиктором снижения коэффициента интеллекта у детей 3–12 лет с билиарной атрезией, выживших с нативной печенью. Кроме того, мужской пол, высокий уровень гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) были предикторами сниженного IQ по тестам Векслера и Уэслера-III [13].

Среди последствий для детей, перенесших хирургическое лечение билиарной атрезии, существенную роль занимают ментальные нарушения. Синдром дефицита внимания и гиперактивности у 31% [14], умеренное и тяжелое снижение коэффициента интеллекта IQ 71–85 и IQ <70 у 26 и 4% соответственно [15], нарушения развития, ассоциированные с нейросенсорной тугоухостью у 5% [16], неспособность

к обучению у 17%, что почти в 3 раза превосходит значения обычной популяции [10]. Недостатком подобных исследований был малый объем выборки – менее 30 участников.

Спектр причин ментальных нарушений среди детей с билиарной атрезией разнообразен. Печеночная энцефалопатия, очевидно влияющая на когнитивные способности пациентов, редко наблюдается у маленьких детей. Критерии диагноза размыты у данной категории пациентов. Тогда как на первый план выходят иные причины задержки развития: саркопения, анорексия, дефицит инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), повышение провоспалительных маркеров и цитокинов.

Недоедание и недостаточность роста до трансплантации печени являются важными факторами риска задержки когнитивного развития [10].

Ген нейротрофического фактора мозга экспрессируется в мышцах, жировой ткани, а также в вентромедиальном ядре гипоталамуса и вентральной тегментальной области. В головном мозге нейротрофический фактор мозга отвечает за пищевое поведение и адекватный контроль потребления пищи. У детей с циррозом печени в исходе билиарной атрезии Wilasco et al. (2016) показали анорексигенный эффект снижения концентрации нейротрофического фактора мозга [17].

Инсулиноподобный фактор роста 1 синтезируется в основном в печени под действием гормона роста. ИФР-1 занимает центральное место в регуляции анаболических процессов в организме на протяжении всей жизни. Гематоэнцефалический барьер проницаем для ИФР-1, и периферический ИФР-1 попадает в головной мозг, где связывается с рецептором через посредника тирозинкиназу, запуская метаболический каскад [18]. ИФР-1 в исследованиях *in vitro* и *in vivo* демонстрирует эффекты роста и ветвления дендритов нейронов, индуцирует апоптоз [19, 20], увеличивает поглощение глюкозы нейронами [21], определяет постнатальный нейрогенез и миелинизацию. Выработка инсулиноподобного фактора роста 1 в печени снижается на фоне цирроза [22], тогда как уровни соматотропного гормона гипофиза в популяции детей с циррозом в исследованиях были высокими [10].

У пациентов с циррозом печеночная энцефалопатия является проявлением декомпенсации наравне с кровотечением из расширенных вен пищевода или асцитом [23]. Патогенез ПЭ в настоящее время до конца не ясен. Предполагается связь развития ПЭ с накоплением аммиака, повышением циркулирующих и тканевых концентраций тканевого глутамина, что приводит к цитотоксическому отеку головного мозга и дисбалансу возбуждающей и тормозящей нейротрансмиттерных систем головного мозга [24, 25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Паллиативная портоэнтеростомия по Касаи, проведенная до трансплантации печени, по данным нашего исследования, отрицательно влияет на когнитивные исходы. Дети, перенесшие двухэтапное лечение, нуждаются в программах раннего вмешательства для коррекции когнитивных, коммуникационных и речевых нарушений. Дети, получившие одноэтапное лечение билиарной атрезии, имеют лучшие показатели нервно-психического развития в течение года после трансплантации печени.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Цирульникова ОМ, Мойсюк ЯГ, Ахаладзе ДГ, Цирульников ИЭ, Силина ОВ и др. Трансплантация печени детям: анализ шестилетнего опыта. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; 16 (3): 54–62. Gautier SV, Tsirolnikova OM, Moysyuk YaG, Akhaladze DG, Tsirolnikova IE, Silina OV et al. Liver transplantation in children: six-year experience analysis. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2014; 16 (3): 54–62. (In Russ.). doi: 10.15825/1995-1191-2014-3-54-62.
2. Atkison PR et al. Long-term results of pediatric liver transplantation in a combined pediatric and adult transplant program. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medical Can*. 2002; 166 (13): 1663–1671.
3. Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia. *Lancet Lond Engl*. 2009; 374 (9702): 1704–1713. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60946-6.
4. Разумовский АЮ, Дегтярева АВ, Куликова НВ, Рачков ВЕ, Ратников СА, Филиппова ЕА и др. Отдаленные результаты лечения детей с билиарной атрезией. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64 (1): 46–55. Razumovskiy AYU, Degtyareva AV, Kulikova NV, Rachkov VE, Ratnikov SA, Filippova EA et al. Remote results of treatment of biliary atresia in children. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii (Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics)*. 2019; 64 (1): 46–55. (In Russ.). <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2019-64-1-46-55>.
5. Hackl C, Schlitt HJ, Melter M, Knoppke B, Loss M. Current developments in pediatric liver transplantation. *World J Hepatol*. 2015; 7 (11): 1509–1520. doi: 10.4254/wjh.v7.i11.1509.
6. Кешишян ЕС. Оценка психомоторного развития ребенка раннего возраста в практике педиатра. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. Keshishyan ES. Ocenka psihomotornogo razvitiya rebenka rannego vozrasta v praktike pediatera. M.: GEOTAR-Media, 2020. doi: 10.33029/9704-5831-0-OPR-2020-1-104.
7. Smith JA, Bidder RT, Gardner SM, Gray OP. Griffiths Scales of Mental Development and different users. *Child Care Health Dev*. 1980; 6 (1): 11–16. doi: 10.1111/j.1365-2214.1980.tb00792.x.
8. Coelho-Medeiros ME et al. M-CHAT-R/F Validation as a screening tool for early detection in children with autism spectrum disorder. *Rev Chil Pediatr*. 2019; 90 (5): 492–499. doi: 10.32641/rchped.v90i5.703.
9. Stewart SM, Uauy R, Waller DA, Kennard BD, Benser M, Andrews WS. Mental and motor development, social competence, and growth one year after successful pediatric liver transplantation. *J Pediatr*. 1989; 114 (4 Pt 1): 574–581. doi: 10.1016/s0022-3476(89)80696-1.
10. Alonso EM. Growth and developmental considerations in pediatric liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008; 14 (5): 585–591. doi: <https://doi.org/10.1002/lt.21488>.
11. Stewart SM, Uauy R, Waller DA, Kennard BD, Andrews WS. Mental and motor development correlates in patients with end-stage biliary atresia awaiting liver transplantation. *Pediatrics*. 1987; 79 (6): 882–888.
12. Caudle SE, Katzenstein JM, Karpen S, McLin V. Developmental assessment of infants with biliary atresia: differences between boys and girls. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012; 55 (4): 384–389. doi: 10.1097/MPG.0b013e318259ed20.
13. Squires JE et al. Neurodevelopmental Outcomes in Preschool and School Aged Children With Biliary Atresia and Their Native Liver. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2020; 70 (1): 79–86. doi: 10.1097/MPG.0000000000002489.
14. Ee LC, Lloyd O, Beale K, Fawcett J, Cleghorn GJ. Academic potential and cognitive functioning of long-term survivors after childhood liver transplantation. *Pediatr Transplant*. 2014; 18 (3): 272–279. doi: 10.1111/petr.12246.
15. Sorensen LG, Neighbors K, Martz K, Zelko F, Bucuvalas JC, Alonso EM Cognitive and Academic Outcomes after Pediatric Liver Transplantation: Functional Outcomes Group (FOG) Results. *Am J Transplant*. 2011; 11 (2): 303–311. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2010.03363.x>.
16. Bucuvalas JC et al. Risk of hearing impairment in pediatric liver transplant recipients: a single center study. *Pediatr Transplant*. 2003; 7 (4): 265–269. doi: 10.1034/j.1399-3046.2003.02054.x.
17. Wilasco MIA, Uribe-Cruz C, Santetti D, Pfaffenseller B, Dornelles CTL, da Silveira TR. Brain-Derived Neurotrophic Factor in Children and Adolescents with Cirrhosis Due to Biliary Atresia. *Ann Nutr Metab*. 2016; 69 (1): 1–8. doi: 10.1159/000447364.
18. Pan W, Yu Y, Cain C.M., Nyberg F, Couraud P.O., Kastin A.J. Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology*. 2005; 146 (11): 4898–4904. doi: 10.1210/en.2005-0587.
19. Van der Heide LP, Ramakers GMJ, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol*. 2006; 79 (4): 205–221. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.06.003.
20. McDonald JW, Goldberg MP, Gwag BJ, Chi SI, Choi DW. Cyclosporine induces neuronal apoptosis and selective

- oligodendrocyte death in cortical cultures. *Ann Neurol.* 1996; 40 (5): 750–758. doi: 10.1002/ana.410400511.
21. Bondy CA, Cheng CM. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol.* 2004; 490 (1–3): 25–31. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.02.042.
22. Курабекова РМ, Цирульникова ОМ, Пащикова ИЕ, Макарова ЛВ, Можейко НП, Монахов АР, Шевченко ОП. Связь уровней гормона роста и инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) с функцией печени и краткосрочной выживаемостью детей – реципиентов печени. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2020; 30 (4): 44–51. Kurabekova RM, Tsiroulnikova OM, Pashkova IE, Makarova LV, Mozheiko NP, Monakhov AR, Shevchenko OP. Association between Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) Levels, Liver Function and Short-Term Survival of Paediatric Liver Recipients. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2020; 30 (4): 44–51. (In Russ.). doi: 10.22416/1382-4376-2020-30-4-44-51.
23. Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: 2014 Practice Guideline by the European Association for the Study of the Liver and the American Association for the Study of Liver Diseases. *J Hepatol.* 2014; 61 (3): 642–659. doi: 10.1016/j.jhep.2014.05.042.
24. Butterworth RF. Pathophysiology of brain dysfunction in hyperammonemic syndromes: The many faces of glutamine. *Mol Genet Metab.* 2014; 113 (1–2): 113–117. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.06.003.
25. Павлов ЧС, Дамулин ИВ, Ивашкин ВТ. Печеночная энцефалопатия: патогенез, клиника, диагностика, терапия. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2016; 26 (1): 44–53. Pavlov ChS, Damulin IV, Ivashkin VT. Hepatic encephalopathy: pathogenesis, clinical presentation, diagnostics, treatment. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology.* 2016; 26 (1): 44–53. <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2016-26-1-44-53>.

Статья поступила в редакцию 17.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 17.06.2021

# МИКРОРНК-27 И -339 ПРИ ФИБРОЗЕ МИОКАРДА ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА: АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ

О.П. Шевченко<sup>1, 2</sup>, Д.А. Великий<sup>1</sup>, С.О. Шарапченко<sup>1</sup>, О.Е. Гичкун<sup>1, 2</sup>, А.В. Марченко<sup>1</sup>,  
А.А. Улыбышева<sup>1, 3</sup>, В.С. Павлов<sup>1</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>, Н.Н. Колоскова<sup>1</sup>, А.О. Шевченко<sup>1-3</sup>

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

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

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

Фиброз миокарда играет ключевую роль в патогенезе сердечной недостаточности. В качестве перспективных профиброгенных биомаркеров, способных сигнализировать о возможном риске негативных событий после трансплантации сердца, выделяют семейство малых некодирующих сигнальных молекул микроРНК.

**Цель:** выявить и оценить диагностическую значимость микроРНК, а также комплексных тестов на их основе у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата. **Материалы и методы.** В исследование включены 83 реципиента сердца в возрасте от 16 до 64 ( $48,4 \pm 13,1$ ) лет. В плазме венозной крови измеряли уровень экспрессии пяти микроРНК (miR-27, -101, -142, -339, -424) методом количественной полимеразной цепной реакции; концентрацию галектина-3 определяли иммуноферментным методом.

**Результаты.** Морфологические признаки фиброза миокарда трансплантата верифицированы у 48 реципиентов. У реципиентов сердца с фиброзом миокарда уровни экспрессии miR-27 и miR-339 значимо выше, чем при отсутствии такового ( $p = 0,018$  и  $p = 0,043$  соответственно). Определены диагностически значимые пороговые величины miR-27 и miR-339 в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца ( $-4,33$  и  $-5,24$  отн. ед. соответственно). Относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантата у реципиентов с величиной экспрессии miR-27 выше порогового уровня составил  $1,5 \pm 0,157$  [95% ДИ 1,104–2,039],  $p = 0,009$ ; для miR-339 –  $1,31 \pm 0,130$  [95% ДИ 1,018–1,692],  $p = 0,036$ . При одновременном уровне экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3 выше их рассчитанных пороговых значений риск развития фиброза миокарда трансплантированного сердца возрастает до  $2,7 \pm 0,456$  [95% ДИ 1,090–6,524],  $p = 0,032$ ; при одновременном превышении пороговых значений miR-339 и галектина-3 риск составляет  $2,0 \pm 0,316$  [95% ДИ 1,076–3,717],  $p = 0,028$ . **Заключение.** Экспрессия miR-27 и miR-339 связана с наличием фибротических изменений в миокарде трансплантата. Сочетание молекулярно-генетических и протеомных биомаркеров в одном тесте позволяет повысить его диагностические характеристики в отношении посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца.

**Ключевые слова:** трансплантация сердца, фиброз миокарда, микроРНК-27, микроРНК-339, галектин-3.

**Для корреспонденции:** Шарапченко Софья Олеговна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (499) 193-87-62. E-mail: Nyashka1512@yandex.ru

**Corresponding author:** Sofya Sharapchenko. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (499) 193-87-62. E-mail: Nyashka1512@yandex.ru

# DIAGNOSTIC VALUE OF MICRORNA-27 AND -339 IN HEART TRANSPLANT RECIPIENTS WITH MYOCARDIAL FIBROSIS

O.P. Shevchenko<sup>1, 2</sup>, D.A. Velikiy<sup>1</sup>, S.O. Sharapchenko<sup>1</sup>, O.E. Gichkun<sup>1, 2</sup>, A.V. Marchenko<sup>1</sup>, A.A. Ulybysheva<sup>1, 3</sup>, V.S. Pavlov<sup>1</sup>, N.P. Mozheiko<sup>1</sup>, N.N. Koloskova<sup>1</sup>, A.O. Shevchenko<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

Myocardial fibrosis plays a key role in the pathogenesis of heart failure. A family of small non-coding signaling molecules, microRNAs (miRNAs), has been identified as promising profibrogenic biomarkers capable of signaling a possible risk of adverse events after heart transplantation. **Objective:** to identify and evaluate the diagnostic significance of miRNAs, as well as comprehensive miRNA-based tests in heart recipients with graft myocardial fibrosis. **Materials and Methods.** The study included 83 heart recipients aged 16 to 64 ( $48.4 \pm 13.1$ ) years. The expression levels of five microRNAs (miR-27, -101, -142, -339, -424) in venous blood plasma were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction; galectin-3 serum levels were determined by enzyme immunoassay. **Results.** Morphological signs of graft myocardial fibrosis were verified in 48 recipients. The miR-27 and miR-339 expression levels were significantly higher in heart recipients with myocardial fibrosis than in those without myocardial fibrosis ( $p = 0.018$  and  $p = 0.043$ , respectively). Diagnostically significant threshold levels of miR-27 and miR-339 for detection of myocardial fibrosis in heart transplant recipients were determined ( $-4.33$  and  $-5.24$  units, respectively). The relative risk of detecting graft myocardial fibrosis in recipients with miR-27 expression value above the threshold level was  $RR = 1.5 \pm 0.157$  [95% CI 1.104-2.039],  $p = 0.009$ ; for miR-339,  $RR = 1.31 \pm 0.130$  [95% CI 1.018-1.692],  $p = 0.036$ . When miR-27 expression levels and galectin-3 serum levels simultaneously exceeded their estimated thresholds, the risk of transplanted heart myocardial fibrosis increased to  $RR = 2.7 \pm 0.456$  [95% CI 1.090-6.524],  $p = 0.032$ ; when miR-339 and galectin-3 simultaneously exceeded threshold values, the risk was  $RR = 2.0 \pm 0.316$  [95% CI 1.076-3.717],  $p = 0.028$ . **Conclusion.** The miR-27 and miR-339 expression levels are associated with the presence of fibrotic changes in the graft myocardium. The combination of molecular-genetic and proteomic biomarkers in one test improves the diagnostic characteristics of these expressions with respect to post-transplant complications in heart recipients.

*Keywords:* heart transplantation, myocardial fibrosis, microRNA-27, microRNA-339, galectin-3.

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на существенные достижения в области трансплантации сердца (ТС), у реципиентов после ТС существует риск развития субклинической хронической сердечной недостаточности вследствие фиброза трансплантата, вызванного аккумулярованием фибриллярного коллагена в миокарде. Исследование эндомикардиальных биоптатов позволяет выявлять патологию трансплантата, однако существенно ограничивается инвазивностью данного вмешательства.

В последние годы ведется активная разработка малоинвазивных методов диагностики посттрансплантационных осложнений, которые позволяют выявлять наличие острого отторжения, а также другие формы патологии сердечного трансплантата [1, 2].

Перспективными кандидатами на роль таких биомаркеров выступают микроРНК – семейство малых эндогенных некодирующих одноцепочечных РНК, выступающих в качестве посттранскрипционных регуляторов, играющих ключевую роль во множестве биологических процессов [3].

На сегодняшний день идентифицировано более 2000 микроРНК и подтверждено их участие в функции здоровых и поврежденных клеток. МикроРНК в основном тканеспецифичны и регулируют экспрессию более 30% генов. Показан диагностический потенциал оценки уровня экспрессии ряда микроРНК в образцах крови пациентов в отношении развития и течения ХСН [4]. Исследования последних лет показали, что измерение уровня экспрессии отдельных видов микроРНК у реципиентов солидных органов может применяться для совершенствования диагностики посттрансплантационных осложнений, в том числе фиброза трансплантата сердца, почек, печени, легкого [5, 6].

**Цель настоящей работы** – выявить и оценить диагностическую значимость микроРНК, а также комплексных тестов на их основе у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование вошли 83 пациента от 16 до 64 лет ( $48,4 \pm 13,1$ ), отобранных случайным образом, которым в период с 2013-го по 2018 год в ФГБУ «НМИЦ

ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России была выполнена ТС, среди них мужчин – 64 (77,1%).

В соответствии с протоколом ведения пациентов в НИИЦ ТИО и Национальными клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества все реципиенты после ТС проходили плановые обследования, включавшие клиническую оценку состояния, общий и биохимический анализы крови с определением концентрации такролимуса, повторные биопсии миокарда.

Экспрессия пяти микроРНК (miR-27, -101, -142, -339 и -424), предположительно играющих роль в развитии патологии сердечного трансплантата, исследовалась в плазме венозной крови (от 1 до 3 образцов от каждого реципиента, в среднем 1,2). Образцы крови собирали в одноразовые пробирки с антикоагулянтом, центрифугировали и полученную плазму замораживали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Из 100 мкл плазмы крови с использованием наборов Serum Plasma (Qiagen, США) выделяли общую РНК с предварительным добавлением  $1,6 \times 10^8$  копий синтетической микроРНК cel-miR-39 (Qiagen) после инкубации плазмы с фенольной смесью Qiazol. В качестве внутреннего контроля эффективности выделения РНК, синтеза комплементарной ДНК (кДНК) и количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали cel-miR-39. Интенсивность экспрессии рассчитывали по  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  методу [7] и выражали в относительных единицах, эквивалентных  $\log_2(2^{-\Delta\text{Ct}})$ , где  $\Delta\text{Ct}$  – рабочие значения изменения цикла получения продукта относительно внутреннего контроля экспрессии микроРНК cel-miR-39.

Концентрацию галектина-3 измеряли иммуноферментным методом с помощью наборов реагентов Human Galectin-3 Platinum ELISA (Bender MedSystems GmbH, Austria) в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией.

Определение признаков фибротических изменений миокарда трансплантата осуществляли путем гистологического исследования биопсийного материала. Выполнение эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) у реципиентов проводили при плановом

обследовании или по показаниям в соответствии с протоколом.

Величина экспрессии оценивались с применением корреляции Спирмена и U-критерия Манна–Уитни для сравнения независимых переменных. Различия в сравниваемых группах принимались значимыми на уровне  $p < 0,05$ . Определение чувствительности и специфичности проводили при помощи ROC-анализа. Сравнение у реципиентов логранговым методом (log-rank) кривых выживаемости без нежелательных событий – Каплан–Майер. Для оценки диагностической значимости использовали показатель относительного риска (RR). Для определения порогового уровня экспрессии микроРНК рассчитывался индекс Юдена [8]. Оценены чувствительность, специфичность, а также положительные и отрицательные прогностические значения тестов (PPV и NPV соответственно). Статистическая обработка данных производилась с использованием статистического пакета «Statistica» v.13.0, StatSoft Inc. (США).

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

В результате серии исследований образцов эндомикардиальных биоптатов у 48 реципиентов сердца был выявлен фиброз миокарда трансплантата.

В табл. 1 представлен сравнительный анализ уровня экспрессии исследуемых микроРНК у реципиентов сердца с фиброзом миокарда и без такового.

При исследовании пяти микроРНК уровень экспрессии miR-27 и miR-339 был выше у пациентов с фиброзом миокарда в сравнении с реципиентами без фиброза ( $p = 0,018$  и  $p = 0,043$  соответственно).

Диагностическая значимость miR-27 и -339 оценивалась путем расчета площади под их ROC-кривыми (AUC). На рис. 1 отражены ROC-кривые экспрессии miR-27 и -339 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата.

Площадь под ROC-кривой для miR-27 составила  $0,69 \pm 0,072$  [95% ДИ 0,545–0,828] и достоверно отличалась от величины 0,5 ( $p = 0,010$ ); для miR-339 она также достоверно отличалась от 0,5 и составила  $0,67 \pm 0,072$  [95% ДИ 0,528–0,812] ( $p = 0,019$ ).

По оптимальному сочетанию значений чувствительности и специфичности, соответствующему

Таблица 1

**Величина экспрессии микроРНК у реципиентов сердца с фиброзом миокарда и без такового**  
**MicroRNA expression levels in heart transplant recipients with and without myocardial fibrosis**

МикроРНК	Реципиенты с фиброзом	Реципиенты без фиброза	p -уровень
miR-27	-5,414 [-6,430; -4,330]	-3,742 [-5,738; -1,576]	0,018
miR-101	-7,629 [-8,732; -5,913]	-5,844 [-7,452; -4,467]	0,105
miR-142	-6,925 [-8,297; -5,863]	-6,226 [-8,036; -5,152]	0,409
miR-339	-9,907 [-11,603; -7,784]	-7,925 [-10,132; -3,543]	0,043
miR-424	-6,532 [-7,779; -5,288]	-7,006 [-7,883; -5,617]	0,579

наибольшему показателю индекса Юдена, определены диагностически значимые пороговые величины miR-27 и miR-339 в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца (-4,33 и -5,24 отн. ед. соответственно).

Логранговым методом оценена выживаемость без нежелательных событий у реципиентов с фиброзом миокарда и уровнем экспрессии miR-27 и miR-339 выше и ниже рассчитанных пороговых значений. В качестве нежелательных событий принимали летальный исход, ретрансплантацию сердца или проведение баллонной ангиопластики.

Показано, что у реципиентов с величиной экспрессии miR-27 ниже порогового уровня выживаемость без нежелательных событий достоверно выше, нежели у пациентов с уровнем экспрессии выше такового (log-rank p = 0,04, рис. 2).

Значимых различий выживаемости у реципиентов сердца с величиной экспрессии miR-339 выше и ниже порогового уровня не установлено (log-rank p = 0,34).

Относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца у реципиентов с величиной экспрессии miR-27 выше порогового уровня составил  $1,5 \pm 0,157$  [95% ДИ 1,104–2,039], p = 0,009; для реципиентов с уровнем экспрессии miR-339 выше порогового значения риск фиброза миокарда составил  $1,31 \pm 0,130$  [95% ДИ 1,018–1,692], p = 0,036.

При одновременно высоких (выше пороговых значений) уровнях экспрессии miR-27 и miR-339 риск развития фиброза миокарда трансплантированного сердца возрастает в 1,93 раза (RR =  $1,93 \pm 0,245$  [95% ДИ 1,191–3,111], p = 0,007).

Полученные результаты указывают на наличие связи экспрессии miR-27 и miR-339 с развитием

фиброза миокарда трансплантированного сердца, однако практическое значение тестов ограничено их недостаточной чувствительностью (не более 60%). В связи с этим предпринято исследование сочетания микроРНК и протеомного биомаркера с доказанной эффективностью при фиброзе миокарда, галектин-3.

Концентрация галектина-3 в плазме крови реципиентов с фиброзом миокарда была значимо выше, чем у реципиентов без фиброза (p = 0,009, рис. 3).

Оценена диагностическая значимость галектина-3 в отношении выявления пациентов с фиброзом. На рис. 4 изображена ROC-кривая концентрации галектина-3 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата.

Площадь под ROC-кривой для галектина-3 составила  $0,73 \pm 0,077$  [95% ДИ от 0,574–0,879] и достоверно отличалась от величины 0,5 (p = 0,004).

По наибольшему показателю индекса Юдена определена диагностически значимая пороговая концентрация галектина-3 в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца, которая составила 21,66 нг/мл; относительный риск выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца у реципиентов с концентрацией галектина-3 выше порогового уровня составил  $1,46 \pm 0,157$  [95% ДИ 1,071–1,978] (p = 0,016) при чувствительности и специфичности теста 60,9% и 78,6% соответственно.

Сравнительный анализ выживаемости реципиентов сердца с концентрацией галектина-3 выше и ниже рассчитанных пороговых значений показал наличие достоверных различий (рис. 5).

В группе пациентов с уровнем галектина-3 ниже 21,66 нг/мл выживаемость без нежелательных событий значимо выше, чем у реципиентов с уров-

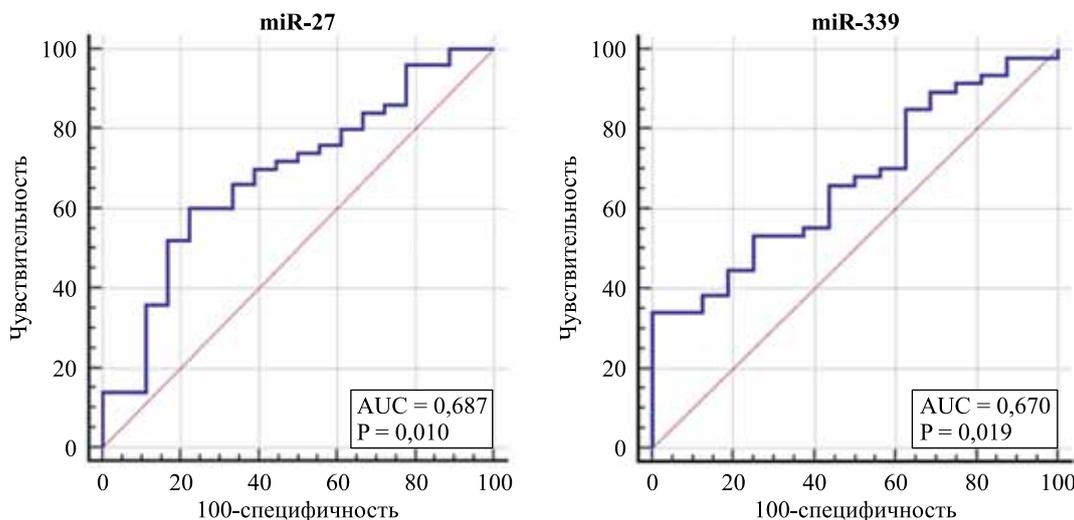


Рис. 1. ROC-кривые экспрессии miR-27 и miR-339 в плазме крови реципиентов сердца с фиброзом миокарда трансплантата

Fig. 1. ROC curves of miR-27 and miR-339 in heart transplant recipients with graft myocardial fibrosis

нем галектина-3, превышающим таковой (log-rank  $p = 0,003$ ).

Оценка диагностических характеристик тестов, предусматривающих совместное измерение экспрессии микроРНК с концентрацией галектина-3, показала следующие результаты: при одновременном уровне экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3 выше рассчитанных пороговых значений риск развития фиброза миокарда трансплантированного сердца возрастает до 2,7 раза ( $RR = 2,67 \pm 0,456$  [95% ДИ 1,090–6,524],  $p = 0,032$  (рис. 6).

При одновременном превышении пороговых значений miR-339 и галектина-3 риск развития фиброза

миокарда возрастает до 2 раз ( $RR = 2,00 \pm 0,316$  [95% ДИ 1,076–3,717],  $p = 0,028$ ) по сравнению с отдельными тестами.

В табл. 2 представлены основные диагностические характеристики тестов miR-27, miR-339, галектина-3 и их комбинаций в отношении развития фиброза миокарда трансплантированного сердца.

Совместное определение уровня экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца обладает наилучшими диагностическими характеристиками в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца.

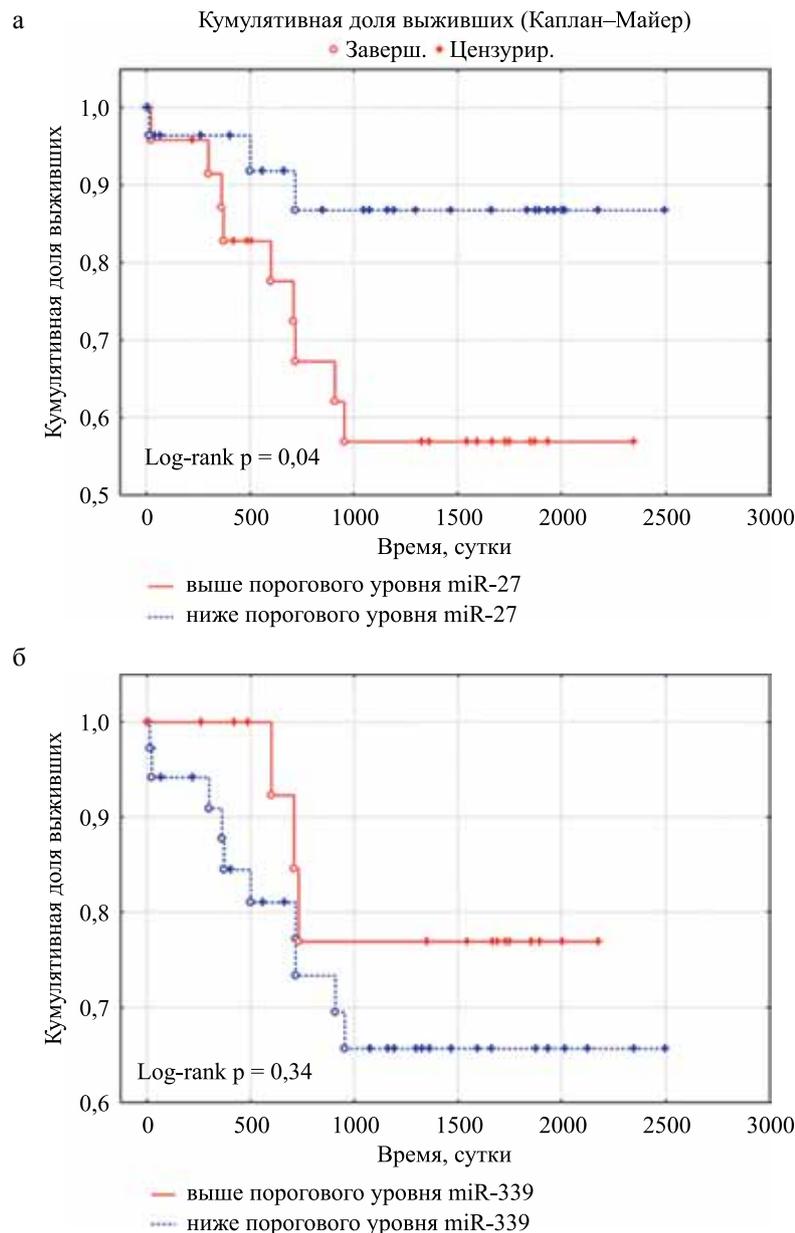


Рис. 2. Кривые выживаемости без нежелательных событий у реципиентов сердца в зависимости от уровня экспрессии miR-27 (а) и miR-339 (б)

Fig. 2. Survival curves without adverse events in heart transplant recipients as a function of miR-27 (a) and miR-339 (б) expression levels

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Фиброз миокарда играет важную роль в развитии субклинической посттрансплантационной сердечной недостаточности. Формирование фиброзной ткани в межклеточном пространстве способствует структурному и функциональному ремоделированию трансплантата. К развитию фиброза миокарда трансплантированного сердца приводят такие патологические

факторы, как артериальная гипертензия, острое отторжение и васкулопатия трансплантата [9, 10].

Верификация фиброза миокарда осуществляется с помощью морфологического анализа ткани миокарда, полученной при ЭМБ, а его количественная характеристика – с определением показателя коллагенообразования – объемной фракции коллагена (ОФК). ОФК позволяет оценить содержание и соотношение коллагена I и III типа в миокарде,

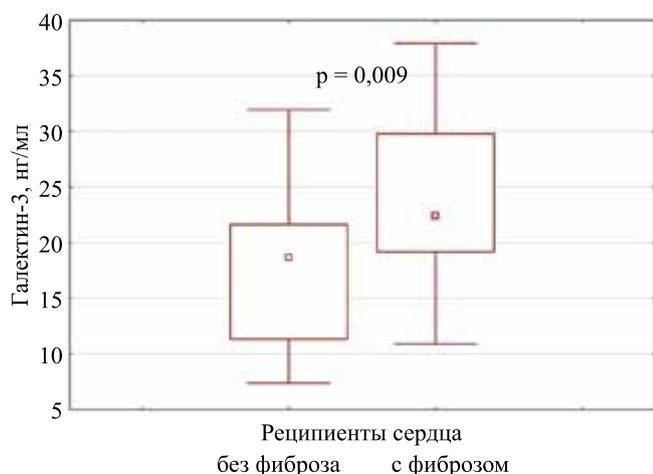


Рис. 3. Концентрация галектина-3 в плазме крови реципиентов сердца с фиброзом миокарда и без такового

Fig. 3. Galectin-3 plasma concentrations in heart transplant recipients with and without myocardial fibrosis

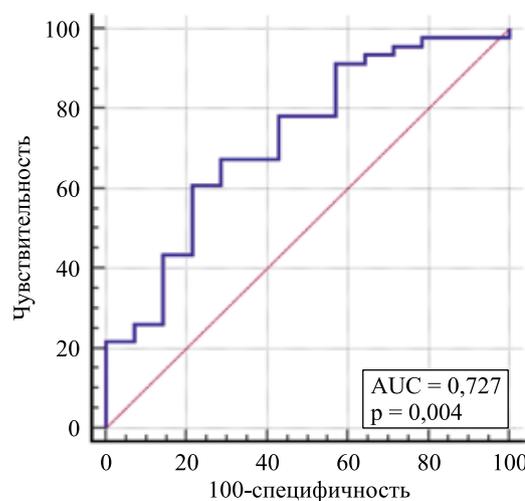


Рис. 4. ROC-кривая концентрации галектина-3 у реципиентов сердца с фиброзом миокарда

Fig. 4. ROC curve of galectin-3 plasma concentrations in heart transplant recipients with myocardial fibrosis

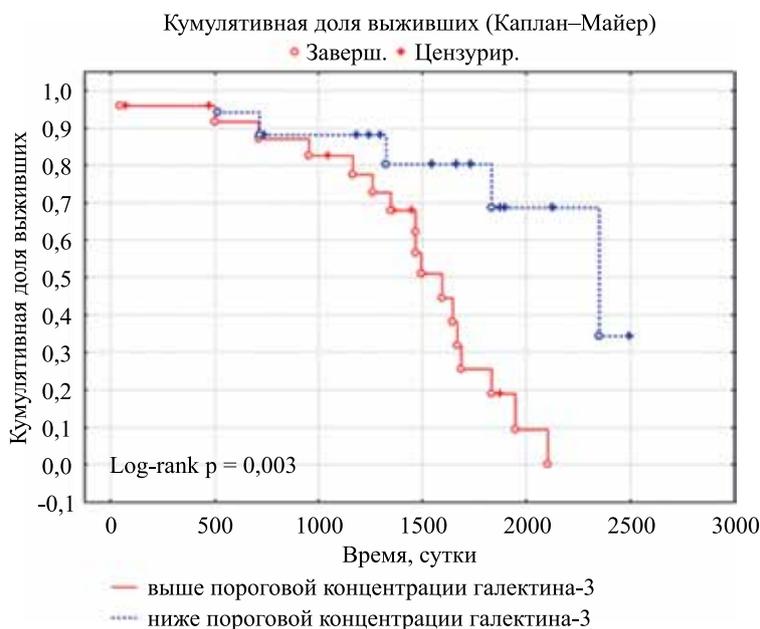


Рис. 5. Кривые выживаемости без нежелательных событий у реципиентов сердца с концентрацией галектина-3 выше и ниже пороговых уровней

Fig. 5. Survival curves without adverse events in heart transplant recipients with galectin-3 plasma concentrations above and below threshold levels

однако диагностическая ценность данного анализа может быть существенно ограничена возможными ошибками при заборе исследуемого биопсийного материала ввиду неравномерного распределения коллагена в тканях [11].

За последнее десятилетие существенно расширены представления о механизмах развития фиброза. Фибробласты играют ключевую роль в поддержании внеклеточного матрикса, они же регулируют синтез и деградацию коллагена. Трансформирующий фактор роста TGF-β1 и ангиотензин II – наиболее известные профиброгенные факторы. Ответной реакцией на действие ангиотензина является экспрессия галектина-3, активного стимулятора пролиферации фибробластов. Подобная стимуляция фибробластов наблюдается при активации иммунной системы в

результате оксидативного стресса или вследствие механического повреждения предсердий [12].

Циркулирующие микроРНК играют важную роль в ремоделировании сердца и других важных биологических процессах. У.М. Huang et al. оценили диагностический потенциал ряда микроРНК в отношении развития и течения сердечной недостаточности у пациентов с ишемической болезнью сердца и дилатационной кардиомиопатией [4].

Функция молекул микроРНК связана с регуляцией экспрессии генов, а именно ингибирующим действием на РНК на уровне процессов транскрипции. Показана регуляторная роль miR-30 и -133a в механизмах фиброобразования миокарда за счет ингибирования фактора роста соединительной ткани [13]. В экспериментах на мышах удалось установить, что повышенная экспрессия miR-133 приво-

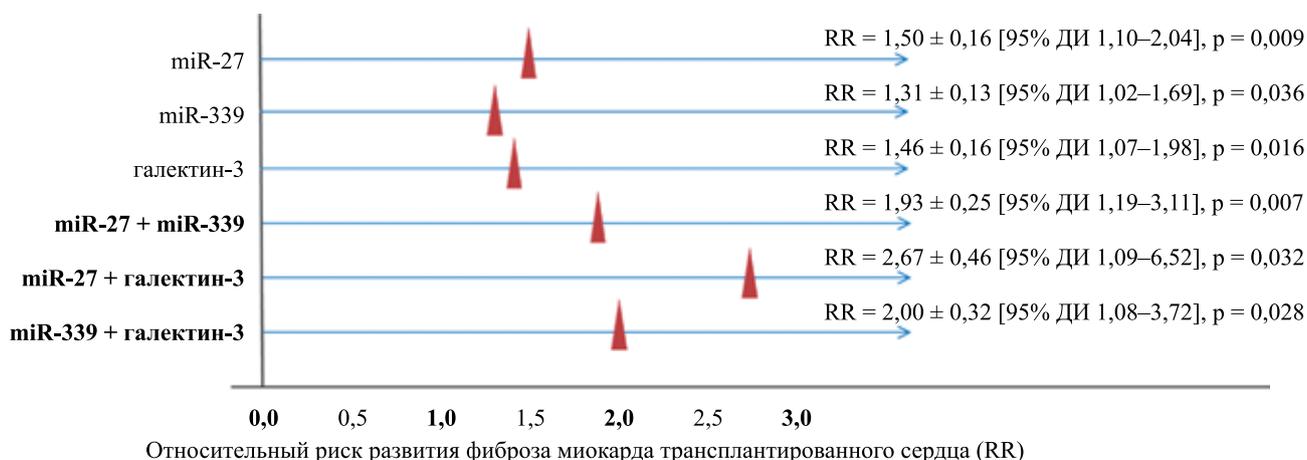


Рис. 6. Показатели относительного риска выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца при уровне экспрессии miR-27, miR-339 и концентрации галектина-3 выше пороговых значений, а также при их совместном определении

Fig. 6. Relative risks of myocardial fibrosis in heart transplant recipients with miR-27, miR-339 expression levels and galectin-3 plasma concentrations above threshold levels, and when they are determined together

Таблица 2

**Диагностические характеристики miR-27, miR-339 и галектина-3 в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца при уровне выше пороговых значений**

**Diagnostic characteristics of miR-27, miR-339, and galectin-3 in relation to detection of myocardial fibrosis in heart recipients at levels above thresholds**

Тесты	Чувствительность	Специфичность	PPV	NPV
miR-27	60,0%	77,8%	88,2%	41,2%
miR-339	36,2%	87,5%	89,5%	31,8%
галектин-3	60,9%	78,6%	90,3%	37,9%
miR-27 + miR-339	52,4%	91,7%	91,7%	52,4%
miR-27 + галектин-3	66,7%	100,0%	100,0%	62,5%
miR-339 + галектин-3	54,5%	100,0%	100,0%	50,0%

Примечание. PPV – положительное прогностическое значение теста; NPV – отрицательное прогностическое значение теста.

Note. PPV – positive predictive value of the test; NPV – negative predictive value of the test.

дит к снижению синтеза коллагена, соответственно, и фиброза миокарда, тогда как отсутствие miR-133 было связано с высокой предрасположенностью к сердечной недостаточности (СН) и фиброзу. Помимо этого miR-21 вовлечен в регуляцию по одному из профибротических путей и оказывает защитный эффект в отношении оксидативного стресса. И наконец, микроРНК-29 связана с отложением коллагена I и III типов. Повышение содержания miR-29 приводит к снижению синтеза этих белков и наоборот.

Результаты нашего исследования о связи miR-27 и miR-339 с процессом фиброза согласуются с работами зарубежных авторов. Имеются данные об ингибирующем влиянии miR-27 и miR-101 на развитие процессов фиброобразования в сердце и других органах [14–16]. В ряде работ отмечается участие микроРНК-27 в качестве ингибитора воспалительных реакций миокарда [17], а miR-27b, как член семейства микроРНК-27, может играть антифибротическую роль в левом предсердии и расцениваться в качестве новой терапевтической мишени в отношении сердечной недостаточности. Механизм противофибротического действия miR-27 связывают с ингибирующим влиянием на TGF- $\beta$  [18]. Вместе с этим имеются немногочисленные данные и о профибротическом действии miR-27 через подавление синтеза транскрипционного белка FBW7 [19]. Установлено, что miR-27 имеет значение при развитии атеросклероза: за счет подавления индуцированного липопротеин-липазой накопления липидов и воспалительного ответа miR-27 снижает прогрессирование атеросклероза [20]. В работе L.O. Cruz et al. приведены сведения о том, что miR-27 могут нарушать дифференцировку Treg-клеток, тем самым снижая Treg-опосредованную иммунологическую толерантность [21]. Вместе с этим в недавних исследованиях показано участие miR-339 в качестве ингибитора пролиферации клеток [22, 23]. При ишемической болезни сердца miR-339 способна увеличивать оксидативный стресс за счет подавления Nrf2/FOXO3 сигнального пути через специфический белок Sirt2 [24]. В исследовании J. Chen et al. показано, что miR-339 подавляет пролиферацию гладкомышечных клеток легочной артерии через ингибирование FGF сигнального пути [25]. Результаты нашего исследования демонстрируют наличие значимо более высоких уровней экспрессии miR-27 и -339 у реципиентов сердца с развитием фибротических процессов в миокарде.

Еще одним новым биомаркером развития тяжелой СН является галектин-3, относящийся к семейству лектинов. Он играет важную роль в регуляции процессов воспаления, иммунного ответа и дегенерации нервной ткани, а также идентифицирован в качестве профиброгенного фактора. Галектин-3 секретируется во внеклеточное пространство в участке повреждения и активизирует прежде покоящиеся

фибробласты [26]. Coromilas et al. установили, что повышение концентрации галектина-3 ассоциировано с развитием СН, тогда как более низкие показатели галектина-3 отмечались при снижении тяжести заболевания [27]. Таким образом, продемонстрирована прогностическая значимость галектина-3 в риске развития нежелательных событий у пациентов с СН.

Ранее нами был показан диагностический потенциал галектина-3 в отношении развития фиброза миокарда трансплантированного сердца [28, 29]. В настоящей работе оценены варианты тестов его комбинации с микроРНК miR-27 и miR-339, потенциально значимых при развитии СН [29].

Установлено, что наилучшими диагностическими характеристиками в отношении выявления фиброза миокарда трансплантированного сердца обладает совместный тест на определение в плазме крови реципиентов сердца уровня экспрессии miR-27 и концентрации галектина-3.

*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. Crespo-Leiro MG, Barge-Caballero G, Couto-Mallon D. Noninvasive monitoring of acute and chronic rejection in heart transplantation. *Curr Opin Cardiol*. 2017; 32 (3): 308–315.
2. 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. Kontroliruemaja 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].
3. Shah P, Bristow MR, Port JD. MicroRNAs in Heart Failure, Cardiac Transplantation, and Myocardial Recovery: Biomarkers with Therapeutic Potential. *Curr Heart Fail Rep*. 2017; 14 (6): 454–464.
4. Huang YM, Li WW, Wu J, Han M, Li BH. The diagnostic value of circulating microRNAs in heart failure. *Exp Ther Med*. 2019; 17 (3): 1985–2003.
5. Duong Van Huyen JP, Tible M, Gay A. MicroRNAs as non-invasive biomarkers of heart transplant rejection. *European Heart Journal*. 2014; 35 (45): 3194–3202.
6. Farid WRR, Pan Q, Van der Meer AJP. Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2012; 18 (3): 290–297.

7. 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; 25 (4): 402–408.
8. Hughes G. Youden's Index and the Weight of Evidence Revisited. *Methods Inf Med*. 2015; 54 (6): 576–577.
9. Дранкина ОМ, Дранкина ЮС. Фиброз и активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Реалии и перспективы. *Артериальная гипертензия*. 2012; 18 (5): 449–458. Дранкина ОМ, Дранкина ЮС. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system activity. Reality and future prospects. *Arterial Hypertension*. 2012; 18 (5): 449–458.
10. Khush K, Zarafshar S. Molecular Diagnostic Testing in Cardiac Transplantation. *Curr Cardiol Rep*. 2017; 19 (11): 118.
11. Stehlik J, Starling RC, Movsesian MA et al. Utility of long-term surveillance endomyocardial biopsy: a multi-institutional analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25 (12): 1402–1409.
12. Миклишанская СВ, Мазур НА, Шестакова НВ. Механизмы формирования миокардиального фиброза в норме и при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях. методы его диагностики. *Медицинский совет*. 2017; 12: 75–81. Miklishanskaya SV, Mazur NA, Shestakova NV. Mekhanizmy formirovaniya miokardial'nogo fibroza v norme i pri nekotoryh serdechno-sosudistykh zabollevaniyah. metody ego diagnostiki. *Medicinskij sovet*. 2017; 12: 75–81.
13. Dzeshka MS, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation. *JACC*. 2015; 66 (8): 943–959.
14. Li X, Zhang S, Wa M et al. MicroRNA-101 Protects Against Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction via Downregulation of Runt-Related Transcription Factor 1. *J Am Heart Assoc*. 2019; 8 (23): e013112.
15. Huang C, Xiao X, Yang Y et al. MicroRNA-101 attenuates pulmonary fibrosis by inhibiting fibroblast proliferation and activation. *J Biol Chem*. 2017; 292 (40): 16420–16439.
16. Meroni M, Longo M, Erconi V et al. Mir-101-3p Downregulation Promotes Fibrogenesis by Facilitating Hepatic Stellate Cell Transdifferentiation During Insulin Resistance. *Nutrients*. 2019; 11 (11): 2597.
17. 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; 35 (10): 607–614.
18. Wang Y, Cai H, Li H, Gao Z, Song K. Atrial overexpression of microRNA-27b attenuates angiotensin II-induced atrial fibrosis and fibrillation by targeting ALK5. *Hum Cell*. 2018; 31 (3): 251–260.
19. Fu Q, Lu Z, Fu X et al. MicroRNA 27b promotes cardiac fibrosis by targeting the FBW7/Snail pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11 (24): 11865–11879.
20. Xie W, Li L, Zhang M et al. MicroRNA-27 Prevents Atherosclerosis by Suppressing Lipoprotein Lipase-Induced Lipid Accumulation and Inflammatory Response in Apolipoprotein E Knockout Mice. *PLoS One*. 2016; 11 (6): e0157085.
21. Cruz LO, Hashemifar SS, Wu CJ et al. Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance. *J Clin Invest*. 2017; 127 (2): 530–542.
22. Zeng H, Zheng J, Wen S et al. MicroRNA-339 inhibits human hepatocellular carcinoma proliferation and invasion via targeting ZNF689. *Drug Des Devel Ther*. 2019; 13: 435–445.
23. Derda AA, Pfanne A, Bär C et al. Blood-based microRNA profiling in patients with cardiac amyloidosis. *PLoS One*. 2018; 3 (10): e0204235.
24. Shi L, Zhang Y, Zhang J et al. MiR-339 is a potential biomarker of coronary heart disease to aggravate oxidative stress through Nrf2/FOXO3 targeting Sirt2. *Ann Palliat Med*. 2021; 10 (3): 2596–2609
25. Chen J, Cui X, Li L et al. MiR-339 inhibits proliferation of pulmonary artery smooth muscle cell by targeting FGF signaling. *Physiol Rep*. 2017; 5 (18): e13441.
26. Grupper A, Nativi-Nativi J, Maleszewski JJ et al. Circulating galectin-3 levels are persistently elevated after heart transplantation and are associated with renal dysfunction. *JACC: Heart Failure*. 2016; 4: 847–856.
27. Coromilas E, Que-Xu E, Moore D et al. Dynamics and prognostic role of galectin-3 in patients with advanced heart failure, during left ventricular assist device support and following heart transplantation. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016; 16: 138–148.
28. Шевченко ОП, Улыбышева АА, Гичкун ОЕ и др. Галектин-3 при отторжении и фиброзе трансплантированного сердца. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (3): 62–68. Shevchenko OP, Ulybysheva AA, Gichkun OE et al. Galectin-3 in rejection and fibrosis of the transplanted heart. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 62–68. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-3-62-68.
29. Великий ДА, Гичкун ОЕ, Шевченко АО. МикроРНК: роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний, перспективы клинического применения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (7): 403–409. Velikij D.A., Gichkun O.E., Shevchenko A.O. MikroRNK: rol' v razvitii serdechno-sosudistykh zabollevanij, perspektivy klinicheskogo primeneniya. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2018; 63 (7): 403–409.

Статья поступила в редакцию 30.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 30.06.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-82-89

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТАННОГО ПЕРФУЗИОННОГО РАСТВОРА ДЛЯ НОРМОТЕРМИЧЕСКОЙ EX VIVO ПЕРФУЗИИ ЛЕГКИХ ПО СРАВНЕНИЮ СО STEEN SOLUTION™ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

*С.В. Готье<sup>1, 2</sup>, О.М. Цирульникова<sup>1, 2</sup>, И.В. Паиков<sup>1</sup>, Н.В. Грудинин<sup>1</sup>, Д.О. Олешкевич<sup>1</sup>, Д.М. Бондаренко<sup>1</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>, А.А. Карпов<sup>3</sup>, Н.С. Буненков<sup>4</sup>*

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

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

<sup>3</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

<sup>4</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Заболевания респираторной системы в совокупности с инфекционными осложнениями и наследственными болезнями легких занимают третью позицию в международной статистике смерти населения. На сегодняшний день трансплантация легких является признанным методом лечения терминальных стадий заболеваний легких. Однако небольшое количество трансплантаций обусловлено высокими требованиями, предъявляемыми к состоянию потенциального донора легких и непосредственно к качеству донорского легкого, что приводит к значительному ограничению количества оптимальных доноров. Реабилитация донорских легких до уровня оптимальных значений показателей газообмена может быть достигнута и объективно оценена в ходе проведения аппаратной эстракорпоральной перфузии. Технология EVLP имеет широкое распространение в ведущих трансплантационных центрах Европы и Северной Америки, позволяет значительно расширить пул донорских легких и тем самым обеспечить большее количество пациентов, нуждающихся в трансплантации легких. Продемонстрирована возможность проведения процедуры EVLP с использованием общедоступного перфузиологического оборудования. Оптимизированный протокол в полной мере продемонстрировал свою надежность и эффективность. Разработанный перфузионный раствор не имел статистически значимых отличий по сравнению с раствором Steen Solution™, что в перспективе позволит использовать его в качестве альтернативы для проведения процедуры EVLP.

*Ключевые слова: трансплантация легких, донорство, аппаратная перфузия.*

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

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

# EVALUATION OF THE EFFICACY OF A NOVEL PERFUSION SOLUTION FOR NORMOTHERMIC EX VIVO LUNG PERFUSION COMPARED WITH STEEN SOLUTION™ (ANIMAL EXPERIMENTAL STUDY)

S.V. Gautier<sup>1, 2</sup>, O.M. Tsirulnikova<sup>1, 2</sup>, I.V. Pashkov<sup>1</sup>, N.V. Grudin<sup>1</sup>, D.O. Oleshkevich<sup>1</sup>, D.M. Bondarenko<sup>1</sup>, N.P. Mozheiko<sup>1</sup>, A.A. Karpov<sup>3</sup>, N.S. Bunenkov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>4</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Respiratory diseases, together with infectious complications and hereditary lung diseases, rank third in international mortality statistics. Today, lung transplantation is a recognized method of treating end-stage lung diseases. However, the number of transplant surgeries performed is not much. This is down to the high requirements on the condition of a potential lung donor and directly on the quality of the donor lung. This has significantly limited the number of optimal donors. Rehabilitation of donor lungs to optimal gas exchange indicators can be achieved and objectively assessed in the course of *ex vivo* lung perfusion (EVLP). The EVLP procedure is widespread in leading transplantation centers in Europe and North America. It allows to significantly expand the pool of donor lungs, thereby serving a greater number of patients in need of lung transplantation. The possibility of EVLP procedure using publicly available perfusion equipment was demonstrated. The optimized protocol fully demonstrated its reliability and efficiency. The developed perfusion solution had no statistically significant differences in comparison with the Steen Solution™, which in the future will serve as an alternative for EVLP procedure.

*Keywords: lung transplantation, donation, ex vivo lung perfusion.*

## ВВЕДЕНИЕ

Заболевания респираторной системы в совокупности с инфекционными осложнениями и наследственными болезнями легких занимают третью позицию в международной статистике смерти населения. Прогрессия заболеваний дыхательной системы зачастую ставит врача и пациента перед необходимостью трансплантации легких. Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), кистозный фиброз, интерстициальный легочный фиброз, первичная легочная гипертензия, муковисцидоз являются наиболее частыми показаниями для трансплантации легких, сообщается об эффективности трансплантации при злокачественных новообразованиях [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно выполняется порядка 3973 пересадок легких [1]. В Российской Федерации в период с 2009-го по 2019 г. выполнено 164 трансплантации легких. Небольшое количество трансплантаций легких обусловлено сложностью хирургического вмешательства и в большей степени высокими требованиями, предъявляемыми к состоянию потенциального донора легких и непосредственно к качеству донорского органа, что в итоге приводит к значительному ограничению количества оптимальных доноров. Для обеспечения большей части пациентов, нуждающихся в пересадке легких, рассматривается возможность использова-

ния легких от субоптимальных доноров [4]. Главным требованием к легким от субоптимальных доноров является функциональная способность обеспечивать достаточную оксигенацию крови реципиента [11]. Реабилитация донорских легких до уровня оптимальных значений показателей газообмена может быть достигнута и объективно оценена в ходе проведения аппаратной экстракорпоральной перфузии (от англ. *ex lung perfusion* – EVLP) [10, 12]. Технология EVLP имеет широкое распространение в ведущих трансплантационных центрах Европы и Северной Америки, позволяет значительно расширить пул донорских легких и тем самым обеспечить большее количество пациентов, нуждающихся в трансплантации легких [2, 4]. Первым проспективным нерандомизированным клиническим исследованием эффективности *ex vivo* перфузии легких было исследование HELP, опубликованное в 2011 году. Команда во главе с Cypel (Торонто, Канада) осуществила 4-часовую экстракорпоральную перфузию 23 донорских легких. Донорские легкие в исследованной группе были классифицированы как группа высокого риска с показателями PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub> <300 мм рт. ст. В 20 случаях в ходе проведения EVLP были достигнуты удовлетворительные показатели газообмена и индекса оксигенации, что позволило предпринять трансплантацию реабилитированных легких. При сравнении

с контрольной группой реципиентов, перенесших трансплантацию оптимальных донорских легких в течение того же периода, различий в 30-дневной летальности, продолжительности послеоперационной вентиляции легких, бронхиальных осложнений или времени пребывания в отделении интенсивной терапии выявлено не было [3].

Таким образом, на сегодняшний день EVLP может представлять большой интерес в качестве эффективного способа увеличения количества трансплантаций легких за счет реабилитации субоптимальных донорских органов.

Учитывая необходимость широкого внедрения и активного использования данной методики в рамках отечественной клинической трансплантологии, представляется целесообразным ее изучение и освоение в условиях эксперимента на крупных животных.

**Цель исследования:** оценить возможность применения аппаратной *ex vivo* перфузии донорских легких в эксперименте с использованием рутинных компонентов аппаратной перфузии, искусственной вентиляции и инвазивного мониторинга на биологической модели легких крупного экспериментального животного (барана); оценить эффективность собственного перфузионного раствора в эксперименте *ex vivo* перфузии легких.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали самцов баранов Романовской породы массой 50 кг. Программа экспериментов была одобрена комитетом по биологической безопасности и биоэтике. Опыты проводились с соблюдением правил Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными и директивы 2010/63/EU.

Дизайн исследования подразумевал две серии экспериментов: 1-я группа (контроль) – легкие баранов, получавшие перфузию раствором Steen Solution™ (n = 5), 2-я группа (эксперимент) – легкие баранов, получавшие перфузию раствором собственной разработки (n = 5). Функциональную способность легких оценивали по следующим параметрам: индекс оксигенации, динамический комплаенс, легочное сосудистое сопротивление, гистологические изменения.

Эксперимент включал стадии наркотизации донора, эксплантации легких, статическое гипотермическое хранение 4 часа, инициацию *ex vivo* перфузии легких. Баранов содержали в стандартных загонках с обеспечением воды *ad libitum* в условиях 12-часового цикла дня и ночи.

**Стадия наркотизации донора:** в день проведения эксперимента животное седатировалось в загоне за 60 минут до операции раствором Золетил 100™ в дозировке 15 мг/кг. Во время седации животное доставлялось в операционную, выбривалось операционное поле и точки сосудистых доступов. Животное

позиционировалось на операционном столе в положении лежа на спине, подключали ЭКГ-мониторинг в стандартных отведениях. В асептических условиях выполнялась катетеризация наружной яремной вены двухпросветным центральным катетером 7 Fr и общей сонной артерии катетером 5 Fr с целью инвазивного мониторинга артериального давления (АД). Мониторинг гемодинамики осуществлялся через систему мониторинга Philips™. После постановки сосудистых доступов и обеспечения инвазивного мониторинга АД, центрального венозного давления (ЦВД) внутривенно выполнялась премедикация: лорноксикам 8 мг, метоклопромид 10 мг, хлоропирамин 20 мг, инфузия раствора бикарбоната натрия 4,2% 200 мл со скоростью 200 мл/час, инфузия раствора Стерофундина изотонического со скоростью 100 мл/ч. Вводный наркоз: атропин 1 мг внутривенно, метилпреднизолон 500 мг, Золетил 100™ 10 мг/кг, интубация трахеи интубационной трубкой 8.0. Искусственная вентиляция легких проводилась наркозно-дыхательным аппаратом Draeger Fabius plus в режиме контроля по объему из расчета 8–10 мл/кг, пиковое давление на вдохе не превышало 25 см вод. ст., положительное давление конца выдоха не превышало 5 см вод. ст., частота дыхания составляла 20 д/мин, глубина анестезии регулировалась использованием испарителя для изофлурана, оптимальная наркотизация для проведения операции эксплантации достигалась на отметке испарителя 3 об%. Для поддержания гемодинамики выполнялась инфузия раствора норадреналина 160 нг/кг через шприц-дозатор.

**Процедура изъятия донорских легких.** Хирургический доступ через срединную стернотомию. Перикард вскрывали продольно, тупым способом разделялись аорта и легочная артерия. После введения гепарина натрия в дозировке 300 ЕД/кг накладывали кисетные швы на аорту и легочную артерию. Аорта канюлировалась катетером 7 Fr для сбора донорской крови. Легочная артерия канюлировалась канюлей 20 Fr. Первым этапом осуществлялась заготовка аутокрови животного в гемоконтейнер с цитратным консервантом. Эритроцитарную массу получали путем центрифугирования цельной крови, очищенной от лейкоцитов. По завершении заготовки крови в легочную артерию вводился раствор простагландина E1 («Вазопростан», производство Bayer Schering Pharma, Германия) в дозе 20 мкг. Перед началом консервации проводилось изменение параметров ИВЛ с дыхательным объемом 4–5 мл/кг. С целью декомпрессии малого круга кровообращения ушко левого предсердия широко рассекалось, далее антероградно через легочную артерию вводился холодный 0,9% NaCl 4 °C в объеме 1 литр с добавлением 25 000 ЕД гепарина натрия. Консервация осуществлялась раствором Celsior™ 4 °C в объеме 2 литра. По окончании

перфузии консервирующего раствора приступали к эксплантации легких. Для удобства изъятия донорское сердце удалялось с сохранением максимальной длины легочной артерии для ее подключения к контуру EVLP. В трахею на уровне средней трети вводили интубационную трубку № 8 с последующей фиксацией синтетической тесьмой. Выше места интубации трахеи накладывался аппаратный шов. После интубации трахеи проводили несколько маневров рекрутмента с последующим пережатием интубационной трубки магистральным зажимом с целью сохранения легких в расправленном состоянии. По завершении эксплантации легкие помещались в стерильный пластиковый пакет, заполненный консервирующим раствором Celsiog (производство компании Ganzyme, Франция) в объеме 500 мл. Пакет герметично завязывался и помещался в термоконтейнер для статического холододового хранения на 4 часа.

Сборка перфузионного контура для EVLP включала магистраль размером 1/4, соединенные с кардиотомным резервуаром и мембранным оксигенатором Terumo Corp. CarioxRX15™. К оксигенатору подключался гидроциркуляторный теплообменный элемент, деоксигенирующая смесь в составе N<sub>2</sub> – 86%, CO<sub>2</sub> – 8%, O<sub>2</sub> – 6%, кислородно-воздушная смесь. В системе магистралей между кардиотомным резервуаром и оксигенатором устанавливался роликовый насос аппарата искусственного кровообращения Stockert Sorin 5™. Магистраль после оксигенатора соединялась с канюлей, установленной в легочной

артерии. Измерение давления в системе магистралей проводилось путем установки двух инвазивных датчиков: первый устанавливался после оксигенатора для измерения давления в проксимальном отделе перфузионного контура, второй – непосредственно в канюле легочной артерии для измерения перфузионного давления в легочной артерии. По завершении установленного срока холододовой консервации трансплантат извлекался из стерильного пакета и располагался в пронпозиции в стерильном контейнере, оборудованном углублением с дренажным отверстием, сообщающимся с кардиотомным резервуаром. Перфузия трансплантата осуществлялась через легочную артерию, дренаж перфузата происходил пассивно через легочные вены. Сбор перфузата происходил самотеком в кардиотомный резервуар.

Схема контура EVLP представлена на рис. 1.

В контрольной группе в качестве перфузионного раствора использовался Steen Solution™ с добавлением эритроцитарной массы, в исследуемой группе – собственный раствор с добавлением альбумина и эритроцитарной массы в заданных пропорциях. Объем перфузата в обеих группах составлял 2 литра. Эритроцитарная масса заготавливалась путем центрифугирования со скоростью 3500 оборотов в минуту в течение 15 минут цельной делейкоцитированной крови. К перфузату добавлялись: цефепим 1000 мг, метилпреднизолон 1000 мг, инсулин 4 ед, глюкоза 40% 5 мл. Целевой уровень гемоглобина поддержи-

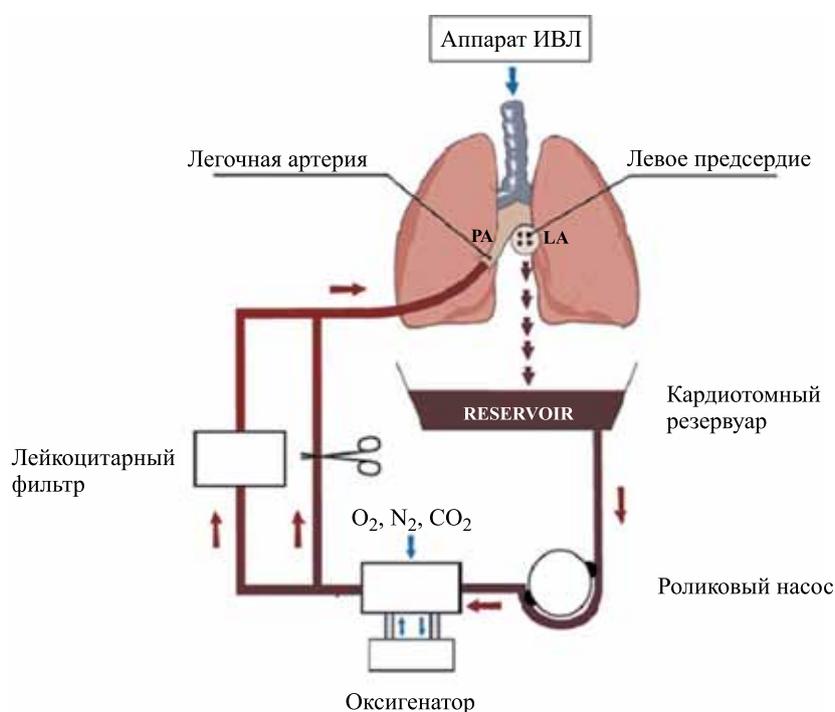


Рис. 1. Схема открытого контура *ex vivo* перфузии легких (EVLP)

Fig. 1. *Ex vivo* lung perfusion (EVLP) device scheme

вался на уровне 30 г/л, показатель гематокрита составлял 10–15% в обеих группах.

Максимальная продолжительность проведения перфузии не превышала 180 минут.

*Инициация EVLP.* Исходная температура перфузата составляла 15 °С, целевое давление в легочной артерии – 4–10 мм рт. ст. Скорость перфузии регулировалась исходя из значений давления в легочной артерии, в начале перфузии составляла 150–200 мл/мин. Поток газо-воздушной смеси, где  $FiO_2 < 0,5$  устанавливался, соответствуя целевым минимальным значениям  $pO_2 > 100$  мм рт. ст. Для достижения газового гомеостаза, где  $pCO_2$  40–50 мм рт. ст., требовалось использование деоксигенирующей смеси, скорость потока соответствовала 1 : 1 скорости перфузии. Контроль ионного и газового состава перфузионного раствора проводился на газоанализаторе ABL 800™. При стабилизации всех параметров в течение 20 минут проводилось постепенное увеличение скорости перфузии до 1200 мл/мин, согревание перфузата до 32 °С. По достижении температуры в 34 °С начинали искусственную вентиляцию легких (ИВЛ). Параметры ИВЛ носили защитный характер и складывались из дыхательного объема от 6 до 8 мл/кг, положительного давления конца выдоха (ПДКВ) 5 см вод. ст., частоты дыхательных движений (ЧДД) 16/мин. Основной целью протективной ИВЛ являлась оптимизация объема и давления в дыхательных путях, при этом необходимо избегать повреждения ателектазированных участков альвеол. Маневр рекрутмента проводился не чаще одного раза в 10 минут для предотвращения вентилятор-ассоциированного повреждения трансплантата. Фракция кислорода на вдохе не превышала 50% ( $FiO_2 < 0,5$ ). Контроль газового состава перфузата осуществлялся с заданной частотой. По достижении целевой температуры 37 °С в течение 20 минут объемная скорость перфузии увеличивалась до 100% от сердечного выброса и

составляла 1700–1900 мл/мин. Продолжительность перфузии не превышала 180 минут.

### Оценка трансплантата после процедуры EVLP

После согревания трансплантата до 37 °С и стабилизации параметров газового и ионного состава перфузата фракция кислорода на вдохе снижалась до 21% ( $FiO_2 = 0,21$ ), проводилась клиническая, инструментальная и лабораторная оценка газового состава. Пальпаторно и визуально хирургом оценивалась однородность паренхимы и отсутствие инфильтративных изменений легких. Проводилось рентгенографическое исследование для оценки остаточных ателектазов и явлений отека паренхимы легких, бронхоскопия с целью санации трахеобронхиального дерева и выявления косвенных признаков отека легких. Каждые 15 минут осуществлялась оценка газового и ионного состава перфузата. По окончании процедуры EVLP производили изъятие биоптатов для морфологического исследования.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

В обеих группах среднее значение  $PaO_2/FiO_2$  на момент эксплантации составило  $220 \pm 25$  мм рт. ст.

Значения  $PaO_2$  были сходными в обеих группах до момента эксплантации донорских легких (контроль:  $220 \pm 20,25$  мм рт. ст. против эксперимент:  $230 \pm 10,20$  мм рт. ст.,  $p = 0,606$ ). Также не было статистически значимых различий показателей  $PaO_2$  и после перфузии легких  $350 \pm 20,53$  мм рт. ст.,  $p = 0,348$ ). Обе группы показали значительное улучшение функции легких после процедуры EVLP (рис. 2).

Обе группы продемонстрировали значительное улучшение динамического комплаенса при проведении перфузии по сравнению с исходными показателями ( $p < 0,0001$ ). Динамика исследуемого показателя в

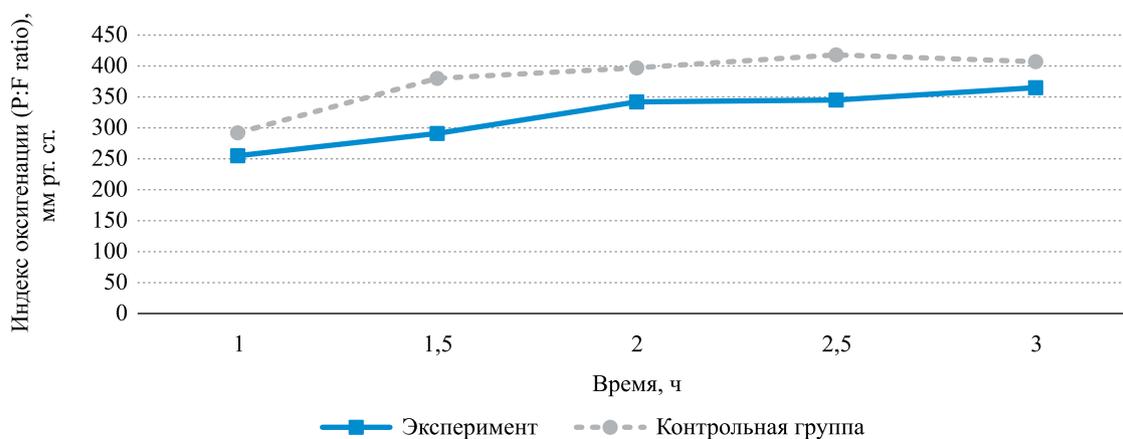


Рис. 2. Индекс оксигенации

Fig. 2. Oxygenation index

группах сравнения была сопоставима. Однако через три часа итоговый комплаенс в экспериментальной группе имел тенденцию к большим значениям, чем в контрольной группе: эксперимент – 38,8, контрольная – 29,3,  $p = 0,22$  (рис. 3).

По результатам перфузии обе группы продемонстрировали снижение легочного сосудистого сопротивления (ЛСС). При этом статистически значимого различия между экспериментальной и контрольной группами не обнаружено ( $p = 0,39$ ) (рис. 4).

### Данные морфологического исследования

В обеих группах гистологическое исследование не показало достоверных различий и структурных повреждений легочной паренхимы (рис. 5, 6).

В обеих группах паренхима легкого имела гистологические признаки функционирующей ткани без патологических изменений. В большинстве срезов отмечались хорошо раздутые альвеолы. Микроате-

лектатические участки были распределены неоднородно в обеих группах и встречались только на отдельных участках.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантация легких на протяжении многих лет зарекомендовала себя как радикальный и эффективный метод лечения пациентов с терминальной стадией респираторных заболеваний [13, 14]. Несмотря на развитие технологии и совершенствование протоколов иммуносупрессивной терапии, долгосрочная выживаемость реципиентов легких остается самой низкой среди всех трансплантаций солидных органов [12, 15]. Причиной тому является высокая восприимчивость трансплантированных легких к воздействию как внешних, так и внутренних негативных факторов [9]. Это же обстоятельство актуально и для легких потенциального донора на этапе кондиционирования. Жесткие режимы вент-

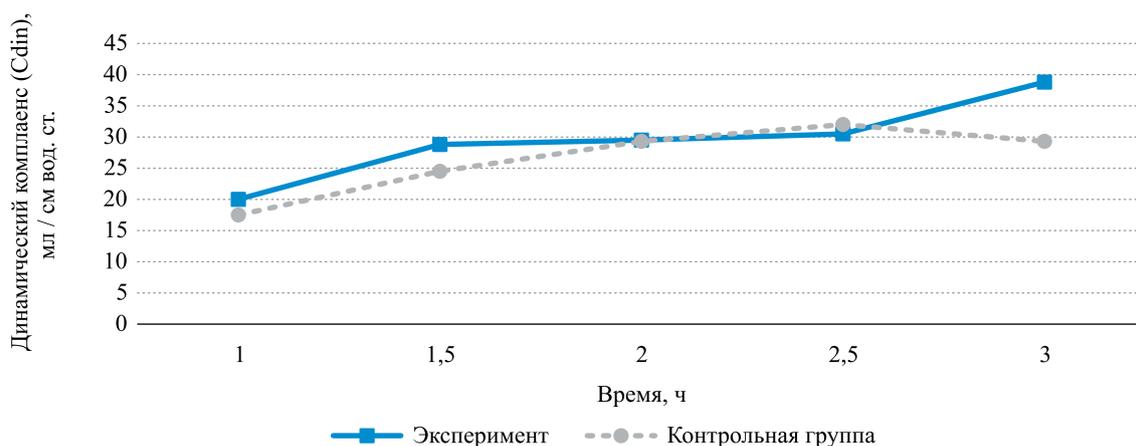


Рис. 3. Динамический комплаенс

Fig. 3. Dynamic compliance

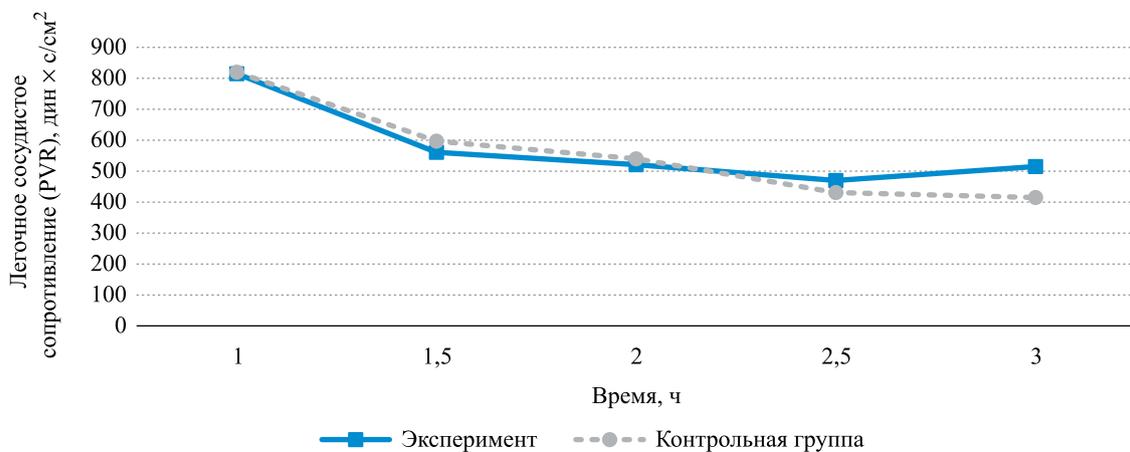


Рис. 4. Динамика изменения легочного сосудистого сопротивления

Fig. 4. Pulmonary vascular resistance dynamic

ляции, контаминация больничной флорой, последствия неэффективной гемодинамики, агрессивная кардиореспираторная реанимация и прочие обстоятельства приводят к повреждению легких донора, в результате чего отвергается около 70% потенциальных легочных трансплантатов ввиду их непригодности, и всего лишь 20–30% расцениваются как пригодные к трансплантации [4, 8, 16]. Появление процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo* открыло новые горизонты в развитии трансплантации легких во всем мире [17, 18, 23]. В 2006 году исследовательская команда Stig Steen et al. (Lund University Hospital, Sweden) доложила первые результаты успешной трансплантации одного легкого после процедуры EVLP. В 2009 году Cypel et al. (Toronto, Canada) представили собственный протокол, впоследствии ставший самым физиологичным

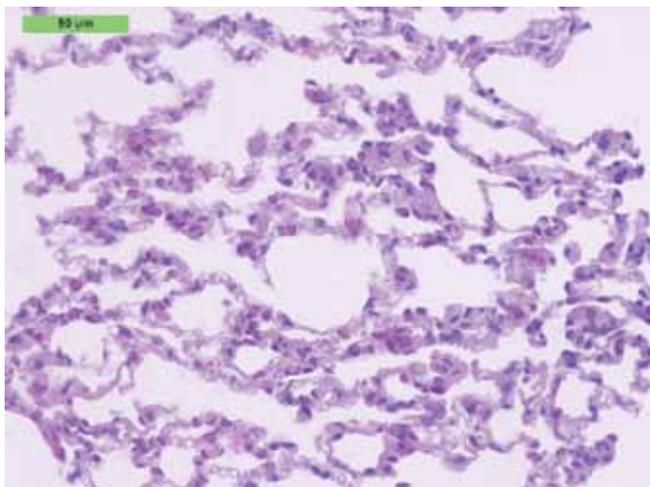


Рис. 5. Эксперимент

Fig. 5. Experiment

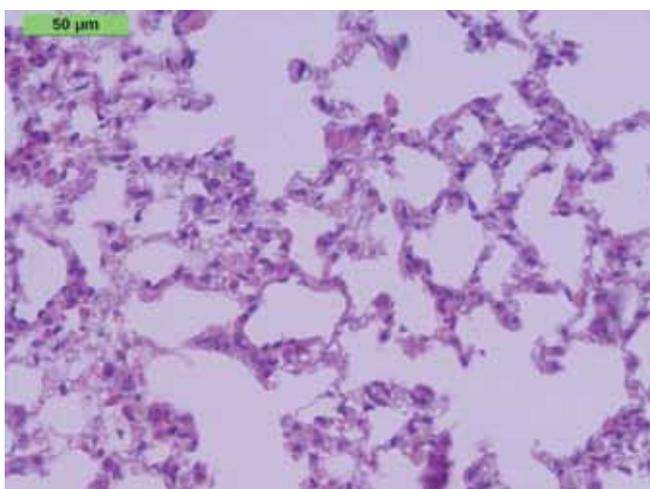


Рис. 6. Контроль

Fig. 6. Control group

и успешным, позволив проведение длительной перфузии более 12 часов [5, 15, 22]. Процедура EVLP позволила в несколько раз увеличить пул донорских легких, тем самым увеличив количество трансплантаций [4, 17].

