

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)

2022. Том XXIV. № 4

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

Заведующая редакцией – Н.Ш. Бегмуродова
(Москва, Россия).
E-mail: edr.begmurodova@gmail.com

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. Хубутиа** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор
- А.М. Чернявский** (Новосибирск, Россия) – д. м. н., профессор, член-корреспондент РАН
- В.П. Чехонин** (Москва, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор
- Е.В. Шляхто** (Санкт-Петербург, Россия) – академик РАН, д. м. н., профессор
- П.К. Яблонский** (Санкт-Петербург, Россия) – д. м. н., профессор

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)

2022. Vol. XXIV. № 4

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

Editor-in-Chief – S.V. Gautier
(Moscow, Russia), MD, PhD, professor, member
of Russian Academy of Sciences (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. Stakanova
(Moscow, Russia), PhD.
E-mail: stahanova.ekaterina@mail.ru

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

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. Tkachuk** (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, corresponding member of Russian Academy of Sciences
- V.P. Chehonin** (Moscow, Russia) – MD, PhD, professor, member of Russian Academy of Sciences
- E.V. Shlyakhto** (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. Климушева (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., профессор РАН
(редактор раздела «Донорство органов»)
Б.Л. Миронков (Москва, Россия) – д. м. н., профессор
(редактор раздела «Смежные дисциплины»)
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., профессор
О.О. Руммо (Минск, Республика Беларусь) – академик 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, professor of Russian Academy of Sciences
(editor of the section «Organ donation»)
B.L. Mironkov (Moscow, Russia), MD, PhD, professor
(editor of the section «Related disciplines»)
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, professor
O.O. Rummo (Minsk, Belarus) – MD, PhD, professor, 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
Интернет-сайт журнала: <http://journal.transpl.ru>
Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>

Address for correspondence:

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

Подписной индекс в каталоге почты России – ПН380

СОДЕРЖАНИЕ

СТРАНИЦА ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Клиническая трансплантология в РФ:
от инновационной феноменологии к доступному
виду медицинской помощи

С.В. Готье

КЛИНИЧЕСКАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

Факторы риска при трансплантации печени
от посмертного донора: опыт одного центра

*С.И. Зубенко, А.Р. Монахов, М.А. Болдырев,
В.Р. Салимов, А.Д. Смолянинова, С.В. Готье*

Беременность после экстракорпорального
оплодотворения у пациентки
с трансплантированной почкой: клиническое
наблюдение и обзор литературы

*Е.И. Прокопенко, В.М. Гурьева, В.А. Петрухин,
К.В. Краснопольская, Ф.Ф. Бурумкулова, Д.В. Губина*

Риски и пути профилактики нарушения функции
почек при проведении медикаментозной
иммуносупрессии у реципиентов солидных
органов

Ш.Р. Галеев, С.В. Готье

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕРДЦА И ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ КРОВООБРАЩЕНИЕ

Современный взгляд
на радиационно-индуцированную кардиопатию
и методы ее диагностики

Р.М. Муратов, С.И. Бабенко, М.Н. Соркомов

Разработка устройства канюли для удаления
газовой фракции в системах дренажа крови

*А.П. Кулешов, А.С. Бучнев, А.А. Дробышев,
О.Ю. Есипова, Г.П. Иткин*

Механическая поддержка лимфоциркуляции
в условиях острой декомпенсированной
сердечной недостаточности.

Исследование на гидродинамическом стенде

*А.С. Бучнев, Г.П. Иткин, А.А. Дробышев,
А.П. Кулешов, О.Ю. Есипова, А.И. Сырбу*

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Коррекция хронической печеночной
недостаточности в эксперименте путем
имплантации клеточно-инженерных конструкций:
морфофункциональные характеристики

*М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, А.В. Гречина,
М.Е. Крашенников, А.О. Никольская, Е.А. Волкова,
Н.П. Можейко, Н.А. Бояринова, А.В. Ляндуп,
Г.А. Пьявченко, Л.И. Давыдова, А.Ю. Архипова,
В.Г. Богуш, С.В. Готье*

CONTENTS

EDITORIAL

- 5 Clinical transplantology in the Russian Federation:
from innovative phenomenology to accessible
medical care
S.V. Gautier

CLINICAL TRANSPLANTOLOGY

- 7 Risk factors in deceased donor liver transplantation:
a single centre experience
*S.I. Zubenko, A.R. Monakhov, M.A. Boldyrev,
V.R. Salimov, A.D. Smolyaninova, S.V. Gautier*
- 15 IVF pregnancy after kidney transplantation: clinical
case and literature review
*E.I. Prokopenko, V.M. Guryeva, V.A. Petrukhin,
K.V. Krasnopol'skaya, F.F. Burumkulova, D.V. Gubina*
- 24 Risks and ways of preventing kidney dysfunction
in drug-induced immunosuppression in solid organ
recipients
Sh.R. Galeev, S.V. Gautier

HEART TRANSPLANTATION AND ASSISTED CIRCULATION

- 39 Current view on radiation-induced heart disease
and methods of its diagnosis
R.M. Muratov, S.I. Babenko, M.N. Sorkomov
- 46 Development of a cannula device for gas fraction
removal in surgical drains
*A.P. Kuleshov, A.S. Buchnev, A.A. Drobyshev,
O.Yu. Esipova, G.P. Itkin*
- 54 Mechanized lymphatic drainage in acute
decompensated heart failure.
A study on a hydrodynamic test bench
*A.S. Buchnev, G.P. Itkin, A.A. Drobyshev, A.P. Kuleshov,
O.Yu. Esipova, A.I. Syrbu*

REGENERATIVE MEDICINE AND CELL TECHNOLOGIES

- 60 Treatment of chronic liver disease using
cell-engineered constructs: morphofunctional
characteristics
*M.Yu. Shagidulin, N.A. Onishchenko, A.V. Grechina,
M.E. Krashennnikov, A.O. Nikolskaya, E.A. Volkova,
N.P. Mogeiko, N.A. Boiarinova, A.V. Lyundup,
G.A. Piyavchenko, L.I. Davydova, A.Yu. Arhipova,
V.G. Bogush, S.V. Gautier*

Биосовместимые и функциональные свойства тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из децеллюляризованного хряща свиньи

Е.А. Немец, А.Э. Лажко, А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, В.И. Севастьянов

Апоптотические мононуклеарные клетки костного мозга ускоряют регенерационные процессы в печени после обширной резекции

Н.А. Онищенко, А.О. Никольская, З.З. Гоникова, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, В.И. Севастьянов

Тканеинженерные сосудистые заплаты – сравнительная характеристика и результаты преклинических испытаний на модели овцы

Л.В. Антонова, А.В. Миронов, А.Р. Шабает, В.Н. Сильников, Е.О. Кривкина, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова, Е.А. Сенокосова, М.Ю. Ханова, В.В. Севостьянова, Т.В. Глушкова, Р.А. Мухамадияров, Л.С. Барбараи

Влияние биоматрикса на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию островков Лангерганса человека *in vitro*

А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов

ДОНОРСТВО ОРГАНОВ

Предикторы стеатоза у доноров печени

М.Г. Минина, Д.В. Воронов, А.А. Невредимов, Э.А. Тенчурина

Применение поликлональных антител у доноров со смертью мозга при пересадке почек

Д.О. Кузьмин, В.А. Мануковский, С.Ф. Багненко, О.Н. Резник, А.Н. Ананьев, О.А. Воробьева, С.Л. Воробьев, Д.В. Гоголев, В.С. Дайнеко, А.А. Кутенков, Н.А. Чичагова, И.В. Ульянкина

СМЕЖНЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Реконструкция гортаноглотки с использованием аутологичных тканеинженерных эпителизированных лоскутов

И.В. Ребрикова, Е.А. Воротеяк, О.С. Роговая, А.П. Поляков, А.В. Мордовский, М.В. Ратушный, А.Д. Каприн, А.В. Васильев

Коронарный парадокс

В.В. Честухин, Ф.А. Блякман

ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ГЕОРГИЯ ПИНКУСОВИЧА ИТКИНА

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

Перечень материалов, опубликованных в 2022 году в журнале «Вестник трансплантологии и искусственных органов»

73	Biocompatible and functional properties of a microdispersed tissue-specific 3D matrix from decellularized porcine cartilage <i>E.A. Nemets, A.E. Lazhko, A.M. Grigoriev, Yu.B. Basok, A.D. Kirillova, V.I. Sevastianov</i>
85	Apoptotic bone marrow-derived mononuclear cells accelerate liver regeneration after extended resection <i>N.A. Onishchenko, A.O. Nikolskaya, Z.Z. Gonikova, L.A. Kirsanova, M.Yu. Shagidulin, V.I. Sevastianov</i>
94	Tissue-engineered vascular patches: comparative characteristics and preclinical test results in a sheep model <i>L.V. Antonova, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, V.N. Silnikov, E.O. Krivkina, V.G. Matveeva, E.A. Velikanova, E.A. Senokosova, M.Yu. Khanova, V.V. Sevostyanova, T.V. Glushkova, R.A. Mukhamadiyarov, L.S. Barbarash</i>
109	<i>In vitro</i> effect of bioscaffolds on viability and insulin-producing function of human islets of Langerhans <i>A.S. Ponomareva, N.V. Baranova, I.A. Miloserdov, V.I. Sevastianov</i>
	ORGAN DONATION
118	Predictors of hepatic steatosis in living liver donors <i>M.G. Minina, D.V. Voronov, A.A. Nevredimov, E.A. Tenchurina</i>
124	Use of polyclonal antibodies in brain-dead donors in kidney transplantation <i>D.O. Kuzmin, V.A. Manukovsky, S.F. Bagnenko, O.N. Reznik, A.N. Ananiev, O.A. Vorobyeva, S.L. Vorobyev, D.V. Gogolev, V.S. Daineko, A.A. Kutenkov, N.A. Chichagova, I.V. Uliankina</i>
	RELATED DISCIPLINES
135	Hypopharyngeal reconstruction using prelaminated autologous bio-engineered pectoralis major flaps <i>I.V. Rebrikova, E.A. Vorotelyak, O.S. Rogovaya, A.P. Polyakov, A.V. Mordovskiy, M.V. Ratushnyy, A.D. Kaprin, A.V. Vasiliev</i>
145	Coronary paradox <i>V.V. Chestukhin, F.A. Blyakhman</i>
152	IN MEMORY OF PROFESSOR GEORGY PINKUSOVICH ITKIN
	INFORMATION
153	Instructions to authors
157	On scientific and medical personnel training at Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs
158	List of articles, published in 2022 in «Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs»

КЛИНИЧЕСКАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ В РФ: ОТ ИННОВАЦИОННОЙ ФЕНОМЕНОЛОГИИ К ДОСТУПНОМУ ВИДУ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ

Глубокоуважаемые коллеги!

Трансплантация органов человека является выдающимся достижением медицинской науки и практики XX века, высшим проявлением гуманности в обществе, направленным на спасение жизни и здоровья пациентов с заболеваниями органов в терминальной стадии, когда иные способы лечения бессильны.

Вклад советских и российских хирургов, ученых в развитие мировой трансплантологии неограничен. В.П. Демихов в эксперименте доказал возможность проведения операций по пересадке органов. Первую в нашей стране успешную трансплантацию почки от родственного донора выполнил академик Б.В. Петровский 15 апреля 1965 года; 12 марта 1987 года первую успешную трансплантацию сердца провел выдающийся хирург и основатель отечественной трансплантологии В.И. Шумаков; в 1990 году бригадой хирургов под руководством профессора А.К. Ерамишанцева выполнена первая трансплантация печени.

К 2007 году, спустя 20 лет после первой успешной трансплантации сердца в стране, подобные операции выполнялись в трех городах – Москве, Екатеринбурге и Новосибирске, общим количеством 19 трансплантаций в год. Количество трансплантаций печени от посмертного донора было несколько больше, они выполнялись в Москве, Санкт-Петербурге, Екатеринбурге и Белгороде. Наиболее часто в стране выполнялась трансплантация почки, но во всех видах трансплантации объем операций был недостаточным.

2022 год отмечен двумя значимыми датами в истории отечественной трансплантологии – 35 лет успешной трансплантации сердца и 25 лет родственной трансплантации печени детям. Благодаря внедрению разработанных в последние годы

CLINICAL TRANSPLANTOLOGY IN THE RUSSIAN FEDERATION: FROM INNOVATIVE PHENOMENOLOGY TO ACCESSIBLE MEDICAL CARE

Dear colleagues,

Human organ transplantation is an outstanding achievement of medical science and practice in the 20th century. It is the highest manifestation of humanity in society, aimed at saving the life and health of patients with end-stage organ diseases, when other treatment methods are powerless.

The contribution by Soviet and Russian surgeons and scientists to the development of world transplantology is invaluable. Organ transplantation pioneer, Vladimir Demikhov, proved the feasibility of organ transplantation operations in his experiment. The first successful kidney transplantation in Russia was performed on April 15,

1965, by academician Boris Petrovsky. The first successful heart transplantation was performed on March 12, 1987, by Valery Shumakov, an outstanding surgeon and founder of Russian transplantology. In 1990, a surgical team, headed by Professor Alexander Yeramishantsev, carried out the first liver transplantation.

By 2007, 20 years after the first successful heart transplantation in the country, similar operations had been performed in three cities – Moscow, Yekaterinburg and Novosibirsk – with a total of 19 transplants per year. The number of deceased donor liver transplants was somewhat higher, performed in Moscow, St. Petersburg, Yekaterinburg, and Belgorod. Kidney transplantation was the most common transplant operation in Russia, but in all types of transplantation, the volume of operations was insufficient.

The year 2022 is marked by two significant dates in the history of Russian transplantology: 35 years of successful heart transplantation and 25 years of pediatric living related liver transplantation. Thanks to the implementation of scientific, technological, surgical,



научно-технологических, хирургических, клинических и организационных решений удалось многократно увеличить число операций по трансплантации солидных органов.

К настоящему времени в нашей стране создана и реализована высокоэффективная программа лечения больных с приобретенными и врожденными заболеваниями органов в терминальной стадии, взрослых и детей, в том числе самого раннего возраста и с малой массой тела. В России сейчас выполняется в год около 2500 трансплантаций органов, из них порядка 300 пересадок органов детям. Благодаря организованной системе отпала необходимость в направлении за рубеж российских детей для выполнения им трансплантации органов. Достигнута выживаемость пациентов на уровне лучших мировых показателей.

Существенно расширена география трансплантологической помощи: сейчас операции по трансплантации осуществляются в 62 учреждениях в 35 регионах РФ с населением 103,4 млн человек.

Создана система региональной координации донорства органов, разработаны нормативные документы по трансплантации печени, почки, сердца, легких.

Разработаны оригинальные высокоэффективные хирургические технологии. Мировой приоритет имеют операции по лапароскопическому изъятию фрагмента печени и почки у родственного донора, первая в мировой практике успешная трансплантация печени и двух легких ребенку (от посмертного взрослого донора) и др. Разработаны технологии трансплантации печени детям от донора, не совместимого по группе крови.

Успех в области трансплантации жизненно важных органов был бы невозможен без внедрения результатов научных исследований и разработок. Раскрыты фундаментальные основы иммунной толерантности, иммуносупрессии, молекулярные механизмы взаимоотношения трансплантата с организмом реципиента. Научно обоснованы и успешно внедрены в клиническую практику новые методы персонализированной диагностики и лечения; выполнены молекулярно-генетические, иммунологические исследования биомаркеров отторжения, фиброза трансплантированных почки, печени, сердца, легкого, кардинально изменившие принципы ведения и прогноз у реципиентов. Созданы и внедрены отечественные системы вспомогательного кровообращения.

Все перечисленное позволило превратить трансплантологию в нашей стране из области престижной инновационной феноменологии в реальный, доступный для населения вид медицинской помощи.

С уважением,
главный редактор
академик РАН С.В. Готье



clinical and organizational solutions developed in recent years, the number of solid organ transplantation operations has increased manifold.

To date, a highly effective treatment program has been created and implemented in our country for patients with acquired and congenital organ diseases in the terminal stage, adults and children, including very young age and low body weight. In Russia today, about 2,500 organ transplants are performed annually, including about 300 pediatric organ transplants. Thanks to the organized system, there is no longer the need to send Russian children abroad for organ transplants. Patient survival has reached the world's best levels.

The geographical footprint of transplant care has expanded considerably. Transplant operations are now carried out in 62 institutions spread across 35 regions of the Russian Federation with a population of 103.4 million people.

A system of regional organ donation coordination has been created, regulatory documents on liver, kidney, heart and lung transplantation have been developed.

Original highly efficient surgical techniques have been developed: laparoscopic liver and kidney resection from a related donor, etc. The world's first successful transplantation of a liver and two lungs in a child (from a deceased adult donor) was performed in Russia. Technologies for pediatric liver transplantation from a blood group incompatible donor have been developed.

Success in the field of vital organ transplantation would not have been possible without implementation of research and development results. The fundamental bases of immune tolerance, immunosuppression, molecular mechanisms of the relationship between graft and the recipient's body were revealed. New methods of personalized diagnosis and treatment were scientifically justified and successfully introduced into clinical practice; molecular-genetic, immunologic studies of rejection biomarkers, kidney, liver, heart, lung transplant fibrosis were performed, which radically changed the principles of recipient management and prognosis. Russian-made circulatory support systems have been created and implemented.

All of the above mentioned have made it possible to turn transplantology in our country from a field of prestigious innovative phenomenology into a real medical care that is accessible to everyone.