Было разработано несколько запатентованных систем перфузии, включая систему перфузии XVIVO (XVIVO Perfusion AB, Гетеборг, Швеция), систему Vivoline LS1 (Vivoline Medical, Лунд, Швеция) и систему ухода за органами легких (OCS) (Transmedics, Andover, Массачусеттс, США) [6, 17, 18]. В системе перфузии XVIVO используется бесклеточный раствор Steen (Vitrolife, Гетеборг, Швеция), а в системе Vivoline используется смесь раствора Steen и эритроцитарная масса. В OCS Lung используется комбинация раствора OCS Lung Solution и эритроцитарная взвесь [7, 14, 18]. Steen Solution – это раствор, содержащий декстран и альбумин, имитирующий концентрации внеклеточных электролитов [8, 14, 15]. OCS Lung Solution – это аналогичный буферный раствор, содержащий декстран вместо альбумина [5, 8, 20, 21].

В нашем исследовании за основу был взят протокол перфузии, разработанный Steen et al. в Швеции для оценки и восстановления легких. В исследовании удалось продемонстрировать выполнимость процедуры и воспроизводимость результатов EVLP в эксперименте на модели барана с использованием рутинных технических компонентов, имеющих широкое распространение в специализированных лечебных учреждениях. Условия эксперимента и адаптированный протокол перфузии были максимально приближены к клинической практике. Оценка эффективности собственного раствора для перфузии осуществлена в рамках стандартного протокола *ex vivo* перфузии, предпринятого в обеих группах. Перфузионный раствор Steen Solution™, считающийся «золотым стандартом» в процедуре EVLP во всем мире, использовался в качестве контроля. Результаты, полученные в обеих группах, демонстрируют отсутствие статистически достоверных различий. Легкие баранов в группах сравнения были схожи по функциональным и гистологическим характеристикам, и поэтому различия, обнаруженные после окончания перфузии, можно отнести к качеству сохранности легких. При гистологическом исследовании использовалась оценка, основанная на полуколичественном анализе изменений, наблюдаемых при обычной световой микроскопии. В группах сравнения отмечалась одинаковая степень повреждения тканей после холодной ишемии и по окончании перфузии, что может говорить об эффективности разработанного раствора, сопоставимой с эффективностью Steen Solution™.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментального исследования продемонстрировали возможность проведения процедуры EVLP с использованием общедоступного перфузиологического оборудования. Оптимизированный протокол в полной мере продемонстрировал свою надежность и эффективность. Разработанный перфузионный раствор не имел статистически значимых отличий по сравнению с раствором Steen Solution™, что в перспективе позволит использовать его в качестве альтернативы для проведения процедуры EVLP.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Yusen RD et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart–Lung Transplant Report – 2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2016; 35 (10): 1170–1184.
2. Andreasson ASI, Dark JH, Fisher AJ. Ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation-State of the art. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2014; 46 (5): 779–788.
3. Briot R et al. Ex vivo lung graft perfusion. 2016.
4. Chakos A et al. Ex-vivo lung perfusion versus standard protocol lung transplantation-mid-term survival and meta-analysis. *Annals of Cardiothoracic Surgery*. 2020; 9 (1): 1–9.
5. Pan X et al. Application of ex vivo lung perfusion (EVLP) in lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*. 2018; 10 (7): 4637–4642.
6. Possoz J, Neyrinck A, Raemdonck D. Van Ex vivo lung perfusion prior to transplantation: An overview of current clinical practice worldwide. *Journal of Thoracic Disease*. 2019; 11 (4): 1635–1650.
7. Rosso L et al. Lung transplantation, ex vivo reconditioning and regeneration: State of the art and perspectives. *Journal of Thoracic Disease*. 2018; 10 (Suppl 20): S2423–S2430.
8. Slama A et al. Standard donor lung procurement with normothermic ex vivo lung perfusion: A prospective randomized clinical trial. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2017; 36 (7): 744–753.
9. Yeung JC, Keshavjee S. Normothermic Ex Vivo Lung Perfusion in Clinical Lung Transplantation. *Current Transplantation Reports*. 2015; 2 (4): 324–328.
10. Pan X et al. Application of ex vivo lung perfusion (EVLP) in lung transplantation. *Journal of Thoracic Disease*. 2018; 10 (7): 4637–4642.
11. Van Raemdonck D et al. Ex-vivo lung perfusion. *Transplant International*. 2015; 28 (6): 643–656.
12. Jiao G. Evolving Trend of EVLP: Advancements and Emerging Pathways. *SN Comprehensive Clinical Medicine*. 2019; 1 (4): 287–303.
13. Steinmeyer J et al. Cellular and acellular ex vivo lung perfusion preserve functional lung ultrastructure in a large animal model: A stereological study. *Respiratory Research*. 2018; 19 (1): 1–15.
14. Abdalla LG et al. Ex vivo lung perfusion in Brazil. *Journal Brasileiro de Pneumologia*. 2016; 42 (2): 95–98.
15. Becker S et al. Evaluating acellular versus cellular perfusate composition during prolonged ex vivo lung perfusion after initial cold ischaemia for 24 hours. *Transplant International*. 2016; 29 (1): 88–97.
16. Broberg E et al. A new way of monitoring mechanical ventilation by measurement of particle flow from the airways using Pexa method in vivo and during ex vivo lung perfusion in DCD lung transplantation. *Intensive Care Medicine Experimental*. 2018; 6 (1): 18.
17. Liersch-Nordqvist A et al. The impact of alteplase on pulmonary graft function in donation after circulatory death – An experimental study. *Annals of Medicine and Surgery*. 2017; 22: 1–6.
18. Looor G et al. Prolonged EVLP Using OCS Lung: Cellular and Acellular Perfusates. *Transplantation*. 2017; 101 (10): 2303–2311.
19. Martens A et al. Steroids can reduce warm ischemic reperfusion injury in a porcine donation after circulatory death model with ex vivo lung perfusion evaluation. *Transplant International*. 2016; 29 (11): 1237–1246.
20. Schiavon M et al. Ex-vivo recruitment and x-ray assessment of donor lungs in a challenging retrieval from a donor supported by lvad using the portable normothermic perfusion system: A case report. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2017; 12 (1): 1–5.
21. Schiavon M et al. Extended criteria donor lung reconditioning with the organ care system lung: a single institution experience. *Transplant International*. 2019; 32 (2): 131–140.
22. Stone ML et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate lung ischemia-reperfusion injury and enhance reconditioning of donor lungs after circulatory death. *Respiratory Research*. 2017; 18 (1): 1–12.
23. Terragni PP et al. Ventilatory management during normothermic ex vivo lung perfusion: Effects on clinical outcomes. *Transplantation*. 2016; 100 (5): 1128–1135.

*Статья поступила в редакцию 30.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 30.06.2021*

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-90-100

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХОНДРОГЕНЕЗА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ НОСИТЕЛЯХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, А.М. Григорьев<sup>1</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, А.Д. Кириллова<sup>1</sup>, А.М. Суббот<sup>2</sup>, А.В. Цветкова<sup>3</sup>,  
Е.А. Немец<sup>1</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

По способу получения коллагеновые носители подразделяются на материалы, полученные на основе компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), в частности, коллагенсодержащие гидрогели и децеллюляризованные ткани. **Цель работы:** сравнить *in vitro* способность биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля (БМКГ) и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного суставного хряща свиньи (ДХ) поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). **Материалы и методы.** Для децеллюляризации хряща использовали обработку поверхностно-активными веществами (додецилсульфат натрия, Тритон X-100) с последующей экспозицией в ДНКазе. Оценку метаболической активности МСК ЖТч проводили методом окрашивания PrestoBlue™ (Invitrogen, США). Морфологическое исследование клеточно-инженерных конструкций (КИК), формирующихся при культивировании МСК ЖТч в присутствии матриксов, проводили с использованием методов гистологического окрашивания и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с лантаноидным контрастированием. **Результаты.** Количество клеток на поверхности как БМКГ, так и ДХ увеличивалось в течение 14 дней. Митохондриальная активность клеток на 3, 10 и 14-е сутки при культивировании на ДХ была выше в 1,7; 1,7 и 1,3 раза по сравнению с БМКГ соответственно. На 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде МСК ЖТч образовали клеточные пласты на поверхности ДХ и на поверхности БМКГ. Цитоплазма клеток включала многочисленные гранулы, по окраске напоминающие сам матрикс. На поверхности матрикса ДХ клетки распределялись более равномерно, тогда как в случае БМКГ адгезия и пролиферация клеток наблюдались только на отдельных участках. При этом нарабатанный клетками ВКМ содержал коллаген и гликозаминогликаны (ГАГ). **Заключение.** Способность полученного по разработанному протоколу ДХ образовывать с МСК ЖТч КИК с равномерным распределением клеток и наработкой ими специфического ВКМ, содержащего коллаген и ГАГ, свидетельствует о потенциале ДХ в регенерации поврежденного хряща. Хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч наблюдали как при культивировании с БМКГ, так и с ДХ. При создании тканевого эквивалента хряща *in vitro* следует учитывать преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с БМКГ.

*Ключевые слова:* хрящевая ткань, хондрогенная дифференцировка, мезенхимальные стромальные клетки, децеллюляризованный матрикс, тканевая инженерия.

**Для корреспонденции:** Басок Юлия Борисовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.  
Тел. (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

**Corresponding author:** Yuliya Basok. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.  
Phone: (916) 637-88-63. E-mail: bjb2005@mail.ru

# COMPARATIVE STUDY OF CHONDROGENESIS OF HUMAN ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS WHEN CULTURED IN COLLAGEN-CONTAINING MEDIA UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Y.B. Basok<sup>1</sup>, A.M. Grigoriev<sup>1</sup>, L.A. Kirsanova<sup>1</sup>, A.D. Kirillova<sup>1</sup>, A.M. Subbot<sup>2</sup>,  
A.V. Tsvetkova<sup>3</sup>, E.A. Nemets<sup>1</sup>, V.I. Sevastianov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

In terms of method of production, collagen carriers are subdivided into materials obtained on the basis of extracellular matrix (ECM) components, particularly collagen-containing hydrogels and decellularized tissue. **Objective:** to compare *in vitro* the ability of biopolymer microheterogeneous collagen-containing hydrogel (BMCH) and tissue-specific matrix from decellularized porcine articular cartilage (DPAC) to support adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs). **Materials and methods.** For cartilage decellularization, we carried out treatment with surfactants (sodium dodecyl sulfate, Triton X-100) followed by exposure in DNAase. The metabolic activity of hAMSCs was assessed by PrestoBlue™ (Invitrogen, USA) staining. The morphological study of cell-engineered constructs (CECs) formed by culturing hAMSCs in the presence of matrices was performed using histological staining and scanning electron microscopy (SEM) with lanthanide contrasting. **Results.** The number of cells on the surface of both BMCH and DPAC increased within 14 days. Mitochondrial activity of the cells was 1.7, 1.7, and 1.3 times higher on days 3, 10, and 14 when cultured on DPAC compared to BMCH, respectively. On day 14 of cultivation in the chondrogenic culture medium, hAMSCs formed cell layers on the DPAC surface and on the BMCH surface. Cytoplasm of the cells included numerous granules, which, when stained, resembled the matrix itself. On the DPAC matrix surface, cells were more evenly distributed, whereas in the case of BMCH, cell adhesion and proliferation were observed only in certain areas. The ECM produced by the cells contained collagen and glycosaminoglycans (GAGs). **Conclusion.** The ability of DPAC obtained according to the developed protocol to form CECs with hAMSCs with uniform distribution of cells and their production of specific collagen- and GAG-containing ECM suggests that DPAC is effective in regeneration of damaged cartilage. Chondrogenic differentiation of hAMSCs was observed both when cultured with BMCH and with DPAC. When creating a tissue equivalent of cartilage *in vitro*, the advantage of using tissue-specific matrix over BMCH should be considered.

*Keywords:* cartilage tissue, chondrogenic differentiation, mesenchymal stem cells, decellularized matrix, tissue engineering.

## ВВЕДЕНИЕ

Суставной хрящ представляет собой аваскулярную плотную ткань с ограниченной способностью к регенерации, что указывает на целесообразность разработки терапевтических подходов к его восстановлению с использованием технологий клеточной терапии и тканевой инженерии [1].

«Золотым стандартом» в клеточной терапии заболеваний суставов на сегодняшний день является трансплантация аутологичных хондроцитов. Однако этот метод имеет ряд недостатков, к которым в первую очередь относят травматичность биопсии и высокую вероятность дедифференцировки хондроцитов при экспансии [2]. В качестве альтернативы аутологичным хондроцитам рассматриваются мезенхимальные стромальные клетки (МСК). По своей природе эти клетки обладают способностью к направленной

дифференцировке в различные мезенхимные ткани, включая хрящевую, и иммуномодулирующими свойствами. Отметим, что благодаря высокому хондрогенному потенциалу, простоте выделения и минимальной травматичности жировую ткань человека (ЖТч) относят к перспективным источникам МСК для тканевой инженерии хряща [3, 4].

Для повышения эффективности клеточной терапии пораженных суставов МСК вводят во внутрисуставную сумку на биodeградируемых носителях – миметиках внеклеточного матрикса (ВКМ), способствующих поддержанию жизнеспособности и хондрогенной дифференцировки МСК [5].

Коллаген, основной структурный белок естественного ВКМ хряща, используют в большинстве биомедицинских клеточных продуктов для лечения дефектов хрящевой ткани [6]. Из отечественных раз-

работок можно выделить биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ) из линейного ряда композиции имплантируемого гетерогенного геля Сферо®ГЕЛЬ (АО «Биомир сервис», Россия). Была доказана эффективность использования БМКГ в качестве матрикса в биомедицинских клеточных продуктах для регенерации поврежденного суставного хряща, печени и поджелудочной железы [7, 8]. Большой, с нашей точки зрения, интерес для тканевой инженерии хряща представляют децеллюляризованные носители – биологические миметики ВКМ, получаемые путем удаления клеток и их фрагментов из ткани с максимальным сохранением структуры и состава естественного ВКМ [9, 10]. Показано, что децеллюляризованный хрящ (ДХ) не только поддерживает адгезию и пролиферацию клеток, но и стимулирует дифференцировку МСК в хондроциты [11–13]. Сравнительная оценка способностей полученных БМКГ и ДХ поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК *in vitro* позволит выбрать матрикс, имеющий наибольший потенциал для применения в регенеративной медицине для восстановления поврежденной хрящевой ткани, что явилось целью данной работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Гетерогенный гель Сферо®ГЕЛЬ

Для создания клеточно-инженерной конструкции (КИК) была выбрана композиция гетерогенного имплантируемого геля из линейного ряда Сферо®ГЕЛЬ (АО «Биомир сервис», Россия) со следующими характеристиками:

- средний размер микрочастиц –  $145,79 \pm 0,09$  мкм;
- модуль упругости –  $1170 \pm 12$  Па;
- модуль вязкости –  $62,9 \pm 7,9$  Па;
- набухаемость – не ниже  $86,6 \pm 3,0$  мас. %.

### Получение микрочастиц суставного хряща

Свиные бедренные и коленные суставы были получены на бойне (ООО «АПК «ПРОМАГРО», г. Старый Оскол) после забоя здоровых животных (вес около 120 кг) в соответствии с Европейской директивой 64/433/ЕЕС. После транспортировки в охлажденном виде (+4 °С) хрящ удаляли с суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером  $0,5 \times 0,5 \times 0,1$  см. Микронизацию полученных фрагментов проводили на криомельнице StyoMill (Retz GmbH, Германия). Фракцию микродисперсных частиц в диапазоне 100–250 мкм выделяли просеиванием помола через набор сит с соответствующим размером пор.

### Режим децеллюляризации

Децеллюляризацию осуществляли обработкой микрочастиц в трех сменах фосфатного буфера (138 мМ NaCl, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфат натрия и повышающуюся концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) при комнатной температуре и периодическом перемешивании. Далее образцы помещали в буферный раствор (10 мМ Трис-HCl, 2,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМоль  $\text{CaCl}_2$ ; pH = 7,6), содержащий 50 Е/мл ДНКазы I типа (New England Biolabs Inc., США) на 48 часов при температуре 37 °С. Отмывку матрикса осуществляли в бидистиллированной воде. Для стерилизации матрикса использовали гамма-облучение в дозе 1,5 Мрад.

### Выделение клеток

Источником МСК ЖТч была подкожная жировая клетчатка здорового донора, взятая у него при информированном добровольном согласии. Образец подкожной жировой ткани объемом 2–3 г измельчали скальпелем, подвергали двукратной промывке холодным (+4...+6 °С) раствором Хенкса, а затем инкубировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа (Gibco, США) при 37 °С в течение 20 мин.

Все клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в полной ростовой среде состава DMEM/F12 (1 : 1) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамина (Gibco, США) и культивировали до формирования монослоя, меняя среду 2 раза в неделю. Перевод клеток в суспензию осуществляли путем обработки раствором Версена при 37 °С в течение 1 мин с последующим добавлением диссоциирующего агента TrypLe™ (Invitrogen, США). Для экспериментов брали клетки 3-го пассажа.

### Дифференцировка клеток

Для подтверждения наличия в культуре мультипотентных клеток были проведены эксперименты по ее разнонаправленной дифференцировке. Хондрогенную дифференцировку клеток проводили в микросферах, полученных путем осаждения  $2 \times 10^5$  клеток в 96-луночных планшетах с коническим дном. Через 2 недели культивирования в хондрогенной культуральной среде (DMEM HG с добавкой GlutaMAX™ (Gibco, США), 10% ITS+ (Corning, США), 1% пируват натрия (Gibco, США), 0,25% аскорбат-2-фосфата (Sigma-Aldrich, США), 0,0001% дексаметазона (Sigma-Aldrich, США), 0,002% TGF-β1 (PeproTech, США) и 1% культурального антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Препараты фиксировали в

забуференном растворе 10% формалина, заливали в парафин. Срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали альциановым синим. Адипогенную дифференцировку изучаемых культур проводили в среде DMEM/F12, содержащей 10% лошадиной сыворотки, 0,5 мМ изобутилметилксантина и 60 мМ индометацина в течение 7 дней, затем препараты фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали масляным красным. Дифференцировку полученных культур в костную ткань проводили в бессывороточной среде DMEM/F12 с добавлением 0,2 мМ аскорбиновой кислоты, 10 мМ б-глицерофосфата кальция, 10-7 М дексаметазона (Sigma), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина сульфата и 2 мМ L-глутамина (Gibco). Клетки культивировали в течение 3 недель, меняя среду 2 раза в неделю. По окончании препараты фиксировали в 4% растворе формальдегида и окрашивали ализариновым красным.

В предыдущих исследованиях [14] было показано, что культуры МСК из всех источников обладали сходным фенотипом CD29, CD34, CD44, CD49b, CD45, CD73, CD90, HLA-DR, что свидетельствует о высоком содержании мультипотентных клеток мезенхимального происхождения. Большинство из этих макромолекул включены в список маркеров, рекомендуемых Международным обществом клеточной терапии для характеристики культур МСК [15].

### Метод определения метаболической активности

Определение метаболической активности клеток проводили с помощью теста с реактивом PrestoBlue™ (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Метод основан на дегидрогеназной активности клеток, превращающих резазурин в резорурфин, который возможно определить в том числе и спектрофотометрически. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Tecan Spark10 (Tecan, Австрия). При исследовании метаболической активности на 5 мг децеллюляризованного хряща (ДХ) вносили  $2 \times 10^4$  МСК ЖТ. При исследовании метаболической активности на 100 мкл БМКГ вносили  $2 \times 10^4$  МСК ЖТ. Данные измерения поглощения использовали для расчета коэффициента метаболической активности (К) по формуле:

$$K = \frac{117,216 \times Abs_{570} - 80,586 \times Abs_{600}}{155,677 \times Abs_{600} - 14,652 \times Abs_{570}} \times 100\%$$

где  $Abs_{570}$  – поглощение при длине волны 570 нм;  $Abs_{600}$  – поглощение при длине волны 600 нм.

### Создание клеточно-инженерных конструкций

КИК состояла из  $1 \times 10^6$  клеток и 5 мг децеллюляризованного хряща (ДХ) или 0,25 мл БМКГ. Матрицы заселяли клетками путем вращения в пробирках с культуральной средой на платформе шейкера типа «балерина» Multi Bio 3D (Biosan, Латвия). Первые 5 суток КИК культивировали в ростовой культуральной среде. Далее культуральную среду заменяли на дифференцировочную хондрогенную среду. Замену среды осуществляли на каждый третий день. Анализ образцов на 14-е и 42-е сутки культивирования в дифференцировочной культуральной среде проводили с использованием гистологических методов окрашивания.

### Метод сканирующей электронной микроскопии

Морфологию поверхности и ближайшего подповерхностного слоя образцов изучали совместно с сотрудниками лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ «НИИ глазных болезней» методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием лантаноидного контрастирования [16].

Пробоподготовка сильно обводненных образцов для СЭМ затруднена, т. к. требует их обезвоживания, напыления токопроводящего слоя, а это приводит не только к сильным структурным изменениям таких объектов, но и затрудняет дифференциацию клеточных элементов от подложки. Метод лантаноидного контрастирования позволяет наблюдать необезвоженные биологические образцы в режиме низкого вакуума после выдержки их в насыщенном растворе редкоземельного металла. При этом максимально сохраняется нативное состояние исследуемого объекта, а изображение, полученное в режиме детекции обратно рассеянных электронов, несет расширенную информацию о внутриклеточных структурах [16].

Протокол обработки включал первичную промывку, выдержку 45 мин в контрастирующем растворе BioREE (ООО «Глаукон», Россия) и финальную промывку дистиллированной водой. После контрастирования с поверхности образца удаляли избыток влаги воздушной кистью и размещали его на предметном столике микроскопа EVO LS10 (Zeiss, Германия). Наблюдения проводились в режиме низкого вакуума (EP, 70 Па), при ускоряющем напряжении 20 кВ.

## Методы гистологического анализа образцов

Для гистологических исследований образцы фиксировали в забуференном 10% растворе формалина, промывали в проточной воде и обезвоживали в спиртах восходящих концентраций (в двух порциях 70, 80, 96% этанола), выдерживали в смеси этанола и хлороформа, в хлороформе и заливали в парафин. Срезы толщиной 4–5 мкм, полученные с помощью микротомы Leica RM3255, депарафинировали, регидратировали и окрашивали, следуя стандартным методикам, гематоксилином и эозином, альциановым синим для выявления гликозаминогликанов (ГАГ) и на соединительную ткань по методу Массона по стандартным методикам.

Анализ и фотосъемку полученных препаратов проводили, используя микроскоп Nikon Eclipse, оснащенный цифровой фотокамерой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способность МСК ЖТч дифференцироваться в хондрогенном, адипогенном, остеогенном направлениях показана на рис. 1.

Из кривых роста видно, что количество клеток на поверхности как БМКГ, так и ДХ увеличивалось в течение 14 дней (рис. 2). В первые сутки измере-

ния значения оптической плотности в образцах не различались, что свидетельствует о схожей численности клеточной популяции на поверхности БМКГ и ДХ в начале эксперимента, а также, вероятно, об одинаковой адгезионной способности носителей для МСК в первоначально внесенном в КИК количестве. Однако значимая разница в объеме клеточной популяции начиная с третьих суток позволила выявить влияние носителей на пролиферативную способность культуры МСК ЖТч. Митохондриальная активность клеток, обеспечивающая превращение синего резазурина в розовый резорурфин, на 3, 10 и 14-е сутки при культивировании МСК на ДХ была выше в 1,7; 1,7 и 1,3 раза по сравнению с БМКГ. Форма кривых роста схожа, однако в случае БМКГ к 14-м суткам мы наблюдали тенденцию приближения к стационарной фазе, тогда как в случае БМКГ на 14-е сутки признаков замедления роста МСК ЖТч не визуализировали. По всей видимости, замедление клеточного роста связано с ограниченностью площади носителя для колонизации, так как оптимальное количество факторов роста и питательных веществ поддерживали, регулярно заменяя культуральную среду. Отметим, что полученные результаты позволяют оценить количество МСК ЖТч, обладающих метаболической активностью, присутствие которых

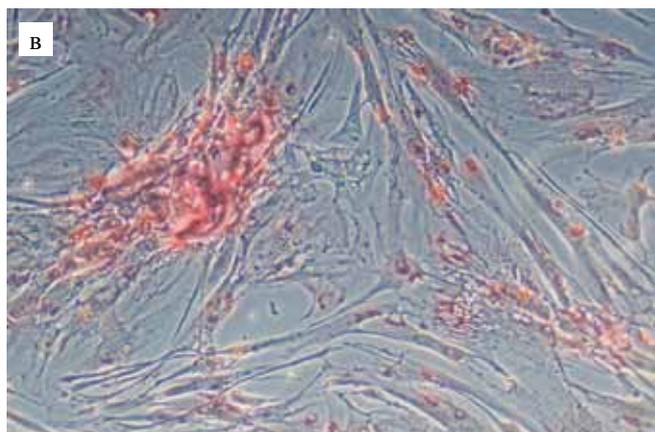
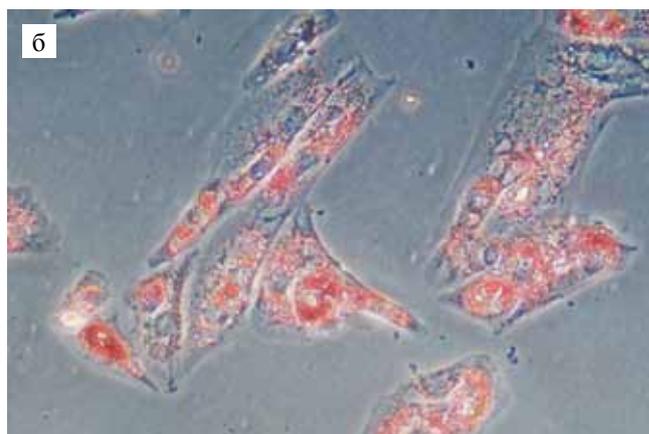
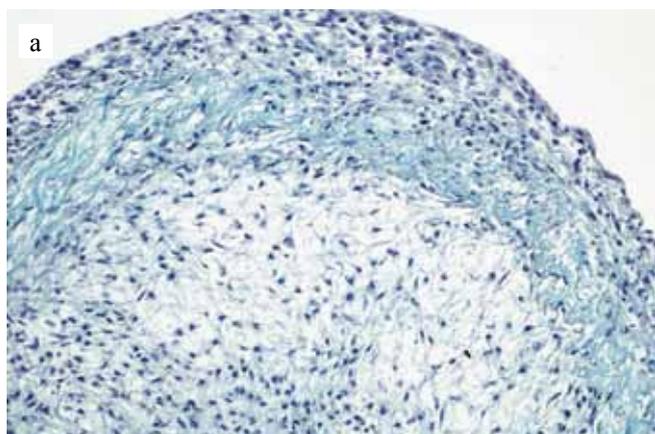


Рис. 1. Дифференцировка МСК ЖТ в хондрогенном (а, окрашивание альциановым синим), адипогенном (б, окрашивание масляным красным) и остеогенном (в, окрашивание ализариновым красным) направлениях.  $\times 200$

Fig. 1. Differentiation of hAMSCs in chondrogenic (a, alcian blue stain), adipogenic (б, Oil Red O stain) and osteogenic (в, Alizarin Red stain).  $\times 200$

в образцах важно для функционирования клеток в составе КИК, так как в восстановлении резазурина до резорфина принимают участие митохондриальные дегидрогеназы, цитохромы и дегидрогеназы, находящиеся в цитоплазме [17]. Разница в количестве клеток при наблюдении в течение 14 суток (рис. 2) свидетельствует о большей способности ДХ стимулировать рост МСК ЖТч по сравнению с БМКГ. Заметим, что для полной сравнительной оценки *in vitro*

перспективы использования клеточных носителей в тканевой инженерии хряща необходимо исследовать их способность к поддержанию хондрогенной дифференцировки МСК ЖТч.

На рис. 3 представлены результаты СЭМ морфологии КИК, состоящих из МСК ЖТч и ДХ или БМКГ после 14 суток культивирования.

На 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде МСК ЖТч образовывались

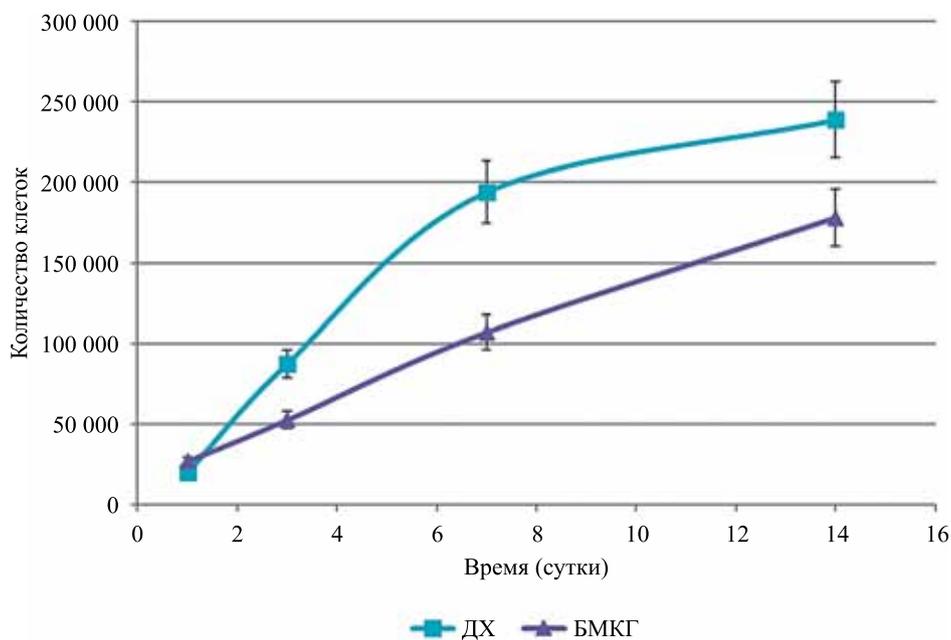


Рис. 2. Кривые роста МСК ЖТч при культивировании в присутствии ДХ и БМКГ

Fig. 2. Growth curve of hAMSCs when cultured in DPAC and BMCH

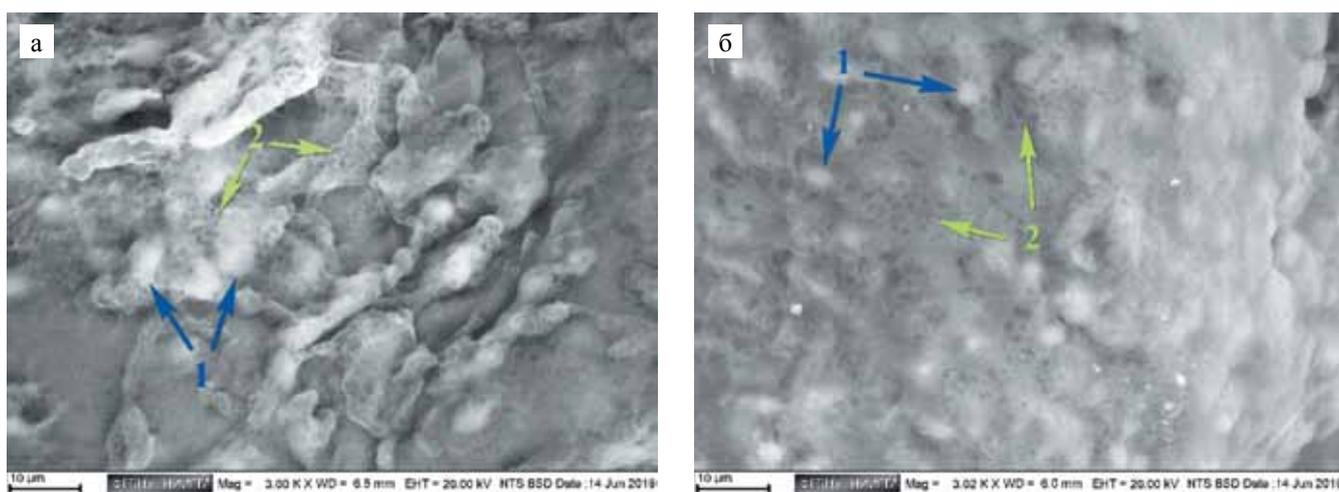


Рис. 3. Микрофотографии структуры поверхности КИК, состоящих из МСК ЖТч и ДХ (а) или БМКГ (б) в дифференцировочной хондрогенной среде после 14 суток культивирования. СЭМ в режиме BSD с использованием лантаноидного контрастирования BioREE. Размер масштабной линейки 10 мкм. 1 – ядра, 2 – внутриклеточные везикулы

Fig. 3. Microphotographs of the CEC surface structure, including hAMSCs, cultured in DPAC (a) and in BMCH (б) in a chondrogenic differentiation medium for 14 days. SEM using lanthanide contrasting BioREE. The scale bar size is 10 µm. 1 – nuclei, 2 – intracellular vesicles

клеточные пласты как на поверхности ДХ, так и на поверхности БМКГ (рис. 3). В части клеток использование лантаноидного контрастирования позволило визуализировать внутриклеточные структуры за счет накопления лантаноидов в зонах, богатых кальцием и фосфором (в том числе  $Ca^{2+}$ -каналов различных мембран, белков клеточных контактов). Удалось идентифицировать ядра и края плазматической мембраны в некоторых клетках. Интересно, что цитоплазма клеток включала многочисленные гранулы, содержимое которых по яркости сходно с используемым матриксом. Эти внутриклеточные везикулы могут быть связаны как с секрецией компонентов внеклеточного хрящевого матрикса, так и с резорбцией носителя. Оба описанных процесса наблюдали в гистологических исследованиях образцов КИК

хряща. Отметим, что, суммируя это с наблюдаемой распластанной формой клеток, можно заключить, что в культивируемых на поверхности тканеспецифического носителя и коллагенсодержащего гидрогеля клетках активно происходили физиологические метаболические процессы.

Как видно на рис. 4, на поверхности ДХ происходил активный рост фибробластоподобных клеток с формированием многослойных пластов. Клетки и наработанный ими ВКМ скрепляли многочисленные микрочастицы ДХ, образуя крупные конгломераты.

В образцах КИК, включающих БМКГ, наблюдали гетерогенную клеточную популяцию, формирующую многослойные участки. Клетки прорастали в толщу БМКГ, что сопровождалось его резорбцией. Также визуализировали участки разрушения клеточного

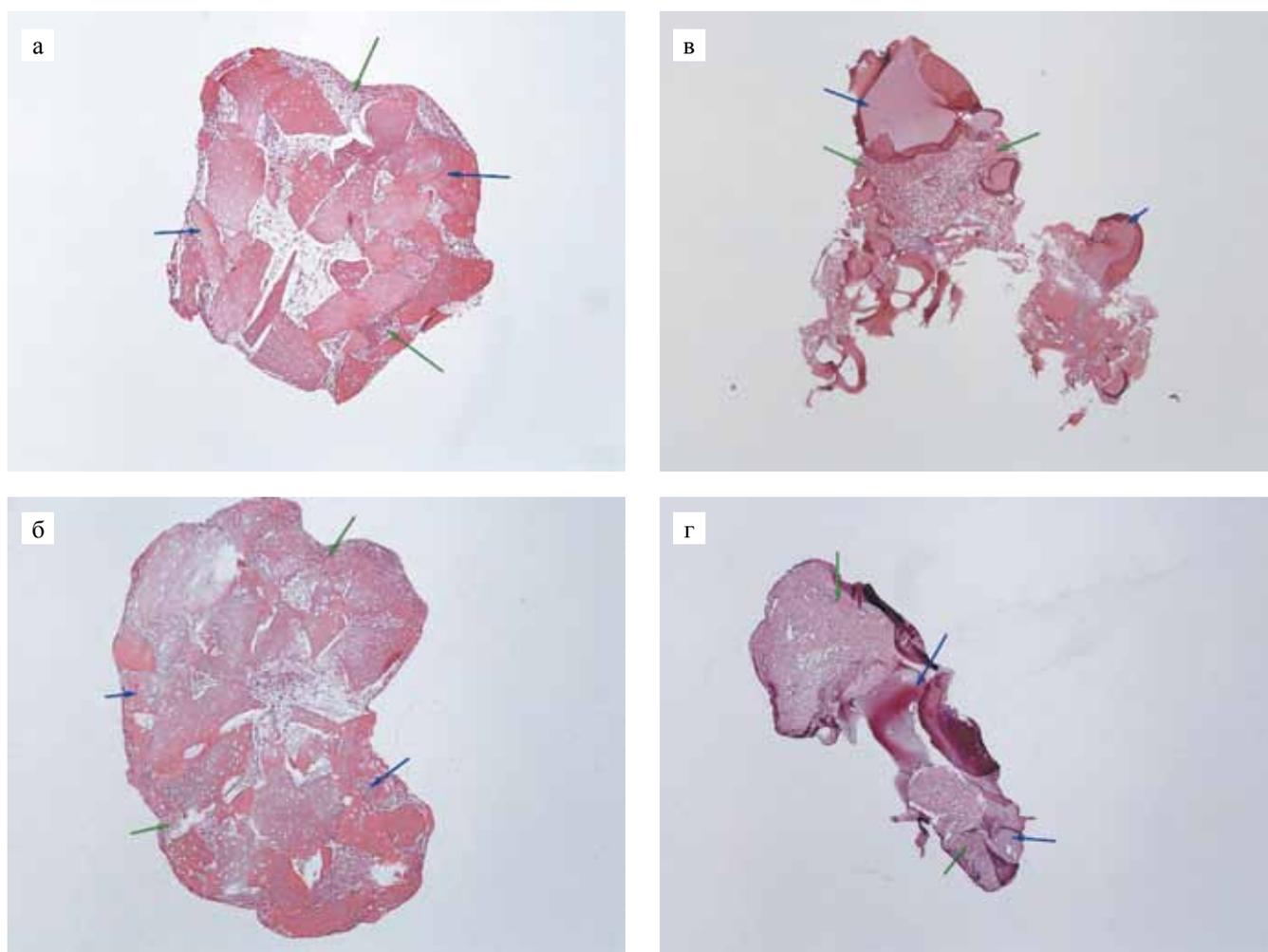


Рис. 4. Гистологическая картина динамики формирования КИК: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 40$

Fig. 4. Histological picture of CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CECs, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. H&E staining.  $\times 40$

пласта. В образце присутствовали зоны, не окрашенные гематоксилином – клеточный детрит.

Количество клеточного детрита в КИК, как на основе ДХ, так и БМКГ, со временем увеличивалось. Отметим, что на поверхности матрикса ДХ клетки распределялись более равномерно, а для БМКГ адгезия и пролиферация клеток наблюдалась только на отдельных участках. Необходимо обратить внимание, что для обоих матриксов объем клеточной массы визуально не различается. Однако на поверхности ДХ клетки с синтезируемым ими ВКМ образуют тонкие тяжи, что приводит к формированию агрегатов из микродисперсных частиц. На поверхности гидрогелевого матрикса МСК ЖТч распределены по поверхности неравномерно в виде крупных скоплений, что может привести к дефициту питательных веществ в объеме клеточных пластов.

В наработанных клетками ВКМ в КИК, включающих оба типа матриксов, на 14-е сутки культивирования в дифференцировочной среде наблюдали локальное положительное окрашивание на ГАГ и коллаген в многослойных участках (рис. 5, а, в и рис. 6, а, в). Равномерное окрашивание ВКМ на ГАГ наблюдали в КИК, содержащих БМКГ, и в КИК с ДХ на 42-е сутки (рис. 5, б, г). К 42-м суткам в образцах наблюдали значительное увеличение содержания коллагена (рис. 6, б, г).

Полученные результаты показывают, что МСК ЖТ способны образовывать КИК хряща при культивировании в хондрогенной дифференцировочной среде на коллагенсодержащих матриксах. Можно предположить, что на хондрогенез МСК ЖТч в КИК с коллагенсодержащими миметиками, полученными из тканей ВКМ, оказывали влияние макромолекуляр-

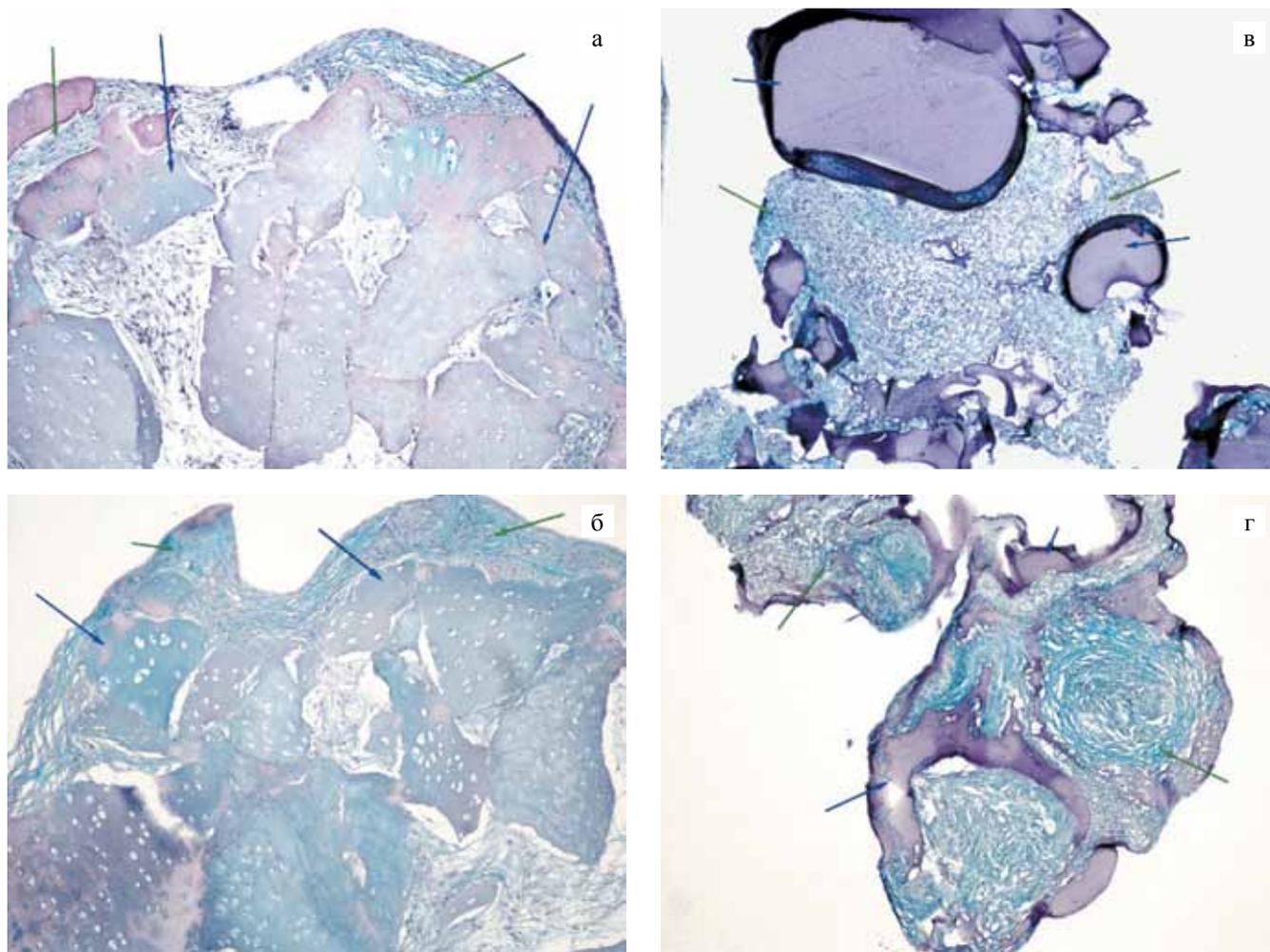


Рис. 5. Гистологическая картина динамики формирования КИК хряща: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание алциановым синим на ГАГ.  $\times 100$

Fig. 5. Histological picture of cartilage CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CEC, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. Blue arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. Alcian blue stain for GAGs.  $\times 100$

ные компоненты ВКМ. Макромолекулы, такие как гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат и коллаген II типа, широко изучались в качестве агента для восстановления хряща. Предполагается, что причина их стимулирующего действия на хондрогенез лежит в их взаимодействии с клетками. Например, введение гиалуроновой кислоты в культуру хондроцитов усиливало синтез ВКМ. В качестве возможного механизма предполагается, что поверхностный рецептор хондроцитов CD44 сначала связывается со стимулирующей его молекулой гиалуроновой кислоты, а затем взаимодействует с цитоплазматическим доменом рецептора TGF- $\beta$ 1, регулируя, в конечном итоге, гены, ответственные за сигнализацию TGF- $\beta$ 1, и улучшая синтез ВКМ [18, 19]. Кроме того, было показано, что коллаген II типа, являющийся основным белковым компонентом ВКМ гиалинового хряща,

из которого был получен ДХ, может способствовать сохранению хондроцитарной морфологии и синтезу большего количества ГАГ, чем коллаген I типа [20]. Также было показано, что коллаген II типа усиливает хондрогенную дифференцировку МСК при добавлении в агарозные матриксы [21]. Отметим, что в КИК с ДХ клетки распределялись более равномерно, тогда как в КИК с БМКГ клетки адгезировали и пролиферировали только на отдельных участках поверхности матрикса. Вероятно, это связано с сохранением участков адгезии клеток на поверхности микрочастиц ДХ благодаря более щадящей процедуре децеллюляризации в сравнении с уксуснокислым гидролизом, которому подвергаются ткани сельскохозяйственных животных при изготовлении БМКГ.

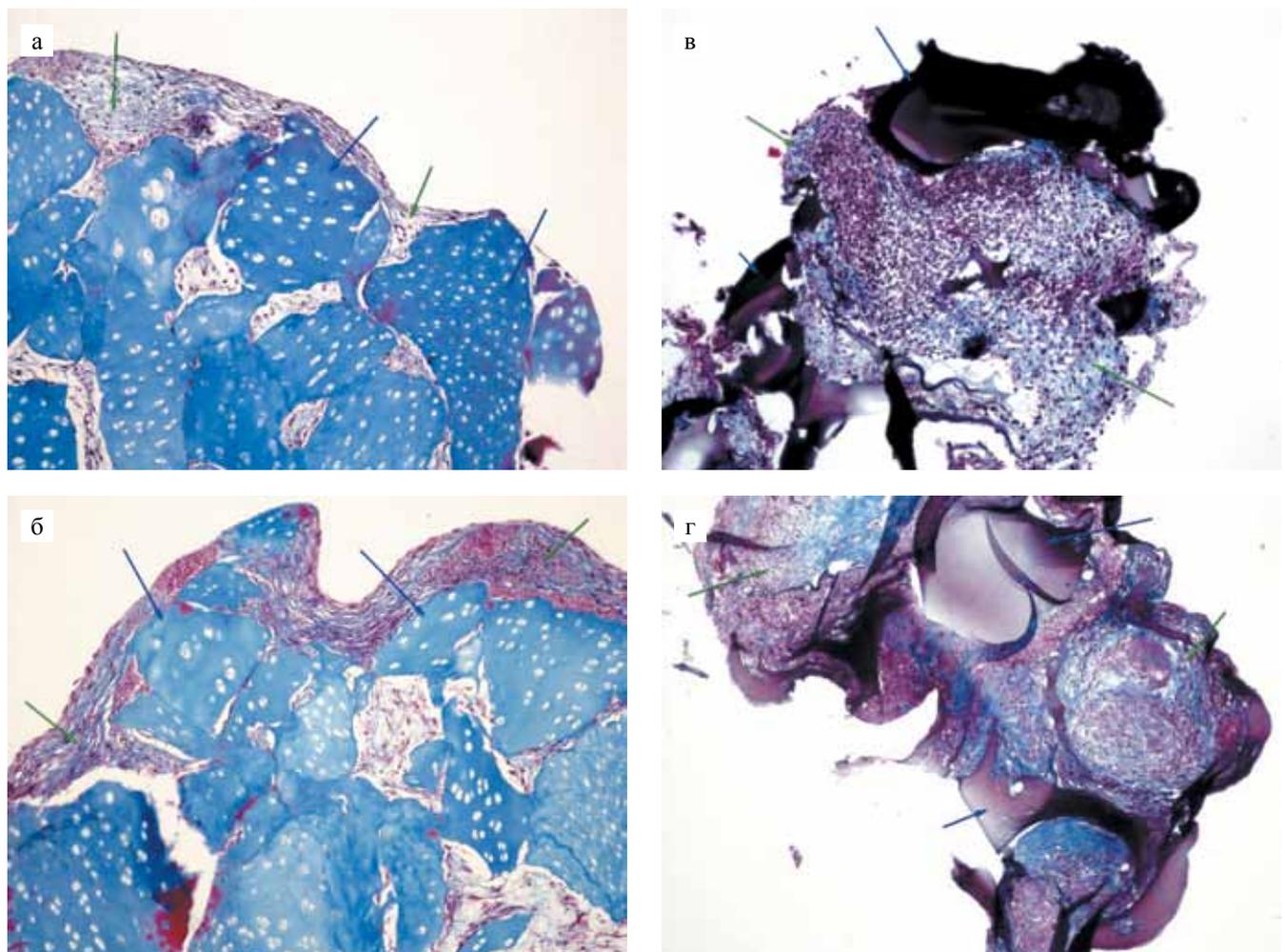


Рис. 6. Гистологическая картина динамики формирования КИК: а, б – КИК на основе ДХ, в, г – КИК на основе БМКГ; а, в – 14-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде, б, г – 42-е сутки культивирования в хондрогенной культуральной среде. Синие стрелки – клеточный носитель, зеленые стрелки – клетки с наработанным ВКМ. Окрашивание гематоксилином и эозином.  $\times 100$

Fig. 6. Histological picture of CEC formation dynamics: а, б – DPAC-based CEC, в, г – BMCH-based CECs; а, в – 14 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium, б, г – 42 days of cultivation in chondrogenic differentiation medium. Blue arrows – cell carrier, green arrows – cells with the obtained ECM. H&E staining.  $\times 100$

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленная способность полученного по разработанному протоколу ДХ образовывать с МСК ЖТ КИК с равномерным распределением клеток и наработкой ими специфического ВКМ, содержащего коллаген и ГАГ, свидетельствует о ее потенциале для регенерации поврежденного хряща. БМКГ и тканеспецифический ДХ проявили способность поддерживать хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч. При создании тканевого эквивалента хряща *in vitro* следует учитывать преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с БМКГ.

Высокая способность полученного ДХ матрикса поддерживать адгезию, пролиферацию и хондрогенную дифференцировку МСК ЖТч в сравнении с применяемым в клинической практике аналогом указывает на перспективность его применения в тканевой инженерии.

*Авторы выражают благодарность И.А. Новикову (лаборатория фундаментальных исследований в офтальмологии, ФГБНУ «НИИ глазных болезней») за помощь в проведении СЭМ.*

*Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-15-00251, <https://rscf.ru/project/21-15-00251/>.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kwon H, Brown WE, Lee CA, Wang D, Paschos N, Hu JC et al. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair. *Nat Rev Rheumatol*. 2019; 15 (9): 550–570. doi: 10.1038/s41584-019-0255-1. PMID: 31296933.
2. Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther*. 2016; 7 (1): 56. doi: 10.1186/s13287-016-0314-3. PMID: 27089917.
3. Schneider S, Unger M, van Griensven M, Balmayor ER. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res*. 2017; 22 (1): 17. doi: 10.1186/s40001-017-0258-9. PMID: 28526089.
4. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al. Chondrogenic potential of MSC from different sources in spheroid culture. *Bull Exp Biol Med*. 2021; 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. PMID: 33725253.
5. Rai V, Dilisio MF, Dietz NE, Agrawal DK. Recent strategies in cartilage repair: A systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105 (8): 2343–2354. doi: 10.1002/jbm.a.36087. PMID: 28387995.
6. Wylie JD, Hartley MK, Kapron AL, Aoki SK, Maak TG. What is the effect of matrices on cartilage repair? *Clin Orthop Relat Res*. 2015; 473 (5): 1673–1682. doi: 10.1007/s11999-015-4141-0. PMID: 25604876.
7. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Биополимерный гетерогенный гидрогель Сферо®ГЕЛЬ – инъекционный биодеградируемый имплантат для заместительной и регенеративной медицины. *Практическая медицина*. 2014; 8 (84): 120–126. Sevastianov VI, Perova NV. Bio-polymer heterogenic hydrogel Sphero®GEL – an injection biodegradable implant for substitutive and regenerative medicine. *Practical medicine*. 2014; 8 (84): 120–126. [In Russ, English abstract].
8. Sevastianov VI, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Vasilets VN. Formation of tissue-engineered construct of human cartilage tissue in a flow-through bioreactor. *Bull Exp Biol Med*. 2017; 164 (2): 269–273. doi: 10.1007/s10517-017-3971-z. PMID: 29177908.
9. Cramer MC, Badylak SF. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. *Ann Biomed Eng*. 2020; 48 (7): 2132–2153. doi: 10.1007/s10439-019-02408-9. PMID: 31741227.
10. Basok YuB, Kirillova AD, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, and Sevastianov VI. Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2020; 11 (5): 1153–1159.
11. Sun Y, Yan L, Chen S, Pei M. Functionality of decellularized matrix in cartilage regeneration: A comparison of tissue versus cell sources. *Acta Biomater*. 2018; 74: 56–73. doi: 10.1016/j.actbio.2018.04.048. PMID: 29702288.
12. Pei M, Li JT, Shoukry M, Zhang Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2011; 22: 333–343. doi: 10.22203/ecm.v022a25. PMID: 22116651.
13. Севастьянов ВИ, Перова НВ, Басок ЮБ, Немец ЕА. Биомиметики внеклеточного матрикса в тканевой инженерии и регенеративной медицине для травматологии и ортопедии. *Opinion Leader*. 2020; 6 (35): 35–46. Sevastyanov VI, Perova NV, Basok JuB, Nemets EA. Biomimetiki vnekletochnogo matriksa v tkanevoj inzhenerii i regenerativnoj medicine dlja travmatologii i ortopedii. *Opinion Leader*. 2020; 6 (35): 35–46.
14. Tsvetkova AV, Vakhrushev IV, Basok YB, Grigor'ev AM, Kirsanova LA, Lupatov AY et al. Chondrogenic Potential of MSC from Different Sources in Spheroid Culture. *Bull Exp Biol Med*. 170 (4): 528–536. doi: 10.1007/s10517-021-05101-x. Epub 2021 Mar 16. PMID: 33725253.
15. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8 (4): 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.

16. *Novikov I, Subbot A, Turenok A, Mayanskiy N, Chebotar I.* A rapid method of whole cell sample preparation for scanning electron microscopy using neodymium chloride. *Micron.* 2019; 124: 102687. doi: 10.1016/j.micron.2019.102687. PMID: 31302532.
17. *Иксанова АГ, Бондарь ОВ, Балакин КВ.* Методы исследования цитотоксичности при скрининге лекарственных препаратов. Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по курсу «Методы скрининга физиологически активных веществ». Казань: Казанский университет, 2016. 40. *Iksanova AG, Bondar' OV, Balakin KV.* Metody issledovanija citotoksichnosti pri skrininge lekarstvennyh preparatov. Uchebno-metodicheskoe posobie k prakticheskim zanjatijam po kursu «Metody skrininga fiziologicheskij aktivnyh veshchestv». Kazan': Kazanskij universitet, 2016. 40.
18. *Bourguignon LY, Singleton PA, Zhu H, Zhou B.* Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor beta receptor I in metastatic breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2002; 277 (42): 39703–39712. doi: 10.1074/jbc.M204320200. PMID: 12145287.
19. *Responde DJ, Natoli RM, Athanasiou KA.* Identification of potential biophysical and molecular signalling mechanisms underlying hyaluronic acid enhancement of cartilage formation. *J R Soc Interface.* 2012; 9 (77): 3564–3573. doi: 10.1098/rsif.2012.0399. PMID: 22809846.
20. *Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T et al.* Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated *in vitro*. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38 (2): 95–104. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199722)38:2<95::aid-jbm3>3.0.co;2-b. PMID: 9178736.
21. *Tiruvannamalai Annamalai R, Mertz DR, Daley EL, Stegemann JP.* Collagen Type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues. *Cytotherapy.* 2016; 18 (2): 263–277. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.015. PMID: 26794716.
- Статья поступила в редакцию 4.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 4.06.2021*

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге **ООО «Прессинформ» «Газеты и журналы» – 80248**



Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	<table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;"><b>80248</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">(индекс издания)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ</td> </tr> </table>	<b>80248</b>	(индекс издания)	КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																					
<b>80248</b>																										
(индекс издания)																										
КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																										
<b>на 2021 год по месяцам</b>																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">1</td><td style="width: 10%;">2</td><td style="width: 10%;">3</td><td style="width: 10%;">4</td><td style="width: 10%;">5</td><td style="width: 10%;">6</td><td style="width: 10%;">7</td><td style="width: 10%;">8</td><td style="width: 10%;">9</td><td style="width: 10%;">10</td><td style="width: 10%;">11</td><td style="width: 10%;">12</td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда <input style="width: 100%;" type="text"/> <small>(почтовый индекс) (адрес)</small>																										
Кому <input style="width: 100%;" type="text"/> <small>(фамилия, инициалы)</small>																										
Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	<table border="1" style="border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;"><b>80248</b></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; font-size: 8px;">(индекс издания)</td> </tr> </table>	<b>80248</b>	(индекс издания)																						
<b>80248</b>																										
(индекс издания)																										
<b>ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА</b>																										
на журнал																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; text-align: center;">ПВ</td> <td style="width: 30%; text-align: center;">место</td> <td style="width: 30%; text-align: center;">ли-тер</td> </tr> </table>			ПВ	место	ли-тер																					
ПВ	место	ли-тер																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 20%; text-align: center;">стоимость</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">подписки</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">руб.</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">коп.</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">количество комплектов</td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">пере-адресовки</td> <td style="text-align: center;">руб.</td> <td style="text-align: center;">коп.</td> <td></td> </tr> </table>			стоимость	подписки	руб.	коп.	количество комплектов		пере-адресовки	руб.	коп.															
стоимость	подписки	руб.	коп.	количество комплектов																						
	пере-адресовки	руб.	коп.																							
<b>на 2021 год по месяцам</b>																										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">1</td><td style="width: 10%;">2</td><td style="width: 10%;">3</td><td style="width: 10%;">4</td><td style="width: 10%;">5</td><td style="width: 10%;">6</td><td style="width: 10%;">7</td><td style="width: 10%;">8</td><td style="width: 10%;">9</td><td style="width: 10%;">10</td><td style="width: 10%;">11</td><td style="width: 10%;">12</td> </tr> <tr> <td style="height: 20px;"></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
Куда <input style="width: 100%;" type="text"/> <small>(почтовый индекс) (адрес)</small>																										
Кому <input style="width: 100%;" type="text"/> <small>(фамилия, инициалы)</small>																										

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-101-114

## ФОРМИРОВАНИЕ МОНОСЛОЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОВЕРХНОСТИ СОСУДИСТОГО ПРОТЕЗА МАЛОГО ДИАМЕТРА В УСЛОВИЯХ ПОТОКА

М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, Е.О. Кривкина, Т.В. Глушкова, В.В. Севостьянова, А.Г. Кутихин, Л.В. Антонова

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

**Цель:** создать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с использованием аутологичных эндотелиальных клеток и белков внеклеточного матрикса и оценить эффективность формирования эндотелиального монослоя при прекондиционировании напряжением сдвига в сосудистом протезе малого диаметра. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга из смеси полигидроксибутирата/валерата (PHBV) и поликапролактона (PCL) изготовлены PHBV/PCL-трубчатые каркасы протезов сосудов и модифицированы фибрином. Для заселения в протезы из крови пациентов с ишемической болезнью сердца выделили культуру эндотелиальных клеток. Фенотипирование культуры колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) проводили методом проточной цитометрии и иммунофлуоресцентной микроскопии, также исследовали пролиферативную и ангиогенную активность клеток. Клеточнозаселенные сосудистые каркасы культивировали в установке пульсирующего потока с итоговым напряжением сдвига 2,85 дин/см<sup>2</sup>. Влияние пульсирующего потока на формирование монослоя оценивали методами иммунофлуоресцентной, сканирующей электронной, атомной силовой микроскопии, полнотранскриптомным секвенированием. **Результаты.** Под влиянием пульсирующего потока эндотелиальные клетки, заселенные в трубчатый каркас, продемонстрировали увеличение уровня экспрессии белков эндотелиального профиля, фокальной адгезии и цитоскелета. Выявлены преимущества культивирования клеточнозаселенных сосудистых протезов в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см<sup>2</sup> в сравнении со статическими условиями, что отразилось на формировании устойчивой адгезии эндотелиальных клеток, а также цитоскелетных перестройках. Полнотранскриптомное секвенирование показало, что напряжение сдвига индуцировало повышение уровня экспрессии дифференциально экспрессируемых генов, кодирующих белки, обеспечивающие развитие сосудов, целостность эндотелия, эндотелиальный метаболизм. Разработан протокол изготовления персонализированного клеточнозаселенного биодеградируемого сосудистого протеза малого диаметра в условиях пульсирующего потока. **Заключение.** Использование аутологичных фибрина и культуры КФЭК и прекондиционирование напряжением сдвига позволяют получить персонализированный клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с непрерывным функциональным эндотелиальным монослоем, адаптированным к потоку.

*Ключевые слова:* тканевая инженерия, аутологичные эндотелиальные клетки, пульсирующий поток, персонализированный сосудистый протез.

Для корреспонденции: Ханова Мариям Юрисовна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (904) 374-36-61. E-mail: khanovam@gmail.com

Corresponding author: Mariam Khanova. Address: 6, Sosnovy bulvar, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Phone: (904) 374-36-61. E-mail: khanovam@gmail.com

# ENDOTHELIAL CELL MONOLAYER FORMATION ON A SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFT SURFACE UNDER PULSATILE FLOW CONDITIONS

M.Yu. Khanova, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva, E.O. Krivkina, T.V. Glushkova, V.V. Sevostianova, A.G. Kutikhin, L.V. Antonova

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

**Objective:** to create a cell-populated small-diameter vascular graft (SDVG) using autologous endothelial cells and extracellular matrix proteins, and to evaluate the efficiency of endothelial cell monolayer formation during shear stress preconditioning in a SDVG. **Materials and methods.** PHBV/PCL tubular scaffolds of vascular grafts were made by electrospinning from a mixture of polyhydroxybutyrate-valerate (PHBV) copolymer and polycaprolactone (PCL) and modified with fibrin. To populate the graft, an endothelial cell culture was isolated from the blood of patients with coronary heart disease. Phenotyping of endothelial colony-forming cell (ECFC) culture was performed by flow cytometry and immunofluorescence microscopy. Cell proliferative and angiogenic activity were also studied. Cell-populated vascular scaffolds were cultured in a pulsatile flow setup with a final shear stress of 2.85 dyne/cm<sup>2</sup>. The effect of pulsatile flow on monolayer formation was assessed by immunofluorescence, scanning electron microscopy, atomic force microscopy, and whole-transcriptome RNA sequencing. **Results.** Under the influence of pulsatile flow, endothelial cells that were seeded into the tubular scaffold showed an increase in the expression level of endothelial profile proteins, focal adhesion and cytoskeleton. In contrast to endothelial cell culture on a vascular graft surface under static conditions, when cultured under pulsatile flow with 2.85 dyne/cm<sup>2</sup> shear stress, endothelial lining cells have an increased ability to adhere and are oriented along the pulsatile flow path. Whole-transcriptome RNA sequencing showed that induced shear stress increased expression levels of differentially expressed genes encoding proteins that ensure vascular development, endothelial integrity, and endothelial metabolism. A protocol for fabrication of a personalized cell-populated biodegradable SDVG under pulsatile flow conditions was developed. **Conclusion.** The use of autologous fibrin and ECFC culture, as well as shear stress preconditioning, allow to obtain a personalized cell-populated SDVG with continuous functional endothelial monolayer adapted to the flow.

*Keywords: tissue engineering, autologous endothelial cells, pulsatile flow, personalized vascular graft.*

## ВВЕДЕНИЕ

Создание биodeградируемых протезов сосудов малого диаметра, способных после имплантации резорбираться и заменяться новыми собственными сосудами пациента, освобождает от необходимости репротезирования, поэтому представляет собой актуальную задачу тканевой сосудистой инженерии [1, 2]. Исследователи ведут поиск идеальной культуры, которая обладала бы высоким пролиферативным потенциалом и полноценной функциональной активностью, а также доступностью воспроизведения.

Считается, что для предупреждения тромбоза тканеинженерных сосудистых протезов весьма эффективной может быть эндотелизация протезов *in vitro* или ранняя стимулированная эндотелизация разрабатываемых конструкций *in situ* [3–5].

Эндотелиальные клетки сосудов постоянно подвергаются напряжению сдвига из-за силы трения, создаваемой током крови. Посредством активации механосенсоров они распознают изменения локального напряжения сдвига и циклическую деформацию, модулируется внутриклеточная передача сигналов, что ведет к изменениям экспрессии генов, морфологии клеток и структурному ремоделированию [6].

В прямой части сосуда напряжение сдвига и циклическое растяжение имеют четко определенные направления, ответ эндотелиальных клеток на направленные механические стимулы включает ремоделирование структуры цитоскелета, чтобы минимизировать внутриклеточный стресс. Эти адаптивные изменения способствуют поддержанию гомеостаза и оказывают атеропротекторный эффект. В сосудистой сети сложной геометрии возникают разнонаправленные механические стимулы, которые могут способствовать атерогенезу в этих областях [7].

Эндотелизация протезов *in vitro* дорога и требует прекодиционирования клеток напряжением сдвига с целью повышения жизнеспособности и устойчивости клеток к смыванию током крови с поверхности клеточнозаселенного протеза после его имплантации в сосудистое русло [8–9]. Также бытует мнение, что из периферической крови невозможно в большом количестве получить аутологичные эндотелиальные клетки [10–12]. Поэтому в целях клеточного заселения внутренней поверхности трубчатых каркасов ученые зачастую прибегали к использованию мононуклеарной фракции костного мозга или стромально-васкулярной фракции жировой ткани либо применя-

ли индуцированные плюрипотентные клетки, дабы соблюсти персонифицированность биологического материала, выступающего в качестве источника собственных сосудистых клеток [13–15].

В своих предыдущих работах мы показали возможность получения аутологичных КФЭК с высоким пролиферативным потенциалом из мононуклеарной фракции крови большинства пациентов с ишемической болезнью сердца [16].

Адгезии эндотелиальных клеток к полимерной основе препятствует гидрофобность поверхности, ее чужеродный молекулярный состав и отсутствие сайтов клеточной адгезии. С целью устранения этих факторов проводят модификацию поверхности различными белками внеклеточного матрикса. В тканевой инженерии в качестве подложки обычно используют белки внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, желатин) животного происхождения либо аллогенные, что повышает риск негативного иммунного ответа после имплантации протеза в сосудистое русло. Использование в качестве фидерного слоя аутологичного фибрина, полученного из периферической крови пациента, позволит снизить иммуногенность биодеградируемого полимерного сосудистого протеза с белковым покрытием. Использование аутологичных фибрина и культуры КФЭК позволит сконструировать персонифицированный сосудистый протез малого диаметра, а культивирование в установке пульсирующего потока – адаптировать эндотелиальные клетки к активным механическим стимулам, существующим в естественном кровотоке.

Цель работы – создать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра с использованием аутологичных эндотелиальных клеток и белков внеклеточного матрикса и оценить эффективность формирования эндотелиального монослоя в условиях preconditionирования напряжением сдвига.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Изготовление биодеградируемых трубчатых каркасов

Полимерные биодеградируемые трубчатые каркасы из смеси 5% раствора поли(3-гидроксибутирата-ко-3-гидроксиивалерата) (PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% раствора поли(ε-капролактона) (PCL, Sigma-Aldrich, США), растворенных в 1,1,1,3,3,3-гексафлуоро-2-пропанол (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1 : 2, изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC, Япония). Для изготовления каркасов использовали иглы калибра 22G. Напряжение на игле – 23 kV, скорость подачи раствора полимера – 0,3 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об./мин, расстояние от иглы до на-

моточного коллектора – 15 см, диаметр намоточного коллектора – 4 мм.

### Модифицирование фибрином внутренней поверхности трубчатых каркасов

Внутреннюю поверхность трубчатых каркасов модифицировали фибрином. Фибриноген выделяли из периферической крови пациентов с ишемической болезнью сердца. Забор крови выполнялся после получения добровольного информированного согласия на использование биологического материала в научно-исследовательских целях. Исследование было одобрено ЛЭК (протокол № 20 от 9.12.2020). Кровь, забранную в вакуумные пробирки с цитратом натрия, центрифугировали при 2000 g 10 мин, полученную плазму охлаждали до 4 °С. В плазму при постоянном перемешивании добавляли холодный этанол (70 об. %, 4 °С) в соотношении 4 : 1 (плазма/этанол). Сразу после этого раствор центрифугировали при 600 g при 4 °С в течение 5 мин. Надосадочную плазму декантировали и осадок фибриногена растворяли в 0,9% NaCl<sub>2</sub> с HEPES при 37 °С (до концентрации фибриногена 30–40 мг/мл) [17]. Фибриноген полимеризовали с помощью тромбина и CaCl<sub>2</sub>. Полимерные графты погружали и пропитывали полученным раствором фибриногена. Далее на поверхность трубчатого каркаса наносили раствор тромбина 500 IU/мл (Thrombin from human plasma, T7009, Sigma-Aldrich, США) и CaCl<sub>2</sub> 40 ммоль/л для полимеризации фибрина. После полимеризации трубчатый каркас погружали в натрий-фосфатный буферный раствор (PBS) с ε-аминокапроновой кислотой 2 мг/мл до последующего заселения клетками.

### Получение КФЭК

Для заселения сосудистых протезов использовали культуру колониеформирующих эндотелиальных клеток мононуклеарной фракции периферической крови, обладающих высокой пролиферативной активностью и полноценной функциональностью. Кровь брали у пациентов с ишемической болезнью сердца (группа пациентов, которым при дальнейшем развитии заболевания потребуется протезирование в объеме АКШ) после получения добровольного информированного согласия на использование биологического материала в научно-исследовательских целях. Получение культуры КФЭК основано на культивировании мононуклеарной фракции (МНФ) крови в средах, содержащих ростовые факторы. Исследования проводились на базе ФГБНУ «НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» и были одобрены ЛЭК (протокол № 20 от 9.12.2020). Методика культивирования, иммунофенотипирование и исследование функциональных свойств полу-

ченной культуры представлены ранее в публикации нашего коллектива [16]. Проведено сравнительное исследование профиля генной экспрессии культуры КФЭК с культурой зрелых клеток коронарной артерии НСАЕС [18].

### **Фенотипирование культуры с помощью проточной цитометрии**

Для окрашивания отбирали  $1 \times 10^5$  клеток полученной культуры, отмытой PBS. В работе использовали комбинации моноклональных антител, конъюгированных различными красителями: с флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC) – CD3 (BC, A07746), CD34 (BC, IM1870U), vWF (abcam, ab8822); с фикоэритрином (PE) – CD309 (BD, 560494), CD14 (BC, A07764); с аллоцикоцианином (APC) – CD133 (MACS, 130-090-826), CD31 (BL, 303115); с фикоэритрином-цианином 7 (PC7) – CD146 (BL, 361008); с Pacific Blue 450 (PB 450) – HLA DR (BL, 307633); с Krome Orange (KrOr) – CD45 (BC, A96416).

Пробоподготовку проводили согласно протоколам фирм-производителей по двум панелям: 1) CD3, CD14, HLADR, CD45; 2) CD34, KDR, CD146, CD133, CD31, CD45. Культуру клеток с морфологией «булыжной мостовой» дополнительно окрашивали vWF, CD146. В качестве контроля использовали культуру, окрашенную антителами соответствующего изотипического контроля, CD146 – PC7 Mouse IgG1 (BL, 400127), CD31, CD133 – APC Mouse IgG1 (BL, 400121), CD309 – PE Mouse IgG1 (BD, 550617), CD3, CD3, CD34 – FITC Mouse IgG1 (BC, A07795), CD14 – PE Mouse IgG2 $\alpha$  (BC, 559319), CD45 – KrOr Mouse IgG1 (BC, A96415), HLA DR – PB Mouse IgG2 $\alpha$  (BL, 400235). При окрашивании внутриклеточного белка vWF выполняли фиксацию и пермеабиллизацию клеток с применением набора IntraPrep (BC, A07803, США). Далее пробы ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном лазерном цитометре CytoFlex (BC, США) в программе CytExpert. Настройку прибора для каждой панели выполняли с использованием контрольных проб, окрашенных соответствующими изотипами, дальнейший анализ всех образцов выполнен на единых настройках прибора.

### **Заселение клетками биodeградируемого трубчатого каркаса**

В PNBV/PCL-каркасы вводили суспензию КФЭК в концентрации 700 тыс./мл. Первые 8 ч после заселения сосудистые протезы переворачивали каждые 30 мин для равномерного распределения клеток по поверхности. Через сутки культуральную среду заменяли. Общее время культивирования сосудистых протезов в статических условиях составило 2 суток.

После этого сосудистые протезы подключали в установку пульсирующего потока (Harvard Apparatus, США) на предварительных настройках, обеспечивающих напряжение в  $1,27$  дин/см<sup>2</sup> в течение суток. Затем постепенно увеличивали напряжение, доводя до  $2,85$  дин/см<sup>2</sup>. Рабочий режим культивирования в установке пульсирующего потока включал в себя следующие параметры: частота выброса – 20 уд./мин, объем выброса – 0,7 мл, итоговое напряжение сдвига –  $2,85$  дин/см<sup>2</sup>. В таком режиме продолжали культивирование в течение 5 суток в стерильных условиях в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C. Для контроля аналогичные сосудистые протезы культивировали в статических условиях.

### **Сканирующая электронная микроскопия**

Внутреннюю поверхность трубчатых каркасов исследовали с помощью сканирующей электронной микроскопии на различных этапах (до и после модифицирования фибрином PNBV/PCL-каркасов, после заселения КФЭК) на микроскопе Hitachi S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума. Подготовка образцов заключалась в фиксации в глутаровом альдегиде (Sigma, США) в течение суток с последующим замораживанием и лиофилизацией в установке Freezone 2.5 (Labonco, США) при температуре  $-40$  °C и давлении  $<0,133$  мбар. После этого образцы монтировали на специальные столики и методом ионного распыления формировали на их поверхности токопроводящее золото-паладиевое покрытие толщиной 7 нм в установке EM CE200 (Leika Mikro-systeme GmbH, Австрия).

### **Иммунофлуоресцентное исследование**

После окончания культивации проводили иммунофлуоресцентное окрашивание эндотелиального слоя, сформированного на внутренней поверхности сосудистого протеза. Сосудистый протез фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин, затем разрезали вдоль и фиксировали в раскрытом состоянии на предметных стеклах внутренней поверхностью вверх. Клетки на внутренней поверхности окрашивали на маркеры эндотелиальных клеток: CD31, VEGFR2 (CD309), CD144, vWF, маркер адгезии F-actin и Talin. Перед окрашиванием внутриклеточных маркеров (vWF, F-actin) проводили пермеабиллизацию 0,01% раствором Triton X-100. На F-actin окрашивали фаллоидином, конъюгированным с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 568 (Alexa Fluor™ 568 Phalloidin, A12380, Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Для остальных маркеров использовали первичные антитела: Mouse anti-CD31 (ab119339), Rabbit anti-VEGFR2 (ab2349), Rabbit anti-CD144 (ab33168), Sheep anti-vWF – FITC (ab8822), Rabbit

anti-Talin (ab71333) и вторичные антитела: Donkey anti-Mouse IgG Highly Cross-Adsorbed – AF555 (A-31570), Donkey anti-Rabbit IgG Highly Cross-Adsorbed – AF488 (A-21206) (Thermo Fisher, США). Инкубацию с первичными антителами производили при 4 °C в течение 16 часов, с вторичными – при комнатной температуре в течение часа. Для блокировки неспецифического связывания использовали раствор 1% бычьего сывороточного альбумина. Образцы докрашивали DAPI (Sigma, США). Готовые стекла заключали в ProLong (Life technologies, США) под стекло. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

### Оценка клеточной адгезии и жизнеспособности

Адгезию и жизнеспособность эндотелиальных клеток на поверхности сосудистых протезов оценивали путем флуоресцентной микроскопии. Образцы отмывали в PBS, последовательно вносили Hoechst 33342 (10 мкг/мл, 14533, Sigma Aldrich, США), затем с этидиум бромидом (30 мкг/мл, 46067, Sigma Aldrich, США) и инкубировали в течение 10 минут и 1 минуты соответственно. Образцы анализировали на лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Zeiss, Германия). Клеточную адгезию оценивали путем подсчета ядер клеток, окрашенных Hoechst 33342, в поле зрения. Анализировали не менее 20 случайно выбранных полей зрения при увеличении  $\times 200$ . Полученные результаты пересчитывали и представляли как ед/мм<sup>2</sup>.