Sincerely,

S.V. Gautier
Editor-in-Chief,
Member, Russian Academy of Sciences

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-7-14

ФАКТОРЫ РИСКА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ ОТ ПОСМЕРТНОГО ДОНОРА: ОПЫТ ОДНОГО ЦЕНТРА

С.И. Зубенко¹, А.Р. Монахов^{1, 2}, М.А. Болдырев¹, В.Р. Салимов¹, А.Д. Смолянинова¹,
С.В. Готье^{1, 2}

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

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

Трансплантация печени от донора со смертью головного мозга – вмешательство высокого риска, на результаты которого влияет большое количество модифицируемых и немодифицируемых факторов. **Цель:** провести анализ собственного опыта и выявить предоперационные и периоперационные прогностические факторы риска неблагоприятного исхода при трансплантации печени. **Материалы и методы.** В исследование включены трансплантации печени (n = 301), выполненные за период с января 2016-го по декабрь 2021 г. Для анализа использованы характеристики доноров и реципиентов, интраоперационные данные, периоперационные характеристики, включая данные лабораторных тестов, а также характер и частоту осложнений. **Результаты.** Выживаемость реципиентов составила: 91,8; 85,1 и 77,9% на сроке 1, 3 и 5 лет после операции; выживаемость трансплантатов – 90,4; 83,7 и 76,7% соответственно. Наиболее значимыми предикторами неблагоприятного исхода трансплантации печени со стороны реципиента стали наличие билиарных стентов (HR 7,203, p < 0,01), острая декомпенсация течения цирроза печени (HR 2,52, p = 0,02); в послеоперационном периоде – нехирургические инфекционные осложнения (HR 4,592, p < 0,01) и количество повторных операций (HR 4,063, p < 0,01). Уровень креатинина донора (HR 1,004, p = 0,01 – однофакторный анализ; HR 1,004, p = 0,016 – многофакторный анализ) является единственным достоверным прогностически негативным фактором. **Выводы.** Выполнение трансплантации печени с учетом установленных факторов риска позволит улучшить результаты операций, а также персонализировать терапию для каждого пациента.

Ключевые слова: трансплантация печени, посмертное донорство, факторы риска.

RISK FACTORS IN DECEASED DONOR LIVER TRANSPLANTATION: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE

S.I. Zubenko¹, A.R. Monakhov^{1, 2}, M.A. Boldyrev¹, V.R. Salimov¹, A.D. Smolyaninova¹,
S.V. Gautier^{1, 2}

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Deceased brain-dead donor liver transplantation (LT) is a high-risk intervention. The outcome depends on a large number of modifiable and non-modifiable factors. **Objective:** to analyze our own experience and identify preoperative and perioperative prognostic factors for poor outcomes in LT. **Materials and methods.** The study included 301 liver transplants performed between January 2016 and December 2021. Donor and recipient characteristics, intraoperative data, perioperative characteristics including laboratory test data, and the nature and frequency of complications were used for the analysis. **Results.** The 1-, 3- and 5-year recipient survival rates were 91.8%, 85.1%, and 77.9%, respectively; graft survival rates were 90.4%, 83.7%, and 76.7%, respectively. The most significant predictors of poor outcome of LT on the recipient side were biliary stents (HR 7.203,

Для корреспонденции: Зубенко Степан Игоревич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (495) 190-35-62. E-mail: zubenko_transpl@yahoo.com

Corresponding author: Stepan Zubenko. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (495) 190-35-62. E-mail: zubenko_transpl@yahoo.com

$p < 0.01$), acutely decompensated cirrhosis (HR 2.52, $p = 0.02$); in the postoperative period, non-surgical infectious complications (HR 4.592, $p < 0.01$) and number of reoperations (HR 4.063, $p < 0.01$). Donor creatinine level (HR 1.004, $p = 0.01$, one factor analysis; HR 1.004, $p = 0.016$, multivariate analysis) was the only reliable prognostic negative factor. **Conclusion.** LT taking into account established risk factors will improve surgery outcomes and help personalize the therapy for each patient.

Keywords: liver transplantation, deceased donor, expanded criteria donor, risk factors.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени является операцией высокого риска [1]. Большое количество сопутствующих осложненному течению цирроза печени состояний обуславливает более тяжелый исходный статус реципиента с повышением ранней и отдаленной летальности [2, 3]. С развитием техники операций уменьшается число хирургических противопоказаний к трансплантации печени, таких как тромбоз воротной вены [4]. Прогрессивное развитие трансплантационной онкологии также приводит в лист ожидания донорской печени большое количество пациентов, ранее считавшихся нетрансплантабельными [5]. Расширение показаний к трансплантации печени приводит к увеличению диспропорции между числом пациентов, ожидающих трансплантацию печени, и количеством доступных донорских органов, и как следствие, к увеличению смертности в листе ожидания [2, 6]. Стремясь максимально использовать имеющиеся донорские органы, многие центры выходят за рамки традиционного «идеального» донора и включают использование расширенных критериев пригодности донорских органов [7]. Особенности донорских органов имеют влияние как на непосредственные, так и на отдаленные результаты трансплантации печени [8]. Перечисленные особенности обуславливают сохраняющуюся актуальность оценки и переоценки факторов риска неблагоприятных исходов трансплантации печени с целью стратификации реципиентов и выполнения операции с оптимальным результатом для каждого пациента.

Распределение органов с учетом факторов риска как донора, так и реципиента способствует снижению риска потери трансплантата и послеоперационной летальности [9, 10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены трансплантации печени от донора со смертью головного мозга взрослым реципиентам, выполненные на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России в период с января 2016-го по декабрь 2021 г.

Были собраны и проанализированы данные о реципиентах: демографические характеристики, антропометрия, индекс тяжести заболевания печени

(MELD), сопутствующие характеристики, влияющие на тяжесть заболевания печени. Кроме того, были проанализированы интраоперационные данные выполненной трансплантации печени, наличие послеоперационных осложнений, динамика лабораторных показателей в послеоперационном периоде, а также выживаемость реципиентов и трансплантатов.

Для оценки качества полученного трансплантата нами были использованы антропометрические и демографические показатели доноров, данные лабораторных исследований, величина вазопрессорной поддержки, тип полученного трансплантата, а также результаты гистологического исследования (микроскопия «нулевой биопсии»).

Методика изъятия печени

В нашем центре используется модификация «быстрого» изъятия печени с исключительно артериальной перфузией печени [11]. Оценка пригодности трансплантата осуществлялась на основании предварительной клинической оценки донора, комплексного абдоминального ультразвукового исследования, визуальной оценки трансплантата. Результаты «нулевой» биопсии донорской печени учитывались ретроспективно.

Методика имплантации печени

Особенности хирургической техники, принятой в нашем центре при трансплантации печени от посмертного донора, подробно изложены в предыдущих работах [12, 13]. Выбор методики кавальной реконструкции определялся интраоперационными характеристиками гемодинамики реципиента [14].

В послеоперационном периоде назначалась иммуносупрессивная терапия по принятым протоколам, в зависимости от исходного заболевания [15]. Наблюдение за пациентами на сроках от 1 до 3 месяцев осуществляется хирургами-трансплантологами с последующей передачей гепатологу для долгосрочного наблюдения.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием пакета IBM SPSS Statistics 23. Количественные переменные выражены в значении медианы и диапазона значений, качественные переменные – в числах и процентах. Выживаемость пациентов и

трансплантатов определялась методом Каплана–Мейера. Мультивариантная регрессия Кокса (модель

Таблица 1

Характеристики реципиентов печени (n = 301)
Characteristics of liver recipients (n = 301)

Показатель	Медиана (min–max)
Возраст, лет	43 (18–72)
Мужской пол, n (%)	148 (49,2)
ИМТ, кг/м ²	24 (15–40)
Сопутствующие состояния, n (%)	
Тромбофилия	7 (2,3)
Предшествующие операции	29 (9,6)
TIPS	5 (1,7)
Билиарные дренажи/стенты	4 (1,3)
Тяжесть заболевания печени	
MELD	18 (7–40)
Фульминантное поражение печени, n (%)	7 (2,3)
Острая декомпенсация цирроза печени, n (%)	22 (7,3)
ГРС, n (%)	88 (29,2)
Срок ожидания, мес.	5 (0–48)

Примечание. ГРС – гепаторенальный синдром.

Note. ГРС – hepatorenal syndrom.

Таблица 2

Характеристики посмертных доноров печени (n = 301)
Characteristics of deceased liver donors (n = 301)

Показатель	Медиана (min–max)
Мужской пол, n (%)	203 (67,4)
Возраст, лет	48 (18–73)
ИМТ, кг/м ²	26 (17–48)
Тип графта, n (%)	
Целая печень	284 (94,4)
Сплит – РПД	17 (5,6)
DRI	1,45 ± 0,28
Стеатоз*, n (%)	
Минимальный	181 (79,0)
Умеренный	19 (8,3)
Выраженный	29 (12,7)
Фиброз*, n (%)	
F = 0	152 (66,4)
F = 1	60 (26,2)
F = 2	17 (7,4)
Лабораторные показатели	
АЛТ	28 (1–436)
АСТ	35 (8–1099)
Билирубин общий	11 (1–96)
Креатинин	101 (6–720)
Натрий	145 (124–176)

* – в анализ включено 229 гистологических исследований.

* – 229 biopsies were included in the analysis.

пропорциональных рисков) была использована для определения факторов риска. Для оценки шансов риска потери трансплантата / смерти реципиента применяли показатель отношения рисков (Hazard Ratio, HR) с указанием значения его 95% доверительного интервала (ДИ). Уровень значимости считался достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

С января 2016-го по декабрь 2021 года на базе НМИЦ ТИО выполнено 34 трансплантации печени от посмертного донора взрослым реципиентам. При проведении гистологического исследования эксплантата в 3 случаях верифицирован опухолевый тромбоз воротной вены при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). Пациенты были исключены из исследования в связи с превышением критериев UCSF для трансплантации печени при ГЦК.

Общие характеристики реципиентов приведены в табл. 1.

Характеристика доноров

Основные параметры, использованные при оценке доноров со смертью головного мозга, приведены в табл. 2.

Обращает на себя внимание относительно высокий индекс DRI. Согласно оригинальной статье Feng et al., выживаемость реципиентов при значении DRI от 1,4 до 1,5 составляет 79,7% в течение одного года [16].

Периоперационные параметры

Проанализированы временные характеристики операции, объем кровопотери, потребность в гемотрансфузиях, а также лабораторные показатели, отражающие функцию печени на 1, 5 и 30-е сутки послеоперационного периода. Сводные данные приведены в табл. 3.

Осложнения и выживаемость

С целью определения негативных прогностических событий в послеоперационном периоде нами была проведена комплексная оценка осложнений с подсчетом Comprehensive Complication Index. Сводные данные приведены в табл. 4.

Актуарная выживаемость реципиентов и трансплантатов после трансплантации проанализирована с помощью метода Каплана–Мейера (рис.).

Определение факторов риска

На основании полученных данных проведен статистический анализ с помощью регрессионной модели Кокса в однофакторном и многофакторном вариантах (табл. 5, 6).

Таблица 3

Периоперационные характеристики реципиентов

Perioperative characteristics of recipients

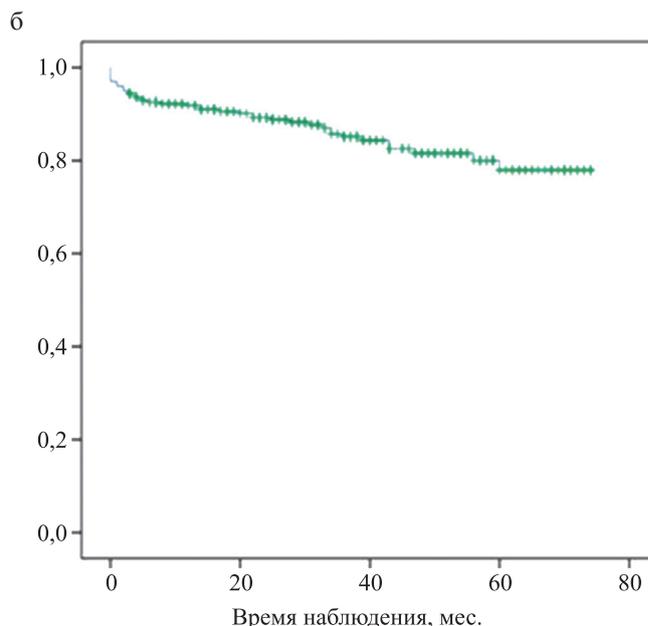
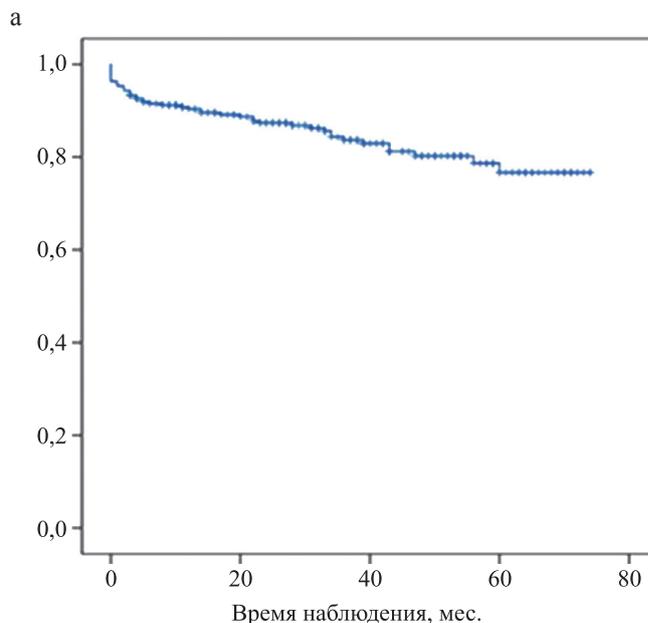
Показатель	Медиана (min-max)
Время, мин	347 (185-805)
Холодовая ишемия, мин	288 (105-744)
Тепловая ишемия, мин	30 (12-80)
Билиарная ишемия, мин	31 (10-400)
Кровопотеря, мл	1000 (200-10 000)
СЗП, доз	6 (1-28)
ЭрМ, доз	2 (0-11)
Классическая кавальная реконструкция, n (%)	283 (94)
Лабораторные показатели	
1-е сутки после операции	
АЛТ	493 (23-6919)
АСТ	481 (28-21 280)
Билирубин общий	46 (11-874)
Креатинин	81 (26-576)
МНО	2 (1-4)
5-е сутки после операции	
АЛТ	195 (29-4260)
АСТ	88 (6-4435)
Билирубин общий	40 (6-477)
Креатинин	82 (28-382)
МНО	1 (1-2)
30-е сутки после операции	
АЛТ	30 (1-694)
АСТ	23 (3-809)
Билирубин общий	19 (2-292)
Креатинин	90 (34-537)
МНО	1 (1-3)

Таблица 4

Послеоперационные осложнения
Postoperative complications

Показатель	n (%)
Кровотечения	25 (8,3)
Артериальные осложнения	
Обкрадывание	4 (1,32)
Стеноз	4 (1,32)
Тромбоз	7 (2,32)
Желчные осложнения	
Ранняя стриктура	13 (4,3)
Поздняя стриктура	8 (2,7)
Свищ	4 (1,32)
Раневая инфекция	26 (8,6)
Повторные вмешательства	60 (19,9)
Отторжения	24 (8)
Нехирургические инфекционные осложнения	42 (14)
CCI (медиана, min-max)	0 (0-100)
Койко-день (медиана, min-max)	17 (1-177)
Ретрансплантации	5 (1,7)

Мужской пол реципиента (HR 0,55; ДИ 0,3-0,98; p = 0,04) снижает риск неблагоприятного исхода. Носительство дренажей, внутривенных стентов достоверно увеличивает риск смерти реципиента (HR 7,203; ДИ 1,699-30,534; p < 0,01). Острая декомпенсация хронического заболевания печени увеличивает риск более чем в 2 раза (HR 2,52; ДИ 1,128-5,631;



n = 301	12 месяцев	36 месяцев	60 месяцев
Выживаемость трансплантатов, % (n)	90,4 (227)	83,7 (129)	76,7 (38)
Выживаемость реципиентов, % (n)	91,8 (231)	85,1 (130)	77,9 (38)

Рис. Выживаемость после трансплантации печени: а – выживаемость трансплантатов; б – выживаемость реципиентов

Fig. Survival after liver transplantation: а – graft survival; б – recipient survival

$p = 0,02$). Уровень креатинина стал единственным из оцениваемых донорских критериев, достоверно влияющих на исход трансплантации.

Временные характеристики трансплантации печени, величина кровопотери, а также большая потребность в трансфузионных средах достоверно снижали выживаемость реципиентов и трансплантатов. При анализе послеоперационных лабораторных показателей достоверность определена практически для

всех исследуемых величин. Среди выявленных факторов риска наибольшим влиянием на результаты трансплантации печени обладает величина МНО. Ряд осложнений послеоперационного периода также увеличивал риск потери трансплантированной печени. Наибольшей негативной прогностической значимостью обладают развитие желчных свищей, нехирургические инфекционные осложнения, коли-

Таблица 5

Определение факторов риска (унивариантный анализ)

Risk factors (univariate analysis)

Показатель	HR	ДИ 95%	p
Факторы реципиента			
Возраст	1,025	0,99–1,05	0,06
Мужской пол	0,55	0,3–0,98	0,04
ИМТ	0,96	0,89–1,04	0,37
Тромбофилия	1,631	0,223–11,938	0,63
Тромбоз воротной вены	1,424	0,723–2,792	0,31
Распространенный ТВВ	1,448	0,519–4,039	0,48
Предшествующие операции	1,379	0,617–3,083	0,43
TIPS	1,452	0,2–10,554	0,71
Билиарные дренажи/стенты	7,203	1,699–30,534	<0,01
MELD	1,027	0,992–1,063	0,13
Фульминантная печеночная недостаточность	0,917	0,126–6,65	0,93
Острая декомпенсация цирроза	2,52	1,128–5,631	0,02
ГПС	1,589	0,885–2,854	0,12
Срок ожидания	0,91	0,853–0,972	<0,01
Факторы донора			
Возраст	0,994	0,97–1,018	0,62
Мужской пол	0,873	0,467–1,632	0,67
ИМТ	1,004	0,952–1,06	0,88
Тип графта	0,385	0,053–2,975	0,35
DRI	0,654	0,228–1,871	0,43
DRI >1,7	0,781	0,349–1,746	0,55
АЛТ	0,996	0,988–1,004	0,36
АСТ	1	0,997–1,003	0,91
Креатинин	1,004	1,002–1,006	0,01
Билирубин	0,988	0,957–1,021	0,48
Нагрый	1,002	0,971–1,034	0,91
Норадреналин	1	1,0–1,001	0,16
Допамин	0,941	0,788–1,123	0,5
Стеатоз	0,939	0,56–1,573	0,81
Фиброз	0,675	0,369–1,237	0,2
Интраоперационные факторы			
Продолжительность операции	1,005	1,003–1,007	<0,01
Время консервации	1,002	1,0–1,005	0,06
Вторичная тепловая ишемия	1,002	0,995–1,008	0,62

Показатель	HR	ДИ 95%	p
Билиарная ишемия	1,009	1,004–1,013	<0,01
Тип кавальной реконструкции	0,046	0–13,463	0,29
Кровопотеря	1	1,0–1,0	<0,01
СЗП	1,11	1,055–1,168	<0,01
ЭрМ	1,28	1,164–1,409	<0,01
Послеоперационные показатели			
1-е сутки			
АЛТ	1	1,0–1,001	<0,01
АСТ	1	1,0–1,0	<0,01
Билирубин	1,003	1,001–1,01	<0,01
Креатинин	1,004	1,001–1,007	0,03
МНО	1,998	1,201–3,324	<0,01
5-е сутки			
АЛТ	1	1,0–1,001	0,29
АСТ	1	0,999–1,001	0,9
Билирубин	1,005	1,003–1,008	<0,01
Креатинин	1,005	1,001–1,009	0,01
МНО	4,228	1,392–12,838	0,01
30-е сутки			
АЛТ	1,001	0,999–1,004	0,28
АСТ	1,002	0,999–1,004	0,19
МНО	4,196	1,564–11,255	<0,01
Креатинин	1,004	1,001–1,008	0,02
Билирубин	1,012	1,008–1,017	<0,01
Осложнения			
Повторные операции	4,063	2,267–7,823	<0,01
Нехирургическая инфекция	4,592	2,526–8,346	<0,01
Раневая инфекция	1,722	0,838–3,538	0,14
Отторжение	1,04	0,416–2,603	0,93
Кровотечение	3,64	1,746–7,591	<0,01
Артериальные осложнения (любые)	1,967	0,705–5,489	0,2
Тромбоз артерии трансплантата	3,682	1,136–11,93	0,03
Билиарные осложнения (любые)	2,57	1,199–5,508	0,015
Билиарная стриктура (любой срок)	2,067	0,877–4,875	0,1
Желчный свищ	5,619	1,354–23,328	0,017
ССИ	1,04	1,03–1,049	<0,01

Таблица 6
Факторы риска (мультивариантный анализ)
Risk factors (multivariate analysis)

Показатель	HR	ДИ 95%	p
Факторы реципиента			
Мужской пол	1,665	0,821–3,376	0,157
Билиарные стенты/дренажи	0,923	0,318–2,682	0,88
Острая декомпенсация цирроза	0,179	0,03–1,068	0,06
Факторы донора			
Креатинин	1,004	1,002–1,007	0,016
Интраоперационные факторы			
Продолжительность операции	1,001	0,997–1,005	0,61
Билиарная ишемия	1,001	0,993–1,008	0,89
Кровопотеря	1	1,0–1,0	0,53
СЗП	1,037	0,938–1,147	0,47
ЭрМ	1,062	0,873–1,292	0,55
Послеоперационные показатели			
1-е сутки			
АЛТ	1	0,999–1,001	0,9
АСТ	1	1,0–1,0	0,23
Билирубин	1,001	0,996–1,006	0,65
Креатинин	0,999	0,993–1,005	0,75
МНО	1,623	0,756–3,484	0,21
5-е сутки			
Билирубин	1	0,994–1,007	0,95
Креатинин	1	0,992–1,008	0,94
МНО	0,397	0,069–2,269	0,3
30-е сутки			
Билирубин	1,003	0,995–1,011	0,48
Креатинин	1,001	0,995–1,007	0,75
МНО	0,589	0,109–3,186	0,54
Осложнения			
Кровотечение	2,067	0,715–5,972	0,18
Тромбоз артерии трансплантата	0,522	0,112–2,429	0,41
Билиарные осложнения (любые)	0,62	0,228–1,69	0,35
Желчный свищ	2,762	0,373–20,457	0,32

чество повторных операций, а также тромбоз артерии трансплантата.

На основании выявленных факторов риска был проведен многофакторный анализ с помощью регрессионной модели Кокса.

По результатам многофакторного анализа достоверным влиянием на результаты трансплантации печени обладал уровень креатинина донора печени (HR 1,004; ДИ 1,002–1,007; p = 0,016).

ОБСУЖДЕНИЕ

Связь пола и летальности показана в недавнем большом исследовании Serrano et al. Для пациен-

тов мужского пола характерна более низкая ранняя летальность при более высокой общей и отдаленной смертности [17]. Длительное ношение условно стерильных имплантатов повышает риск развития инфекционных осложнений [18]. В связи с высокой частотой стационарного лечения наиболее часто у таких реципиентов преобладает высевание мультирезистентной госпитальной микрофлоры [19], что в сочетании с иммуносупрессивной терапией в посттрансплантационном периоде обуславливает высокий риск инфекционных осложнений с потенциальной генерализацией [20]. Острая декомпенсация цирроза печени также повышала риск смерти реципиента более чем в 2,5 раза. Развитие органной дисфункции на фоне существующего хронического заболевания печени характеризуется значительным повышением летальности пациентов [21].

Связь донорского креатинина с результатами трансплантации печени нашла свое отражение, в частности, в прогностической шкале SOFT [22]. Однако механизм этого влияния достоверно не установлен. Уровень креатинина, по мнению Rogers et al., может отражать степень вторичного ишемического повреждения паренхимы донорской печени. Однако авторы предостерегают от распределения органов с учетом данного фактора, подчеркивая необходимость дальнейших исследований [23]. Отсутствие влияния показателя DRI на результаты трансплантации печени в нашем исследовании подтверждается более поздними работами многих авторов [24, 25]. Таким образом, можно поставить вопрос о переходе на более современные шкалы оценки качества органов от доноров со смертью головного мозга для более прецизионного распределения в зависимости от особенностей реципиента [22].

Большая величина кровопотери и потребность в интраоперационной гемотрансфузии связана с большей частотой инфекционных осложнений, почечной дисфункцией и худшей выживаемостью после ОТП [26].

В исследовании Rostved et al. показана прогностическая ценность индекса MELD в раннем посттрансплантационном периоде для определения риска потери трансплантата печени в течение первого года [27]. Величина МНО в значительной степени отражает выраженность нарушения синтетической функции трансплантата, что связано с более высокой послеоперационной летальностью [28]. Выраженность коагулопатии косвенно отражает степень полиорганной дисфункции, что наиболее актуально для пациентов с септическим статусом [29, 30]. Таким образом, более высокий уровень МНО может быть использован как негативный прогностический критерий при трансплантации печени [28, 31].

ВЫВОДЫ

В нашем исследовании определены прогностические факторы риска неблагоприятного исхода трансплантации печени от посмертного донора. Выполнение трансплантации печени с учетом полученных данных позволит улучшить результаты операций, а также персонализировать стратегию лечения каждого пациента.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Busuttil RW, Klintmalm G.* Transplantation of the Liver 3rd Edition. Elsevier Health Sciences. 2014: 1538.
2. *Montenovo M, Rahneimai-Azar A, Reyes J, Perkins J.* Clinical Impact and Risk Factors of Portal Vein Thrombosis for Patients on Wait List for Liver Transplant. *Exp Clin Transplant.* 2018 Apr; 16 (2): 166–171. doi: 10.6002/ect.2016.0277. Epub 2017 Jun 16. PMID: 286216359.
3. *Ebadi M, Montano-Loza AJ.* Sarcopenia and Frailty in the Prognosis of Patients on the Liver Transplant Waiting List. *Liver Transpl.* 2019 Jan; 25 (1): 7–9. doi: 10.1002/lt.25386. PMID: 30472786.
4. *Qi X, Dai J, Jia J, Ren W, Yang M, Li H et al.* Association between portal vein thrombosis and survival of liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Gastrointest Liver Dis.* 2015 Mar; 24 (1): 51–59, 4 p following 59. doi: 10.15403/jgld.2014.1121.qix. PMID: 25822434.
5. *Поршеников ИА, Соколов АВ, Щекина ЕЕ, Чубуков АЮ, Третьякова ТА, Останина ИБ и др.* Трансплантация печени при метастатическом колоректальном раке (клиническое наблюдение). *Анналы хирургической гепатологии.* 2018; 23 (4): 54–67. *Porshennikov IA, Sokolov AV, Shchekina EE, Chubukov AYU, Tret'yakova TA, Ostanina IB i dr.* Transplantatsiya pecheni pri metastaticheskom kolorektal'nom rake (klinicheskoe nablyudenie). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii.* 2018; 23 (4): 54–67. <https://doi.org/10.16931/1995-5464.2018454-67>.
6. *Orman ES, Barritt AS, Wheeler SB, Hayashi PH.* Declining liver utilization for transplantation in the United States and the impact of donation after cardiac death. *Liver Transpl.* 2013; 19: 59–68.
7. *Готье СВ, Корнилов МН, Милосердов ИА и др.* Трансплантация печени от доноров старше 60 лет. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (1): 6–12. *Gautier SV, Kornilov MN, Miloserdov IA i dr.* Transplantatsiya pecheni ot donorov starshe 60 let. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2018; 20 (1): 6–12.
8. *Stine JG, Argo CK, Pelletier SJ, Maluf DG, Northup PG.* Liver transplant recipients with portal vein thrombosis receiving an organ from a high-risk donor are at an increased risk for graft loss due to hepatic artery thrombosis. *Transpl Int.* 2016 Dec; 29 (12): 1286–1295. doi: 10.1111/tri.12855. Epub 2016 Oct 6. PMID: 27714853; PMCID: PMC5154764.
9. *Nacif LS, Zanini LY, Pinheiro RS, Waisberg DR, Rocha-Santos V, Andraus W et al.* Portal vein surgical treatment on non-tumoral portal vein thrombosis in liver transplantation: Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinics (Sao Paulo).* 2021 Jan 22; 76: e2184. doi: 10.6061/clinics/2021/e2184. PMID: 33503185; PMCID: PMC7811829.
10. *Stine JG, Northup PG.* Management of Non-tumoral Portal Vein Thrombosis in Patients with Cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2019 Mar; 64 (3): 619–626. doi: 10.1007/s10620-018-5427-3. PMID: 30560339.
11. *Погребниченко ИВ.* Эффективное использование печени мультиорганного донора для трансплантации: дис. ... канд. мед. наук. М., 2014. 143. *Pogrebniichenko IV.* Jeffektivnoe ispol'zovanie pecheni mul'tiorgannogo donora dlja transplantacii [Dissertation]. М.: 2014. 143.
12. *Латыпов РА.* Сплит-трансплантация печени: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.24. М., 2019. 125. *Latyrov RA.* Split-transplantatsiya pecheni: dis. ... kand. med. nauk: 14.01.24. М., 2019. 125.
13. *Восканов МА.* Интервенционные методы коррекции сосудистых осложнений и билиодигестивных стриктур после трансплантации печени у детей: дис. ... канд. мед. наук: 14.01.24. М., 2020. 109. *Voskanov MA.* Interventsionnye metody korrektsii sosudistykh oslozhneniy i biliodigestivnykh striktur posle transplantatsii pecheni u detey: dis. ... kand. med. nauk: 14.01.24. М., 2020. 109.
14. *Готье СВ, Попцов ВН, Корнилов МН и др.* Методика кавальной реконструкции при трансплантации печени от посмертного донора – выбор хирурга или анестезиолога. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (S1): 62. *Gautier SV, Poptsov VN, Kornilov MN i dr.* Metodika kaval'noy rekonstruktsii pri transplantatsii pecheni ot posmertnogo donora – vybor khirurga ili anesteziologa. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2018; 20 (S1): 62.
15. Трансплантация печени: национальные клинические рекомендации / Общероссийская общественная организация трансплантологов «Российское трансплантологическое общество». М., 2016. 61. *Transplantatsiya pecheni: natsional'nye klinicheskie rekomendatsii / Obshcherossiyskaya obshchestvennaya organizatsiya transplantologov «Rossiyskoe transplantologicheskoe obshchestvo».* М., 2016. 61.
16. *Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA et al.* Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006 Apr; 6 (4): 783–790. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01242.x. Erratum in: *Am J Transplant.* 2018 Dec; 18 (12): 3085. PMID: 16539636, 165.
17. *Serrano MT, Sabroso S, Esteban LM, Berenguer M, Fondevila C, Lorente S et al.* Mortality and Causes of Death After Liver Transplantation: Analysis of Sex Differences in a Large Nationwide Cohort. *Transpl Int.* 2022

- May 9; 35: 10263. doi: 10.3389/ti.2022.10263. PMID: 35615539; PMCID: PMC9124758.
18. Isik O, Kaya E, Sarkut P, Dundar HZ. Factors Affecting Surgical Site Infection Rates in Hepatobiliary Surgery. *Surg Infect (Larchmt)*. 2015 Jun; 16 (3): 281–286. doi: 10.1089/sur.2013.195. Epub 2015 Apr 1. PMID: 25830815.
 19. Vaishnavi C, Samanta J, Kochhar R. Characterization of biofilms in biliary stents and potential factors involved in occlusion. *World J Gastroenterol*. 2018 Jan 7; 24 (1): 112–123. doi: 10.3748/wjg.v24.i1.112. PMID: 29358888; PMCID: PMC5757116.
 20. Kim YJ, Yoon JH, Kim SI, Choi HJ, Choi JY, Yoon SK et al. Impact of Pretransplant Infections on Clinical Course in Liver Transplant Recipients. *Transplant Proc*. 2018 May; 50 (4): 1153–1156. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.01.036. PMID: 29731084.
 21. Sarin SK, Choudhury A, Sharma MK, Maiwall R, Al Mahtab M, Rahman S et al. APASL ACLF Research Consortium (AARC) for APASL ACLF working Party. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update. *Hepatology Int*. 2019 Jul; 13 (4): 353–390. doi: 10.1007/s12072-019-09946-3. Epub 2019 Jun 6. Erratum in: *Hepatology Int*. 2019 Nov; 13 (6): 826–828. PMID: 31172417; PMCID: PMC6728300.
 22. Tortoroli F, Watanabe RK, Tabushi FI, Peixoto IL, Nassif PAN, Tefilli NL et al. Bar, soft and dri post-hepatic transplantation: what is the best for survival analysis? *Arq Bras Cir Dig*. 2021 Jun 11; 34 (1): e1576. doi: 10.1590/0102-672020210001e1576. PMID: 34133523; PMCID: PMC8195467.
 23. Rogers ME, Delman A, Campbell K, Miethke A, Tiao G, Mullapudi B, Bondoc A. Children undergoing early liver re-transplantation for primary non-function have improved survival. *Pediatr Transplant*. 2022 Jun 25: e14347. doi: 10.1111/petr.14347. Epub ahead of print. PMID: 35751646.
 24. Boecker J, Czigany Z, Bednarsch J, Amygdalos I, Meister F, Santana DAM et al. Potential value and limitations of different clinical scoring systems in the assessment of short- and long-term outcome following orthotopic liver transplantation. *PLoS One*. 2019 Mar 21; 14 (3): e0214221. doi: 10.1371/journal.pone.0214221. PMID: 30897167; PMCID: PMC6428268.
 25. Rauchfuss F, Zidan A, Scheuerlein H, Dittmar Y, Bauschke A, Settmacher U. Waiting time, not donor-risk-index, is a major determinant for beneficial outcome after liver transplantation in high-MELD patients. *Ann Transplant*. 2013 May 28; 18: 243–247. doi: 10.12659/AOT.883924. PMID: 23792527.
 26. Teofili L, Valentini CG, Aceto P, Bartolo M, Sollazzi L, Agnes S et al. High intraoperative blood product requirements in liver transplantation: risk factors and impact on the outcome. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2022 Jan; 26 (1): 64–75. doi: 10.26355/eurrev_202201_27749. PMID: 35049021.
 27. Rostved AA, Lundgren JD, Hillingsø J, Peters L, Mccroft A, Rasmussen A. MELD score measured day 10 after orthotopic liver transplantation predicts death and re-transplantation within the first year. *Scand J Gastroenterol*. 2016 Nov; 51 (11): 1360–1366. doi: 10.1080/00365521.2016.1196497. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27319374.
 28. Okamura Y, Yagi S, Sato T, Hata K, Ogawa E, Yoshizawa A et al. Coexistence of Bilirubin ≥ 10 mg/dL and Prothrombin Time-International Normalized Ratio ≥ 1.6 on Day 7: A Strong Predictor of Early Graft Loss After Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation*. 2018 Mar; 102 (3): 440–447. doi: 10.1097/TP.0000000000001959. PMID: 28968350.
 29. Chen RX, Wu ZQ, Li ZY, Wang HZ, Ji JF. Prognostic predictors in patients with sepsis after gastrointestinal tumor surgery: A retrospective study. *World J Gastrointest Surg*. 2021 Mar 27; 13 (3): 256–266. doi: 10.4240/wjgs.v13.i3.256. PMID: 33796214; PMCID: PMC7992996.
 30. Liu J, Bai C, Li B, Shan A, Shi F, Yao C et al. Mortality prediction using a novel combination of biomarkers in the first day of sepsis in intensive care units. *Sci Rep*. 2021 Jan 14; 11 (1): 1275. doi: 10.1038/s41598-020-79843-5. PMID: 33446739; PMCID: PMC7809407.
 31. Ben-Ari Z, Weiss-Schmilovitz H, Sulkes J, Brown M, Bar-Nathan N, Shaharabani E et al. Serum cholestasis markers as predictors of early outcome after liver transplantation. *Clin Transplant*. 2004 Apr; 18 (2): 130–136. doi: 10.1046/j.1399-0012.2003.00135.x. PMID: 15016125.