Относительное количество мертвых клеток высчитывали по формуле: абсолютное количество мертвых клеток  $\times 100\%$  / абсолютное количество всех адгезированных клеток. Относительное количество живых клеток определяли путем вычитания доли мертвых клеток из 100% адгезированных клеток.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 7. Данные представлены как медианы (Me) и квартили (25% и 75%). Статистическую значимость различий между двумя независимыми группами оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Полнотранскриптомное секвенирование

Для проведения полнотранскриптомного секвенирования (RNA-seq) использовали культуру КФЭК в количестве 10 млн клеток. Клетки были лизированы тризолом (15596018, Invitrogen, США) с последующим выделением тотальной РНК при помощи набора

Purelink RNA Micro Scale Kit (12183016, Invitrogen, США) с сопутствующей обработкой ДНКазой (DNASE70, Sigma-Aldrich, США). Качество РНК контролировали с помощью набора RNA 6000 Pico Kit (5067-1513, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) по индексу целостности РНК (RNA integrity index, RIN). Оценку количества выделенной РНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США) и флюорометре Qubit 4 (Invitrogen, США). Для 1 мкг выделенной РНК проводили деплецию рРНК посредством набора RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (037.96, Lexogen, Австрия) с дальнейшим формированием ДНК-библиотек (SENSE Total RNA-Seq Library Prep Kit, 042.96, Lexogen, Австрия). Качество полученных ДНК-библиотек анализировали с помощью набора High Sensitivity DNA Kit (5067-4626, Agilent, США) на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent, США). Количественный анализ ДНК-библиотек осуществляли с помощью количественной полимеразной цепной реакции (RT-qPCR) на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Далее эквимольно смешивали ДНК-библиотеки и секвенировали на платформе HiSeq 2000 (Illumina) с длиной парно-концевых прочтений  $2 \times 125$  нуклеотидов.

Полученные прочтения фильтровали по качеству ( $QV > 20$ ), длине ( $>20$ ), с помощью программы TrimGalore v.0.4.4 удаляли адаптерную последовательность. После фильтрации среднее количество ридов превышало 10 миллионов. Их картирование на геном человека (hg38) с аннотацией Ensembl (v.38.93) проводили с использованием программы CLC GW 11.0 (Qiagen) со следующими параметрами: Similarity fraction = 0.8, Length fraction = 0.8, Mismatch cost = 2, Insertion cost = 3, Deletion cost = 3; в итоге были получены файлы в формате .bam. Для оценки дифференциальной экспрессии генов использовали мультифакторный статистический анализ в программе CLC GW 11.0, основанный на отрицательной биномиальной модели, используемой в программах EdgeR и DESeq2.

Значение индекса целостности РНК (RIN), выделенной из культуры КФЭК, было не менее 8, что свидетельствовало о ее высоком качестве и возможности использования для RNA-seq (рекомендуется  $RIN \geq 7$ ). Количество полученной тотальной РНК в образцах составляло не менее 29 мкг, этого было более чем достаточно для деплеции рРНК (рекомендуется  $\geq 1$  мкг).

### Статистический анализ результатов полнотранскриптомного секвенирования

Статистический анализ проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные пред-

ставлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей, а также минимума и максимума. Группы сравнивали по U-критерию Манна–Уитни. При анализе различий между клеточными культурами статистически значимые дифференциально экспрессируемые гены (ДЭГ) определяли по кратности изменения  $\geq 2$  и скорректированному с учетом средней доли ложных отклонений гипотез (false discovery rate, FDR) значению  $p < 0,05$ . Анализ обогащения набора генов на основе геной онтологии (Gene Ontology – GO) проводили в категориях молекулярных функций, биологических процессов и клеточных компонентов с использованием Gene Set Test в CLC GW. При сравнении групп клеток в рассматривали категории с поддержкой

$p < 0,05$  (FDR) и отношением ДЭГ к общему количеству генов более 50%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика аутологических колониформирующих эндотелиальных клеток

Фенотип полученной культуры КФЭК соответствовал фенотипу зрелых эндотелиальных клеток: CD31+CD309+vWF+CD146+, отсутствие экспрессии прогениторных маркеров CD34, CD133 (рис. 1) [16]. Культура обладала высокой пролиферативной активностью. Выявлена полноценная функциональная активность, в том числе ангиогенная [16].

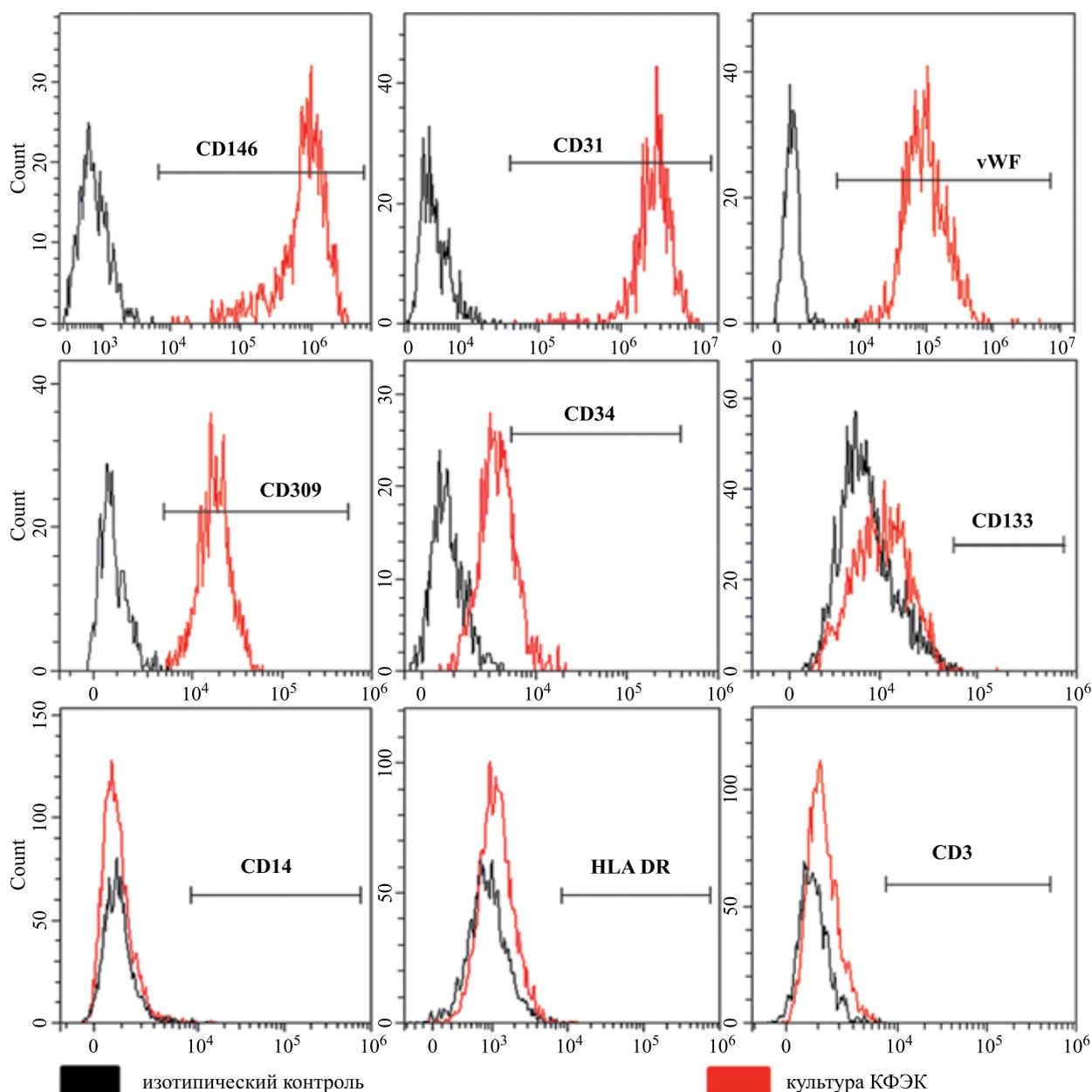


Рис. 1. Фенотип культуры КФЭК. Проточная цитометрия [16]

Fig. 1. ECFC culture phenotype. Flow cytometry [16]

## Структура поверхности PHBV/PCL-каркасов до и после модифицирования фибрином

Немодифицированные PHBV/PCL-каркасы обладали однородной высокопористой структурой с хаотичным переплетением нитей. Средний диаметр волокон составил 2,8 [1,9; 3,3] мкм, размер пор – 36,1 [30,2; 38,7] мкм. Модификация поверхности полимерного каркаса фибрином значительно изменила его архитектуру (рис. 2). Выявлено, что при полимеризации фибрин выровнял поверхность полимерного каркаса, образовав равномерное мелкопористое покрытие их мельчайших разветвленных фибрилл с диаметром волокон 125 [94,0; 152,0] нм и поры размером 273 [176,0; 333,0] нм.

На внутренней поверхности клеточнозаселенных PHBV/PCL/фибрин сосудистых протезов обнаруже-

ны хорошо распластанные эндотелиальные клетки, что свидетельствует о качественной адгезии. В то же время на немодифицированных PHBV/PCL каркасах обнаружено крайне неравномерное распределение КФЭК. При отсутствии фидерного слоя, несущего сайты клеточной адгезии, достаточно плотное приращение клеток не происходило.

## Режим культивирования клеточнозаселенного сосудистого протеза в условиях пульсирующего потока

Проведен подбор оптимального режима пульсирующего потока для формирования и сохранения эндотелиальной выстилки на поверхности PHBV/PCL/фибрин сосудистых протезов.

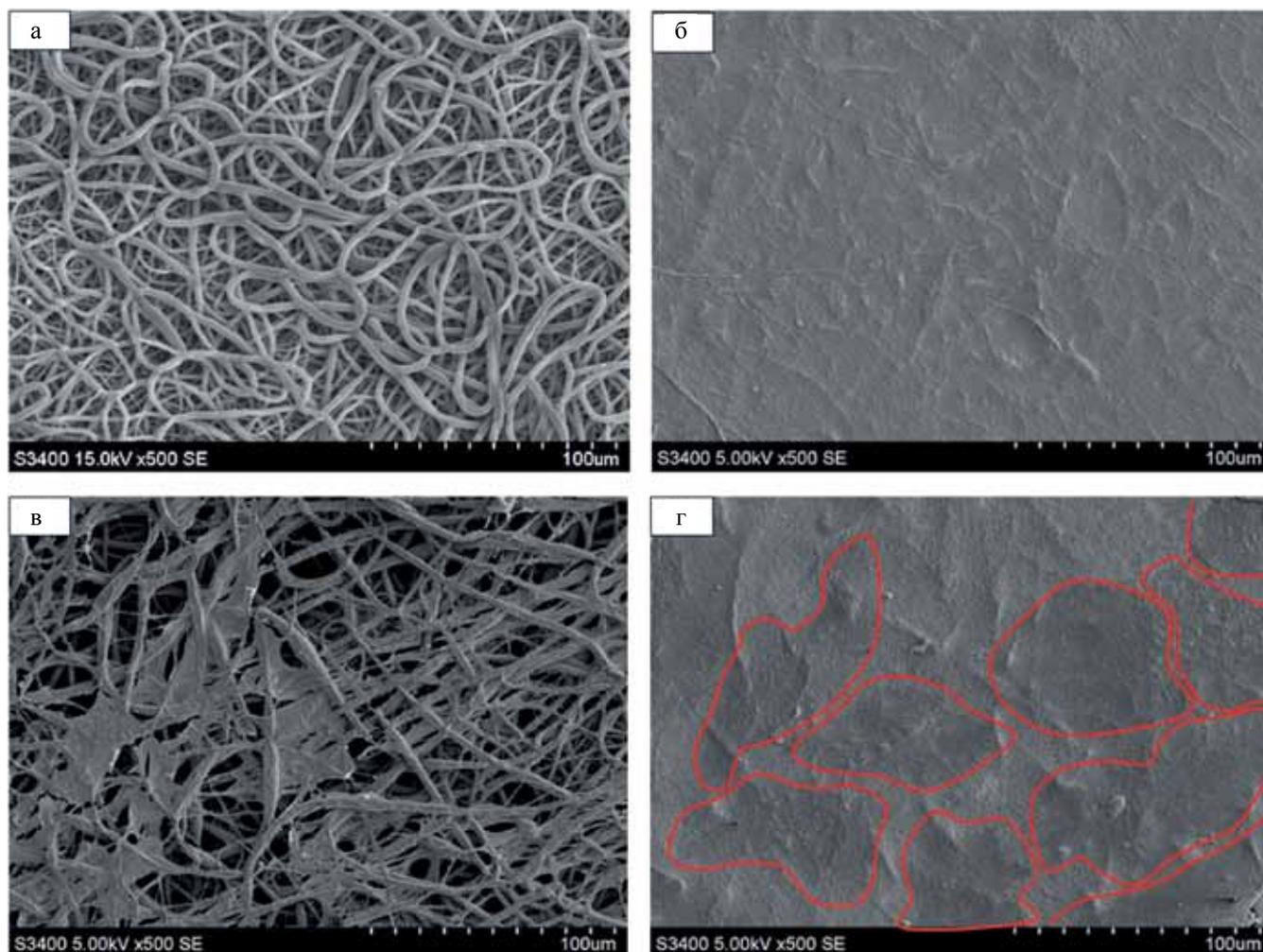


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия внутренней поверхности биодеградируемых сосудистых протезов: а – PHBV/PCL; б – PHBV/PCL/фибрин, в – PHBV/PCL, заселенные КФЭК; г – PHBV/PCL/фибрин, заселенные КФЭК. Красная линия очерчивает контур клеток.  $\times 500$

Fig. 2. Scanning electron microscopy of the inner surface of biodegradable vascular prostheses: а – PHBV/PCL; б – PHBV/PCL/fibrin, в – ECFC-populated PHBV/PCL; г – ECFC-populated PHBV/PCL/fibrin. The red line outlines the cell contour.  $\times 500$

Выявлено, что увеличение времени культивирования эндотелиальных клеток на поверхности протезов не приводит к повышению эффективности заселения. По-видимому, это связано с тем, что зрелые эндотелиальные клетки обладают умеренной пролиферативной активностью. Спустя 2 суток культивирования эндотелиальных клеток в статичных условиях большая часть внутренней поверхности протеза была заселена. Через 7 суток в статичных условиях происходила умеренная пролиферация с формированием практически непрерывного клеточного слоя. При культивировании клеток на поверхности протезов в статичных условиях более 7 суток (14-е и 21-е сутки) наблюдали гибель части клеток с нарушением клеточного монослоя.

В условиях пульсирующего потока мы определили следующий оптимальный режим культивирования клеточнозаселенного сосудистого протеза: продолжительность предварительного культивирования в статичных условиях – 2 суток, продолжительность последующего культивирования в установке пульсирующего потока – 5 суток при следующих параметрах пульсирующего потока: объем выброса – 0,7 мл; частота выброса – 20 уд./мин; напряжение сдвига – 2,85 дин/см<sup>2</sup>. Напряжение сдвига постепенно увеличивали до указанного значения после предварительного культивирования в статичных условиях клеток в течение двух суток.

**Результаты клеточного заселения трубчатых каркасов PNBV/PCL/фибрин**

Жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток, культивируемых на внутренней поверхности биодеградируемых каркасов PNBV/PCL/фибрин, была полностью сохранена независимо от условий культивирования. Также не было обнаружено статистически значимых отличий в плотности клеточных популяций на единицу площади (рис. 3). Полученные результаты подтверждают, что выбранный режим культивирования не оказывает повреж-

дающего влияния на эндотелиальную выстилку, а фидерный слой из фибрина обеспечил для КФЭК достаточные адгезивные характеристики поверхности.

На основе результатов окраски специфическими антителами проводили анализ влияния пульсирующего потока интенсивностью 2,85 дин/см<sup>2</sup> на фенотип колониеформирующих эндотелиальных клеток, межклеточные контакты, функциональную активность, организацию цитоскелета, адгезию клеток к поверхности. Было выявлено, что для КФЭК, составляющих монослой на внутренней поверхности трубчатых каркасов PNBV/PCL/фибрин, независимо от условий культивирования был характерен высокий уровень экспрессии специфичных эндотелиальных маркеров: CD31, CD309, CD144, vWF (рис. 4). Тем не менее в динамических условиях культивирования эти показатели были выше, за исключением CD144 (VE-кадгерина). Тем временем ответ на пульсирующий поток отразился в цитоскелетных перестройках. Средняя интенсивность флуоресценции структурного белка F-actin была достоверно выше в динамических условиях культивирования (p < 0,01). Под влиянием напряжения сдвига хаотичная ориентация микрофиламентов F-actin сменилась на преимущественную ориентацию клеток в направлении потока, что отражает адаптацию клеток на воздействие напряжения сдвига. Также адаптивным изменением к потоку является увеличение экспрессии белка точечной адгезии Talin (p < 0,05). Talin связывает интегриновые рецепторы и актиновый цитоскелет, является механочувствительным белком и передает механический сигнал среды клетке, позволяя ей адаптироваться к измененным условиям (табл. 1).

Выявлено изменение морфологии эндотелиальных клеток, культивируемых в условиях пульсирующего потока. При таком рабочем режиме клетки вытягивались вдоль тока жидкости, плотно контактируя с соседними клетками, чего не наблюдалось в статичных условиях.

Эндотелиальный гомеостаз, поддерживаемый правильным профилем экспрессии генов, влияет на

Таблица 1

**Результаты количественного анализа иммунофлуоресцентного окрашивания КФЭК, культивируемых в статических условиях («Статика») и в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см<sup>2</sup> («Динамика»)**

**Results of quantitative analysis of immunofluorescent staining of CFECs cultured under static conditions («Statics») and under conditions of a pulsating flow with a shear stress of 2.85 dyn/cm<sup>2</sup> («Dynamics»)**

	Статика Me (25%; 75%)	Динамика Me (25%; 75%)
Средняя интенсивность флуоресценции CD31, у. ед.	50,5 [40,8; 55,3]	56,0 [53,5; 62,3]
Положительно окрашенная площадь CD309, %	2,0 [1,8; 2,3]	3,1 [2,7; 4,3]
Средняя интенсивность флуоресценции CD144, у. ед.	34,5 [31,3; 37,6]	22,0 [19,6; 23,2]
Средняя интенсивность флуоресценции vWF, у. ед.	5,5 [4,0; 7,3]	17,5 [13,5; 23,3]
Положительно окрашенная площадь Talin, %	1,7 [1,6; 1,9]	2,7 [2,1; 3,3]
Средняя интенсивность флуоресценции F-actin, у. ед.	59,7 [52,2; 64,8]	66,5 [62,7; 71,6]

долгосрочную проходимость сосудистого протеза. Чтобы определить, оказывает ли preconditioning напряжением сдвига влияние на профиль генной экспрессии КФЭК, проведено полнотранскриптомное секвенирование (RNA-Seq).

В результате секвенирования ДНК-библиотек были получены парные прочтения длиной 125 нук-

леотидов, общий объем которых варьировал в диапазоне 1–5 млрд пар оснований, а покрытие составляло 9,5–42,7 млн ридов. После фильтрации прочтений по качеству и длине, а также удаления адаптеров их количество практически не изменилось. Картирование прочтений библиотек на геном человека показало, что не менее 98,2% ридов во всех образцах соответ-

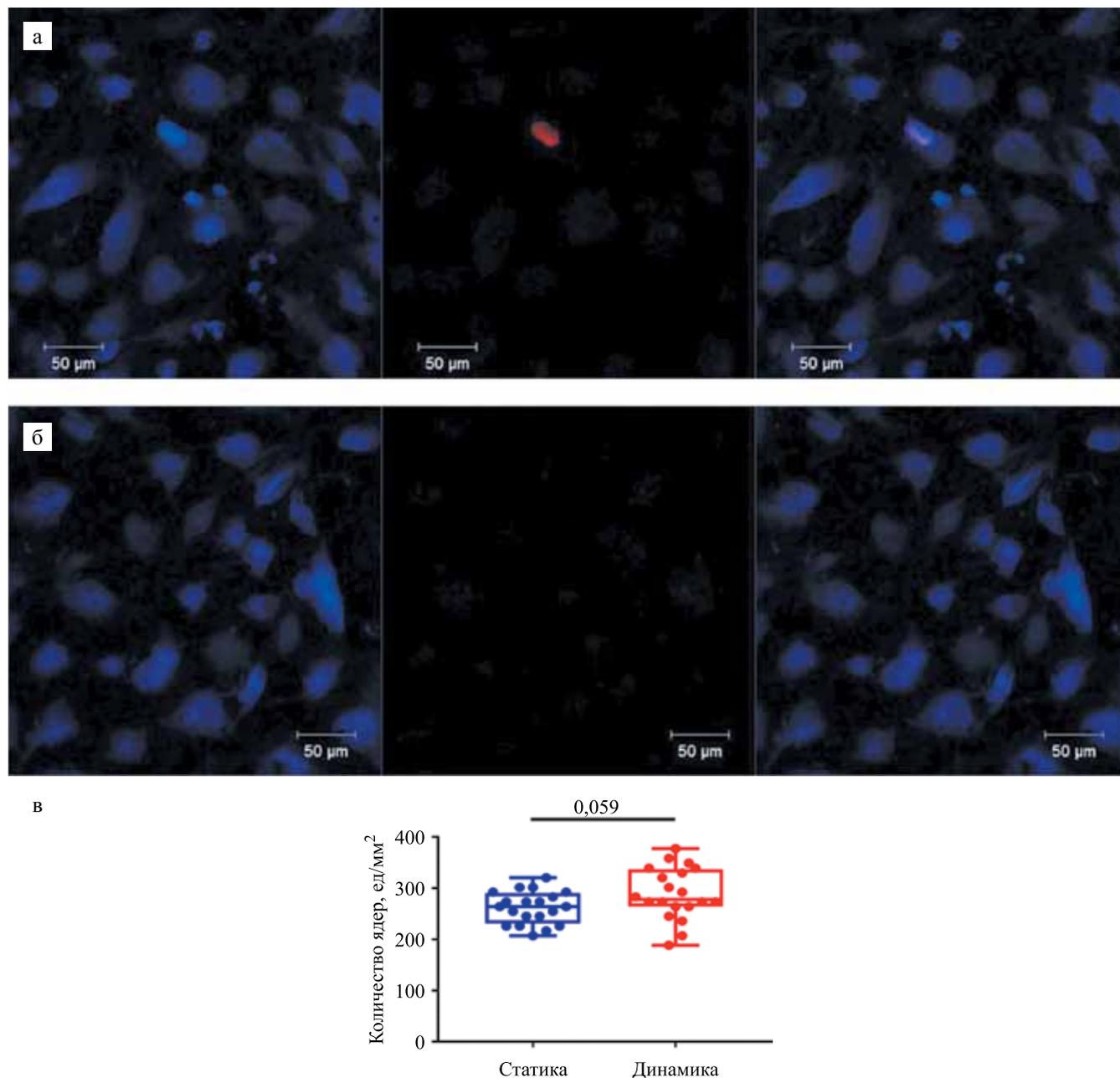


Рис. 3. Жизнеспособность колониеформирующих эндотелиальных клеток человека (КФЭК) при культивировании в течение 7 суток на внутренней поверхности биodeградируемых сосудистых протезов PHBV/PCL/фибрин: а – в статических условиях; б – в условиях пульсирующего потока; в – количественный анализ плотности клеточной популяции,  $p < 0,05$ . Сочетанная окраска флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (синий) и этидиумом бромидом (красный). Конфокальная лазерная микроскопия,  $\times 200$

Fig. 3. Viability of human ECFC when cultured for 7 days on the inner surface of PHBV/PCL/fibrin biodegradable vascular prostheses: а – under static conditions; б – under pulsatile flow conditions; в – quantitative analysis of cell population density,  $p < 0.05$ . Combined staining with Hoechst 33342 fluorescent (blue) and ethidium bromide (red). Confocal laser microscopy,  $\times 200$

ствовали геному человека. При этом большая часть (82,2–90,4) прочтений приходилась на экзоны, т. е., белок-кодирующую часть генов.

Были выявлены различия транскриптомов КФЭК, культивируемых на внутренней поверхности РНВВ/РСЛ/фибрин в статических условиях и в условиях пульсирующего потока. Всего у культуры КФЭК было идентифицировано 185 значимых ДЭГ. ДЭГ были аннотированы с использованием терминов, предложенных в базе данных Gene Ontology для дальнейшего раскрытия их молекулярных характеристик. ДЭГ были разделены на 125 категорий, которые можно условно разделить на 2 обширные группы: эндотелиальный метаболизм (62) и процессы, участвующие в биологии эндотелия (63).

Сравнительный анализ дифференциальной экспрессии систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов, показал, что воздействие пульсирующего потока активирует метаболизм в КФЭК. Для выявления этих отличий использовали инструмент

Gene Ontology, который обладал преимуществом при анализе ДЭГ в категории «эндотелиальный метаболизм» и позволил определить, что в статике 23 ДЭГ характеризовались повышенной экспрессией, в то время как в динамике – 39 (табл. 2).

Дальнейшее обогащение систем, связанных с эндотелиальным фенотипом генов при помощи укрупнения категорий Gene Ontology (особенно при помощи мануального аннотирования ДЭГ КФЭК) показало, что в ответ на пульсирующий поток наблюдается повышенная экспрессия генов, кодирующих:

- 1) белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (3 ДЭГ в условиях пульсирующего потока (динамических) против 2 ДЭГ в статических условиях);
- 2) белки, ответственные за регуляцию целостности эндотелия (9 ДЭГ в динамических против 6 ДЭГ в статических условиях);

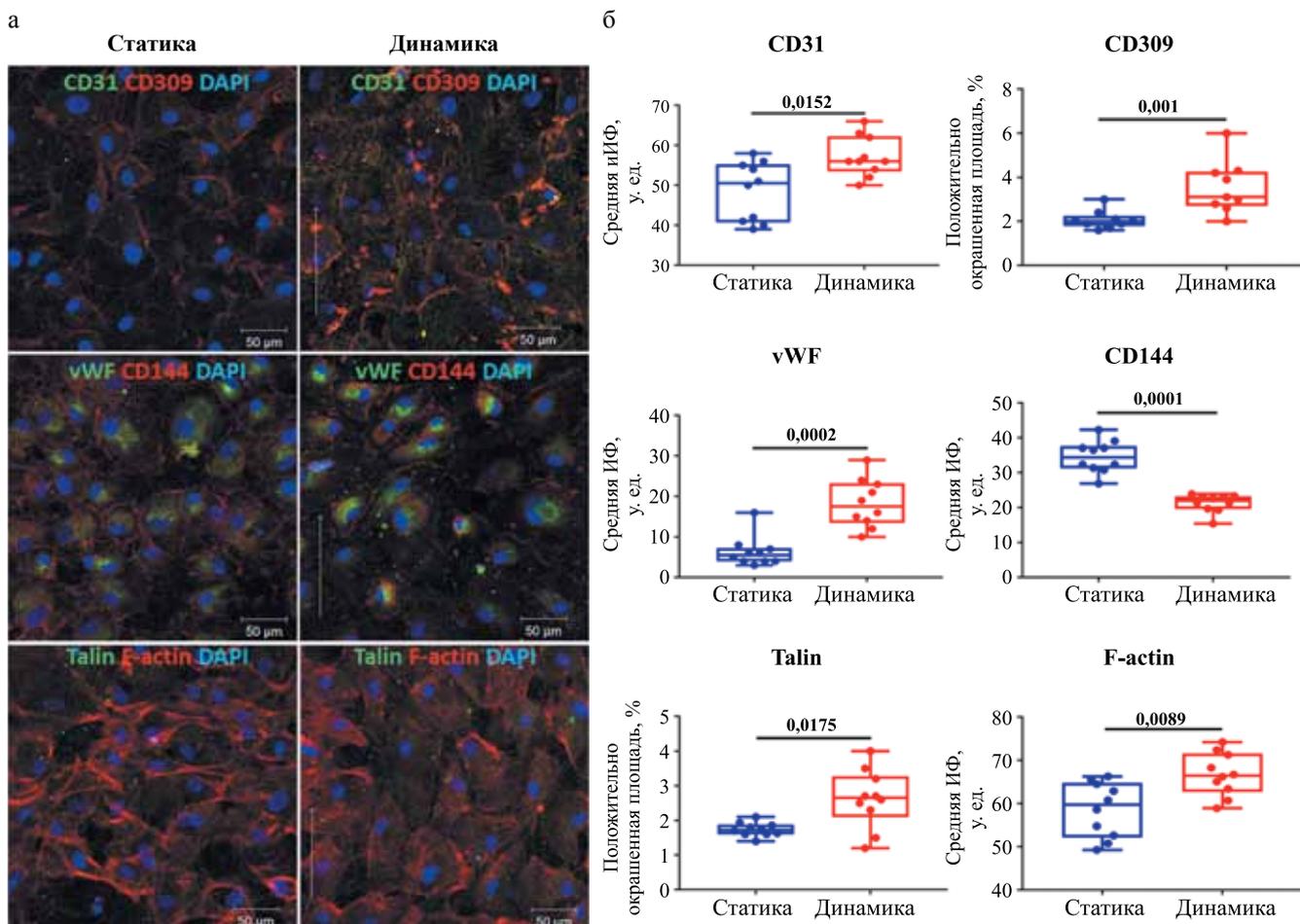


Рис. 4. Сочетанное иммунофлуоресцентное окрашивание колониформирующих эндотелиальных клеток, культивируемых в статических условиях («Статика») и в условиях пульсирующего потока с напряжением сдвига 2,85 дин/см<sup>2</sup> («Динамика»): CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. а – репрезентативные фотографии, сканирующая конфокальная микроскопия, ×200; б – количественный анализ; ИФ – интенсивность флуоресценции

Fig. 4. Combined immunofluorescence staining of ECFCs cultured under static conditions («Static») and under pulsatile flow conditions with 2.85 dyn/cm<sup>2</sup> shear stress («Dynamic»): CD31/CD309/DAPI; CD144/vWF/DAPI; F-actin/Talin/DAPI. а – representative photographs, scanning confocal microscopy, ×200; б – quantitative analysis; ИФ – fluorescence intensity

- 3) стимулирующие ангиогенез белки (48 ДЭГ в динамических против 33 ДЭГ в статических условиях);
- 4) белки, определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток (17 ДЭГ в динамических против 12 ДЭГ в статических условиях);
- 5) белки, способствующие миграции эндотелиальных клеток (21 ДЭГ в динамических против 15 ДЭГ в статических условиях);
- 6) белки, ответственные за регуляцию воспаления (20 ДЭГ в динамических против 16 ДЭГ в статических условиях) (рис. 5).

Именно мануальное аннотирование позволило установить различия ДЭГ КФЭК в ответ на пульсирующий поток во всех приведенных генных системах.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нативный эндотелиальный слой формирует непрерывный, избирательно проницаемый, устойчивый к тромбообразованию барьер между циркулирующей кровью и сосудистой стенкой. Именно эндотелий в большей степени подвергается напряжению сдвига, которое оказывается током крови. Мы предприняли попытку разработать клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра в условиях пульсирующего потока. Главной задачей было получить устойчивый к смыванию функциональный слой эндотелия на внутренней поверхности трансплантата. Эффективность выбранного протокола оценивали по формированию эндотелиального монослоя, его целостности и жизнеспособности, влиянию напряжения сдвига на фенотип эндотелиальных клеток.

Под воздействием пульсирующего потока клетки выравнивались относительно друг друга, формировали монослой и осуществляли межклеточные взаимодействия. Было установлено, что некоторые из этих сдвиговых реакций, например, выравнивание клеток, опосредованы рецепторами PECAM-1, VE-кадгерин

и VEGFR2 [19]. Эти рецепторы, обеспечивающие адгезию и формирующие монослой, осуществляют механотрансдукцию. Ламинарное напряжение сдвига способствует удлинению клеток и их ориентации вдоль стенки сосуда, активирует механосенсоры и внутриклеточные сигнальные пути, индуцирует экспрессию эндотелиальных генов и белков [20]. Таким образом, напряжение сдвига играет ведущую роль в сосудистом гомеостазе, обуславливая атеропротективные, антикоагулянтные и противовоспалительные функции [20–22].

Tondreau et al. получили полную эндотелизацию децеллюляризованного тканеинженерного сосудистого каркаса, изготовленного методом самосборки внеклеточного матрикса из фибробластов. Эндотелиальный монослой удалось воссоздать с применением культуры HUVEC и в условиях потока со скоростью 40 мл/мин и с напряжением сдвига 0,65 дин/м<sup>2</sup> в течение 1 недели [23].

Кроме того, было установлено, что постепенное увеличение воздействующей силы тока жидкости от 5 до 10 дин/см<sup>2</sup> способствовало адгезии клеток на уровне 99,31 ± 4,97% через 32 часа культивирования с почти полным монослоем HUVEC [24].

Группе Yazdani et al. удалось получить эффективную эндотелизацию при высоких значениях напряжения сдвига. Каркасы, полученные из децеллюляризованной сонной артерий свиньи (4–5 мм), заселяли аутологичными эндотелиальными клетками и предварительно кондиционировали в течение 9 дней. В исследовании были апробированы три режима: низкое постоянное напряжение сдвига LSS (1,7 дин/см<sup>2</sup>), высокое постоянное напряжение сдвига HSS (13,2 дин/см<sup>2</sup>) и циклическое высокое напряжение сдвига CSS (13,2 дин/см<sup>2</sup>, 60 уд./мин). Прекодиционирование протезов в условиях HSS и CSS привело к формированию монослоя и устойчивой адгезии, а также ориентации клеток в направлении

Таблица 2

**Характеристика ДНК-библиотек, приготовленных из РНК КФЭК, культивированных в статических условиях и условиях пульсирующего потока, и результаты их секвенирования**  
**Characterization of DNA-libraries prepared from samples RNA from CFECs, the cultured under static and pulsed flow conditions and the results of their sequencing**

Образец	ДНК-библиотеки, нуклеотидов	Покрывтие, млн ридов	Процент прочтений (hg38)	Процент прочтений (экзоны)
<i>КФЭК статика</i>				
S1	356	15,7	98,2	84,9
S2	354	14,5	98,4	84,5
S3	389	42,7	98,2	82,2
S4	360	9,5	98,2	84,1
<i>КФЭК динамика</i>				
D1	346	15,1	98,2	88,8
D2	351	15,5	98,3	89,8
D3	353	15,3	98,3	90,4

потока. В модели артериовенозного шунтирования предварительно кондиционированные трансплантаты в условиях HSS и CSS оставались неповрежденными, морфология клеток сохранялась, наблюдалось статистически значимое снижение прикрепления элементов крови, особенно тромбоцитов, по сравнению с другими условиями. Вестерн-блоттинг продемонстрировал увеличение экспрессии белка eNOS и простагландин-I-синтазы для клеток, кондиционированных циклическим высоким напряжением сдвига,

по сравнению с клетками, кондиционированными только высоким напряжением сдвига [25].

В исследовании коллектива A.J. Melchiorri в 2016 г. полимерные каркасы из PGA, заселенные ЭПК, подвергали низкому напряжению сдвига в 0,6 дин/см<sup>2</sup>, аналогичному венозной системе. Исследователи обнаружили усиление пролиферации, инфильтрации и дифференцировки ЭПК под влиянием динамической нагрузки. В динамически культивируемых трансплантатах наблюдали повышенную

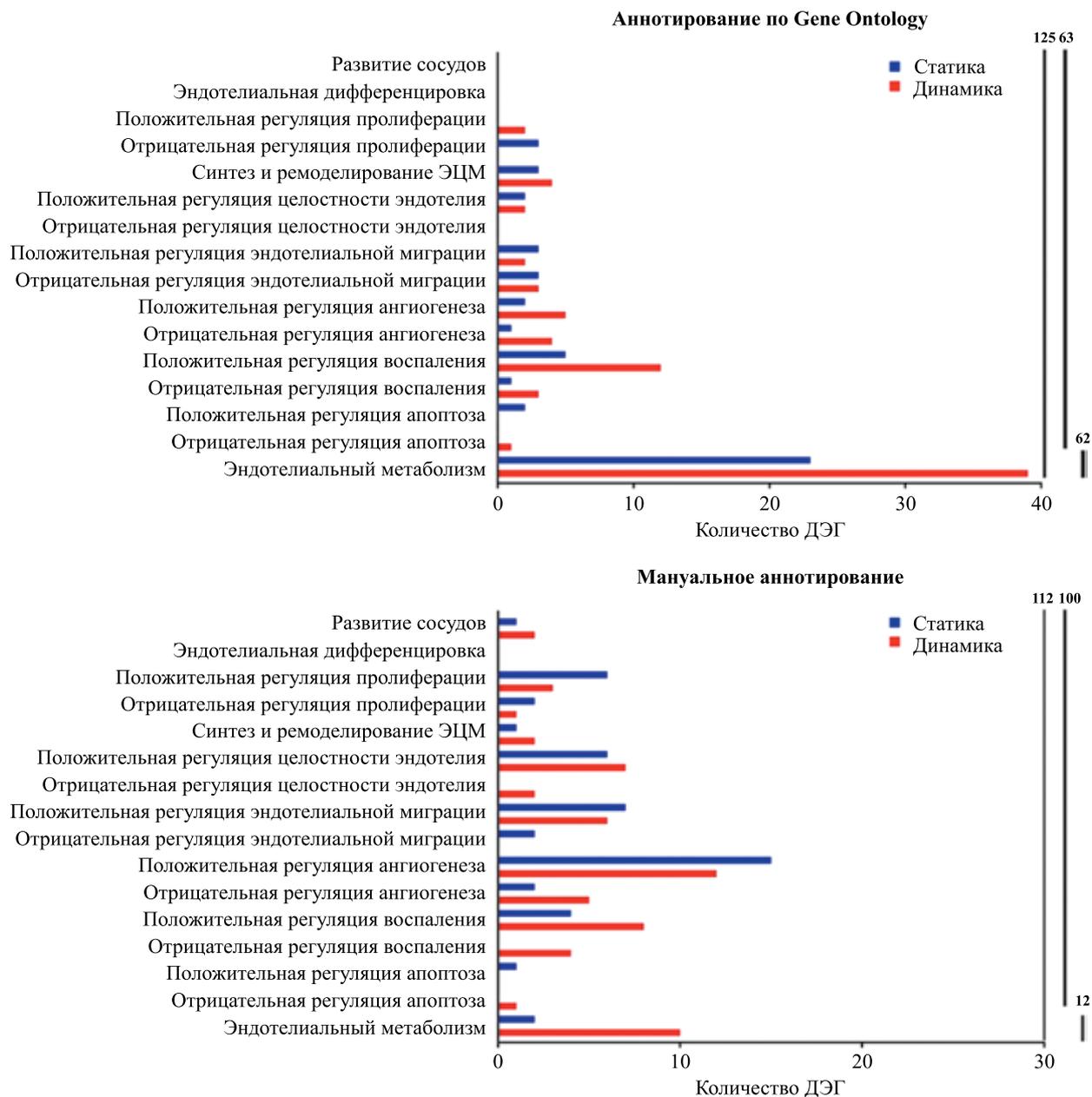


Рис. 5. Качественное и количественное сравнение профиля ДЭГ в КФЭК в статических условиях и при воздействии на них пульсирующего потока с напряжением сдвига в 2,85 дин/см<sup>2</sup> при помощи биоинформатического инструмента Gene Ontology и мануального аннотирования. ЭЦМ – экстрацеллюлярный матрикс

Fig. 5. Qualitative and quantitative comparison of the profile of DEGs in ECFC under static conditions and when exposed to pulsatile flow with 2.85 dyne/cm<sup>2</sup> shear stress using bioinformatic tool Gene Ontology and manual annotation. ЭЦМ – extracellular matrix

экспрессию функциональных эндотелиальных маркеров – vWF и VEGF по сравнению со статически культивированными ЭПК по результатам ПЦР [26].

В нормальных физиологических условиях динамический баланс между механическим напряжением сдвига и биологическими ответами поддерживает целостность эндотелия [27]. Напряжения сдвига, возникающие в результате различных схем потока, инициируют различные сигнальные события в эндотелии, включая механочувствительность, внутриклеточную передачу стресса, преобразование механической силы в биохимические сигналы и механизмы обратной связи [28–29]. Белки фокальной адгезии – динамический механочувствительный мультибелковый комплекс, который связывает рецепторы интегрина внеклеточного матрикса с внутриклеточным актином. Этот комплекс представлен множеством различных белков (винкулин, зиксин, талин, паксиллин), которые выполняют каркасные, адапторные и регуляторные функции [30–31]. Присутствие белков фокальной адгезии отражает реакцию клетки на внешнюю среду и позволяет адаптировать адгезию клеточного матрикса к составу и механическим свойствам внеклеточного матрикса [32–34].

Культивирование КФЭК на поверхности каркасов PNBV/PCL/фибрин в условиях пульсирующего потока изменило ориентацию клеток в направлении потока, привело к увеличению экспрессии специфических эндотелиальных маркеров CD31, CD309 и vWF и стимулировало экспрессию структурного белка F-actin и белка очаговой адгезии Talin. Помимо этого, в эндотелиальных клетках произошло повышение экспрессии генов, кодирующих белки:

- обеспечивающие развитие кровеносных сосудов;
- ответственные за регуляцию целостности эндотелия;
- стимулирующие ангиогенез;
- определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток;
- способствующие миграции эндотелиальных клеток;
- ответственные за регуляцию воспаления.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Создание персонифицированного биodeградируемого клеточнозаселенного сосудистого протеза малого диаметра становится возможным при использовании в качестве фидерного слоя аутологичного фибрина, а для клеточного заселения – аутологичной культуры КФЭК. Сформированные на внутренней поверхности протеза в условиях напряжения сдвига клетки эндотелиальной выстилки обладают повышенной синтетической активностью, способностью к адгезии, ориентированы по ходу пульсирующего потока. Напряжение сдвига также повлияло на транскриптом культуры клеток, повышая способность эн-

дотелия к миграции, пролиферации и сохранению целостности.

*Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований СО РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Song HG, Rumma RT, Ozaki CK, Edelman ER, Chen CS. Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical Promise. *Cell Stem Cell*. 2018; 22 (3): 340–354. doi: 10.1016/j.stem.2018.02.009.
2. Mallis P, Kostakis A, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. Future Perspectives in Small-Diameter Vascular Graft Engineering. *Bioengineering*. 2020; 7 (4): 160. doi: 10.3390/bioengineering7040160.
3. Ardila DC, Liou JJ, Maestas D, Slepian MJ, Badowski M, Wagner WR et al. Surface Modification of Electrospun Scaffolds for Endothelialization of Tissue-Engineered Vascular Grafts Using Human Cord Blood-Derived Endothelial Cells. *J Clin Med*. 2019; 8 (2): 185. doi: 10.3390/jcm8020185.
4. Braghirolli DI, Helfer VE, Chagastelles PC, Dalberto TP, Gamba D, Pranke P. Electrospun scaffolds functionalized with heparin and vascular endothelial growth factor increase the proliferation of endothelial progenitor cells. *Biomed Mater*. 2017; 12 (2): 025003. doi: 10.1088/1748-605X/aa5bbc.
5. Антонова ЛВ, Севостьянова ВВ, Кутихин АГ, Великанова ЕА, Матвеева ВГ, Глушкова ТВ и др. Влияние способа модифицирования трубчатого полимерного матрикса биомолекулами bFGF, SDF-1 $\alpha$  и VEGF на процессы формирования *in vivo* тканеинженерного кровеносного сосуда малого диаметра. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 96–109. Antonova LV, Sevostyanova VV, Kutikhin AG, Velikanova EA, Matveeva VG, Glushkova TV et al. Influence of bFGF, SDF-1 $\alpha$ , or VEGF incorporated into tubular polymer scaffolds on the formation of small-diameter tissue-engineered blood vessel *in vivo*. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 96–109. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2018-1-96-109.
6. Ando J, Yamamoto K. Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 15 (5): 1389–1403. doi: 10.1089/ars.2010.3361.
7. Chien S. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292 (3): H1209-24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.

8. *Bilodeau K, Mantovani D.* Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng.* 2006; 12 (8): 2367–2383. doi: 10.1089/ten.2006.12.2367.
9. *Plein A, Fantin A, Denti L, Pollard J, Ruhrberg C.* Erythromieloid progenitors contribute endothelial cells to blood vessels. *Nature.* 2018; 562 (7726): 223–228. doi: 10.1038/s41586-018-0552-x.
10. *Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000; 105 (1): 71–77. doi: 10.1172/JCI8071.
11. *Estes ML, Mund JA, Ingram DA, Case J.* Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr Protoc Cytom.* 2010; 52 (1): 9.33.1–9.33.11. doi: 10.1002/0471142956.cy0933s52.
12. *Lee PS, Poh KK.* Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells.* 2014; 6 (3): 355–366. doi: 10.4252/wjsc.v6.i3.355.
13. *Krawiec JT, Liao HT, Lily Kwan LY, D'Amore A, Weinbaum JS, Rubin JP et al.* Evaluation of the stromal vascular fraction of adipose tissue as the basis for a stem cell-based tissue-engineered vascular graft. *J Vasc Surg.* 2017; 66 (3): 883–890.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2016.09.034.
14. *Luo J, Qin L, Zhao L, Gui L, Ellis VW, Huang Y et al.* Tissue-engineered vascular grafts with advanced mechanical strength from human iPSCs. *Cell Stem Cell.* 2020; 26 (2): 251–261.e8. doi: 10/1016/j.stem.2019.12.012.
15. *Fukunishi T, Best CA, Ong CS, Groehl T, Reinhardt J, Yi T et al.* Role of Bone Marrow Mononuclear Cell Seeding for Nanofiber Vascular Grafts. *Tissue Engineering Part A.* 2018; 24 (1–2): doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0044.
16. *Matveeva VG, Khanova MYu, Sardin ES, Antonova LV, Barbarash OL.* Endovascular Interventions Permit Isolation of Endothelial Colony-Forming Cells from Peripheral Blood. *Int J Mol Sci.* 2018; 19 (11): 3453. doi: 10.3390/ijms19113453.
17. *Aper T, Kolster M, Hilfiker A, Teebken OE, Haverich A.* Fibrinogen Preparations for Tissue Engineering Approaches. *J Bioengineer & Biomedical Sci.* 2012; 2 (3): 115. doi: 10.4172/2155-9538.1000115.
18. *Великанова ЕА, Кутихин АГ, Матвеева ВГ, Тупикин АЕ, Кабилов МР, Антонова ЛВ.* Сравнение профиля генной экспрессии колониеформирующих эндотелиальных клеток из периферической крови человека и эндотелиальных клеток коронарной артерии. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2020; 9 (2): 74–81. *Velikanova EA, Kutikhin AG, Matveeva VG, Tupikin AE, Kabilov MR, Antonova LV.* Comparison of gene expression profiles of human peripheral blood derived endothelial colony-forming cells and coronary artery endothelial cells. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020; 9 (2): 74–81. [In Russ, English abstract]. doi: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-74-81.
19. *Chien S.* Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292 (3): H1209–24. doi: 10.1152/ajpheart.01047.2006.
20. *Davies PF.* Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6 (1): 16–26. doi: 10.1038/npc-cardio1397.
21. *Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B et al.* A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005; 437 (7057): 426–431. doi: 10.1038/nature03952.
22. *Nayak L, Lin Z, Jain MK.* «Go With the Flow»: How Krüppel-Like Factor 2 Regulates the Vasoprotective Effects of Shear Stress. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2011; 15 (5): 1449–1461. doi: 10.1089/ars.2010.3647.
23. *Yazdani SK, Tillman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL.* The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg.* 2010; 51 (1): 174–183. doi: 10.1016/j.jvs.2009.08.074.
24. *Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP.* In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016; 22 (7): 663–670. doi: 10.1089/ten.TEC.2015.0562.
25. *Tondreau MY, Laterreur V, Gauvin R, Vallières K, Bourget JM, Lacroix D et al.* Mechanical properties of endothelialized fibroblast-derived vascular scaffolds stimulated in a bioreactor. *Acta Biomater.* 2015; 18: 176–185. doi: 10.1016/j.actbio.2015.02.026.
26. *Liu J-X, Yan Z-P, Zhang Y-Y, Wu J, Liu X-H, Zeng Y.* Hemodynamic shear stress regulates the transcriptional expression of heparan sulfate proteoglycans in human umbilical vein endothelial cell. *Cell Mol Biol.* 2016; 62 (8): 28–34. doi: 10.14715/cmb/2016.62.8.5.
27. *Zhou J, Li Y-S, Chien S.* Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34 (10): 2191–2198. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.
28. *Davies PF.* Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6 (1): 16–26. doi: 10.1038/npc-cardio1397.
29. *Tzima E.* Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res.* 2006; 98 (2): 176–185. doi: 10.1161/01.RES.0000200162.94463.d7.
30. *Burridge K, Wittchen ES.* The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J Cell Biol.* 2013; 200 (1): 9–19. doi: 10.1083/jcb.201210090.
31. *Murphy KN, Brinkworth AJ.* Manipulation of Focal Adhesion Signaling by Pathogenic Microbes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (3): 1358. doi: 10.3390/ijms22031358.
32. *Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ.* Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1692 (2–3): 103–119. doi: 10.1016/j.bbamer.2004.04.007.
33. *Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA.* Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11 (9): 633–643. doi: 10.1038/nrm2957.
34. *Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM.* Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature.* 2010; 468 (7323): 580–584. doi: 10.1038/nature09621.

Статья поступила в редакцию 24.05.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 24.05.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-115-121

## ЭКСПРЕССИЯ ТКАНЕВЫХ ИНГИБИТОРОВ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ ТИПА 1 И 2 В СТОРОКАХ ЭКСПЛАНТИРОВАННЫХ БИОПРОТЕЗОВ КЛАПАНОВ СЕРДЦА – НОВАЯ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАРАЛЛЕЛЬ МЕЖДУ СТРУКТУРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ КЛАПАНА И КАЛЬЦИНИРУЮЩИМ АОРТАЛЬНЫМ СТЕНОЗОМ

*А.Е. Костюнин, Т.В. Глушкова, Л.А. Богданов, Е.А. Овчаренко*

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

**Цель:** изучить клеточную и липидную инфильтрацию, а также экспрессию тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП) типа 1 и 2 в створках биологических протезов клапанов сердца (БПК), explantированных по причине дисфункций. **Материал и методы.** Исследовано 17 створок от 6 БПК, иссеченных из аортальной и митральной позиций при репротезировании клапанов. Для выполнения микроскопического анализа фрагменты створок БПК замораживали и с помощью криотома изготавливали серийные срезы. С целью изучения клеточной инфильтрации и степени дегенеративных изменений протезного биоматериала срезы окрашивали гематоксилином Джилла и эозином, для оценки отложения липидов использовали окраску Oil Red. С целью типирования клеток и выявления ТИМП-1/-2 применяли иммуногистохимический метод. Анализ окрашенных образцов осуществляли методом световой микроскопии. **Результаты.** Клеточная и липидная инфильтрация ксенотканей выявлена во всех исследованных створках БПК. Клетки реципиентов коэкспрессировали панлейкоцитарный и макрофагальный маркеры РТРС/CD45 и CD68. Положительная окраска на ТИМП-1/-2 локализовалась с клеточными скоплениями, но отсутствовала в бесклеточных участках. **Заключение.** Клетки, проникающие в ксеногенные ткани БПК, экспрессируют ТИМП-1/-2. Это указывает на частичное сходство патофизиологии иммунного отторжения БПК с таковой кальцинирующего аортального стеноза.

*Ключевые слова:* биопротезы клапанов сердца, структурная дегенерация клапана, кальцинирующий аортальный стеноз, клеточная инфильтрация, липиды, тканевые ингибиторы металлопротеиназ.

## EXPRESSION OF TISSUE INHIBITORS OF METALLOPROTEINASES TYPE 1 AND TYPE 2 IN THE LEAFLETS OF EXPLANTED BIOPROSTHETIC HEART VALVES: A NEW PATHOGENETIC PARALLEL BETWEEN STRUCTURAL VALVE DEGENERATION AND CALCIFIC AORTIC STENOSIS

*A.E. Kostyunin, T.V. Glushkova, L.A. Bogdanov, E.A. Ovcharenko*

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

**Objective:** to study cellular and lipid infiltration, as well as the expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) types 1 and 2 in biological prosthetic heart valves (BPHVs) explanted due to dysfunction. **Material and Methods.** We examined 17 leaflets from 6 BPHVs, dissected from the aortic and mitral positions during valve replacement. For microscopic analysis, fragments of the BPHV leaflets were frozen and serial sections were made

**Для корреспонденции:** Костюнин Александр Евгеньевич. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый бульвар, 6. Тел. (900) 108-10-97. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

**Corresponding author:** Alexander Kostyunin. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation. Phone: (900) 108-10-97. E-mail: rhabdophis\_tigrina@mail.ru

using a cryotome. In order to study cellular infiltration and the degree of degenerative changes in the prosthetic biomaterial, the sections were stained with Gill's hematoxylin and eosin; Oil Red O stain was used to assess lipid deposition. Immunohistochemistry was used for cell typing and detection of TIMP-1/-2. The stained samples were analyzed by light microscopy. **Results.** Cellular and lipid infiltration of xenogeneic tissues was detected in all BPHV flaps studied. Recipient cells coexpressed pan-leukocyte and macrophage markers PTPRC/CD45 and CD68. Positive staining for TIMP-1/-2 co-localized with cell clusters but was absent in acellular sections. **Conclusion.** Cells infiltrating xenogeneic BPHV tissues express TIMP-1/-2. This suggests that BPHV immune rejection pathophysiology is partially similar to that of calcific aortic stenosis.

*Keywords: bioprosthetic heart valves, structural valve degeneration, calcific aortic stenosis, cellular infiltration, lipids, tissue inhibitors of metalloproteinases.*

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на развитие технологий в медицине, в настоящее время все еще не существует эффективных методов консервативного лечения тяжелых клапанных патологий, поэтому пораженные клапаны сердца заменяют механическими или биологическими протезами [1]. Биологические протезы клапанов сердца (БПК) изготавливают из химически стабилизированных тканей животного происхождения [2]. Они выгодно отличаются от механических аналогов низкой тромбогенностью, однако подвержены структурной дегенерации их биологической составляющей [3, 4]. Последняя проявляется разволокнением, фрагментацией и кальцификацией волокнистого компонента внеклеточного матрикса (ВМ) створчатого аппарата, становясь причиной регургитации или стенозирования БПК [3, 4]. Несмотря на современные достижения в области разработки методов химической модификации биоматериала и совершенствование дизайна БПК, данная проблема остается нерешенной, и до половины протезных клапанов требуют замены уже через 15 лет после имплантации пациентам [1].

Любопытно, что результаты современных исследований указывают на схожесть ряда патофизиологических черт структурной дегенерации биоматериала БПК и кальцинирующего аортального стеноза (КАС). Так, возникающие в пораженном нативном аортальном клапане (АК) дегенеративные изменения, связанные с развитием фиброза и кальцификации, обусловлены отложением липидов и макрофагальной инфильтрацией створок [5]. Исследования последних лет демонстрируют, что при дегенерации биоматериала БПК также наблюдается накопление в тканях липидов и иммунных клеток, что сопровождается продукцией матриксных металлопротеиназ (ММП) [6, 7]. Предполагают, что эти процессы могут вносить заметный вклад в деградацию ВМ протезного биоматериала [8]. В этой связи углубленное изучение патофизиологических закономерностей дегенерации БПК представляет значительный интерес, поскольку потенциально открывает дорогу к разработке меди-

каментозной терапии, нацеленной на замедление дегенерации и нативных клапанов сердца и их заменителей.

К одним из факторов, регулирующих ремоделирование ВМ нативных АК, относятся тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ТИМП) типа 1 и 2, сверхэкспрессируемые при КАС [9, 10]. ТИМП-1/-2 представляют собой многофункциональные белки, которые помимо ингибирования ММП играют роль сигнальных молекул, участвующих в регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировке клеток [11, 12]. Продукция клетками ТИМП-1/-2, как и ММП, указывает на их ремоделирующую активность в отношении ВМ. До настоящего времени не было опубликовано данных об экспрессии ТИМП в тканях БПК.

Целью настоящей работы явилось изучение клеточной и липидной инфильтрации створок эксплантационных по причине дисфункций БПК, а также выявление экспрессии ТИМП-1/-2 в тканях имплантатов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для настоящего исследования послужили эпоксиобработанные БПК производства ЗАО «НеоКор» (Россия), иссеченные из аортальной или митральной позиций у 6 пациентов при выполнении операций репротезирования клапанов в 2019–2020 гг. Средний возраст реципиентов при первичном протезировании клапанов составил  $54,5 \pm 10,5$  года. Средний срок функционирования изученных БПК –  $12 \pm 8$  лет. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. БПК включены в исследование с учетом наличия подписанного добровольного информированного согласия пациентов. Эндокардит, как причина дисфункции, являлся критерием исключения БПК из данного исследования.

После макроскопического описания БПК, полученных при реоперациях, осуществляли подготовку образцов для исследования материала на микроструктурном уровне. От каждого БПК производили забор центральной части 1–3 створок от основания

до свободного края, а также участки с выраженными дегенеративными изменениями, которые замораживали при температуре  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Затем с помощью криотома Microm HM 525 (Thermo Scientific, Германия) были подготовлены серийные срезы толщиной  $6 \pm 1\text{ }\mu\text{m}$ , размещенные на предметные стекла по 4–6 штук. В общей сложности изучено 17 образцов от 6 трансплантированных БПК, среди которых были ксеноаортальные протезы «КемКор» ( $n = 2$ ) и «ПериКор» ( $n = 2$ ), а также перикардальные модели «ЮниЛайн» ( $n = 1$ ) и «ТиАра» ( $n = 1$ ).

С целью изучения интенсивности инфильтрации клетками реципиента и определения степени дегенеративных изменений протезного биоматериала срезы окрашивали гематоксилином Джилла и эозином в соответствии с протоколом, оптимизированным для тканей элементов системы кровообращения [13]. Наличие липидов в структуре биоматериала БПК определяли посредством окраски срезов красителем Oil Red (Abcam, Великобритания). Для этого срезы фиксировали в 4% параформальдегиде (Sigma-Aldrich, США), затем промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (Sigma-Aldrich, США) и инкубировали в изопропанол в течение 5 минут. Далее их в течение 15 минут окрашивали Oil Red, промывали 60% изопропанолом и контрастировали с модифицированным гематоксилином Майера (Abcam, Великобритания). В заключение срезы промывали в водопроводной, а затем бидистиллированной воде и заключали под покровное стекло посредством Mowiol (Sigma-Aldrich, США).

Для типирования клеток и выявления ТИПМ-1/-2 применяли метод ручного иммуногистохимического окрашивания с использованием антител против РТПРС/CD45, CD68, ТИМП-1 и ТИМП-2 (Abcam PLC, Великобритания). Перед окрашиванием срезы 10 минут фиксировали при комнатной температуре 4% параформальдегидом с последующей трехкратной отмывкой (по 5 минут) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (рН 7,4) на шейкере (Polymax 1040, Heidolph, 25 об/мин). Иммуногистохимическую реакцию выполняли с помощью набора NovoLink Polymer Detection System (Leica Microsystems Inc., США) согласно модифицированному протоколу производителя. Сначала осуществляли блокировку эндогенной пероксидазы 4% раствором пероксида водорода (Peroxidase Block) в течение 5 минут. Затем срезы дважды отмывали в ФСБ и блокировали неспецифическое связывание антител 0,4% солевым раствором казеина со вспомогательными реагентами (Protein Block) в течение 60 минут. Первичные антитела разводили согласно протоколу производителя в 1% солевом растворе бычьего сывороточного

альбумина в пропорциях 1 : 1000, 1 : 2000 и 1 : 3000 для антител против CD68, ТИМП-1/2 и РТПРС/CD45 соответственно. Срезы инкубировали с антителами в темноте при  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, после чего трижды отмывали в ФСБ. При окрашивании на CD68 и ТИМП-2 срезы дополнительно обрабатывали 30 минут противомышиными кроличьими антителами (Post Primary) с последующей трехкратной отмывкой в ФСБ. Далее срезы инкубировали 30 минут с противокроличьими антителами (Novolink Polymer), а затем вновь трижды отмывали в ФСБ и 2 минуты обрабатывали 0,087% раствором диаминобензидина. Потом срезы отмывали бидистиллятом и помещали в гематоксилин (из набора) на 10 минут. После этого производили подсинение срезов в проточной воде (5 минут), их обезвоживание в трех сменах 95% этанола (по 5 минут) и просветление в 3 сменах ксилола (по 5 минут), заключая в конце под покровное стекло посредством Витрогель (БиоВитрум, Россия). В качестве контроля использовали интактные эпоксиобработанные ксеноткани: створки аортального клапана свиньи и бычий перикард, приобретенные у ЗАО «НеоКор» (Кемерово, Россия). Также на каждом стекле выделяли по одному срезу с отрицательным контролем первичного и вторичного антител.

Анализ образцов с гистологическими и иммуногистохимическими окрасками осуществляли с использованием светового микроскопа AxioImager A1 (Zeiss, Германия), обработку изображений производили с помощью программы AxioVision (Zeiss, Германия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Макроскопическое описание трансплантированных БПК

БПК, включенные в настоящее исследование, имели признаки первичной тканевой несостоятельности в виде отрывов створок в области комиссур, перфораций, а также признаков кальцификации (рис. 1). Отмечена фиксация створок по стойкам каркаса паннусом со стороны выводного отдела, что способствовало некоторому ограничению их подвижности. Паннус отмечен у 4 из 6 БПК, кальцификация – в разной степени для всех исследуемых имплантатов.

### Гистологическое исследование створок трансплантированных БПК

На микроструктурном уровне дегенеративные изменения биоматериала представлены в виде разрыхления и фрагментации коллагеновых волокон. Инфильтрация протезного биоматериала клетками реципиента выявлена во всех исследуемых образцах

(рис. 2). Клеточные инфильтраты были локализованы преимущественно на поверхности или в разрыхленных предповерхностных слоях ксеногенного ВМ

вблизи основания створок. Проникновение клеток вглубь биоматериала отмечено только для ксеноаортальных протезов, при этом наиболее массивные

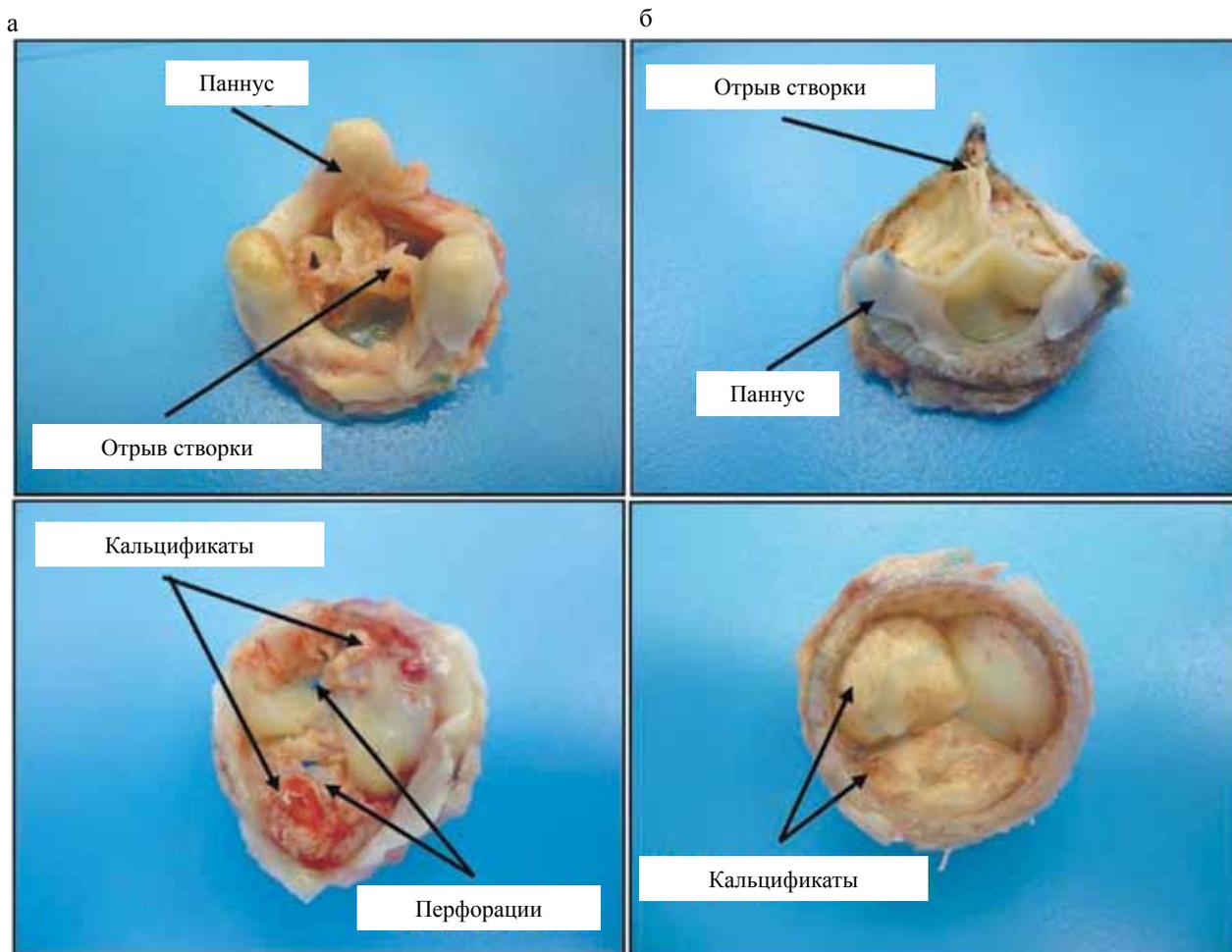


Рис. 1. Биопротезы клапанов сердца, удаленные по причине дисфункции: а – ксеноаортальный протез (ПериКор); б – ксеноперикардиальный протез (ЮниЛайн). Верхний и нижний ряд – вид со стороны выводящего и приточного отделов соответственно

Fig. 1. Heart valve bioprostheses removed due to dysfunction: а – xenoaortic prosthesis (PeriCor); б – xenopericardial prosthesis (UniLine). Upper and lower rows – view from the outflow and inflow side, respectively

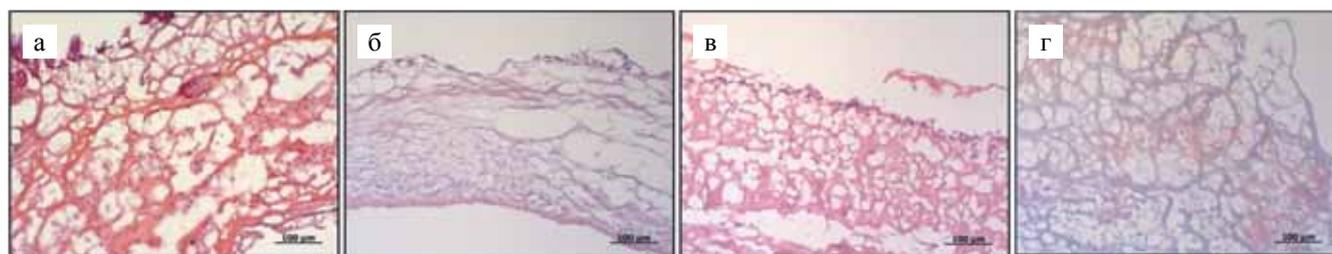


Рис. 2. Клеточная и липидная инфильтрация створок биопротезов клапанов сердца: а – крупный клеточный инфильтрат вблизи кальцификата (окраска гематоксилином Джилла и эозином, Г-Э); б и в – клеточная инфильтрация поверхностных слоев ксеноткани ксеноаортального и ксеноперикардиального протеза соответственно (Г-Э); г – липидные пятна в толще протезных створок (окраска Oil Red)

Fig. 2. Cellular and lipid infiltration of heart valve bioprostheses leaflets: а – large cellular infiltrate near the calcific (Gill's hematoxylin and eosin staining); б and в – cellular infiltration of the surface layers of xenogenic tissue of the xenoaortic and xenopericardial prosthesis respectively (Gill's hematoxylin and eosin); г – lipid spots in the thickness of the prosthetic leaflets (Oil Red O stain)

клеточные инфильтраты зафиксированы вблизи перфораций и крупных кальцификатов, где наблюдалось выраженное разволокнение ВМ. В большей степени клеточной инфильтрации биоматериал был подвержен со стороны выводного отдела.

Присутствие липидной инфильтрации в разной степени отмечено для всех исследуемых образцов. При этом локализация липидов не зависела от наличия клеток во ВМ. Образцы интактных эпоксиобработанных ксенотканей не показали положительного окрашивания красителем Oil Red (данные не показаны).

### Иммуногистохимический анализ створок эксплантированных БПК

Результаты иммуногистохимического окрашивания срезов продемонстрировали, что большинство клеток в инфильтратах коэкспрессируют панлейкоцитарный и макрофагальный маркеры РТПРС/CD45 и CD68, что позволяет идентифицировать их как макрофаги (рис. 3). Также удалось установить,

что эти клетки являются источником ТИМП-1/-2. Положительная окраска на указанные молекулярные агенты отмечена во всех изученных образцах в локализации с клеточными инфильтратами (рис. 4). Окрашивания на ТИМП-1/-2 в бесклеточном ВМ не отмечено.

Во всех контролях положительной окраски на РТПРС/CD45, CD68 и ТИМП-1/-2 не выявлено (данные не показаны).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные хорошо согласуются с результатами других оригинальных исследований, направленных на изучение клеточной и липидной инфильтрации ксенотканей БПК [6, 7], а также подтверждают выводы, сделанные нашей группой ранее [14]. Окрашивание большинства клеток на маркеры РТПРС/CD45 и CD68 указывает на преобладание макрофагов в составе клеточных инфильтратов, формирующихся в створках БПК. Важно отметить, что макрофаги доминируют вне зависимости от сроков

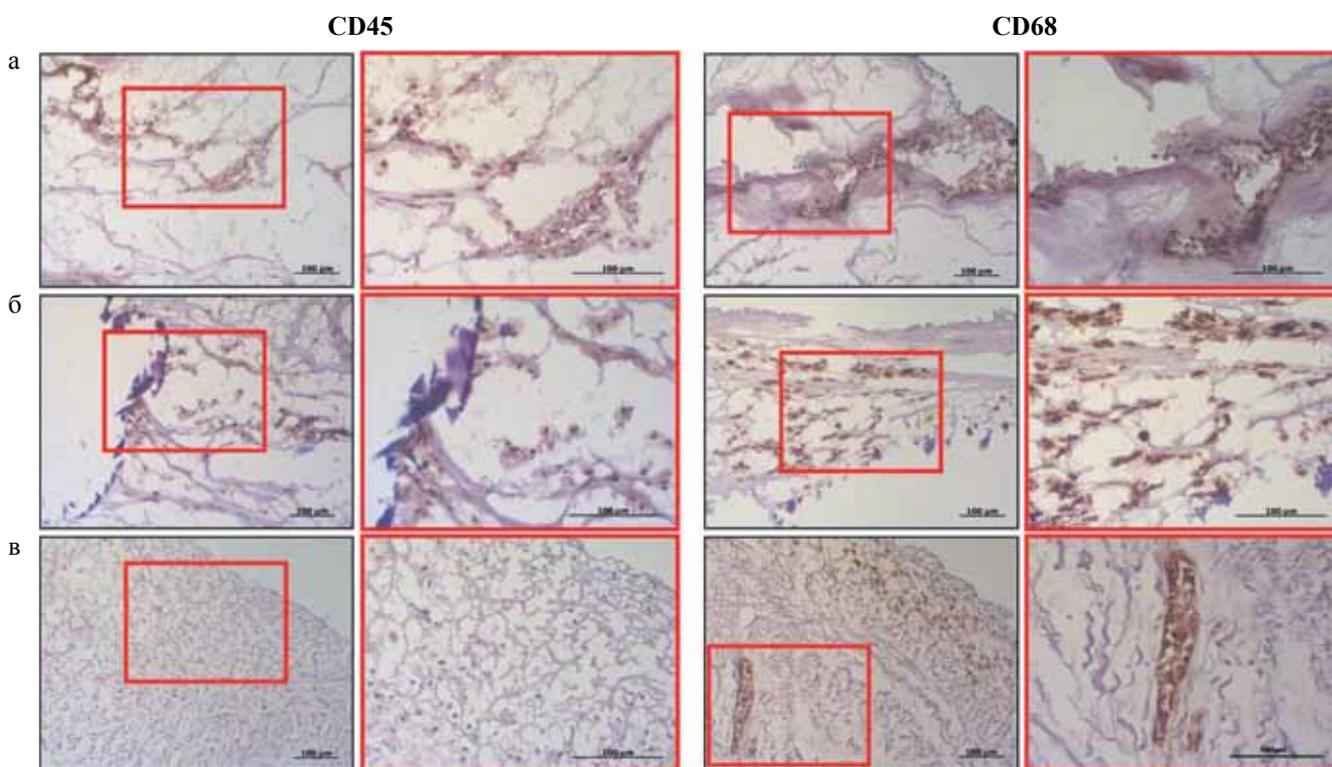


Рис. 3. Результаты иммуногистохимического окрашивания створок биопротезов клапанов сердца на РТПРС/CD45 и CD68: а – скопления иммунных клеток в разрыхленных подповерхностных слоях створок ксеноаортальных протезов; б – крупные воспалительные инфильтраты вблизи кальциевых отложений в створках ксеноаортальных протезов; в – диффузная клеточная инфильтрация поверхностных слоев створок ксеноперикардиальных протезов. Обратите внимание на проникновение макрофагов вглубь ксеноперикарда благодаря псевдососудам

Fig. 3. Results of immunohistochemical staining of cardiac valve bioprosthesis leaflets for PTPRC/CD45 and CD68: а – clusters of immune cells in the loosened subsurface layers of xenogeneic prosthesis leaflets; б – large inflammatory infiltrates near calcium deposits in xenogeneic prosthesis leaflets; в – diffuse cellular infiltration of the surface layers of xenogeneic prosthesis leaflets. Pay attention to the penetration of macrophages deep into the xenopericardium due to the pseudovessels

функционирования имплантатов. Это указывает на хронический тип воспалительной реакции, возникающей в ответ на имплантацию БПК. Любопытно, что воспаление в створках нативных АК, являющееся движущей силой КАС, также имеет хронический характер [5].

Отложение липидов в створках БПК зарубежных и отечественных моделей ранее уже изучали, хотя точный вклад в структурное разрушение протезного биоматериала до сих пор не установлен [6, 15]. Потенциально накопление липидов может способствовать активации окислительных процессов в створках. Было продемонстрировано, что биологическая составляющая БПК в значительной степени подвержена разрушению через окислительно-зависимые механизмы [16]. Кроме того, поглощение липидов макрофагами стимулирует перерождение последних в пенные клетки, которые встречаются в тканях БПК [15]. Пенные клетки секретируют широкий спектр биоактивных соединений, включающий хемокины, митогены и факторы роста, поэтому они могут стимулировать миграцию фибробластов, их пролиферацию и синтез соединительной ткани. Этот процесс свойственен патогенезу КАС, где он ответственен за фиброз и склерозирование створок АК [5]. По-видимому, он также отчасти стоит за формированием паннуса на поверхности БПК.

Нами впервые было установлено, что инфильтрирующие створки БПК клетки экспрессируют ТИМП-1/-2, но клиническое значение этого явления пока

неизвестно. Эксперименты на нокаутных мышах показывают, что сверхэкспрессия ТИМП-1/-2 имеет антиатерогенное действие за счет подавления активности ММП и уменьшения воспалительного ответа в сосудах [17]. Предполагается, что ТИМП-1/-2 могут играть сходную роль в пораженных нативных АК, при этом увеличение экспрессии данных факторов является рефлекторным механизмом, защищающим ВМ от протеолитической деградации [10]. Экспрессия ТИМП-1/-2 в тканях БПК может иметь как положительное, так и отрицательное значение. Ранее нами было установлено, что инфильтрирующие БПК макрофаги продуцируют ММП [14]. Таким образом, ТИМП-1/-2 могут защищать протезный биоматериал от протеолиза. В то же время снижение активности протеолитических ферментов может способствовать разрастанию соединительной ткани поверх створок БПК. Для проверки представленных гипотез необходимы дальнейшие исследования.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ксеногенный биоматериал БПК подвержен накоплению липидов, а также инфильтрации иммунными клетками, которые, в свою очередь, экспрессируют ТИМП-1/-2. Эти наблюдения указывают на частичное сходство патофизиологии структурной дегенерации биоматериала БПК с таковой КАС. Непосредственный вклад ТИМП-1/-2 в развитие дисфункций БПК в настоящее время не установлен и требует изучения.

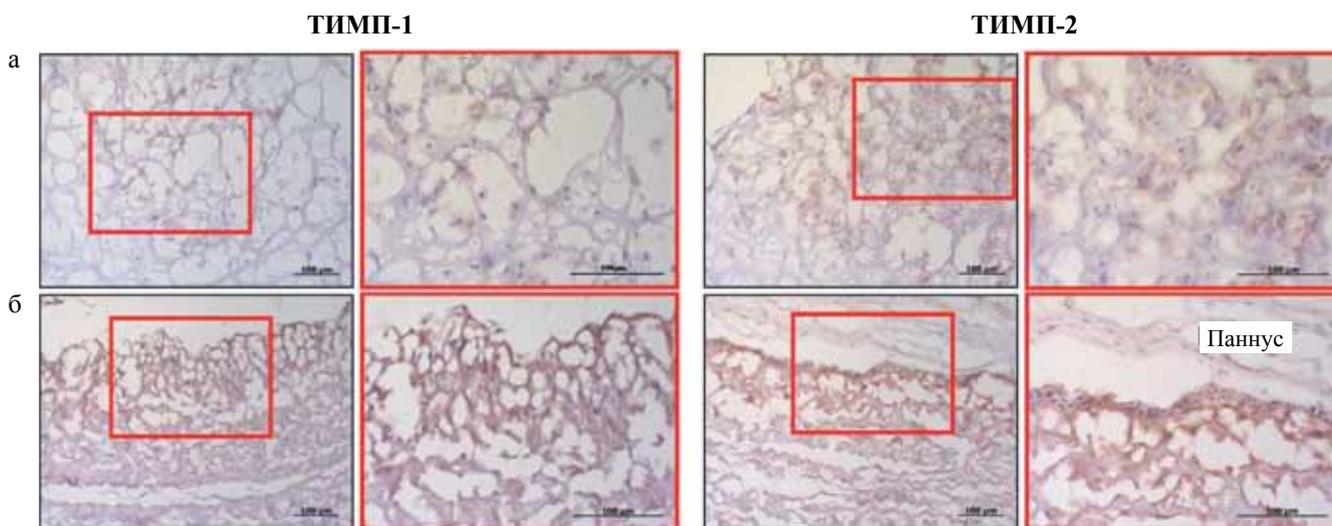


Рис. 4. Результаты иммуногистохимического окрашивания створок биопротезов клапанов сердца на ТИМП-1/-2: а – окрашивание инфильтратов в толще створок ксеноаортальных протезов; б – окрашивание инфильтратов, расположенных в поверхностных слоях биоматериала ксеноперикардальных протезов

Fig. 4. The results of immunohistochemical staining of heart valve bioprosthesis leaflets for TIMP-1/-2: а – staining of infiltrates in the thickness of xenoaortic prosthesis leaflets; б – staining of infiltrates located in the surface layers of the xenopericardial prosthesis biomaterial

Настоящая работа выполнена в рамках комплексной программы фундаментальных научных исследований по фундаментальной теме НИИ КПССЗ № 0546-2019-0002 «Патогенетическое обоснование разработки имплантатов для сердечно-сосудистой хирургии на основе биосовместимых материалов, с реализацией пациент-ориентированного подхода с использованием математического моделирования, тканевой инженерии и геномных предикторов».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Pibarot P, Dumesnil JG. Prosthetic heart valves: selection of the optimal prosthesis and long-term management. *Circulation*. 2009; 119 (7): 1034–1048. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.778886.
2. Овчаренко ЕА, Клышников КЮ, Глушкова ТВ, Нуштаев ДВ, Кудрявцева ЮА, Саврасов ГВ. Выбор ксеноперикардального лоскута для створчатого аппарата транскатетерных биопротезов клапанов сердца. *Медицинская техника*. 2015; 5: 1–4. Ovcharenko EA, Klyshnikov KYu, Glushkova TV, Nushtaev DV, Kudryavtseva YuA, Savrasov GV. The choosing of the xenopericardial patch for transcatheter heart valve. *Medical equipment*. 2015; 5: 1–4. [In Russ].
3. Capodanno D, Petronio AS, Prendergast B, Eltchaninoff H, Vahanian A, Modine T et al. Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: a consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2017; 38 (45): 3382–3390. doi: 10.1093/eurheartj/ehx303.
4. Dvir D, Bourguignon T, Otto CM, Hahn RT, Rosenhek R, Webb JG et al. Standardized definition of structural valve degeneration for surgical and transcatheter bioprosthetic aortic valves. *Circulation*. 2018; 137 (4): 388–399. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030729.
5. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Jung B, Lancellotti P, Otto CM et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16006. doi: 10.1038/nrdp.2016.6.
6. Shetty R, Pibarot P, Audet A, Janvier R, Dagenais F, Perron J et al. Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39 (6): 471–480. doi: 10.1111/j.1365-2362.2009.02132.x.
7. Simionescu A, Simionescu DT, Deac RF. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. *Cardiovasc Pathol*. 1996; 5 (6): 323–332. PMID: 25851789.
8. Cote N, Pibarot P, Clavel MA. Incidence, risk factors, clinical impact, and management of bioprosthesis structural valve degeneration. *Curr Opin Cardiol*. 2017; 32 (2): 123–129. doi: 10.1097/HCO.0000000000000372.
9. Bosse Y, Miqdad A, Fournier D, Pepin A, Pibarot P, Mathieu P. Refining molecular pathways leading to calcific aortic valve stenosis by studying gene expression profile of normal and calcified stenotic human aortic valves. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009; 2 (5): 489–498. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.820795.
10. Fondard O, Detaint D, Jung B, Choqueux C, Adle-Biasette H, Jarraya M et al. Extracellular matrix remodelling in human aortic valve disease: the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors. *Eur Heart J*. 2005; 26 (13): 1333–1341. doi: 10.1093/eurheartj/ehi248.
11. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol*. 2015; 44–46: 247–254. doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.005.
12. Ries C. Cytokine functions of TIMP-1. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71 (4): 659–672. doi: 10.1007/s00018-013-1457-3.
13. Богданов ЛА, Кутихин АГ. Оптимизация окрашивания элементов системы кровообращения и гепатолиенальной системы гематоксилином и эозином. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2019; 4 (4): 70–77. Bogdanov LA, Kutikhin AG. Optimization of hematoxylin and eosin staining of heart, blood vessels, liver, and spleen. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2019; 4 (4): 70–77. [in Russian]. doi: 10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77.
14. Костюнин АЕ, Глушкова ТВ. Первые результаты изучения экспрессии матриксных металлопротеиназ-1/-2/-9/-12 в ксеногенных тканях эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца, эксплантированных по причине дисфункций. *Российский кардиологический журнал*. 2020; 25 (10): 49–55. Kostyunin AE, Glushkova TV. The first results of the study of matrix metalloproteinases-1/-2/-9/-12 expression in xenogenic tissues of epoxy-treated bioprosthetic heart valves explanted due to dysfunctions. *Russian Journal of Cardiology*. 2020; 25 (10): 49–55. doi: 10.15829/1560-4071-2020-3978.
15. Kostyunin A, Mukhamadiyarov R, Glushkova T, Bogdanov L, Shishkova D, Osyayev N et al. Ultrastructural pathology of atherosclerosis, calcific aortic valve disease, and bioprosthetic heart valve degeneration: commonalities and differences. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (20): E7434. doi: 10.3390/ijms21207434.
16. Lee S, Levy RJ, Christian AJ, Hazen SL, Frick NE, Lai EK et al. Calcification and oxidative modifications are associated with progressive bioprosthetic heart valve dysfunction. *J Am Heart Assoc*. 2017; 6 (5). pii: e005648. doi: 10.1161/JAHA.117.005648.
17. Di Gregoli K, George SJ, Jackson CL, Newby AC, Johnson JL. Differential effects of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 on atherosclerosis and monocyte/macrophage invasion. *Cardiovasc Res*. 2016; 109 (2): 318–330. doi: 10.1093/cvr/cvv268.

Статья поступила в редакцию 27.01.2021 г.

The article was submitted to the journal on 27.01.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-122-133

## ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

*А.Е. Гордеева, М.Г. Шаратов, В.И. Новоселов*

Институт биофизики клетки ФИЦ «ПНЦБИ РАН», Пушкино, Российская Федерация

**Цель:** исследовать роль пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния ишемизированной изолированной почки при перфузии. **Материалы и методы.** В работе была использована модель изолированной перфузируемой почки крысы. Срок ишемии составил 5 и 20 минут, перфузия – 50 минут. Для оценки эффективности пероксиредоксина 6 при разной продолжительности ишемии использовали общепринятые критерии функционирования почки и гистологические методы. **Результаты.** На коротких сроках тепловой ишемии экзогенный Prx6 улучшает морфофункциональное состояние изолированной почки при перфузии. В этот период основные критерии функционирования изолированной ишемизированной почки достигают допустимых значений, почечная паренхима без выраженных повреждений. К концу перфузии отмечается увеличение скорости потока мочи, скорости клубочковой фильтрации, фракционной реабсорбции глюкозы, концентрации мочевины в моче и доли первичной мочи от 1,5 до 2 раз по сравнению с контрольным поражением. При 20-минутной ишемии изолированную почку можно признать нежизнеспособной по критериям функционирования, и положительный эффект пероксиредоксина 6 нивелируется. **Заключение.** Применение рекомбинантного пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния изолированных почек может быть эффективным подходом в предупреждении ишемически-реперфузионных поражений органов.

*Ключевые слова:* изолированная почка, ишемия, перфузия, пероксиредоксин.

## THE EFFECT OF EXOGENOUS PEROXIREDOXIN 6 ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF ISOLATED RAT KIDNEY

*A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, V.I. Novoselov*

Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to investigate the role of peroxiredoxin 6 (PRX6) in preserving the morphofunctional state of ischemic isolated kidney during perfusion. **Materials and methods.** The model of an isolated perfused rat kidney was used. Ischemia time was 5 and 20 minutes, perfusion was 50 minutes. To evaluate the effectiveness of PRX6 at different ischemia times, we used the conventional criteria of kidney function and histological methods. **Results.** During short warm ischemia times, exogenous PRX6 improves the morphofunctional state of an isolated kidney during perfusion. During this period, the main criteria for functioning of the isolated ischemic kidney reach acceptable values, renal parenchyma is without severe damage. By the end of perfusion, there was an increase in urine flow rate, glomerular filtration rate, fractional glucose reabsorption, urine urea concentration and proportion of primary urine from 1.5 to 2 times compared with the control lesion. At 20-minute ischemia, the isolated kidney can be recognized as non-viable according to the functioning criteria; the positive effect of PRX6 is leveled. **Conclusion.** The use of recombinant peroxiredoxin 6 for preserving the morphofunctional state of isolated kidneys can be an effective approach in preventing ischemia–reperfusion injury.

*Keywords:* isolated kidney, ischemia, perfusion, peroxiredoxin.

**Для корреспонденции:** Гордеева Алина Евгеньевна. Адрес: 142290, Пушкино, ул. Институтская, д. 3. Тел. (496) 773-05-61. E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

**Corresponding author:** Alina Gordeeva. Address: 3, Institutskaya str., Pushchino, 142290, Russian Federation. Phone: (496) 773-05-61. E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Популярность использования изолированной почки в качестве предмета исследования обусловлена удобством ее применения для изучения секреторной функции почек, метаболизма лекарственных препаратов, скрининга клинически значимых лекарственных взаимодействий и многих аспектов почечного метаболизма без системных влияний, таких как артериальное давление, гормоны или нервная иннервация [1–3]. Изолированная почка представляет собой модель *ex vivo*, которая состоит из целой почки, изолированной от сосудистой сети. Можно выделить две модификации модели. Большинство исследователей используют модификацию, описанную Nishiitsutsuji-Uwo et al., – перфузия почки через верхнюю мезентеральную артерию без периода ишемии [4, 5]. Вторая модификация – перфузия почки ретроградно, через брюшную аорту без периода ишемии [3, 6]. Для интерпретации результатов важно, чтобы изолированная почка функционировала в течение всего периода перфузии. Для оценки функционирования используют ряд критериев [1]. В настоящей работе мы использовали модель ретроградной перфузии почки, принципиальным моментом было наличие периода ишемии изолированной почки.

Ишемия и последующая реперфузия органа приводит к активации патологических процессов, в частности, запускает лавинообразный рост активных форм кислорода и развитие окислительного стресса, тем самым приводя к структурно-функциональному поражению тканей [7, 8]. Именно ишемически-реперфузионное поражение (И-РП) является основной причиной первичной дисфункции трансплантата и снижения его жизнеспособности [9]. В этом случае для снижения концентрации активных форм кислорода и уменьшения поражения изолированных органов основным направлением терапии может стать использование антиоксидантных препаратов, в частности, использование антиоксидантных ферментов семейства пероксиредоксинов, в связи с их широким распространением в организме и мультифункциональностью [10–13]. Среди представителей семейства пероксиредоксину 6 (Prx6) посвящено наибольшее количество работ, указывающих на его протекторную роль при свободно-радикальных патологиях [8, 14–16], в том числе и в защите изолированных органов от И-РП [17, 18]. Учитывая протекторную роль Prx6, следует изучить возможность его применения для сохранения морфофункционального состояния изолированной ишемизированной почки.

**Цель:** исследовать роль пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния ишемизированной изолированной почки при перфузии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар весом 230 г. Животных содержали в условиях вивария ИБК РАН (г. Пущино Московской области). Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей, 1986». Основной документ, регламентирующий проведение настоящего исследования, – «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011.

Рекомбинантный Prx6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН по ранее описанной методике [19].

В работе была использована модель изолированной перфузируемой почки (ИПП) предложенная J. Czogalla et al., с некоторыми модификациями [3]. Крысы были наркотизированы путем внутривенного введения 0,5 мл 3,5% (3 мг/кг) зоветила 100. Для предотвращения свертываемости крови использовали гепарин (5000 ЕД/мл). Ишемия была инициирована проведением декапитации. Было выбрано два временных периода ишемии: 5 и 20 минут. Время перфузии составляет 50 минут. В качестве раствора для перфузии использовали питательную среду DMEM (GIBCO, Invitrogen) с содержанием глюкозы 4,5 г/л. В среду включали мочевины (5 мМ/литр), креатинин (80 мкМ/литр), 6% БСА и 0,6% БСА. Перед перфузией раствор оксигенировали смесью O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95%/5%), pH 7,4. Температура раствора субнормотермическая (30–35 °С). Алгоритм перфузии изолированной почки представлен на рис. 1.

*Период ишемии.* С началом ишемии в течение 5 минут производили изолирование правой почки от общей сосудистой системы путем последовательного наложения лигатур на сосуды и катетеризацию почечной артерии через брюшную аорту. Дополнительно проводили отсечение нижней полой вены с ее последующей катетеризацией. Правый мочеточник был изолирован, катетеризирован и помещен в резервуар для сбора мочи [3, 20]. Через 5 минут ишемии производили удаление крови из сосудистого русла изолированной почки путем ее промывки перфузионным буфером в течение 5 минут. Для определения эффектов экзогенного пероксиредоксина 6 в перфузионный буфер добавляли Prx6 в концентрации 0,2 мг/мл и перфузировали им изолированную почку на этапе удаления крови из сосудистого русла. Скорость перфузии на данном этапе – 3 мл/мин. Концентрация экзогенного Prx6 в перфузионном растворе была выбрана на основании полученных ранее данных по эффективному снижению И-Р поражения тонкого кишечника и почек с помощью Prx6 [8, 14].

**Период перфузии.** По окончании ишемии производили перфузию изолированной почки перфузионным буфером в течение 50 минут. На данном этапе Prx6 в перфузионном буфере отсутствует. Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период. В течение всего срока перфузии каждые 10 минут осуществляли сбор мочи из мочеточника. По окончании перфузии почечная ткань фиксировалась для дальнейшего исследования. Все крысы были разделены на 10 групп (n = 5) (табл. 1).

Для оценки эффективности Prx6 как средства для сохранения морфофункциональных характеристик изолированной почки в течение всего периода перфузии анализировали несколько общепринятых критериев функционирования [1]. Величину этих критериев определяли в исследуемых пробах мочи каждые 10 минут.

– Перфузионное давление (ПД), мм рт. ст., поддерживалось на уровне 90–100 мм рт. ст. и регулировалось изменением скорости перфузионного

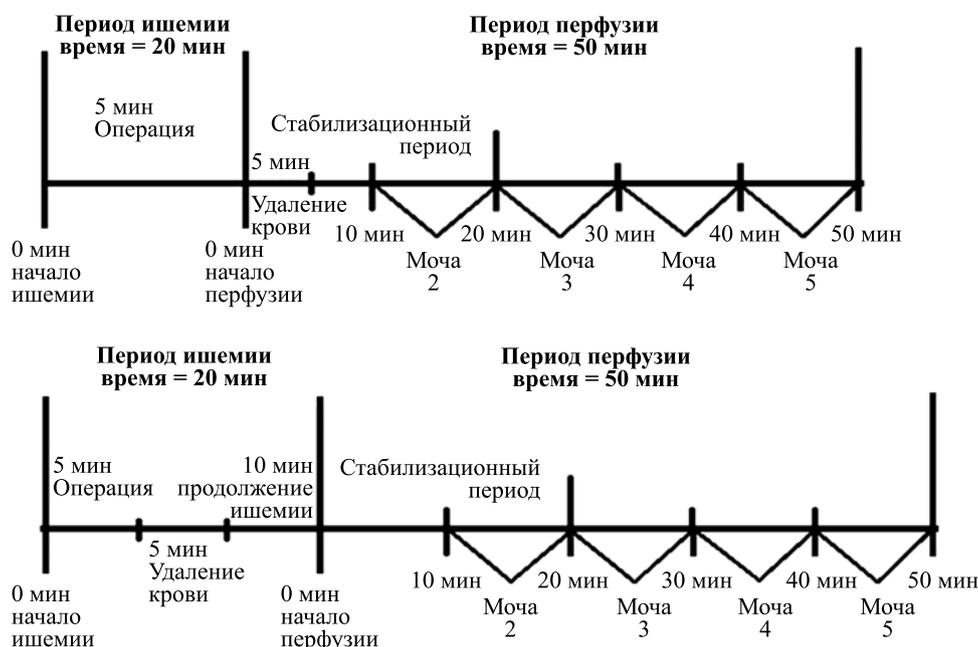


Рис. 1. Алгоритм перфузии изолированной почки: а – период ишемии 5 минут; б – период ишемии 20 минут. Prx6 (0,2 мг/мл) был добавлен в перфузионный буфер на этапе удаления крови. На этапе перфузии Prx6 в перфузионном буфере отсутствует

Fig. 1. Isolated kidney perfusion algorithm: а – ischemia time 5 min; б – ischemia time 20 min. Prx6 (0,2 mg/ml) was added to perfusion buffer at the stage blood removal. There is no Prx6 in the perfusion buffer during the perfusion period

Таблица 1

**Экспериментальные группы**

**Experimental groups**

Экспериментальная группа	Время ишемии (мин)	Добавка / этап внесения добавки в перфузионный буфер
1	5	6% БСА / перфузионный период
2		0,6% БСА / перфузионный период
3		Без добавок
4		Prx6 / этап удаления крови
5		6% БСА / перфузионный период
6	20	0,6% БСА / перфузионный период
7		Без добавок
8		Prx6 / этап удаления крови
9		0
10	90	Перфузии нет

*Примечание.* БСА находился в перфузате на этапе перфузии. Prx6 находился в перфузате на этапе удаления крови. Группа 9 – почки интактных животных, группа 10 – почки, без периода перфузии.

*Note.* BSA was in perfusate at the perfusion period. Prx6 was in perfusate at the blood removal period. Group 9 – kidneys of intact animals, group 10 – kidneys, without perfusion period.

- потока (СПП). СПП считалась удовлетворительной, если соответствовала скорости почечного кровотока в норме – 4–5,3 мл/мин·г почки [21].
- Скорость потока мочи (СПМ), мкл/мин, рассчитывали путем деления собранного объема мочи из мочеточника на время. Первый сбор мочи стартовал через 20 мин после начала перфузии, так как первые 15 минут мочеиспускание было нерегулярным. Значения СПМ ниже 30 мкл/мин неудовлетворительные и указывают на отсутствие процессов ультрафильтрации [1].
  - Скорость клубочковой фильтрации (СКФ), мл/мин·г, определяли по клиренсу креатинина с использованием уравнения [5]:

$$СКФ = \frac{M_{кр} \times СПМ}{П_{кр}},$$

- где  $M_{кр}$  – концентрация креатинина в моче (мг/мл); СПМ – скорость потока мочи (мл/мин);  $П_{кр}$  – концентрация креатинина в перфузате (мг/мл). Минимально допустимое значение для СКФ >0,5 мл/мин [6]. Концентрацию креатинина в исследуемых пробах мочи и перфузата определяли на приборе Reflotron Plus («Roche Diagnostics», Швейцария) каждые 10 минут.
- Фракция реабсорбированной глюкозы (ФРГ), %, выражается как доля глюкозы из ультрафильтрата, реабсорбированного почками [1, 5]:

$$ФРГ = 1 - \frac{СПМ \times M_{гл}}{СКФ \times П_{гл}},$$

- где  $M_{гл}$  – концентрация глюкозы в моче;  $П_{гл}$  – концентрация глюкозы в перфузате; СКФ – скорость клубочковой фильтрации. Концентрацию глюкозы в исследуемых пробах мочи определяли на глюкометре Accu-Chek (Roche, Germany) каждые 10 минут. ФРГ отражает функциональность проксимальных каналов и в модели ИПП должна быть не менее 90% [1, 2].
- Доля терминальной мочи (ДТМ), %, выражается как отношение: количество терминальной мочи в пробе / СКФ. Данный критерий отражает % ультрафильтрата, который выделяется как терминальная моча [22].
  - Количество мочевины в моче (КММ), мкмоль/10 мин, определяли как произведение: концентрация мочевины в пробе мочи × количество вторичной мочи в пробе. Концентрацию мочевины в исследуемых пробах мочи определяли на приборе Reflotron Plus («Roche Diagnostics», Швейцария) каждые 10 минут. Концентрация мочевины в перфузате 5 мМ.

Выполняли гистологическое исследование почечной ткани, включающее окраску парафиновых срезов ренальной ткани гематоксилин-эозином (VITROSTAIN Biovitrum, Россия). Толщина среза

3 мкм. Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM 6000 с цифровой камерой Leica DFC 490.

Статистический анализ и построение графиков выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение. Значение  $p < 0,05$  принимали статистически достоверным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Оценка функционального состояния изолированной ишемизированной почки

Группы 1–4 были подвергнуты периоду ишемии, равному 5 минутам, период перфузии 50 минут. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

При введении в перфузионный буфер 6% БСА (группа 1) не наблюдалось образования мочи, хотя ПД и СПП соответствовали нормальным значениям в течение всего периода перфузии. Отсутствие мочи делает невозможной оценку исследуемых функциональных критериев. В группе 2 (0,6% БСА) к окончанию перфузионного периода из всех критериев только СПП и СПМ соответствуют минимально допустимым значениям ( $5,7 \pm 0,5$  мл/мин·г и  $49 \pm 2,5$  мкл/мин соответственно).

Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии в группах 3–4 представлена на рис. 2. ПД и СПП были постоянными в течение перфузии в обеих группах и имели допустимые значения. Rtx6 не оказывал влияния на динамику этих критериев (рис. 2, а). Для СПМ наблюдается рост в течение перфузии и значения критерия выше минимально допустимых в течение всего периода перфузии в обеих группах. При использовании Rtx6 происходит достоверное увеличение СПМ к концу перфузии в 1,5 раза относительно группы 3 ( $115 \pm 23$  и  $178 \pm 28$  мкл/мин соответственно) (рис. 2, б, табл. 2). В группе 3 СКФ не изменяется в течение периода перфузии и к окончанию перфузии не достигает минимально допустимых значений ( $0,2 \pm 0,04$  мл/мин·г) (рис. 2, в); ФРГ, несмотря на рост в течение перфузии, к концу перфузионного периода также не достигает минимально допустимых значений и составляет 71% (рис. 2, д, табл. 2). Использование Rtx6 выводит эти критерии на значения выше минимальных. Данные выявили статистически значимую разницу между группами 3 и 4 по этим критериям к концу перфузионного периода (табл. 2). ДТМ выше в группе 3, здесь 63% первичного ультрафильтрата выводилось как терминальная моча, напротив, в группе с Rtx6 этот показатель в 1,5 раза ниже ( $p < 0,05$ ) (рис. 2, г). В обеих группах наблюдается рост КММ к концу перфузии, однако значение этого критерия достоверно выше

в 2 раза в группе с Pгх6 ( $7,3 \pm 1,8$  мкмоль/10 мин и  $13 \pm 1,7$  мкмоль/10 мин соответственно) (рис. 2, е). В табл. 2 приведены значения критериев функциональности почки в группах 1–4 в конце перфузии.

Группы 5–8 были подвергнуты периоду ишемии равному 20 минутам, период перфузии 50 минут. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

При введении в перфузионный буфер 6% БСА (группа 5) не наблюдалось образования мочи, СПП не соответствовала минимально допустимым значениям. Отсутствие мочи делает невозможной оценку исследуемых параметров функционирования. В группе 6 (0,6% БСА) к окончанию перфузионного периода из всех критериев только СПП соответствует мини-

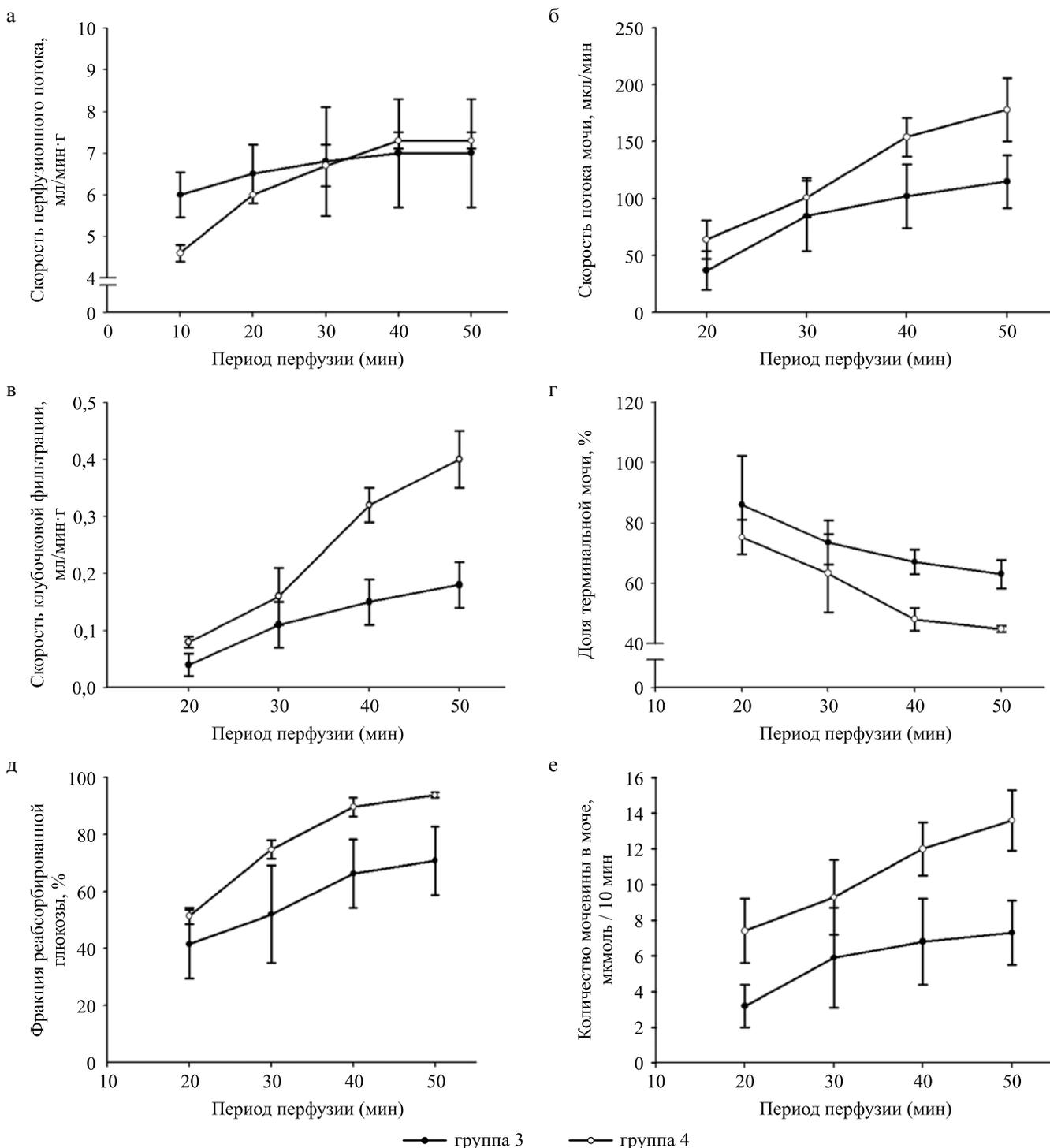


Рис. 2. Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут). Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период

Fig. 2. The dynamic of the criteria of the functioning of an isolated ischemic kidney during perfusion (ischemia 5 minutes / perfusion 50 minutes). The first 20 minutes of perfusion is the stabilization period

мально допустимым значениям ( $44 \pm 4,6$  мкл/мин). В обеих группах наблюдалось повышение давления при снижении скорости перфузионного потока.

Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии в группах 7–8 представлена на рис 3. Перфузионное давление и скорость перфузионного потока были постоянными в течение перфузии в обеих группах и имели допустимые значения. Pгх6 не оказывал влияния на динамику этих параметров (рис. 3, а). СПМ была выше минимально допустимых значений в течение всего периода перфузии в обеих группах. При использовании Pгх6 не наблюдалось достоверного увеличения СПМ к концу перфузии относительно группы 3 ( $137 \pm 40$  и  $146 \pm 41$  мкл/мин соответственно) (рис. 3, б, табл. 2). Значения СКФ и ФРГ ниже минимально допустимых в течение всего перфузионного периода в обеих группах. Использование Pгх6 не выводит СКФ и ФРГ на значения выше минимальных даже к окончанию перфузии ( $0,16 \pm 0,05$  мл/мин и 44% соответственно) (рис. 3, в, д). В группах 7–8 не наблюдается достоверного изменения ДТМ и КММ в течение перфузии. К концу перфузии значения этих критериев достоверно не отличаются между группами (рис. 3, г, е, табл. 2).

В табл. 2 представлены значения критериев функционирования почки в экспериментальных группах в последний 10-минутный интервал перфузии.

### Оценка морфологического состояния изолированной ишемизированной почки

На рис. 4 представлена морфология ренальной ткани из разных экспериментальных групп. Почки интактных животных имеют различимые отделы нефрона в корковом слое: почечное тельце и почечные извитые канальцы: проксимальный (клет-

ки канала имеют выраженную щеточную каемку) и дистальный (рис. 4, а). Полуторачасовой период ишемии и отсутствие перфузии приводят к развитию очагов некробиоза и некроза в почечной паренхиме, десквамативным изменениям в каналах, а также к очаговому капиллярно-венозному полнокровию коркового вещества с эритростазами (рис. 4, б). На коротких сроках ишемии в изолированной почке после перфузии наблюдается сохранение общей морфофункциональной структуры нефрона (рис. 4, в, г). Для группы 3–4 отмечена общая морфологическая картина: гидропическая дистрофия в юкстамедуллярной зоне, очаги поражения каналов, отсутствие клеточного мусора. При использовании Pгх6 наблюдается снижение поражения канальцевого эпителия, отмечена выраженная щеточная каемка нефроцитов проксимальных каналов. Дистальные каналы без изменений (рис. 4, г). С увеличением сроков ишемии изолированной почки до 20 минут в группах 7–8 к окончанию периода перфузии наблюдается сходная морфологическая картина, в частности, нарушение морфофункциональной структуры нефрона. Отмечено наличие зернистых масс в просвете капсулы и очаговый спазм капиллярных петель. Очаги гидропической дистрофии эпителия каналов, отсутствие щеточной каемки нефроцитов проксимальных каналов, некроз отдельных эпителиоцитов и групп клеток. Для канальцев отмечено истощение за счет снижения высоты эпителия и расширения просветов. В просвете каналов отмечены гомогенные массы и слущенные эпителиоциты. Поражение имеет зональность и выражено в корковом слое. Степень поражения снижается к латеральному краю. Использование Pгх6 не

Таблица 2

**Критерии функционирования в конце периода перфузии**  
**Functioning criteria at the end of the perfusion period**

Критерий		СПП, мл/мин·г	СПМ, мкл/мин	СКФ, мл/мин	ФРГ, %	КММ, мкмоль / 10 мин	ДТМ, %
Мин. значения		4–5,3	>30	>0,5	>90		
Ишемия 5 мин	№ 1 6% БСА	$7,5 \pm 2,8$	–	–	–	–	–
	№ 2 0,6% БСА	$5,7 \pm 0,5$	$49 \pm 2,5$	$0,01 \pm 0,01$	50	$4,2 \pm 0,5$	$61 \pm 0,5$
	№ 3 Без добавок	$6,9 \pm 1,3$	$115 \pm 23$	$0,18 \pm 0,04$	$71 \pm 12$	$7 \pm 1,8$	$64 \pm 4,7$
	№ 4 Pгх 6	$7,3 \pm 0,2$	$178 \pm 28$	$0,4 \pm 0,05$	$94 \pm 1$	$13 \pm 1,7$	$45 \pm 1$
Ишемия 20 мин	№ 5 6% БСА	$2 \pm 0,7$	–	–	–	–	–
	№ 6 0,6% БСА	$3,4 \pm 1$	$44 \pm 4,6$	$0,05 \pm 0,01$	$21 \pm 6$	$2,8 \pm 3,6$	$92 \pm 6,5$
	№ 7 Без добавок	$5,6 \pm 1$	$137 \pm 40$	$0,16 \pm 0,05$	$46 \pm 13$	$9,6 \pm 3$	$85 \pm 3,2$
	№ 8 Pгх 6	$5,1 \pm 0,3$	$146 \pm 41$	$0,16 \pm 0,04$	$44 \pm 13$	$9,6 \pm 1$	$91 \pm 2,3$

приводит к изменению морфологического состояния ренальной ткани и снижению повреждения.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Модель ИПП является признанной для исследования функций почек [1, 23], а также имеет важное практическое значение для оценки методов консер-

вации [22, 24]. В модели ИПП три взаимосвязанных процесса почечного транспорта – фильтрация, секреция и реабсорбция – по критериям функционирования близки к их показателям *in vivo*, кроме того, сохраняются функции клубочков и проксимальных канальцев. К недостаткам модели можно отнести нарушение почечной гемодинамики из-за высокой

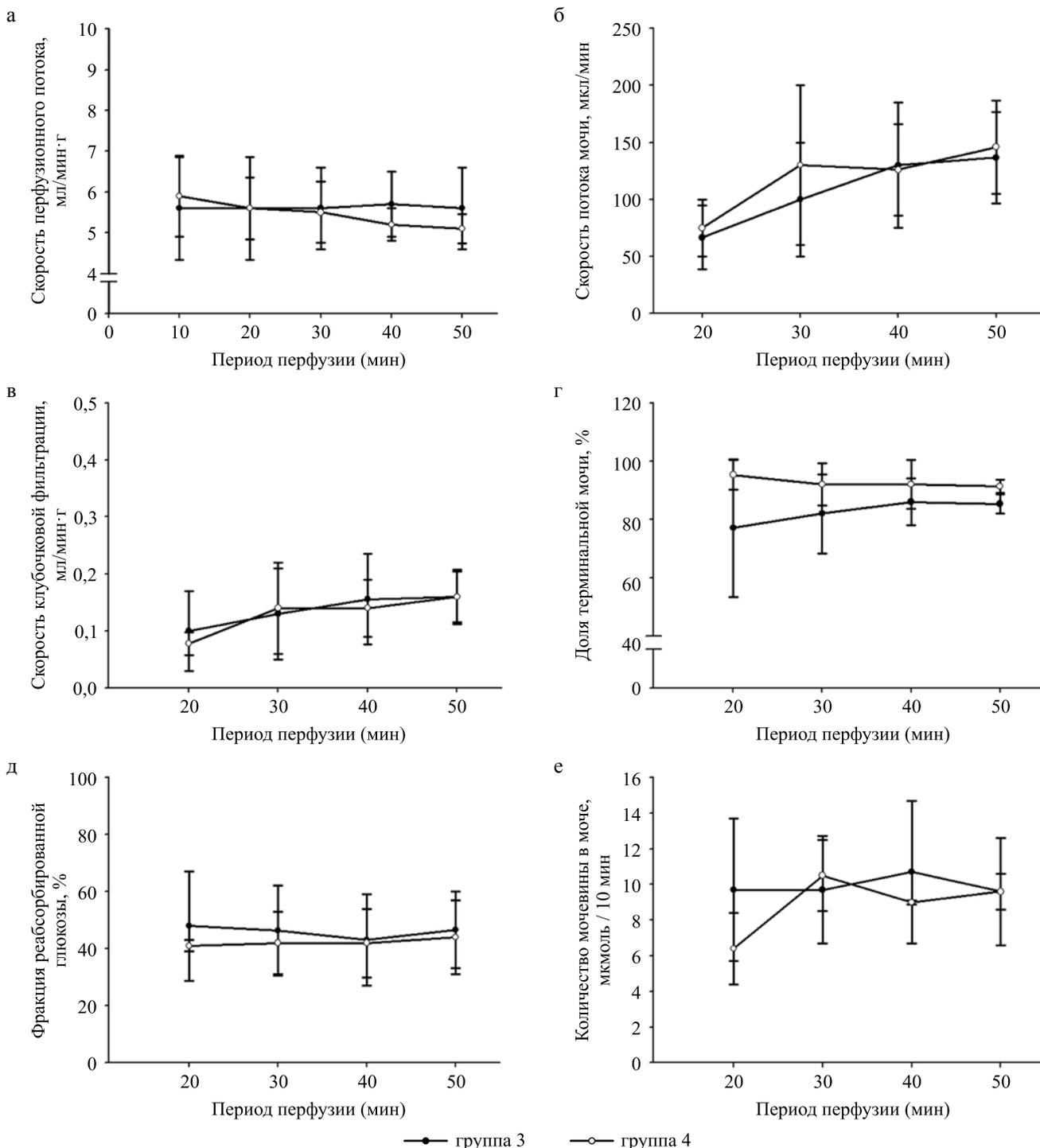


Рис. 3. Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут). Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период

Fig. 3. The dynamic of the criteria of the functioning of an isolated ischemic kidney during perfusion (ischemia 5 minutes / perfusion 50 minutes). The first 20 minutes of perfusion is the stabilization period

скорости перфузионного потока и нарушение функций дистальных канальцев [1].

В настоящей работе мы использовали модель ретроградной перфузии изолированных почек

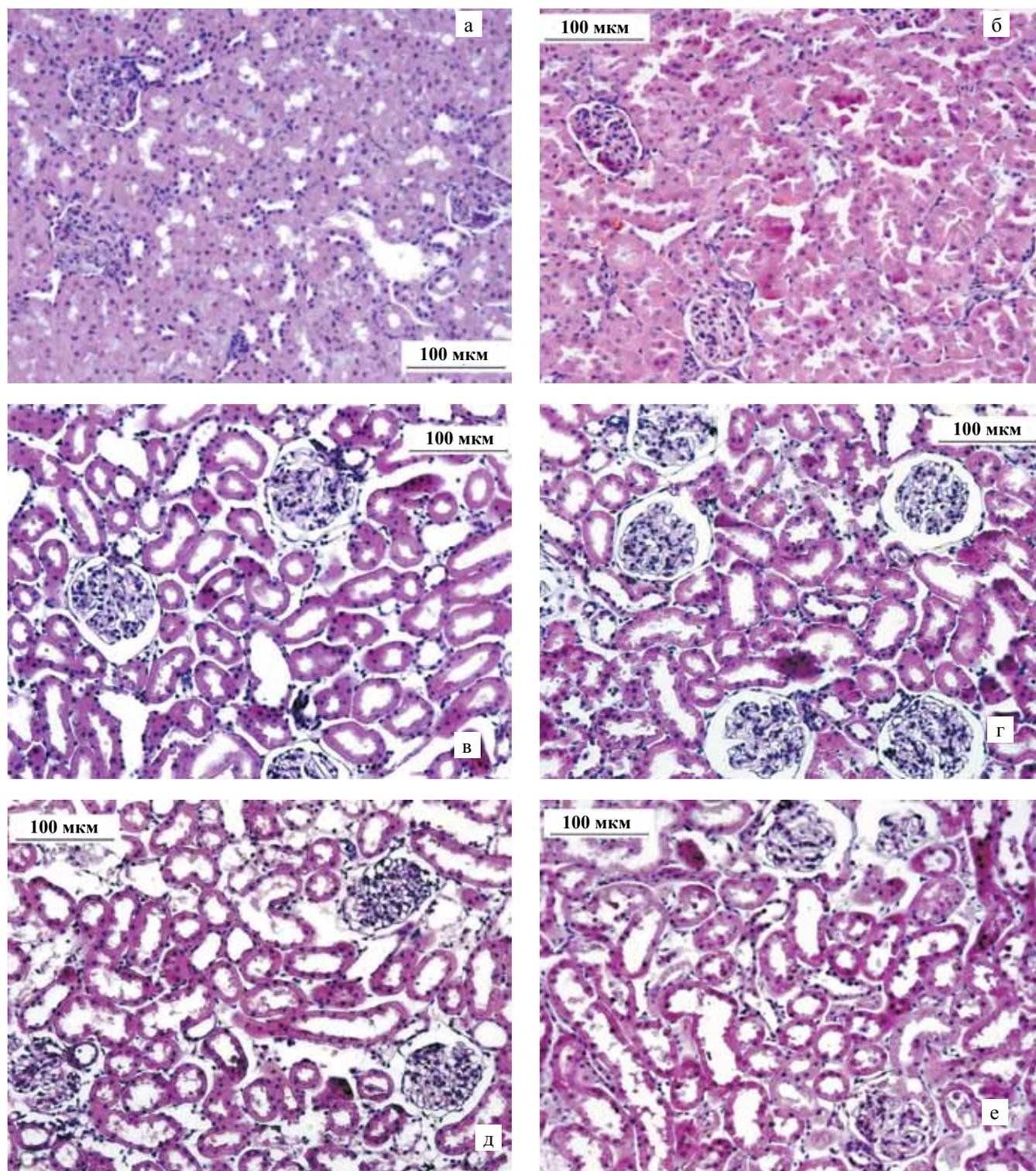


Рис. 4. Морфология ренальной ткани: а – почки интактных животных; б – почки, без перфузии, ишемия 90 минут; в – группа 3 (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут, без Prx6); г – группа 4 (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут, + Prx6); д – группа 7 (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут, без Prx6); е – группа 8 (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут, + Prx6). Эозин-гематоксилин,  $\times 200$

Fig. 4. Morphology of renal tissue: а – native control; б – kidney, no perfusion, ischemia 90 minutes; в – group 3 (ischemia period 5 min / perfusion period 50 min, no Prx6); г – group 4 (ischemia period 5 min / perfusion period 50 min, + Prx6); д – group 7 (ischemia period 20 min / perfusion period 50 min, no Prx6); е – group 8 (ischemia period 20 min / perfusion period 50 min, + Prx6). Eosin-hematoxylin,  $\times 200$

крыс [3]. Перфузия производилась синтетической средой DMEM. В нашей модели ИПП принципиальным моментом было наличие периода тепловой ишемии сроком 5 и 20 минут. Период 5 минут выбран как минимальный срок прерывания кровотока. 20-минутный период тепловой ишемии описывают как наиболее оптимальный для последующего восстановления функций изолированной почки при трансплантации [26]. Известно, что ишемия запускает ряд патологических реакций, которые приводят к нарушению функций жизненно важных структур клетки. Последующая реперфузия приводит к прогрессированию патологических процессов. Исследования последних лет неоднократно указывают на ключевую роль окислительного стресса в патогенезе И-РП почек. Основными участниками цепи событий, приводящих к окислительному стрессу, являются активные формы кислорода и азота: в клетках почки происходит резкое усиление генерации этих свободных радикалов [7]. В настоящей работе для защиты изолированного органа от повреждающего действия И-РП и улучшения морфофункциональных характеристик изолированной ишемизированной почки был использован экзогенный фермент-антиоксидант Rgx6. Rgx6 в составе перфузионного раствора вводился локально в изолированную почку с началом ишемии. Таким образом, Rgx6 находился в ткани почки в течение всего периода ишемии и на начальном этапе перфузии. Ранее было показано, что при перфузии изолированной почки экзогенным Rgx6 белок распределяется по сосудам почечных клубочков и сосудам, сопровождающим тонкий каналец [20]. Кроме того, в почечной ткани имеется собственный пул Rgx6 в трубчатых сегментах нефрона, при И-РП именно в этих местах наблюдается усиление экспрессии Rgx6 [27]. Для оценки эффективности Rgx6 как средства для сохранения морфофункциональных характеристик изолированной ишемизированной почки анализировали несколько общепринятых критериев функционирования: ПД, СПП, СПМ, СКФ, ФРГ, ДТМ [1, 22] и КММ.

ПД поддерживалось на уровне 90–110 мм рт. ст. изменением СПП от 2 до 7,5 мл/г/мин·г в разных группах (табл. 2). К окончанию перфузионного периода максимальная СПП отмечена при 5-минутной ишемии на фоне 6% БСА; минимальная – при 20-минутной ишемии на фоне 6% БСА. Несмотря на высокую СПП в группе 1 (6% БСА) не происходило образования мочи. Отмечается, что внесение высоких доз БСА в буфер приводит к снижению СКФ, напротив, изолированные почки, перфузированные синтетической средой без добавления БСА, имеют тенденцию к росту показателей СКФ и ФРГ [22]. Макроскопически было отмечено увеличение размера изолированных почек при перфузии примерно в 1,5 раза. Это является естественным процессом, так

как имеются факторы, способствующие скоплению жидкости в канальцах – отсутствие нервного контроля афферентных артериол и блок лимфатических сосудов [4].

Мониторинг основных критериев функционирования изолированной почки начинался после установления гемодинамического равновесия, когда СПП и ПД принимали постоянные значения (стабилизационный период – 20 минут).

При 5-минутной ишемии во всех группах критерии функционирования изолированной почки выше минимальных значений (табл. 2). Для группы 2 (0,6% БСА) и 3 (без добавок) к этим параметрам можно отнести ПД, СПП, СПМ. Для СКФ и ФРГ значения ниже минимально допустимых. При гистологической оценке ренальной ткани в этих группах обнаружены очаги поражения внутренней организации каналов. Повреждение проксимальных каналов уже на ранних сроках ишемии объясняется их высоким уровнем метаболической активности [25]. Использование Rgx6 расширяет список критериев функционирования изолированной почки с допустимыми значениями: ПД, СПП, СПМ, СКФ, ФРГ. При использовании Rgx6 происходит увеличение СПМ, СКФ, ФРГ и снижение ДТМ по сравнению с группой 3. Такая картина указывает на улучшение процессов фильтрации, секреции и реабсорбции ультрафильтрата при использовании Rgx6 при перфузии ишемизированной изолированной почки. Значение ФРГ выше 90% при использовании Rgx6 указывает на сохранение функциональности тубулярных структур, изолированной ишемизированной почки к окончанию перфузионного периода. Это подтверждается результатами гистологического анализа. Снижение поражения тубулярных структур при использовании Rgx6 также подтверждается увеличением количества мочевины в терминальной моче почти в 2 раза по сравнению с группой 3. Так как основные места, ответственные за транспорт мочевины, – проксимальный каналец и тонкий сегмент восходящей части петли Генле [25], можно говорить о протекции именно этих структур канальца. Рост КММ может быть не связан напрямую с сохранением канальцевых структур, однако полученные морфологические данные говорят о существенном вкладе именно этого процесса в транспорт мочевины. Таким образом, по критериям функционирования экзогенный Rgx6 существенно улучшает функциональное состояние изолированной почки при перфузии после коротких сроков тепловой ишемии.

Оценка состояния изолированной почки после 20-минутной ишемии показала, что при увеличении сроков ишемии среди критериев функционирования только СПМ имеет допустимые значения. Остальные критерии имеют значения ниже минимальных (табл. 2). Использование Rgx6 не выводит эти критерии на более высокие значения. Внутри времен-

ной группы отсутствие БСА в перфузате приводит к росту показателей СКФ и ФРГ, но не выводит их на необходимый уровень. Низкие показатели ФРГ указывают на нарушение процессов реабсорбции глюкозы в проксимальных каналах [28]. Аналогичная ситуация наблюдается и с КММ, наблюдается рост ее концентрации в отсутствие БСА в растворе. Таким образом, через 20 минут ишемии почку можно признать нежизнеспособной. Отсутствие функционирования почки связано, вероятнее всего, с тем, что принципиальное значение для выживаемости изолированного органа играет длительность ишемии. В ишемизированной почке с началом перфузии возникают очаги гипо- и гиперперфузии. На фоне острого канальцевого некроза происходит спазм приносящих артериол клубочков, что может приводить к нарушению внутриорганный кровотока и развитию синдрома «no-reflow» [26]. Наличие поражения канальцев было подтверждено результатами гистологического анализа. Ранее было показано, что увеличение сроков ишемии до 45 минут приводит к критическому поражению паренхимы и снижению СПМ до менее 30 мкл/мин. Использование Rгх6 на этих сроках приводит к уменьшению поражения изолированной почки по сравнению с контрольным повреждением. Однако, несмотря на протекторный эффект Rгх6 на критических сроках ишемии, поражение почечной паренхимы остается на высоком уровне [20].

Таким образом, использование синтетических сред в модели ИПП целесообразно только на ранних сроках ишемии. В этот период некоторые критерии функционирования изолированной почки достигают допустимых значений. Структура почечной ткани сохранена, однако имеются очаги дистрофических изменений в юкстамедуллярной зоне и проксимальных каналах. С увеличением сроков ишемии поражение почечной ткани усиливается, наблюдается развитие канальцевого некроза, что выражается в снижении значений критериев функциональности и прекращении функционирования изолированного ишемизированного органа. Использование экзогенного Rгх6 положительно влияет на морфофункциональное состояние изолированной почки только на ранних сроках ишемии. В этом случае значения критериев выше, чем минимально допустимые, что может указывать на функционирование изолированной ишемизированной почки определенный период при ее перфузии синтетической средой. Морфологически на ранних сроках ишемии отмечена морфоструктурная целостность нефронов.

Пероксиредоксин 6 является полифункциональным ферментом-антиоксидантом, обладающим пероксидазной активностью, небольшой фосфолипазной активностью, а также участием во многих процессах в клетке [10–13]. Тот факт, что пероксире-

доксин 6 защищает изолированную почку на малых периодах ишемии, свидетельствует о том, что в данном случае основной вклад в защиту органа вносит пероксидазная активность пероксиредоксина 6. Опыт использования рекомбинантного Rгх6 для протекции изолированных органов описан ранее. Защитный эффект Rгх6 был показан на модели перфузии изолированного сердца крысы. Было отмечено, что использование Rгх6 приводит к нормализации пульса, поддержанию сократительной активности миокарда и предотвращению перекисного окисления липидов [17]. Экзогенный Rгх6 показал свой протекторный эффект для прекондиционирования трансплантата сердца крысы. Показано, что Rгх6 уменьшает тяжесть И-РП сердца и способствует нормализации его морфофункционального состояния при гетеротопической трансплантации [18].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели изолированной перфузируемой почки был показан ренопротекторный эффект экзогенного рекомбинантного пероксиредоксина 6, введенного локально перед ишемией. При интерпретации полученных данных учитывался принципиальный фактор – отклик изолированной почки отличается от естественного из-за подавления гуморальной регуляции и отсутствия иннервации [4]. В связи с этим действие Rгх6 в изолированной почке, вероятно, может отличаться от его протекторных эффектов в почке *in vivo* [8].

На основании полученных данных есть основание предполагать, что применение экзогенного рекомбинантного Rгх6 может быть эффективным подходом для сохранения изолированной почки при трансплантации, так как включение Rгх6 в состав известных перфузионных растворов в качестве мощного антиоксидантного агента будет способствовать снижению процессов свободно-радикального окисления. В этом отношении требуются дальнейшие экспериментальные исследования.

*Для получения микрофотографий, представленных в публикации, использовали оборудование, предоставленное «Сектором оптической микроскопии и спектродомерии» ЦКП ФИЦ «ЛНЦ БИ РАН».*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Taft DV. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Current Drug Discovery Technologies*. 2004; 1: 97–111. doi: 10.2174/1570163043484824.

2. Georgiev T, Iliev R, Mihailova S, Hadzhibozheva P, Ilieva G, Kamburova M et al. The isolated perused kidney models – certain aspects. *Trakia Journal of Sciences*. 2011; 9 (3): 82–87.
3. Czogalla J, Schweda F, Loffing J. The mouse isolated perfused kidney technique. *J Vis Exp*. 2016; 117: 54712. doi: 10.3791/54712.
4. Nishiitsutsuji-Uwo J, Ross B, Krebs H. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J*. 1967; 103 (3): 852–862. doi: 10.1042/bj1030852.
5. Chang HH, Choong B, Phillips A, Loomes KM. The isolated perfused rat kidney: a Technical update. *Exp Anim*. 2013; 62 (1): 19–23. doi: 10.1538/expanim.62.19.
6. Weiss C, Passow H, Rothstein A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol*. 1959; 196 (5): 1115–1118. doi: 10.1152/ajplegacy.1959.196.5.1115.
7. Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tcvirkun DV, Isaev NK et al. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int*. 2007; 72 (12): 1493–1502. doi: 10.1038/sj.ki.5002568.
8. Goncharov RG, Rogov KA, Temnov AA, Novoselov VI, Sharapov MG. Protective role of exogenous recombinant peroxiredoxin 6 under ischemia-reperfusion injury of kidney. *Cell Tissue Res*. 2019; 378 (2): 319–332. doi: 10.1007/s00441-019-03073-z.
9. Багненко СФ, Мойсюк ЮГ, Скворцов АЕ, Резник ОН. Реабилитация донорских органов. Направление в консервации или новая парадигма трансплантологии? *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2009; 11 (3): 17–29. Vagnenko SF, Moysyuk YG, Skvortsov AE, Reznik ON. Rehabilitation of organ from deceased donors. New preservation trend or new paradigm in transplantology? *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2009; 11 (3): 17–29. [In Russ. English abstract]. doi.org/10.15825/1995-1191-2009-3-17-29.
10. Новоселов ВИ. Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания. *Пульмонология*. 2012; 1: 83–87. Novoselov VI. A role of peroxiredoxins in oxidative stress in the respiratory system. *Pulmonologiya*. 2012; 1: 83–87. (In Russ.) https://doi.org/10.18093/0869-0189-2012-0-1-83-87.
11. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 2000; 275 (37): 28421–28427. doi: 10.1074/jbc.M005073200.
12. Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem*. 2003; 28 (1): 32–40. doi: 10.1016/s0968-0004(02)00003-8.
13. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev*. 2015; 24 (1): 29–39. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.003.
14. Шарпов МГ, Гордеева АЕ, Гончаров РГ, Тихонова ИВ, Равин ВК, Темнов АА и др. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на состояние мезентеральных сосудов и тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении. *Биофизика*. 2017; 62 (6): 998–1008. Sharapov MG, Gordeeva AE, Goncharov RG, Tikhonova IV, Ravin VK, Temnov AA et al. The effect of exogenous peroxiredoxin 6 on the state of mesenteric vessels and the small intestine in ischemia–reperfusion injury. *Biofizika*. 2017; 62 (6): 998–1008. [In Russ. English abstract]. doi: 10.1134/S0006350917060239.
15. Волкова АГ, Шарпов МГ, Равин ВК, Гордеева АЕ, Карадулева ЕВ, Мубаракшина ЕК и др. Эффект различных ферментов-антиоксидантов на регенеративные процессы в эпителии трахеи после химического ожога. *Пульмонология*. 2014; 2: 84–90. Volkova AG, Sharapov MG, Ravin VK, Gordeeva AE, Karaduleva EV, Mubarakshina EK et al. The effect of various antioxidant enzymes in the regenerative processes in the epithelium of the trachea after chemical burn. *Pulmonologiya*. 2014; 2: 84–90. doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-2-84-90.
16. Sharapov MG, Novoselov VI, Gudkov SV. Radioprotective Role of Peroxiredoxin 6. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8 (1): 15. doi: 10.3390/antiox8010015.
17. Karaduleva EV, Mubarakshina EK, Sharapov MG, Volkova AG, Pimenov OY, Ravin VK et al. Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins during retrograde perfusion of isolated rat heart under oxidative stress condition. *Bull Exp Biol Med*. 2016; 160 (5): 639–642. doi: 10.1007/s10517-016-3237-1.
18. Грудинин НВ, Богданов ВК, Шарпов МГ, Буненков НС, Можейко НП, Гончаров РГ и др. Применение пероксиредоксина при прекондиционировании трансплантата сердца крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (2): 158–164. Grudin N V, Bogdanov V K, Sharapov M G, Bunenkov N S, Mozheiko N P, Goncharov R G et al. Use of peroxiredoxin for preconditioning of heterotopic heart transplantation in a rat. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (2): 158–164. [In Russ. English abstract]. doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-158-164.
19. Шарпов МГ, Новоселов ВИ, Равин ВК. Клонирование, экспрессия кДНК и сравнительный анализ пероксиредоксина 6 различных организмов. *Молекулярная биология*. 2009; 43 (3): 505–511. Sharapov MG, Novoselov VI, Ravin VK. Cloning, expression and comparative analysis of peroxiredoxin 6 from different sources. *Molekulyarnaya biologiya*. 2009; 43 (3): 505–511. [In Russ. English abstract].
20. Гордеева АЕ, Шарпов МГ, Евдокимов ВА, Новоселов ВИ, Фесенко ЕЕ. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на функциональные параметры изолированной почки крысы. *Биофизика*. 2020; 65 (2): 340–348. Gordeeva AE, Sharapov MG, Evdokimov VA, Novoselov VI, Fesenko EE. The effect of exogenous peroxiredoxin 6 on functional parameters of isolated rat kidney. *Biofizika*. 2020; 65 (2): 340–348 [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0006302920020179.
21. Доржу УВ, Айзман РИ. Оценка объемной скорости почечного и клубочкового кровотока в постнатальном онтогенезе у крыс. *Вестник ЧГПУ им. И.Я. Яковлева*. 2018; 2 (98): 16–23. Dorzhu UV, Aizman RI. Esti-

- mation of renal blood flow and glomerular the flow rate in postnatal ontogenesis at the rats. *Vestnik ChGPU im. I.Ja. Jakovleva*. 2018; 2 (98): 16–23. [In Russ, English abstract].
22. Höchel J, Lehmann D, Fehrenberg C, Unger V, Groneberg AD, Grosse-Siestrup C et al. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1748–1754. doi: 10.1093/ndt/gfg285.
  23. Thein E, Sevilimis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K. Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs. *Xenotransplantation*. 2001; 8 (2): 94–99. doi: 10.1034/j.1399-3089.2001.00083.x.
  24. Суконко ОГ, Пилотович ВС, Кушниренко ПС, Ролевич АИ, Жегалик АГ, Юшко ДЕ. Резекция единственной почки с изолированной перфузией охлажденным раствором «EuroCollins». *Онкоурология*. 2006; 1: 57–60. Sukonko OG, Pilotovich VS, Kushnirenko PS, Rolevich AI, Zhegalik AG, Jushko DE. Rezekcija edinstvennoj pochki s izolirovannoj perfuziej ohlazhdenym rasvorom «EuroCollins». *Onkourologija*. 2006; 1: 57–60.
  25. Савин ИА, Горячев АС. Водно-электролитные нарушения в нейрореанимации. М.: Аксиом графикс юнион, 2015. 331 с. Savin IA, Gorjachev AS. Vodno-jelektrolitnye narushenija v nejroreanimacii. М.: Аксиом графикс юнион, 2015. 331.
  26. Szajer M, Shah G, Kittur D, Searler B, Li L, Bruch D et al. A novel extracorporeal kidney perfusion system: a concept model. *Perfusion*. 2004; 19 (5): 305–310. doi: 10.1191/0267659104pf7610a.
  27. Godoy JR, Oesteritz S, Hanschmann EM, Oskenga W, Askermann W, Lillig CH et al. Segment-specific overexpression of redoxins after renal ischemia and reperfusion: protective roles of glutaredoxin 2, peroxiredoxin 3, and peroxiredoxin 6. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51 (2): 552. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.036.
  28. Ватазин АВ, Астахов ПВ, Зулкарнаев АБ, Ветчинникова ОН, Кантария РО, Синютин АА и др. Неспецифические механизмы ишемического и реперфузионного повреждения почечного аллотрансплантата и способы воздействия на них. *Нефрология*. 2013; 17 (1): 42–48. Vatazin AV, Astakhov PV, Zulkarnaev AB, Vetchinnikova ON, Kantaria RO, Sinutin AA et al. Non-specific mechanisms of ischemic and reperfusion injury of renal allograft and its modalities. *Nefrologija*. 2013; 17 (1): 42–48. [In Russ, English abstract].

*Статья поступила в редакцию 27.05.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 27.05.2021*

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-134-141

## КСЕНОГЕННАЯ ЛИМФОЦИТАРНАЯ РНК СТИМУЛИРУЕТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

*Н.В. Тишевская<sup>1</sup>, Е.С. Головнева<sup>1, 2</sup>, Р.В. Галлямутдинов<sup>2</sup>, А.А. Позина<sup>1</sup>, Н.М. Геворкян<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Российская Федерация

<sup>2</sup> БУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

**Цель:** найти доказательства существования дистантного лимфоцитарного РНК-контроля физиологического миогенеза как способа управления процессом регенерации мышечной ткани. **Материалы и методы.** Исследование проведено на крысах-самцах породы Вистар, n = 33. В первой части эксперимента 12 крыс получали регулярную 40-дневную физическую нагрузку (плавание), половине из них 4 раза внутрибрюшинно вводили суммарную РНК, выделенную из лимфоцитов селезенки свиньи в возрасте 30 дней; 6 крыс составили группу интактного контроля. В гистологических препаратах разных групп скелетных мышц оценивали ширину и площадь поперечного сечения мышечных волокон, площадь ядер и количество миоцитов и миосателлитов. Во второй части эксперимента 15 интактным крысам вводили исследуемую ксеногенную РНК и определяли количество рибонуклеиновых кислот в лимфоцитах периферической крови, лимфоцитах селезенки, скелетных мышцах через 2 часа и через 24 часа после введения. **Результаты.** После 40-дневной физической нагрузки в скелетных мышцах увеличились ширина волокон и площадь ядер миоцитов, абсолютное количество миосателлитов и площадь их ядер не изменились. При введении ксеногенной РНК у тренированных крыс помимо увеличения толщины и площади поперечного сечения мышечных волокон абсолютное количество миосателлитов в *m. biceps femoris* увеличилось в 1,4 раза, в *m. triceps brachii* – в 1,3 раза, в *m. pectoralis major* – в 1,4 раза; площадь ядер миосателлитов увеличилась в среднем на 7%. У интактных крыс через 2 часа после введения ксеногенной РНК количество РНК в скелетных мышцах не изменилось, в лимфоцитах селезенки увеличилось на 19%, в лимфоцитах периферической крови – на 16%. Через 24 часа количество РНК в лимфоцитах оставалось достоверно выше контрольных значений, в мышечной ткани не отличалось от контроля. **Заключение.** Ксеногенная лимфоцитарная РНК стимулирует физиологический миогенез путем активации пролиферации клеток-миосателлитов.

*Ключевые слова:* миогенез, лимфоциты, РНК, регенерация.

## XENOGENEIC LYMPHOCYTIC RNA STIMULATES SKELETAL MUSCLE REGENERATION

*N.V. Tishevskaya<sup>1</sup>, E.S. Golovneva<sup>1, 2</sup>, R.V. Gallyamutdinov<sup>2</sup>, A.A. Pozina<sup>1</sup>, N.M. Gevorkyan<sup>3</sup>*

<sup>1</sup> South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Multidisciplinary Center for Laser Medicine, Chelyabinsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to find evidence of the existence of distant lymphocytic RNA control of physiological myogenesis as a way to control the muscle tissue regeneration process. **Materials and methods.** The study was conducted on male Wistar rats, n=33. In the first part of the experiment, 12 rats were subjected to regular 40-day physical activity (swimming), half of them were intraperitoneally injected 4 times with total RNA isolated from pig spleen lymphocytes at 30 days of age; 6 rats made up the intact control group. In histological preparations of different skeletal muscle groups, the width and cross-sectional area of muscle fibers, the area of nuclei, and the number of myocytes and myosatellite cells were evaluated. In the second part of the experiment, 15 intact rats were injected

**Для корреспонденции:** Тишевская Наталья Викторовна. Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, д. 64. Тел. (351) 232-74-67. E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

**Corresponding author:** Natalia Tishevskaya. Address: 64, Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russian Federation. Phone: (351) 232-74-67. E-mail: natalya-tishevskaya@yandex.ru

with the studied xenogeneic RNA and the amounts of ribonucleic acids in peripheral blood lymphocytes, spleen lymphocytes, and skeletal muscles were determined 2 hours and 24 hours after injection. **Results.** After the 40-day physical activity, the width of the fibers and the area of myocyte nuclei in the skeletal muscles increased; the absolute number of myosatellite cells and the area of their nuclei did not change. After administration of xenogeneic RNA in the trained rats, in addition to an increase in the thickness and cross-sectional area of muscle fibers, the absolute number of myosatellite cells in *m. biceps femoris*, in *m. triceps brachii*, and in *m. pectoralis major* increased 1.4-fold, 1.3-fold, and 1.4-fold, respectively; the area of myosatellite nuclei increased on average by 7%. In intact rats, two hours after xenogeneic RNA injection, the amount of RNA in skeletal muscles remained unchanged, it increased by 19% in spleen lymphocytes, and by 16% in peripheral blood lymphocytes. At 24 hours, the RNA amount in the lymphocytes remained significantly higher than the control values, while in the muscle tissue, it didn't differ from the control. **Conclusion.** Xenogeneic lymphocytic RNA stimulates physiological myogenesis by activating myosatellite cell proliferation.

*Key words:* myogenesis, lymphocytes, RNA, regeneration.

Лимфоидные клетки активно участвуют в регуляции регенеративных процессов [1, 2], обеспечивая тем самым реактивность или резистентность организма в условиях изменяющейся внешней или внутренней среды, включая адаптационные ответы тканей на повышенную нагрузку. Восстановление целостности скелетных мышц после острого повреждения и их физиологическая регенерация при умеренно выраженной сократительной активности происходят за счет пролиферации и дифференцировки миосателлитов – коммитированных клеток-предшественниц, располагающихся между базальной мембраной и сарколеммой мышечного волокна. В регуляции этих процессов принимают участие гормоны, ростовые факторы, нейромедиаторы, многие из которых синтезируются и секретируются лимфоидными клетками. В последние 10 лет появились доказательства того, что после острого повреждения мышцы уже на начальных этапах восстановительного морфогенеза в мышечной ткани появляются Т-хелперы различных фенотипов, присутствие которых значительно ускоряет выход миосателлитов из состояния покоя и сопровождается формированием полноценных мышечных волокон как в живом организме, так и в условиях *in vitro* [3, 4]. Однако при этом авторы отмечали, что выраженность регенераторного ответа не соответствует количественному составу Т-клеток, пришедших в мышечную ткань, и ими было высказано предположение, что Т-лимфоцитарная регуляция миогенеза, вероятно, осуществляется не контактным, а дистантным путем через растворимые биологически активные вещества, продуцируемые Т-клетками.

Лимфоидная система является частью нейроиммуноэндокринного регуляторного контура, она способна информировать ткани организма о модуляции собственной функции, а также об изменениях, происходящих в «обслуживаемом» ею органе [5]. Посредниками в этой межклеточной сигнальной системе помимо гормонов, цитокинов и факторов роста являются чрезвычайно разнообразные по своим функциональным свойствам молекулы РНК, способные копировать и транспортировать информацию, регу-

лировать экспрессию генов, катализировать образование химических связей. Получены данные о том, что суммарная РНК, выделенная из морфогенетически активных клеток, обладает более выраженным прорегенеративным действием, чем сами клетки [6]. Ранее нами было доказано, что лимфоцитарная суммарная РНК не имеет аллогенных и ксеногенных ограничений, в частности, суммарная РНК, выделенная из лимфоцитов периферической крови человека, стимулировала костномозговой эритропоз у крыс как *in vivo*, так и *in vitro*. Целью настоящего исследования явился поиск доказательств существования дистантного лимфоцитарного РНК-контроля физиологического миогенеза как способа управления процессом регенерации мышечной ткани.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на 33 крысах-самцах породы Wistar массой тела 260–310 г. Эксперимент проводился с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации, соответствовал приказу Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199Н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в стандартных клетках ( $n = 6$ ) в условиях свободного доступа к воде и пище, при температуре воздуха в виварии  $+24 \pm 2$  °С в соответствии с правилами СП 2.2.1.3218. Ежедневный рацион животных состоял из специализированного гранулированного корма, соответствующего по содержанию питательных веществ, витаминов и минералов международным стандартам и ГОСТ Р 50258-92 (Комбикорма полнорационные для лабораторных животных). Все болезненные манипуляции с животными и их эвтаназию путем дислокации шейных позвонков проводили под эфирным наркозом в отдельном от вивария помещении.

В первой части эксперимента использовали 18 животных, которые были разделены на 3 группы по 6 особей в каждой группе: группа 1 – интактные крысы; группа 2 – контрольные крысы, в течение 6 недель участвующие в тренировочном процессе,

группа 3 – крысы, в течение 6 недель участвующие в тренировочном процессе и получавшие инъекции суммарной РНК. Тренировочный процесс представлял собой плавательную нагрузку в резервуаре емкостью 200 л, толщина слоя воды составляла 0,5 м, температура воды – +22–23 °С. Крысы помещались в указанный резервуар 3 раза в неделю, длительность нагрузки увеличивали каждую неделю на 5 минут (с 30 до 55 минут) [7]. Лимфоциты – источники морфогенетически активной ксеногенной РНК выделяли путем суспендирования селезенки 30-дневного поросенка в стеклянном гомогенизаторе с последующей фильтрацией взвеси через капроновый фильтр и 3-кратным центрифугированием клеток в стерильном 0,9% растворе NaCl. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции. Концентрация выделенной РНК определялась спектрофотометрическим методом по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм. Полученную суммарную РНК лиофилизировали и хранили в стерильных флаконах при температуре +5 °С. Перед инъекцией лиофилизированную РНК растворяли в стерильном 0,9% растворе NaCl. РНК вводили крысам внутривентриально, используя метод стерилизующей фильтрации (стерильные шприцевые насадки с диаметром пор 0,22 мкм). Всего каждой крысе из группы 3 было произведено по 4 инъекции с частотой 1 раз в неделю, доза РНК при каждом введении составляла 30 мкг / 100 г веса, объем вводимого раствора – 0,5 мл. Для оценки морфофункционального состояния скелетной мышечной ткани препараты фиксировали 10% нейтральным формалином. После стандартной гистологической проводки, приготовления парафиновых блоков и нарезки препараты окрашивались гематоксилином-эозином. Окрашенные препараты изучали на микроскопе LEICA DMRXA (Германия), с помощью цифровой видеокамеры LEICA DFC 290 (Германия), сопряженной с персональным компьютером, получая изображения микропрепаратов в формате графических файлов \*TIFF в цветовом пространстве RGB. Для морфометрических исследований использовали лицензионную версию программы анализа изображений ImageScore M (Россия). Количество миосателлитов и миоцитов подсчитывали при увеличении микроскопа  $\times 400$  (объектив  $\times 40$ ; окуляр  $\times 10$ ), площадь клеточных ядер определяли с использованием функции «ручное выделение» при увеличении  $\times 1000$ .

Во второй части эксперимента использовали 15 животных, которые были разделены на 3 группы; 5 интактных крыс составили контрольную группу, им внутривентриально ввели по 0,5 мл 0,9% раствора NaCl; 10 крысам внутривентриально ввели по 30 мкг / 100 г веса ксеногенной суммарной РНК, растворенной в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl. Затем 5 особей были выведены из эксперимента через 2 ч после введения РНК, оставшиеся 5 особей – через

24 ч. У всех 15 крыс из лимфоцитов периферической крови (выделенных путем центрифугирования в растворе фиколла-верографина с градиентом плотности 1,119 г/см<sup>3</sup>, ПанЭко, Россия), лимфоцитов селезенки и ткани большой грудной мышцы методом гуанидин тиоцианат–фенол–хлороформной экстракции выделяли суммарную РНК и определяли ее количество спектрофотометрическим методом по оптической плотности препарата при длине волны 260 нм.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью лицензионного пакета прикладных программ: Excel 2020 и PAST версии 4.03. Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический метод Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки ( $M \pm m$ ). Статистически значимыми считали различия  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамические характеристики плавательных движений у сухопутных грызунов таковы, что наибольшие гребковые усилия обеспечиваются двуглавыми мышцами бедра, большими грудными мышцами и трехглавыми мышцами плеча. При гистоморфологическом исследовании указанных мышц было установлено, что регулярная физическая нагрузка умеренной интенсивности приводит к гипертрофии мышечных волокон, но не сопровождается регенераторной гиперплазией. После 40-дневного тренировочного процесса во всех исследуемых скелетных мышцах увеличились ширина мышечных волокон и площадь ядер миоцитов (табл.). При этом в двуглавых мышцах бедра, несмотря на выраженную сократительную активность и напряжение во время плавания, количество зрелых мышечных клеток достоверно уменьшилось. Эти результаты согласуются с данными других исследователей, которые в мышечной ткани грызунов, подвергающихся регулярной плавательной нагрузке, обнаружили частичную фрагментацию и очаговый глыбчатый некроз миоцитов [8]. Клеточная форма регенерации мышечной ткани при регулярных нагрузках умеренной интенсивности отсутствовала: абсолютное количество миосателлитов и размеры их ядер во всех исследуемых мышцах не отличались от показателей интактных животных.

Введение ксеногенной суммарной РНК сопровождалось и достоверным увеличением показателей, характеризующих развитие гипертрофической формы регенерации мышечной ткани, и появлением признаков клеточной гиперплазии в мышечной ткани, испытывающей регулярные физические нагрузки (табл.). У подопытных крыс, получивших инъекции РНК, площадь поперечного сечения мышечных волокон увеличилась в среднем в 1,2 раза, толщина волокон возросла на 8–10%. Визуально волокна стали располагаться более плотно и компактно (рис. 1).

В двуглавой мышце бедра введение РНК позволило сохранить количество активно функционирующих зрелых мышечных клеток на физиологическом уровне (число миоцитов у крыс группы 3 не отличалось от показателей, зарегистрированных у интактных животных).

Очевидно, что под влиянием экзогенной лимфоцитарной РНК пул зрелых миоцитов начал пополняться за счет пролиферации клеток-миосателлитов: во всех исследуемых поперечнополосатых мышцах число этих коммитированных клеток-предшественниц и размеры их ядер увеличились по сравнению с показателями крыс контрольной группы, не получивших лимфоцитарную РНК. Миосателлиты легко визуализировались в гистологических препаратах (рис. 1): они имели округлые крупные светлые ядра с равномерно распределенным хроматином в виде крупных глыбок и мелких пылевидных включений.

У здоровых молодых грызунов, живущих в лабораторных условиях, доля клеток-миосателлитов в поперечнополосатых мышцах не превышает 25%. После регулярного принудительного плавания доля молодых пролиферирующих мышечных клеток в мышцах передних и задних конечностей у тренированных животных в процентном отношении была

достоверно больше, чем у интактных крыс (рис. 2), хотя абсолютное количество клеток-миосателлитов в скелетных мышцах не изменялось (табл.). Это относительное увеличение доли миогенных клеток-предшественниц у тренированных животных было связано с уменьшением доли зрелых миоцитов, возникающим вследствие регулярного повреждающего действия физической нагрузки. На фоне введения ксеногенной лимфоцитарной РНК доля мышечных клеток-предшественниц возросла более заметно, и ее прирост наблюдался не только в мышцах конечностей, но и в большой грудной мышце. Увеличение процентного содержания клеток-миосателлитов у тренированных животных, получивших лимфоцитарную РНК, сочеталось с абсолютным приростом числа этих клеток. Так, у крыс группы 3 по сравнению с крысами группы 2 количество клеток-миосателлитов в двуглавой мышце бедра увеличилось в 1,4 раза, в трехглавой мышце плеча – в 1,25 раза, в большой грудной мышце – в 1,43 раза (табл.). О повышении пролиферативной активности миосателлитов у крыс группы 3 свидетельствовало также заметное увеличение размеров ядер этих клеток.

На лепестковой диаграмме, отображающей выраженность признаков гипертрофических и гипер-

Таблица

**Влияние нагрузки умеренной интенсивности и ксеногенной лимфоцитарной РНК на физиологический миогенез**

**Effect of moderate intensity load and xenogeneic lymphocytic RNA on physiological myogenesis**

Показатели	Интактные крысы (группа 1), n = 6	Физическая нагрузка (плавание)	
		Контроль (группа 2), n = 6	Введение РНК (группа 3), n = 6
<b>Двуглавая мышца бедра (<i>m. biceps femoris</i>)</b>			
Ширина мышечного волокна (мкм)	26,1 ± 1,4	31,1 ± 0,7*	34,6 ± 2,5* <sup>▲</sup>
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм <sup>2</sup> )	1450,0 ± 58,6	1514,3 ± 41,7	2009,0 ± 127,9* <sup>▲</sup>
Количество миосателлитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	275,9 ± 22,7	302,2 ± 14,9	423,1 ± 28,6* <sup>▲</sup>
Площадь ядер миосателлитов (мкм <sup>2</sup> )	30,7 ± 0,6	31,0 ± 0,9	32,2 ± 1,7
Количество миоцитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	1058,4 ± 46,5	877,2 ± 36,9*	1001,2 ± 64,4
Площадь ядер миоцитов (мкм <sup>2</sup> )	14,7 ± 0,9	20,9 ± 0,8*	19,6 ± 1,1*
<b>Большая грудная мышца (<i>m. pectoralis major</i>)</b>			
Ширина мышечного волокна (мкм)	25,0 ± 1,0	30,4 ± 0,9*	32,6 ± 1,9* <sup>▲</sup>
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм <sup>2</sup> )	1404,6 ± 77,2	1470 ± 27,5	1786,2 ± 92,3* <sup>▲</sup>
Количество миосателлитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	265,8 ± 14,9	280,7 ± 11,3	399,3 ± 23,2* <sup>▲</sup>
Площадь ядер миосателлитов (мкм <sup>2</sup> )	29,9 ± 0,9	30,5 ± 1,3	32,0 ± 1,6* <sup>▲</sup>
Количество миоцитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	791,4 ± 40,5	785,5 ± 32,2	965,4 ± 51,3* <sup>▲</sup>
Площадь ядер миоцитов (мкм <sup>2</sup> )	14,2 ± 0,6	17,7 ± 0,7*	17,3 ± 0,5*
<b>Трехглавая мышца плеча (<i>m. triceps brachii</i>)</b>			
Ширина мышечного волокна (мкм)	26,7 ± 0,6	30,8 ± 0,8*	33,5 ± 2,0* <sup>▲</sup>
Площадь поперечного сечения мышечного волокна (мкм <sup>2</sup> )	1632,7 ± 54,1	1745,8 ± 82,9	1815,0 ± 65,9
Количество миосателлитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	292,6 ± 20,3	327,8 ± 13,7	411,1 ± 31,6* <sup>▲</sup>
Площадь ядер миосателлитов (мкм <sup>2</sup> )	31,11 ± 1,05	32,24 ± 0,83	33,99 ± 1,47* <sup>▲</sup>
Количество миоцитов (клетки/мм <sup>2</sup> )	910,6 ± 33,4	923,7 ± 33,4	977,4 ± 50,1
Площадь ядер миоцитов (мкм <sup>2</sup> )	17,1 ± 0,6	20,8 ± 0,6*	17,4 ± 0,7 <sup>▲</sup>

*Примечание.* \* – отличия групп 2, 3 от группы 1 (p < 0,05); <sup>▲</sup> – различия между группой 3 и группой 2 (p < 0,05).