Статья поступила в редакцию 30.08.2022 г.
The article was submitted to the journal on 30.08.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-15-23

БЕРЕМЕННОСТЬ ПОСЛЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ У ПАЦИЕНТКИ С ТРАНСПЛАНТИРОВАННОЙ ПОЧКОЙ: КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Е.И. Прокопенко^{1, 2}, В.М. Гурьева², В.А. Петрухин², К.В. Краснополянская²,
Ф.Ф. Бурумкулова², Д.В. Губина¹*

¹ ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация

² ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», Москва, Российская Федерация

Трансплантация почки (ТП), являющаяся оптимальным методом лечения ХБП 5-й стадии, восстанавливает нарушенную фертильность у большинства женщин репродуктивного возраста. Однако у части пациенток после успешной ТП выявляется бесплодие. Мы приводим собственный опыт преодоления вторичного трубного бесплодия с помощью экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у 36-летней пациентки с трансплантированной почкой, имевшей две потери беременности в анамнезе из-за тяжелой преэклампсии (ПЭ). После второй попытки ЭКО-крио на фоне заместительной гормональной терапии, переноса одного эмбриона в полость матки наступила беременность. В первом триместре диагностирован гестационный сахарный диабет (ГСД), назначена диета. В течение беременности проводилась иммуносупрессия такролимусом, азатиоприном и метилпреднизолоном, профилактика ПЭ низкомолекулярным гепарином и антиагрегантами. В 37–38 недель выполнено плановое кесарево сечение, родился здоровый мальчик массой 2760 г (25-й перцентиль), ростом 48 см (36-й перцентиль). Пребывания в отделении реанимации новорожденных не потребовалось. Ребенок растет и развивается нормально, у матери функция ренального трансплантата удовлетворительная. Таким образом, ЭКО может с успехом использоваться у пациенток после ТП с бесплодием при условии тщательного контроля программы ЭКО и мультидисциплинарного ведения беременности.

Ключевые слова: трансплантация почки, бесплодие, беременность, вспомогательные репродуктивные технологии, экстракорпоральное оплодотворение.

IVF PREGNANCY AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: CLINICAL CASE AND LITERATURE REVIEW

*E.I. Prokopenko^{1, 2}, V.M. Guryeva², V.A. Petrukhin², K.V. Krasnopol'skaya²,
F.F. Burumkulova², D.V. Gubina¹*

¹ Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

² Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russian Federation

Kidney transplantation (KT), the optimal treatment for stage 5 chronic kidney disease (CKD), restores impaired fertility in most women of reproductive age. However, infertility occurs in some patients after successful KT. We present our own experience of overcoming secondary tubal infertility by in vitro fertilization (IVF). The patient was a 36-year-old with a transplanted kidney, who had lost two pregnancies in the past due to severe preeclampsia (PE). After the second attempt on cryo-thawed embryo transfer against the background of hormone replacement therapy, one embryo was transferred into the uterus, resulting in pregnancy. Gestational diabetes mellitus (GDM) was diagnosed in the first trimester, and a diet was prescribed. Immunosuppression with tacrolimus, azathioprine

Для корреспонденции: Прокопенко Елена Ивановна. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, д. 61/2.
Тел. (495) 681-55-85. E-mail: renalnephron@gmail.com

Corresponding author: Elena Prokopenko. Address: 61/2, Shchepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation.
Phone: (495) 681-55-85. E-mail: renalnephron@gmail.com

and methylprednisolone, prophylaxis of PE with low molecular weight heparin and antiplatelet drugs were administered during pregnancy. Elective cesarean section was performed at 37–38 weeks and a healthy boy was born, weighing 2760 g (25th percentile), 48 cm tall (36th percentile). A stay in the neonatal intensive care unit was not required. The baby is growing and developing normally, the mother's renal graft function is satisfactory. So, IVF can be successfully used in post-KT patients with infertility issues, provided that the IVF program is carefully controlled, and the pregnancy is managed in a multidisciplinary manner.

Keywords: kidney transplantation, infertility, pregnancy, assisted reproductive technology, in vitro fertilization.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки (ТП) является оптимальным методом лечения у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии. Одной из медицинских проблем, которые возникают у молодых женщин с трансплантированной почкой, является осуществление репродуктивной функции. В настоящее время беременность после ТП прочно вошла в реальную клиническую практику. После того как в 1958 году женщина с трансплантированной почкой впервые выносила беременность и родила здорового ребенка, описаны тысячи беременностей после ТП, результаты которых, несмотря на повышенный риск акушерских и перинатальных осложнений, в целом можно назвать благоприятными – частота рождения живых и жизнеспособных детей составляет более 70% даже с учетом потерь плодов в ранние сроки гестации [1, 2]. В нашей стране также накоплен определенный опыт ведения беременности у женщин после ТП, в том числе после сочетанной трансплантации почки и поджелудочной железы [3–6]. Ключевыми моментами планирования и ведения беременности у женщин с трансплантированной почкой являются прегравидарная подготовка, изменение иммуносупрессии и других видов медикаментозной терапии при планировании с исключением тератогенных и фетотоксических препаратов (микофенолаты и ингибиторы пролиферативного сигнала, ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина, статины, аллопуринол, варфарин и новые оральные антикоагулянты), диагностика на прегравидном этапе посттрансплантационного диабета («диабета с новым началом после трансплантации» – NODAT), тщательный мониторинг показателей почечной функции и концентрации в крови ингибиторов кальциневрина в период гестации, своевременное выявление и лечение ГСД, профилактика плацента-ассоциированных осложнений – преэклампсии (ПЭ) и фетоплацентарной недостаточности, преждевременных родов. Ведение такой беременности должна осуществлять междисциплинарная команда специалистов, обладающих соответствующим опытом: нефролог, акушер-гинеколог, в ряде случаев эндокринолог, ревматолог, уролог и другие специалисты.

Хроническая почечная недостаточность (ХПН) является одной из причин дисфункции гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы, приводящей к повышению уровней фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона и пролактина и в результате данных изменений гормонального фона – к бесплодию [7]. После успешной ТП у большинства женщин репродуктивного возраста в течение первого послеоперационного года благодаря устранению влияния уремических токсинов, нормализации уровня половых гормонов восстанавливается регулярный менструальный цикл и способность к зачатию. Однако гормональные изменения, воспалительные процессы в малом тазу и другие причины женской infertility могут персистировать или возникать *de novo* в посттрансплантационном периоде, при этом истинную частоту бесплодия у этой когорты пациенток оценить достаточно сложно. По-видимому, из-за анатомических и эндокринных изменений нарушения фертильности у женщин после ТП встречаются чаще, чем у здоровых женщин [8–10]. Вместе с тем такой современный метод преодоления бесплодия, как применение вспомогательных репродуктивных технологий, у пациенток с трансплантированной почкой используется в клинической практике достаточно редко.

Методы лечения бесплодия у реципиентов ренального трансплантата в целом не отличаются от таковых в общей популяции. Выбор метода должен основываться на характере диагностированных нарушений и включать индукцию овуляции или более продвинутые вспомогательные репродуктивные технологии, если это необходимо [11]. Показания к внутриматочной инсеминации или экстракорпоральному оплодотворению (ЭКО) определяются существующими рекомендациями, а целью ЭКО является наступление одноплодной беременности и рождение в срок здорового ребенка.

Данные о численности всей когорты женщин после ТП, у которых был использован метод ЭКО, отсутствуют, поскольку публикуются обычно только те случаи, когда после ЭКО наступила беременность. Первый успешный случай беременности, наступившей в результате ЭКО у пациентки с трансплантированной почкой, был описан Lockwood et al.

в 1995 г. [12]. В последующие годы в литературе нам удалось найти еще 11 публикаций с описанием отдельных клинических наблюдений или их небольших серий (табл.) [9, 12–22].

Как представлено в таблице, всего у 27 пациенток с трансплантированной почкой, которым было проведено ЭКО, наступила 31 беременность, родилось 30 живых детей, в том числе 4 двойни, т. е. до сроков жизнеспособности плода выносили беременность 26 пациенток. Развитие ПЭ описано в 8 случаях беременности из 31 (26%). Таким образом, частота данного осложнения примерно в 8 раз превышает популяционную. Гестационная и хроническая артериальная гипертензия была у 6 (22%) беременных, этот показатель выше, чем в общей популяции, примерно в 2 раза. Наличие ГСД отмечено лишь в 3 наблюдениях из 31 (10%). Задержка роста плода наблюдалась в 8 случаях (26%), что примерно в 5 раз превышает

частоту данного осложнения в общей популяции. Преждевременными роды были у 15 женщин (58%), при этом основными показаниями к досрочному родоразрешению явились ПЭ и ухудшение функции ренального трансплантата. Только 3 из 26 беременных (11%) были родоразрешены через естественные родовые пути, в остальных случаях было выполнено кесарево сечение. Следует отметить, что, несмотря на повышение уровня креатинина перед родами у значительной части пациенток, случаев потери почечного трансплантата в исходе беременности в представленных наблюдениях не было.

Описан также успешный исход беременности после ЭКО при сочетанной трансплантации поджелудочной железы и почки [23]. Однако такие беременности надо рассматривать отдельно из-за дополнительных рисков, связанных с сахарным диабетом, особенно у пациенток с большим стажем диабета до трансплан-

Таблица

**Акушерские исходы беременности после ЭКО у пациенток с трансплантированной почкой
(по данным литературы 1995–2021 гг.)**

**Obstetric outcomes in IVF pregnancy in kidney recipients
(based on 1995–2021 literature)**

Авторы, год публикации	Число пациенток / беременностей	Число живых детей	Преждевременные роды	Гестационная или хроническая АГ	Преэклампсия	Задержка роста плода	Гестационный сахарный диабет	Кесарево сечение
Lockwood G.M., Ledger W.L., Barlow D.H., 1995 [12]	1/1	2 (двойня)	1 (100%)	0	0	1 (100%)	–	Вагинальные роды
Furman B., Wiznitzer A., Hackmon R. et al., 1999 [13]	1/1	2 (двойня)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	–	1 (100%)	1 (100%)
Khalaf Y., Elkington N., Anderson H. et al., 2000 [14]	1/1	2 (двойня)	1 (100%)	–	–	–	–	Вагинальные роды
Tamaki M., Ami M., Kimata N. et al., 2003 [15]	1/1	1	1 (100%)	1 (100%)	–	–	–	1 (100%)
Rao N.N., Wilkinson C., Morton M. et al., 2011 [16]	1/1	1	1 (100%)	1 (100%)	0	0	1 (100%)	1 (100%)
Nouri K., Bader Y., Helmy S. et al., 2011 [17]	1/1	1	0	0	0	0	–	1 (100%)
Norrman E., Bergh C., Wennerholm U.B., 2015 [18]	7/8	9 (одна двойня)	3 (42,9%)	2 (26%)	1 (13%)	1 (13%)	–	8 (100%)
Pietrzak B., Mazanowska N., Kociszewska-Najman B. et al., 2015 [19]	1/1	1	1 (100%)	1	–	1 (100%)	–	1 (100%)
Warzecha D., Szymusik I., Grzechocińska B. et al., 2018 [20]	3/3	3	3 (100%)	–	3 (100%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	3 (100%)
Yaprak M., Dogru V., Sanhal C.Y. et al., 2019 [9]	8/11	6	3/6 (50%)	–	3/8 (37,5%)	3/8 (37,5%)	–	6 (100%)
Kosoku A., Uchida J., Maeda K., Yoshikawa Y. et al., 2019 [21]	1/1	1	0	0	0	0	0	1 (100%)
Gastañaga-Holguera T., Calvo M., Gómez-Irwin L. et al., 2021 [22]	1/1	1	0	0	0	1 (100%)	0	Вагинальные роды

тации поджелудочной железы (как известно, поздние осложнения диабета длительно персистируют после успешной трансплантации и полной нормализации углеводного обмена и в ряде случаев не способны к полной регрессии).

В отечественной литературе нам не удалось обнаружить описаний случаев ЭКО у пациенток после ТП. Приводим собственное наблюдение успешного применения ЭКО у женщины с трансплантированной почкой.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

У пациентки А., 1985 г. р., в детстве были выявлены изменения в анализах мочи, однако медицинские документы того времени не сохранились. В 2011–2012 гг. при плановой диспансеризации обнаружены следы белка в моче, но диагноз заболевания почек не ставился. В 2013 г. самопроизвольно наступила первая беременность, многоплодная (двойня). В 10 недель беременности выявлена артериальная гипертензия, протеинурия 1,4 г/л, микрогематурия, повышение креатинина сыворотки до 216 мкмоль/л с прогрессирующим его нарастанием. Клинически (без морфологической верификации) диагностирован хронический гломерулонефрит, ХБП 3Б стадии. При сроке беременности 16–17 недель беременность была прервана путем малого кесарева сечения. После родоразрешения креатинин составил 214 мкмоль/л. В дальнейшем пациентка получала с целью нефропротекции ингибитор АПФ периндоприл, а также препарат кетоновых аналогов аминокислот. Биопсия почки не выполнялась.

Вторая беременность наступила спонтанно в 2017 г., с ранних сроков пациентка самостоятельно принимала внутрь железа (III) гидроксид полимальтозат, витамины для беременных, дипиридамол, микронизированный прогестерон, допегит. При постановке на учет по беременности при сроке 15–16 недель АД повышено до 145/90 мм рт. ст., уровень гемоглобина составил 97 г/л, креатинина сыворотки – 308 мкмоль/л, мочевины – 17,8 ммоль/л. Протеинурия была относительной невысокой – 0,5–0,8 г/сут. Пациентке разъяснены риски вынашивания беременности на фоне ХПН: риск материнской смертности и смерти плода, риск усугубления артериальной гипертонии, развития ранней тяжелой ПЭ, задержки роста плода, дальнейшего ухудшения почечной функции во время беременности, вплоть до потребности в экстренном начале лечения гемодиализом, ускорения прогрессирования ХБП в послеродовом периоде; однако женщина категорически настаивала на пролонгировании беременности. К лечению был добавлен амлодипин с целью коррекции повышенного АД, низкомолекулярный гепарин, в/в

введение препаратов железа. При сроке 19–20 недель пришлось начать заместительную почечную терапию (гемодиализ) в связи с дальнейшим нарастанием азотемии. Несмотря на проводимое лечение, у пациентки отмечалось прогрессирующее повышение АД, нарастание протеинурии с 0,8 до 15 г/сут (после начала гемодиализа диурез оставался сохранным), началось снижение количества тромбоцитов, что было расценено как проявления тяжелой ПЭ. При сроке 22 недели в связи с бесперспективностью вынашивания беременности и высоким риском материнской смертности произведено малое кесарево сечение. В дальнейшем в связи со стабилизацией СКФ на уровне 16–18 мл/мин/1,73 м² лечение гемодиализом было прекращено, пациентка включена в лист ожидания трансплантации почки.

В апреле 2018 г. была выполнена ТП от посмертного донора, функция трансплантата немедленная, отмечено быстрое снижение креатинина сыворотки до 90–95 мкмоль/л. Индукция иммуносупрессии осуществлена базиликсимабом по стандартной схеме, в качестве базисной иммуносупрессии пациентка получала такролимус пролонгированного действия, препарат микофеноловой кислоты и метилпреднизолон перорально. В течение 6 мес. после трансплантации проводилась профилактика цитомегаловирусной инфекции валганцикловиrom и профилактика пневмоцистоза триметопримом/сульфаметоксазолом. В июле 2018 г. диагностировано урологическое осложнение – стриктура мочеточника и гидронефроз ренального трансплантата. Немедленно выполнено стентирование мочеточника, а в ноябре 2018 г. реконструктивная операция – лапароскопическая ревизия, неоуретероцистоанастомоз по Боари. В январе 2019 г. стент мочеточника трансплантированной почки был удален. Однократно отмечался эпизод пиелонефрита трансплантата, в дальнейшем рецидивов мочевой инфекции не было. Ультразвуковая картина трансплантированной почки после реконструктивной операции подтверждала отсутствие нарушений уродинамики.

В мае 2019 г. пациентка высказала желание планировать беременность. Абсолютных противопоказаний к вынашиванию беременности не выявлено: функция трансплантата удовлетворительная (креатинин сыворотки 90 мкмоль/л, расчетная СКФ 69 мл/мин/1,73 м²), суточная протеинурия 0,15–0,18 г, уровень АД нормальный (120/80–110/70 мм рт. ст.) без приема антигипертензивных препаратов, рецидивов мочевой инфекции нет, ожирение отсутствует – масса тела 56 кг при росте 165 см (ИМТ 20,57). С целью подготовки к беременности произведена успешная конверсия с препарата микофеноловой кислоты, запрещенного к применению

в период гестации, на азатиоприн. По месту жительства в 2019 году выполнено удаление полипа эндометрия.

Однако беременность у пациентки не наступала в течение года, несмотря на прекращение контрацепции. При гистеросальпингографии выявлена непроходимость маточных труб справа и слева. В 2020 г. консилиумом с участием нефролога, трансплантолога, акушера-гинеколога, репродуктолога, руководителя Московского областного НИИ акушерства и гинекологии (МОНИИАГ) принято решение об использовании ЭКО у пациентки с хорошо функционирующей трансплантированной почкой и трубным бесплодием.

В октябре 2020 г. выполнена программа ЭКО с мягкой стимуляцией по протоколу с антагонистами гонадотропного рилизинг-гормона, при трансвагинальной пункции получено 14 ооцитов, 3 эмбриона криоконсервированы на 5-е сутки культивирования. В декабре 2020 года выполнена программа ЭКО-крио на фоне заместительной гормональной терапии, в полость матки перенесен 1 эмбрион, беременность не наступила. В январе 2021 года выполнена повторная программа ЭКО-крио на фоне заместительной гормональной терапии, перенесен 1 эмбрион в полость матки, в результате беременность наступила.

Иммуносупрессивная терапия в период гестации проводилась такролимусом пролонгированного действия с постепенным повышением дозы из-за снижения концентрации в крови, небольшой дозой азатиоприна – 50 мг/сут и пероральным метилпреднизолоном – 4 мг/сут. Течение беременности с 1-го триместра осложнилось ранним ГСД, который удалось компенсировать диетой, и гестационным гипотиреозом, по поводу которого пациентке для постоянного приема был назначен левотироксин под контролем ТТГ. Клинико-лабораторных проявлений вторичного гиперпаратиреоза у женщины не было. К ведению беременности был привлечен эндокринолог, контролировавший достижение целевых показателей гликемии и уровня гормонов щитовидной железы. В 1-м триместре при амбулаторных визитах отмечались высокие показатели АД, однако проведение суточного мониторирования АД и анализ дневника самоконтроля показали, что данных за артериальную гипертензию нет, и эпизоды повышения АД обусловлены психоэмоциональной лабильностью пациентки. Это позволило отказаться от назначения гипотензивной терапии. С 1-го триместра с целью профилактики плацента-ассоциированных и тромбоемболических осложнений, а также с целью нефропротекции пациентка получала антиагреганты (дипиридамо́л) и низкомолекулярный гепарин

в профилактической дозировке. При сроке 13 недель гестации дипиридамо́л был заменен на ацетилсалициловую кислоту 150 мг/сут, прием которой по протоколу профилактики преэклампсии продолжался до 36-й недели. Также были даны рекомендации по двигательной активности (аэробная нагрузка – пешая прогулка 25–50 минут в день ежедневно), которые пациенткой выполнялись. Течение ГСД на фоне диеты было компенсированным, размеры плода при плановых ультразвуковых исследованиях не выявляли отклонений. АД во 2-м и 3-м триместрах, по данным дневника самоконтроля, оставалось нормальным, значения маркера ПЭ (ангиогенного коэффициента sFlt-1/PlGF), которые контролировались в течение беременности, не превышали референсных. Отмечалась гестационная протеинурия, которая при большинстве исследований не превышала 1 г/сут. Проводился постоянный мониторинг бактериурии, к счастью, эпизодов пиелонефрита не было, по поводу однократного эпизода бессимптомной бактериурии был проведен недельный курс терапии цефиксимом внутрь. Лечение анемии легкой степени проводилось пероральными препаратами железа.

В 37 недель беременности у пациентки были отмечены эпизоды повышения АД до 145–155/90–100 мм рт. ст., в основном на фоне психоэмоционального напряжения (плановая госпитализация в акушерский стационар, подготовка к родоразрешению), которые врачами акушерского отделения были расценены как умеренная ПЭ. При этом роста протеинурии в динамике, значимого повышения суточного креатинина не было, показатель sFlt-1/PlGF составлял 10,0 (норма для данного срока гестации).

Пациентка была родоразрешена в сентябре 2021 г. при сроке 37–38 недель, произведено плановое кесарево сечение в связи с наличием рубца на матке. Родился мальчик, вес ребенка составил 2760 г (25-й перцентиль), рост – 48 см (36-й перцентиль), оценка по шкале Апгар – 7–8 баллов. Состояние ребенка после рождения удовлетворительное, выписан домой с матерью на 5-е сутки после операции. Лактация у матери была подавлена с целью быстрого восстановления иммуносупрессивной терапии в полном объеме, с возобновлением приема микофенолатов, хотя в настоящее время считается, что грудное вскармливание женщинами, получающими такролимус, небольшие дозы кортикостероидов, азатиоприн, возможно [24]. Мальчик растет и развивается нормально, функция ренального трансплантата у матери удовлетворительная.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленный нами случай наглядно иллюстрирует, что у молодых женщин заболевание почек может быть впервые диагностировано во время беременности, хотя изменения в анализах мочи отмечались и раньше (первая беременность А.), и что течение беременности, осложненной ПЭ, может значительно ускорить прогрессирование почечной дисфункции и быстро привести к терминальной стадии ХПН (вторая беременность А.). Необходимо, однако, отметить, что до ТП спонтанные беременности наступали у нашей пациентки в короткие сроки после прекращения контрацепции. После успешной ТП мы столкнулись с проблемой вторичного бесплодия, которое было связано с трубным фактором. Вероятно, причиной непроходимости маточных труб могли явиться повторные абдоминальные оперативные вмешательства: два малых кесаревых сечения, операция Боари, при которой используется трансперитонеальный доступ. Как и в общей популяции, причиной бесплодия у реципиенток ренального трансплантата могут быть яичниковые или трубные факторы, а также мужской фактор [24].

Учитывая возраст пациентки (35 лет), решено было не откладывать проведение ЭКО, поскольку эффективность этого метода преодоления бесплодия резко снижается с увеличением возраста. У пациенток после трансплантации органов важнейшей задачей ЭКО является не только достижение беременности, но и предупреждение возможных осложнений: при проведении ЭКО используется мягкая стимуляция яичников для снижения риска синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ), осуществляется перенос, как правило, одного эмбриона, поскольку осложнения многоплодной беременности могут негативно влиять и на исход гестации, и на трансплантированный орган [13]. Khalaf et al. описали пациентку после трансплантации почки, у которой в цикле ЭКО развился СГЯ с ухудшением функции трансплантата – ростом креатинина сыворотки максимально до 230 мкмоль/л [14]. В патогенезе ренальной дисфункции в описанном наблюдении сыграли роль сдавление ренального трансплантата увеличенным яичником и гипоперфузия пересаженной почки на фоне гиповолемии, характерной для данного осложнения. Консервативное лечение СГЯ было эффективным, функция трансплантата нормализовалась, и через 3 мес. был выполнен криоперенос двух эмбрионов, что привело к наступлению беременности двойней и рождению впоследствии двоих живых детей. Во втором опубликованном наблюдении СГЯ у пациентки после ТП также удалось успешно справиться с осложнением, однако перенос эмбриона в последующем так и не был осуществлен [26]. В последние

годы в связи с совершенствованием протоколов ЭКО частота СГЯ снижается, что приводит к снижению риска ЭКО, в том числе и у пациенток с трансплантированными органами [27]. Важным моментом при подготовке к ЭКО является отмена применяющихся для иммуносупрессии у некоторых пациенток ингибиторов mTOR сиролимуса и эверолимуса, которые не только обладают тератогенным действием, но и могут снижать эффективность ЭКО из-за негативного влияния на созревание ооцитов [28].

В нашем наблюдении заболевание почек не было наследственным, и ЭКО применялось для преодоления вторичного бесплодия. Но необходимо помнить о том, что вспомогательные репродуктивные технологии используются не только при бесплодии: ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием и отбором здоровых эмбрионов может с успехом применяться у пациенток с моногенными почечными заболеваниями, в том числе и у пациенток с почечным трансплантатом, для получения здорового потомства. Это касается прежде всего женщин с наиболее распространенными моногенными заболеваниями почек – аутосомно-доминантной или аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек и синдромом Альпорта [29, 30].

У нашей пациентки в результате ЭКО удалось получить беременность, однако уже в первом триместре был выявлен ранний ГСД, который проявлялся клинически значимой гипергликемией натощак. Истинная частота ГСД у беременных после ЭКО с трансплантированной почкой не известна, по нашему мнению, она должна превышать популяционную не менее чем в 2–4 раза, поскольку и процедура ЭКО (эстрогены, индукция овуляции), и препараты, применяемые для иммуносупрессии, обладают сильным диабетогенным потенциалом. В представленном наблюдении развился именно ранний ГСД, в патогенезе которого контринсулярное действие плацентарных гормонов минимально.

Однако данные литературы не позволяют объективно судить о частоте ГСД в данной группе беременных, поскольку в различных странах и в разное время использовались различные диагностические критерии. Тем не менее современные исследования показали высокую значимость достижения нормогликемии у беременных с ГСД для хорошего перинатального исхода, в том числе за счет снижения частоты ПЭ [31, 32], поэтому выявление и эффективное лечение ГСД у женщин с трансплантированной почкой является очень важным.

В приведенных выше литературных источниках (табл.) отмечается высокая частота ПЭ, которая у данного контингента беременных является одной из основных причин досрочного родоразрешения

и может приводить к ухудшению функции трансплантата. Эффективная профилактика ПЭ позволяет как снизить частоту ее развития, так и увеличить гестационный срок, при котором ПЭ манифестирует (если не удастся полностью предотвратить данное осложнение), что существенно улучшает исход беременности для плода. По этой причине профилактика ПЭ пациенткам с почечным трансплантатом (особенно после ЭКО) должна быть назначена с самых ранних сроков. По нашему мнению, применения для предупреждения ПЭ только аспирина недостаточно для беременных после ТП, необходимо сочетание низкомолекулярного гепарина и антиагрегантов. Следует отметить, что ни в одной из приведенных нами публикаций нет упоминаний о каких-либо мероприятиях, проводимых с целью профилактики плацентарно-ассоциированных осложнений. Работ, посвященных изучению эффективности методов профилактики ПЭ у пациенток после ТП, пока нет. Однако результаты ранее проведенного нами исследования показали, что сочетанное применение гепарина и антиагрегантов значительно повышает частоту благоприятных исходов беременности у женщин со сниженной почечной функцией, соответствующей ХБП 3-й стадии [33], а функция ренального трансплантата в большинстве случаев соответствует ХБП 2–3-й стадии. Целесообразность комплексной профилактики ПЭ отчасти подтверждается и представленным наблюдением. Напомним, что две предыдущие беременности пациентки осложнились ранней тяжелой ПЭ, приведшей не только к прерыванию беременности по витальным показаниям, но и к ускоренному прогрессированию ХБП. При третьей беременности, наступившей после ТП и применения ЭКО, пациентка с момента установления беременности и до ее окончания получала низкомолекулярный гепарин и антиагреганты, в результате симптомы, которые могли быть обусловлены ПЭ, появились только при сроке доношенной беременности, за 2–3 дня до родоразрешения, и не ухудшили перинатальный исход. Диагноз ПЭ в представляемом нами случае вообще является достаточно спорным, поскольку протеинурии у пациентки не было и значение биомаркера sFlt-1/PlGF оставалось нормальным.

Нефрологи, трансплантологи, акушеры-гинекологи могут опасаться отторжения почечного трансплантата во время беременности и в послеродовом периоде. Однако риск отторжения трансплантированной почки при беременности относительно невысок: по данным метаанализа 2019 г., включавшего 6712 беременностей у 4174 реципиенток, частота отторжения составила около 9%, что мало отличается от данного показателя вне беременности [1]. По-видимому, при адекватном контроле иммуносупрессии ЭКО не яв-

ляется дополнительным фактором, повышающим риск отторжения.

В нашем случае благоприятный исход беременности, наступившей в результате ЭКО, у пациентки после ТП с отягощенным акушерским анамнезом обусловлен тщательной оценкой на этапе планирования риска ЭКО и вынашивания беременности, профилактикой ассоциированных с плацентой осложнений (ПЭ, задержки роста плода), своевременной диагностикой ГСД и достижением нормогликемии, контролем иммуносупрессивной терапии, мультидисциплинарным подходом к ведению беременности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные литературы и наше наблюдение позволяют заключить, что при отсутствии однозначных противопоказаний к вынашиванию беременности пациентки после трансплантации почки с бесплодием могут успешно лечиться с помощью ЭКО и рожать здоровых детей без ухудшения функции трансплантата. Однако у таких женщин отмечается высокая частота осложнений беременности, прежде всего ПЭ, что требует проведения ее профилактики. Также необходимо своевременное выявление и лечение ГСД, артериальной гипертензии, инфекции мочевыводящих путей и анемии. Наблюдение междисциплинарной группой квалифицированных специалистов и оптимальная тактика ведения такой беременности с учетом факторов риска позволяют снижать частоту преждевременных родов и получать удовлетворительные исходы беременности как для матери, так и для плода.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Shah S, Venkatesan RL, Gupta A, Sanghavi MK, Welge J, Johansen R et al.* Pregnancy outcomes in women with kidney transplant: Metaanalysis and systematic review. *BMC Nephrol.* 2019; 20 (1): 24. doi: 10.1186/s12882-019-1213-5.
2. *Puthenveetil N, Mohan A, Rahman S, Paul J.* Pregnancy outcomes in renal transplant recipients. *Indian J Anaesth.* 2021; 65 (9): 695–699. doi: 10.4103/ija.ija_362_21.
3. *Мурашко ЛЕ, Кандидова ИЕ, Сухих ГТ.* Заболевания почек у беременных и беременность после трансплантации почки. М.: Авторская академия, 2012; 246. *Murashko LE, Kandidova IE, Sukhikh GT.* Zabollevaniya pochek u beremennyh i beremennost' posle transplantacii pochki. М.: Avtorskaya akademiya, 2012; 246.
4. *Прокопенко ЕИ, Никольская ИГ, Ватазин АВ, Новикова СВ, Гурьева ВМ, Янковой АГ, Щербакова ЕО.* Повторная успешная беременность и необычное течение преэклампсии у пациентки с почечным алло-

- трансплантатом. *Клиническая нефрология*. 2014; 5: 36–39. Prokopenko EI, Nikolskaya IG, Vatazin AV, Novikova SV, Gurieva VM, Yankovoy AG, Shcherbakova EO. Povtorная uspeshnaya beremennost' i neobychnoe techenie preeklampsii u pacientki s pochechnym allotransplantatom. *Klinicheskaya nefrologiya*. 2014; 5: 36–39.
5. Темирбулатов РР, Беженарь ВФ, Резник ОН, Ананьев АН. Беременность и роды у пациенток с почечным аллотрансплантатом (клиническое наблюдение). *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2017; 24 (1): 74–78. Temirbulatov RR, Bezhenar VF, Reznik ON, Anan'ev AN. Beremennost' i rody u pacientok s pochechnym allotransplantatom (klinicheskoe nablyudeniye). *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova*. 2017; 24 (1): 74–78.
 6. Загайнов ВЕ, Каткова НЮ, Васенин СА, Кукош ВМ, Муртазалиева МС, Паузина ОА и др. Случай успешного ведения беременности и родов у пациентки после трансплантации поджелудочной железы и почки. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2021; 23 (S): 90. Zagajnov VE, Katkova NYu, Vasenin SA, Kukosh VM, Murtazalieva MS, Puzina OA i dr. Sluchaj uspeshnogo vedeniya beremennosti i rodov u pacientki posle transplantacii podzheludochnoj zhelezy i pochki. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2021; 23 (S): 90.
 7. Dumanski SM, Ahmed SB. Fertility and reproductive care in chronic kidney disease. *J Nephrol*. 2019; 32 (1): 39–50. doi: 10.1007/s40620-018-00569-9.
 8. Sarkar M, Bramham K, Moritz MJ, Coscia L. Reproductive health in women following abdominal organ transplant. *Am J Transplant*. 2018; 18: 1068–1076. doi: 0.1111/ajt.14697.
 9. Yaprak M, Doğru V, Sanhal CY, Özgür K, Erman M. In vitro fertilization after renal transplantation: a single-center experience. *Transplant Proc*. 2019; 51 (4): 1089–1092. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.01.105.
 10. Kuczera P, Więcek A, Adamczak M. Impaired fertility in women and men with chronic kidney disease. *Adv Clin Exp Med*. 2022; 31 (2): 187–195. doi: 0.17219/acem/141188.
 11. Szymusik I, Warzecha D, Wielgoś M, Pietrzak B. Infertility in female and male solid organ recipients – from diagnosis to treatment: an up-to-date review of the literature. *Ann Transplant*. 2020; 25: e923592. doi: 10.12659/AOT.923592.
 12. Lockwood GM, Ledger WL, Barlow DH. Successful pregnancy outcome in a renal transplant patient following in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1995; 10: 1528–1530. doi: 10.1093/humrep/10.6.1528.
 13. Furman B, Wiznitzer A, Hackmon R, Gohar J, Mazor M. Multiple pregnancies in women after renal transplantation. Case report that rises a management dilemma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999; 84 (1): 107–110. doi: 10.1016/s0301-2115(98)00258-9.
 14. Khalaf Y, Elkington N, Anderson H, Taylor A, Braude P. Ovarian hyperstimulation syndrome and its effect on renal function in a renal transplant patient undergoing IVF treatment: case report. *Hum Reprod*. 2000; 15 (6): 1275–1277. doi: 10.1093/humrep/15.6.1275.
 15. Tamaki M, Ami M, Kimata N, Tsutsui T, Watanabe Y, Saito T et al. Successful singleton pregnancy outcome resulting from in vitro fertilization after renal transplantation. *Transplantation*. 2003; 75 (7): 1082–1083. doi: 10.1097/01.TP.0000055984.84947.90.
 16. Rao NN, Wilkinson C, Morton M, Bennett GD, Russ GR, Coates PT, Jesudason S. Successful pregnancy in a recipient of an ABO-incompatible renal allograft. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28: 351–353. doi: 10.1007/s10815-010-9521-5.
 17. Nouri K, Bader Y, Helmy S, Ott J, Jirecek S, Tempfer CB. Live birth after in vitro fertilization and single embryo transfer in a kidney transplant patient: a case report and review of the literature. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28: 351–353. doi: 10.1007/s10815-010-9521-5.
 18. Norrman E, Bergh C, Wennerholm UB. Pregnancy outcome and long-term follow-up after in vitro fertilization in women with renal transplantation. *Hum Reprod*. 2015; 30: 205–213. doi: 10.1093/humrep/deu293.
 19. Pietrzak B, Mazanowska N, Kociszewska-Najman B, Szymusik I, Grzechociska B, Pazik J et al. Successful pregnancy outcome after in vitro fertilization in a kidney graft recipient: a case report and literature review. *Ann Transplant*. 2015; 20: 338–341. doi: 10.12659/AOT.893735.
 20. Warzecha D, Szymusik I, Grzechocinska B, Cyganek A, Kociszewska-Najman B, Mazanowska N et al. In vitro fertilization and pregnancy outcomes among patients after kidney transplantation: case series and single-center experience. *Transplant Proc*. 2018; 50 (6): 1892–1895. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.02.144.
 21. Kosoku A, Uchida J, Maeda K, Yoshikawa Y, Hamuro A, Shimada H et al. Successful pregnancy after in vitro fertilization in an ABO-incompatible kidney transplant recipient receiving rituximab: a case report. *BMC Nephrol*. 2019; 20 (1): 206. doi: 10.1186/s12882-019-1396-9.
 22. Gastañaga-Holguera T, Calvo M, Gómez-Irwin L, Campo Gesto I, González-González V, Vidaurreta M. Successful pregnancy and follow-up after in vitro fertilization of a kidney transplant patient with systemic lupus erythematosus, primary biliary cholangitis, and hypothyroidism. *JBRA Assisted Reproduction*. 2021; 25 (4): 657–660. doi: 10.5935/1518-0557.20210052.
 23. Mohammadi F, McDonald S, Clark E, Jesudason S. Two pregnancies after simultaneous pancreas-kidney transplantation: A case report. *Obstet Med*. 2020; 13 (2): 92–95. doi: 10.1177/1753495X18789584.
 24. Agarwal KA, Pavlakis M. Sexuality, contraception, and pregnancy in kidney transplantation. *Kidney Med*. 2021; 3 (5): 837–847. doi: 10.1016/j.xkme.2021.05.009.
 25. Mishra VV, Nanda SS, Mistry K, Choudhary S, Aggarwal R, Vyas BM. An overview on fertility outcome in renal transplant recipients. *J Obstet Gynaecol India*. 2016; 66 (Suppl 1): 330–334. doi: 10.1007/s13224-016-0919-6.
 26. Zheng HH, Song Y, Wu JY. Critical ovarian hyperstimulation syndrome after in vitro fertilization treatment in