*Note.* \* – differences between groups 2, 3 from group 1 (p < 0,05); <sup>▲</sup> – differences between group 3 and group 2 (p < 0,05).

пластических восстановительных процессов в конкретных скелетных мышцах (рис. 3) после введения лимфоцитарной РНК, видно, что оба указанных типа регенераторной активности почти равнозначно проявляют себя в мышцах задних конечностей. В мышцах передних конечностей регенераторный ответ на введение РНК при физической нагрузке был выражен слабее, чем в других исследуемых мышцах, но при этом преобладали гиперпластические процессы, связанные с активацией пролиферации клеток-сателлитов. Наибольшая ответная реакция на лимфоидный РНК-сигнал была зарегистрирована в больших

грудных мышцах – в них под влиянием ксеногенной лимфоцитарной РНК мышечные волокна увеличили свой размер на 21%, а число клеток-миосателлитов в этих мышцах возросло на 42%. Вероятно, данный феномен был связан как с исходной относительно большей долей клеток-миосателлитов в *m. pectoralis major* по сравнению с мышцами конечностей (рис. 2), так и с повышенной нагрузкой на грудные мышцы во время плавания.

При изучении *in vivo* свойств любых экзогенных биологически активных веществ всегда возникает вопрос, как именно эти вещества осуществляют

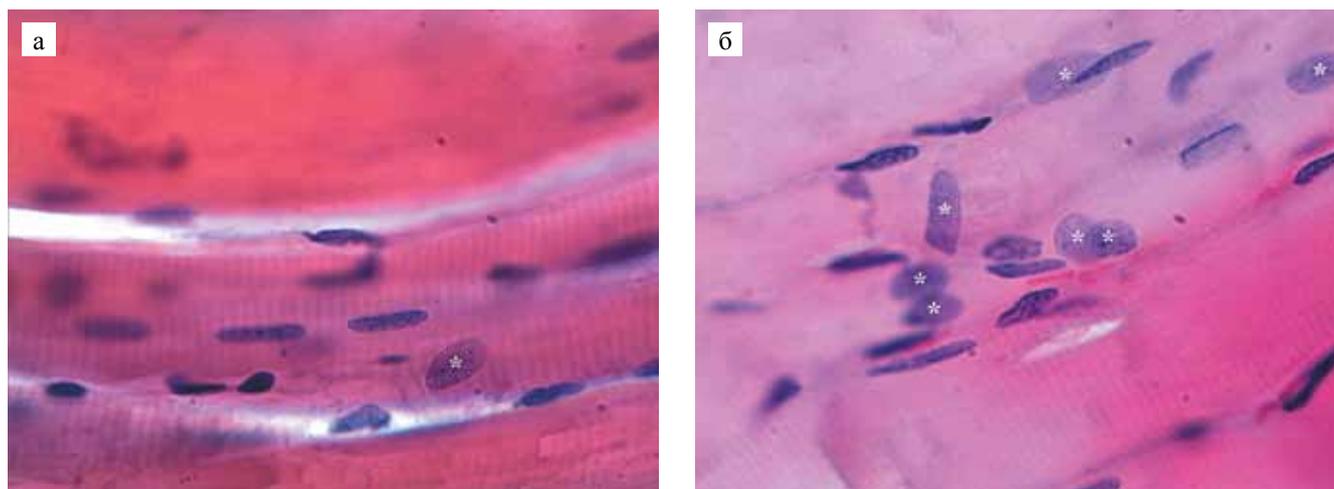


Рис. 1. Клетки-миосателлиты (ядра\*) в поперечнополосатом мышечном волокне двуглавой мышцы бедра (*m. biceps femoris*): а – интактная мышца (группа 1); б – мышца после введения лимфоцитарной РНК на фоне регулярной нагрузки средней интенсивности (группа 3). Окраска: гематоксилин – эозин, ×1000, масляная иммерсия

Fig. 1. Myosatellite cells (nuclei\*) in the transverse striated muscle fiber of the *m. biceps femoris*: а – intact muscle (group 1); б – muscle after injection of lymphocytic RNA against the background of regular load of moderate intensity (group 3). H&E staining, ×1000 magnification, oil immersion

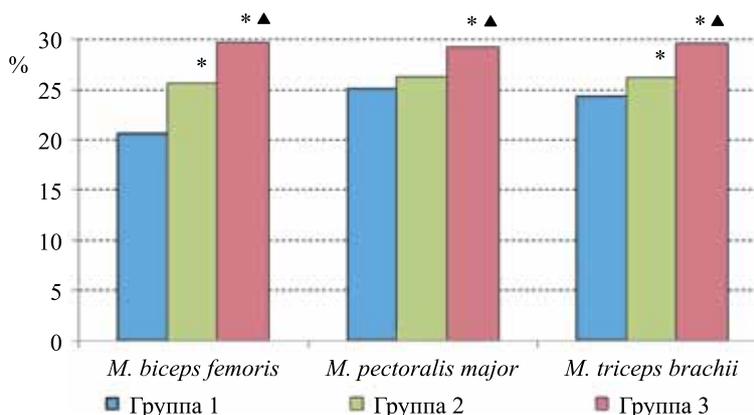


Рис. 2. Процентное содержание миосателлитов в мышцах интактных крыс (группа 1), в мышцах крыс после регулярной физической нагрузки (группа 2), в мышцах крыс после регулярной физической нагрузки и введения ксеногенной лимфоцитарной РНК (группа 3). \* – отличия групп 2, 3 от группы 1 ( $p < 0,05$ ); ▲ – различия между группами 2 и 3 ( $p < 0,05$ )

Fig. 2. Percentage of myosatellite cells in the muscles of intact rats (group 1), in the muscles of rats after regular exercise (group 2), in the muscles of rats after regular physical activity and injection of xenogeneic lymphocytic RNA (group 3). \* – differences between groups 2, 3 and group 1 ( $p < 0.05$ ); ▲ – differences between groups 2 and 3 ( $p < 0.05$ )

свои регуляторные функции. На настоящий момент неизвестно, какие клетки в организме являются мишенью для экзогенной морфогенетически активной лимфоцитарной РНК, т. е. действует ли она непосредственно на ткань или же передает информационный сигнал Т-лимфоцитам реципиента, которые, в свою очередь, активируют или тормозят пролиферацию и дифференцировку клеток. В рамках существующей концепции о лимфоидной РНК-регуляции восстановительных процессов [5, 9] мы предполагаем, что

морфогенетически активная лимфоцитарная РНК действует на клетки других, нелимфоидных органов опосредованно, через Т-лимфоциты, приверженные определенной ткани или органу. В связи с этим во второй части эксперимента мы оценили динамику содержания суммарной РНК в лимфоцитах периферической крови, лимфоцитах селезенки и в мышечной ткани интактных животных после введения им ксеногенной лимфоцитарной РНК (рис. 4). Оказалось, что даже через сутки после введения в организм

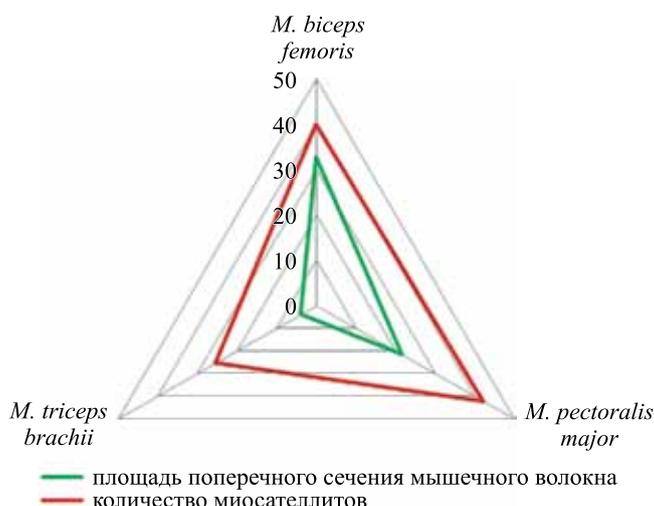


Рис. 3. Степень выраженности гипертрофии и гиперплазии в разных скелетных мышцах после введения ксеногенной лимфоцитарной РНК в условиях регулярной физической нагрузки (в процентах от контрольных значений)

Fig. 3. Severity of hypertrophy and hyperplasia in different skeletal muscles after injection of xenogeneic lymphocytic RNA under conditions of regular physical activity (as a percentage of control values)

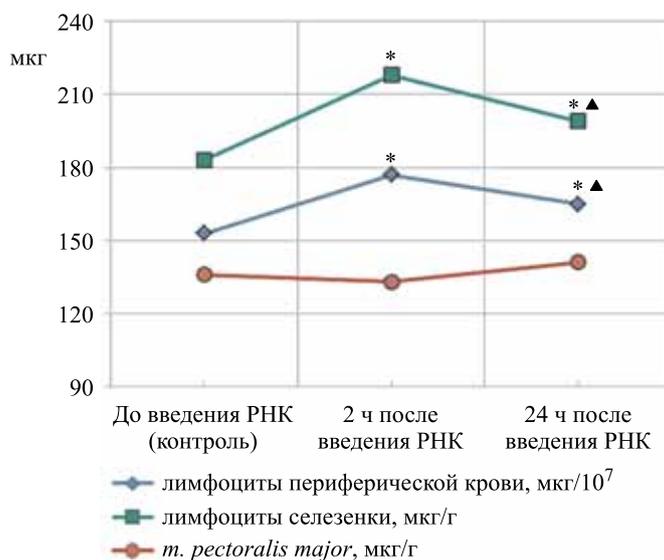


Рис. 4. Динамика содержания суммарной РНК в тканях интактных крыс после введения ксеногенной лимфоцитарной РНК. \* – отличия от контроля ( $p < 0,05$ ); ▲ – различия между показателями, полученными через 2 ч и через 24 ч после введения РНК ( $p < 0,05$ )

Fig. 4. Dynamics of total RNA content in tissues of intact rats after injection of xenogeneic lymphocytic RNA. \* – differences from control ( $p < 0.05$ ); ▲ – differences between the indicators obtained 2 hours and 24 hours after RNA injection ( $p < 0.05$ )

животных экзогенной РНК содержание суммарной РНК в поперечнополосатой мышечной ткани не изменилось, т. е. экзогенная лимфоцитарная РНК не проникала в миоциты. В отличие от мышечных клеток лимфоциты периферической крови и лимфоциты селезенки, по-видимому, активно поглощали экзогенную РНК как минимум в течение 2 часов после инъекции. К 24-му часу после введения лимфоцитарной РНК содержание РНК в лимфоцитах периферической крови и селезенки уменьшилось, но оставалось достоверно больше контрольного уровня.

## ОБСУЖДЕНИЕ

О том, что аллогенная и ксеногенная РНК может быстро проникать в лимфоидные клетки, известно достаточно давно: 3% РНК, выделенной из лимфоцитов периферической крови здоровых людей или пациентов с хроническим лимфобластным лейкозом, через 3 минуты инкубации обнаруживалось внутри аллогенных лимфоцитов и лимфоидных клеток селезенки мышей, а через 15 минут внутри этих клеток находилось уже 8% экзогенной РНК [10]. Незначительное снижение удельной радиоактивности клеток после многократного отмывания и обработки панкреатической рибонуклеазой свидетельствовало о том, что экзогенная РНК действительно поглощалась лимфоцитами, а не адсорбировалась на их мембране. Так же быстро в лимфоидные клетки селезенки проникала гомологичная суммарная РНК, стимулируя при этом их синтетическую активность [11]. Современные данные мировой литературы свидетельствуют о том, что главными участниками лимфоидной регуляции миогенеза являются Т-хелперы, а именно регуляторные Т-клетки (Treg), которые в большом количестве обнаруживаются вокруг регенерирующих мышечных волокон [12, 13]. Предполагается, что это особая популяция Treg, которая пролиферирует не в лимфоузлах и селезенке, а в месте повреждения мышечной ткани. Особенностью этих Т-регуляторных клеток «мышечного типа» является их способность к синтезу фактора роста – амфирегулина. Поскольку среди Т-лимфоцитов селезенки обнаружены амфирегулин-продуцирующие Т-клетки, вполне возможно, что эти уже «обученные» Т-клетки мигрируют из нее в поврежденную мышцу. К настоящему времени доказано, что «обслуживающие» конкретную мышцу Treg посредством амфирегулина напрямую усиливают пролиферацию и дифференцировку клеток-миосателлитов *in vivo* и *in vitro*, а у мышей, лишенных Treg, регенеративный потенциал миосателлитов значительно снижается [12]. Кроме того, в организме лабораторных грызунов обнаружены Т-клетки памяти, которые начинают экспрессировать специфические миорегуляторные белки при повторных повреждениях мышцы [14].

Результаты проведенного нами исследования являются доказательством того, что сигнал к усиленной пролиферации находящегося в мышцах тканеспеци-

фичного клона регуляторных Т-лимфоцитов может передаваться дистантно, с помощью молекул РНК. Во-первых, в качестве источника морфогенетически активной РНК мы использовали лимфоциты животного в периоде активного гистогенеза (вес поросят в течение первого месяца жизни увеличивается в 8 раз). Во-вторых, введение подопытным крысам ксеногенной морфогенетически активной лимфоцитарной РНК способствовало развитию не только саркоплазматической и миофибриллярной гипертрофии мышечных волокон, но и стимулировало процесс клеточной регенерации, сопровождающейся увеличением числа клеток-миосателлитов в поперечнополосатой мышечной ткани. В-третьих, после введения РНК в самой мышечной ткани количество рибонуклеиновых кислот не изменялось, но достоверно увеличивалось как в лимфоцитах селезенки, так и в лимфоцитах периферической крови. Вероятнее всего, посредниками в этой дистантной передаче РНК-сигнала от лимфоидных клеток скелетным мышцам являются молекулы микроРНК, которые не разрушаются плазменными и тканевыми РНКазами. В настоящее время во всем мире активно изучаются как регенераторные функции различных микроРНК, так и спектры микроРНК, секретлируемые разными типами Т-лимфоцитов, и есть все основания полагать, что в недалеком будущем будут расшифрованы РНК-механизмы передачи регенерационной лимфоцитарной информации. Первый шаг на этом пути уже сделан. В 2011 году в Т-лимфоцитах было обнаружено семейство микроРНК-223 [15], в 2020 году было доказано, что микроРНК-223-3р активируется на ранней стадии регенерации скелетных мышц после повреждения, а нокаут гена, кодирующего синтез этой микроРНК, приводит к усилению воспаления, торможению регенерации и развитию интерстициального фиброза в поперечнополосатой мышечной ткани [16]. Установлено также, что интенсивно экспрессирующаяся в Т-лимфоцитах микроРНК-27 [17] подавляет синтез миостатина – белка, угнетающего пролиферацию миосателлитов [18], следовательно, повышенная экспрессия микроРНК-27 в Т-клетках при повреждении мышечной ткани может являться одним из механизмов, посредством которого Т-лимфоциты стимулируют миогенез.

Эффективность именно ксеногенной лимфоцитарной РНК позволяет нам утверждать, что Т-лимфоцитарный контроль эффекторного звена двигательной системы – это универсальный механизм регуляции функционального состояния мышечной ткани у всех млекопитающих, поскольку способность к перемещению в пространстве является жизненно важной функцией, необходимой для реализации мотивации поиска пищи или полового партнера. Дальнейшее изучение лимфоцитарной регуляции миогенеза является чрезвычайно актуальной задачей для медицины, так как создание пригодных для использования в регенеративной медицине препаратов ксеногенной

РНК может стать одним из передовых методов субклеточной терапии мышечных дистрофий, а также других заболеваний, связанных с патологией скелетных мышц.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Тишевская НВ, Геворкян НМ, Козлова НИ. Роль Т-лимфоцитов в гормональной регуляции морфогенетических процессов. *Успехи современной биологии*. 2015; 135 (2): 189–202. *Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Kozlova NI*. The role of T-lymphocytes in the hormonal regulation of morphogenetic processes. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2015; 135 (2): 189–202.
2. D'Alessio FR, Kurzhagen JT, Rabb H. Reparative T lymphocytes in organ injury. *J Clin Invest*. 2019; 129: 2608–2618. doi: 10.1172/JCI124614.
3. Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J et al. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell research*. 2015; 25 (6): 655. doi: 10.1038/cr.2015.58.
4. Kwee BJ, Budina E, Najibi AJ, Mooney DJ. CD4 T cells regulate angiogenesis and myogenesis. *Biomaterials*. 2018; 178: 109–121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.003.
5. Тишевская НВ, Бабаева АГ, Геворкян НМ. Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2016; 102 (11): 1280–1301. *Tishevskaya NV, Babaeva AG, Gevorkyan NM*. The role of lymphocytic RNA in intercellular information exchange and regulation of regenerative processes. *Rossiyskiy fiziologicheskiy Zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2016; 102 (11): 1280–1301.
6. Гоникова ЗЗ, Никольская АО, Кирсанова ЛА, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Севастьянов ВИ. Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 113–121. *Gonikova ZZ, Nikolskaya AO, Kirsanova LA, Shagidulin MYu, Onishchenko NA, Sevastyanov VI*. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov*. 2019; 21 (1): 113–121. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-113-121.
7. Галлямутдинов РВ, Астахова ЛВ, Головнева ЕС, Серышева ОЮ. Влияние лазерного инфракрасного излучения на некоторые морфофункциональные показатели регенерирующей скелетной мышцы в возрастном аспекте. *Лазерная медицина*. 2020; 24 (2–3): 90–94. *Gallyamutdinov RV, Astahova LV, Golovneva ES, Serysheva OYu*. Vliyanie lazernogo infrakrasnogo izlucheniya na nekotorye morfofunktsional'nye pokazateli regeneriruyushchej skeletnoj myshcy v vozrastnom aspekte. *Lazernaya medicina*. 2020; 24 (2–3): 90–94. doi: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-90-94.
8. Хабибуллин РМ, Бакирова АУ, Хабибуллин ГМ, Ахмадуллина ЕТ. Биохимические показатели крови и морфологические изменения мышечной ткани у мышей после физических нагрузок на фоне применения левзеи сафлоровидной. *Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана*. 2019; 238 (2): 215–219. *Khabibulin RM, Bakirova AU, Khabibulin GM, Akhmadullina ET*. Blood biochemical parameters and morphological changes of muscle tissue in mice after exercise on the application of rhaponticum carthamoides. *Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im. N.E. Bauman*. 2019; 238 (2): 215–219. doi: 10.31588/2413-4201-1883-238-2-215-220.
9. Тишевская НВ, Геворкян НМ, Козлова НИ. Современный взгляд на роль Т-лимфоцитов в регуляции эритропоэза. *Успехи современной биологии*. 2016; 136 (1): 83–96. *Tishevskaya NV, Gevorkyan NM, Kozlova NI*. A modern view of the role of T-lymphocytes in regulation of erythropoiesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2016; 136 (1): 83–96.
10. Блинов МН, Луганова ИС, Владимиров АД. Включение экзогенной РНК в лейкоциты человека. *Проблемы гематологии и переливания крови*. 1981; 26 (1): 38–40. *Blinov MN, Luganova IS, Vladimirova AD*. Vklucheniye ekzogennoy RNK v leykotsity cheloveka. *Problemy gematologii i perelivaniya krvi*. 1981; 26 (1): 38–40.
11. Wang SR, Giacomoni D, Dray S. Physical and chemical characterization of RNA incorporated by rabbit spleen cells. *Exp Cell Res*. 1973; 78 (1): 15–24. doi: 10.1016/0014-4827(73)90032-3.
12. Burzyn D, Kuswanto W, Kolodin D, Shadrach JL, Cerletti M, Jang Y et al. A special population of regulatory T-cells potentiates muscle repair. *Cell*. 2013; 155 (6): 1282–1295. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.054.
13. Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol*. 2018; 9: 585. doi: 10.3389/fimmu.2018.00585.
14. Tidball JG. Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017; 17 (3): 165–178. doi: 10.1038/nri.2016.150.
15. Grigoryev YA, Kurian SM, Hart T, Nakorchevsky AA, Chen C, Campbell D et al. MicroRNA regulation of molecular networks mapped by global microRNA, mRNA, and protein expression in activated T lymphocytes. *J Immunol*. 2011; 187 (5): 2233–2243. doi: 10.4049/jimmunol.1101233.
16. Cheng N, Liu C, Li Y, Gao S, Han YC, Wang X et al. MicroRNA-223-3p promotes skeletal muscle regeneration by regulating inflammation in mice. *J Biol Chem*. 2020; 295 (30): 10212–10223. doi: 10.1074/jbc.RA119.012263.
17. Kuchen S, Resch W, Yamane A, Kuo N, Li Z, Chakraborty T et al. Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity*. 2010; 32 (6): 828–839. doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.009.
18. Wang XH. MicroRNA in myogenesis and muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2013; 16 (3): 258–266. doi: 10.1097/MCO.0b013e32835f81b9.

Статья поступила в редакцию 7.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 7.06.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-142-147

## КЛЕТКИ СЕРТОЛИ: ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА, СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

*Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Скалецкая*

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

В связи с осложнениями, обусловленными неизбежным применением иммуносупрессивных препаратов при трансплантации органов и клеток, вызывает интерес использование естественных механизмов обеспечения иммунологической толерантности, выявленных в организмах животных и человека. Давно известно, что в них имеются определенные области, в том числе семенник, где иммунные реакции практически невозможны. В настоящем обзоре основное внимание уделено роли клеток Сертоли, обеспечивающих иммунопривилегированность семенника. Описываются способы изоляции и культивирования клеток Сертоли и обсуждаются возможности их использования в биологии и медицине.

*Ключевые слова:* семенник, клетки Сертоли, иммунопривилегированность, культивирование клеток.

## SERTOLI CELLS: IMMUNOMODULATORY PROPERTIES, METHODS OF ISOLATION AND CULTURE

*N.N. Skaletskiy, G.N. Skaletskaya*

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

Due to complications caused by the inevitable use of immunosuppressive drugs in organ and cell transplantation, the use of natural mechanisms of immunological tolerance identified in animal and human organisms arouses interest. It has long been known that there are certain areas in them, including the testis, where immune reactions are virtually impossible. Our review focuses on the role of Sertoli cells that provide testicular immune privilege. Methods of isolation and cultivation of Sertoli cells are described and their potentials in biology and medicine are discussed.

*Keywords:* testis, Sertoli cells, immune privileged cells, cell culture.

### ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация донорских органов может обеспечить радикальную помощь больным с терминальной стадией хронических заболеваний ряда органов, прежде всего почек, сердца и печени. Однако нехватка подходящих доноров существенно ограничивает применение такого метода лечения. Теоретически использование в качестве донорского источника органов и тканей животных могло бы обеспечить неограниченный их запас и удовлетворить потребность в трансплантационном лечении, но агрессивное иммунное отторжение ксенотрансплантатов является основным препятствием для их использования в клинике [1, 2]. При этом медикаментозное продление их выживаемости требует таких доз иммуносупрессив-

ных препаратов, которые являются высокотоксичными и поэтому неприемлемыми для применения у реципиентов [3–7]. В связи с этим вызывает интерес использование естественных механизмов обеспечения иммунологической толерантности, выявленных в организмах животных и человека.

Давно известно, что в организме есть определенные области, где иммунные реакции практически невозможны. К ним относятся такие органы или их части, как семенник, мозг, передняя камера глаза, яичник, беременная матка и плацента [8]. Эти области получили название иммунопривилегированных зон. Помещение в них как аллогенных, так и ксеногенных органов (или их фрагментов), тканей и клеток не приводит к отторжению трансплантатов.

**Для корреспонденции:** Скалецкий Николай Николаевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

**Corresponding author:** Nikolay Skaletskiy. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (903) 790-95-39. E-mail: NSkaletsky@mail.ru

В частности, многократно показано, что чужеродные трансплантаты, введенные интратестикулярно, выживают дольше, чем те, которые имплантируются в другие места [9]. При этом загадочность этого феномена в определенной мере сохраняется, и механизмы, обеспечивающие такую иммунную привилегию, остаются недостаточно ясными.

В настоящем обзоре основное внимание уделено выяснению факторов, обеспечивающих иммунопривилегированность семенника, и роли, которую играют клетки Сертоли, являющиеся незародышевыми клетками, локализующимися в семенном эпителии, в обеспечении этой иммунной толерантности.

## ИММУНОМОДЕЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК СЕРТОЛИ

Клетки Сертоли (КС) были впервые описаны еще в 1865 году Энрико Сертоли, но оставались в значительной степени неизвестными до 1975 года, когда были проведены исследования, которые позволили получить новые данные о структуре и функциональных способностях этих уникальных клеток [10].

Было показано, что КС, несомненно, играют ключевую роль в сперматогенезе. В гонадах плода они дифференцируются первыми, и в свою очередь индуцируют развитие семенных канальцев [11]. Являясь соматическими клетками, КС осуществляют управление зародышевыми клетками во время их развития и обеспечивают полноценный сперматогенез у взрослых животных [12–16]. В зрелом семеннике КС поддерживают необходимое структурно-функциональное состояние семенного эпителия и отвечают за формирование гемато-тестикулярного барьера, а также осуществляют секрецию биомолекул, таких как трансферрин и андрогенсвязывающий белок, обеспечивающих питание зародышевых клеток и фагоцитоз дегенерирующих зародышевых клеток [10, 14].

Чрезвычайно важным является тот факт, что помимо питательных веществ и ростовых факторов КС могут секретировать различные факторы иммунной защиты, такие как цитокины [17]. В связи с этим область использования КС значительно расширилась. Этому также способствовало получение данных о том, что совместная инкубация с КС способствует пролиферации и сохранению жизнеспособности различных клеток, в частности нейроцитов и островковых клеток [18–20]. Иммуномодулирующие свойства КС были подтверждены после их сокультивирования с панкреатическими островками и ксенотрансплантации последних животным с экспериментальным сахарным диабетом [20, 21].

Весьма существенным в выяснении иммуномодулирующего и трофического воздействий КС следует считать предположение о том, что их морфофункциональные свойства похожи на таковые у мезенхимальных стволовых клеток (МСК) находящихся на ранней

стадии дифференцировки [22]. В этом исследовании было обнаружено, что поверхностные маркеры КС и МСК были почти одинаковыми. В то же время пролиферативная активность КС, а также склонность к остеогенной и адипогенной дифференцировке были слабее, чем у МСК. Ядерное окрашивание показало, что по сравнению с МСК хроматин в КС начинал агрегироваться и был в немного большем количестве. Окрашивание на  $\beta$ -галактозидазу показало, что КС находились в слегка стареющем состоянии. Кроме того, они секретировали цитокины в несколько меньшем количестве, чем МСК.

Главным образом путем формирования гемато-тестикулярного барьера, который, по сути, является совокупной популяцией соединительных комплексов КС, осуществляется защита сперматозоидов от иммунного обнаружения и разрушения. Механизмы иммуномоделирующего действия КС еще четко не определены, но, возможно, этому способствует тот факт, что эти клетки не экспрессируют основные антигены комплекса гистосовместимости класса 1 или 2 и, следовательно, не могут быть обнаружены иммунной системой [23]. Одним из предполагаемых основополагающих механизмов, обеспечивающих иммунную защиту, является экспрессия FasL (лиганда CD 95) [24, 25], с помощью которого изолированные КС индуцируют локализованную иммунную привилегированность совместно трансплантированных клеток. Это интересно тем, что весьма похоже на уже четко определенный механизм подавления иммунного ответа, естественного в системе млекопитающих. Альтернативным или дополнительным механизмом внетестикулярной иммунопротективной активности КС является путь подавления активированной пролиферации лимфоцитов. Было показано, что кондиционированная среда, полученная после инкубации КС, ингибирует пролиферацию лимфоцитов селезенки в дозозависимой пропорции. Это, по-видимому, происходит посредством соответствующего снижения секреции интерлейкина 2 (IL-2), поскольку добавление экзогенного IL-2 не смогло обратить вспять это эффект [23–25].

Для детального анализа причин, обеспечивающих иммунопривилегированность семенников, и выяснения тонких механизмов влияния КС на выживание аллогенных и ксеногенных клеточных трансплантатов необходимо обеспечить получение препарата жизнеспособных КС с помощью эффективной ферментной обработки тестикулярной ткани и/или путем подбора адекватного режима ее культивирования.

## ВЫДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК СЕРТОЛИ

Как правило, методы выделения КС из семенников имеют своей основной целью устранение из получаемого препарата контаминирующих его элементов соединительной ткани и интерстициальных

клеток. Большинство исследований по изоляции КС проведено на грызунах [26–30].

Наиболее распространенный метод выделения очищенных от контаминантов КС заключается в использовании последовательной ферментной обработки тестикулярной ткани [26, 29–31]. Процедура выделения КС проводится обычно следующим образом: сначала яички декапсулируют и белковую оболочку, состоящую из фибробластов, МСК и внеклеточного матрикса (ВКМ), механически удаляют с помощью щипцов и ножниц. Декапсулированные семенники тщательно измельчают, чтобы высвободить интерстициальные клетки (клетки Лейдига, перитубулярные миоидные клетки, макрофаги, эндотелиальные клетки, фибробласты и МСК), которые затем вымывают серией декантирований или низкоскоростного центрифугирования. Затем оставшуюся в осадке ткань подвергают двухэтапной инкубации в смеси ферментов, состоящей из коллагеназы, трипсина и гиалуронидазы, используемых в различных комбинациях, в зависимости от конкретных протоколов. Первая инкубация с ферментами направлена на переваривание внеклеточного матрикса, что приводит к отслоению большего количества интерстициальных клеток снаружи семенных канальцев. После отмывания от отделившихся клеток изолированные канальцы дополнительно инкубируют во второй ферментной смеси для разборки канальцев на отдельные КС и зародышевые клетки, которые затем выдерживают при температуре 32–37 °С. Так как зародышевые клетки не имеют склонности к адгезии, их несложно удалить промыванием гипотоническим солевым раствором или в процессе выполнения последующих замен питательной среды. Основные этапы выделения КС представлены ниже (рис.).

Некоторые исследователи модифицировали описанный выше протокол обработки тестикулярной

ткани, проводя измельчение канальцев только после первого ферментного переваривания или используя фильтрование (вместо центрифугирования) для отделения клеток от полученных в результате измельчения микрофрагментов канальцев [32, 33]. Чтобы повысить степень чистоты препарата КС, некоторые исследователи разделяли полученные в результате ферментного переваривания изолированные клетки с помощью центрифугирования в градиентах плотности или путем помещения их на короткий период в покрытые лектином чашки перед вымыванием неприкрепившихся клеток [34]. По мнению ряда авторов, проводивших исследования в разные годы, эти ферментативные методы могут применяться как в опытах на крысах, так и на мышах, как на препубертатных, так и на взрослых животных, то есть не требуют видоспецифических и возрастных модификаций [30, 35, 36]. Однако, как было показано в некоторых опубликованных ранее работах, при использовании более возрастных животных контаминация зародышевыми клетками может быть высокой, что требует увеличения времени инкубации тестикулярной ткани с каждой ферментативной смесью. Кроме того, для удаления зародышевых клеток настоятельно рекомендовалось применение гипотонического шока [30, 37].

Таким образом, несколько факторов могут влиять на величину выделяемой клеточной массы и чистоту получаемого препарата КС, включая возраст донора. У мышей популяция КС падает с 50% от общего количества тестикулярных клеток сразу после рождения до <1% у взрослых особей [38, 39].

Хотя считается, что только зрелые КС выполняют свои функции в сперматогенезе *in vivo*, такие как формирование гематотестикулярного барьера и секреция жидкости, широко признано, что они не пролиферируют и могут поддерживаться в культуре

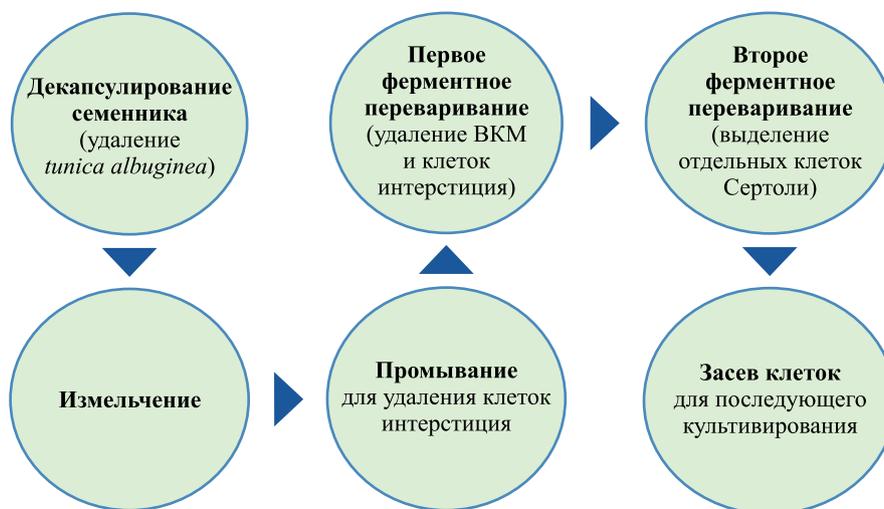


Рис. Основные этапы выделения клеток Сертоли

Fig. The main stages of Sertoli cell isolation

только в течение ограниченного времени [12]. В то же время некоторые исследователи получали из семенников взрослых крыс и мышей пролиферирующие «сертолиподобные» клетки, которые можно было культивировать в течение нескольких недель [40, 41].

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК СЕРТОЛИ

Использование первичных культур позволило провести молекулярные и генетические исследования, способствовавшие выяснению механизмов, с помощью которых КС поддерживают зародышевые клетки и влияют на процесс сперматогенеза [10, 11]. Получение культур КС и изучение их морфофизиологических свойств в процессе их инкубации *in vitro* являются фундаментальными инструментами для изучения молекулярных механизмов, обеспечивающих поддержание гомеостаза и развитие патологических процессов в семенниках. При этом можно проследить за морфофизиологическими изменениями, происходящими в различных клетках под влиянием вводимых в культуральную среду всевозможных специфических веществ, включая гормоны, факторы роста и другие субстанции, обладающие как стимулирующим, так и ингибирующим эффектом [12]. Однако в связи с тем, что в полной мере смоделировать сложные взаимодействия между различными типами клеток в яичке в условиях *in vitro* практически невозможно, интерпретировать результаты, полученные в условиях культивирования, надо с осторожностью и по возможности подтвердить их в экспериментах *in vivo*. Например, тестостерон играет решающую роль в регуляции сперматогенеза, но КС, по-видимому, не реагируют на этот андроген в условиях культуры, скорее всего, из-за снижения экспрессии рецепторов андрогенов [13, 14]. Тем не менее было показано, что системы *in vitro* отражают многие особенности КС, ранее наблюдавшиеся *in vivo*, такие как образование плотных соединений, секреция трансферрина, фагоцитоз зародышевых клеток и реакция на фолликулостимулирующий гормон [15]. Кроме того, было показано, что большинство свойств, впервые наблюдаемых *in vitro*, имеют место *in vivo* [42].

Так как незрелые КС менее дифференцированы и больше склонны к пролиферации, их адаптационные возможности в условиях культивирования оказываются выше, чем у клеток, полученных от взрослых грызунов. Поэтому большинство исследований проводится на КС, выделенных от препубертатных (незрелых) животных, обычно на постнатальном сроке 18–22 дня у крыс и 10–18 дней – у мышей [1, 26, 32, 43, 44]. В то же время имеются данные о том, что незрелые КС могут себя во многих отношениях вести *in vitro* так же, как их зрелые аналоги [45]. Например, первичные культуры незрелых КС показали сопоставимую кинетику с культурами от зрелых доноров с точки зрения фагоцитоза и экспрессии соединительных белков, участвующих в формировании ге-

матотестикулярного барьера [46, 47]. Как показали недавние исследования, выявлено сниженное содержание внутриклеточных липидов и белков, участвующих в клеточном метаболизме в КС, выделенных от 20-дневных мышей, по сравнению с аналогичными показателями, определенными в КС, полученных от взрослых животных [48]. Поэтому следует проявлять осторожность при экстраполяции результатов, полученных при исследовании КС от незрелых грызунов, на предполагаемую физиологическую ситуацию у взрослых особей.

Следует кратко описать основные условия, при которых проводится культивирование КС. Обычно при инкубации КС используют модификации сред Дульбекко и Игла с бычьей фетальной сывороткой или без нее и с добавками, такими как инсулин, трансферрин, селенит натрия и эпидермальный фактор роста [32, 48–50]. Хотя использование различных добавок предназначено для имитации микроокружения, существующего *in vivo*, неясно, как их отсутствие влияет на культуры КС. Интересно, что уменьшение количества или отсутствие сыворотки в культуральной среде было предложено для улучшения чистоты первичных культур КС [40, 41, 51]. Неиспользование питательных добавок, прежде всего сыворотки, как бы создающее условия для «голодания» КС, направлено на то, чтобы избежать значительного увеличения количества быстро пролиферирующих клеток-контаминантов, таких как перитубулярные миоидные клетки, фибробласты, эндотелиальные клетки и МСК [40, 52]. Кроме того, присутствие сыворотки влияет на фагоцитарную активность и может ингибировать ответ на определенные гормоны, такие как фолликулостимулирующий гормон [53, 54]. При этом давно было показано, что КС могут сохранять свою жизнеспособность, морфологию и секреторную активность в отсутствие сыворотки [55]. Однако в ряде сообщений последних лет указывается на то, что при соблюдении оптимальных условий использования сыворотки при получении первичных культур КС можно обойтись без негативных последствий [35, 56, 57]. Поэтому, несмотря на то, что «метод голодания» довольно успешно используется при получении более чистых популяций КС, следует провести сравнительное исследование влияния различных условий применения сыворотки для дальнейшего выяснения его эффективности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая уникальные морфофизиологические особенности клеток Сертоли, разработку методов их выделения и культивирования можно считать весьма перспективной. Исследования с применением культур КС в условиях *in vitro* и *in vivo* позволят не только получить новые данные о заболеваниях мужской половой сферы и разработать способы их коррекции, но и решить ряд проблем в различных

областях биологии и медицины, прежде всего в тканевой инженерии и трансплантологии. Способность КС стимулировать рост и выживаемость ряда клеток в процессе совместного культивирования и оказывать на них иммуномодулирующее действие может быть использована для улучшения результатов клеточной трансплантации.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Le Bas-Bernardet S, Blancho G. Current cellular immunological hurdles in pig-to-primate xenotransplantation. *Transpl Immunol.* 2009; 21 (2): 60–64.
2. Kaur G, Wright K, Mital P. Neonatal Pig Sertoli Cells Survive Xenotransplantation by Creating an Immune Modulatory Environment Involving CD4 and CD8 Regulatory T Cells. *Cell Transplant.* 2020 Jan-Dec; 29: 963689720947102.
3. Cooper DKC, Hara H, Iwase H, Yamamoto T, Jagdale A, Kumar V et al. Clinical pig kidney xenotransplantation: how close are we? *J Am Soc Nephrol.* 2020; 31 (1): 12–21.
4. Stephany BR, Augustine JJ, Krishnamurthi V, Goldfarb DA, Flechner SM, Braun WE et al. Differences in proteinuria and graft function in de novo sirolimus-based vs. calcineurin inhibitor-based immunosuppression in live donor kidney transplantation. *Transplantation.* 2006; 82 (3): 368–374.
5. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005; 56 (1): 23–46.
6. Thompson P, Badell IR, Lowe M, Turner A, Cano J, Avila J et al. Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation: CD40/154 pathway-sparing regimens promote xenograft survival. *Am J Transplant.* 2012; 12 (7): 1765–1775.
7. Vadori M, Cozzi E. Immunological challenges and therapies in xenotransplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4 (4): a015578.
8. Yin M, Xie MN. Sertoli Cells Induce Xenolymphocyte Apoptosis *In Vitro.* *Transpl Proc.* 2006 Dec; 38 (Issue 10): 3309–3311.
9. Selawry HP, Whittington KB, Bellgrau D. Abdominal intratesticular islet-xenograft survival in rats. *Diabetes.* 1989; 38: 220.
10. Gou BJI. The Sertoli cell *in vivo* and *in vitro*. *Cell Biology and Toxicology.* 1992; 8 (3): 49–54.
11. Griswold MD, McLean D. The sertoli cell, Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3rd ed. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press. 2006: 949–975.
12. Gassei K, Schlatt S. Testicular morphogenesis: Comparison of *in vivo* and *in vitro* models to study male gonadal development. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007; 1120: 152–167.
13. Griswold MD. Sertoli Cell Biology. Oxford: Elsevier Academic Press; 2015. 469 p.
14. Griswold MD. Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol Rev.* 2016; 96: 1–17.
15. França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology.* 2016; 4: 189–212.
16. França LR, Nobrega RH, Morais RDVS, Assis LHC, Schulz RW, Griswold MD. Sertoli Cell Biology. Pullman, WA: Elsevier; 2015. Sertoli cell structure and function in anamniote vertebrates: 469–469.
17. Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2004; 25: 747–806.
18. Boulogne B, Habert R, Levacher C. Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and Sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells. *Mol Reprod Dev.* 2003; 65: 194–203.
19. Shamekh R, Newcomb J, Mallery J, Cassady CJ, Saporita S, Cameron DF et al. Survival of rat or mouse ventral mesencephalon neurons after cotransplantation with rat sertoli cells in the mouse striatum. *Cell Transplant.* 2005; 14: 551–564.
20. Dufour JM, Rajotte RV, Korbutt GS, Emerich DF. Harnessing the immunomodulatory properties of Sertoli cells to enable xenotransplantation in type I diabetes. *Immunol Invest.* 2003; 32: 275–297.
21. Selawry HP, Cameron DF. Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell transplantation. *Cell Transplant.* 1993; 2: 123–129.
22. Daoyuan Gong, Chunfu Zhang, Tao Li, Jiahui Zhang, Nannan Zhang, Zehua Tao et al. Are Sertoli cells a kind of mesenchymal stem cells? *Am J Transl Res.* 2017; 9 (3): 1067–1074.
23. Luca G, Calvitti M, Nastruzzi C, Macchiarulo G, Becchetti E, Neri LM et al. Effects of simulated microgravity on the morphology and function of neonatal porcine cell clusters cultured with and without Sertoli cells. *Cell Transplant.* 2006; 15 (1): 55–65.
24. Bellgrau D, Gold D, Selawry HP. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature.* 1995; 377: 630–632.
25. Cameron DF, Hushen JJ, Nazian SJ. Formation of Sertoli cell-enriched tissue constructs utilizing simulated microgravity technology. *Ann NY Acad Sci.* 2001 Nov; 944: 420–428.
26. Bernardino RL, Alves MG, Oliveira PF. Establishment of primary culture of Sertoli cells. *Methods in Molecular Biology.* 2018a; 1748: 1–8.
27. Bernardino RL, Alves MG, Oliveira PF. Evaluation of the purity of Sertoli cell primary cultures. *Methods in Molecular Biology.* 2018b; 1748: 9–15.
28. Bhushan S, Aslani F, Zhang Z, Sebastian T, Elsässer HP, Klug J. Isolation of Sertoli cells and peritubular cells from rat testes. *Journal of Visualized Experiments.* 2016; (108): 1–12.
29. Chang YF, Lee-Chang JS, Pannerdoss S, MacLean JA, Rao M. Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *Biotechniques.* 2011 Nov; 51 (5): 341–342, 344. doi: 10.2144/000113764.

30. Zomer HD, Reddi PP. Characterization of rodent Sertoli cell primary cultures. *Mol Reprod Dev.* 2020 Aug; 87 (8): 857–870.
31. Scarpino S, Rita Morena A, Petersen C, Frøysa B, Söder O, Boitani C. A rapid method of Sertoli cell isolation by DSA lectin, allowing mitotic analyses. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 1998; 146 (1–2): 121–127.
32. Elliott M, Zheng S, Park D, Woodson RJ, Reardon MA, Juncadella IJ et al. Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells *in vivo*. *Nature.* 2010; 467 (7313): 333–337.
33. Li F, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Enatsu N, Chiba K, Fujisawa M. Efficient transfection of DNA into primarily cultured rat Sertoli cells by electroporation. *Biology of Reproduction.* 2013 Mar 14; 88 (3): 61. doi: 10.1095/biolreprod.112.106260. Print 2013 Mar.
34. Monfared M, Akbari M, Kashani IR, Solhjoo S, Tooli H, Omid A et al. Inductive role of sustentacular cells (Sertoli cells) conditioned medium on bone marrow derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Morphology.* 2017 Dec; 35 (4): 1597–1606.
35. Ahmadi H, Boroujeni ME, Sadeghi Y, Abdollahifar MA, Khodaghali F, Meftahi GH et al. Sertoli cells avert neuroinflammation-induced cell death and improve motor function and striatal atrophy in rat model of Huntington disease. *Journal of Molecular Neuroscience.* 2018; 65 (1): 17–27.
36. Anway MD, Folmer J, Wright WW, Zirkin BR. Isolation of Sertoli cells from adult rat testes: An approach to *ex vivo* studies of Sertoli cell function. *Biology of Reproduction.* 2003; 68 (3): 996–1002.
37. Rich KA, Bardin CW, Gunsalus GL, Mather JP. Age-dependent pattern of androgen-binding protein secretion from rat sertoli cells in primary culture. *Endocrinology.* 1983; 113 (6): 2284–2293.
38. Oresti GM, García-López J, Aveland MI, Del Mazo J. Cell-type-specific regulation of genes involved in testicular lipid metabolism: Fatty acid-binding proteins, diacylglycerol acyltransferases, and perilipin 2. *Reproduction.* 2013; 146 (5): 471–480.
39. Soumillon M, Necsulea A, Weier M, Brawand D, Zhang X, Gu H et al. Cellular source and mechanisms of high transcriptome complexity in the mammalian testis. *Cell Reports.* 2013; 3 (6): 2179–2190.
40. Ghasemzadeh-Hasankolaei M, Eslaminejad MB, Sedighi-Gilani M, Mokarizadeh A. Starvation is more efficient than the washing technique for purification of rat Sertoli cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal.* 2014; 50 (8): 723–730.
41. Sato Y, Yoshida K, Nozawa S, Yoshiike M, Arai M, Otoi T et al. Establishment of adult mouse Sertoli cell lines by using the starvation method. *Reproduction.* 2013; 145 (5): 505–516.
42. Gwatkin RBL. The Sertoli cell, edited by Lonnie D. Russell and Michael D. Griswold, Cache River Press, Clearwater, FL, 1993, 826 pp. *Molecular Reproduction and Development.* 36 (4): 517.
43. Garcia TX, Farmaha JK, Kow S, Hofmann M-C. RBPJ in mouse Sertoli cells is required for proper regulation of the testis stem cell niche. *Development.* 2014; 141 (23): 4468–4478.
44. Halley K, Dyson EL, Kaur G, Mital P, Uong PM, Dass B et al. Delivery of a therapeutic protein by immune-privileged sertoli cells. *Cell Transplantation.* 2010; 19 (12): 1645–1657.
45. Pineau C, Le Magueresse B, Courtens J-LL, Jégou B. Study *in vitro* of the phagocytic function of Sertoli cells in the rat. *Cell and Tissue Research.* 1991; 264 (3): 589–598.
46. McCabe MJ, Foo CF, Dinger ME, Smooker PM, Stanton PG. Claudin-11 and occludin are major contributors to Sertoli cell tight junction function, *in vitro*. *Asian Journal of Andrology.* 2016; 18 (4): 620–626.
47. Sluka P, O'Donnell L, Bartles JR, Stanton PG. FSH regulates the formation of adherens junctions and ectoplasmic specialisations between rat Sertoli cells *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Endocrinology.* 2006; 189: 381–395.
48. Saewu A, Kongmanas K, Raghupathy R, Netherton J, Kadunganattil S, Linton J-JJ. Primary Sertoli cell cultures from adult mice have different properties compared with those derived from 20-day-old animals. *Endocrinology.* 2020; 161 (1): bqz020.
49. Beattie PJ, Welsh MJ, Brabec MJ. The effect of 2-methoxyethanol and methoxyacetic acid on Sertoli cell lactate production and protein synthesis *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1984; 76 (1): 56–61.
50. Cheng CY, Bardin CW. Identification of two testosterone-responsive testicular proteins in Sertoli cell-enriched culture medium whose secretion is suppressed by cells of the intact seminiferous tubule. *Journal of Biological Chemistry.* 1987; 262 (26): 12768–12779.
51. Zhang H, Liu B, Qiu Y, Fan J. Pure cultures and characterization of yak Sertoli cells. *Tissue and Cell.* 2013; 45 (6): 414–420.
52. Griswold MD, McLean D. The sertoli cell, Knobil and Neill's physiology of reproduction. 3rd ed. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press. 2006; 1: 949–975.
53. Monaco L, Adamo S, Stefanini M, Conti M. Signal transduction in the sertoli cell: Serum modulation of the response to FSH. *Journal of Steroid Biochemistry.* 1989; 32: 129–134.
54. Xiong W, Chen Y, Wang H, Wu H, Lu Q, Han D. Gas6 and the Tyro 3 receptor tyrosine kinase subfamily regulate the phagocytic function of Sertoli cells. *Reproduction.* 2008; 135 (1): 77–87.
55. Skinner MK, Griswold MD. Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biology of Reproduction.* 1982; 27 (1): 211–221.
56. Dong YS, Hou WG, Li Y, Liu DB, Hao GZ, Zhang HF. Unexpected requirement for a binding partner of the syntaxin family in phagocytosis by murine testicular Sertoli cells. *Cell Death and Differentiation.* 2016; 23 (5): 787–800.
57. Doyle TJ, Kaur G, Putrevu SM, Dyson EL, Dyson M, McCunniff WT et al. Immunoprotective properties of primary Sertoli cells in mice: Potential functional pathways that confer immune privilege. *Biology of Reproduction.* 2012; 86 (1): 1–14.

Статья поступила в редакцию 1.07.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 1.07.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-148-161

## ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЗРЕЛЫХ КРЫСИНЫХ ГЕПАТОЦИТОВ В ДЛИТЕЛЬНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ ПЕЧЕНОЧНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ

А.М. Григорьев<sup>1</sup>, И.В. Холоденко<sup>2</sup>, А.Ю. Лупатов<sup>2</sup>, Р.В. Холоденко<sup>3</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>2</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии В.Н. Ореховича», Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБУН «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», Москва, Российская Федерация

**Цель:** получить длительно пролиферирующие клетки, обладающие признаками прогениторных, за счет дедифференцировки зрелых крысиных гепатоцитов с помощью комбинаций малых молекул. **Материалы и методы.** Гепатоциты, выделенные из крысиной печени путем перфузии, культивировали в присутствии набора из трех малых молекул: агониста Wnt сигнального пути (CHIR99021), ингибиторов TGF- $\beta$  (A83-01) и ROCK киназы (Y27632). С помощью флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии в процессе культивирования клеток оценивали морфологические характеристики и особенности роста культуры. Проллиферативную активность клеток анализировали с помощью цейтраферной съемки в режиме реального времени. Экспрессию поверхностных и внутриклеточных маркеров анализировали, используя проточную цитофлуориметрию и флуоресцентную микроскопию высокого разрешения. **Результаты.** Используя комплекс малых молекул Y-27632, A-83-01 и CHIR99021, из зрелых крысиных гепатоцитов были получены длительно пролиферирующие клетки, которые экспрессировали маркеры прогениторных клеток, такие как  $\alpha$ -фетопротейн и HNF4 $\alpha$ . Клетки имели гепатоцитоподобную морфологию и формировали дискретные кластеры пролиферирующих клеток, образующих в процессе культивирования единый клеточный пласт. Удаление из среды малых молекул приводило к экспансии фибробластоподобных клеток и к элиминации потенциально прогениторных гепатоцитоподобных клеток. **Заключение.** Подтверждена возможность получения пролиферирующих прогениторных клеток с помощью дедифференцировки зрелых гепатоцитов.

*Ключевые слова:* гепатоциты, дедифференцировка, печеночные прогениторные клетки, малые молекулы, сигнальные пути, Y-27632, A-83-01, CHIR99021.

## MATURE RAT HEPATOCYTE DEDIFFERENTIATION INTO LONG-LIVED PROLIFERATING HEPATIC PROGENITOR CELLS

А.М. Григорьев<sup>1</sup>, И.В. Кхолоденко<sup>2</sup>, А.Ю. Лупатов<sup>2</sup>, Р.В. Кхолоденко<sup>3</sup>, Л.А. Кирсанова<sup>1</sup>, Ю.Б. Басок<sup>1</sup>, К.Н. Ярыгин<sup>2</sup>, В.И. Севастьянов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

**Objective:** to obtain long-lived proliferating cells with progenitor features by dedifferentiation of mature rat hepatocytes using combinations of small molecules. **Materials and Methods.** Hepatocytes isolated from rat liver by perfusion were cultured in the presence of a cocktail of three small molecules – Wnt signaling pathway activator (CHIR99021), TGF- $\beta$  inhibitors (A83-01) and ROCK kinase (Y27632). The morphological characteristics

**Для корреспонденции:** Григорьев Алексей Михайлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Телефон: (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

**Corresponding author:** Alexey Grigoryev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: 8 (499) 193-86-62. E-mail: Bear-38@yandex.ru

and growth features of the culture were assessed using fluorescence and phase-contrast microscopy during cell culture. Cell proliferative activity was analyzed using real-time time-lapse imaging. The expression of surface and intracellular markers was analyzed using flow cytometry and high-resolution fluorescence microscopy. **Results.** Using a cocktail of small molecules, Y-27632, A-83-01, and CHIR99021, long-lived proliferating cells that express progenitor cell markers, such as  $\alpha$ -fetoprotein and HNF4 $\alpha$ , were obtained from mature rat hepatocytes. The cells had hepatocyte-like morphology and formed discrete clusters of proliferating cells, forming a single cell layer during culturing. Removal of the small molecules from the medium led to expansion of fibroblast-like cells and elimination of potentially progenitor hepatocyte-like cells. **Conclusion.** Proliferating progenitor cells can be obtained by dedifferentiation of mature hepatocytes.

*Keywords: hepatocytes, dedifferentiation, hepatic progenitor cells, small molecules, signaling pathways, Y-27632, A-83-01, CHIR99021.*

## ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на тот факт, что первичные крысиные гепатоциты впервые были выделены из печени более 50 лет назад [1], а первое сообщение о выделении гепатоцитов из человеческой печени появилось спустя еще 20 лет [2], до сих пор остаются нерешенными вопросы длительного культивирования этих клеток и сохранения их в функционально активном состоянии *in vitro*. Между тем к настоящему времени достоверно доказано, что в условиях хронического повреждения печени гепатоциты способны дедифференцироваться в пролиферирующие бипотентные прогениторные/стволовые клетки [3]. В связи с этим большое значение приобретают разработки способов получения прогениторных клеток из зрелых гепатоцитов *in vitro*. Это может не только помочь в большей степени разобраться в происхождении прогениторных клеток печени и в механизмах репрограммирования, но и предложить неограниченный источник клеток для генерации функциональных гепатоцитов, которые находят широкое применение в фармакологии, клинической медицине, тканевой инженерии и при моделировании заболеваний.

За последние несколько лет ученым удалось достичь определенных успехов в данном направлении. Например, были разработаны протоколы трансдифференцировки мезенхимных стволовых клеток в функционально активные гепатоцитоподобные клетки [4], появилось множество работ, в которых гепатоциты получали из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [5], также в ряде исследований описаны подходы к получению так называемых индуцированных гепатоцитов из различных соматических клеток [6]. Все эти методы, безусловно, имеют определенный научный интерес, но в то же время обладают рядом ограничений с точки зрения перспектив использования в клинической практике. В частности, использование генетических модификаций для репрограммирования клеток создает ряд проблем для безопасности их клинического использования. Одним из многообещающих современных подходов, решающих вопросы безопасности, является репрограммирование клеток с

использованием так называемых малых молекул. Малые молекулы – это низкомолекулярные соединения, которые могут включать липиды, моносахариды, вторичные мессенджеры, другие природные соединения, а также лекарственные препараты и иные ксенобиотики. Малые молекулы обладают рядом неоспоримых преимуществ перед любыми другими способами регуляции/изменения судьбы клеток: как правило, они проницаемы для клеток; их проще синтезировать и стандартизировать; себестоимость их невысокая, что позволяет использовать этот способ для массового производства клеток с заданными свойствами. Еще более важно, что эффекты малых молекул можно регулировать, варьируя их концентрации и комбинации, тем самым обеспечивая более высокую степень временного и пространственного контроля над функцией белка-мишени или сигнального пути [7]. В 2017 г. Katsuda et al. [8] опубликовали работу, где была показана возможность получения пролиферирующих печеночных бипотентных прогениторных клеток из зрелых крысиных гепатоцитов с использованием коктейля малых молекул, таких как Y-27632, A-83-01 (ингибиторов ROCK киназы и TGF- $\beta$  соответственно) и CHIR99021 (агониста Wnt сигнального пути), без каких-либо генетических модификаций. Полученные клетки, которые авторы назвали химически-индуцированными печеночными прогениторами (chemically induced liver progenitors – CLiPs), обладали свойствами стволовых клеток, т. е. пролиферировали в культуре и дифференцировались в гепатоциты и холангиоциты. Примерно в это же время была опубликована еще одна работа, в которой описан способ получения печеночных прогениторных клеток из зрелых мышечных гепатоцитов за счет создания *in vitro* условий, моделирующих условия хронического повреждения печени *in vivo*, когда происходит не только пролиферация зрелых гепатоцитов, но и их обратимое превращение в прогениторные клетки протоков [9]. Помимо вышеупомянутых малых молекул CHIR99021, A83-01 и Y27632, эта среда также содержала эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста гепатоцитов (HGF), активаторы Yap сигнализации – лизофосфатидную кислоту и

сфингозин-1-фосфат. Полученные таким способом из гепатоцитов пролиферирующие клетки канальцев (duct-like cells – hepPDCs) были способны претерпевать более 30 пассажей без явных морфологических изменений и нарушений кариотипа. Профили генной экспрессии показали, что эти клетки экспрессируют маркеры гепатоцитов, холангиоцитов и печеночных прогениторных клеток, а также способны дифференцироваться в зрелые функционально-активные гепатоциты [9]. Используя аналогичную культуральную среду с небольшими модификациями, через 2 года авторы получили прогениторные клетки из зрелых человеческих гепатоцитов [10].

Также в 2019 г. была опубликована работа Kim et al. [11], которые использовали коктейль из двух малых молекул A83-01 и CHIR99021 в комбинации с EGF и HGF для получения человеческих печеночных прогениторных клеток из зрелых гепатоцитов, которые они назвали человеческие химически-полученные печеночные прогениторы (human chemically derived hepatic progenitors – hCdHs). Полученные клетки hCdHs экспрессировали маркеры печеночных прогениторных клеток и претерпевали около 10 пассажей в культуре, сохраняя нормальный кариотип и способность дифференцироваться в гепатоциты и эпителиальные клетки желчных протоков *in vitro*. Генное профилирование подтвердило на транскрипционном уровне репрограммирование, показав экспрессию генов, ответственных за прогениторное состояние, и супрессию генов зрелых гепатоцитов. При внутриселезеночной трансплантации в нескольких животных моделях hCdHs клетки эффективно заселяли паренхиму печени [11]. Совсем недавно была опубликована работа, в которой похожим образом, используя коктейль из двух малых молекул A83-01, CHIR99021 и HGF, бипотентные прогениторные клетки были получены из зрелых гепатоцитов нечеловекообразных приматов [12].

Учитывая значимость проблемы получения длительно пролиферирующих клеток печени в культуре для решения задач клеточной биологии, отсутствие работ на эту тему в отечественной науке, а также значимость разработки технологии для воспроизводства клеточной массы и использования в регенеративной медицине, мы поставили целью нашей работы получение длительно пролиферирующих клеток, обладающих признаками прогениторных, за счет дедифференцировки зрелых крысиных гепатоцитов с помощью комбинаций малых молекул.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки печени крысы выделяли методом двухстадийной перфузии с использованием коллагеназного буфера с последующей отмывкой и посевом на культуральный пластик, модифицированный бычьим коллагеном I типа. Первую стадию перфузии прово-

дили промывочной средой Liver Perfusion Medium (LPM) (Gibco™, США) объемом 250 мл, первые две минуты со скоростью 5 мл/мин, далее остальной объемом – 25 мл/мин. Вторую стадию перфузии проводили коллагеназным буфером на основе раствора Хенкса (HBSS без  $Ca^{2+}$  и  $Mg^{2+}$ , без фенолового красного) (Gibco™, США) с добавлением 0,03% коллагеназы IV типа (ПанЭко, Россия) и 0,5% бычьего сывороточного альбумина BSA (Диаэм, Россия) объемом 250 мл со скоростью 25 мл/мин. По окончании перфузии печень помещали в охлажденную до +2...+4 °C среду L-15 (Gibco™, США) и транспортировали из операционной в ламинарный бокс. Далее скальпелем вскрывали капсулу Гилсона, содержимое измельчали в стерильной чашке Петри на льду. После чего пропускали через клеточное сито с размером пор 100 мкм, промывая средой Hepatocyte Wash Medium (Gibco™, США), охлажденной до +2...+4 °C. Суспензию клеток центрифугировали при температуре +2 °C при 50 g в течение 5 минут. Клеточный осадок ресуспендировали в свежей порции среды и повторяли процедуру три раза. Далее осадок ресуспендировали в среде William's E Medium (Gibco™, США) с добавлением 5% FBS, (HyClone, UK), 1% антибиотика-антимикотика (Gibco™, США) и 200 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия), после чего подсчитывали количество живых клеток на счетчике клеток BioRad TS20.

Для того чтобы определить рабочие концентрации малых молекул, был проведен колориметрический анализ пролиферации клеток в МТТ-тесте. В качестве клеточной модели гепатоцитов использовали человеческую линию HepG2, которую культивировали в стандартных условиях (37 °C, 5%:  $CO_2$ ) в полной ростовой среде на основе DMEM/F12 (Gibco™, США) с добавлением 10% FBS, пенициллина/стрептомицина (100X, ПанЭко, Россия) и 200 мМ L-глутамина (ПанЭко, Россия). Для проведения теста в лунки 96-луночного плоскодонного планшета вносили серийные разведения каждого ингибитора: для A-83-01 диапазон концентраций составил от 2,5 до 0,03 мкМ, для CHIR99021 – от 15 до 0,2 мкМ, для Y-27632 – от 50 до 0,75 мкМ. Далее в лунки вносили суспензию клеток (10 тыс. клеток/лунка). Каждая точка в одном эксперименте в четырех повторах. В качестве контроля использовали интактные клетки, культивированные в тех же условиях, но без добавления ингибиторов. Клетки инкубировали с малыми молекулами в течение 4 дней. После этого сливали из лунок культуральную среду, добавляли по 30 мкл в лунку раствора МТТ (5 мг/мл; Sigma, США) и инкубировали в  $CO_2$ -инкубаторе в течение 2–4 ч до выпадения кристаллов формазана, которые затем растворяли в 100 мкл/лунка ДМСО (диметилсульфоксид; ПанЭко, Россия). Измерение оптической плотности (OD) проводили на планшетном ридере Tecan infinite

M200 Pro (Tescan, США) при длине волны 565 нм. Уровень пролиферации клеток рассчитывали, как описано ранее [13], по формуле:

$$\frac{(\text{OD индуцированных клеток} - \text{OD blank}) / (\text{OD контрольных клеток} - \text{OD blank}) \times 100\%,$$

где OD blank – значения оптической плотности в лунках, содержащих раствор МТТ и ДМСО, но не содержащих клеток; OD контрольных клеток – значения оптической плотности в лунках с интактными клетками.

Для модифицирования поверхности в культуральные флаконы и чашки Петри вносили раствор бычьего коллагена I типа в холодном (+2...+4 °С) DPBS из расчета 12,5 мкг коллагена на 1 см<sup>2</sup> поверхности, после чего помещали на 1 час в инкубатор при 37 °С. Далее жидкость сливали и производили посев клеточной суспензии в заданной концентрации: 2 × 10<sup>5</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Через два часа инкубирования в стандартных условиях (37 °С, 5%: CO<sub>2</sub>), удаляли среду William's E и не прикрепившиеся клетки и добавляли среду Hepatozyme-SFM (Gibco™, США) с добавлением 1% антибиотика-антимикотика (Gibco™, США), 200 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), комбинации малых молекул в следующих концентрациях: A-83-01 – 1,25 мкМ, CHIR99021 – 5 мкМ, Y-27632 – 12,5 мкМ. Контрольные клетки культивировали в той же ростовой среде без добавления комплекса малых молекул. Через 48 часов ростовая среда была заменена на среду на основе William's E с теми же добавками. Пассирование клеток осуществляли при достижении 50–70% конfluence по стандартной методике с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и реактива TrypLe (Gibco™, США).

Через определенные временные интервалы клетки на чашках Петри окрашивали комплексом витальных красителей Live/Dead Assay (Invitrogen, США), позволяющих оценить морфологию адгезивных клеток и отличить живые и мертвые клетки. Исследование проводили с использованием микроскопической системы сверхвысокого разрешения Leica DMI8 Thunder, оснащенной камерой Leica DFC9000 GTC (Leica, ФРГ).

Пролиферацию клеток оценивали, используя систему микроскопии с автоматической цейтраферной съемкой (IncuCyte ZOOM, США). Система позволяет в режиме реального времени с высокой точностью оценивать конfluence клеточного монослоя и рассчитывать кривые роста клеточной культуры.

Для анализа использовали клетки 1-го пассажа, которые сеяли в культуральные флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> из расчета 4 × 10<sup>3</sup> кл/см<sup>2</sup>. Изучали рост клеток на 4 типах сред:

- 1) ростовая среда на основе William's E с добавлением комплекса малых молекул;
- 2) ростовая среда на основе William's E;

3) ростовая среда на основе DMEM/F12 с добавлением комплекса малых молекул;

4) ростовая среда на основе DMEM/F12.

Анализ проводили в режиме реального времени в течение 26 суток. Построение кривых роста осуществлялось в автоматическом режиме программным обеспечением прибора.?

Для проведения цитофлуориметрического анализа экспрессии поверхностного маркера CD29 клетки 1-го пассажа, культивировавшиеся с добавлением комплекса малых молекул, снимали с пластика, инкубировали с антителами к CD29, мечеными FITC (BD Biosciences, США), в течение 1 ч. В качестве контроля использовали неокрашенные клетки. По окончании инкубации клетки дважды отмывали в DPBS, фиксировали в CytoFix (BD Biosciences, США) в течение 15 мин и проводили измерения на проточном цитофлуориметре-сортере BD FACSAria III (BD Biosciences, США). Анализировали не менее 10 тыс. событий. Обработку данных проводили в программе FlowJo\_V10.

Экспрессию внутриклеточных маркеров в клетках, культивировавшихся в присутствии комплекса малых молекул, анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Для этого клетки пермеабилizировали в 0,1% растворе Triton X-100 (Sigma, США) в течение 10 мин при комнатной температуре. После чего инкубировали с первичными антителами против Ki-67, α-фетопротейна (АФП), HNF4α, цитокератина 18 (все – SantaCruz Biotechnology, США) в течение 1 ч, а затем с вторичными антивидовыми антителами, мечеными FITC (все – Sigma, США), в течение 40 мин. В качестве контроля неспецифического связывания использовали клетки, окрашенные только вторичными антивидовыми антителами. Для флуоресцентной микроскопии ядра клеток докрашивали DAPI (1 мкг/мл) (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, США) и заключали препарат в протектор флуоресценции (Anti-Fade Fluorescence Mounting Medium, Abcam, США). Анализ флуоресценции и проточную цитофлуориметрию проводили, как описано выше.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы был проведен анализ влияния малых молекул на уровень пролиферации клеток линии HepG2, а также определены оптимальные концентрации малых молекул для последующей работы.

Из рис. 1 видно, что все три малые молекулы в определенных диапазонах концентраций индуцируют увеличение уровня пролиферативных клеток линии HepG2. Так, ингибитор ROCK киназы (Y27632) повышал уровень пролиферации клеток в диапазоне концентраций от 0,75 до 12,5 мкМ (рис. 1, а), агонист Wnt сигнального пути (CHIR99021) стимулировал

пролиферативную активность в диапазоне от 0,2 до 7,5 мкМ (рис. 1, б), тогда как ингибитор TGF- $\beta$  (A83-01) увеличивал пролиферацию клеток во всем использованном диапазоне концентраций от 0,03 до 2,5 мкМ (рис. 1, в). Исходя из полученных данных, а также ориентируясь на ранее опубликованные работы, в которых для репрограммирования гепатоцитов использовались те же малые молекулы, были определены следующие рабочие концентрации малых молекул: Y-27632 – 12,5 мкМ, CHIR99021 – 5 мкМ и A-83-01 – 1,25 мкМ.

Для анализа влияния комплекса малых молекул на формирование культуры пролиферирующих клеток из крысиных гепатоцитов использовали флуоресцентную и фазово-контрастную микроскопию. После выделения крысиные гепатоциты были разделены на две культуры. В контрольной культуре клетки культивировали без добавления комплекса малых молекул, в опытной культуре – с добавлением комплекса малых молекул в определенных в предварительных экспериментах рабочих концентрациях.

Флуоресцентная микроскопия клеток, окрашенных комплексом Live/Dead™ через 24 часа после выделения клеток, показала, что и в контроле, и в опытном варианте присутствует значительное количество жизнеспособных клеток (рис. 2).

Примечательно, что уже через сутки после выделения отчетливо видна разница в уровне жизнеспособности контрольной и опытной культур. В контрольных клетках можно наблюдать гораздо более высокий уровень клеточной гибели (рис. 2, а) по сравнению с опытными клетками, которые культивировались в присутствии комплекса малых молекул (рис. 2, б). Морфологически в опытной культуре можно выделить два типа клеток: гепатоцитоподобные и клетки овальной формы.

На пятые сутки эксперимента отмечались еще более существенные различия в опытной и контрольной культурах клеток (рис. 3, а, б). К этому времени в контрольной культуре в основном сохраняются одиночные сильно распластанные клетки с признаками нарушения плазматической и ядерной мембран

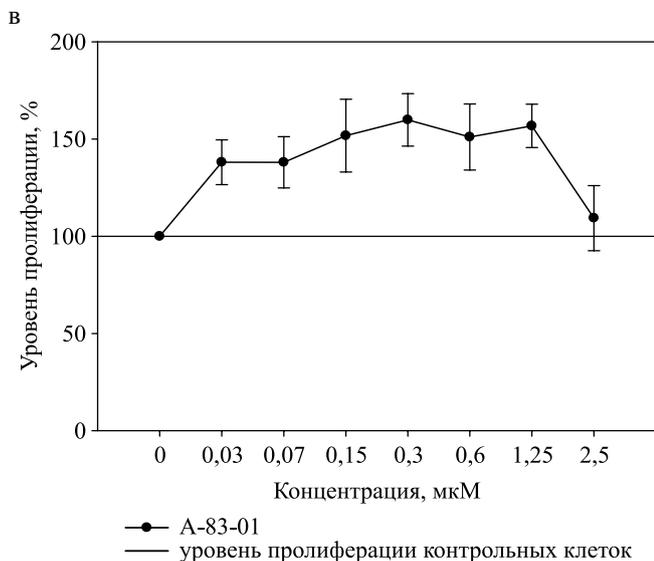
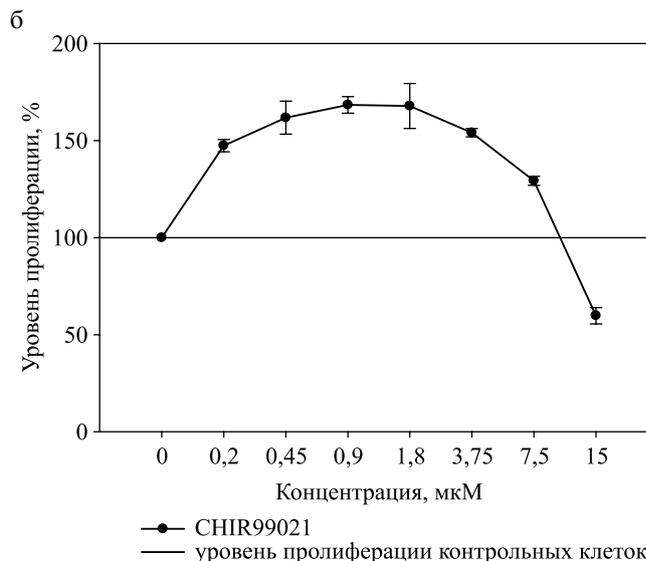
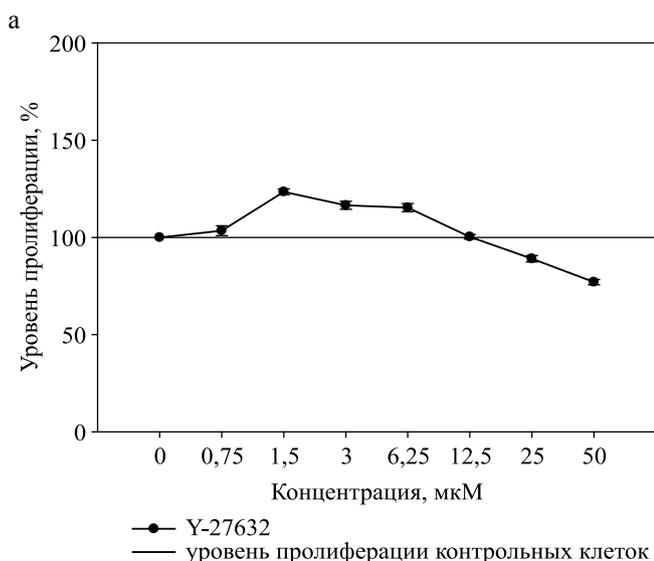


Рис. 1. Зависимость уровня пролиферации клеток линии HepG2 от концентраций малых молекул в культуральной среде: а – клетки культивировали в присутствии серийных разведений Y-27632; б – клетки культивировали в присутствии серийных разведений CHIR99021; в – клетки культивировали в присутствии серийных разведений A-83-01

Fig. 1. Dependence of the HepG2 cells proliferation level on the concentration of small molecules in the culture medium: а – cells were cultured in the presence of serial dilutions of Y-27632; б – cells were cultured in the presence of serial dilutions of CHIR99021; в – cells were cultured in the presence of serial dilutions of A-83-01

и повышенной вакуолизацией (рис. 3, а). Тогда как в опытной культуре наряду с такими же зрелыми клетками, переходящими в состояние клеточной гибели, визуализировались группы вновь образовавшихся клеток (рис. 3, б).

К 7-м суткам эксперимента в контрольной культуре продолжился процесс клеточной гибели (рис. 3, в). А в опытной культуре отчетливо визуализировалось усиление пролиферации с образованием небольших клеточных кластеров (рис. 3, г). На 10-е сутки эксперимента в связи с полной гибелью клеток в контрольной культуре наблюдение продолжали только в опытном варианте. В течение этого времени в опытной культуре наблюдалось увеличение количества клеток в образовавшихся кластерах, уплотнение их структуры и формирование внеклеточного матрикса (рис. 4).

Через 15 суток эксперимента наблюдалась экспансия клеток в кластерах, которая приводила к их разрастанию, слиянию с соседними кластерами и формированию клеточного пласта. Уровень клеточной гибели в культуре был незначительным (рис. 5).

Для всех последующих экспериментов использовались клетки после первого пассажа, которые с момента выделения непрерывно культивировались в присутствии комплекса малых молекул. Чтобы оценить влияние различных ростовых сред и комплекса малых молекул на рост клеток в культуре, был

проведен анализ пролиферации и построены кривые роста с использованием системы микроскопии с автоматической цейтраферной съемкой. Анализ роста клеточной популяции на разных средах с добавлением комплекса малых молекул и без них показал, что наиболее быстрый рост и равномерную экспансию проявляли клетки, которые культивировались на средах (DMEM/F12 и William's E) без добавления малых молекул (рис. 6).

Однако при визуальном анализе изображений было обнаружено, что в обоих вариантах ростовых сред при отсутствии комплекса малых молекул рост клеточной популяции происходил за счет экспансии фибробластоподобных клеток. Характерные кластеры гепатоцитоподобных клеток в этих вариантах отсутствовали на всем протяжении эксперимента (26 суток).

С другой стороны, при культивировании клеток в обоих типах ростовых сред (DMEM/F12 и William's E) в присутствии комплекса малых молекул после первого пассажа происходило формирование кластеров гепатоцитоподобных клеток, такое же, как мы наблюдали в исходном опытном варианте после выделения гепатоцитов до пассирования. Таким образом, показано, что для поддержания роста и пролиферации гепатоцитоподобных, но не фибробластоподобных, клеток необходимо не только первоначальное воздействие комплекса малых молекул,

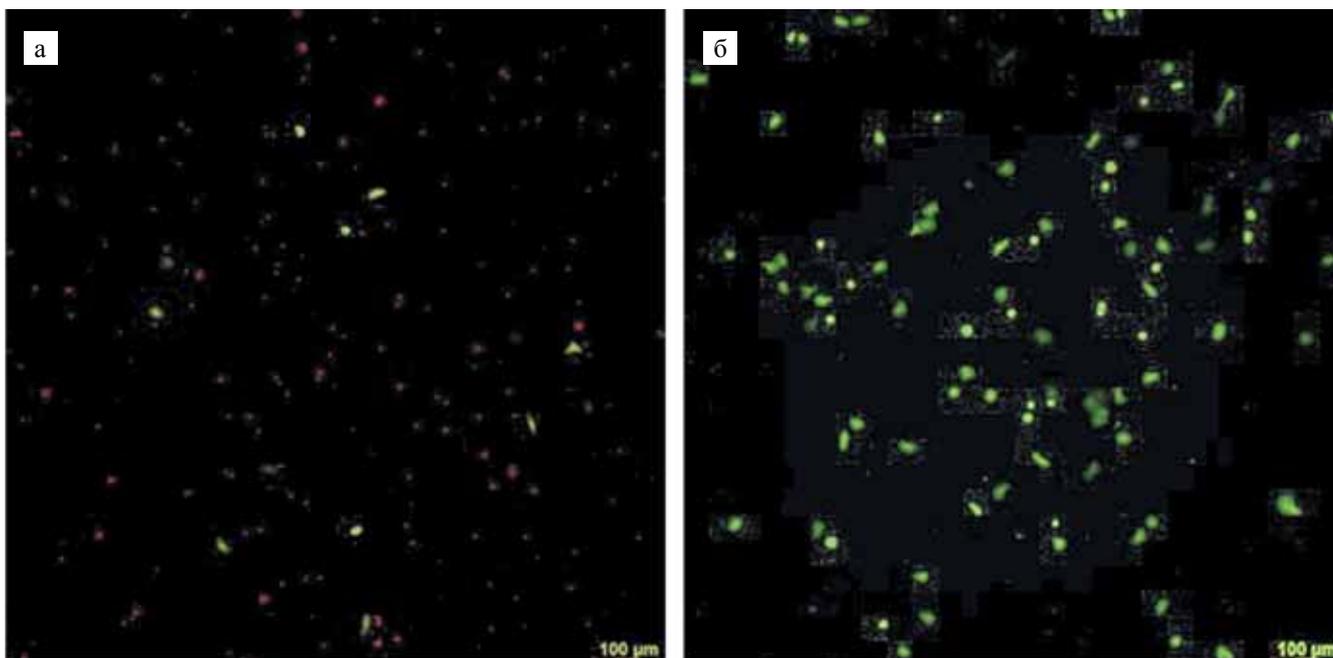


Рис. 2. Флуоресцентная микроскопия клеток печени через 24 ч после выделения. Окрашивание Live/Dead™: а – контрольные клетки (без добавления комплекса малых молекул); б – опытные клетки (с добавлением комплекса малых молекул). Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. ×50

Fig. 2. Fluorescence microscopy of cells 24 h after isolation. Live/Dead™ staining: а – control cells (without the addition of a set of small molecules); б – experimental cells (with the addition of a set of small molecules). Green – living cells, red – cells in a state of cell death. ×50

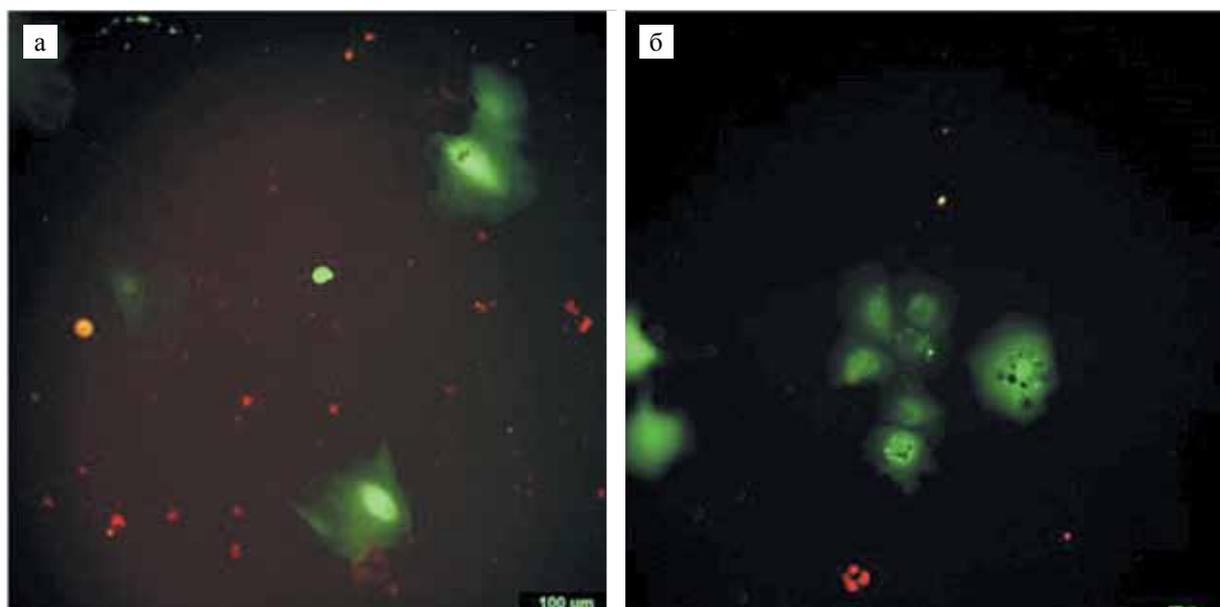
но и их постоянное присутствие в ростовой среде на протяжении всего периода культивирования.

Примечательно, что при культивировании на среде DMEM/F12 процесс формирования клеточных кластеров начинался значительно раньше (через 48 часов после посадки клеток), тогда как в среде William’s E начало формирования кластеров отмечали только на 7-е сутки культивирования. Различалось также и количество клеточных кластеров по полям зрения. Для

каждого образца клеточных культур анализировали 80 полей зрения на культуральный флакон площадью 25 см<sup>2</sup>. При культивировании на среде DMEM/F12 в присутствии малых молекул клеточные кластеры встречались в 90% проанализированных полей зрения. При росте на среде William’s E с добавлением малых молекул этот показатель достигал только 50%.

Фазово-контрастная микроскопия клеток на разных сроках роста клеточной культуры позволила

5-е сутки



7-е сутки

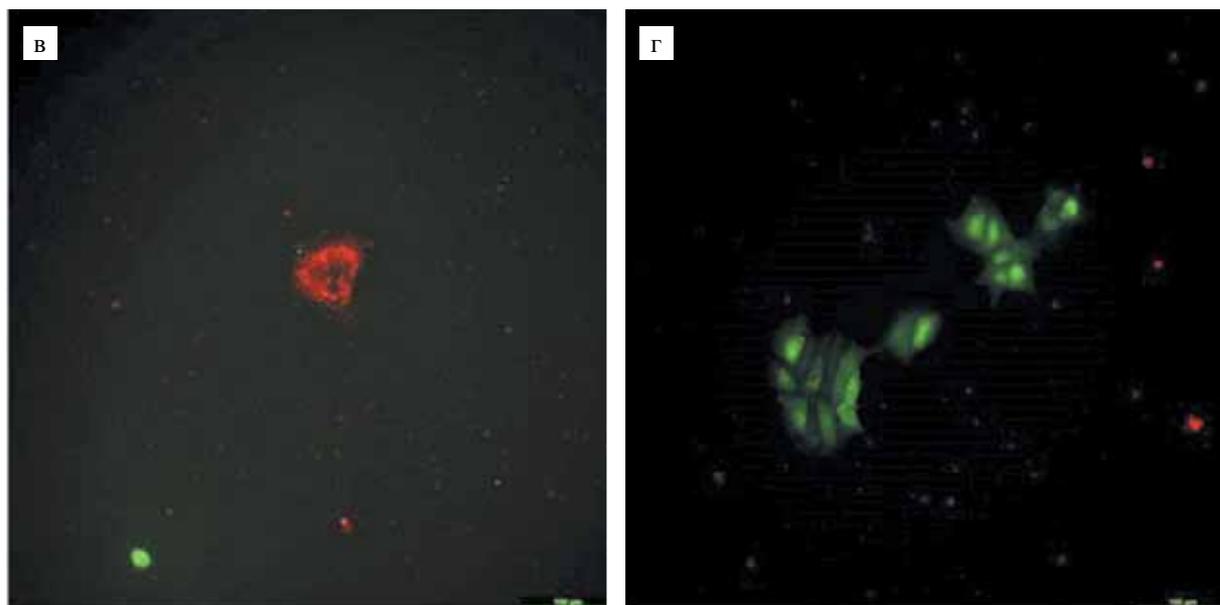


Рис. 3. Флуоресцентная микроскопия клеток печени на 5-е (а и б) и 7-е (в и г) сутки после выделения: а, в – контрольные клетки (без добавления комплекса малых молекул), б, г – опытные клетки (с добавлением комплекса малых молекул); б – группа новообразовавшихся клеток; г – формирование клеточных кластеров. Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. Окрашивание Live/Dead™. ×200

Fig. 3. Fluorescence microscopy of cells on the 5th (a and б) and 7th (в and г) days after isolation: а, в – control cells (without the addition of a set of small molecules), б, г – experimental cells (with the addition of a set of small molecules); б – a group of newly formed cells; г – the formation of cell clusters. Green – living cells, red – cells in a state of cell death. Live/Dead™ staining. ×200

визуализировать процесс формирования отдельных кластеров. Центром образования такого кластера являются крупные, в основном двухъядерные клетки неправильной формы (рис. 7).

В формирующемся клеточном кластере обнаруживается заметное число клеток, содержащих два ядра. Известно, что одной из характерных особенностей печени является полиплоидия гепатоцитов, т. е. увеличение числа набора хромосом на клетку. Полиплоидные гепатоциты могут быть представлены в нескольких вариантах: они могут быть тетраплоидными (двухъядерными с  $2n$  набором хромосом или одноядерными с  $4n$  набором хромосом) или октаплоидными (двухъядерными с  $4n$  набором хромосом или одноядерными с  $8n$  набором хромосом) [14]. Функциональная роль полиплоидии гепатоцитов пока не совсем ясна. Однако показано, что полиплоидные гепатоциты обладают повышенной пролиферативной способностью, экспрессируя ряд генов, ассоциированных с прохождением клеточного цикла [15].

Далее в процессе культивирования происходит активное деление клеток и периферический рост кластера с формированием на более поздних сроках значительных скоплений плотно упакованных клеток (рис. 8, а), находящихся в тесном соседстве с фибробластоподобными клетками (рис. 8, б).

Анализ экспрессии поверхностных и внутриклеточных маркеров проводили на клетках после 1-го пассажа, культивировавшихся с добавлением комплекса малых молекул.

CD29, или интегрин  $\beta 1$ , относится к семейству интегриновых белков, которые вовлечены во взаимодействия клеток с белками внеклеточного матрикса, такими как коллаген, ламинин и фибронектин, а также в составе гетеродимеров, участвует в межклеточных взаимодействиях, играет функциональную роль в миграции, адгезии и выживании клеток. CD29 широко экспрессирован на различных типах клеток, включая мезенхимные и эпителиальные клетки, а также стволовые/прогениторные клетки различного происхождения [16]. Так, CD29 наряду с CD44 и CD90 зачастую рассматривается в качестве маркера мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК), выделяемых из разных тканевых источников, как у человека [17], так и у грызунов [18]. Во взрослой печени интегрин  $\beta 1$  экспрессируют зрелые гепатоциты [19], а также печеночные стволовые клетки и гепатобласты [20].

Используя проточную цитофлуориметрию, мы проанализировали экспрессию на поверхности клеток интегрин  $\beta 1$  (CD29) (рис. 9, а).

Как видно из рис. 9, а, экспрессия CD29 наблюдалась на более чем 60% клеток. Морфологически в этой культуре преобладали гепатоцитоподобные клетки (рис. 9, б).

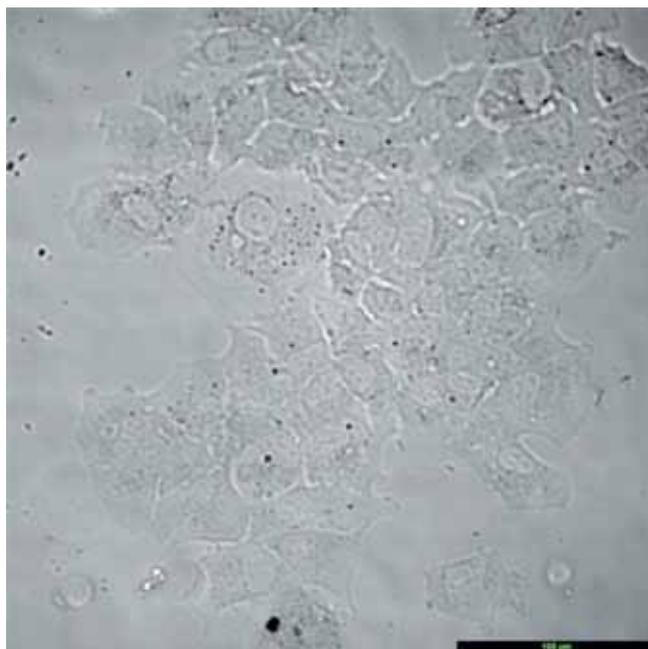


Рис. 4. Фазово-контрастная микроскопия плотного кластера, состоящего из клеток с гепатоцитоподобной морфологией, к 10-м суткам в опытной культуре.  $\times 200$

Fig. 4. Phase contrast microscopy of a dense cluster consisting of cells with hepatocyte-like morphology by day 10 in an experimental culture.  $\times 200$

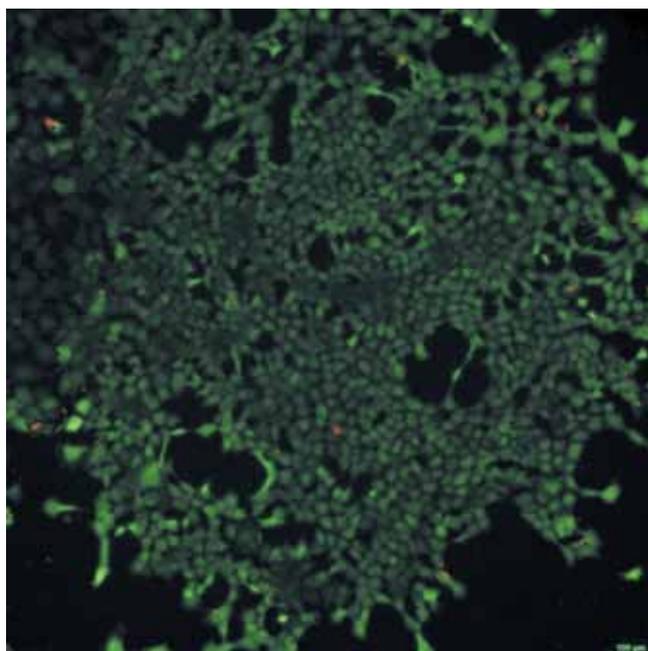


Рис. 5. Флуоресцентная микроскопия клеток на 15-е сутки после выделения. Экспансия клеток в кластерах, приводящая к формированию крупных клеточных скоплений. Зеленый цвет – живые клетки, красный цвет – клетки в состоянии клеточной гибели. Окрашивание Live/Dead™.  $\times 100$

Fig. 5. Fluorescence microscopy of cells on the 15th day after isolation. Expansion of cells in clusters, leading to the formation of large cell conglomerates. Green – living cells, red – cells in a state of cell death. Live/Dead™ staining.  $\times 100$

Делеция интегрин  $\beta 1$  в эмбриональной печени приводит к нарушению нормального развития полярности гепатоцитов, к отсутствию спецификации межклеточных контактов и к невозможности форми-

рования канальцев. Направленная делеция интегрин  $\beta 1$  во взрослых гепатоцитах предотвращает восстановление нормальной архитектуры гепатоцитов после повреждения печени с последующим развитием

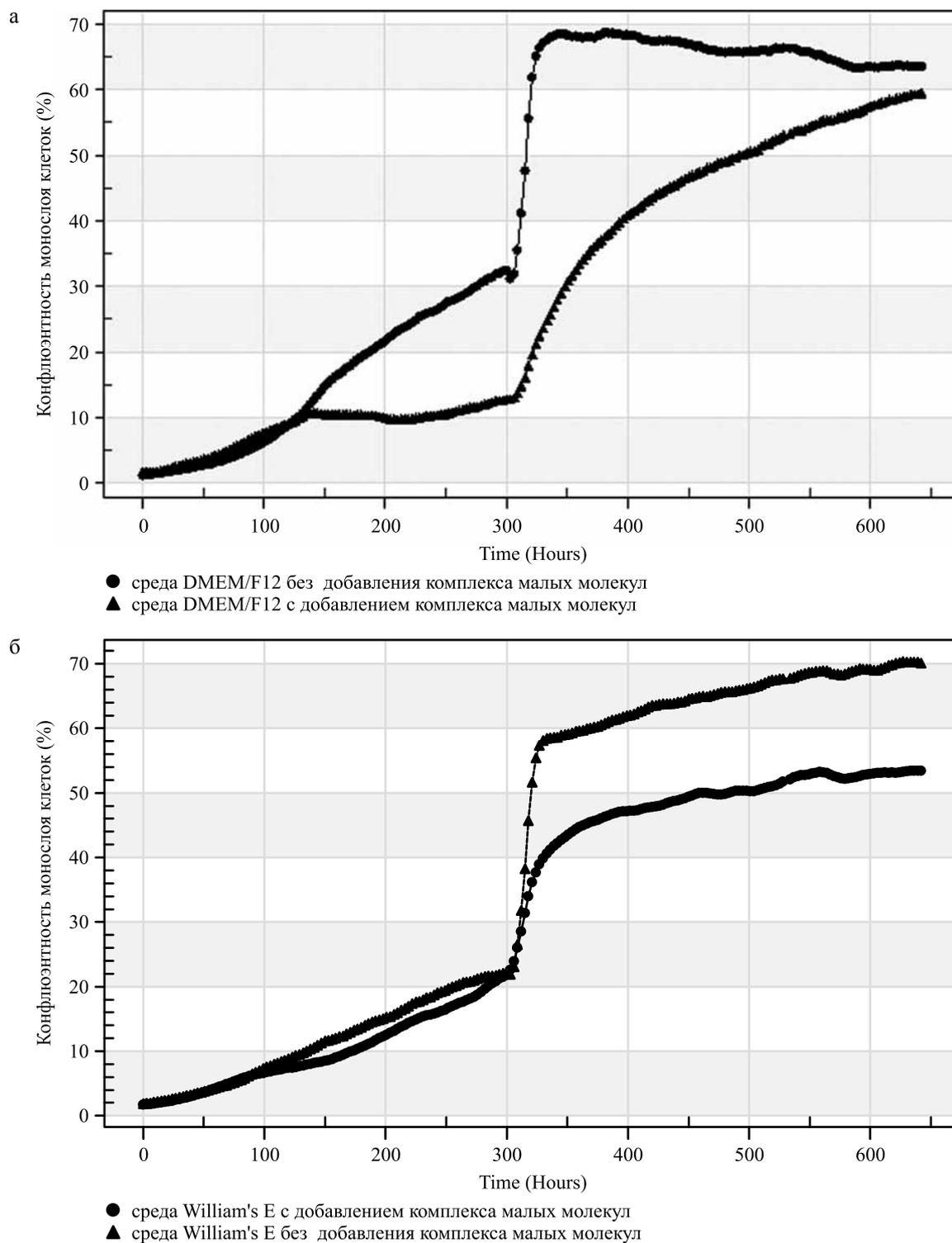


Рис. 6. Кривые роста клеток I пассажа, культивировавшихся на разных средах в течение 26 сут. Построение кривых роста основано на оценке % конфлюэнтности монослоя за счет фотофиксации полей зрения каждые 4 часа: а – клетки культивировались на среде DMEM/F12; б – клетки культивировались на среде William’s E

Fig. 6. Growth curves of the cells at 1st passage, cultivated on different media for 26 days. The construction of growth curves is based on an estimate of the % confluency of the monolayer due to photographic fixation of the visual fields every 4 hours: а – cells were cultured in DMEM/F12 medium; б – cells were cultured on William’s E medium

фиброза [21]. Таким образом, экспрессия CD29 на клетках, полученных из крысиных гепатоцитов после культивирования их в присутствии малых молекул, может также обеспечивать поддержание характерной архитектуры формирующихся кластеров и способствовать пролиферации.

Экспрессию внутриклеточных маркеров в клетках анализировали с использованием двух методов. Используя метод флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, была проведена оценка

экспрессии таких печень-ассоциированных белков, как цитокератин 18, альфа-фетопротеин, HNF4 $\alpha$ , а также маркера пролиферирующих клеток Ki-67.

Маркер пролиферации Ki-67 экспрессируется в ядре в течение G1, S и G2–M фаз клеточного цикла в пролиферирующих клетках [22]. Показали, что практически 100% клеток экспрессируют данный белок (рис. 10, а).

Цитокератин 18 – белок цитоскелета и основной промежуточный филамент, экспрессируемый в пе-

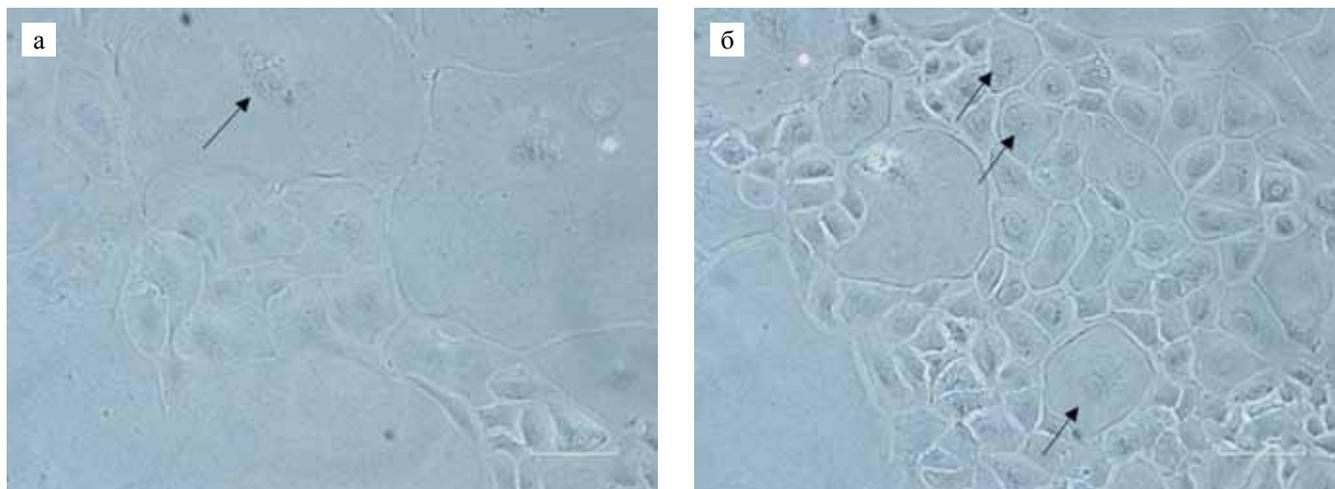


Рис. 7. Фазово-контрастная микроскопия кластеров гепатоцитоподобных клеток, формирующихся в присутствии комплекса малых молекул: а – центральная двухъядерная клетка, предположительно дающая начало росту кластера; б – разрастание клеток в кластере; стрелками обозначены двухъядерные клетки.  $\times 200$

Fig. 7. Phase contrast microscopy of hepatocyte-like cell clusters formed in the presence of a small moleculeset: а – central binucleated cell, presumably giving rise to cluster growth; б – proliferation of cells in a cluster; arrows indicate binucleated cells.  $\times 200$

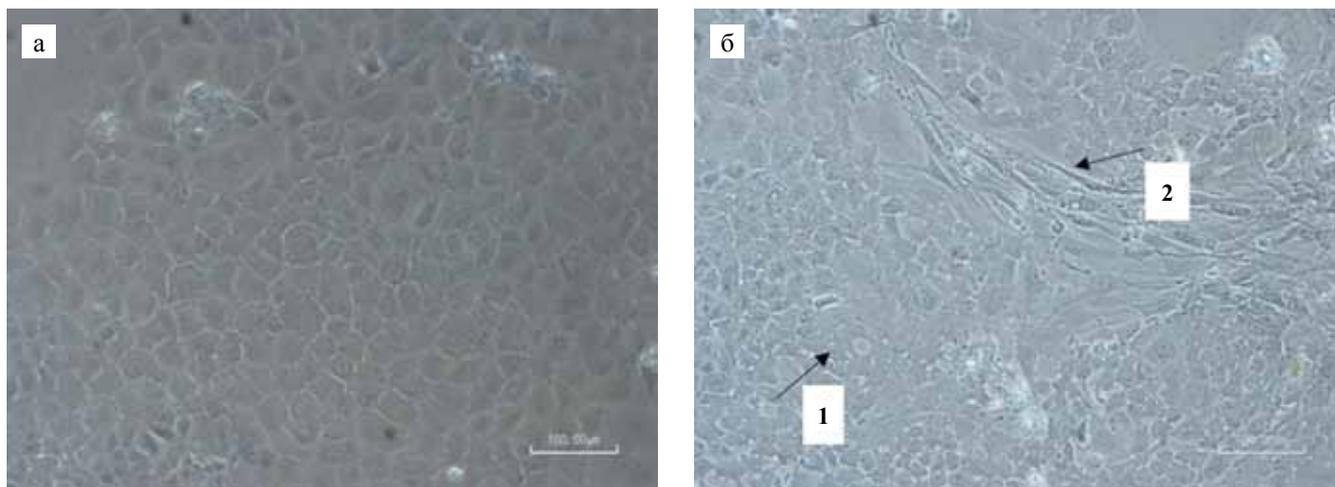


Рис. 8. Фазово-контрастная микроскопия клеточного пласта на поздних сроках культивирования (47 суток) в присутствии комплекса малых молекул: а – плотный кластер гепатоцитоподобных клеток;  $\times 200$ ; б – зона контакта разных типов клеток в составе единого клеточного пласта; 1 – гепатоцитоподобные клетки, 2 – фибробластоподобные клетки;  $\times 100$

Fig. 8. Phase contrast microscopy of the cell layer at late stages of cultivation (47 days) in the presence of a small moleculeset: а – dense cluster of hepatocyte-like cells;  $\times 200$ ; б – contact zone of cells with different morphology as part of a single cell layer; 1 – hepatocyte-like cells, 2 – fibroblast-like cells;  $\times 100$

чени [23]. Показано, что цитокератин 18 наряду с цитокератином 19 экспрессируется в человеческих печеночных стволовых клетках, аналогичных овальным клеткам грызунов [24]. Мы показали, что экспрессия цитокератина 18 характерна для всех клеток в культуре, имеющих гепатоцитоподобную морфологию (рис. 10, б).

Гепатоцитарный ядерный фактор (Hepatocyte nuclear factor) 4α (HNF4α) является орфанным ядер-

ным рецептором, который известен как мастер-регулятор печеночных дифференцировочных процессов, поскольку регулирует большое количество гепатоцит-специфичных генов [25]. HNF4α регулирует такие важные функции печени, как гликолиз, глюконеогенез, метаболизм жирных кислот, синтез желчных кислот, метаболизм лекарств, синтез аполипопротеина, уреогенез и коагуляцию крови, за счет регуляции транскрипции множества генов, вовлеченных в

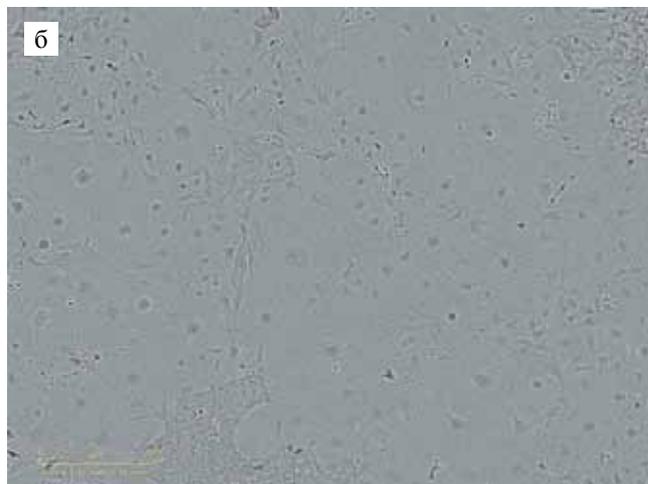
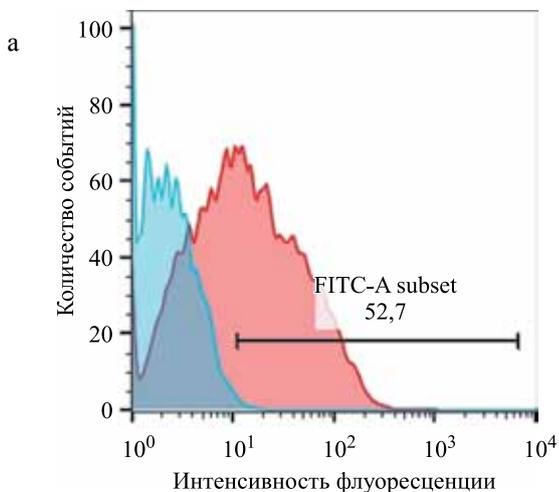


Рис. 9: а – цитофлуориметрический анализ экспрессии CD29. Голубой пик – аутофлуоресценция контрольных клеток, не окрашенных антителами. Красный пик – флуоресценция анти-CD29-FITC, связавшихся с клетками; б – фазово-контрастная микроскопия культуры. ×100

Fig. 9: a – flow cytometric analysis of CD29 expression. Blue peak – autofluorescence of control cells, unstained with antibodies. Red peak – fluorescence of anti-CD29-FITC bound to cells; б – phase contrast microscopy of the culture. ×100

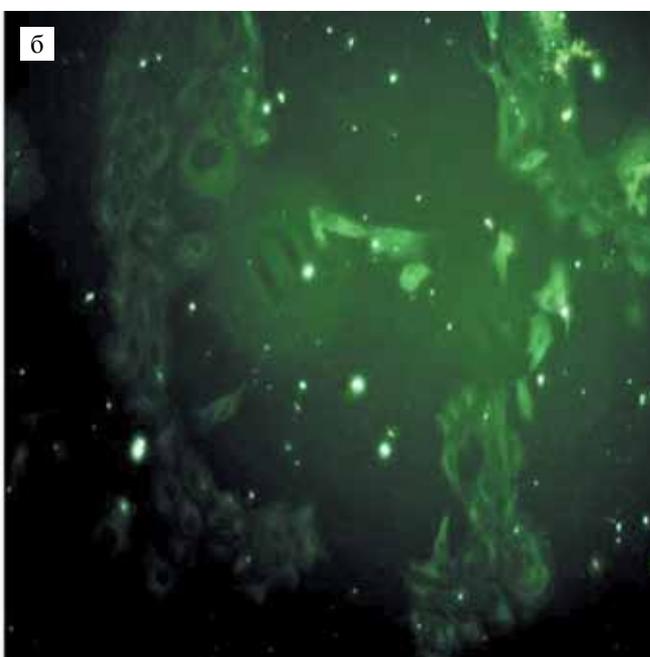
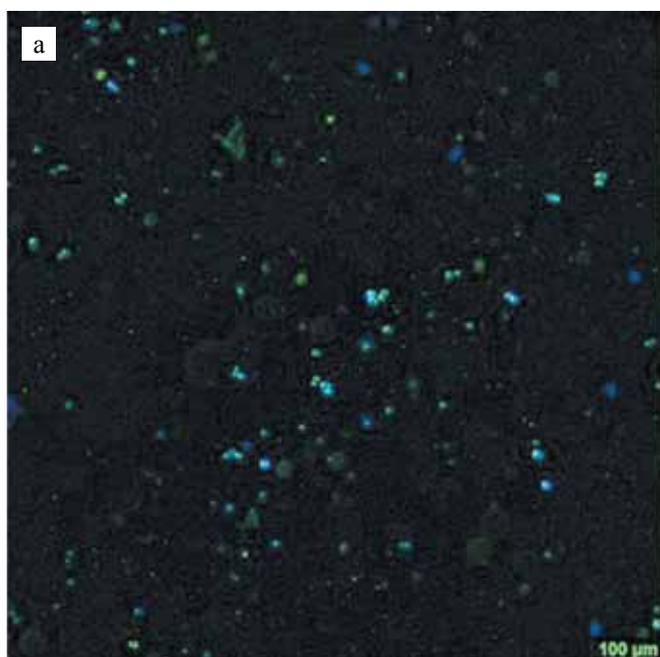


Рис. 10. Флуоресцентная микроскопия клеток после культивирования в присутствии малых молекул: а – клетки окрашены антителами к Ki-67. Ядра докрашены DAPI. ×100; б – клетки окрашены антителами к цитокератину 18. ×200

Fig. 10. Fluorescence microscopy of cells after cultivation in the presence of small molecules: а – cells are stained with antibodies to Ki-67. Nuclei are contrasted with DAPI. ×100; б – cells are stained with antibodies to cytokeratin 18. ×200

каждую из этих функций [26–28]. Помимо зрелых гепатоцитов HNF4 $\alpha$  экспрессируется бипотентными гепатобластами человека и грызунов в эмбриогенезе [29], а также печеночными стволовыми клетками во взрослом органе [30].

Мы также обнаружили экспрессию HNF4 $\alpha$  преимущественно в клетках, формирующих характерные кластеры (рис. 11, а).

На полученных изображениях отчетливо видна ядерная локализация HNF4 $\alpha$ , что характерно для нор-

мальных печеночных клеток. Экспрессия HNF4 $\alpha$  в клетках, культивировавшихся в присутствии комплекса малых молекул, свидетельствует об их гепатоцитарном происхождении и прогениторном потенциале.

$\alpha$ -фетопроtein (АФП) является одним из наиболее изученных маркеров клеточной дифференцировки и развития опухоли. Этот белок экспрессируется фетальными и злокачественными гепатоцитами и не экспрессируется нормальными зрелыми гепатоцита-

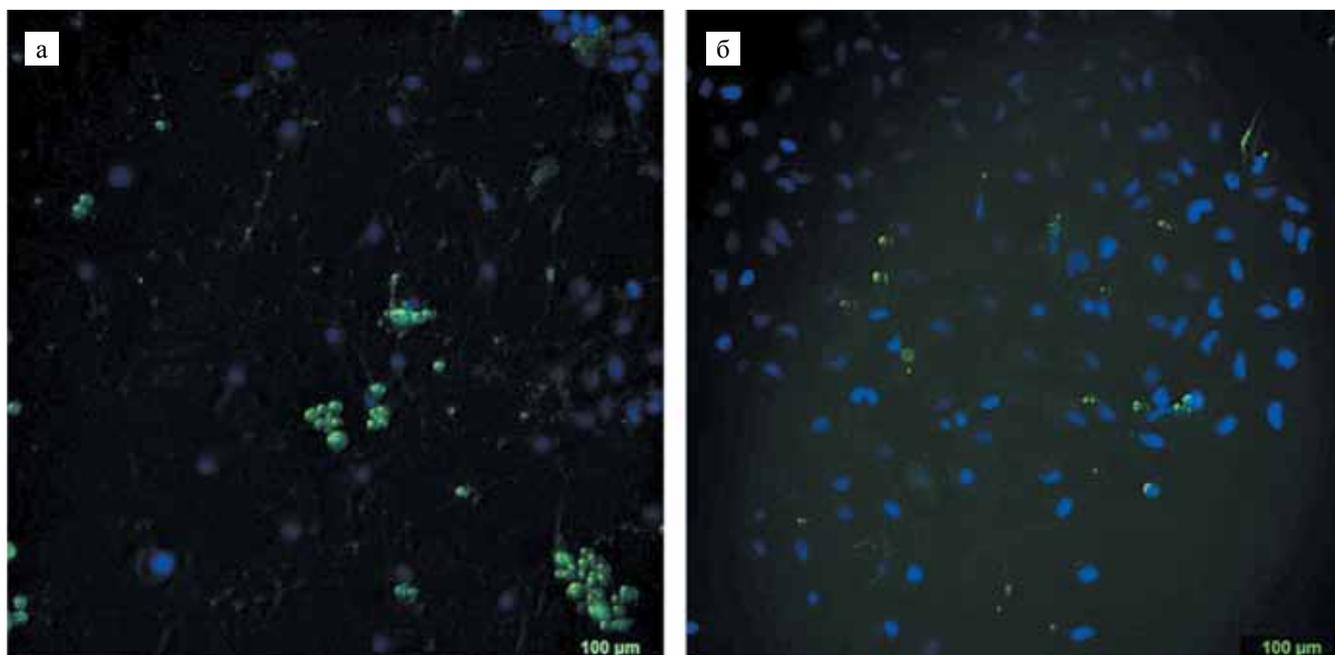


Рис. 11. Флуоресцентная микроскопия клеток после культивирования в присутствии малых молекул: а – клетки, окрашенные анти-HNF4 $\alpha$ ; б – клетки, окрашенные антителами к АФП. Ядра клеток докрашены DAPI.  $\times 200$

Fig. 11. Fluorescence microscopy of cells after cultivation in the presence of small molecules: а – cells stained with anti-HNF4 $\alpha$ ; б – cells stained with antibodies to AFP. Nuclei are contrasted with DAPI.  $\times 200$

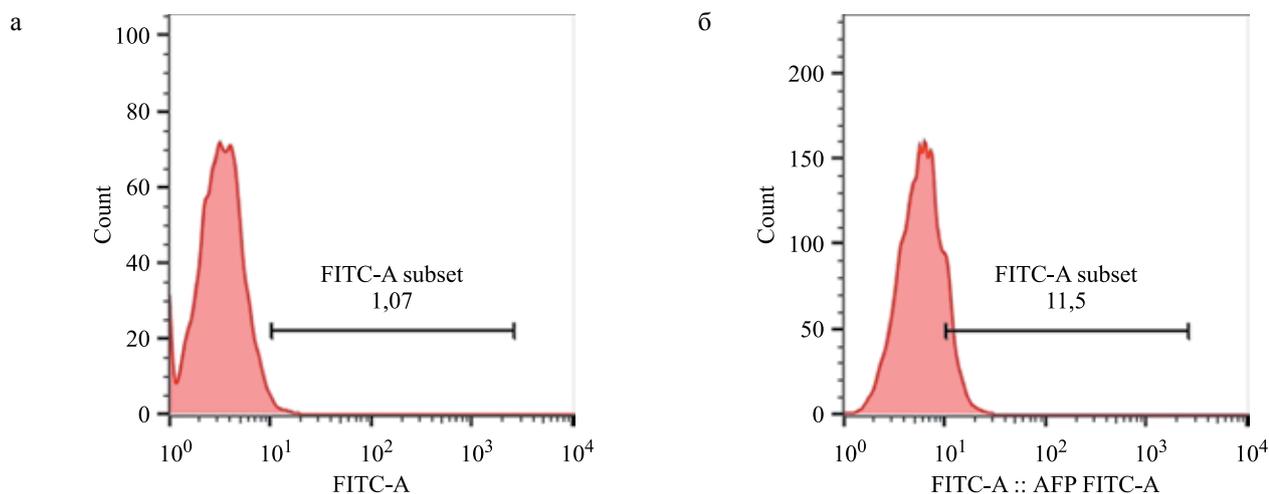


Рис. 12. Цитофлуориметрический анализ экспрессии АФП в клетках: а – контрольные клетки, окрашенные вторичными антивидовыми антителами; б – клетки, окрашенные антителами к АФП

Fig. 12. Flow cytometric analysis of AFP expression in cells: а – control cells stained with secondary anti-species antibodies; б – cells stained with antibodies to AFP

ми [31]. АФП является одним из основных маркеров овальных клеток [32] и незрелых гепатоцитов [33]. В связи с тем что экспрессия АФП сильно коррелирует с экспрессией фетальных генов в онтогенезе, этот белок служит идеальным кандидатным маркером для отслеживания и изучения путей развития стволовых клеток, их дифференцировки и редифференцировки.

Экспрессию  $\alpha$ -фетопротейна мы анализировали двумя методами, используя флуоресцентную микроскопию и проточную цитофлуориметрию. Для этого проводили внутриклеточное окрашивание клеток антителами, специфичными к АФП. Результаты окрашивания представлены на рис. 11, б и 12. При проведении флуоресцентной микроскопии мы наблюдали не очень отчетливую картину экспрессии АФП в клетках, а именно очень мало клеток оказались окрашены антителами к данному белку, и его локализация в большинстве клеток была преимущественно околядерная, и только в отдельных клетках АФП распределялся в цитоплазме, что является характерным для данного белка (рис. 11, б).

Для подтверждения наличия экспрессии АФП был проведен цитофлуориметрический анализ внутриклеточного окрашивания клеток соответствующими антителами (рис. 12).

Как следует из рис. 12, около 10% клеток экспрессируют  $\alpha$ -фетопротейн, что подтверждает результат, полученный с помощью флуоресцентной микроскопии. Таким образом, наличие экспрессии АФП в клетках, полученных из зрелых крысиных гепатоцитов после культивирования в присутствии комплекса малых молекул, свидетельствует об их дедифференцировке/репрограммировании в незрелое прогениторное состояние.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Индукция зрелых гепатоцитов комплексом малых молекул может служить одним из подходов к репрограммированию терминально дифференцированных клеток в прогениторное состояние. Показано, что наличие в среде трех малых молекул Y-27632, A-83-01 и CHIR99021 позволяет культивировать крысиные гепатоциты в течение длительного времени (более 2 месяцев). При этом происходят существенные изменения в их морфологии и начинают экспрессироваться маркеры печеночных прогениторных клеток, такие как АФП и HNF4 $\alpha$ . Полученный результат открывает новые возможности для изучения механизма дедифференцировки/репрограммирования зрелых гепатоцитов. На наш взгляд, он является отправной точкой для дальнейших исследований, направленных на изучение свойств печеночных прогениторных клеток человека, разработку способов их получения с последующим применением в лечении терминальных стадий заболеваний печени, таких как цирроз

различной этиологии и злокачественные новообразования.

*Авторы выражают благодарность д. м. н. М.Ю. Шагидулину за помощь в проведении манипуляций с лабораторными животными.*

*Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) Тема № 5.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Berry MN, Friend DS.* High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 1969; 43: 506–520. doi: 10.1083/jcb.43.3.506. PMID: 4900611.
2. *Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, Glaise D, Launois B, Bourel M et al.* High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep.* 1982; 6: 625–628. doi: 10.1016/0309-1651(82)90187-4. PMID: 6286153.
3. *Tarlow BD, Pelz C, Naugler WE, Wakefield L, Wilson EM, Finegold MJ et al.* Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes. *Cell Stem Cell.* 2014; 15: 605–618. doi: 10.1016/j.stem.2014.09.008. PMID: 25312494.
4. *Afshari A, Shamdani S, Uzan G, Azarpira N.* Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cell Res Ther.* 2020; 11: 54. doi: 10.1186/s13287-020-1555-8. PMID: 32033595.
5. *Kholodenko IV, Kholodenko RV, Manukyan GV, Lupatov AY, Yarygin KN.* Isolation of Induced Pluripotent Cells from Stromal Liver Cells of Patients with Alcoholic Cirrhosis. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163: 535–541. doi: 10.1007/s10517-017-3845-4. PMID: 28853085.
6. *Lim KT, Lee SC, Gao Y, Kim KP, Song G, An SY et al.* Small Molecules Facilitate Single Factor-Mediated Hepatic Reprogramming. *Cell Rep.* 2016; 15: 814–829. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.071. PMID: 27149847.
7. *Kim Y, Jeong J, Choi D.* Small-molecule-mediated reprogramming: a silver lining for regenerative medicine. *Exp Mol Med.* 2020; 52: 213–226. doi: 10.1038/s12276-020-0383-3. PMID: 32080339.
8. *Katsuda T, Kawamata M, Hagiwara K, Takahashi RU, Yamamoto Y, Camargo FD et al.* Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell.* 2017; 20: 41–55. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.007. PMID: 27840021.
9. *Wu H, Zhou X, Fu GB, He ZY, Wu HP, You P et al.* Reversible transition between hepatocytes and liver progenitors for *in vitro* hepatocyte expansion. *Cell Res.* 2017; 27: 709–712. doi: 10.1038/cr.2017.47. PMID: 28374751.

10. Fu GB, Huang WJ, Zeng M, Zhou X, Wu HP, Liu CC et al. Expansion and differentiation of human hepatocyte-derived liver progenitor-like cells and their use for the study of hepatotropic pathogens. *Cell Res.* 2019; 29: 8–22. doi: 10.1038/s41422-018-0103-x. PMID: 30361550.
11. Kim Y, Kang K, Lee SB, Seo D, Yoon S, Kim SJ et al. Small molecule-mediated reprogramming of human hepatocytes into bipotent progenitor cells. *J Hepatol.* 2019; 70: 97–107. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.007. PMID: 30240598.
12. Hee Hong D, Lee C, Kim Y, Lee SB, Han SC, Kim SJ et al. Generation of Hepatic Progenitor Cells from the Primary Hepatocytes of Nonhuman Primates Using Small Molecules. *Tissue Eng Regen Med.* 2021; 18: 305–313. doi: 10.1007/s13770-020-00327-8. PMID: 33591557.
13. Kholodenko IV, Kalinovskiy DV, Svirshchevskaya EV, Doronin II, Konovalova MV, Kibardin AV et al. Multimerization through Pegylation Improves Pharmacokinetic Properties of scFv Fragments of GD2-Specific Antibodies. *Molecules.* 2019; 24: 3835. doi: 10.3390/molecules24213835. PMID: 31653037
14. Zhang S, Lin YH, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle.* 2019; 18: 1302–1315. doi: 10.1080/15384101.2019.1618123. PMID: 31096847.
15. Katsuda T, Hosaka K, Matsuzaki J, Usuba W, Prieto-Vila M, Yamaguchi T et al. Transcriptomic Dissection of Hepatocyte Heterogeneity: Linking Ploidy, Zonation, and Stem/Progenitor Cell Characteristics. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020; 9: 161–183. doi: 10.1016/j.jcmgh.2019.08.011. PMID: 31493546.
16. Togarrati PP, Dinglasan N, Desai S, Ryan WR, Muench MO. CD29 is highly expressed on epithelial, myoepithelial, and mesenchymal stromal cells of human salivary glands. *Oral Dis.* 2018; 24: 561–572. doi: 10.1111/odi.12812. PMID: 29197149.
17. Kholodenko IV, Kurbatov LK, Kholodenko RV, Manukyan GV, Yarygin KN. Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? *Cells.* 2019; 8: 1127. doi: 10.3390/cells8101127. PMID: 31546729.
18. Zou W, Zhao J, Li Y, Wang Z, Yan H, Liu Y et al. Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote the Migration and Invasion of Colorectal Cancer Stem Cells. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 6617–6628. doi: 10.2147/OTT.S249353.
19. Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant.* 2007; 16: 639–647. doi: 10.3727/000000007783465000. PMID: 17912955.
20. Turner RA, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Reid LM. Hyaluronan-supplemented buffers preserve adhesion mechanisms facilitating cryopreservation of human hepatic stem/progenitor cells. *Cell Transplant.* 2012; 21: 2257–2266. doi: 10.3727/096368912X637000. PMID: 22472355.
21. Masuzaki R, Ray KC, Roland J, Zent R, Lee YA, Karp SJ. Integrin  $\beta$ 1 Establishes Liver Microstructure and Modulates Transforming Growth Factor  $\beta$  during Liver Development and Regeneration. *Am J Pathol.* 2021; 191: 309–319. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.10.011. PMID: 33159885.
22. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 1987; 133: 579–584. doi: 10.1002/jcp.1041330321. PMID: 3121642.
23. Chougule P, Sumitran-Holgersson S. Cytokeratins of the liver and intestine epithelial cells during development and disease. in: Hamilton G. Cytokeratins – Tools in Oncology. InTech, 2012; 118–158.
24. Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA. Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: G45–54. doi: 10.1152/ajpgi.00465.2005. PMID: 16769813.
25. Walesky C, Apte U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) in cell proliferation and cancer. *Gene Expr.* 2015; 16: 101–108. doi: 10.3727/105221615X14181438356292. PMID: 25700366.
26. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2001; 21: 1393–1403. doi: 10.1128/MCB.21.4.1393-1403.2001. PMID: 11158324.
27. Inoue Y, Yu AM, Inoue J, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  is a central regulator of bile acid conjugation. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279: 2480–2489. doi: 10.1074/jbc.M311015200. PMID: 14583614.
28. Inoue Y, Peters LL, Yim SH, Inoue J, Gonzalez FJ. Role of hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  in control of blood coagulation factor gene expression. *Journal of Molecular Medicine – Jmm.* 2006; 84: 334–344. doi: 10.1007/s00109-005-0013-5. PMID: 16389552.
29. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Development.* 2015; 142: 2094–2108. doi: 10.1242/dev.114215. PMID: 26081571.
30. Li K, Zhang H, Wang Y, Wang Y, Feng M. Differential expression of HNF4 $\alpha$  isoforms in liver stem cells and hepatocytes. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 558–564. doi: 10.1002/jcb.20939. PMID: 16639723.
31. Khamzina L, Borgeat P. Correlation of alpha-fetoprotein expression in normal hepatocytes during development with tyrosine phosphorylation and insulin receptor expression. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 1093–1105. doi: 10.1091/mbc.9.5.1093. PMID: 9571242.
32. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* 2004; 39: 1477–1487. doi: 10.1002/hep.20214. PMID: 15185286.
33. Giri S, Acikgöz A, Bader A. Isolation and Expansion of Hepatic Stem-like Cells from a Healthy Rat Liver and their Efficient Hepatic Differentiation of under Well-defined Vivo Hepatic like Microenvironment in a Multiwell Bioreactor. *J Clin Exp Hepatol.* 2015; 5: 107–122. doi: 10.1016/j.jceh.2015.03.003. PMID: 26155038.

Статья поступила в редакцию 24.07.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 24.07.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-162-170

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ И МИНИМИЗАЦИЯ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

О.А. Герасимова<sup>1, 2</sup>, В.В. Боровик<sup>1</sup>, Н.В. Марченко<sup>1</sup>, И.И. Тилеубергенов<sup>1</sup>

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

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

В обзоре современных публикаций рассматриваются молекулярные механизмы толерантности печени и ее аллотрансплантатов в аспекте минимизации и возможностей отмены иммуносупрессивной терапии, главным образом, в отдаленном периоде после трансплантации печени. Представлены сведения о клинических испытаниях Трег с целью индукции толерантности. Продемонстрированы данные нового консенсусного исследования об индивидуализации режимов иммуносупрессивной терапии. Рассматриваются варианты возможной отмены иммуносупрессии как в ранние, так и в отдаленные сроки после ТП. Предлагается к исследованию путь изучения лимфопролиферативного потенциала реципиента трансплантата печени, поскольку не только отторжением определяется продолжительность жизни, но и степенью влияния иммуносупрессии на костный мозг в зависимости от возраста пациента.

*Ключевые слова:* апоптоз, иммунная толерантность, иммуносупрессия, стромальные мезенхимальные клетки, T-регуляторные лимфоциты, трансплантат печени, NK-клетки.

## TOLERANCE AND MINIMIZATION OF IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY AFTER LIVER TRANSPLANTATION

O.A. Gerasimova<sup>1, 2</sup>, V.V. Borovik<sup>1</sup>, N.V. Marchenko<sup>1</sup>, I.I. Tileubergenov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Granov Russian Scientific Center of Radiology and Surgical Technology, St. Petersburg, Russian Federation

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

In this review of current publications, we look at the molecular mechanisms of tolerance of the liver and its allografts in terms of minimization and possibilities of withdrawing immunosuppressive therapy, mainly in the long-term period after liver transplantation. Information about clinical trials with regulatory T cells (Tregs) for the purpose of tolerance induction is presented. Data from a new consensus study on individualization of immunosuppressive therapy regimens are presented. Options for possible withdrawal of immunosuppression both in the early and in the long term after liver transplantation (LT) are considered. We suggest a way to study the lymphoproliferative potential of a liver transplant recipient to be investigated, since not only rejection determines life expectancy, but also the degree of immunosuppression effect on bone marrow depending on patient age.

*Keywords:* apoptosis, immune tolerance, immunosuppression, mesenchymal stem cells, regulatory T cells, liver transplant, NK cells.

С влиянием иммуносупрессивной терапии в отдаленном периоде после трансплантации печени (ТП) связан целый комплекс негативных последствий, которые ограничивают срок жизни реципиентов. И если выживаемость в первый год после ТП представляется удовлетворительной, то продолжитель-

ность жизни пациентов в поздние сроки остается существенно меньшей, чем в общей популяции (рис. 1), среди причин негативных исходов лидируют малигнизации, инфекции, кардиоваскулярные и нефрологические проблемы [1]. Поэтому остается актуальным поиск рациональных путей преодоления

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

**Corresponding author:** Olga Gerasimova. Address: 70, Leningradskaya str., Pesochny settlement, St. Petersburg, 197758, Russian Federation.

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

нежелательных эффектов. Основными подходами к модификации иммуносупрессии после ТП, исходя из анализа современной литературы, можно признать интраоперационную и отсроченную индукцию толерантности, индивидуализацию и рационализацию режимов с целью уменьшения частоты развития побочных эффектов препаратов, и наконец, минимизацию иммуносупрессии вплоть до полной ее отмены.

Большинство исследователей считают печень иммунопривилегированным органом, который может быть толерантным к различным воздействиям. Иммунологическая толерантность в печени опосредуется специализированными антигенпрезентирующими клетками (АПК), включая дендритные клетки (ДК), клетки Купфера, синусоидальные эндотелиальные клетки и звездчатые клетки печени. Эти клетки, предоставляя аутоантигены собственным Т-клеткам, способствуют их апоптозу, анергии или дифференцировке Т-лимфоцитов в регуляторные Т-клетки. Толерогенная роль иммунной системы печени была впервые продемонстрирована еще в 1969 г. R.Y. Calne et al. [2], которые обнаружили, что аллотрансплантаты свиной печени, которые имели несовпадения в главном комплексе гистосовместимости (МНС), приживались без иммуносупрессии.

Объяснение относительной толерогенности печени многофакторно: большой размер органа приводит к гораздо большей площади эндотелиальной

поверхности, на которой распределяются антитела, таким образом их эффекты ослабляются; печень обладает природной регенеративной способностью, поэтому при отторжении повреждение ткани печени потенциально обратимо. Экспрессия антигенов МНС II класса на клетках печени более вариабельна по сравнению с экспрессией, наблюдаемой в почках и сердце. Толерантность в печени имеет эволюционную основу, поскольку 75% кровотока в печени происходит из воротной вены, которая собирает кровь из желудочно-кишечного тракта, обогащенного микробными антигенами. Иммунная система печени эволюционировала, чтобы жестко регулировать иммунные реакции на безвредные кишечные микроорганизмы и избежать нежелательных реакций воспалительного типа [3].

Достижение иммунной толерантности после ТП потенциально позволило бы избежать длительной иммуносупрессии. В настоящее время продолжают активно изучаться и уточняться механизмы толерантности трансплантированной печени. В формировании толерантности участвуют главным образом мезенхимальные стромальные клетки (МСК), Т-регуляторные лимфоциты (T-reg), НК-клетки донора (рис. 2). Treg признаны центральными регуляторами иммунного ответа, они экспрессируют FOXP3 – транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за дифференцировку

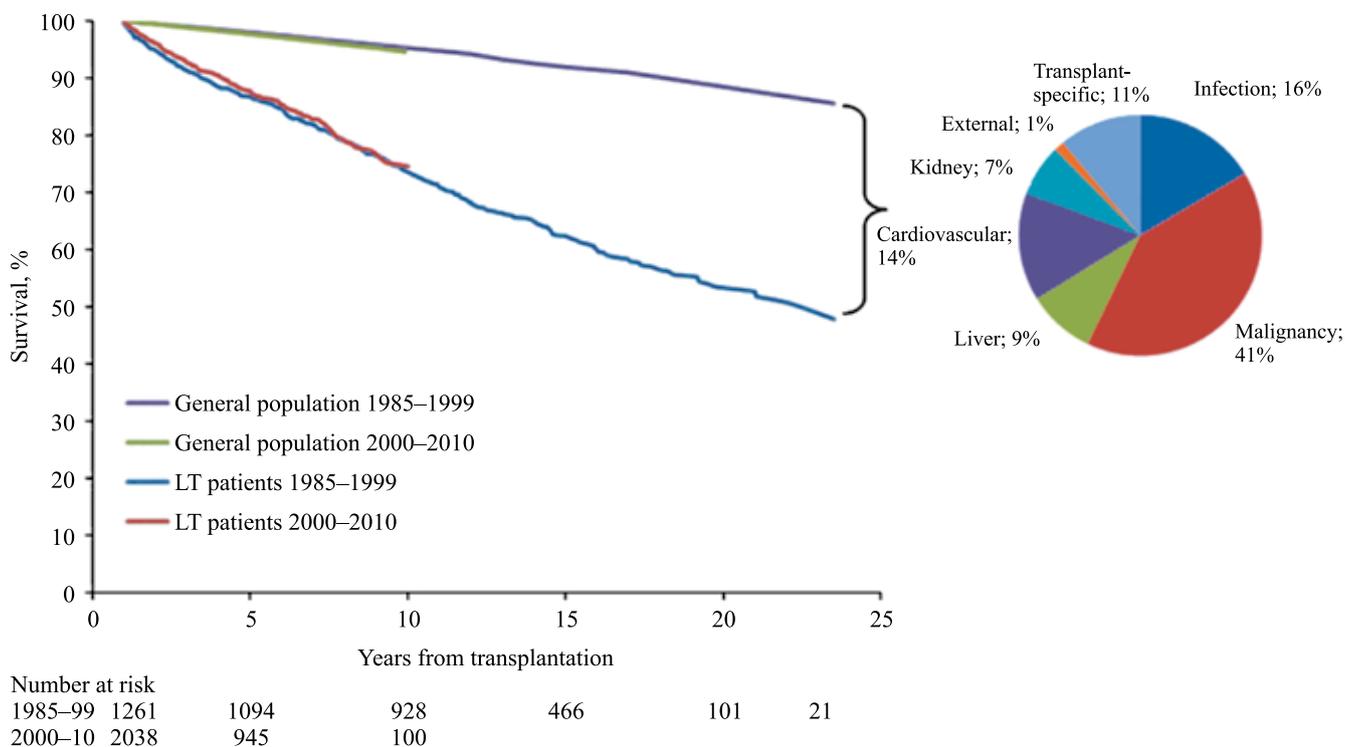


Рис. 1. Сравнительная с общей популяцией выживаемость пациентов после трансплантации печени в отдаленном периоде [1]

Fig. 1. Differences in long-term survival among liver transplant recipients and the general population [1]

Т-клеток и экспрессию цитокинов и других факторов, участвующих в супрессии иммунного ответа, важным маркером Т-регуляторных клеток является экспрессия на их поверхности рецептора к цитокину IL-2 – CD25.

Хотя презентация антигенов донорских дендритных клеток (ДК) является основным фактором отторжения, в печени были обнаружены и толерогенные фенотипы ДК [6, 7]. ДК также способны тормозить пролиферацию Т-клеток, предоставляя незначительное число костимулирующих молекул, которые наряду с высокой экспрессией PDL1 (лиганд PD1 – мембранного белка, который предотвращает активацию Т-лимфоцитов) вызывают анергию или делецию аллореактивного клона Т-клеток. ДК секретируют IL-10 и TGF-β, которые индуцируют дифференцировку Treg. Рецепторы CTLA4 на поверхности Treg связываются с белком B7 на ДК с более высоким сродством, чем CD28, нарушая взаимодействия между ДК и Т-клетками. Treg тоже вносят вклад в толерогенное микроокружение, секретируя TGF-β, IL-10 и IL-35, связывая IL-2 с CD25 с более высокой аффинностью, чем эффекторные Т-клетки, а также за счет прямой

цитотоксичности, осуществляемой двумя известными путями через гранзим, перфорин и взаимодействие Fas-FasL. В отличие от NK-клеток реципиента, которые могут опосредовать отторжение, NK-клетки донорского происхождения, трансплантированные в качестве клеток-пассажигов, способны напрямую лизировать аллореактивные иммунные клетки реципиента через взаимодействия NKG2D-MIC-A и TRAIL-TRAILR. Есть данные о том, что и NK-клетки реципиента могут иметь толерогенный потенциал. МСК подавляют пролиферацию и дифференцировку Т-клеток посредством секреции индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) фермента, способного метаболизировать аминокислоту триптофан до кинуренина. Т-клеткам эта аминокислота необходима для активации, а дефицит триптофана индуцирует апоптоз или угнетает пролиферацию и дифференцировку при контакте клетки с клеткой, опосредованном PD-L1 [4, 5]. Клетки Купфера могут быть поляризованы по фенотипу M2, продуцируя IL-10 и TGF-β и, таким образом, тоже способствуя толерантности. Они также могут высвобождать оксид азота (NO) при участии IFN-γ для подавления пролиферации Т-клеток.

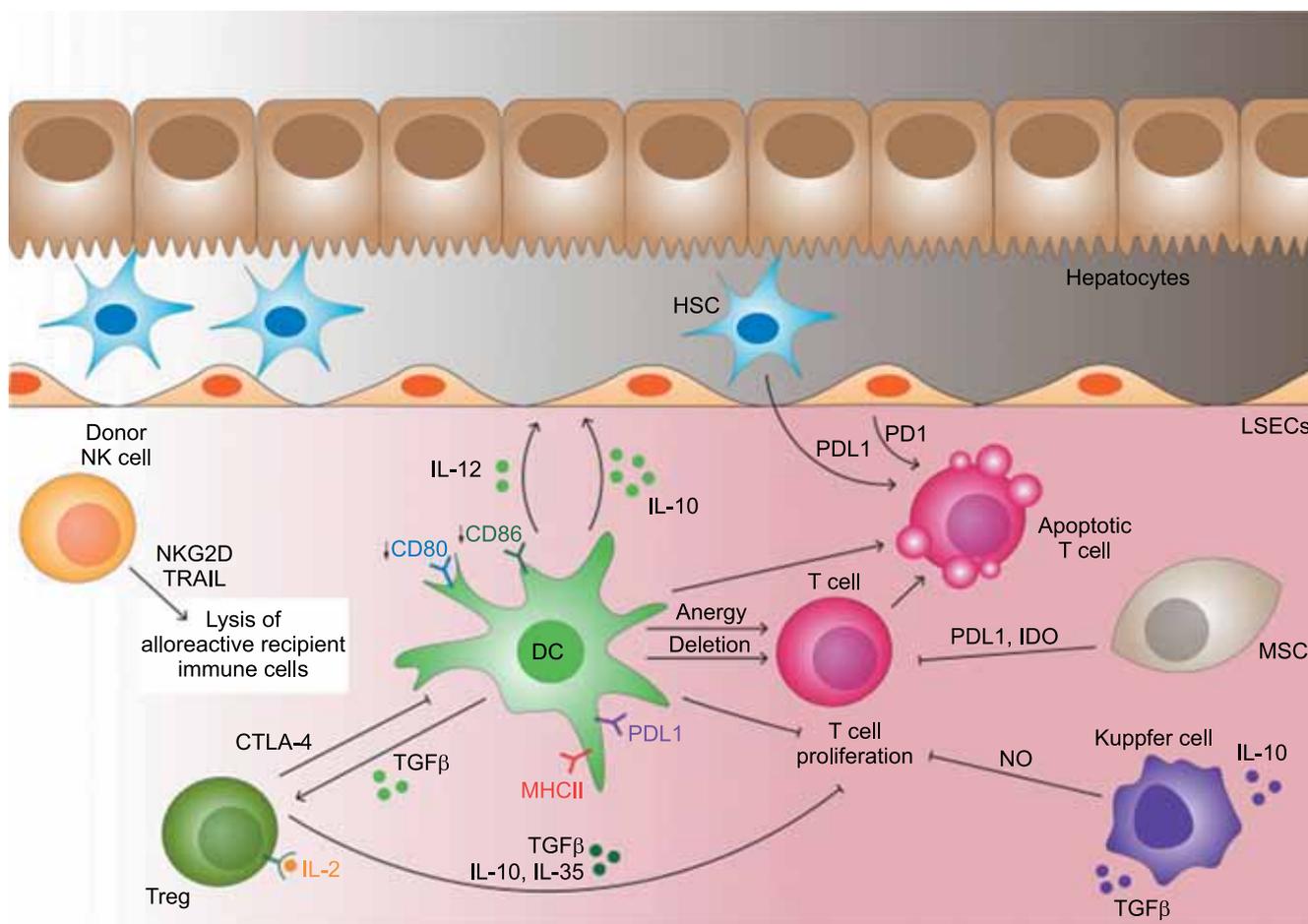


Рис. 2. Клеточные механизмы толерантности после ТП (описание в тексте) [3]

Fig. 2. Cellular mechanisms of liver allograft tolerance (description in text) [3]

Синусоидальные эндотелиоциты (LSEC) действуют как непрофессиональные АПК с обычно низкими уровнями экспрессии антигенов МНС II класса. LSEC вместе со звездчатыми клетками печени индуцируют апоптоз Т-клеток через взаимодействия PDL1-PD1 [3–8].

Печень сохраняет толерогенный потенциал даже тогда, когда аллореактивные Т-клетки получили доступ к паренхиме и началось повреждение ткани. По некоторым данным, аллореактивные Т-клетки вызывают гибель клеток печени либо через апоптоз, либо через лизосомную деградацию гепатоцитов. Этот процесс отчасти зависит и от Treg, обеспечивающих торможение реакции отторжения [9, 10].

Исследование этих механизмов представляется важным для обоснования возможностей индукции толерантности после ТП.

Клеточная терапия на основе Treg – многообещающий альтернативный подход, способствующий приживлению аллотрансплантата, потенциально сводящий к минимуму использование традиционной иммуносупрессии [11, 12]. В 2020 г. в журнале *Lancet* были опубликованы данные исследования ONE, демонстрирующие безопасность введения Treg реципиентам донорской почки [13]. В других центрах близки к завершению клинические испытания, которые находятся на разных фазах, и сосредоточены на изучении аллоантиген-специфичных Treg, поскольку они имеют лучшую подавляющую функцию по отношению к аллореактивным эффекторным Т-клеткам, чем поликлональные Treg [14]. Экспансия Treg *in vivo* представляет собой еще одну интересную терапевтическую стратегию. Treg проявляют более высокое сродство к IL-2, поэтому использование незначитель-

ных концентраций этой молекулы может увеличить пул Treg *in vivo* в несколько раз без значительного увеличения количества эффекторных Т-клеток [15].

В настоящее время во всем мире проводится несколько клинических испытаний с использованием ряда препаратов Treg при ТП (табл.). Поликлональная регуляторная Т-клеточная терапия с наращиванием клеток *ex vivo* используется в исследовании ThRIL в клинике Кингс-Колледж (Великобритания), в исследовании DeLTA и ARTEMIS в Калифорнийском университете (Сан-Франциско, США) используют донорский аллоантиген, реактивные регуляторные Т-клетки (daTregs), а также в Нанкинском медицинском университете (Китай) используют донорские антиген-специфические Treg у пациентов в ранние и поздние сроки после трансплантации печени.

В случае родственной ТП клеточный продукт может быть произведен перед операцией трансплантации, и инфузия может проводиться в ранний посттрансплантационный период. Однако во всем мире преобладает ТП от посмертного донора, что затрудняет доступ и получение донорской ткани. Кроме того, производство препарата Treg очень ресурсоемкое. Очень мало лицензированных лабораторий, способных производить Treg в условиях GMP [16]. Существует еще множество технических проблем производства, масштабирования, хранения клеточного продукта, однако это направление представляется самым вдохновляющим для индукции толерантности как в ранние, так и в поздние сроки после ТП.

Поскольку донорская печень является чужеродным органом, постоянно предоставляющим АПК, а индукция толерантности не стала общедоступной, иммуносупрессивная терапия остается необходимой

Таблица

**Клинические испытания с использованием *ex vivo* Treg при ТП [16]**  
**Clinical trials using Treg *ex vivo* in liver transplantation [16]**

Испытание	Цель и точка приложения	Страна	Дизайн	Возраст (лет)	Доза Treg	Повторные введения	Отмена ИСТ
NCT 01624077	Хроническое отторжение	Китай	Открытое в одной группе	10–60	$1 \times 10^6$ клеток/кг донорские	Да	Да
ARTEMIS (NCT 02474199)	Индукция толерантности при родственной ТП	США	Открытое в одной группе	18–70	$300\text{--}500 \times 10^6$ клеток донорские	Нет	Да
ThRIL (NCT 02166177)	Индукция толерантности при родственной ТП	Великобритания	Открытое в одной группе	18–70	Аутологичные поликлональные 1-я когорта: $0,5\text{--}1,0 \times 1 \times 10^6$ клеток/кг 2-я когорта: $3,0\text{--}4,5 \times 1 \times 10^6$ клеток/кг 3-я когорта: $5,0\text{--}6,5 \times 1 \times 10^6$ клеток/кг	Нет	Нет
dELTA (NCT 02188719)	Индукция толерантности при ТП от посмертного донора	США	Нерандомизированное открытое	21–70	Донорские аллоантиген-реактивные 1-я когорта: 0 2-я когорта: $25\text{--}60 \times 10^6$ клеток 3-я когорта: $100\text{--}240 \times 10^6$ клеток 4-я когорта: $400\text{--}960 \times 10^6$ клеток	Нет	Да

для профилактики и лечения отторжения трансплантата.

В реальной клинической практике спектр препаратов для иммуносупрессии не так велик. Основу по-прежнему составляет такролимус. Схемы, состоящие из комбинации микофенолатов и ингибиторов кальциневрина (ИКН), или, в последнее время, эверолимуса, обычно используются как поддерживающий режим иммуносупрессии после ТП.

Механизмы подавления активации Т-клеток этими препаратами хорошо изучены, тем не менее воздействие указанных иммунодепрессантов на апоптоз гепатоцитов не было исследовано. Апоптоз гепатоцитов стимулирует фиброгенез при различных повреждениях печени [17]. С этой точки зрения интересным представляется исследование E.J. Lim et al. [18], где оценивали гибель гепатоцитов по маркерам апоптоза в биоптате иммуногистохимическим методом на фоне иммуносупрессии и сравнивали их с состоянием клеток печени у людей без заболеваний печени, оперированных по иным поводам. Уровень маркеров апоптоза гепатоцитов оказался достоверно выше у реципиентов трансплантата печени по сравнению с контролем. Апоптотические гепатоциты поглощаются и утилизируются как клетками Купфера, так и звездчатыми клетками печени. Клетки Купфера, которые поглотили апоптотические гепатоциты, секретируют TGF- $\beta$ , основной фактор фиброгенеза [19]. На культуре мышечных гепатоцитов было показано, что комбинации циклоспорина (CyA) и микофенолата (MMF), такролимуса (Tas) и MMF снижали жизнеспособность клеток и увеличивали апоптоз гепатоцитов, а изолированно Tas и CyA таких эффектов не вызывали. Сиролимус как монокомпонент не влиял на жизнеспособность и апоптоз гепатоцитов, а в сочетании с MMF эти эффекты были выражены минимально [20]. Таким образом, выбирать рациональную схему иммуносупрессии возможно с учетом влияния препаратов и на апоптоз гепатоцитов, а следовательно, на фиброгенез. Обоснованными представляются схемы ИКН/mTOR и mTOR/MMF в отдаленном периоде после ТП [18].

Несмотря на то, что накоплен большой опыт использования иммуносупрессивных препаратов после ТП, тем не менее, схемы гетерогенны и не идеальны. Длительность выживания реципиентов связана не только и не столько с реакциями отторжения, но и с накоплением нежелательных явлений. Для их коррекции могут быть реализованы два подхода: предварительный индивидуальный подбор до ТП и стандартные схемы, которые модифицируются по мере развития осложнений [21]. В 2020 г. опубликован итальянский консенсус по применению эверолимуса в клинической практике после ТП, где предложены алгоритмы модификации иммуносупрессивной терапии. При выборе режима иммуносупрессивной

терапии следует учитывать комплекс клинических переменных, включая первичное заболевание, статус пациента при трансплантации, тип операции, особенности раннего послеоперационного периода, события и ожидаемые осложнения, связанные с длительным использованием ИКН, и риск *de novo* злокачественных новообразований. Стратегии предотвращения или ограничения нежелательных явлений, связанных с ИКН, стоит использовать как можно раньше после ТП. В настоящее время наиболее эффективными стратегиями нефрозащиты признаны снижение воздействия ИКН, что возможно при раннем введении эверолимуса или микофенолата, если эверолимус не показан. Представленные алгоритмы позволяют минимизировать риски нежелательных явлений и токсичности иммуносупрессантов (рис. 3, 4) [22]. Эти рекомендации согласуются и с приведенными выше экспериментальными данными о рациональных схемах иммуносупрессии, основанных на влиянии известных препаратов на фиброгенез в печени.

К сожалению, результаты экспериментальных исследований, направленных на изучение механизмов толерантности, пока не позволяют установить определенные факторы для эффективной минимизации и отмены поддерживающей иммуносупрессивной терапии. В отсутствие надежных биомаркеров толерантности [23], при сложности и противоречивости молекулярных механизмов единственным надежным способом подтверждения толерантности является отсутствие отторжения после преднамеренного прекращения иммуносупрессии.

С клинической позиции толерантность определяется как стабильная функция трансплантата у реципиента, не принимающего иммунодепрессанты, у которого не обнаружено клинически значимого иммунного ответа.

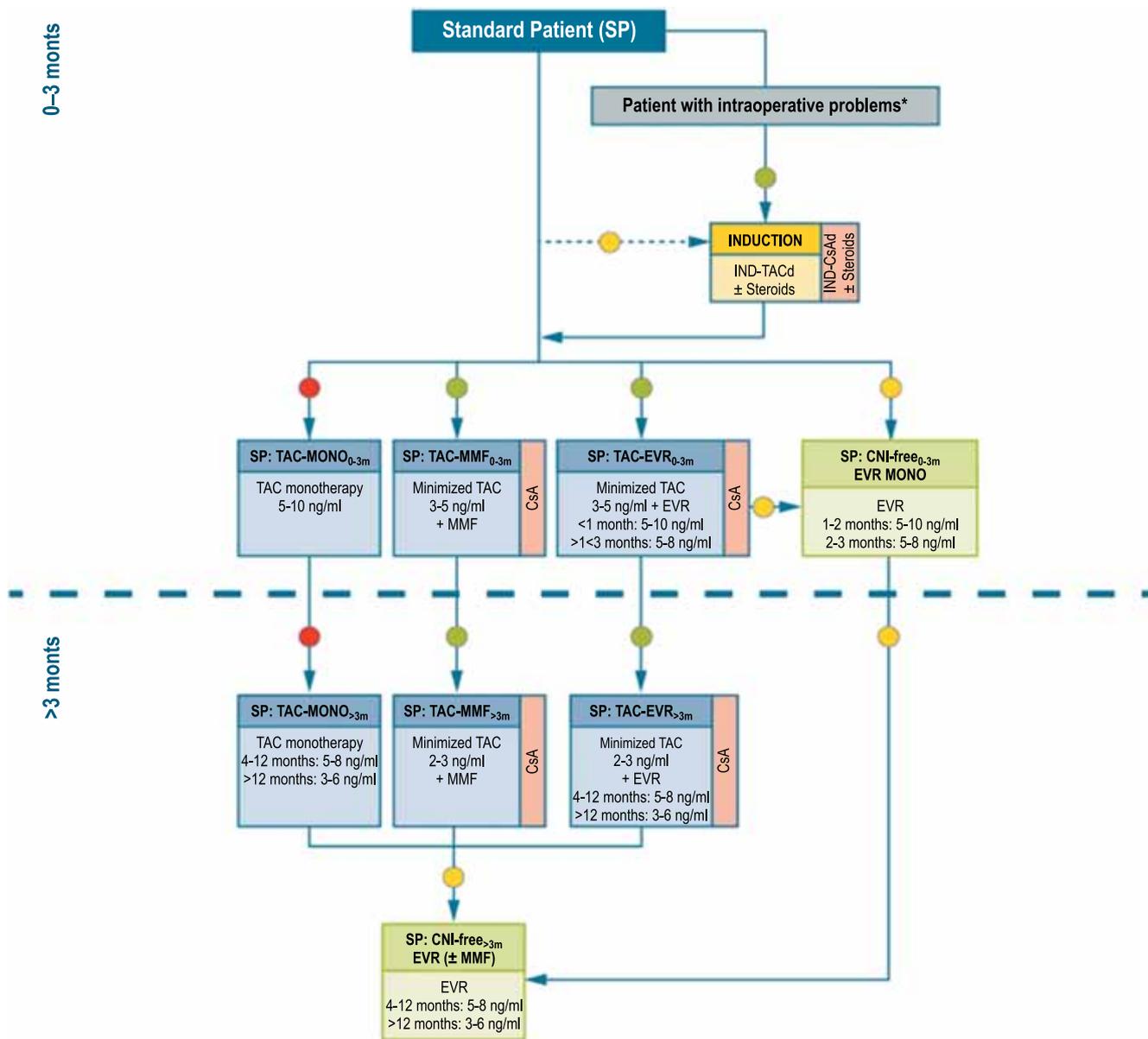
В 2015 г. Chi-Xian Zhang et al. представили обзор данных о минимизации и возможной отмене иммуносупрессивной терапии после ТП [24], на основании сведений о врожденном толерогенном свойстве печени и тщательной оценки клинических показателей. Успешное отлучение от иммуносупрессии оказалось возможным у почти 20% отобранных реципиентов трансплантата печени.

В более позднем исследовании [25] 95 реципиентов через 1–2 года после ТП были случайным образом распределены для отмены ( $n = 77$ ) и продолжения поддерживающей терапии ( $n = 18$ ). Критериями включения были: монокомпонентная иммуносупрессия; адекватная функция печени и почек;  $\leq 2$  стадия фиброза по Ishak; отсутствие отторжения по данным биопсии. Отмена иммуносупрессии проводилась по 8-ступенчатому алгоритму снижения с 8-недельным интервалом; 52 из 77 реципиентов (67,5%) снизили дозу до  $\leq 50\%$  от базовой, а 10 из 77

(13,0%) полностью прекратили иммуносупрессию в течение  $\geq 1$  года. При отторжении или выраже лабораторных тестов усиливали иммуносупрессию. В 5 из 32 случаев отторжения потребовалось болюсное введение метилпреднизолона. Композитная конечная точка (смерть или потеря трансплантата; вторичная злокачественная опухоль 4-й степени или оппортунистическая инфекция; стадия Ishak  $\geq 3$ ; или  $>25\%$  снижение скорости клубочковой фильтрации в течение 24 месяцев после рандомизации) достигнута у 12 из 66 (18%) и 4 из 13 (31%) в группах отмены и

минимизации соответственно. Таким образом, ранняя минимизация иммуносупрессии оказалась возможной у отдельных реципиентов печени, а полная отмена успешна только у совсем небольшой части.