- a renal transplant recipient: a case report. *Transplant Proc.* 2016; 48 (1): 267–270. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.01.008.
27. Schirmer DA 3rd, Kulkarni AD, Zhang Y, Kawwass JF, Boulet SL, Kissin DM. Ovarian hyperstimulation syndrome after assisted reproductive technologies: trends, predictors, and pregnancy outcomes. *Fertil Steril.* 2020; 114 (3): 567–578. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.04.004.
28. Wald K, Cakmak H, Noel M. mTOR inhibitor sirolimus negatively impacts in vitro fertilization outcomes. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36 (5): 947–950. doi: 10.1007/s10815-019-01439-4.
29. Snoek R, Stokman MF, Lichtenbelt KD, van Tilborg TC, Simcox CE, Paulussen A et al. Preimplantation genetic testing for monogenic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2020; 15 (9): 1279–1286. doi: 10.2215/CJN.03550320.
30. Chaperon JL, Wemmer NM, McKanna TA, Clark DM, Westemeyer MA, Gauthier P et al. Preimplantation genetic testing for kidney disease-related genes: a laboratory's experience. *Am J Nephrol.* 2021; 52: 684–690. doi: 10.1159/000518253.
31. Jain R, Davey S, Davey A, Raghav SK, Singh JV. Can the management of blood sugar levels in gestational diabetes mellitus cases be an indicator of maternal and fetal outcomes? The results of a prospective cohort study from India. *J Family Community Med.* 2016; 23 (2): 94–99. doi: 10.4103/2230-8229.181002.
32. Yang Y, Wu N. Gestational diabetes mellitus and preeclampsia: correlation and influencing factors. *Front Cardiovasc Med.* 2022; 9: 831297. doi: 10.3389/fcvm.2022.831297.
33. Прокопенко ЕИ, Никольская ИГ, Ватазин АВ, Новикова СВ, Гурьева ВМ. Влияние гепарина и антиагрегантов на исход беременности у женщин с хронической почечной недостаточностью. *Нефрология и диализ.* 2015; 17 (2): 185–192. Prokopenko EI, Nikolskaya IG, Vatazin AV, Novikova SV, Gurieva VM. Impact of heparin and antiplatelet agents on pregnancy outcome in women with chronic renal failure. *Nephrology and Dialysis.* 2015; 17 (2): 185–192.

Статья поступила в редакцию 20.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 20.07.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-24-38

РИСКИ И ПУТИ ПРОФИЛАКТИКИ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ У РЕЦИПИЕНТОВ СОЛИДНЫХ ОРГАНОВ

*Ш.Р. Галеев¹, С.В. Готье^{1, 2}*¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

Иммуносупрессивная терапия (ИТ) является наиболее важным компонентом медикаментозного лечения после трансплантации. Задачей иммуносупрессии является предотвращение острого и хронического отторжения при достижении максимальной выживаемости пациента и долгосрочной функции трансплантата. Однако ожидаемые эффекты иммуносупрессивной терапии должны находиться в балансе с серьезными побочными эффектами этих препаратов и их токсичностью. Целью данного обзора было обобщение мирового опыта современной стратегии иммуносупрессии, оценка ее влияния на почечную функцию.

Ключевые слова: трансплантация органов, индукционная терапия, иммуносупрессивная терапия, нежелательные явления, почечная недостаточность.

RISKS AND WAYS OF PREVENTING KIDNEY DYSFUNCTION IN DRUG-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION IN SOLID ORGAN RECIPIENTS

*Sh.R. Galeev¹, S.V. Gautier^{1, 2}*¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Immunosuppressive therapy (IMT) is the cornerstone of treatment after transplantation. The goal of immunosuppression is to prevent acute and chronic rejection while maximizing patient survival and long-term graft function. However, the expected effects of IMT must be balanced against the major adverse effects of these drugs and their toxicity. The purpose of this review is to summarize world experience on current immunosuppressive strategies and to assess their effects on renal function.

Keywords: organ transplantation, induction therapy, immunosuppressive therapy, adverse events, renal failure.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация органов является методом выбора в лечении пациентов с необратимой утратой функции жизненно важных органов. Достижение заданных результатов возможно при оптимальном применении и глубоком понимании механизмов ИТ, направленной на предотвращение острого и хронического отторжения аллотрансплантата. Начало

широкого применения ингибиторов кальциневрина стало важной вехой в эволюции ИТ, заметно снизив частоту острого отторжения [1]. В данном обзоре обсуждаются достижения и технологии ИТ, появившиеся за последние 50 лет в практике клинической трансплантологии. Также оцениваются возможности и ограничения этих достижений и то, как они влияют на текущие результаты у пациентов после трансплантации.

Для корреспонденции: Галеев Шамиль Ринатович. Адрес: 404120, Волжский, Волгоградская область, ул. Генерала Карбышева, д. 86.

Тел. (917) 237-16-50. E-mail: namerec_tao_rsu@outlook.com

Corresponding author: Shamil Galeev. Address: 86, Generala Karbysheva str., Volzhskiy, 404120, Russian Federation.

Phone: (917) 237-16-50. E-mail: namerec_tao_rsu@outlook.com

I. ИММУНОСУПРЕССИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ПОЧЕЧНАЯ ФУНКЦИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭКСТРАРЕНАЛЬНЫХ ОРГАНОВ

Длительная выживаемость реципиентов донорских органов привела к большей экспозиции иммуносупрессивных агентов и увеличила количество нежелательных явлений, ассоциированных с их приемом. Сегодня основные причины смертности в позднем посттрансплантационном периоде во многом обусловлены длительным приемом иммуносупрессивных препаратов [2]. С начала 2010-х годов более двух третей смертей после пересадки печени оказываются не связаны с функцией печеночного трансплантата, что подчеркивает эффективность современных схем ИТ [3]. Однако хорошая выживаемость реципиентов печени продемонстрировала роль нежелательных явлений, ассоциированных с длительным воздействием ИТ на организм реципиента. С улучшением показателей выживаемости реципиентов солидных органов стали появляться сообщения и о выявлении хронической болезни почек (ХБП) у детей – реципиентов экстраренальных трансплантатов [4, 5]. Частота ХБП у детей – реципиентов донорского сердца, легких, печени колеблется от 8 до 38 процентов в зависимости от определения и продолжительности посттрансплантационного наблюдения [4–6]. Ruebner et al. проанализировали данные более чем 16 000 детей, перенесших трансплантацию экстраренальных органов в период с 1990-го по 2010 год. Терминальная почечная недостаточность (ТПН) наблюдалась у 3% ($n = 426$) при медиане наблюдения 6,2 года [4]. Choudhry et al., также изучив базы данных научного регистра трансплантированных пациентов (Scientific Registry of Transplant Recipients, SRTR) и базы данных почечных пациентов США (United States Renal Data System,USRDS), установили, что у 4% реципиентов сердца развивается ТПН в течение среднего периода наблюдения в 11,8 года [7]. Актуарный риск развития ТПН через 10 и 20 лет после трансплантации сердца составил 3 и 16 процентов соответственно.

В ретроспективном исследовании Menon et al. оценили риск развития острого повреждения почек (ОПП) и ХБП у реципиентов солидных органов. В исследование были включены пациенты в возрасте до 21 года, перенесшие трансплантацию печени ($n = 112$) или сердца ($n = 109$) в период с 1 июля 2009-го по 31 декабря 2016 года. Авторы установили, что ОПП встречается у 63% ($n = 69$) реципиентов сердца и 43% ($n = 43$) реципиентов печени. Кумулятивная частота (95% ДИ) ХБП 3–5-й стадии через 60 месяцев после трансплантации сердца составила 40,9% (27,9–57,1%) у пациентов с ОПП по сравнению с 35,8% (17,1–64,8%) у пациентов без ОПП ($p = NS$). После трансплантации печени кумулятивная

частота ХБП 3–5-й стадии через 60 месяцев составила 0% у пациентов без периоперационного ОПП по сравнению с 10% (3,2–29,3%) у пациентов, перенесших ОПП ($p = 0,01$). К моменту завершения исследования пациенты, перенесшие периоперационное ОПП, имели более низкую расчетную скорость клубочковой фильтрации (pСКФ) [8].

Почки у реципиентов экстраренальных органов зачастую начинают страдать еще на предтрансплантационном этапе. Факторами риска развития ХБП традиционно рассматриваются использование ингибиторов кальциневрина (CNI) в качестве компонента поддерживающей иммуносупрессии и исходное нарушение функции почек [4, 5, 7]. Другими провоцирующими факторами являются инфекция, артериальная гипертензия и иные нефротоксичные препараты [5, 8]. Повреждение почек – частое событие после трансплантации экстраренальных органов у взрослых [10–12]. Исследования демонстрируют, что у взрослых после трансплантации экстраренальных органов снижение почечной функции наиболее ощутимо в первые шесть месяцев после трансплантации, а в дальнейшем дисфункция почек прогрессирует медленнее или даже стабилизируется [13]. Даже единичный эпизод ОПП, развившийся в первые три месяца после трансплантации, ассоциирован с трехкратно увеличенным риском развития ХБП [5]. Почечная недостаточность, сохраняющаяся в течение месяца после трансплантации печени, ассоциирована с повышенным риском развития ХБП [14]. В отдаленные сроки после трансплантации печени ХБП и ТПН регистрируются у 70 и 8,5% пациентов соответственно [15]. Несмотря на то что повреждение почек у реципиентов непочечных трансплантатов обусловлено многофакторными механизмами, вазоконстрикция почечных артериол, обусловленная CNI, играет ведущую роль [16, 17]. В связи с высокой значимостью повреждения почек в клинической практике стала разрабатываться стратегия нефропротекции, которую условно разделяют на раннюю и позднюю.

Стратегия ранней нефропротекции включает в себя индукцию ИТ с отсроченным введением низких доз CNI в комбинации с не нефротоксичными иммуносупрессантами, позволяющей безопасно минимизировать CNI.

Индукция ИТ при трансплантации печени используется реже, чем при трансплантации других органов, из-за меньшего риска отторжения и часто тяжелого клинического состояния пациентов с циррозом печени к моменту трансплантации. В США только 20–25% реципиентов печени получают индукцию ИТ. Тем не менее индукция антилимфоцитарным иммуноглобулином (rATG) оказывается целесообразной при трансплантации печени у пациентов с нарушением функции почек [18].

Исследование регистра объединенной сети распределения органов (United Network for Organ Sharing) [19] показало, что лимфоцит-истощающие агенты типа гАТГ, особенно в сочетании со стероидами, по-видимому, более эффективны в предотвращении дисфункции почек у реципиентов печени, чем агенты, не влияющие на количество лимфоцитов (базиликсимаб и даклизумаб).

Из-за существующих данных о корреляции между концентрацией CNIs, ранней дисфункцией почек и смертностью многие протоколы индукции ИТ изучались как часть стратегии минимизации CNIs, направленной на сохранение почечной функции. Применение анти CD-25 моноклональных антител для индукции позволяет назначить минимальные стартовые дозы CNIs или же отсрочить их назначение у реципиентов печени с острым повреждением почек. Данный подход приводит к более быстрому восстановлению почечной функции при сопоставимой или даже меньшей частоте отторжения [20]. В более позднем исследовании, проведенном Pratima Sharma et al., результаты были не столь однозначны. В группе реципиентов печени с тяжелой дисфункцией почек отсроченное назначение такролимуса в сочетании с индукцией базиликсимабом не оказало значимого влияния на почечную функцию в отдаленном посттрансплантационном периоде [21].

Стандартные остаточные концентрации такролимуса (Tac), C0, в рандомизированных контролируемых исследованиях варьировали от 10 до 15 нг/мл. Комбинация с MMF позволяет безопасно снизить уровень C0 Tac до 7–10 нг/мл, с аналогичной частотой острого отторжения при лучшей функции почек, метаболическом и сердечно-сосудистом профиле [22]. Возможность применения mTOR-ингибиторов в свое время вызвала значительный интерес ввиду лучшего профиля безопасности в отношении почечной функции и высокой иммуносупрессивной эффективности. К сожалению, комбинация Tac с рапамицином (Rap) у *de novo* трансплантированных пациентов продемонстрировала повышенный риск развития тромбоза печеночной артерии и острого отторжения трансплантата по сравнению с группой на стандартном режиме ИТ, что потребовало досрочного прекращения исследования [23]. В другом исследовании, сравнивающем комбинацию Rap с MMF против Tac с MMF, через четыре недели после трансплантации печени наблюдалось значительное улучшение почечной функции, но повышение частоты отторжения в группе Rap [24]. В рандомизированном контролируемом исследовании H2304 сравнивали комбинацию эверолимуса (Eve) с низкими дозами Tac, Eve без Tac и обычный режим Tac. Через 12, 24 и 36 месяцев почечная функция была лучше в группе Eve с низкими дозами Tac, а исследование в группе

Eve без Tac было прекращено досрочно из-за высокой частоты острого отторжения в ней [25].

Схожие результаты были получены в исследовании PROTECT, в котором сравнивали комбинацию Eve со снижением CNIs через 8–16 недель после трансплантации печени со стандартными дозами CNIs. Лучшая функция почек в группе пациентов, получавших Eve, прослеживалась на протяжении 5 лет [26]. В результате одного метаанализа рандомизированных контролируемых исследований взрослых реципиентов после *de novo* трансплантации печени, получавших Eve в сочетании с низкими дозами Tac или без Tac, выяснилось, что они по истечении 12 месяцев ассоциированы с лучшей почечной функцией при аналогичной эффективности в отношении отторжения или смертности [27]. Ряд центров предложили использовать комбинацию m-TOR-ингибиторов с низкими дозами Tac начиная с ближайшего послеоперационного периода. К сожалению, убедительных данных, подтверждающих эффективность данной рекомендации, нет [28]. Следует отметить, что схемы ИТ без CNIs также были предложены как варианты терапии после индукции иммуносупрессии комбинацией моно- и поликлональными антителами. Сообщается о высокой частоте отторжения в случае применения данного протокола [29]. Попытка замены нефротоксичных CNIs на блокатор костимулирующего сигнала белатацепт показала улучшение почечной функции через год после трансплантации. Однако исследование было досрочно прекращено из-за необъяснимого увеличения смертей в группе пациентов, получавших белатацепт [30].

Стратегия нефропротекции в позднем посттрансплантационном периоде

Поздний переход, через 1 год и более после трансплантации, с CNIs на Rap не продемонстрировал значительного влияния на почечную функцию, при высокой частоте отторжения и побочных эффектов Rap, потребовавших возврата на CNIs [31]. Два крупных, но относительно давних рандомизированных контролируемых исследования по конверсии с CNIs на комбинацию Eve с низкими дозами Tac в сроки от года до пяти лет показали сопоставимую вероятность развития острого отторжения при отсутствии значимого влияния на почечную функцию [32, 33]. В другом ретроспективном исследовании изучалась эффективность конверсии на Eve у пациентов с нарушением функции почек после трансплантации печени. Улучшения почечной функции по истечении 12 месяцев удалось достичь в группе пациентов, у которых конверсия была произведена не позднее 1 года после пересадки печени [34]. Стратегия перехода на монотерапию MMF или их комбинацию с низкой дозой CNIs приводила к улучшению почечной

функции, если осуществлялась не позднее 2 лет после пересадки. Систематический обзор, обобщивший переход на MMF, заключил, что он демонстрирует благотворное влияние на почечную функцию, при повышенном риске развития отторжения [35]. С другой стороны, имеются данные, что даже при полной отмене иммуносупрессии у реципиентов после трансплантации печени, которой удается достичь в части случаев [36–38], ни в одном из исследований не сообщается о положительных эффектах отмены ИТ в аспекте почечной функции, артериальной гипертензии, диабета или гиперлипидемий [2].