Данные еще одного проспективного рандомизированного исследования [26], свидетельствуют, что у более 40% тщательно отобранных реципиентов печени через несколько лет после ТП возможна отмена иммуносупрессии. 102 стабильных реципиента печени через 3 года и более после ТП были отобраны для отмены. Прием препаратов постепенно прекращался



\*Se grave evento intraoperatorio considerare switch a "Paziente critico – Alto rischio chirurgico".  
CNI = Calcineurin inhibitors; CsA = Cyclosporin A; d = delayed; EVR = Everolimus; IND = Induction; MMF = Mycophenolate mofetil; TAC = Tacrolimus;

Рис. 3. Алгоритм иммуносупрессии для стандартного пациента. Зеленые круги – рекомендовано, желтые – с осторожностью, красные – не рекомендовано [22]

Fig. 3. Immunosuppression algorithm for standard patients. Key: green circle = recommended; yellow circle = caution advised; red circle = not recommended [22]

в течение нескольких месяцев. Первичной конечной точкой было развитие толерантности, определяемой как успешное прекращение приема иммуносупрессивных препаратов, когда в течение не менее 12 месяцев оставалась стабильной функция трансплантата и отсутствовали гистологические признаки отторжения. Из 98 реципиентов 57 сохранили и 41 успешно отменили все иммунодепрессанты. У толерантных пациентов прием препаратов прекращался в среднем

в течение  $8,0 \pm 4,6$  месяца. 23 толерантных пациента перенесли один эпизод временной дисфункции аллотрансплантата, не связанной с отторжением. Все эпизоды разрешились спонтанно без увеличения доз иммунодепрессантов. Два толерантных пациента умерли с нормальной функцией трансплантата через 16 и 26 месяцев после полного прекращения приема препаратов из-за послеоперационных осложнений резекции рака толстой кишки и метастатиче-

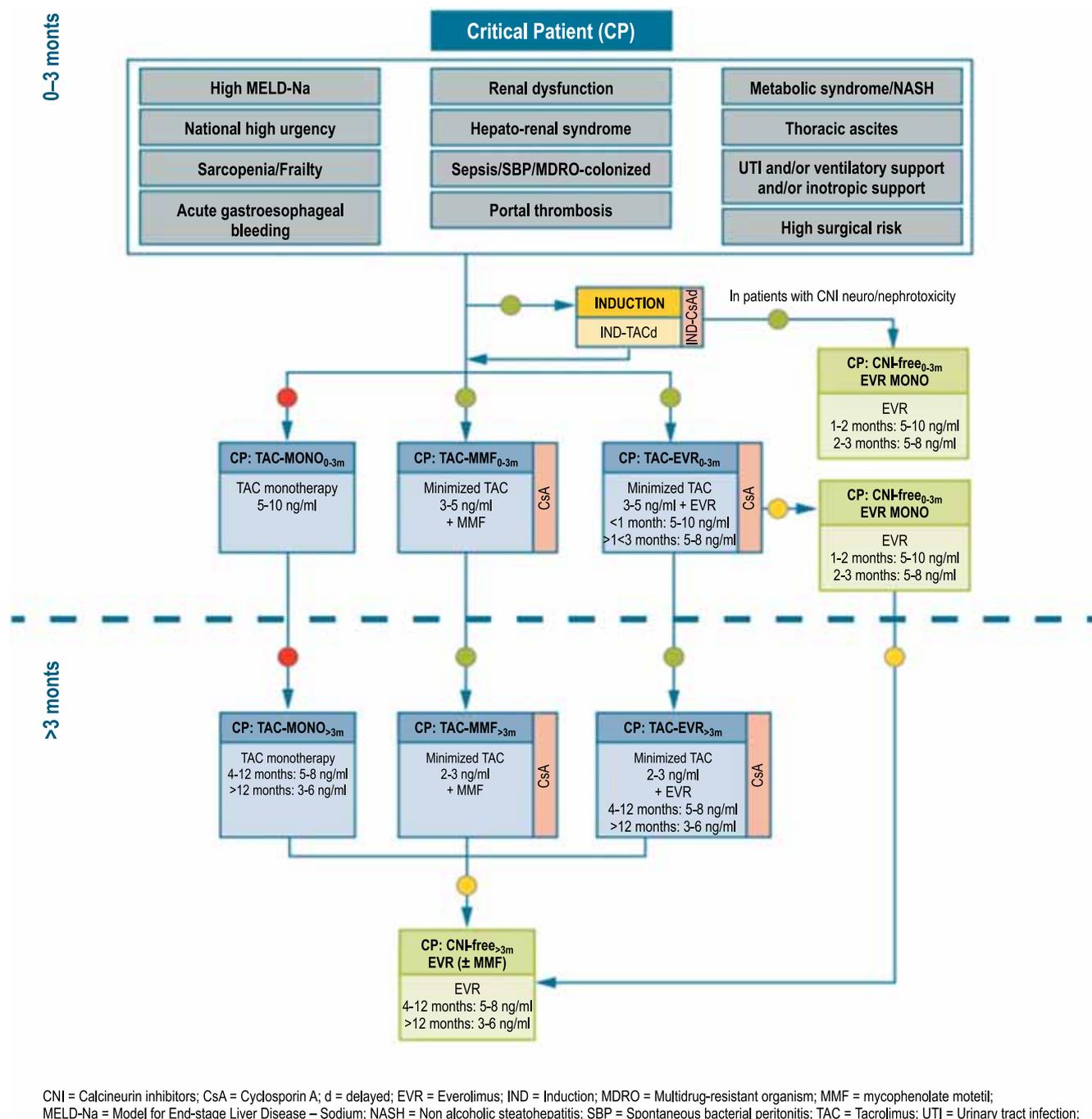


Рис. 4. Алгоритм иммуносупрессии для пациента с тяжелыми осложнениями. Зеленые круги – рекомендовано, желтые – с осторожностью, красные – не рекомендовано. По [22]

Fig. 4. Immunosuppression algorithm for critically ill patients. Key: green circle = recommended; yellow circle = caution advised; red circle = not recommended. По [22]

ского рака яичников соответственно. Ни у одного из толерантных реципиентов во время последующего наблюдения не развилось отторжение. У 57 нетолерантных пациентов острое отторжение обнаружили в срок  $6,4 \pm 4,4$  месяца после начала минимизации терапии. Все нетолерантные пациенты получали иммунодепрессанты во время отторжения. Биопсия печени была проведена в 89% случаев, и отторжение классифицировано в большинстве случаев как пограничное или легкое по критериям Banff. Случаев хронического отторжения не наблюдалось. У 21 пациента отторжение было купировано возвращением исходной иммуносупрессии. У остальных пациентов восстановление исходной иммуносупрессии сочетали с низкими дозами или умеренными дозами пероральных стероидов, лишь однажды потребовалось их болюсное введение. У 55 реципиентов (96,5%) через  $5,6 \pm 5$  месяца после выявления отторжения полностью нормализовались все показатели. Потеря трансплантата не было.

По итогам исследования успешная отмена иммуносупрессии достоверно чаще происходила у мужчин ( $p = 0,009$ ), у лиц более старшего возраста на момент ТП ( $p = 0,05$ ), а также у тех, кто живет после ТП дольше ( $p < 0,0001$ ). Время после ТП было определено как самый сильный предиктор клинической толерантности. У пациентов, включенных в исследование спустя более 10 лет после ТП, в 79% случаев отмена иммуносупрессии была успешной по сравнению с пациентами, живущими более 5,7 года, им отменить все препараты удалось только в 38% случаев. Достоверно легче отлучать от иммуносупрессии оказалось тех, у кого отсутствовали ИКН в схеме, применяемой при включении в исследование ( $p = 0,005$ ).

Тем не менее рандомизированных исследований пошаговой минимизации и полной отмены иммуносупрессивной терапии в отдаленном периоде очень мало, а в сроки 1–2 года после ТП отмена представляется все же нецелесообразной.

Существует еще один не вполне традиционный взгляд на проблему длительного выживания или поддержания функционального состояния трансплантата печени. У части реципиентов утрата трансплантата печени может быть обусловлена не отторжением, а истощением пролиферативного потенциала лимфоцитарного ростка костного мозга (произведение числа стволовых/прогениторных лимфоцитов крови на митотическую активность), величина которого лимитирует продолжительность жизни при естественном старении организма [27]. Индивидуальный мониторинг лимфопротеративного потенциала мог бы способствовать своевременной коррекции доз и модификации схем иммуносупрессивной терапии. Исследование наименее изученной функциональной связи собственных Т-регуляторных лимфоцитов с пу-

лом стволовых гемопоэтических клеток представляется актуальным для объективизации индивидуального мониторинга иммуносупрессии в отдаленном периоде после ТП. Этот аспект можно рассматривать как один из подходов к минимизации, а возможно, и отмене иммуносупрессии.

В заключение следует сказать, что на основании дальнейших исследований молекулярных механизмов толерантности могут быть определены пути ее индукции в клинической практике, и тогда иммуносупрессивная терапия, возможно, утратит свою актуальность. Перспективным и многообещающим является введение аллогенных Treg с целью индукции иммунной толерантности. В отдаленном периоде после ТП актуальным остается сохранение режимов иммуносупрессии с учетом индивидуального профиля реципиента. Минимизация доз и отмена иммуносупрессии у тщательно отобранных реципиентов со стабильной функцией трансплантата представляется возможной, но требует тщательного мониторинга состояния трансплантата печени. В настоящее время необходимы дополнительные проспективные исследования для подтверждения безопасности и эффективности полной отмены иммуносупрессии по сравнению с поддерживающей терапией, а также для верификации биомаркеров толерантности.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации (№ 37.12-2021).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Aberg F, Gissler M, Karlsen TH, Ericzon BG, Foss A, Rasmussen A et al. Differences in long-term survival among liver transplant recipients and the general population: a population-based Nordic study. *Hepatology*. 2015; 61 (2): 668–677. doi: 10.1002/hep.27538.
2. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969; 223 (5205): 472–476. doi: 10.1038/223472a0. PMID: 4894426.
3. Ronca V, Wootton G, Milani C, Cain O. The Immunological basis of liver allograft rejection. *Front Immunol*. 2020; 11: 2155. doi: 10.3389/fimmu.2020.02155. PMID: 32983177.
4. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*. 2016; 18: 160–171. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.011.
5. Taner T, Abrol N, Park WD, Hansen MJ, Gustafson MP, Lerman LO et al. Phenotypic transcriptional, and functional analysis of liver mesenchymal stromal cells and

- their immunomodulatory properties. *Liver Transpl.* 2020; 26: 549–563. doi: 10.1002/lt.25718.
6. Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today.* 1999; 20: 27–32. doi: 10.1016/S0167-5699(98)01378-4.
  7. Thomson AW, Humar A, Lakkis FG, Metes DM. Regulatory dendritic cells for promotion of liver transplant operational tolerance: rationale for a clinical trial and accompanying mechanistic studies. *Hum Immunol.* 2018; 79: 314–321. doi: 10.1016/j.humimm.2017.10.017.
  8. Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7- homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepatology.* 2008; 47: 296–305. doi: 10.1002/hep.21965.
  9. Shalev I, Selzner N, Shyu W, Grant D, Levy G. Role of regulatory T cells in the promotion of transplant tolerance. *Liver Transpl.* 2012; 18: 761–770. doi: 10.1002/lt.23458.
  10. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med.* 2008; 14: 88–92. doi: 10.1038/nm1688.
  11. Todo S, Yamashita K, Goto R, Zaitzu M, Nagatsu A, Oura T et al. A pilot study of operational tolerance with a regulatory T-cell-based cell therapy in living donor liver transplantation. *Hepatology.* 2016; 64: 632–643. doi: 10.1002/hep.28459.
  12. Landwehr-Kenzel S, Issa F, Luu SH, Schmuck M, Lei H, Zobel A et al. Novel GMP-compatible protocol employing an allogeneic B cell bank for clonal expansion of allospecific natural regulatory T cells. *Am J Transplant.* 2014; 14: 594–606. doi: 10.1111/ajt.12629.
  13. Sawitzki B, Harden PN, Reinke P, Moreau A, Hutchinson JA, Game DS et al. Regulatory cell therapy in kidney transplantation (The ONE Study): a harmonised design and analysis of seven non-randomised, single-arm, phase 1/2A trials. *Lancet.* 2020; 395: 1627–1639. doi: 10.1016/S0140-6736(20) 30167-7.
  14. MacDonald KG, Hoeppli RE, Huang Q, Gillies J, Luciani DS, Orban PC et al. Alloantigen-specific regulatory T cells generated with a chimeric antigen receptor. *J Clin Invest.* 2016; 126: 1413–1424. doi: 10.1172/JCI 82771.
  15. Boardman DA, Philippeos C, Fruhwirth GO, Ibrahim MA, Hannen RF, Cooper D et al. Expression of a chimeric antigen receptor specific for donor HLA Class I enhances the potency of human regulatory T Cells in preventing human skin transplant rejection. *Am J Transplant.* 2017; 17: 931–943. doi: 10.1111/ajt.14185.
  16. Whitehouse GP, Hope A, Sanchez-Fueyo A. Regulatory T-cell therapy in liver transplantation. *Transpl Int.* 2017; 30 (8): 776–784. doi: 10.1111/tri.12998. PMID: 28608637.
  17. Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology.* 2004; 39 (2): 273–278. PMID: MEDLINE:14767974.
  18. Lim EJ, Chin R, Nachbur U, Silke J, Jia Z, Angus PW et al. Effect of immunosuppressive agents on hepatocyte apoptosis post-liver transplantation. *PLoS ONE.* 2015; 10 (9): e0138522. doi: 10.1371/journal.pone.0138522.
  19. Johnson JD, Ao Z, Ao P, Li H, Dai L-J, He Z et al. Different effects of FK506, rapamycin, and mycophenolate mofetil on glucose-stimulated insulin release and apoptosis in human islets. *Cell Transplant.* 2009; 18 (8): 833–845. PMID: MEDLINE:19500470. doi: 10.3727/096368909X471198.
  20. Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis. *J Hepatol.* 2006; 45 (6): 786–796. PMID: MEDLINE:17050028.
  21. De Simone P, Carrai P, Coletti L, Ghinolfi D, Petrucci S, Filippini F. Modification of immunosuppressive therapy as risk factor for complications after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017; 31 (2): 199–209. doi: 10.1016/j.bpg.2017.03.001. PMID: 28624108.
  22. Cillo U, De Carlis L, Del Gaudio M, De Simone P, Faggioli S, Lupo F et al. Immunosuppressive regimens for adult liver transplant recipients in real-life practice: consensus recommendations from an Italian Working Group. *Hepatol Int.* 2020; 14 (6): 930–943. doi: 10.1007/s12072-020-10091-5. PMID: 33099753.
  23. Shevchenko OP, Kurabekova RM, Tsirolnikova OM. Biomarkers of immune tolerance in liver transplantation. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2016; 18 (3): 137–144. doi.org/10.15825/1995-1191-2016-3-137-144.
  24. Zhang CX, Wen PH, Sun YL. Withdrawal of immunosuppression in liver transplantation and the mechanism of tolerance. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015; 14 (5): 470–476. doi: 10.1016/s1499-3872(15)60411-8. PMID: 26459722.
  25. Shaked A, DesMarais MR, Kopetskie H, Feng S, Punch JD, Levitsky J et al. Outcomes of immunosuppression minimization and withdrawal early after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2019; 19 (5): 1397–1409. doi: 10.1111/ajt.15205.
  26. Benítez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abraldes JG, Lozano JJ et al. Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology.* 2013; 58 (5): 1824–1835. doi: 10.1002/hep.26426. PMID: 23532679.
  27. Shoutko AN, Gerasimova OA, Ekimova LP, Zhebrebtsov FK, Mus VF, Matyurin KS et al. Lymphocyte reproductive activity normalized to numbers of hematopoietic stem cells in blood and rate of death in fatal diseases. *Int J of Genetics and Genomics.* 2017; 5: 54–62. doi: 10.11648/j.ijgg.20170505.12.

Статья поступила в редакцию 19.04.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 19.04.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-171-179

# ИММУНОСЕНЕСЦЕНЦИЯ КАК ПРИЧИНА ИНДИВИДУАЛИЗИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

*В.А. Федулкина, А.В. Ватазин, А.В. Кильдюшевский, А.Б. Зулькарнаев, Д.В. Губина, М.П. Федулкина*

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

Трансплантация пожилому реципиенту, очевидно, более сложна из-за существующих сопутствующих заболеваний, изменений фармакокинетики иммуносупрессивных препаратов, полипрагмазии и трансформации иммунореактивности (иммуносенесценции). В обзоре представлены данные о модификации адаптивного и врожденного иммунитета при старении и рассмотрена возможность как сокращенной, так и адаптированной иммуносупрессивной терапии у пожилых реципиентов почечных трансплантатов для достижения оптимального баланса между эффективностью и осложнениями.

*Ключевые слова:* трансплантация почки, старение, иммуносенесценция, иммуносупрессивная терапия.

## IMMUNOSENESCENCE AS A REASON FOR INDIVIDUALIZED IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY IN KIDNEY TRANSPLANTATION

*V.A. Fedulkina, A.V. Vatazin, A.V. Kildyushevskiy, A.B. Zulkarnayev, D.V. Gubina, M.P. Fedulkina*

Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Transplantation in elderly patients is obviously more challenging due to existing underlying diseases, changes in pharmacokinetics of immunosuppressive drugs, polypragmasy, and transformation of immunoreactivity (immunosenescence). Our review presents data on modification of adaptive and innate immunity during aging. It also considers the possibility of both reduced and adapted immunosuppressive therapy in elderly renal transplant recipients in achieving an optimal balance between efficacy and complications.

*Keywords:* kidney transplantation, aging, immunosenescence, immunosuppression therapy.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время трансплантация почки является оптимальным методом заместительной почечной терапии, обеспечивая наилучшую выживаемость пациентов [1].

Непосредственные и отдаленные результаты трансплантаций определяются рядом факторов, связанных с возрастом, основным заболеванием, длительностью диализа и наличием инфекций, длительностью функционирования и причиной утраты первого трансплантата в случае повторной трансплантации, наличием предрасполагающих антител, типом и качеством донорского органа, а также со-

путствующими заболеваниями [2–5]. Некоторые из перечисленных факторов напрямую влияют на состояние иммунной системы реципиента перед трансплантацией.

Например, известно, что молодые люди в возрасте до 30 лет имеют более реактивный иммунитет, затем с возрастом более всего страдает Т-звено иммунитета, что в первую очередь связано с возрастной инволюцией вилочковой железы, начинающейся с 15–20 лет и сопровождающейся уменьшением ее массы, ослаблением функции и синтеза регуляторных факторов, что приводит к закономерному прогрессирующему подавлению тимусзависимого звена иммунитета. Из-

**Для корреспонденции:** Федулкина Вероника Андреевна. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2, корп. 6. Тел. (495) 684-57-91. E-mail: v.fedulkina@mail.ru

**Corresponding author:** Veronika Fedulkina. Address: 61/2, Schepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation. Phone: (495) 684-57-91. E-mail: v.fedulkina@mail.ru

меняется соотношение регуляторных субпопуляций лимфоцитов на фоне общей лимфопении. В-звено иммунитета также подвергается негативным изменениям: у стариков наблюдается падение нормальных антител, включая изогемагглютинины, что необходимо учитывать при определении группы крови и трансплантации органов у пожилых лиц [6, 7].

За последние десятилетия число пожилых людей значительно увеличилось и, как ожидается, вырастет еще больше – с 8% от общей численности населения мира в 2015 году до 16% в 2050 году [8]. При этом самая быстрорастущая возрастная группа реципиентов – это именно пациенты старше 65 лет [9]. Например, в США количество операций пациентам старше 65 лет увеличилось с 17 до 33,3% от общего числа трансплантаций почки в период с 2012-го по 2018 год [10]. В Австралии 14% трансплантаций почек, выполненных в 2015 году, были у пациентов в возрасте 65 лет и старше [11]. В европейском отчете Регистра трансплантации почек за 2012 год указано, что распространенность трансплантаций составляла 22% в возрастной группе старше 65 лет и 20% в возрастной группе старше 75 лет [12].

В регистре Российского трансплантологического общества распределения по возрасту реципиентов нет, отдельно освещаются лишь данные о трансплантации почки несовершеннолетним [13]. По данным сотрудников из НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, доля пациентов старше 60 лет в листе ожидания трансплантации почки составляет 9–13% от общего числа потенциальных реципиентов, что несколько меньше, чем в Европе и США [14].

Такой рост частоты трансплантации почки у пожилых людей можно объяснить старением населения, улучшением результатов трансплантации и введением расширенных критериев донорской почки [15, 16]. Однако трансплантация пожилому реципиенту, очевидно, более сложна из-за существующих сопутствующих заболеваний, изменений фармакокинетики иммунодепрессивных лекарств, полипрагмазии и трансформации иммунореактивности (иммуносенесценции).

Несмотря на это, результаты исследований показывают, что трансплантация почки у пожилых пациентов связана со снижением смертности по сравнению с диализом [9, 17]. У пожилых реципиентов более низкий риск острого отторжения из-за снижения иммунной реактивности, однако они являются наиболее вероятной возрастной группой, которая умрет с функционирующим трансплантатом [18]. В то время как краткосрочные результаты у пожилых реципиентов трансплантата схожи с более молодыми, длительная выживаемость трансплантата и выживаемость пожилых реципиентов уступает таковой у более молодых. Наиболее частыми причинами смерти у пожилых реципиентов являются инфекция, злока-

чественные новообразования и сердечно-сосудистые заболевания, каждую из которых частично можно записать на счет иммунодепрессантов [19–21].

Очевидно, что многогранные модификации адаптивного и врожденного иммунитета при старении могут служить оправданием как сокращенной, так и адаптированной иммуносупрессивной терапии у пожилых реципиентов почечных трансплантатов для достижения оптимального баланса между эффективностью и токсичностью. Сводя к минимуму побочные эффекты, индивидуализованная стратегия может обеспечить оптимальный уровень иммуносупрессии для пожилого реципиента трансплантата для минимизации или предотвращения инфекций, злокачественных новообразований и хронических заболеваний почек, а также сердечно-сосудистых осложнений, связанных с сахарным диабетом, гипертонией и гиперлипидемией [22, 23].

Исследование в качестве биомаркеров таких показателей, как выработка цитокинов, пролиферация лимфоцитов или экспрессия активационных антигенов на Т-лимфоцитах, можно использовать для мониторинга и оценки активности иммунной системы, поскольку для некоторых из них существует статистически значимая связь с частотой острого отторжения или токсичностью иммуносупрессантов, и это является очевидной неудовлетворенной клинической потребностью [24].

## ИММУНОСЕНЕСЦЕНЦИЯ И ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ОРГАНОВ

Иммуносенесценция (иммунное старение или изнашивание иммунной системы, от лат. *senescere* – стареть) – это постепенное подавление иммунной реактивности у пожилых людей из-за снижения количества наивных Т-лимфоцитов, накопления Т-клеток памяти и изменения В-клеток, вызывающего снижение ответа антител [18]. Иммунное старение характеризуется нарушением функции как адаптивного, так и врожденного иммунитета и может влиять на все иммунологические компоненты и вызывать сдвиг как в регуляции, так и в функции всей иммунной системы [25, 26]. Очевидно, что механизмы, лежащие в основе отторжения пересаженных органов, различаются у молодых и пожилых реципиентов трансплантата, а клинические результаты у пожилых реципиентов должны сопровождаться индивидуализацией иммуносупрессии [27].

Иммуносенесценция представляет собой сложное и непрерывное ремоделирование определенных клеточных субпопуляций, а не единообразные изменения [28]. Наиболее заметно влияние старения на Т-клеточный иммунитет, в то время как изменения в В-клетках ученые считают менее выраженными [29].

T-клетки играют ключевую роль как в развитии толерантности, так и в отторжении трансплантата. В стареющей популяции динамика T-клеточного иммунитета включает внутренние и системные изменения T-клеток с изменением соотношения наивных T-клеток и T-клеток памяти и инволюцией тимуса, что, безусловно, влечет за собой клиническую значимость [30].

Инволюция тимуса начинается уже в 1 год, при этом количество наивных T-клеток уменьшается на 50% за любые 15 лет жизни и ведет к значительному снижению выработки наивных T-лимфоцитов в тимусе у населения старше 60 лет [31]. Примечательно, что T-клетки памяти являются долгоживущими, а реакции памяти T-лимфоцитов показывают период полураспада 8–15 лет. Продолжительность жизни подмножеств T-клеток памяти в основном объясняется самообновлением, а не продолжительностью жизни отдельных T-клеток [32]. Наивные T-клетки могут делиться и генерировать дочерние T-клетки с наивным фенотипом, такая повышенная гомеостатическая пролиферация может компенсировать, по крайней мере частично, снижение активности тимуса при старении. Однако эта новая популяция T-клеток, состоящая в основном из T-клеток памяти, имеет пониженную способность распознавать и устранять новые патогены [27]. Таким образом, ответ T-лимфоцитов пожилого возраста в основном строится на менее эффективных ответах памяти, которым не хватает способности молодых T-клеток к миграции и наивной продукции *de novo* [28].

В крупном обзоре российских авторов обосновывается необходимость внедрения в клиническую практику комплексного мониторинга иммунных клеток крови и цитокинов у больных с пересаженными органами для выбора индивидуальной тактики иммуносупрессивной терапии, оценки ее эффективности и прогнозирования результатов. Подчеркивается, что с особым вниманием следует отнестись к характеристике CD4+ T-лимфоцитов и определению соотношения их отдельных популяций в периферической крови, так как именно они являются основными участниками ответа иммунной системы организма на трансплантат [33].

Соотношение CD4+ (T-хелперов) к CD8+ (T-супрессорам) клеткам в периферической крови называется иммунорегуляторным индексом и у большинства пожилых людей подвергается инверсии вместе с увеличением активированных T-клеток и T-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры NK-клеток [34]. J.M. Schaenman et al. показали, что у пожилых реципиентов трансплантата почки наблюдалось понижение наивных CD4+ и CD8+ T-клеток и повышение терминально дифференцированных, иммунных стареющих и NK T-клеток. Также авторы заметили тенденцию к статистически значимому увеличению

показателей иммунного старения T-клеток у пациентов, перенесших инфекцию в первый год после трансплантации, и отметили возможности данной теории для стратификации риска и коррекции иммуносупрессии для предотвращения инфекций и отторжения после трансплантации [35].

Старение T-клеток сопровождается также потерей костимулирующей молекулы CD28 на CD4+ и CD8+ T-клетках [36]. CD28 является ключевым костимулирующим поверхностным рецептором, который играет решающую роль в антиген-зависимой активации, пролиферации и выживании T-клеток и продлевает выживаемость трансплантата. Практически все человеческие T-клетки экспрессируют CD28 во время рождения. В отличие от этого к 80 годам у 10–15% CD4+ T-клеток периферической крови и 50–60% CD8+ T-клеток отсутствует экспрессия CD28. В качестве альтернативного и компенсаторного пути классической активации T-клеточный рецептор / CD28 стареющие T-клетки повышают *de novo* экспрессию рецепторов цитотоксических NK-клеток [37]. Эти изменения показывают, что повышенная экспрессия рецепторов NK-клеток будет влиять на аллоиммунные ответы у пожилых людей, потенциально отражая актуальность усиленного врожденного иммунного ответа. Хотя общее значение рецепторов NK-клеток при трансплантации почки остается малоизученным, недавняя работа показала фенотипические изменения репертуара NK-клеток, вызванные иммуносупрессивным лечением [38]. Такие возрастные изменения T-клеток дают основание для изучения потенциала новых иммуносупрессивных подходов [28].

В нашем исследовании 2020 года были также отмечены интересные возрастные особенности клеточного иммунитета – у здоровых добровольцев функциональная активность мононуклеаров периферической крови статистически не значимо, но постепенно снижается по мере увеличения возраста. В то же время у больных хронической болезнью почек (ХБП) диализной стадии эта зависимость была такой же направленности, но выражена значительно сильнее и была статистически значима. Можно сделать вывод, что больные ХБП старшей возрастной группы после трансплантации почки 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, что следует учитывать при выборе иммуносупрессивной терапии у реципиентов почечного трансплантата старшей возрастной группы [39].

Дополнительные исследования *in vitro* показали, что потеря CD28 сопровождается повышенной экс-

прессией гена его антагониста, рецептора CTLA-4, что потенциально усиливает уже ингибирующий эффект [40].

Некоторые авторы обнаружили очень значимую корреляцию между возрастом и процентом CTLA-4+ CD4+ клеток, а также между возрастом и средней интенсивностью флуоресценции CTLA-4. Уровни CTLA-4 также коррелируют с активацией иммунной системы, определяемой по уровням HLA-DR+ CD3+ клеток. Следовательно, старение иммунной системы, связанное с возрастом, частично вызвано хронической активацией иммунной системы с соответствующим снижением костимулирующих молекул CD28 и увеличением ингибирующих молекул CTLA-4 [41].

Важно отметить, что иммунное старение следует рассматривать как множество сложных модификаций иммунологических функций и регуляций с широкими последствиями для аллоиммунных ответов. Доказательств влияния возраста на функцию В-клеток мало. Литература демонстрирует, что пожилой возраст влияет на гуморальный иммунный ответ посредством снижения количества наивных В-клеток в сочетании с уменьшением количества Т-клеток, которые являются неотъемлемой частью активации В-клеток [42]. В отличие от Т-клеток гомеостаз В-клеток поддерживается на периферии за счет уменьшения оборота зрелых В-лимфоцитов. Несмотря на это, снижение количества В-клеток вызывает изменение специфичности антител и уменьшение плазматических клеток в костном мозге [26]. Однако ряд авторов, наоборот, считают, что старение, по-видимому, приводит к уменьшению разнообразия наивных В-клеток, а не к значительным изменениям в количестве периферических В-клеток, что позволяет предположить, что влияние старения на компонент В-клеток может быть в первую очередь качественным [43].

Сужение репертуара В-клеток с возрастом коррелирует с восприимчивостью к инфекции. Сообщалось о корреляции между серопозитивностью вируса Эпштейна–Барр и клональной экспансией В-клеток у очень пожилых людей (80 лет и старше) без связи с персистирующей инфекцией цитомегаловируса (ЦМВ) [44]. Клинически остается неясным, зависит ли гуморальный ответ от возраста и требует ли гуморальное отторжение иного терапевтического подхода у пожилых людей. Большинство гуморальных иммунных ответов требует помощи родственных Т-лимфоцитов, и, как отмечалось выше, иммуносенесценция связана с изменением в компартменте CD4+. Однако как связанные с иммунным старением изменения в CD4+ клетках инициируют изменения в В-клетках у пожилых людей, непосредственно не исследовалось.

В ряде сообщений старение также связывается со снижением соотношения цитокинов Th1/Th2, тогда как общее количество цитокин-продуцирующих

Т-клеток типа 1 и 2, по-видимому, увеличивается с возрастом [45]. Нарушение продукции IL-2 в старых Т-клетках также может быть связано с возрастной потерей CD-28, поскольку костимулирующий сигнал имеет решающее значение для активации Т-клеток и их последующего производства IL-2 [46]. В одном исследовании было показано, что как емкость цитокинов IL-2, так и чувствительность CD4+ Т-клеток снижаются с возрастом, по крайней мере, в моделях на мышах [45]. Поддерживающая иммуносупрессия в значительной степени зависит от ингибиторов кальциневрина, которые специфически нацелены на продукцию IL-2 в Т-клетках. Взятые вместе потеря CD28 и снижение высвобождения IL-2 могут представлять собой критические факторы нарушения аллоиммунного ответа у пожилых людей, влияющие на протоколы иммуносупрессии и толерантности.

Регуляторные Т-клетки (Treg) играют решающую роль в сохранении иммунной толерантности и предотвращении обострения иммунных ответов на чужеродные антигены. Многочисленные исследования доказывают накопление FoxP3+ Treg-клеток с возрастом [47, 48]. В итоге от баланса Т-хелперов (Th), инициирующих активный иммунный ответ и запускающих отторжение, и Т-регуляторных клеток (Treg), обладающих обратным действием, зависит активность иммунного ответа или формирование иммунологической толерантности.

## **ВЛИЯНИЕ ИММУННОГО СТАРЕНИЯ НА РЕЗУЛЬТАТЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ**

У пожилых реципиентов почечного трансплантата общая смертность выше, и почти 50% потерь трансплантата связаны со смертью при работающем трансплантате по сравнению с 15% у молодых реципиентов. Осложнения иммуносупрессии, такие как сердечно-сосудистые заболевания, инфекции или злокачественные новообразования, особенно среди пожилых пациентов, представляют собой важные составляющие заболеваемости и смертности [20]. Тем не менее прогнозируемая продолжительность жизни возросла до 10 лет у реципиентов почечного трансплантата старше 65 лет по сравнению с контрольной группой соответствующего возраста, остающейся на диализе [49].

О. Weaver-Pinzon et al. провели ретроспективное исследование 52 995 взрослых пациентов после трансплантации почки и пришли к логичным выводам: смертность среди реципиентов в возрасте от 60 лет была значительно выше, смертность более молодых реципиентов обусловлена острым отторжением, коронарной васкулопатией и несостоятельностью трансплантата, а смертность реципиентов старшего возраста обусловлена инфекцией, злокачественными новообразованиями и почечной недо-

статочностью [50]. Другое крупное исследование также подтвердило снижение как врожденной, так и адаптивной иммунной реактивности с возрастом, что способствует снижению частоты острого отторжения и повышению инфекционной смертности у пожилых реципиентов трансплантата [51].

F. Jackson-Spence et al. провели ретроспективный анализ результатов 1140 почечных трансплантаций в разных возрастных группах и отметили, что у пожилых реципиентов трансплантата почки повышен риск осложнений, связанных с иммуносупрессией, но показатели отторжения и потери трансплантата после цензуры на смерть оказались аналогичны. Поэтому авторы считают необходимыми клинические испытания адаптированной к возрасту иммуносупрессии [52].

В исследовании S.G. Tullius et al. у пожилых реципиентов (>50 лет) наблюдалась меньшая частота острого отторжения по сравнению с более молодыми реципиентами, несмотря на более очевидную иммуногенность пожилых донорских почек [53].

Другие авторы также отмечают, что при трансплантации почки менее 25% неудач у пожилых реципиентов связаны с отторжением по сравнению с 50% у реципиентов моложе 45 лет. Однако острые отторжения у пожилых людей оказывают более выраженное пагубное влияние на выживаемость пациентов и трансплантатов. Возрастные изменения внутренних органов и аспекты иммуногенности могут иметь значение в этом контексте, поскольку пожилые реципиенты с большей вероятностью получают органы от более возрастных доноров [49].

Таким образом, у реципиентов трансплантата старение иммунной системы, вероятно, снижает риск острого отторжения, но увеличивает риск побочных эффектов, связанных с приемом иммуносупрессии, особенно инфекций и злокачественных новообразований [54].

Актуальность метаболических нарушений также возрастает в процессе старения. Действительно, вновь возникший сахарный диабет чаще встречается у пожилых людей и связан с применяемой иммуносупрессией. Например, риск его возникновения после трансплантации почки увеличивается в 1,5 раза на протяжении каждого десятилетия жизни. Число случаев предтрансплантационного сахарного диабета также увеличивается с 7 до 31% с возрастом, как показано в исследовании более 12 000 реципиентов трансплантата печени [55]. В свою очередь, наличие сахарного диабета связано с увеличением частоты острых отторжений, инфекций, поздних сердечно-сосудистых осложнений и неблагоприятных исходов.

Риск смерти от инфекции экспоненциально увеличивается с возрастом среди реципиентов почечного трансплантата, а среди реципиентов почек и легких старше 60 лет инфекция является основной

причиной повышенной смертности, наблюдаемой в первый послеоперационный год [54]. Цитомегаловирусная инфекция считается вкладом окружающей среды в иммуносенescенцию, поскольку количество ЦМВ-специфических CD8 Т-клеток является самым высоким у пожилых людей. Было высказано предположение, что заполнение «иммунологического пространства» ЦМВ-специфическими Т-клетками может сужать репертуар Т-клеток и сильно влиять на компонент памяти. Популяция периферических наивных Т-клеток у людей, не инфицированных ЦМВ, демонстрировала более высокое количество наивных Т-клеток и более низкий иммунорегуляторный индекс [56].

Известно, что заболеваемость раком неуклонно растет с возрастом, достигая наибольшего числа у реципиентов трансплантата старше 50 лет. Раковые заболевания кожи и лимфопролиферативные заболевания являются наиболее распространенными злокачественными новообразованиями среди реципиентов трансплантата. Кроме того, злокачественные новообразования *de novo* являются одной из основных причин смерти, например, на их долю приходится треть случаев смерти реципиентов трансплантата печени, не связанных с патологией печени [57].

## ОБСУЖДЕНИЕ

Старение вызывает серию модификаций иммунитета Т-клеток. В целом компартменты Т-клеток претерпевают сдвиг в сторону менее эффективной реакции в течение всей жизни. При трансплантации органов нарушение Т-клеточного иммунитета при старении связано с менее острым отторжением и улучшением выживаемости трансплантата. В то же время у пожилых реципиентов трансплантата чаще наблюдаются побочные эффекты иммуносупрессии с более высокой частотой инфекций и злокачественных новообразований.

Сложный баланс между недостаточной и избыточной иммуносупрессией становится еще более уязвимым у пожилых реципиентов из-за изменений фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов [58]. Также существующие методы лечения отторжения могут иметь пагубное влияние у пожилых людей и часто приводят к чрезмерной иммуносупрессии. Становится очевидным, что протоколы иммуносупрессии для пожилых реципиентов трансплантата должны уравнивать риск острого отторжения с риском неблагоприятных сердечно-сосудистых, инфекционных и других осложнений.

Решения по корректировке доз иммуносупрессантов принимаются на основе клинического опыта, и пациенты часто отклоняются от целевых концентраций, подвергаясь альтернативным рискам токсичности и отторжения трансплантата. При использовании такой стратегии была достигнута пятилетняя

выживаемость для реципиентов 78%, но эти показатели успеха лишь указывают на то, что еще есть возможности для улучшения [59]. Текущие данные о рекомендуемой стандартной иммуносупрессивной терапии в основном получены из исследований, в которых пожилые пациенты были исключены или составляли меньшинство. На сегодняшний день проведено лишь несколько хорошо спланированных проспективных исследований среди пожилых людей, которые демонстрируют необходимость коррекции иммуносупрессии в первые месяцы после трансплантации [49].

Многие авторы акцентируют внимание на необходимости уменьшения поддерживающих доз иммуносупрессивных препаратов у пожилых реципиентов для возможной минимизации побочных эффектов и считают необходимыми дальнейшие исследования в данном направлении. Например, предполагается, что в качестве индукционного лечения данной группе реципиентов предпочтительнее сниженная доза тимоглобулина или антитела к IL-2R, в качестве поддерживающей терапии можно рассмотреть снижение дозы такролимуса или иммуносупрессию без ингибитора кальциневрина (CNI). Судя по экспериментальным данным, mTORi (в частности, Беталасепт) представляется перспективным кандидатом на замену CNI у пожилых пациентов [28].

Из-за возрастных изменений дифференцировки Т-клеток фармакодинамика иммунодепрессантов также изменяется, и это одна из причин, по которой доза этих препаратов может быть снижена. Кроме того, одновременное назначение нескольких препаратов может привести к побочным эффектам фармакодинамических взаимодействий. Хорошо известно, что CNI могут вызывать острую и хроническую нефротоксичность. В недавнем исследовании S. Khan et al. особое внимание уделялось острому повреждению почек у пожилых пациентов и кумулятивной или синергической нефротоксичности CNI с нестероидными противовоспалительными препаратами, аминогликозидами, ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента и противомикробными препаратами. Авторы сделали вывод, что необходимо свести к минимуму использование нефротоксических препаратов, поскольку пациенты пожилого возраста более склонны к острому повреждению почек после трансплантации [60].

Amelia R. Cossart et al. в своем обзоре 2019 года также изучали известные в настоящее время факты о фармакокинетике и фармакодинамике обычно назначаемых иммунодепрессантов (такролимус, циклоспорин, микофенолат и преднизолон) у пожилых реципиентов почечного трансплантата и отметили, что у пожилых реципиентов может быть более высокая дозированная экспозиция или более низкий клиренс ингибиторов кальциневрина. Также сообщается о сокращении эффективности такролимуса у пожилых людей на 50%, об отсутствии повышенного дозированного воздействия микофеноловой кислоты на трансплантат пожилых реципиентов и о неясности влияния старения на фармакокинетику преднизолона [19].

М. Meier et al. считают, что индивидуальные стратегии иммуносупрессии, такие как отказ от ингибитора кальциневрина и отмена микофеноловой кислоты, могут улучшить выживаемость пациента и трансплантата в случае возрастного реципиента. Пользу отказа от стероидов авторы считают менее очевидной, но, возможно, более важной для пожилых людей, у которых возрастная потеря костной массы, непереносимость глюкозы и другие метаболические изменения осложняют стероидную терапию [61].

Становится очевидно, что стареющая иммунная система может не только требовать снижения, но и индивидуализации иммуносупрессии. Таким образом, крайне необходимы клинические исследования, оценивающие выживаемость трансплантатов и реципиентов, для внедрения адаптированных к возрасту иммуносупрессивных протоколов в соответствии с потребностями этой уязвимой группы реципиентов трансплантата почки [62].

Недостатком современной иммуносупрессивной лекарственной терапии для пожилых людей также является использование минимальных концентраций препарата в качестве текущего «золотого стандарта» для мониторинга уровня иммуносупрессивной терапии. Однако мониторинг концентраций в крови может не отражать должным образом эффекты старения иммунной системы или возрастные нарушения функции органов. Следовательно, необходимо диагностическое использование биомаркеров для корректировки лекарственной терапии с учетом возрастных изменений. Ученые начинают задумываться о поиске фармакодинамических, фармакогенетических или иммунологических маркеров индивидуализированной иммуносупрессии. Вместо дозирования иммуносупрессивных препаратов на основе фармакокинетических измерений иммунологический биомаркер будет лучше отражать активность лекарственного средства (или комбинации лекарств), а не просто его концентрацию [54]. Действительно, мониторинг клеток периферической крови и цитокинов в пред- и посттрансплантационном периоде позволяет выявить изменения в процессах развивающегося отторжения либо приживления органа, что может дать основания для индивидуализации иммуносупрессивной терапии [63].

Разработка комплексной индивидуализированной иммунотерапевтической стратегии при трансплантации почки позволит применять ее с целью минимизации осложнений используемых иммуносупрессивных препаратов, их нефротоксичности, различных

инфекционных и онкологических заболеваний, посттрансплантационного сахарного диабета, тем самым улучшая результаты трансплантации почки и сокращая лист ожидания на пересадку с одновременным рациональным использованием дорогостоящей иммуносупрессии.

*Работа была выполнена с использованием средств гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых № МК-63.2020.7.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Hod T, Goldfarb-Rumyantzev AS. Clinical issues in renal transplantation in the elderly. *Clin Transplant*. 2015; 29 (2): 167–175. doi: 10.1111/ctr.12481.
- Reese PP, Shults J, Bloom RD, Mussell A, Harnay MN, Abt P et al. Functional status, time to transplantation, and survival benefit of kidney transplantation among wait-listed candidates. *Am J Kidney Dis*. 2015; 66 (5): 837–845. doi: 10.1053/j.ajkd.2015.05.015.
- Panchal H, Muskovich J, Patterson J, Schroder PM, Ortiz J. Expanded criteria donor kidneys for retransplantation United Network for Organ Sharing update: proceed with caution. *Transpl Int*. 2015; 28 (8): 990–999. doi: 10.1111/tri.12584.
- Tsapepas DS, Vasilescu R, Tanriove B, Coppleson Y, Rekhman Y, Hardy MA et al. Preformed donor-specific antibodies and risk of antibody-mediated rejection in repeat renal transplantation. *Transplantation*. 2014; 97 (6): 642–647. doi: 10.1097/01.TP.0000440954.14510.6a.
- Aufhauser DD Jr, Peng AW, Murken DR, Concors SJ, Abt PL, Sawinski D et al. Impact of prolonged dialysis prior to renal transplantation. *Clin Transplant*. 2018; 32 (6): e13260. doi: 10.1111/ctr.13260.
- Маркелова ЕВ, Хачатрян ЛС, Бирко ОН, Байбарина ЕВ. Показатели иммунного статуса у пациенток разных возрастных групп. *Современные проблемы науки и образования*. 2018; (6): 44. Markelova EV, Khachatryan LS, Birko ON, Baybarina EV. Pokazateli immunnogo statusa u patsientok raznykh vozrastnykh grupp. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2018; (6): 44. [In Russ].
- Talamantes E, Norris KC, Mangione CM, Moreno G, Waterman AD, Peipert JD et al. Linguistic Isolation and Access to the Active Kidney Transplant Waiting List in the United States. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017; 12 (3): 483–492. doi: 10.2215/CJN.07150716.
- Dreyer GJ, Hemke AC, Reinders MEJ, de Fijter JW. Transplanting the elderly: balancing aging with histocompatibility. *Transplant Rev (Orlando)*. 2015; 29 (4): 205–211. doi: 10.1016/j.trre.2015.08.003.
- Segall L, Nistor I, Pascual J, Mucsi I, Guirado L, Higgins R et al. Criteria for and Appropriateness of Renal Transplantation in Elderly Patients With End-Stage Renal Disease: A Literature Review and Position Statement on Behalf of the European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Descartes Working Group and European Renal Best Practice. *Transplantation*. 2016; 100 (10): 55–65. doi: 10.1097/TP.0000000000001367.
- Hart A, Smith JM, Skeans MA, Gustafson SK, Wilk AR, Castro S et al. OPTN/SRTR 2018 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant*. 2020; Suppl s1: 20–130. doi: 10.1111/ajt.15672.
- Anzdata.org.au [Internet]. The 39th Annual ANZDATA Report Chapter 8: Transplantation 2016. [updated 2016 Jan; cited 2020 Dec 12]. Available from: <https://www.anzdata.org.au/report/anzdata-39th-annual-report-2016>.
- Pippias M, Stel VS, Abad Diez JM, Afentakis N, Jose Antonio Herrero-Calvo JS, Ariaset M et al. Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2012 ERA-EDTA Registry Annual Report. *Clin Kidney J*. 2015; 8 (3): 248–261. doi: 10.1093/ckj/sfv014.
- 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 the Russian Federation in 2018. 11th report of the Registry of the Russian Transplant Society. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2019; 21 (3): 7–32. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-3-7-32.
- Шмарина НВ, Дмитриев ИВ, Хубутия БЗ, Пинчук АВ. Трансплантации почек от доноров с расширенными критериями пожилым реципиентам в НИИ СП им. Н.В. Склифосовского. *Трансплантология*. 2018; 10 (3): 175–184. Shmarina NV, Dmitriev IV, Khubutiya BZ, Pinchuk AV. Transplantation of expanded criteria kidney grafts to old recipients in N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine. *Transplantologiya*. 2018; 10 (3): 175–184. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23873/2074-0506-2018-10-3-175-184.
- Maggiore U, Abramowicz D, Budde K. Renal transplantation in the elderly. *Transplant Rev (Orlando)*. 2015; 29 (4): 191–192. doi: 10.1016/j.trre.2015.09.003.
- Aubert O, Kamar N, Vernerey D, Viglietti D, Martinez F, Jean-Paul Duong-Van-Huyen JP et al. Long term outcomes of transplantation using kidneys from expanded criteria donors: prospective, population based cohort study. *BMJ*. 2015; 351: h3557. doi: 10.1136/bmj.h3557.
- Usrds.org [Internet]. United States Renal Data System. 2016 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2016. [updated 2016 Jan; cited 2020 Nov 22]. Available from: <https://www.usrds.org/annual-data-report/previous-adrs/>.
- Le Meur Y. What immunosuppression should be used for old-to-old recipients? *Transplant Rev (Orlando)*. 2015; 29 (4): 231–236. doi: 10.1016/j.trre.2015.08.004.
- Cossart AR, Cottrell NW, Campbell SB, Isbel NM, Staatz CE. Characterizing the pharmacokinetics and

- pharmacodynamics of immunosuppressant medicines and patient outcomes in elderly renal transplant patients. *Transl Androl Urol.* 2019; 8 (Suppl 2): S198–S213. doi: 10.21037/tau.2018.10.16.
20. Gupta R, Schlendorf K, Lindenfeld J. Older and Wiser: Personalized Immunosuppression in the Current Era. *JACC Heart Fail.* 2017; 5 (12): 943–945. doi: 10.1016/j.jchf.2017.10.010.
21. Lund LH, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Heart Transplantation Report – 2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant.* 2016; 35 (10): 1158–1169. doi: 10.1016/j.healun.2016.08.017.
22. Colvin MM, Smith CA, Tullius SG, Goldstein DR. Aging and the immune response to organ transplantation. *J Clin Invest.* 2017; 127 (7): 2523–2529. doi: 10.1172/JCI90601.
23. Tang JT, de Winter BC, Hesselink DA, Sombogaard F, Wang LL, van Gelder T. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of mycophenolate mofetil in younger and elderly renal transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2017; 83 (4): 812–822. doi: 10.1111/bcp.13154.
24. Zhang WQ, Vierling JM. Progress in Immunosuppressive Agents for Solid-Organ Transplantation. *Tex Heart Inst J.* 2019; 46 (1): 69–70. doi: 10.14503/THIJ-18-6746.
25. Martins PNA, Tullius SG, Markmann JF. Immunosensescence and immune response in organ transplantation. *Int Rev Immunol.* 2014; 33 (3): 162–173. doi: 10.3109/08830185.2013.829469.
26. Krenzien F, ElKahl A, Quante M, Biefer HRC, Hirofumi U, Gabardi S et al. A rationale for age-adapted immunosuppression in organ transplantation. *Transplantation.* 2015; 99 (11): 2258–2268. doi: 10.1097/TP.0000000000000842.
27. Klinger M, Banasik M. Immunological characteristics of the elderly allograft recipient. *Transplant Rev (Orlando).* 2015; 29 (4): 219–223. doi: 10.1016/j.trre.2015.07.002.
28. Nian Y, Minami K, Maenesono R, Iske J, Yang J, Azuma H et al. Changes of T-cell Immunity Over a Lifetime. *Transplantation.* 2019; 103 (11): 2227–2233. doi: 10.1097/TP.0000000000002786.
29. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosensescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol.* 2016; 7: 2111. doi: 10.3389/fmicb.2016.02111.
30. Pallikkuth S, de Armas L, Rinaldi S, Pahwa S. T Follicular Helper Cells and B Cell Dysfunction in Aging and HIV-1 Infection. *Front Immunol.* 2017; 8: 1380. doi: 10.3389/fimmu.2017.01380.
31. Palmer S, Albergante L, Blackburn CC, Newman TJ et al. Thymic involution and rising disease incidence with age. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115 (8): 1883–1888. doi: 10.1073/pnas.1714478115.
32. Macallan DC, Borghans JAM, Asquith B. Human T Cell Memory: A Dynamic View. *Vaccines (Basel).* 2017; 5 (1): 5. doi: 10.3390/vaccines5010005.
33. Онищенко НА, Башкина ЛВ, Никольская АО, Артамонов СД. Информационная значимость мониторинга популяций CD4+ Т-лимфоцитов в диагностике и прогнозировании реакции организма на трансплантат. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2013; 15 (4): 112–125. Onishchenko NA, Bashkina LV, Nicol'skaya AO, Artamonov SD. Significance of CD4+ T-lymphocyte populations monitoring for diagnosing and forecasting of organism reaction on transplant. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2013; 15 (4): 112–125. [In Russ] doi: 10.15825/1995-1191-2013-4-112-125.
34. Denkinger MD, Leins H, Schirmbeck R, Florian MC, Geiger H. HSC Aging and Senescent Immune Remodeling. *Trends Immunol.* 2015; 36 (12): 815–824. doi: 10.1016/j.it.2015.10.008.
35. Schaenman JM, Rossetti M, Sidwell T, Groysberg V, Sunga G, Korin Y et al. Increased T cell immunosensescence and accelerated maturation phenotypes in older kidney transplant recipients. *Hum Immunol.* 2018; 79 (9): 659–667. doi: 10.1016/j.humimm.2018.06.006.
36. Moro-García MA, Alonso-Arias R, Lopez-Larrea C. When Aging Reaches CD4+ T-Cells: Phenotypic and Functional Changes. *Front Immunol.* 2013; 4: 107. doi: 10.3389/fimmu.2013.00107.
37. Seyda M, Elkhail A, Quante M, Tullius SG. T Cells Going Innate. *Trends Immunol.* 2016; 37 (8): 546–556. doi: 10.1016/j.it.2016.06.004.
38. Neudoerfl C, Mueller BJ, Blume C, Daemen K, Stevanovic-Meyer M, Keil J et al. The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs. *Front Immunol.* 2013; 4: 46. doi: 10.3389/fimmu.2013.00044.
39. Артемов ДВ, Зулкарнаев АБ, Ватазин АВ. Возрастные особенности субпопуляционного состава лимфоцитов и функциональной активности мононуклеаров периферической крови у больных хронической болезнью почек до и после трансплантации. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2020; 22 (1): 40–49. Artemov DV, Zulkarnaev AB, Vatazin AV. 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. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2020; 22 (1): 40–49. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2020-1-40-49.
40. Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des.* 2013; 19 (9): 1680–1698.
41. Chen G, Lustig A, Weng NP. T cell aging: a review of the transcriptional changes determined from genome-wide analysis. *Front Immunol.* 2013; 4: 121. doi: 10.3389/fimmu.2013.00121.
42. Frasca D, Diaz A, Romero M, Landin AM, Blomberg BB. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res Rev.* 2011; 10 (3): 330–335. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.004.
43. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosensescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol.* 2013; 14: 428–436. doi: 10.1038/ni.2588.
44. Wang C, Liu Y, Xu LT, Jackson KJL, Roskin KM, Pham TD et al. Effects of aging, cytomegalovirus infec-

- tion, and EBV infection on human B cell repertoires. *J Immunol.* 2014; 192 (2): 603–611. doi: 10.4049/jimmunol.1301384.
45. Gong Z, Liu T, Wan Y, Hang Z, Tong X, Zhang B et al. Decreased c-rel activation contributes to aberrant interleukin-2 expression in CD4+ T-cells of aged rats. *Mol Immunol.* 2014; 61 (1): 1–6. doi: 10.1016/j.molimm.2014.04.010.
  46. Seyda M, Quante M, Uehara H, Slegtenhorst BR, Elkhali A, Tullius SG et al. Immunosenescence in renal transplantation: a changing balance of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015; 20 (4): 417–423. doi: 10.1097/MOT.0000000000000210.
  47. Dias S, D'Amico A, Cretney E, Liao Y, Tellier J, Bruggeman C et al. Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. *Immunity.* 2017; 46 (1): 78–91. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.017.
  48. Derhovanessian E, Chen S, Maier AB, Hahnel K, de Craen AJM, Roelofs H. CCR4+ Regulatory T Cells Accumulate in the Very Elderly and Correlate With Superior 8-Year Survival. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015; 70 (8): 917–923. doi: 10.1093/gerona/glu128.
  49. Lehner LJ, Staeck O, Halleck F, Liefeldt L, Bamouli J, Budde K. Need for optimized immunosuppression in elderly kidney transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando).* 2015; 29 (4): 237–239. doi: 10.1016/j.trre.2015.08.001.
  50. Weaver-Pinzon O, Edwards LB, Taylor DO, Kfoury AG, Drakos SG, Selzman CH et al. Association of recipient age and causes of heart transplant mortality: implications for personalization of post-transplant management – an analysis of the International Society for Heart and Lung Transplantation registry. *J Heart Lung Transplant.* 2017; 36 (4): 407–417. doi: 10.1016/j.healun.2016.08.008.
  51. Shi YY, Hesselink DA, van Gelder T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunosuppressive drugs in elderly kidney transplant recipients. *Transplant Rev (Orlando).* 2015; 29 (4): 224–230. doi: 10.1016/j.trre.2015.04.007.
  52. Jackson-Spence F, Gillott H, Tahir S, Nath J, Mytton J, Evison F et al. Balancing risks for older kidney transplant recipients in the contemporary era: a single-centre observational study. *Eur Geriatric Med.* 2017; 8 (1): 42–47. doi: 10.1016/j.eurger.2016.11.004.
  53. Tullius SG, Tran H, Guleria I, Malek SK, Tilney NL, Milford E. The Combination of Donor and Recipient Age is Critical in Determining Host Immunoresponsiveness and Renal Transplant Outcome. *Ann Surg.* 2010; 252 (4): 662–674. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181f65c7d.
  54. Peeters LEJ, Andrews LM, Hesselink DA, de Winter BCM, van Gelder T. Personalized immunosuppression in elderly renal transplant recipients. *Pharmacol Res.* 2018; 130: 303–307. doi: 10.1016/j.phrs.2018.02.031.
  55. Hoehn RS, Singhal A, Wima K, Sutton JM, Paterno F, Woodle ES et al. Effect of pretransplant diabetes on short-term outcomes after liver transplantation: a national cohort study. *Liver Int.* 2015; 35 (7): 1902–1909. doi: 10.1111/liv.12770.
  56. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akbar A, Arens R, Chiu YL et al. New advances in CMV and immunosenescence. *Exp Gerontol.* 2014; 55: 54–62. doi: 10.1016/j.exger.2014.03.020.
  57. AlBugami M, Kiberd B. Malignancies: pre and post transplantation strategies. *Transplant Rev (Orlando).* 2014; 28 (2): 76–83. doi: 10.1016/j.trre.2013.12.002.
  58. Hutchison LC, O'Brien CE. Changes in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in the Elderly Patient. *J Pharm Pract.* 2007; 20 (1): 4–12. doi: 10.1177/0897190007304657.
  59. Langman LJ, Jannetto PJ. Individualizing Immunosuppressive Therapy for Transplant Patients. *Clin Chem.* 2016; 62 (10): 1302–1303. doi: 10.1373/clinchem.2016.260380.
  60. Khan S, Loi V, Rosner MH. Drug-induced kidney injury in the elderly. *Drugs Aging.* 2017; 34 (10): 729–741. doi: 10.1007/s40266-017-0484-4.
  61. Meier M, Bode W, Nitschke M, Wong W, Ison M, Kramer J et al. High rejection rates with low dose immunosuppression in old for old kidney transplantation. *Transplantationsmedizin.* 2011; 23: 118–126.
  62. Oberbauer R, Bestard O, Furian L, Maggiore U, Pascual J, Rostaing L. Optimization of tacrolimus in kidney transplantation: New pharmacokinetic perspectives. *Transplant Rev (Orlando).* 2020; 34 (2): 100531. doi: 10.1016/j.trre.2020.100531.
  63. Онищенко НА, Артамонов СД, Крашенинников МЕ, Башикина ЛВ, Никольская АО. Индивидуальная устойчивость стереотипов иммунного реагирования и современные возможности их диагностики при трансплантации органов (иммуно-физиологический анализ проблемы). *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2013; 15 (2): 123–134. Onischenko NA, Artamonov SD, Krashennnikov ME, Bashkina LV, Nicol'skaya AO. Individual stability of stereotypes of immune reacting and modern possibilities of their diagnostic in organ transplantation (immune-physiological analysis of a problem). *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2013; 15 (2): 123–134. [In Russ.]. doi: 10.15825/1995-1191-2013-2-123-134.

Статья поступила в редакцию 14.01.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 14.01.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-180-185

# РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 1$ В РАЗВИТИИ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СОЛИДНЫХ ОРГАНОВ

*Р.М. Курабекова<sup>1</sup>, О.Е. Гичкун<sup>1, 2</sup>, С.В. Мещеряков<sup>1</sup>, О.П. Шевченко<sup>1, 2</sup>*

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

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

Трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) является иммуносупрессивным и профиброгенным цитокином и способен оказывать влияние на развитие отторжения и фиброза трансплантата у реципиентов солидных органов. Ген TGFB1 обладает значительным полиморфизмом, который может служить причиной индивидуального уровня экспрессии белка и быть связан с осложнениями после трансплантации органов. Полагают, что 3 полиморфных варианта в гене TGFB1 (rs1800469, rs1800470 и rs1800471) могут быть ассоциированы с развитием отторжения, фиброза и хронической дисфункции трансплантата сердца, печени или почки. В обзоре данных современной литературы представлены результаты исследований о связи полиморфных вариантов гена TGFB1 с посттрансплантационными осложнениями у реципиентов солидных органов. Выводы различных исследований генетического полиморфизма TGFB1 у реципиентов солидных органов не всегда однозначны, а их результаты зачастую сложно обобщить даже с помощью метаанализа. Включенные в исследования выборки различаются по этнической принадлежности, полу, возрасту и основным заболеваниям, тогда как результат сильно зависит от структуры выборки или скрытого родства. Имеющиеся в настоящее время данные позволяют полагать, что полиморфизм TGFB1 может определять предрасположенность к развитию отторжения, фиброза и дисфункции трансплантата у реципиентов солидных органов, однако не дают возможности сделать однозначное заключение и требуют дальнейших, более масштабных исследований.

*Ключевые слова: однонуклеотидный полиморфизм, отторжение, фиброз трансплантата, дисфункции трансплантата.*

## THE ROLE OF TGF- $\beta 1$ GENE POLYMORPHISMS IN THE DEVELOPMENT OF POST-TRANSPLANT COMPLICATIONS

*R.M. Kurabekova<sup>1</sup>, O.E. Gichkun<sup>1, 2</sup>, S.V. Meshcheryakov<sup>1</sup>, O.P. Shevchenko<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta 1$ ) is an immunosuppressive and profibrogenic cytokine capable of influencing the development of graft rejection and graft fibrosis in solid organ recipients. The TGF- $\beta$  gene has a significant polymorphism that may cause individual protein expression levels and be associated with post-organ transplant complications. It is believed that three TGFB1 polymorphic variants (rs1800469, rs1800470 and rs1800471) may be associated with the development of graft rejection, graft fibrosis and chronic dysfunction of a heart, liver or kidney transplant. A review of current literature presents the results of studies on the relationship between TGF- $\beta 1$  gene polymorphisms and post-transplant complications in solid organ recipients. The findings of various studies of TGF- $\beta 1$  gene polymorphism in solid organ recipients are not always unambiguous, and their

**Для корреспонденции:** Шевченко Ольга Павловна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru

**Corresponding author:** Olga Shevchenko. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru

results are often difficult to generalize even with the help of meta-analysis. Samples included in studies vary in terms of ethnicity, gender, age, and underlying medical conditions, while results are highly dependent on sample structure or latent relatedness. Currently available data suggest that TGFB1 polymorphism may determine a predisposition to the development of graft rejection, graft fibrosis and graft dysfunction in solid organ recipients, but this is not conclusive and requires further, larger studies.

*Keywords: single-nucleotide polymorphism, graft rejection, graft fibrosis, graft dysfunction.*

Трансплантация жизненно важных органов является единственным эффективным методом лечения пациентов с терминальной стадией хронических заболеваний, приводящих к органной недостаточности/необратимой утрате их функций, и позволяющим достичь длительного выживания и реабилитации. Период после трансплантации может сопровождаться развитием таких осложнений, как отторжение, фиброз и дисфункция трансплантата, предупреждение которых является актуальной задачей трансплантологии [1].

Роль главного комплекса гистосовместимости (ГКГ) в возникновении острого и хронического отторжения после трансплантации солидных органов хорошо изучена, однако, кроме системы ГКГ, на развитие посттрансплантационных осложнений могут влиять и другие факторы. К настоящему времени известен широкий спектр цитокинов, включающий интерлейкины, интерфероны, различные факторы роста, а также их рецепторы, являющиеся важными регуляторами иммунного ответа после трансплантации органов [2].

В отдаленном периоде у пациентов с трансплантированными органами могут развиваться осложнения, в том числе фиброз трансплантата, что может приводить к структурному и функциональному ремоделированию органа и к его последующей дисфункции. Развитию фибротических изменений в трансплантированном органе способствуют острое и хроническое отторжение трансплантата, артериальная гипертензия, метаболический синдром, сахарный диабет, нарушение функции почек и др. [3, 4].

Для верификации патологии трансплантированных органов используют главным образом биопсию, выполнение которой сопряжено со всеми рисками инвазивных вмешательств. Поиск новых молекулярно-генетических маркеров и разработка на их основе малоинвазивных методов выявления осложнений в посттрансплантационном периоде представляется приоритетной задачей, занимающей существенное место в концепции персонализированной медицины.

Трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), цитокин, важный компонент иммунной системы, обладающий иммуносупрессивным и профиброгенным действием, может оказывать значительное влияние на развитие отторжения, фиброз трансплантата и инфекционные процессы после трансплантации органов [5–8].

Как показывают исследования различных авторов, в том числе работы нашей лаборатории, уровень цитокина коррелирует с функцией трансплантата печени и может иметь прогностическое и диагностическое значение [9–12]. Содержание TGF- $\beta 1$  в крови и тканях реципиента может зависеть от различных факторов – клинических, фармакологических, в том числе и генетических.

В настоящее время известно, что ген TGFB1 обладает значительным генетическим полиморфизмом, который может служить причиной индивидуального уровня экспрессии белка и быть связан с различными заболеваниями [13–17] и осложнениями после трансплантации органов [16, 18–22].

Цитокин TGF- $\beta 1$  кодируется геном TGFB1, имеет порядковый номер 190180 в генетической базе данных Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), ген расположен на длинном плече хромосомы 19 в локусе 19q13.2, состоит из 7 экзонов и 6 интронов общей длиной около 23 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). Размер регуляторной части гена составляет около 3 т. п. н. и находится в положении –2665 до +423 в 1 экзоне (+1 – это сайт начала трансляции) [23]. В настоящее время в гене TGFB1 выявлено восемь потенциально значимых однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП, англ. SNP, single nucleotide polymorphism) и один делеционный/инсерционный полиморфизм (зарегистрированы в генетических базах данных под номерами rs2317130, rs11466313, rs1800468, rs1800469, rs11466314, rs1800470, rs1800471 и rs11466316), которые влияют на экспрессию TGF- $\beta 1$  и регулируют его транскрипцию [24]. Все исследуемые замены одиночных нуклеотидов связаны с характеристикой иммунного статуса человека и входят в список рекомендованных XXV Международным совещанием по гистосовместимости и иммуногенетике в Бразилии в 2008 г. для изучения в клинико-диагностических целях.

Исследования генетического полиморфизма гена TGFB1 при трансплантации солидных органов проведены главным образом у реципиентов почки и печени [25–28] и значительно меньше – у реципиентов сердца, что обусловлено числом проводимых трансплантаций сердца [29–31]. Как правило, исследуемые исходы включали острое и хроническое отторжение, среднесрочную функцию трансплантата, концентрации такролимуса, впервые возникший диабет после трансплантации, развитие фиброза трансплантата, а также частоту инфекционных заболеваний.

Наибольший интерес исследователей в области трансплантации солидных органов вызывают 3 полиморфных варианта в гене TGFB1: rs1800469, представляющий собой замену цитозина на тимин С(–509)Т в промоторной области, локализованный в экзоне 1 в кодоне 10 (Т+869С) rs1800470, приводящий к замене лейцина на пролин, и rs1800471 в кодоне 25 (С+915G), приводящий к замене аргинина на пролин в белковом продукте. Предположительно указанные ОНП могут приводить к различному уровню продукции TGF-β1 и могут быть ассоциированы с развитием отторжения, фиброза и хронической дисфункции трансплантата [20, 27, 30].

У реципиентов сердца исследованы главным образом два полиморфизма в гене TGFB1: rs1800470 и rs1800471. В ряде исследований была обнаружена связь между rs1800471 и острым клеточным отторжением и/или развитием ИБС после трансплантации сердца [32–34]. Однако в других работах не удалось выявить достоверной связи между острым клеточным отторжением и rs1800471 [35, 36], также не обнаружено связи этого полиморфизма с хроническим отторжением [37]. Данные о связи rs1800471 с функцией почек после трансплантации также противоречивы [38, 39]. Для полиморфизма rs1800470 показано, что он может быть связан с ускоренным развитием ИБС [37] и нарушением функции почек после трансплантации сердца [40].

Анализ связи полиморфизма гена TGFB1 у реципиентов печени показал предрасположенность определенного генотипа к развитию фиброза печени и почечной недостаточности после трансплантации [41, 42]. В работе D. Eurich et al. [42] у 192 реципиентов печени исследованы 2 типа полиморфизма и их связь с развитием фиброза печени и показано, что замена на С аллель в кодоне 25 была связана с фиброзом печени. С другой стороны, в исследовании Н. Xie et al. [26] не удалось обнаружить связи полиморфизма TGFB1 с острым отторжением или рецидивами заражения вирусом гепатита В у реципиентов печени.

Результаты и выводы различных исследований генетического полиморфизма TGFB1 у реципиентов солидных органов не всегда однозначны, что может быть связано с недостаточным количеством изучаемых случаев, этнической неоднородностью выборки, а также с различиями в определении исследуемых фенотипов и применением различных методов анализа. Для обобщения разнородных исследований часто используют метаанализ и систематические обзоры, которые проводятся в соответствии с определенными стандартами и позволяют, как полагают, привести к общему знаменателю разобщенные данные [18, 28, 43].

Например, метаанализ 18 исследований, посвященных поиску связи полиморфизма в гене цитокина

TGF-β1 в позициях +869Т/С и +915G/С с развитием острого отторжения у реципиентов почки, показал, что эти факторы не связаны между собой [28].

Метаанализ 23 исследований случай–контроль, суммарно объединивший 795 случая острого отторжения почки и 1562 контрольных случая без отторжения, также не показал значимой связи между полиморфизмом кодона 10 TGF-β1 (rs1982073) и повышенным риском развития острого отторжения почки в общей популяции [44]. Более того, стратифицированный анализ не выявил значимой связи между полиморфизмом TGF-β1 и риском острого отторжения в зависимости от этнической принадлежности реципиента и донора. Исследователи сделали вывод, что полиморфизм TGF-β1 rs1982073 достоверно не связан с повышенным риском отторжения, однако авторы заключают, что для дальнейшей проверки результатов необходимы исследования с большим количеством субъектов разных этнических групп.

Приведенные выше примеры показывают, что результаты разнородных исследований сложно обобщить даже с помощью метаанализа. Включенные в исследования выборки различаются по этнической принадлежности, полу, возрасту и основным заболеваниям, тогда как получаемые данные могут сильно зависеть от структуры выборки или скрытого родства. Возможно, что более крупные исследования, включающие генетические вариации в масштабе всего генома, позволят обнаружить новые локусы и подтвердить известные генетические вариации, связанные с исходами после трансплантации органов.

Важными преимуществами генной диагностики перед другими лабораторными методами анализа являются независимость от физиологического состояния, неизменность и однократность выполнения теста. Результаты такого исследования дают информацию о слабых сторонах пациента и позволяют проводить прицельную профилактику заболеваний, подбирая лекарственные препараты в соответствии с индивидуальными особенностями организма больного. В то же время такие сложные состояния, как острое и хроническое отторжение или дисфункция пересаженного органа, могут находиться под влиянием множества генетических полиморфизмов, которые индивидуально вносят лишь небольшую долю в общий риск и значение которых сложно оценить при анализе небольших групп. В развитии этих состояний участвуют различные патогенетические пути, и во многих случаях неясно, какие именно процессы задействованы или насколько важен конкретный путь. Поэтому исследования генов-кандидатов, основанные на предварительных знаниях функции гена, не всегда приводят к идентификации генетических вариантов, связанных с клиническими результатами трансплантации органов.

Анализ устойчивых сочетаний нескольких полиморфизмов, составляющих гаплотип (кластер аллелей, наследуемый вместе), может быть более информативным, чем единичные полиморфизмы, и поможет выявить генетическую основу предрасположенности к ассоциированным с геном заболеваниям [24]. Для гена TGFB1 предполагается наличие совместного носительства нескольких полиморфизмов, что может приводить к кумулятивной ассоциации, которая определяется однонаправленным изменением уровня белка [45]. Однако изучение более одного полиморфизма требует проведения многофакторного анализа значительной выборки, иначе исследование может приводить к ложноположительным результатам.

Уровень TGF- $\beta$ 1 может определяться не только полиморфизмом отдельного гена, но и генетическими вариантами других факторов, включенных в клеточные пути цитокина, таких как связывающие белки и его рецепторы. Например, показано, что у пациентов после трансплантации печени риск развития гепатита С связан с частотой встречаемости однонуклеотидного полиморфизма rs868 в гене рецептора цитокина TGF- $\beta$  TGFB1, который находится в нетранслируемой области гена [46].

Клиническое значение может также иметь взаимодействие различных генов. Так, у пациентов с диабетом первого типа, являющимся многофакторным аутоиммунным заболеванием, где важно взаимодействие и полиморфизм генов HLA и инсулина, также обнаружена взаимосвязь генов HLA и различных цитокинов, в частности, TGF- $\beta$ 1 [47].

Кроме того, предрасположенность к различным полигенным заболеваниям может зависеть от этнического происхождения индивида, что вызывает необходимость проведения исследований в генетически гомогенных группах. Следует отметить, что в настоящее время исследований роли полиморфизма генов вне системы ГКГ в развитии посттрансплантационных осложнений у реципиентов солидных органов в российской популяции практически нет.

Наиболее подходящим дизайном исследования полигенных заболеваний считают полногеномные ассоциативные исследования (англ. Genome-wide association study, GWAS), включающие миллионы генетических вариантов. Важно, что в таких исследованиях используется агностический подход, означающий отсутствие предвзятости, в отличие от исследований генов-кандидатов, основанных на предварительных знаниях функции гена. Полногеномные исследования нуждаются в больших размерах выборки, которая необходима для обеспечения статистической мощности и значимости результата, но ограничена количеством выполняемых трансплантаций [29]. Для решения проблемы создана международная сеть генетических и трансляционных исследований в области трансплантации (www.

igenetrain.org), которая в настоящее время проводит около 30 исследований по геномике. Полногеномные исследования в трансплантологии направлены на улучшение результатов трансплантации путем более точного дозирования и индивидуального подбора иммуносупрессивных препаратов и/или возможной стратификации риска неблагоприятных исходов после трансплантации органов. Было показано, что использование в прогностических моделях данных генетического типирования полиморфизмов реципиента и донора может повышать точность расчета риска развития фиброза трансплантата после трансплантации печени [48].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют полагать, что при трансплантации органов величина уровня TGF- $\beta$ 1 в крови может быть обусловлена генетически и может определять предрасположенность к развитию фиброза, дисфункции трансплантата и инфекционных заболеваний у реципиентов солидных органов. Однако имеющиеся в настоящее время данные о роли полиморфизма TGFB1 в развитии посттрансплантационных осложнений не позволяют сделать однозначного заключения и требуют дальнейших, более масштабных исследований [18, 42].

Выяснение роли полиморфизма генов, кодирующих активность про- и противовоспалительных цитокинов, в том числе и TGF- $\beta$ , в патогенезе посттрансплантационных осложнений является важной задачей, решение которой позволит, с одной стороны, прогнозировать риск развития патологии или тяжесть ее течения, а с другой – индивидуально подбирать специфическую терапию для конкретного пациента.

*Исследование проведено при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-2598-2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Гомье СВ.* Трансплантология: итоги и перспективы. Том VI. 2014 год. М.–Тверь: Триада, 2015. 448 с. Gauthier SV. Transplantologiya: itogi i perspektivy. Tom VI. 2014 god. M.–Tver: Triada, 2015. 448. (in Rus.).
2. *Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R et al.* Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138 (4): 984–1010. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.033.

3. Park S, Nguyen NB, Pezhouman A, Ardehali R. Cardiac fibrosis: potential therapeutic targets. *Transl Res.* 2019; 209: 121–137. doi: 10.1016/j.trsl.2019.03.001.
4. Hughes A, Okasha O, Farzaneh-Far A, Kazmirczak F, Nijjar PS, Velangi P et al. Myocardial Fibrosis and Prognosis in Heart Transplant Recipients. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2019; 12 (10): e009060. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.119.009060.
5. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342 (18): 1350–1358. doi: 10.1056/NEJM200005043421807.
6. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008; 214 (2): 199–210. doi: 10.1002/path.2277.
7. Dudek K, Koziak K, Placha G, Kornasiewicz O, Zieniewicz K, Zurakowski J et al. Early expression of hepatocyte growth factor, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 and -beta2 in symptomatic infection in patients who have undergone liver transplantation. *Transplant Proc.* 2009; 41 (1): 240–245. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.10.021.
8. Zhang Y, Wang YL, Liu YW, Li Q, Yuan YH, Niu WY et al. Change of peripheral blood mononuclear cells IFN-gamma, IL-10, and TGF-beta1 mRNA expression levels with active human cytomegalovirus infection in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc.* 2009; 41 (5): 1767–1769. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.03.064.
9. Briem-Richter A, Leuschner A, Krieger T, Grabhorn E, Fischer L, Nashan B et al. Peripheral blood biomarkers for the characterization of alloimmune reactivity after pediatric liver transplantation. *Pediatr Transplant.* 2013; 17 (8): 757–764. doi: 10.1111/ptr.12161.
10. Hussein MH, Hashimoto T, AbdEl-Hamid Daoud G, Kato T, Hibi M, Tomishige H et al. Pediatric patients receiving ABO-incompatible living related liver transplantation exhibit higher serum transforming growth factor-beta1, interferon-gamma and interleukin-2 levels. *Pediatr Surg Int.* 2011; 27 (3): 263–268. doi: 10.1007/s00383-010-2784-1.
11. Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP, Mc Morrow T. Tacrolimus Modulates TGF-beta Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin Med.* 2016; 5 (5). doi: 10.3390/jcm5050050.
12. Kurabekova R, Tsirolnikova O, Pashkova I, Gichkun O, Mozheyko N, Gautier S et al. Transforming growth factor beta 1 levels in the blood of pediatric liver recipients: Clinical and biochemical correlations. *Pediatr Transplant.* 2020; 20 (10): e13693. doi: 1111/ptr.
13. Dhaouadi T, Sfar I, Bardi R, Jendoubi-Ayed S, Abdallah TB, Ayed K et al. Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2013; 45 (6): 2152–2157. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.12.006.
14. Javor J, Ferencik S, Bucova M, Stuchlikova M, Martinaka E, Barak L et al. Polymorphisms in the genes encoding TGF-beta1, TNF-alpha, and IL-6 show association with type 1 diabetes mellitus in the Slovak population. *Arch Immunol Ther Exp.* 2010; 58 (5): 385–393. doi: 10.1007/s00005-010-0092-z.
15. Kim YH, Kim TH, Kang SW, Kim HJ, Park SJ, Jeong KH et al. Association between a TGFBR2 gene polymorphism (rs2228048, Asn389Asn) and acute rejection in Korean kidney transplantation recipients. *Immunol Invest.* 2013; 42 (4): 285–295. doi: 10.3109/08820139.2013.777073.
16. Mu HJ, Xie P, Chen JY, Gao F, Zou J, Zhang J et al. Association of TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6 And IFN-gamma Gene Polymorphism with Acute Rejection and Infection in Lung Transplant Recipients. *Clin Transplant.* 2014; 28 (9): 1016–1024. doi: 1111/ctr.
17. Paladino N, Flores AC, Fainboim H, Schroder T, Cuarterolo M, Lezama C et al. The most severe forms of type I autoimmune hepatitis are associated with genetically determined levels of TGF-beta1. *Clin Immunol.* 2010; 134 (3): 305–312. doi: 10.1016/j.clim.2009.11.004.
18. Liu K, Liu X, Gu S, Sun Q, Wang Y, Meng J et al. Association between TGFB1 genetic polymorphisms and chronic allograft dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2017; 8 (37): 62463–62469. doi: 10.18632/oncotarget.19516.
19. Berro M, Palau Nagore MV, Rivas MM, Longo P, Foncuberta C, Vitriu A et al. Transforming growth factor-beta1 functional polymorphisms in myeloablative sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2017; 52 (5): 739–744. doi: 10.1038/bmt.2016.355.
20. Arrieta-Bolanos E, Mayor NP, Marsh SG, Madrigal JA, Apperley JF, Kirkland K et al. Polymorphism in TGFB1 is associated with worse non-relapse mortality and overall survival after stem cell transplantation with unrelated donors. *Haematologica.* 2016; 101 (3): 382–390. doi: 10.3324/haematol.2015.134999.
21. Seyhun Y, Ciftci HS, Kekik C, Karadeniz MS, Tefik T, Nane I et al. Genetic association of interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, transforming growth factor-beta, tumour necrosis factor-alpha and blood concentrations of calcineurin inhibitors in Turkish renal transplant patients. *Int J Immunogenet.* 2015; 42 (3): 147–160. doi: 10.1111/iji.12192.
22. Arrieta-Bolanos E, Madrigal JA, Shaw BE. Novel alleles of the transforming growth factor beta-1 regulatory region and exon 1. *Tissue Antigens.* 2015; 85 (6): 484–491. doi: 10.1111/tan.12555.
23. Shah R, Selby ST, Yokley B, Slack RS, Hurley CK, Posch PE. TNF, LTA and TGFB1 genotype distributions among acute graft-vs-host disease subsets after HLA-matched unrelated hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Tissue Antigens.* 2009; 74 (1): 50–56. doi: 10.1111/j.1399-0039.2009.01257.x.
24. Martelossi Cebinelli GC, Paiva Trugilo K, Badaró Garcia S, Brajão de Oliveira K. TGF-β1 functional polymorphisms: a review. *Eur Cytokine Netw.* 2016; 27 (4): 81–89.
25. Nikolova PN, Ivanova MI, Mihailova SM, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Simeonov PL et al. Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation – impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome. *Transpl Immunol.* 2008; 18 (4): 344–348.
26. Xie HY, Wang WL, Yao MY, Yu SF, Feng XN, Jin J et al. Polymorphisms in cytokine genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis B in Chinese liver transplant recipients. *Arch Med Res.* 2008; 39 (4): 420–428. doi: 10.1016/j.arcmed.2008.01.003.

27. Zhang XX, Bian RJ, Wang J, Zhang QY. Relationship between cytokine gene polymorphisms and acute rejection following liver transplantation. *Genet Mol Res*. 2016; 15 (2): 15027599. doi: 10.4238/gmr.
28. Li HY, Zhou T, Lin S, Lin W. Relationship between TGF- $\beta$ 1 +869T/C and +915G/C gene polymorphism and risk of acute rejection in renal transplantation recipients. *BMC Med Genet*. 2019; 20 (1): 019–0847. doi: 10.1186/s12881-2.
29. van Setten J, Warmerdam EG, Groot OQ, de Jonge N, Keating B, Asselbergs FW. Non-HLA Genetic Factors and Their Influence on Heart Transplant Outcomes: A Systematic Review. *Transplant Direct*. 2019; 5 (2): e422. doi: 10.1097/TXD.0000000000000859.
30. Benza RL, Coffey CS, Pekarek DM, Barchue JP, Tal-laj JA, Passineau MJ et al. Transforming growth factor-beta polymorphisms and cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*. 2009; 28 (10): 1057–1062. doi: 10.1016/j.healun.2009.06.001.
31. Ge YZ, Wu R, Lu TZ, Jia RP, Li MH, Gao XF et al. Combined effects of TGFB1 +869T/C and +915G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014; 9 (4): e93938. doi: 10.1371/journal.pone.0093938.
32. Di Filippo S, Zeevi A, McDade KK, Bastien O, Webber SA. Impact of TGFbeta1 gene polymorphisms on acute and chronic rejection in pediatric heart transplant allografts. *Transplantation*. 2006; 81 (6): 934–939.
33. Densem CG, Hutchinson IV, Cooper A, Yonan N, Brooks NH. Polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene correlates with the development of coronary vasculopathy following cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (6): 551–556. doi: 10.1016/s1053-2498(00)00114-5.
34. Aziz T, Hasleton P, Hann AW, Yonan N, Deiraniya A, Hutchinson IV. Transforming growth factor beta in relation to cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 119 (4 Pt 1): 700–708. doi: 10.1016/s0022-5223(00)70004-3.
35. Bijlsma FJ, van der Horst AA, Tilanus MG, Rozemuller E, de Jonge N, Gmelig-Meyling FH et al. No association between transforming growth factor beta gene polymorphism and acute allograft rejection after cardiac transplantation. *Transpl Immunol*. 2002; 10 (1): 43–47. doi: 10.1016/s0966-3274(02)00021-7.
36. Webber SA, Boyle GJ, Gribar S, Law Y, Bowman P, Miller SA et al. Polymorphisms in cytokine genes do not predict progression to end-stage heart failure in children. *Cardiol Young*. 2002; 12 (5): 461–464.
37. Holweg CT, Baan CC, Balk AH, Niesters HG, Maat AP, Mulder PM et al. The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transplantation*. 2001; 71 (10): 1463–1467. doi: 10.1097/00007890-200105270-00018.
38. Tambur AR, Pamboukian S, Costanzo MR, Heroux A. Genetic polymorphism in platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor are significantly associated with cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant*. 2006; 25 (6): 690–698. doi: 10.1016/j.healun.2006.02.006.
39. Van de Wetering J, Weimar CH, Balk AH, Roodnat JJ, Holweg CT, Baan CC et al. The impact of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism on end-stage renal failure after heart transplantation. *Transplantation*. 2006; 82 (12): 1744–1748. doi: 10.1097/01.tp.0000250360.78553.5e.
40. Baan CC, Balk AH, Holweg CT, van Riemsdijk IC, Maat LP, Vantrimont PJ et al. Renal failure after clinical heart transplantation is associated with the TGF-beta 1 codon 10 gene polymorphism. *J Heart Lung Transplant*. 2000; 19 (9): 866–872. doi: 10.1016/s1053-2498(00)00155-8.
41. Eurich D, Neumann UP, Boas-Knoop S, Neuhaus R, Bahra M, Neuhaus P et al. Transforming growth factor-beta1-gene polymorphism in the development of kidney disease after liver transplantation. *Transplantation*. 2012; 93 (5): 555–560. doi: 10.1097/TP.0b013e318242be0b.
42. Eurich D, Bahra M, Boas-Knoop S, Lock JF, Golembus J, Neuhaus R et al. Transforming growth factor beta1 polymorphisms and progression of graft fibrosis after liver transplantation for hepatitis C virus – induced liver disease. *Liver Transpl*. 2011; 17 (3): 279–288. doi: 10.1002/lt.22190.
43. Wang K, Wang Z, Si S, Liu X, Han Z, Tao J et al. Lack of Association Between TGF-beta1 and MDR1 Genetic Polymorphisms and Cyclosporine-Induced Gingival Overgrowth in Kidney Transplant Recipients: A Meta-analysis. *Transplant Proc*. 2017; 49 (6): 1336–1343. doi: 10.1016/j.transproceed.2017.01.080.
44. Najafi F, Dastgheib SA, Jafari-Nedooshan J, Moghimi M, Heiranizadeh N, Zare M et al. Association of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 rs1982073 Polymorphism with Susceptibility to Acute Renal Rejection: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Urol J*. 2020; 18 (1): 1–10. doi: 10.22037/uj.v0i0.5437.
45. Барсова Р, Титов Б, Матвеева Н, Фаворов А, Рыбалкин И, Власик Т и др. Участие гена TGFB1 в формировании предрасположенности к инфаркту миокарда. *Acta Naturae (русскоязычная версия)*. 2012; 4 (2): 76–82. Barsova R, Titov B, Matveeva N, Favorov A, Rybalkin I, Vlasik T et al. Participation of the TGFB1 gene in the formation of a predisposition to myocardial infarction. *Acta Naturae*. 2012; 4 (2): 76–82. (in Rus.).
46. Niel O, Bastard P. Artificial intelligence improves estimation of tacrolimus area under the concentration over time curve in renal transplant recipients. *Transpl Int*. 2018; 31 (8): 940–941. doi: 10.1111/tri.13271.
47. Kumar R, Goswami R, Agarwal S, Israni N, Singh SK, Rani R. Association and interaction of the TNF-alpha gene with other pro- and anti-inflammatory cytokine genes and HLA genes in patients with type 1 diabetes from North India. *Tissue Antigens*. 2007; 69 (6): 557–567. doi: 10.1111/j.1399-0039.2007.00817.x.
48. Wang C, Zhang X, Ling Q, Zheng S, Xu X. A model integrating donor gene polymorphisms predicts fibrosis after liver transplantation. *Aging*. 2020; 13 (1): 1264–1275. doi: 10.18632/aging.202302.

Статья поступила в редакцию 30.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 30.06.2021

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-186-191

## ЛИМФООБРАЩЕНИЕ И СЕРДЕЧНАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ

*Г.П. Иткин<sup>1, 2</sup>, М.Г. Иткин<sup>3</sup>*<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация<sup>3</sup> Университет штата Пенсильвания, Филадельфия, США

Цель работы: обобщить современные знания о взаимодействиях между лимфатической, сердечно-сосудистой системами и интерстициальной тканью, которые связаны с сердечной недостаточностью (СН). Авторы в настоящей статье пытаются ответить на фундаментальный вопрос, являются ли аномалии лимфатической системы (ЛС) причиной или следствием СН. Понимание процессов лимфообразования в условиях СН позволит найти новые пути лечения СН.

*Ключевые слова:* лимфатическая система, сердечная недостаточность, уравнение Старлинга, интерстициальная жидкость, лимфа, лимфодренаж.

## LYMPHATIC CIRCULATION AND HEART FAILURE

*G.P. Itkin<sup>1, 2</sup>, M.G. Itkin<sup>3</sup>*<sup>1</sup> Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation<sup>2</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation<sup>3</sup> Pensilvenia State University, Philadelphia PN, USA

Objective: to summarize current knowledge about the interactions between the lymphatic/cardiovascular systems and interstitial tissue, which are associated with heart failure (HF). The authors attempt to answer the fundamental question of whether lymphatic insufficiency is a cause or consequence of HF. Understanding lymph formation processes in HF will allow finding new ways of treating HF.

*Keywords:* lymphatic system, heart failure, Starling equation, interstitial fluid, lymph, lymphatic drainage.

### ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных физиологических функций организма является метаболизм воды для поддержания жидкостного гомеостаза. В этом процессе участвуют три типа жидкостей: кровь (плазма), интерстициальная жидкость и лимфа. Сложные механизмы движения молекул воды между этими компартментами имеют конечные цели доставки питательных веществ и кислорода во все клетки организма и выведения токсичных продуктов обмена обратно через почки, легкие и печень.

Сердечно-сосудистая система (ССС) снабжает кровью все органы и ткани, где путем конвекции, ультрафильтрации или диффузии вода, питательные вещества и кислород достигают клеток через эндотелиальную стенку капилляров в интерстициальное

пространство (ИП). Из ИП жидкость возвращается обратно через лимфатическую систему (ЛС) в систему кровообращения. Эти системы, регулирующие обмен воды между кровью, интерстицием и лимфой, работают совместно для поддержания гомеостаза организма. При этом каждая система имеет определенную буферную емкость, и сбой одной из них влияет на относительный баланс жидкости между отделами.

Из трех типов жидкости больше всего известно о крови и кровеносной системе, поскольку сердце и крупные сосуды достаточно легко визуализируются и подробно изучены. Напротив, ЛС и процессы образования интерстициальной жидкости (ИЖ) оказались гораздо менее исследованы, и поэтому ее роль в развитии признаков, симптомов и дисфункции органов при сердечной недостаточности (СН)

**Для корреспонденции:** Иткин Георгий Пинкусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел (916) 129-78-33. E-mail: georgeitkin@mail.ru.

**Corresponding author:** Georgiy Itkin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (916) 129-78-33. E-mail: georgeitkin@mail.ru

можно рассматривать как неспособность ЛС адекватно компенсировать увеличение потока жидкости из кровеносной системы в ИП. В данной статье приводятся современные данные об образовании лимфы и механизмах, с помощью которых лимфа возвращается в систему кровообращения, и рассматриваются последствия неадекватности лимфатического тока (ЛТ). Будут рассмотрены методы дренажа лимфы в качестве эффективного терапевтического средства при рефрактерной СН для уменьшения отечных явлений.

Развитие новой технологии визуализации ЛС позволит расширить наши представления о взаимодействии системы кровообращения и ЛС в условиях СН и приступить к разработке новых методов нормализации лимфатического тока (ЛТ) в венозную систему.

## ОБРАЗОВАНИЕ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

В 1894–1896 гг. Е. Старлинг [1, 2] на основании проведенных им экспериментов на изолированной задней конечности собаки обнаружил, что физиологический раствор, введенный в интерстициальную ткань, всасывается в кровоток. На основании этого он сделал вывод, что гидростатическое давление отвечает за **фильтрацию** жидкости, а онкотическое давление отвечает за **реабсорбцию** жидкости и что существует баланс между гидростатическими и осмотическими давлениями в капиллярах и окружающей ткани, которые определяют процессы фильтрации и реабсорбции между капиллярами и тканью.

На основании этого он предложил классическую модель, описывающую процесс фильтрации и реабсорбции жидкости в капиллярах как процесс взаимодействия гидростатического и осмотического

давления по обе стороны капилляров, который он выразил через уравнение, получившее впоследствии название «уравнение Старлинга» (1).

$$J_v = L_p S [(P_c - P_i) - \sigma (\pi_r - \pi_i)], \quad (1)$$

где  $J_v$  – транспорт транкапиллярной жидкости;  $L_p$  – гидравлическая проводимость капиллярной стенки;  $S$  – площадь поверхности капилляра, на которой происходит обмен жидкостей;  $P_c$  – гидростатическое давление крови в капилляре;  $P_i$  – гидростатическое давление в интерстици;  $\sigma$  – коэффициент отражения, который отражает проницаемость для белков в капиллярах;  $\pi_r$  – капиллярное коллоидное осмотическое давление;  $\pi_i$  – интерстициальное коллоидное осмотическое давление.

Когда величина  $J_v$  положительна (т. е. когда разность гидростатического давления превышает разность осмотических давлений), происходит процесс **фильтрации** жидкости из капилляров в ИП. Когда же величина  $J_v$  отрицательна, жидкость переходит из ИП обратно в капилляры – процесс **реабсорбции**.

В соответствии с этим Е. Старлинг утверждал, что разность гидравлического давления в артериальной стороне капилляров и осмотического давления в тканях определяет фильтрацию жидкости из капилляров в ИП, а обратная реабсорбция жидкости из ИП происходит в венозной стороне капилляров.

На рис. 1 приведена схема, иллюстрирующая гипотезу Старлинга. На артериальном конце капилляра гидростатическое давление в капилляре превышает онкотическое давление в плазме, в результате чего происходит **фильтрация** жидкости из сосуда в ткани.

На венозном конце капилляра гидростатическое давление падает, онкотическое давление в плазме оказывается выше гидростатического, и в результате

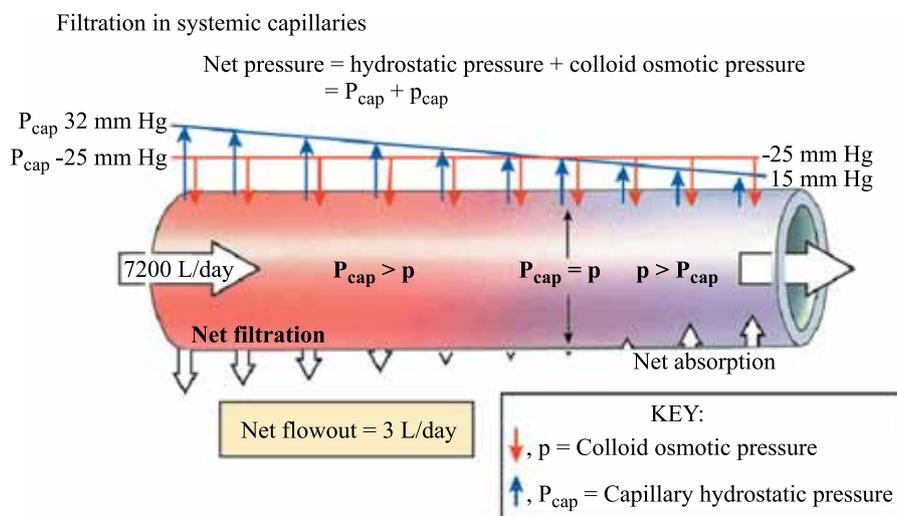


Рис. 1. Движение жидкости по Старлингу

Fig. 1. Fluid movement according to Starling's law

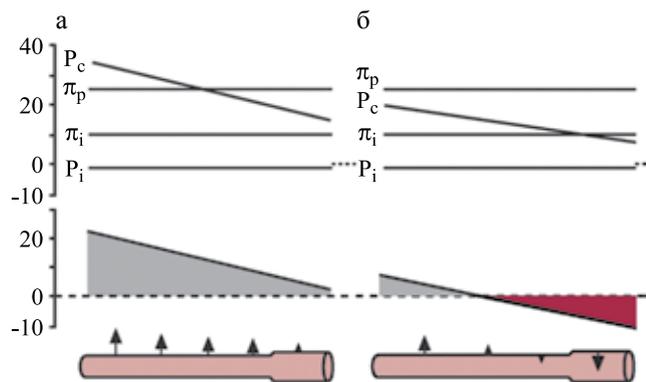


Рис. 2. Фильтрация жидкости в капилляре: а – новая концепция; б – концепция фильтрации/адсорбции жидкости в капилляре по Старлингу

Fig. 2. Liquid filtration in the capillary: а – new concept; б – filtration/adsorption concentration of liquid in the capillary according to Starling’s law

происходит обратное поступление жидкости (*реабсорбция*).

В другой работе Старлинг постулировал, что повышенное венозное давление (ВД) у пациентов с СН является результатом увеличения объема крови, скорее всего, из-за задержки почечной жидкости, а не только вследствие механического увеличения ВД при плохой функции сердца [3]. В этой же работе он предложил следующий механизм отека у пациентов с СН: «Кажется вероятным, что препятствие оттоку лимфы из грудного протока (ГП) в кровь, а также растяжение ГП из-за значительного увеличения лимфообразования в печени могут способствовать возникновению отеков в остальной части тела».

Работы Старлинга впоследствии стимулировали большое количество доклинических исследований, направленных на понимание механизмов образования лимфы и взаимодействия между кровью, интерстицием и лимфой.

Позднее, через 60 лет, А. Гайтон, измеряя внутреннее гидростатическое давление в имплантированной в ткань перфорированной капсуле, определил, что давление в ИП близко к атмосферному давлению [4] и в норме равно 2 мм рт. ст. [5, 6].

Интерстициальное онкотическое давление также измерялось в жидкости, накапливающейся в капсуле, и оказалось, что оно составляет 9–15 мм рт. ст., что намного выше, чем считалось ранее [7].

В норме гидростатическое давление на артериальной стороне капилляров составляет ~35 мм рт. ст., тогда как на венозной стороне капилляра ~15 мм рт. ст., что свидетельствует о положительном градиенте фильтрации из капилляра в ИП по всей длине капилляра. Поэтому был сделан важный вывод о том, что в норме венозная реабсорбция по всей длине капилляра отсутствует, хотя в отдельных видах па-

тологии, связанных, например, с падением артериального давления (АД) при гиповолемическом шоке, реабсорбция жидкости с венозной стороны капилляра возможна [8–10].

Таким образом, концепция Старлинга, просуществовавшая более 100 лет, была признана ошибочной, и последние открытия полностью изменили представление о механизме эвакуации интерстициальной жидкости, основанном на том, что в норме даже в состояниях венозного застоя весь интерстициальный ультрафильтрат полностью удаляется через капилляры в ИП и далее попадает исключительно в ЛС, т. е. венозная реадсорбция отсутствует (рис. 2).

При этом важно понимать, что «силы Старлинга», приводящие к образованию ИЖ, различаются в разных частях тела, что связано с различиями гидростатических давлений на уровне капилляров. Например, синусоидальное давление в печени составляет ~5 мм рт. ст., а капиллярное давление в мягких тканях ~35 мм рт. ст. Единственная переменная в уравнении Старлинга для всех органов и тканей – онкотическое давление плазмы в капилляре ( $\pi_p$ ), которое составляет ~24 мм рт. ст.

Поэтому для положительного баланса фильтрации из капилляров в ИП онкотическое давление в интерстиции ( $\pi_i$ ) также должно быть различным для разных органов. Кроме того, проницаемость эндотелия капилляров для белков ( $\sigma$ ) должна различаться, чтобы позволить регулировать поток белков из капилляров в ИП. Следовательно, состав и поток лимфы, которые отражают состав интерстициального ультрафильтрата, могут значительно отличаться в различных органах.

### ПРОЦЕСС УДАЛЕНИЯ ЖИДКОСТИ ИЗ ИП В ЛС

Отек тканей, одно из основных клинических проявлений СН, представляет собой скопление жидкости в интерстициальных тканях. При этом количество этой жидкости определяется балансом между капиллярной фильтрацией и оттоком лимфы в венозную систему (рис. 3).

При этом ЛС практически является единственным механизмом удаления и транспортировки ИЖ в системный кровоток. Как указано выше, капиллярная фильтрация определяется балансом гидростатического и онкотического давления (модифицированное уравнение Старлинга) и проницаемостью капилляров.

Гидростатическое интерстициальное давление в большинстве тканей ниже атмосферного давления [11], в то время как центральное венозное давление (ЦВД) приблизительно равно 5 мм рт. ст. и для транспорта лимфы требуются энергетически активные механизмы.

В настоящее время установлено, что движение лимфы в сосудах обеспечивается как внешними факторами (компрессией из окружающих тканей, перистальтикой кишечника, колебаниями давления внешнего дыхания, массажем, пульсацией кровеносных сосудов и др), так и внутренними факторами (сокращения лимфатических сосудов, стенки большинства которых содержат мышечный слой, имеющий общие биохимические и функциональные характеристики с сосудистыми и сердечными мышцами). Сегмент лимфатических сосудов между двумя клапанами, называемый лимфангиомом (рис. 4), сокращается подобно сердечной мышце [12].

Кроме того, важным механизмом для обеспечения однонаправленного потока лимфы являются лимфатические клапаны. При этом разность давлений, необходимая для закрытия лимфатического клапана, в значительной степени зависит от диаметра сосуда: менее 1 см вод. ст. при малом диаметре до нескольких см вод. ст., когда диаметр сосуда приближается к максимальному [13]. Таким образом, клапаны становятся менее эффективными в расширенных сосудах, что потенциально способствует обратному потоку лимфы, когда сосуды хронически расширены, например при СН [14, 15].

Показано, что в покое  $\frac{1}{3}$  лимфотока (ЛТ) в нижних конечностях человека определяется сжатием скелетных мышечных сокращений (внешний насос) и  $\frac{2}{3}$  активной перекачкой сети собирательных сосудов (внутренний насос). Активное сокращение лимфатических сосудов может создавать давление от 20 до 120 мм рт. ст. [16, 17].

При этом основным путем ЛТ является грудной поток (ГП), через который  $\frac{3}{4}$  всей лимфы (от нижних конечностей, стенок и органов таза, брюшной полости, левой половины грудной полости, левой верхней конечности, левой половины головы и шеи) перемещается в венозную систему (рис. 5).  $\frac{1}{4}$  ЛТ формируется в результате слияния правых бронхосредостенного, подключичного и яремного стволов и впадает в правую венозную систему [18].

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СН И ЛТ

Основным методом противоотечной терапии у пациентов с сердечной недостаточностью для поддержания эводемического состояния, несмотря на отсутствие высококачественных данных, демонстрирующих клиническую пользу в отношении сердечно-сосудистых исходов, являются петлевые диуретики. Однако при острой СН пациенты могут проявлять пониженную чувствительность к диуретикам, что часто называют резистентностью к диуретикам и связывают с более высоким риском повторной госпитализации и смерти [19, 20]. Особенности ЛТ при СН, с которым связывали патофизиологию отеков легких, стал предметом многих исследований, ко-

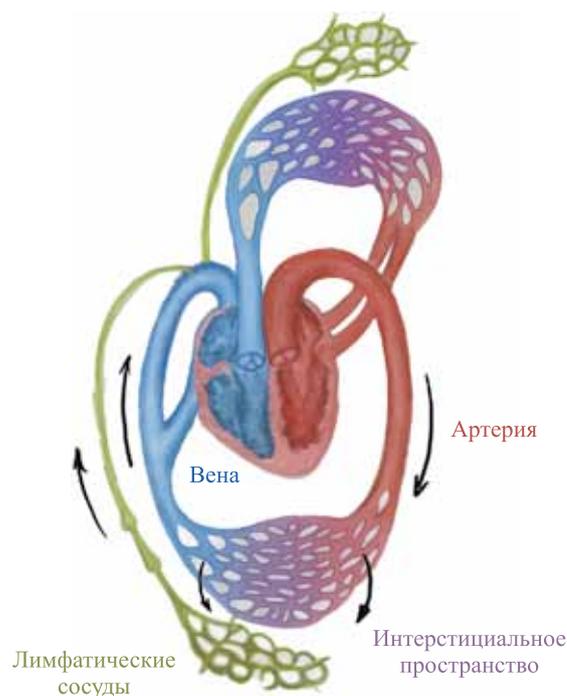


Рис. 3. Взаимодействие системы кровообращения и ЛС

Fig. 3. Interaction between the circulatory system and the lymphatic system

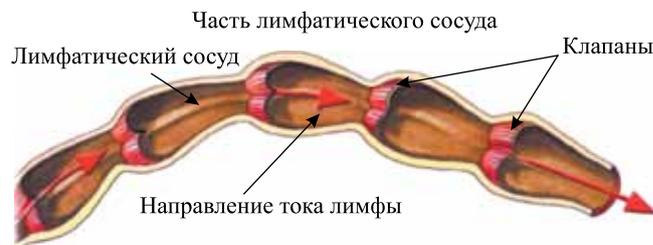


Рис. 4. Строение лимфатического сосуда

Fig. 4. Structure of the lymphatic vessel

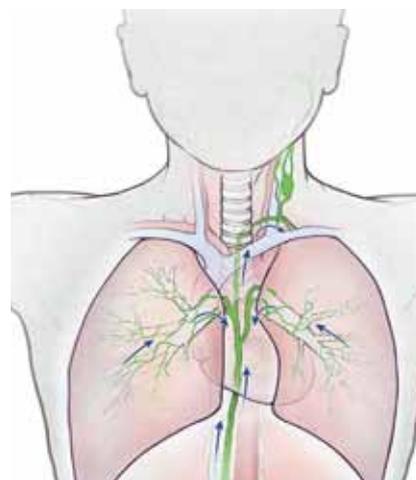


Рис. 5. Лимфоток из грудного потока в вену

Fig. 5. Lymph flow from the thoracic duct to the vein

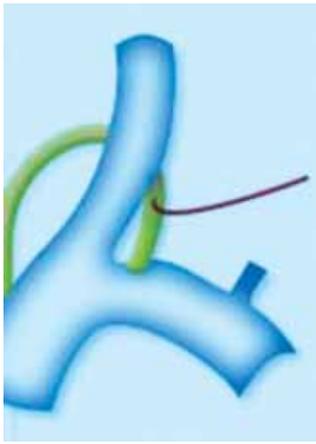


Рис. 6. Дренаж лимфы из ГП

Fig. 6. Lymph drainage from the thoracic duct

которые показали значительное увеличение ЛТ и давления в ГП, несмотря на повышение центрального венозного давления (ЦВД) в зоне выхода лимфы в венозное русло [21]. Данные исследования натолкнули нескольких исследователей на гипотезу о том, что декомпрессия ГП может быть одним из методов лечения СН. Allen et al. [22] показали, что наружный дренаж ГП у овец с повышенным давлением в левом предсердии снижает отек легких и плевральный выпот

Dumont et al., дренировали ГП у 5 пациентов с СН [23].

Первоначальный дренаж лимфы из ГП составлял 4–17 литров в сутки. При этом наблюдалось сразу значительное улучшение симптомов СН у всех пациентов, значительное снижение ЦВД и потеря веса.

В последующем исследовании Witte et al. [24] сообщили о внешнем дренаже ГП у 12 пациентов с ХСН (у четырех пациентов с компенсированной СН и у 42 здоровых пациентов; мочегонные средства отменялись в течение всего периода лимфодренажа.

При этом они показали, что ЛТ из ГП значительно повышался от ~1 мл/мин до ~8 мл/мин. Давление в ГП было повышено и коррелировало с повышенным ЦВД. Они отметили также, что симптомы СН улучшились в течение нескольких часов после начала дренажа ГП. В противоположность диуретическому лечению, которое часто вызывает ухудшение почечной функции, они продемонстрировали значительное улучшение почечной функции у четырех пациентов с олигурией. Данный эффект может быть потенциально объяснен декомпрессией почечной ЛС, что приводит к уменьшению почечной недостаточности и улучшению диуреза.

После этих наблюдений Clauss и Breed [25] сделали вывод о том, что контролируемый дренаж ГП может быть использован как терапия при ХСН и значительные терапевтические эффекты внешнего

дренажа, наблюдаемые в этих работах, могут быть объяснены просто удалением жидкости, аналогично эффектам диуреза.

V. Hraska [26] хирургическим путем анастомозировал ГП с левым предсердием – точкой самого низкого давления при операции Фонтэна у детей, которая сопровождается потерей белка и пластическим бронхитом вследствие лимфатического отека. Он сообщил о значительном улучшении симптомов у большинства этих пациентов, доказав тем самым, что такая «внутренняя декомпрессия» перегруженной ЛС может потенциально устранить симптомы отека ЛС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя за последние несколько десятилетий прогресс изучения механизмов СН был огромным, тем не менее все еще остается много вопросов в понимании патофизиологических механизмов симптомов пациентов, которые не могут быть объяснены только дисфункцией сердечной мышцы и реакцией сосудистой системы. На протяжении многих лет и до настоящего времени даже с учетом новых фундаментальных научных знаний о формировании ультрафильтрата и важного вклада ЛС в удаление жидкости из ткани эта область остается относительно малоисследованной в современной клинической медицине и роль ЛС при хронической СН все еще недостаточно определена.

Общее мнение основано на том, что отечные явления при СН надо рассматривать как неспособность ЛС удалить избыточное количество ИЖ. Остается недостаточно исследованным процесс значительного увеличения ЛТ при СН. Полагая доказанным, что единственным механизмом перемещения жидкости из системы кровообращения в ИП является фильтрация в капиллярах, возникает вопрос о значительном росте лимфотока при СН, который, с нашей точки зрения, может быть связан с увеличением количества функционирующих капилляров. Мы выдвигаем идею о том, что при СН скорость кровотока по капилляру уменьшается, что приводит к дефициту кислорода в дистальных концах капилляров и, соответственно, прилегающей к этим концам капилляров ткани. Естественной реакцией на это является открытие сфинктеров в данной зоне и включение в кровоток дополнительно функционирующих капилляров, и соответственно, это должно привести к увеличению фильтрационного потока в ИП.

Как показали многие исследования, в условиях СН увеличение производства лимфы не компенсируется оттоком лимфы в венозную систему, что приводит к отечным явлениям в органах и тканях. Поэтому одним из перспективных методов механической поддержки и оттока лимфы в венозную систему в условиях СН является локальное снижение повы-

шенного венозного давления в зоне выхода лимфы в венозную систему.

Относительно недавнее клиническое внедрение технологии визуализации ЛС на основе магнитно-резонансной лимфоангиографии служит основой для более углубленного анализа взаимодействия ЛС с системой в условиях СН [27–29].

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Starling EH. The Influence of Mechanical Factors on Lymph Production. *J Physiol*. 1894; 224–267.
2. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol*. 1896; 19 (4): 312–326.
3. Starling E. The Arris and Bale Lectures on Some points in the pathology of the heart disease. Lecture 2, the effect of the heart failure on the circulation. *Lancet*. 1897; 149 (3836): 652–655.
4. Guyton AC, Lindsey AW, Johnnie OH, John WW, Malcolm AF. Effect of elevated left atrial pressure and decreased plasma protein concentration on the development of pulmonary edema. *Circ Res*. 1959; 7 (4): 649–657.
5. Michel CC. Starling: The formulation of his hypothesis of microvascular fluid exchange and its significance after 100 years. *Exp Physiol*. 1997 Jan; 82 (1): 1–30.
6. Scholander APF, Hargens AR, Miller SL. Negative Pressure in the Interstitial Fluid of Animals. Fluid tensions are spectacular in plants; in animals they are elusively small, but just as vital. *Science*. 1968; 161 (3839): 321–322.
7. Levick JR. Capillary filtration-absorption balance reconsidered in light of dynamic extravascular factors. *Exp Physiol*. 1991; 76 (6): 825–857.
8. Levick JR. Introduction to cardiovascular physiology. 1989.
9. Michel CC, Phillips ME. Steady-state fluid filtration at different capillary pressures in perfused frog mesenteric capillaries. *J Physiol*. 1987; 388 (1): 421–435.
10. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res*. 2010; 87 (2): 198–210.
11. Guyton AC, Granger HJ, Taylor AE. Interstitial fluid pressure. *Physiol Rev*. 1971; 51 (3): 527–563.
12. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol*. 2016; 5749–68.
13. Davis MJ, Rahbar E, Gashev AA, Zawieja DC, Moore JE. Determinants of valve gating in collecting lymphatic vessels from rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 301 (1): H48–60.
14. Unthank JL, Bohlen HG. Lymphatic pathways and role of valves in lymph propulsion from small intestine. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2017; 254 (3): G389–398.
15. Von Der Weid PY, Zawieja DC. Lymphatic smooth muscle: The motor unit of lymph drainage. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36 (7): 1147–53.
16. Olszewski WL, Engeset A. Intrinsic contractility of prenodal lymph vessels and lymph flow in human leg. *Am J Physiol*. 1980; 239 (6): H775–H777.
17. Aspelund A, Robluc MR, Karaman S, Makinen K. Lymphatic System in Cardiovascular Medicine. *Circulation Research*. 2016; 118: 515–530.
18. Jones D, Min W. An overview of lymphatic vessels and their emerging role in cardiovascular disease. *Journal of Cardiovascular Disease Research*. 2011; 2 (3): 141–152.
19. Voors AA, Davison BA, Teerlink JR, Felker GM, Cotter G, Filippatos G et al. RELAX-AHF Investigators. Diuretic response in patients with acute decompensated heart failure: characteristics and clinical outcome – an analysis from RELAX-AHF. *Eur J Heart Fail*. 2014; 16: 1230–1240.
20. Valente MA, Voors AA, Damman K, Van Veldhuisen DJ, Massie BM, O'Connor CM et al. Diuretic response in acute heart failure: clinical characteristics and prognostic significance. *Eur Heart J*. 2014; 35: 1284–1293.
21. Engeset A, Olszewski W, Jæger PM, Sokolowski J, Theodorsen L. Twenty-Four Hour Variation in Flow and Composition of Leg Lymph in Normal Men. *Acta Physiol Scand*. 1977; 99 (2): 140–148.
22. Allen SJ, Drake RE, Laine GA, Gabel JC. Effect of thoracic duct drainage on hydrostatic pulmonary edema and pleural effusion in sheep. *J Appl Physiol*. 1991; 71 (1): 314–316.
23. Dumont AE, Clauss RH, Reed GE, Tice DA. Lymph Drainage in Patients with Congestive Heart Failure. *N Engl J Med*. 1963; 269 (18): 949–952.
24. Witte MH, Dumont AE, Clauss RH, Rader B, Levine N, Breed ES. Lymph Circulation in Congestive Heart Failure: Effect of External Thoracic Duct Drainage. *Circulation*. 1969; 39 (6): 723–733.
25. Clauss RH, Breed ES. Controlled rate of drainage of thoracic duct lymph. *Am J Surg*. 1970; 119 (5): 610–612.
26. Hraška V. Decompression of thoracic duct: New approach for the treatment of failing.
27. Chavhan GB, Amaral JG, Temple M, Itkin M. MR Lymphangiography in Children: Technique and Potential Applications. *Radiographics*. 2017; 37 (6): 1775–1790.
28. Dori Y, Zviman MMM, Itkin M. Dynamic Contrast-enhanced MR Lymphangiography: Feasibility Study in Swine. *Radiology*. 2014; 273 (2): 410–416.
29. Butler J, Hamo CE, Udelson JE, Pitt B, Yancy C, Shah S et al. Exploring New Endpoints for Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Circ Heart Fail*. 2016; 9 (11): 1–8.

*Статья поступила в редакцию 30.06.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 30.06.2021*

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-192-197

# МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ И ФАКТОРЫ РИСКА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ У РЕЦИПИЕНТОВ СОЛИДНЫХ ОРГАНОВ

*А.В. Никулин, И.В. Пашков, Я.С. Якунин*

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

По данным международного агентства по изучению рака, за 2020 год в мире выявлено 19 292 789 новых случаев заболеваемости раком различных локализаций и 9 958 133 пациента умерло от рака. Эти пугающие цифры наглядно показывают актуальность проблемы развития злокачественных новообразований у населения. Риск развития злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов в 2–6 раз выше, чем в популяции. С учетом неуклонно возрастающего количества трансплантаций солидных органов во всем мире и постепенного увеличения продолжительности жизни реципиентов донорских органов изучение вопросов, касающихся факторов риска и механизмов развития, является актуальной задачей.

*Ключевые слова:* злокачественные новообразования, трансплантация, солидные органы.

## POST-TRANSPLANT MALIGNANCIES IN SOLID ORGAN RECIPIENTS: DEVELOPMENT MECHANISMS AND RISK FACTORS

*A.V. Nikulin, I.V. Pashkov, Y.S. Yakunin*

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

According to the International Agency for Research on Cancer, there were an estimated 19,292,789 new cancer cases in various localizations and 9,958,133 cancer deaths worldwide in 2020. These frightening figures clearly show that malignancies among the population is a pressing matter. The risk of post-transplant malignancy in solid organ recipients is 2–6-times higher than in the general population. Given the steadily increasing number of solid organ transplants worldwide and the gradual increase in life expectancy among organ recipients, studying the issues concerning risk factors and development mechanisms becomes a crucial task.

*Keywords:* malignant tumor, transplantation, solid organs.

### ВВЕДЕНИЕ

По данным международного агентства по изучению рака, за 2020 г. в мире выявлено 19 292 789 новых случаев заболеваемости раком различных локализаций и 9 958 133 пациента умерло от рака. Первое место по заболеваемости в мире занимает рак груди – 2 261 419 случаев (11,7%), затем рак легкого – 2 206 771 (11,4%), колоректальный рак – 1 931 590 (10%), рак предстательной железы – 1 414 259 (7,3%) и рак желудка – 1 089 103 (5,6%). В структуре смертности первое место занимает рак легкого – 1 796 144 случая (18%), затем колоректальный

рак – 935 173 (9,4%), рак печени – 830 180 (8,3%) и рак желудка – 768 793 (7,7%). Существуют некоторые различия по заболеваемости раком различных локализаций мужчин и женщин. Так, у мужчин на первом месте по заболеваемости находится рак легкого (14,7%), затем рак предстательной железы (14,1%) и колоректальный рак (10,6%). У женщин – рак груди (24,5%), затем колоректальный рак (9,4%) и рак легкого (8,4%). Эти пугающие цифры наглядно показывают актуальность проблемы развития злокачественных новообразований у населения [31].

**Для корреспонденции:** Никулин Андрей Владимирович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (495) 190-35-62. E-mail: nikulin5642@gmail.com

**Corresponding author:** Andrey Nikulin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (495) 190-35-62. E-mail: nikulin5642@gmail.com

По данным литературы, риск развития злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов в 2–6 раз выше, чем в популяции. С учетом неуклонно возрастающего количества трансплантаций солидных органов во всем мире (только за 2020 год в мире выполнено 113 363 трансплантации солидных органов) и постепенного увеличения продолжительности жизни реципиентов донорских органов актуальность изучения злокачественных новообразований будет только возрастать. Вопросы развития онкозаболеваний у этой категории достаточно подробно освещены в иностранной литературе, тогда как отечественных источников мы не нашли [1–13, 30].

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Начиная с первых трансплантаций донорских органов был отмечен повышенный риск развития рака различных локализаций у реципиентов солидных органов [1, 2, 6–10]. Большинство авторов приходят к заключению, что в течение следующего десятилетия злокачественные новообразования станут ведущей причиной смерти у реципиентов солидных органов [3, 4, 11–13]. По мере увеличения продолжительности жизни растет и значение проблемы возникновения рака различных локализаций [2, 14].

В литературе имеется множество данных о возникновении злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов. Авторы, анализируя группы реципиентов с диагнозом ЗНО, отличающиеся по возрасту, полу, пересаженному органу, стране проживания и т. д., подтверждают актуальность этой проблемы. Так, например, N.E. Wareham et al. на основании анализа данных 212 реципиентов солидных органов с диагнозом «злокачественные новообразования» установили, что среди реципиентов печени злокачественные новообразования являются второй, реципиентов почек – третьей, а легких – четвертой наиболее распространенной причиной смерти через 5 лет после трансплантации. Авторы пришли к выводу, что причины развития онкологических заболеваний в первую очередь связаны с иммуносупрессивной терапией, а также наличием предраковых заболеваний [6, 7].

E.C. Hall et al. на основании анализа 8520 случаев возникновения злокачественных новообразований среди 164 156 реципиентов солидных органов установили, что за исключением немеланомного рака кожи неходжкинская лимфома (НХЛ) (один из неблагоприятных исходов посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания – ПТЛД от англ. Post-transplant lymphoproliferative disorder) является наиболее распространенным ЗНО у реципиентов солидных органов [1, 11, 12].

Согласно данным E. Yanik et al., среди 187 384 реципиентов солидных органов, из которых реципиенты

почки – 58%, печени – 22%, сердца – 10% и легких – 4%, было выявлено 9323 случаев возникновения злокачественных новообразований (4,97%). Наиболее распространенными злокачественными новообразованиями были рак легких ( $n = 1993$ ), НХЛ ( $n = 1846$ ) и рак предстательной железы ( $n = 1544$ ) [15].

По мнению A. Guillemin et al., риск развития рака различных локализаций у реципиентов солидных органов повышен в 2,6 раза по сравнению с популяцией в целом и является третьей по частоте причиной смерти среди этой категории больных [5].

S. Vajdic et al. сообщают, что реципиенты солидных органов имеют в 3 раза выше риск развития рака различных локализаций по сравнению с общей популяцией [16].

В исследовании S. Acuna et al., которые оценивали 11 061 реципиентов солидных органов, злокачественные новообразования различных локализаций являлись второй причиной смертности после сердечно-сосудистых заболеваний; 20% смертей в этой исследуемой когорте были связаны с развитием злокачественных новообразований, большинство из которых (68%) возникли впервые. У 11% (1267 пациентов) были выявлены злокачественные новообразования в течение 5 лет после трансплантации. Уровень смертности от немеланомного рака кожи (плоскоклеточный и базальноклеточный рак) у реципиентов солидных органов в 30 раз превышает аналогичный показатель в общей популяции, а смертность от неходжкинской лимфомы в 10 раз выше, чем в популяции [17].

По данным E. Neval et al., среди исследованных 1656 реципиентов солидных органов наиболее частым типом рака был рак кожи (121 больной), затем лимфома – неходжкинская и Ходжкина (37 больных) и рак легких (19 больных) [2, 16].

По мнению Z. Huo et al., риски развития рака легких, печени и почек были в основном повышены у реципиентов сердца и/или легких, реципиентов печени и реципиентов почек соответственно [18].

В когортном исследовании, в котором анализировалась частота развития злокачественных новообразований у 175 000 реципиентов солидных органов, D.C. Brennan et al. отмечают увеличение более чем в 5 раз частоты развития саркомы Капоши, немеланомного рака кожи, неходжкинской лимфомы, рака печени и аногенитальной области. А также достоверное увеличение других видов рака: легких, почки (у реципиентов легких и почки соответственно), толстой кишки, поджелудочной железы, лимфомы Ходжкина и меланомы. Напротив, заболеваемость раком молочной железы и раком предстательной железы была ниже [19].

По данным A.-M. Noone et al., среди 221 962 исследованных реципиентов солидных органов у 15 012 развился рак (6,76%). Смертность от рака

легких составила 3,1%, от неходжкинской лимфомы – 1,9%, от колоректального рака – 0,7%, от рака почек – 0,5%. Неходжкинская лимфома была самой частой причиной смерти у детей (4,1%), а рак легких – у реципиентов солидных органов в возрасте  $\geq 50$  лет (3,7–4,3%). Показатели смертности от рака неуклонно росли с увеличением времени после трансплантации, достигнув 15,7% через  $\geq 10$  лет после трансплантации [20].

Таким образом, несмотря на некоторое противоречие в данных, полученных разными авторами, риск развития таких злокачественных новообразований, как лимфомы (Ходжкина и неходжкинские лимфомы), рак легких, рак кожи и колоректальный рак, у реципиентов солидных органов выше в сравнении с популяцией.

## ПАТОГЕНЕЗ

Существуют три основных механизма развития злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов: развитие злокачественного новообразования *de novo*; трансплантация органа, содержащего злокачественное новообразование (первичное или метастаз); прогрессирование существовавшего до трансплантации у реципиента неопластического процесса [8, 18]. По мнению многих авторов, существует ряд факторов, связанных с развитием злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов, среди которых: характер и продолжительность иммуносупрессивной терапии, сопутствующая вирусная инфекция, воздействие солнца (для рака кожи), наличие в анамнезе предтрансплантационного диализа у реципиентов почки (риск развития почечно-клеточного рака связан с формированием приобретенного поликистоза почек, возникающего у пациентов, длительно находящихся на гемодиализе), а также эпизоды острого отторжения [1, 7, 11, 16–22]. К дополнительным факторам риска, общим для популяции в целом, также относятся курение, злоупотребление алкоголем, возраст реципиента [23]. Важно отметить, что мы имеем неполное представление о том, как иммуносупрессивные препараты на самом деле способствуют развитию злокачественных новообразований. Высокий риск развития посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний (от англ. Post-transplant lymphoproliferative disorder – PTLD), связанный с использованием индукции антителами, направленными против Т-лимфоцитов, почти наверняка связан с интенсивной иммуносупрессией и, как следствие, снижением функций иммунологического надзора [24, 25]. Иммуносупрессанты приводят к подавлению иммунитета реципиентов, тем самым снижая противоопухолевую и противовирусную защиту, а также они могут оказывать прямое повреждающее действие на ДНК реципиента (например, азатиоприн повышает

риск развития злокачественных новообразований, и особенно плоскоклеточного рака кожи за счет мутагенного эффекта и потенцирования неблагоприятного эффекта ультрафиолетовых лучей) [7, 17, 26]. Иммуносупрессивная терапия, направленная против Т-лимфоцитов (антитимоцитарный глобулин), предрасполагает к развитию PTLD, индуцированного вирусом Эпштейна–Барр [7, 15]. Напротив, терапия антителами, нацеленными на В-лимфоциты (ритуксимаб), не приводит к увеличению частоты развития злокачественных новообразований [8].

Существует взаимосвязь между вероятностью развития злокачественных новообразований и повышенным уровнем иммуносупрессии. Например, при трансплантации сердца из-за риска смерти, связанного с отторжением органа, часто поддерживается высокий уровень иммуносупрессии, в отличие от трансплантации почки. В ходе исследования более 50 000 трансплантаций почек и сердца заболеваемость ПТЛД была самой высокой в первый год, в период наиболее интенсивной иммуносупрессии, и после этого снижалась на 80%. Частота развития злокачественных новообразований была значительно выше у реципиентов сердца, что согласовалось с большей степенью иммуносупрессии у этих пациентов [18]. Эпизоды отторжения трансплантата в первый год после трансплантации повышают вероятность развития злокачественных новообразований, очевидно из-за высоких дозировок иммуносупрессивных препаратов, применяемых в случае развития криза отторжения [16, 17, 22]. Различная частота заболеваемости злокачественными новообразованиями у разных реципиентов солидных органов может быть связана с непосредственным влиянием иммуносупрессивных препаратов [1, 8, 12, 16, 18, 19]. Существует дозозависимая связь между ингибиторами кальциневрина и развитием злокачественных новообразований, например лимфопролиферативных нарушений или рака кожи. Напротив, сиролимус и другие m-TOR-ингибиторы оказывают прямое противоопухолевое действие [19]. Одни авторы говорят о снижении риска развития злокачественных новообразований на фоне приема сиролимуса (по сравнению с контролем применение сиролимуса снижало на 40% риск развития злокачественных новообразований и на 56% – риск развития немеланомного рака кожи) [7, 11, 14, 18, 19], другие не отмечают такого эффекта [19]. Экспериментальные исследования *in vivo* показали, что азатиоприн повышает риск развития злокачественных новообразований, и особенно плоскоклеточного рака кожи за счет мутагенного эффекта и потенцирования неблагоприятного эффекта ультрафиолетовых лучей [3, 5, 7, 8]. Циклоспорин увеличивает риск развития саркомы Капоши и метастатического поражения легких у пациентов с железистым раком [3, 5, 7, 8]. D.C. Brennan et al. приво-

дт данные исследования 231 реципиента почечного аллотрансплантата. Пациенты, в течение 12 месяцев получавшие низкие дозы циклоспорина (от 75 до 125 нг/мл), имели более низкую частоту развития всех злокачественных новообразований (23 против 37 заболеваний), особенно рака кожи (17 против 26 заболеваний), в сравнении с группой пациентов, получающих обычные дозировки циклоспорина (от 150 до 250 нг/мл). Медиана наблюдения составляла 66 месяцев [19]. По данным D.C. Brennan et al., применение такролимуса повышает риск возникновения злокачественных новообразований после трансплантации почки. Канцерогенный эффект ингибиторов кальциневрина достигается главным образом за счет стимуляции секреции клетками трансформирующего фактора роста (Transforming growth factor beta – TGF-бета) и повышенной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов [8]. Реципиенты солидных органов, получающие микофенолата мофетил, имеют более низкий риск развития злокачественных новообразований, что может быть связано со снижением частоты острого отторжения, что, в свою очередь, приводит к снижению потребности в повышенных дозах иммуносупрессивных препаратов [5, 7]. Роль кортикостероидов в развитии злокачественных новообразований трудно оценить, т. к. они практически всегда назначаются одновременно с другими иммунодепрессантами [5].

По мнению большинства авторов, наличие онкогенных вирусов или передача их с донорским органом является существенным фактором риска развития рака на фоне продолжительной иммуносупрессии. Например, вирус Эпштейна–Барр считается основным провоцирующим фактором развития неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина, которые являются злокачественными формами PTLD (от англ. Post-transplant lymphoproliferative disorder). Аногенитальный рак связан с вирусом папилломы человека, а саркома Капоши – с герпес-вирусом 8-го типа. В этих ситуациях иммуносупрессия снижает иммунный контроль над этими вирусными инфекциями [1, 7, 16, 18, 19, 21, 22]. По мнению Z. Huo et al., наличие вируса гепатита С или В считается фактором риска развития рака печени, а наличие вируса папилломы человека может провоцировать развитие плоскоклеточного рака шейки матки, вульвы, влагалища, пениса, ануса и ротоглотки. Среди реципиентов солидных органов у 90% больных плоскоклеточным раком имелся вирус папилломы человека, тогда как в популяции распространенность вируса папилломы человека среди больных плоскоклеточным раком кожи составляет от 11 до 32% [18]. По мнению J. Liao et al., развитие рака шейки матки, вульвы и влагалища у реципиентов солидных органов также связано с персистирующим вирусом папилломы человека [28].

Если трансплантация печени выполнялась по поводу первичного склерозирующего холангита или трансплантация легких – по поводу муковисцидоза, у реципиентов увеличивается риск развития колоректального рака, так как до 80% реципиентов с первичным склерозирующим холангитом имеют воспалительные заболевания кишечника (чаще всего неспецифический язвенный колит, являющийся фактором риска развития колоректального рака), а при муковисцидозе за счет нарушения секреции слизи происходят изменения эпителия желудочно-кишечного тракта [24]. При односторонней трансплантации легких или при трансплантации почки существует повышенный риск развития злокачественных новообразований в сохраненном нативном органе в соответствии с нозологической формой исходного заболевания, приведшего к трансплантации [24]. По мнению N.E. Wareham et al., пожилой возраст и наличие хронического воспаления являлись факторами риска развития рака различных локализаций, особенно рака легких [12, 21]. Кроме того, вредные привычки, приводящие к терминальной стадии заболевания у реципиентов солидных органов (например, курение у реципиентов легких и комплекса «сердце–легкие»), также негативно влияют на частоту развития злокачественных новообразований [3, 8].

По мнению ряда авторов, проведение иммуносупрессивной терапии может способствовать развитию злокачественных новообразований из нераспознанных до трансплантации новообразований [1, 3, 5, 7, 9]. Например, повышенный риск развития меланомы у реципиентов солидных органов в течение 5 лет после трансплантации может быть связан с наличием неопластического процесса у донора, не выявленного до трансплантации. В свою очередь, назначение иммуносупрессии приводит к быстрому росту и прогрессированию новообразований [24]. Злокачественные новообразования донорских органов (печени, легких и почек), если эти органы получены от доноров, имевших онкологический анамнез, почти в половине случаев диагностируются после трансплантации [1, 5, 9]. По данным S.A. Acuna et al., среди 22 реципиентов сердца и/или легких от таких доноров злокачественные новообразования развились у 45% реципиентов [19].

По мнению S.A. Acuna et al., значительное число пациентов, нуждающихся в трансплантации солидных органов, имели в анамнезе онкологические заболевания и представляют собой группу повышенного риска развития злокачественного новообразования как новой локализации, так и ранее существовавшего злокачественного новообразования [29]. По данным обзора литературы и метаанализа, проведенного S. Acuna et al., общая частота рецидивов рака после трансплантации солидных органов у пациентов с онкологическим анамнезом до трансплантации со-

ставляет 6%. Самый низкий риск рецидива рака был у реципиентов трансплантата печени, а самый высокий – у реципиентов почки [29].

Несмотря на то что данные исследования IPITTR (от англ. Israel Penn International Transplant Tumor Registry) показали, что частота рецидивов рака после трансплантации почки у пациентов с онкологическим анамнезом до трансплантации составила 21% (у большинства (53%) операция была в первые 2 года после диагностики или лечения рака), по мнению S. Acuna et al., нужно скептически относиться к приведенным данным. Поскольку в IPITTR пациенты регистрируются добровольно, без обязательств последующего длительного мониторинга [29]. Современные англоязычные рекомендации по отбору кандидатов на трансплантацию почки рекомендуют разное время ожидания перед трансплантацией для пациентов с онкологическим анамнезом до трансплантации. Период ожидания может варьироваться от полного отсутствия для некоторых злокачественных новообразований *in situ* и до более чем 5 лет для меланомы, рака мочевого пузыря, колоректального рака и рака молочной железы. Для реципиентов других солидных органов рекомендуется проводить трансплантацию, если после полного излечения от опухоли ожидаемая онкологическая выживаемость превосходит ожидаемую выживаемость после трансплантации [29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются одной из ведущих причин смертности во всем мире независимо от пола. Несмотря на часто противоречивые данные, приводимые разными авторами, большинство сходятся во мнении, что существует повышенный риск развития некоторых видов злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов, постоянно принимающих иммуносупрессивные препараты (например, рака кожи, колоректального рака, рака легкого, лимфопролиферативных заболеваний). Помимо общеизвестных факторов риска, характерных для популяции в целом (курение, вирусные инфекции, злоупотребление алкоголем, возраст, пол и так далее), у реципиентов солидных органов существуют специфические факторы, как, например, влияние иммуносупрессивной терапии, причем не только подавление иммунитета, но и непосредственное влияние иммуносупрессивных препаратов. Также необходимо отметить и специфические механизмы развития злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов, например, передача опухоли от донора.

Анализ литературы показывает, что по мере увеличения продолжительности жизни реципиентов солидных органов и учитывая постоянно растущее количество трансплантаций солидных органов, акту-

альность ранней диагностики злокачественных новообразований будет только возрастать. Без знания факторов риска и механизмов развития злокачественных новообразований у реципиентов солидных органов невозможны своевременная диагностика и профилактика злокачественных новообразований у этой категории больных.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Rousseau-Gazaniol C et al. Lung cancer in renal transplant recipients: A case-control study. *Lung Cancer: Elsevier Ireland Ltd.* 2017; 111: 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.07.011>.
2. Shtraichman O, Ahya VN. Malignancy after lung transplantation. *Ann Transl Med.* 2020; 8: 416–416. doi: 10.21037/atm.2020.02.126.
3. Smedman TM et al. Transplant oncology: assessment of response and tolerance to systemic chemotherapy for metastatic colorectal cancer after liver transplantation – a retrospective study. *Transpl Int.* 2019; 11: 1144–1150. doi: 10.1111/tri.13471.
4. D’Arcy ME et al. Survival after a cancer diagnosis among solid organ transplant recipients in the United States. *Cancer.* 2019; 6: 933–942. doi: 10.1002/cncr.31782.
5. Guillemain A et al. Cancers solides après transplantation d’organe: épidémiologie, pronostic et spécificités de prise en charge. *Bull Cancer. Société Française du Cancer.* 2017; 104: 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.12.008>.
6. Wareham NE et al. Risk of *de novo* or secondary cancer after solid organ or allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol. Springer Berlin Heidelberg.* 2019; 145: 3125–3135. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03039-2>.
7. Katabathina VS et al. Malignancy after solid organ transplantation: Comprehensive imaging review. *Radiographics.* 2016; 36: 1390–1407. <https://doi.org/10.1148/rp.2016150175>.
8. González-Cruz C, Ferrándiz-Pulido C, García-Patos Briones V. Melanoma in Solid Organ Transplant Recipients. *Actas Dermosifiliogr.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2021.01.011>.
9. Lizakowski S et al. Solid Organ Cancer and Melanoma in Kidney Transplant Recipients: TumorTx Base Preliminary Results. *Transplant Proc.* 2018; 6: 1881–1888. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.02.146.
10. Benoni H et al. Survival among solid organ transplant recipients diagnosed with cancer compared to nontransplanted cancer patients – A nationwide study. *Int J Cancer.* 2020; 146: 682–691. doi: 10.1002/ijc.32299.
11. Acuna SA. Etiology of increased cancer incidence after solid organ transplantation. *Transplant Rev. Elsevier Inc.* 2018; 32: 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.tre.2018.07.001>.

12. Hall EC et al. Cumulative incidence of cancer after solid organ transplantation. *Cancer*. 2013; 119: 2300–2308. <https://doi.org/10.1002/cncr.28043>.
13. Lengwiler E et al. Solid cancer development in solid organ transplant recipients within the Swiss Transplant Cohort Study. *Swiss Med Wkly*. 2019; 149: 1–9. <https://doi.org/10.4414/sm.w.2019.20078>.
14. Madeleine MM et al. Epidemiology of keratinocyte carcinomas after organ transplantation. *Br J Dermatol*. 2017; 177: 1208–1216. doi: 10.1111/bjd.15931.
15. Yanik EL et al. Comparison of cancer diagnoses between the US solid organ transplant registry and linked central cancer registries. *Am J Transplant*. 2016; 16: 2986–2993. <https://doi.org/10.1111/ajt.13818>.
16. Vajdic CM, Van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer*. 2009; 125: 1747–1754. doi: 10.1002/ijc.24439.
17. Asch WS, Perazella MA. Cancer and Mortality in Solid-Organ Transplantation: Preventable or Inevitable? *Am J Kidney Dis*. 2016; 68: 839–842. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2016.06.009>.
18. Huo Z et al. Cancer Risks in Solid Organ Transplant Recipients: Results from a Comprehensive Analysis of 72 Cohort Studies. *Oncoimmunology*. Taylor & Francis. 2020; 9. doi: 10.1080/2162402X.2020.1848068.
19. Brennan DC et al. Development of malignancy following solid organ transplantation. *UpToDate*. 2016; 10: 1–20.
20. Noone AM et al. Cancer-attributable mortality among solid organ transplant recipients in the United States: 1987 through 2014. *Cancer*. 2019; 125: 2647–2655. doi: 10.1002/cncr.32136.
21. Endén K et al. Cancer morbidity and mortality after pediatric solid organ transplantation – a nationwide register study. *Pediatr Nephrol. Pediatric Nephrology*. 2020; 35: 1719–1728. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04546-y>.
22. Fogel AL, Miyar M, Teng JMC. Cutaneous Malignancies in Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *Pediatr Dermatol*. 2016; 33: 585–593. doi: 10.1111/pde.12941.
23. Rademacher S et al. The 28-year incidence of *de novo* malignancies after liver transplantation: A single-center analysis of risk factors and mortality in 1616 patients. *Liver Transplant*. 2017; 23: 1404–1414. doi: 10.1002/lt.24795.
24. Engels EA. Cancer in Solid Organ Transplant Recipients: There Is Still Much to Learn and Do. *Am J Transplant*. 2017; 17: 1967–1969. <https://doi.org/10.1111/ajt.14140>.
25. Legendre C et al. Long-term challenges after solid organ transplantation: Summary of expert presentations from the Sandoz 5th standalone transplantation meeting, 2017. *Transplantation*. 2018; 102: 1–14. doi: 10.1097/TP.0000000000002316.
26. Wang X, Dong M. Malignancy After Lung Transplantation: How to Manage Immunosuppression? *Transplant Proc. Elsevier Inc*. 2020; 52: 315–320. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2019.09.012>.
27. Hellström VC et al. Malignancies in transplanted patients: Multidisciplinary evaluation and switch to mTOR inhibitors after kidney transplantation – experiences from a prospective, clinical, observational study. *Acta Oncol (Madr)*. 2016; 55: 774–781. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1130855>.
28. Liao JB, Fisher CE, Madeleine MM. Gynecologic cancers and solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2019; 19: 1266–1277. doi: 10.1111/ajt.15292.
29. Acuna SA et al. Cancer recurrence after solid organ transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Transplant Rev. Elsevier Inc*. 2017; 31: 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2017.08.003>.
30. <http://www.transplant-observatory.org> [Internet]. Global Observatory on Donation and Transplantation. Available from: <http://www.transplant-observatory.org>.
31. <https://gco.iarc.fr> [Internet]. International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr>.

*Статья поступила в редакцию 9.08.2021 г.  
The article was submitted to the journal on 9.08.2021*



## ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ ЭДУАРДА ИЗРАИЛЕВИЧА ГАЛЬПЕРИНА

*Эдуард Израилевич родился в Москве 10 августа 1931 года. В 1955 году с отличием окончил I Московский медицинский институт имени И.М. Сеченова. Самостоятельную работу будущий профессор начал в качестве врача выездной бригады «Скорой помощи» Института им. Н.В. Склифосовского, а затем врача-хирурга. В 36 лет успешно защищена докторская диссертация, посвященная хирургии желчных протоков.*

*С 1970-го по 1979 г. Э.И. Гальперин работает в должности заведующего отделом трансплантации печени в Институте трансплантации органов и тканей, где после многолетних экспериментальных исследований вместе с академиком В.И. Шумаковым проводит первую в мире пересадку левой доли печени в гетеротопическую позицию, приоритет признан за рубежом. Исследования по методу использования доли печени положили*

*начало развитию трансплантации печени от живого донора и имели большое значение для развития пересадки печени в педиатрии в мире и в нашей стране.*

*С 1980 г. по настоящее время трудовая деятельность профессора Э.И. Гальперина связана с Первым МГМУ им. И.М. Сеченова. Эдуард Израилевич является почетным профессором Сеченовского университета, профессором кафедры госпитальной хирургии Института клинической медицины. Им созданы хирургические классификации рубцовых стриктур и «свежих» поврежденных желчных протоков, механической желтухи и хронического панкреатита, которыми успешно пользуются хирурги нашей страны. Разработана методика резекции печени, направленная на снижение кровопотери и профилактику внутрипеченочного метастазирования, и концепция максимально корригирующих вмешательств при хроническом панкреатите, создан новый метод интраоперационной химиотерапии при злокачественных поражениях печени (получены патенты РФ и США). Результаты работ изложены в многочисленных статьях и монографиях: «Хирургия внепеченочных желчных протоков», «Печеночная недостаточность», «Трансплантация печени», «Заболевания желчных путей после холецистэктомии», «Нестандартные ситуации при операциях на желчных путях», «Рубцовые стриктуры желчных протоков». Э.И. Гальперин – редактор учебных изданий «Руководство по хирургии желчных путей» и «Курс лекций по гепатопанкреатобилиарной хирургии». Э.И. Гальперин стал инициатором создания и первым президентом Международной общественной организации «Ассоциация хирургов-гепатологов», которая объединила хирургов России и стран СНГ, а также создателем журнала «Анналы хирургической гепатологии», главным редактором которого Эдуард Израилевич был в течение 20 лет.*

*Имея множество регалий, свидетельствующих о признании государством и международным сообществом его заслуг, обладая высочайшим авторитетом врача, хирурга и ученого, Эдуард Израилевич остается скромным человеком, с которым можно обсудить не только профессиональные, но и жизненные проблемы.*

*Ученики и коллеги профессора Э.И. Гальперина желают своему Учителю здоровья и активного долголетия!*

*Коллектив сотрудников во главе с академиком РАН Сергеем Владимировичем Готье поздравляет с юбилеем Эдуарда Израилевича Гальперина и желает дальнейших успехов в профессиональной деятельности на благо отечественной медицины.*



## ПОЗДРАВЛЯЕМ С ЮБИЛЕЕМ АЛЕКСЕЯ СЕРГЕЕВИЧА ИВАНОВА

*2 июня 2021 года исполнилось 70 лет Алексею Сергеевичу Иванову – доктору медицинских наук, профессору, заведующему кардиохирургическим отделением НМИЦ ТИО имени академика В.И. Шумакова.*

*Алексей Сергеевич в 1974 г. окончил I Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. С 1974-го по 1977 г. обучался в очной аспирантуре на кафедре оперативной хирургии и топографической анатомии, где в 1978 г. успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему: «Комбинированные материалы на основе коллагена для пластики остеомиелитических полостей» по специальности «хирургия». С 1979 года работал в кардиохирургическом отделении врожденных пороков сердца Российского научного центра хирургии им. ак. Б.В. Петровского, где прошел путь от младшего до главного*

*научного сотрудника. В 1992 году Алексей Сергеевич защитил докторскую диссертацию на тему: «Реконструкция выходного отдела правого желудочка при тетраде Фалло. Морфометрия, хирургическая тактика, клинические результаты»; в 2000 г. удостоен ученого звания профессор.*

*Основными направлениями научной деятельности Алексея Сергеевича Иванова стали изучение вариантной анатомии сложных врожденных пороков сердца и разработка тактики их радикальной коррекции, а также разработка нового поколения биологических пластических материалов и конструкций для кардиохирургии. Им обоснован и создан моностворчатый ксеноперикардальный трансплантат для хирургической коррекции выходного отдела правого желудочка сердца и ствола легочной артерии, используемый при операциях у пациентов со сложными врожденными пороками сердца. На основании оценки степени резидуальных нарушений гемодинамики у пациентов после коррекции врожденных пороков сердца им разработана диагностическая концепция показаний к неотложным повторным операциям. За разработку и внедрение биологических протезов клапанов сердца А.С. Иванову в 1982 г. была присуждена Государственная премия СССР.*

*Алексей Сергеевич Иванов ввел в практику комплексный подход к диагностике, хирургической коррекции и прогнозированию результатов оперативного лечения пациентов с врожденными и приобретенными пороками сердца, осложненными легочной гипертензией. В 1996 году А.С. Иванову была присвоена высшая квалификация врача по сердечно-сосудистой хирургии.*

*В 2000 году Алексей Сергеевич был удостоен премии Правительства РФ в области науки и техники «За разработку и клиническое применение новых биотехнологий в сердечно-сосудистой хирургии». В 2007 г. А.С. Иванову присвоено звание «Заслуженный деятель науки РФ».*

*Алексей Сергеевич Иванов уделяет огромное внимание подготовке молодых специалистов, передавая свой уникальный опыт ученого и кардиохирурга. Под его руководством и при консультативном участии подготовлено 13 кандидатов и 3 доктора медицинских наук.*

*Он является автором 430 печатных работ, в числе которых монографии «Хирургия тетрады Фалло», «Хирургическое лечение посттравматических пороков и инородных тел сердца», 12 авторских свидетельств СССР, патентов США, ФРГ, ГДР, Швеции, НРБ, патента РФ и диплома на открытие «Свойство клапанно-аортального комплекса аорты человека открывать створки аортального клапана при равенстве давления в аорте и левом желудочке».*

*За более чем десятилетие успешной работы заведующим кардиохирургическим отделением в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова при участии А.С. Иванова было выполнено более 500 кардиохирургических вмешательств у детей и взрослых, а также операции по трансплантации сердца. Тысячи спасенных им пациентов вернулись к полноценной жизни, что всегда является главной наградой для врача. Неоднократно он был удостоен почетного диплома «Человек года» НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова.*

*Алексей Сергеевич является членом ученого совета, диссертационного совета ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, диссертационного совета на базе ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ, членом Ассоциации сердечно-сосудистых хирургов России и почетным членом Российского научного общества интервенционных радиологов и эндоваскулярных хирургов.*

*Нельзя не упомянуть не только высочайший профессионализм Алексея Сергеевича, но и его прекрасные человеческие качества: интеллигентность, отзывчивость, доброту, преданность делу, которому служит.*

*Коллектив сотрудников во главе с академиком РАН Сергеем Владимировичем Готье поздравляет с юбилеем Алексея Сергеевича Иванова и желает дальнейших успехов в профессиональной деятельности на благо отечественной медицины.*

## 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 виде одного файла Microsoft Word (шрифт Times New Roman, 12 pt через 1,5 интервала), который необходимо направить в электронную редакцию в соответствии с указаниями на сайте журнала. <https://journal.transpl.ru>.

### Схема построения статьи

#### 1. Титульная страница

Должна быть представлена на русском и английском языках и соответствовать шаблону:

- **Название статьи**

Англоязычное название должно быть грамотным с точки зрения английского языка, при этом полностью соответствовать по смыслу русскоязычному названию.

- **Авторы статьи**

При написании авторов статьи инициалы имени и отчества указываются перед фамилией. Ф. И. О. на английском языке необходимо писать так, как в заграничном паспорте или как в ранее опубликованных статьях в зарубежных журналах.

- **Название учреждения**

– Полное официальное название учреждения, город, страна. Наиболее полный список названий учреждений на русском и английском языках можно найти на сайте РУНЭБ eLibrary.ru

– Если в написании рукописи принимали участие авторы из разных учреждений, необходимо соотнести их названия с Ф. И. О. авторов путем добавления цифровых индексов в верхнем регистре после фамилии и перед названием учреждения.

- **Для корреспонденции**

Полностью указать фамилию, имя, отчество автора, с которым будет вестись переписка, адрес (с почтовым индексом), телефон, факс, e-mail.

### Пример титульной страницы

#### Сравнительный анализ диагностической значимости панелей биомаркеров у реципиентов сердца в отдаленные сроки после трансплантации

О.П. Шевченко<sup>1,2</sup>, А.В. Аксенова<sup>1</sup>, А.А. Улыбышева<sup>1,3</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>, Е.А. Никитина<sup>1</sup>, В.И. Орлов<sup>1</sup>, Е.А. Стаханова<sup>1</sup>, А.О. Шевченко<sup>1,2</sup>

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

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

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

#### Для корреспонденции

Аксенова Александра Владимировна

Адрес:

Тел.:

E-mail:

#### Comparative analysis of diagnostic significance of biomarkers' panels in cardiac recipients in the long term period after transplantation

O.P. Shevchenko<sup>1,2</sup>, A.V. Aksyonova<sup>1</sup>, A.A. Ulybysheva<sup>1,3</sup>, N.P. Mozheiko<sup>1</sup>, E.A. Nikitina<sup>1</sup>, V.I. Orlov<sup>1</sup>, E.A. Stakhanova<sup>1</sup>, A.O. Shevchenko<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

#### For correspondence

Aksyonova Alexandra Vladimirovna

Address:

Tel.

E-mail:

#### 2. Реферат

К каждой статье должен быть приложен реферат на русском и английском языках. Объем текста реферата для оригинальной статьи – не более 300 слов, для обзора литературы, клинического наблюдения – не более 200 слов. Реферат должен полностью соответствовать содержанию работы. Англоязычная версия реферата статьи должна по смыслу и структуре соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка. Для перевода реферата не допускается использование электронных программ-переводчиков (например, Google Переводчик) без последующей редакции.

В реферате не следует употреблять аббревиатуры без предварительного раскрытия.

Реферат **оригинальной статьи** должен содержать следующие разделы:

**Цель** (*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](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Если количество авторов не превышает 6, в библиографическом описании указываются все авторы. Если количество авторов более 6, следует указать шесть первых авторов и добавить «и др.» (et al.).

#### Примеры библиографических описаний

1. *Статья из русскоязычного журнала, имеющая англоязычное название*

*Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2015 году. VIII сообщение регистра Российского трансплантологического общества. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 18 (2): 6–26. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2015. 8th report of National Register. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2016; 18 (2): 6–26. [In Russ, English abstract] DOI:10.15825/1995-1191-2016-2-6-26.*

2. *Статья из русскоязычного журнала, не имеющая англоязычного названия*  
Трапезникова МФ, Филиппцев ПЯ, Перлин ДВ, Кулачков СМ. Лечение стриктур мочеточника после трансплантации почки. *Урология и нефрология*. 1994; 3: 42–45. Trapeznikova MF, Filiptsev PYa, Perlin DV, Kulachkov SM. Lechenie striktur mochetochnika posle transplantatsii pochki. *Urologiya i nefrologiya*. 1994; 3: 42–45.
3. *Статья из англоязычного журнала*  
Goldstein DJ, Oz MC, Rose EA. Implantable left ventricular assist devices. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1522–1533.
4. *Англоязычная монография*  
Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
5. *Русскоязычная монография*  
Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА (2008), 246 с. Gautier SV, Konstantinov BA, Tsi-rulnikova OM. *Transplantatsiya pecheni*. М.: МИА (2008), 246.
6. *Диссертация (автореферат диссертации)*  
Орлова ОВ. Роль маркеров воспаления, тромбоза, неоангиогенеза и апоптоза в прогнозировании васкулопатии сердечного трансплантата: дис. ... докт. мед. наук. М., 2009, 84 с. Orlova OV. Rol' markerov vospaleniya, tromboza, neoangiogeneza i apoptoza v progno-

zirovanii vaskulopatii serdechnogo transplantata. [Dissertation]. М., 2009, 84.

7. *Ресурс в сети Internet*  
Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

### Требования к таблицам и иллюстрациям

**Таблицы** следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

**Иллюстрации и рисунки** должны быть представлены в электронном виде (формат JPEG или TIF с разрешением не менее 300 точек на дюйм и размером не менее 6 × 9 см), в объеме, близком к 1 Мб. Рисунок должен содержать все авторские обозначения – стрелки, цифры, указатели и пр. Подписи к рисункам должны быть представлены в отдельном файле с расширением \*.doc. Сначала дается название, а затем объясняются все цифровые и буквенные обозначения.

**Названия таблиц, иллюстраций и рисунков, а также объяснения к ним должны быть представлены на русском и английском языках.**

**Статьи направлять в редакцию журнала по адресу:**

123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1, ФГБУ «НМИЦ ТИО им. академика В.И. Шумакова»,  
«Вестник трансплантологии и искусственных органов»  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Articles should contain original information that has not been previously published and is not considered for publication in other editions. Fee for publication of manuscripts will not be charged.

The manuscript should be presented in Microsoft Word format A4, 1.5 spacing, and Times New Roman font size 12. Submit your article to the online submission system in accordance with the instructions on the journal's website <https://journal.transpl.ru>.

### 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 Lib-

rary of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). If the number of authors does not exceed 6, the bibliographic description includes all the authors. If the number of authors is more, only the first six authors should be indicated and then add et al.

### **Requirements for tables and figures**

**Tables** should be placed into the text; they should have numbered heading and clearly labeled graphs, convenient and simple to read. Table's data must comply

with the numbers in the text, but should not duplicate the information therein. Table references in the text are required.

**Illustrations and drawings** should be submitted in electronic format (JPEG or TIFF format with a resolution of at least 300 dpi and no smaller than 6 × 9 cm), in a volume of close to 1 MB. Drawings must include all copyright symbols – arrows, numbers, signs, etc. Figure captions should be submitted in a separate file with the extension \*.doc. First, the name is given, then all arithmetic and alphabetical symbols (lettering) are explained.

#### **Articles should be addressed to the Editor at:**

Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs  
Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs  
1, Shchukinskaya ul., Moscow 123182, Russian Federation  
E-mail: [vestniktranspl@gmail.com](mailto:vestniktranspl@gmail.com)

**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 07.09.21.

Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «Триада».

ИД № 06059 от 16.10.01 г.

170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 514,

тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30

E-mail: triadatver@yandex.ru

<http://www.triada.tver.ru>

Отпечатано в ООО «Тверская фабрика печати».

170006, г. Тверь, Беляковский пер., 46.

Заказ 9005