II. ОСНОВНЫЕ ИММУНОСУПРЕССИВНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

А. Глюкокортикостероиды

Глюкокортикостероиды (ГКС) еще до появления азатиоприна (AZA) и циклоспорина (CsA) использовались в качестве препаратов первой линии при трансплантации органов. Они применялись как индукторы ИТ, а также в качестве поддерживающей терапии для предотвращения острого отторжения. ГКС являются противовоспалительными агентами, а их иммуносупрессивный эффект является результатом действия нескольких механизмов. Они действуют через GC-рецептор (GCR) [39]. Геномные эффекты ГКС реализуются в течение нескольких часов после их применения [40]. ГКС также реализуют незамедлительный эффект, возникающий в течение нескольких секунд или минут и называемый негеномной активностью ГКС [41]. В совокупности ГКС нарушают или замедляют различные клеточные активности, такие как миграция, фагоцитоз, высвобождение воспалительных хемокинов и цитокинов из различных клеток. ГКС также ускоряют апоптоз лимфоцитов и прерывают иммунные реакции на чужеродные антигены. Клинически эти эффекты ГКС обуславливают повышенный риск бактериальных, вирусных и грибковых инфекций у реципиента. ГКС являются неотъемлемым компонентом индукции ИТ, однако их применение в качестве компонента поддерживающей ИТ не столь однозначно. Побочные эффекты применения ГКС включают в себя развитие минерально-костных нарушений, инфекционных осложнений [42], катаракты, гиперлипидемии, асептического некроза головки бедренной кости, остеопороза, изменения настроения и кушингоида, а длительное применение ГКС у детей приводит к задержке их роста [43]. Частота артериальной гипертензии, связанной с применением ГКС, составляет около 15%, и почти в 10% случаев ГКС являются причиной нарушения толерантности к глюкозе, т. е. так называемому посттрансплантационному сахарному диабету [44]. Следовательно, минимизация применения ГКС может улучшить выживаемость трансплантатов и пациентов [45].

Метаанализ семи исследований, оценивающих влияние основанных на приеме CsA бесстероидных протоколов ИТ на выживаемость трансплантата, пациентов и частоту острых реакций отторжения трансплантата, продемонстрировал, что отсутствие или отмена ГКС увеличивают риски развития острой реакции отторжения, но не оказывают неблагоприятного влияния на выживаемость пациентов или трансплантатов. Поскольку только в одном исследовании оценивалась выживаемость пациентов и трансплантатов по истечении двух лет после пересадки, сделать достоверные долгосрочные выводы о риске развития хронического отторжения или потери трансплантатов не представлялось возможным [46]. Метаанализ других десяти исследований продемонстрировал повышение риска острого клеточного отторжения (ОКО) в группах пациентов, у которых были отменены ГКС, наряду с повышенным относительным риском дисфункции трансплантата [47]. Ввиду противоречивости полученных результатов и применения AZA в качестве компонента поддерживающей ИТ в этих исследованиях третий метаанализ включал только рандомизированные контролируемые исследования пациентов, принимавших CNIs и MMF. В этом исследовании был сделан вывод, что поздняя отмена ГКС связана с более высокой частотой ОКО, но в среднесрочной перспективе не оказывает неблагоприятного влияния на выживаемость трансплантата [48]. Поскольку сегодня большинство трансплантационных центров используют индукцию ИТ с последующей поддерживающей терапией Tac и MMF, многие протоколы предусматривают либо быструю отмену ГКС, либо полный отказ от их применения [49].

В рекомендациях «Болезни почек – улучшение глобальных результатов лечения» (Kidney Disease: Improving Global Outcomes – KDIGO) авторы указывают, что у пациентов с низким иммунологическим риском, получивших индукцию ИТ лимфоцитотощающими антителами, прием ГКС может быть прекращен в течение первой недели после трансплантации [47, 50]. Эти рекомендации подтверждаются метаанализом 9 исследований, в 5 из которых поддерживающая ИТ базировалась на приеме Tac, а в 4 – на CsA, в одном исследовании применялся ингибитор мишени рапамицина млекопитающих (ингибитор mTOR) [51]. Смертность и утрата функции трансплантата были одинаковыми как у пациентов, получающих ГКС, так и у больных на бесстероидных протоколах [52]. Эти данные согласуются с наблюдением, полученным в результате анализа данных регистра США, показывающим, что иммуносупрессия *de novo* без ГКС в среднесрочной перспективе не приводила к увеличению риска неблагоприятных клинических исходов [53].

Б. Антипролиферативные агенты: азатиоприн и микофенолата мофетил

1. Азатиоприн

AZA относится к классу антиметаболитов, имидазолиновое производное 6-меркаптопурина. AZA является структурным аналогом аденина, гипоксантина и гуанина, входящих в состав нуклеиновых кислот [54]. Ингибирование синтеза пуринов *de novo* блокирует пролиферацию лимфоцитов [55]. 6-меркаптопурин метаболизируется до 6-тиогуанозин-5'-монофосфата, который далее метаболизируется серией киназ и редуктаз с образованием дезокси-6-тиогуанозин-5'-трифосфата. Остановка клеточного цикла и апоптоз запускаются включением дезокси-6-тиогуанозин-5'-трифосфата в ДНК клетки [56]. Обнаружено, что AZA блокирует путь костимуляции CD28, тем самым ингибируя пролиферацию активированных лимфоцитов [57]. AZA наряду с ГКС и CsA был иммуносупрессантом выбора после трансплантации органов, пока несколько рандомизированных исследований, сравнивающих его с MMF, не продемонстрировали значительные преимущества последнего [58].

2. Микофенолата мофетил

Микофенолата мофетил (MMF) представляет собой 2-морфолиноэтиловый эфир микофеноловой кислоты (MFA). MMF – мощный селективный неконкурентный и обратимый ингибитор инозинмонофосфатдегидрогеназы, который подавляет синтез гуанозинового нуклеотида *de novo* в Т- и В-лимфоцитах [59, 60]. Более того, MMF преимущественно ингибирует инозинмонофосфатдегидрогеназу II типа, активность которой повышается в активированных лимфоцитах, а следовательно, MMF в наибольшей степени влияет на пролиферацию активированных лимфоцитов и снижает выработку цитокинов и антител, индуцированную аллогенами и митогенами [61]. Данное селективное воздействие является фактором, обеспечивающим лучший профиль безопасности MMF по сравнению с азатиоприном или циклофосфамидом [62]. Помимо антипролиферативного действия на лимфоциты, MPA обладает и другими механизмами действия: за счет истощения запасов гуанозинтрифосфата нарушается процесс фукозилирования и поверхностной экспрессии молекул адгезии лимфоцитов и моноцитов [63]. MMF ингибирует поверхностную экспрессию антигенов, ответственных за дифференцировку и эффективную презентацию аллогенов дендритными клетками, подавляя тем самым адаптивный иммунный ответ [64]. Другим преимуществом MPA является его нефропротективный эффект, наблюдаемый у пациентов с хронической нефропатией трансплантата [65]. Обзор 19 исследований, в которых сравнивали эф-

фективность MMF и AZA в сочетании с CNIs, продемонстрировал, что использование MMF дает положительный клинический эффект за счет снижения абсолютного риска развития острого отторжения или потери трансплантата [66].

В. Ингибиторы кальциневрина

Внедрение в клиническую практику CNIs привело к увеличению выживаемости трансплантата без отторжения. Однако применение CsA или Tac требует частого контроля уровня препарата в крови из-за их очень узкого терапевтического индекса. Узкий терапевтический индекс, высокая индивидуальная вариабельность, плохо предсказуемая и изменчивая пероральная биодоступность обуславливают риск серьезных нежелательных эффектов данных препаратов [67]. Наиболее известным побочным эффектом является нефротоксичность, которая была обнаружена практически с началом клинического применения препаратов [68]. Другим нежелательным эффектом CNIs является развитие инсулинорезистентности. И хотя Tac считается менее нефротоксичным, чем CsA, он до 5 раз более диабетогенен, что провоцирует развитие посттрансплантационного сахарного диабета (ПТСД). В долгосрочной перспективе ПТСД ассоциирован с нарушением функции почек и ухудшением выживаемости пациентов [69]. Еще одной проблемой применения CNIs является нейротоксичность, которая может проявляться как при терапевтических, так и токсических уровнях препарата. Основным проявлением нейротоксичности является синдром задней обратимой энцефалопатии, радиологическим признаком которого является изменение интенсивности сигнала, отражающего вазогенный отек головного мозга (ОГМ), локализованный преимущественно в задних теменно-затылочных отделах мозга [70]. На сегодняшний день Tac рассматривается как более предпочтительный CNIs при всех видах трансплантации солидных органов из-за его способности лучше контролировать риски развития острой реакции отторжения и потенциально меньшей нефротоксичности [67].

В исследовании Efficacy Limiting Toxicity Elimination (ELITE)–Symphony сравнили четыре группы пациентов после трансплантации почки: 1-я – получавшие стандартные дозы CsA с минимальной концентрацией (C0), равной 200–300 нг/мл; 2-я – получавшие низкие дозы CsA с C0, равной 100–200 нг/мл; 3-я – получавшие низкие дозы Tac с C0, равной 4–7 нг/мл; 4-я – получавшие низкие дозы сиролимуса с C0 4–8 нг/мл. Все пациенты получили индукцию ИТ даклизумабом, а в качестве поддерживающей терапии получали MMF и ГКС. Частота острого отторжения была ниже у пациентов 3-й группы. Выживаемость трансплантата значительно разли-

чалась в четырех группах и была самой высокой в группе, получавшей низкие дозы Тас. В то же время серьезные побочные эффекты были наиболее часты в группе пациентов, получавших сиролимус [71]. Указанные тенденции прослеживались на протяжении 3 лет [72]. Исследование предоставило надежное доказательство эффективности поддерживающей ИТ, основанной на комбинации Тас, ММФ и ГКС для реципиентов почечного трансплантата.

Г. Ингибиторы к рецептору рапамицина млекопитающих (mTOR-ингибиторы): сиролимус и эверолимус

Сиролимус, или рапамицин (Rap), вторичный метаболит, продуцируемый *S. hygroscopicus*, получен в 70-х годах прошлого века [73]. Эверолимус (Eve) является производным Rap, отличается повышенной биодоступностью при приеме внутрь и более коротким периодом полувыведения [74]. Ингибиторы mTOR значимо подавляют стимулированную IL-2 пролиферацию Т-клеток, а также воздействуют на В-клетки, вызывая ингибирование их антиген- и цитокинзависимой пролиферации [75]. Было показано, что Rap тормозит цитокинзависимую (IL-2, IL-6) дифференцировку В-лимфоцитов в плазматические клетки, тем самым подавляя синтез иммуноглобулинов [76]. Побочными эффектами mTOR-ингибиторов являются гиперлипидемия, тромбоцитопения, мукозит, отеки и протеинурия [77]. Явлений нефротоксичности для mTOR-ингибиторов обнаружено не было [78]. Посылком использования mTOR-ингибиторов было стремление избежать нежелательных эффектов в виде хронической нефротоксичности, присущей CNIs. Комбинация Rap или Eve со стандартной дозой CsA оказалась ассоциированной с повышенным риском нефротоксичности [79]. В связи с этим были предприняты попытки использования Rap вместо CNIs. В исследовании комбинации Rap с МРА у реципиентов почечного трансплантата продемонстрирован повышенный риск отторжения [80]. В последующих исследованиях потенциал Rap изучали либо в качестве терапии спасения для замены CNIs на ранних сроках после трансплантации [81], либо у пациентов с «проблемным» почечным трансплантатом [82]. Также mTOR-ингибиторы изучались как средство сохранения почечной функции у реципиентов других органов с повышенным уровнем креатинина на фоне лечения CsA или Тас [83–85].

Потенциал Eve внушал осторожную надежду при трансплантации сердца, а его комбинация с Тас, по видимому, является безопасной альтернативой поддерживающей терапии на основе Тас и ММФ [86]. У реципиентов сердца без протеинурии Eve можно использовать для минимизации дозы CsA. Поскольку до 20% реципиентов печеночного трансплантата

развивают терминальную стадию хронической почечной недостаточности, прием Eve в комбинации с низкими дозами CNIs изучался у пациентов после пересадки печени [87]. Данные 3-летнего рандомизированного исследования демонстрируют длительную сохранность функции почек у реципиентов печени без потери эффективности при ранней отмене CNIs, продолжающих прием Eve [88]. К преимуществам mTOR-ингибиторов также относят их способность блокировать пролиферацию эндотелия, способность подавлять репликацию вирусов и некоторых типов опухолевых клеток. В связи с этим Rap и Eve используют вместо CNIs для вторичной профилактики неоплазий, таких как рак кожи, саркома Капоши и гепатоцеллюлярная карцинома, и посттрансплантационных лимфопролиферативных заболеваний [89].

Д. Белатацепт

Белатацепт (Bel) разработан на основе абатацепта (CTLA-4 Ig) – рекомбинантного иммуноглобулина, который состоит из внеклеточной части молекулы CTLA-4 и константного домена IgG [90]. Он одобрен для использования с целью профилактики отторжения трансплантата и исключения нефротоксичности, связанной с CNIs, после пересадки почки [91, 92]. Исследования, такие как BENEFIT и BENEFIT-EXT, установили, что использование Bel вместо CsA способствует сохранению почечной функции [93]. Было отмечено увеличение частоты ОКО у пациентов, получавших Bel, по сравнению с теми, кто получал CsA. Однако это не повлияло на функцию трансплантата по истечении 3 и 5 лет наблюдения. Это связано с тем, что Bel менее эффективен, чем CsA, в предотвращении раннего, но не позднего отторжения [94]. Лишь у небольшой доли пациентов на поддерживающей терапии Bel образуются донорспецифические антитела (3% против 8% на CsA). Кроме этого, поддерживающая терапия на основе Bel по сравнению с CsA обеспечивает лучший профиль сердечно-сосудистых и метаболических рисков, а также ассоциирована с меньшим риском развития посттрансплантационного сахарного диабета [95]. В метаанализе, в котором белатацепт сравнивали с CsA, пытались получить косвенную оценку эффективности Bel, CsA и Тас в отношении выживаемости трансплантатов и пациентов, частоты острого отторжения и почечной функции [94, 96]. В результате исследования сделан вывод, что все три препарата обеспечивали сопоставимую выживаемость трансплантатов и пациентов. В дополнение Bel был ассоциирован со значительно лучшими показателями СКФ по сравнению с CsA. По сравнению с Тас эта разница была клинически значимой, но статистически недостоверной [97]. Bel не применяется при трансплантации других органов, кроме почки, за исключением досрочно прекращен-

ной II фазы исследования при трансплантации печени из-за повышенного риска смерти и дисфункции трансплантата [30].

III. ИНДУКЦИЯ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ

Основываясь на идее, что во время кондиционирования донора, изъятия органов, тепловой и холодовой ишемии происходит усиленная активация иммуногенных комплексов, стала реализовываться концепция индукции ИТ. Еще одним обоснованием применения индукции ИТ является тот факт, что риск развития острых реакций отторжения максимален в первые недели и месяцы после трансплантации [98]. На сегодняшний день доступны 2 различные категории иммунологических агентов, применяемых для индукции ИТ. К первой относятся лимфоцитостощающие антитела: например, поликлональные антитела, такие как лошадиный и кроличий анти-тимоцитарный иммуноглобулин (rATG) [107], ко второй – генно-инженерные гуманизированные IgG1-каппа моноклональные анти-CD52 антитела [99]. По состоянию на 2008 год препараты для индукции ИТ получали 82% реципиентов почек. У реципиентов других органов индукция иммуносупрессии применялась реже: 57% при трансплантации легких, 47% – сердца и 26% – печени. При трансплантации экстраренальных органов, как правило, применялись не лимфоцитостощающие агенты [100]. В 2020 году индукция иммуносупрессии применялась уже у 91% реципиентов почки, на 1% меньше по сравнению с 2019 годом. Основное снижение использования препаратов, истощающих лимфоцитарное звено, пришлось на начало пандемии COVID-19 [101].

A. Антитимоцитарный иммуноглобулин, тимоглобулин (rATG)

rATG – поликлональные антитела, продуцируемые кроликами после иммунизации детской тканью тимуса человека. rATG содержит антитела не только к Т-лимфоцитам, но и к множеству других антигенов, экспрессируемых в тканях тимуса человека [103]. Было показано, что rATG *in vitro* приводит к увеличению регуляторных Т-клеток CD4+CD25+FOXP3+, подавляющих иммунный ответ на аллоген и участвующих в индукции толерантности [104, 105], а также подавляет гены, участвующие в регуляции работы NF-κB, костимуляции, апоптозе, хемоаттракции и функции дендритных клеток [106, 107]. У ряда пациентов вырабатываются антитела против кроличьего иммуноглобулина. Антитела обнаруживаются более чем у 50% пациентов после применения rATG, однако их присутствие не влияет на эффективность препарата [108]. Индукция ИТ тимоглобулином по сравнению с базиликсимабом у реципиентов почки

от посмертного донора с высоким риском отсроченной функции или острого отторжения значительно снижала вероятность развития отторжения, но не влияла на продолжительность дисфункции трансплантата. Выживаемость пациентов и трансплантатов была сопоставимой в обеих группах [109].

Б. Базиликсимаб (анти-CD25 моноклональное антитело)

Базиликсимаб представляет собой химерное моноклональное антитело мыши/человека, не разрушающее лимфоциты, направленное против α-цепи IL-2R (известной также как CD25 или IL-2Rα) [99, 110]. Действуя как антагонист IL-2Rα, базиликсимаб конкурентно ингибирует активацию лимфоцитов. Основным преимуществом при использовании анти-CD25 моноклональных антител является их специфичность и отсутствие лейкопении и тромбоцитопении, которые часто наблюдаются при использовании лимфоцитостощающих антител.

Многочисленные рандомизированные контролируемые исследования показали, что базиликсимаб значительно снижал риск острого отторжения по сравнению с плацебо у реципиентов почечного трансплантата, получавших двойную (CNIs и ГКС) или тройную ИТ (CNIs, ГКС и AZA или MMF). Однако показатели выживаемости трансплантата и пациента через 12 месяцев были сопоставимы [111–113]. Эффекты базиликсимаба оказываются еще менее выраженными при использовании в качестве основного компонента поддерживающей ИТ Tac. Возможно, это обусловлено отсутствием крупных исследований или же более выраженным иммуносупрессивным эффектом Tac по сравнению с CsA [112]. В то же время информации о долгосрочных эффектах базиликсимаба мало. Что касается профиля безопасности, базиликсимаб, по данным одного исследования, является независимым фактором риска развития посттрансплантационного сахарного диабета [115].

В. Алемтузумаб (Campath-1H)

Алемтузумаб представляет собой гуманизированное крысиное моноклональное антитело, изначально предназначенное для лечения хронического лимфолейкоза (крысиный IgG2b), направленное против антигена CD52. Антиген CD52 присутствует на поверхности Т-клеток, В-клеток, естественных киллеров, макрофагов и моноцитов [114, 116]. Применение даже небольших доз препарата вызывает стойкую глубокую лимфопению, а для восстановления количества лимфоцитов может потребоваться значительное время. Впервые алемтузумаб с целью индукции ИТ применили Calne et al. в 1998 году [117]. Они предположили, что достигнутое глубокое истощение лимфоцитарного звена позволит минимизировать

дозу ГКС, CNIs и даже будет способствовать развитию толерантности иммунной системы в отношении трансплантированной почки. Однако у всех пациентов в течение первого месяца развивались эпизоды обратимого острого отторжения трансплантата [118]. Другие исследования оценивали эффективность и безопасность алемтузумаба на поддерживающей терапии с применением CNIs или его сочетания с MMF [119]. В одном исследовании у пациентов с низким иммунологическим риском подтвержденное биопсией острое отторжение трансплантата в течение первого года встречается реже при применении алемтузумаба по сравнению со стандартной индукцией ИСТ бализиксимабом или гАТG, в то время как при высоком иммунологическом риске эффективность всех трех препаратов была сопоставима [119]. В другом обзоре, включавшем в себя 1687 трансплантаций почки взрослым реципиентам, выполненных в период с 1 января 2002 года по 31 декабря 2007 года, сравнивались результаты у пациентов, получивших в качестве индуктора ИТ алемтузумаб ($n = 632$), базиликсимаб ($n = 690$) или тимоглобулин ($n = 125$). Кумулятивная 1-, 3- и 5-летняя выживаемость была значительно ниже в группе пациентов, получивших алемтузумаб, а частота антителоопосредованного отторжения – выше. Алемтузумаб оказался независимым фактором риска потери трансплантата ($p = 0,004$), оппортунистических инфекций ($p = 0,01$), ЦМВ-инфекций ($p = 0,001$) и антителоопосредованного отторжения ($p = 0,002$) [120]. Анализ пожилой группы населения показал, что алемтузумаб, по-видимому, связан с повышенным риском смерти и потери трансплантата в этой группе [121]. Комбинация индукции алемтузумабом с монотерапией Rap была еще одной привлекательной гипотезой и была апробирована на 29 пациентах. Восемь пациентам потребовалось лечение по поводу острого отторжения, а в одном случае произошла потеря трансплантата [122]. Другие исследователи обнаружили, что комбинация Rap с MMF после индукции алемтузумабом была ассоциирована с высокой частотой отторжения и осложнений в виде лейкопении и респираторного дистресс-синдрома [123].

Г. Другие агенты

Ритуксимаб – противоопухолевое и иммуномодулирующее средство. Представляет собой химерное моноклональное антитело мыши/человека, которое специфически связывается с трансмембранным антигеном CD20 [124]. В течение последних 15 лет он в основном использовался при АВ0-несовместимых трансплантациях почек и с разной степенью успеха применялся в протоколах десенсибилизации реципиентов почечных трансплантатов и лечения антителоопосредованного отторжения [125–127]. Данные

о применении ритуксимаба в качестве средства для индукции ИТ пока ограничены. Его эффективность была оценена в проспективном двойном слепом рандомизированном плацебо контролируемом исследовании [128]. Частота острых отторжений, а также почечная функция существенно не различались между группой, получившей ритуксимаб, и группой плацебо. Другое рандомизированное контролируемое исследование, сравнивающее ритуксимаб с даклизумабом, было остановлено досрочно из-за повышенной частоты развития ОКО в группе пациентов, получавших ритуксимаб [129].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, поскольку сам факт приема иммуносупрессивных препаратов оказывает негативное воздействие, целью лечения является назначение наименьшего иммуносупрессивного режима, способного надежно предотвращать развитие отторжения. Тем не менее эта простая концепция несет в себе массу сложностей при адаптации ее к клинической практике. Существуют серьезные различия в режимах ИТ между разными центрами, врачами одного центра и даже одного и того же пациента, но в разные периоды времени, а снижение режима ИТ основано на суррогатных маркерах (т. е. минимальной концентрации препарата в крови) и клинических событиях (т. е. эпизодах отторжения, инфекционных осложнениях). Поскольку в клинической практике отсутствует надежный механизм оценки адекватности иммуносупрессии, оказывается очень сложно определить тот минимальный уровень ИТ, достаточный для каждого конкретного пациента в каждый момент времени. Кроме этого, в доступной литературе имеется относительно мало современных исследований, описывающих стратегии ИТ, а средний период публикаций, приведенных в современных обзорах, датируется 2011 годом. Все это определяет актуальность поиска новых принципов и режимов ИТ, обеспечивающих длительную выживаемость реципиентов солидных органов, при минимальном отрицательном воздействии. Отсутствие новых молекул, предотвращающих развитие отторжения, оставляет клиницистам только возможность поиска оптимальных комбинаций уже существующих иммуносупрессивных препаратов, применяемых как на этапе индукции, так и в дальнейшем поддерживающем режиме.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Metalidis C, Kuypers D. Immunosuppressive therapy after kidney transplantation: current and new strategies.*

- Minerva Urol Nefrol.* 2011 Mar; 63 (1): 1–19. PMID: 21336242.
2. *Di Maira T, Little EC, Berenguer M.* Immunosuppression in liver transplant. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020 Jun–Aug; 46–47: 101681. doi: 10.1016/j.bpg.2020.101681. Epub 2020 Sep 11. PMID: 33158467.
 3. *Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR.* Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *Am J Transplant.* 2010 Jun; 10 (6): 1420–1427. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03126.x. Epub 2010 May 10. PMID: 20486907; PMCID: PMC2891375.
 4. *Ruebner RL, Reese PP, Denburg MR, Abt PL, Furth SL.* End-stage kidney disease after pediatric nonrenal solid organ transplantation. *Pediatrics.* 2013 Nov; 132 (5): e1319–e1326. doi: 10.1542/peds.2013-0904. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24127468; PMCID: PMC3813394.
 5. *Williams C, Borges K, Banh T, Vasilevska-Ristovska J, Chanchlani R, Ng VL et al.* Patterns of kidney injury in pediatric nonkidney solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 2018 Jun; 18 (6): 1481–1488. doi: 10.1111/ajt.14638. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29286569.
 6. *LaRosa C, Glah C, Baluarte HJ, Meyers KE.* Solid-organ transplantation in childhood: transitioning to adult health care. *Pediatrics.* 2011 Apr; 127 (4): 742–753. doi: 10.1542/peds.2010-1232. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21382946.
 7. *Choudhry S, Dharnidharka VR, Castleberry CD, Goss CW, Simpson KE, Schechtman KB, Canter CE.* End-stage renal disease after pediatric heart transplantation: A 25-year national cohort study. *J Heart Lung Transplant.* 2017 Oct 2; S1053–2498(17)32042-9. doi: 10.1016/j.healun.2017.09.027. Epub ahead of print. PMID: 29055603; PMCID: PMC5880747.
 8. *Menon S, Pollack AH, Sullivan E, Murphy T, Smith J.* Acute kidney injury and chronic kidney disease after non-kidney solid organ transplantation. *Pediatr Transplant.* 2020 Sep; 24 (6): e13753. doi: 10.1111/petr.13753. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32497381.
 9. *Sigurjonsdottir VK, Chaturvedi S, Mammen C, Sutherland SM.* Pediatric acute kidney injury and the subsequent risk for chronic kidney disease: is there cause for alarm? *Pediatr Nephrol.* 2018 Nov; 33 (11): 2047–2055. doi: 10.1007/s00467-017-3870-6. Epub 2018 Jan 26. PMID: 29374316.
 10. *Charbonney E, Saudan P, Triverio PA, Quinn K, Mentha G, Martin PY.* Prognosis of acute kidney injury requiring renal replacement therapy in solid organ transplanted patients. *Transpl Int.* 2009 Nov; 22 (11): 1058–1063. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00914.x. Epub 2009 Jul 13. PMID: 19624498.
 11. *Pham PT, Slavov C, Pham PC.* Acute kidney injury after liver, heart, and lung transplants: dialysis modality, predictors of renal function recovery, and impact on survival. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2009 Jul; 16 (4): 256–267. doi: 10.1053/j.ackd.2009.04.002. PMID: 19576556.
 12. *Nadkarni GN, Chauhan K, Patel A, Saha A, Poojary P, Kamat S et al.* Temporal trends of dialysis requiring acute kidney injury after orthotopic cardiac and liver transplant hospitalizations. *BMC Nephrol.* 2017 Jul 19; 18 (1): 244. doi: 10.1186/s12882-017-0657-8. PMID: 28724404; PMCID: PMC5516358.
 13. *Bloom RD, Doyle AM.* Kidney disease after heart and lung transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Apr; 6 (4): 671–679. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01248.x. PMID: 16539623.
 14. *Gonwa TA, Mai ML, Melton LB, Hays SR, Goldstein RM, Levy MF, Klimmalm GB.* End-stage renal disease (ESRD) after orthotopic liver transplantation (OLT) using calcineurin-based immunotherapy: risk of development and treatment. *Transplantation.* 2001 Dec 27; 72 (12): 1934–1939. doi: 10.1097/00007890-200112270-00012. PMID: 11773892.
 15. *Beckebaum S, Cicinnati VR, Radtke A, Kabar I.* Calcineurin inhibitors in liver transplantation – still champions or threatened by serious competitors? *Liver Int.* 2013 May; 33 (5): 656–665. doi: 10.1111/liv.12133. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23442173.
 16. *Ojo AO.* Renal disease in recipients of nonrenal solid organ transplantation. *Semin Nephrol.* 2007 Jul; 27 (4): 498–507. doi: 10.1016/j.semnephrol.2007.03.010. PMID: 17616280.
 17. *Nowicki M, Zwiech R.* Chronic renal failure in non-renal organ transplant recipients. *Ann Transplant.* 2005; 10 (3): 54–58. PMID: 16617670.
 18. *Uemura T, Schaefer E, Hollenbeak CS, Khan A, Kadry Z.* Outcome of induction immunosuppression for liver transplantation comparing anti-thymocyte globulin, daclizumab, and corticosteroid. *Transpl Int.* 2011 Jul; 24 (7): 640–650. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01250.x. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21429047.
 19. *Cai J, Terasaki PI.* Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation.* 2010 Dec 27; 90 (12): 1511–1515. doi: 10.1097/TP.0b013e3181fecfcb. PMID: 21057388.
 20. *Levitsky J, O’Leary JG, Asrani S, Sharma P, Fung J, Wiseman A, Niemann CU.* Protecting the Kidney in Liver Transplant Recipients: Practice-Based Recommendations From the American Society of Transplantation Liver and Intestine Community of Practice. *Am J Transplant.* 2016 Sep; 16 (9): 2532–2544. doi: 10.1111/ajt.13765. Epub 2016 Apr 22. PMID: 26932352; PMCID: PMC5007154.
 21. *Sharma P, Sun Y, Neal J, Erley J, Shen J, Tischer S et al.* Renal Outcomes of Liver Transplantation Recipients Receiving Standard Immunosuppression and Early Renal Sparing Immunosuppression: A Retrospective Single Center Study. *Transplant Direct.* 2019 Aug 8; 5 (9): e480. doi: 10.1097/TXD.0000000000000917. PMID: 31579808; PMCID: PMC6739043.
 22. *Jain A, Sharma R, Ryan C, Tsoulfas G, Orloff M, Abt P et al.* Potential immunological advantage of intravenous mycophenolate mofetil with tacrolimus and steroids in primary deceased donor liver transplantation

- and live donor liver transplantation without antibody induction. *Liver Transpl.* 2008 Feb; 14 (2): 202–209. doi: 10.1002/lt.21348. PMID: 18236395.
23. *Asrani SK, Wiesner RH, Trotter JF, Klintmalm G, Katz E, Maller E et al.* De novo sirolimus and reduced-dose tacrolimus versus standard-dose tacrolimus after liver transplantation: the 2000–2003 phase II prospective randomized trial. *Am J Transplant.* 2014 Feb; 14 (2): 356–366. doi: 10.1111/ajt.12543. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24456026.
 24. *Teperman L, Moonka D, Sebastian A, Sher L, Marotta P, Marsh C et al.* Spare-the-Nephron Trial Liver Transplantation Study Group. Calcineurin inhibitor-free mycophenolate mofetil/sirolimus maintenance in liver transplantation: the randomized spare-the-nephron trial. *Liver Transpl.* 2013 Jul; 19 (7): 675–689. doi: 10.1002/lt.23658. PMID: 23775875.
 25. *Fischer L, Saliba F, Kaiser GM, De Carlis L, Metselaar HJ, De Simone P et al.* H2304 Study Group. Three-year Outcomes in De Novo Liver Transplant Patients Receiving Everolimus With Reduced Tacrolimus: Follow-Up Results From a Randomized, Multicenter Study. *Transplantation.* 2015 Jul; 99 (7): 1455–1462. doi: 10.1097/TP.0000000000000555. PMID: 26151607.
 26. *Sterneck M, Kaiser GM, Heyne N, Richter N, Rauchfuss F, Pascher A et al.* Long-term follow-up of five yr shows superior renal function with everolimus plus early calcineurin inhibitor withdrawal in the PROTECT randomized liver transplantation study. *Clin Transplant.* 2016 Jun; 30 (6): 741–748. doi: 10.1111/ctr.12744. Epub 2016 May 10. PMID: 27160359.
 27. *Lin M, Mittal S, Sahebjam F, Rana A, Sood GK.* Everolimus with early withdrawal or reduced-dose calcineurin inhibitors improves renal function in liver transplant recipients: A systematic review and meta-analysis. *Clin Transplant.* 2017 Feb; 31 (2). doi: 10.1111/ctr.12872. Epub 2017 Jan 18. PMID: 27862340.
 28. *Charlton M, Levitsky J, Aqel B, O'Grady J, Hembach J, Rinella M et al.* International Liver Transplantation Society Consensus Statement on Immunosuppression in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 2018 May; 102 (5): 727–743. doi: 10.1097/TP.0000000000002147. Erratum in: *Transplantation.* 2019 Jan; 103 (1): e37. PMID: 29485508.
 29. *De Simone P, Carrai P, Coletti L, Ghinolfi D, Petruccelli S, Filipponi F.* Modification of immunosuppressive therapy as risk factor for complications after liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2017 Apr; 31 (2): 199–209. doi: 10.1016/j.bpg.2017.03.001. Epub 2017 Apr 12. PMID: 28624108.
 30. *Klintmalm GB, Feng S, Lake JR, Vargas HE, Wekerle T, Agnes S et al.* Belatacept-based immunosuppression in de novo liver transplant recipients: 1-year experience from a phase II randomized study. *Am J Transplant.* 2014 Aug; 14 (8): 1817–1827. doi: 10.1111/ajt.12810. PMID: 25041339; PMCID: PMC4140547.
 31. *Abdelmalek MF, Humar A, Stickel F, Andreone P, Pascher A, Barroso E et al.* Sirolimus Liver Conversion Trial Study Group. Sirolimus conversion regimen versus continued calcineurin inhibitors in liver allograft recipients: a randomized trial. *Am J Transplant.* 2012 Mar; 12 (3): 694–705. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03919.x. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22233522.
 32. *De Simone P, Metselaar HJ, Fischer L, Dumortier J, Boudjema K, Hardwigsen J et al.* Conversion from a calcineurin inhibitor to everolimus therapy in maintenance liver transplant recipients: a prospective, randomized, multicenter trial. *Liver Transpl.* 2009 Oct; 15 (10): 1262–1269. doi: 10.1002/lt.21827. PMID: 19790150.
 33. *Saliba F, Dharancy S, Lorho R, Conti F, Radenne S, Neau-Cransac M et al.* Conversion to everolimus in maintenance liver transplant patients: a multicenter, retrospective analysis. *Liver Transpl.* 2011 Aug; 17 (8): 905–913. doi: 10.1002/lt.22292. PMID: 21384525.
 34. *Bilbao I, Salcedo M, Gómez MA, Jimenez C, Castroagudín J, Fabregat J et al.* EVEROLIVER study group. Renal function improvement in liver transplant recipients after early everolimus conversion: A clinical practice cohort study in Spain. *Liver Transpl.* 2015 Aug; 21 (8): 1056–1065. doi: 10.1002/lt.24172. PMID: 25990257.
 35. *Goralczyk AD, Bari N, Abu-Ajaj W, Lorf T, Ramadori G, Friede T, Obed A.* Calcineurin inhibitor sparing with mycophenolate mofetil in liver transplantation: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Transplant.* 2012 Oct; 12 (10): 2601–2607. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04157.x. Epub 2012 Jul 19. PMID: 22813081.
 36. *Feng S, Ekong UD, Lobritto SJ, Demetris AJ, Roberts JP, Rosenthal P et al.* Complete immunosuppression withdrawal and subsequent allograft function among pediatric recipients of parental living donor liver transplants. *JAMA.* 2012 Jan 18; 307 (3): 283–293. doi: 10.1001/jama.2011.2014. PMID: 22253395.
 37. *Benítez C, Londoño MC, Miquel R, Manzia TM, Abalde JG, Lozano JJ et al.* Prospective multicenter clinical trial of immunosuppressive drug withdrawal in stable adult liver transplant recipients. *Hepatology.* 2013 Nov; 58 (5): 1824–1835. doi: 10.1002/hep.26426. Epub 2013 Sep 19. PMID: 23532679.
 38. *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 May; 19 (5): 1397–1409. doi: 10.1111/ajt.15205. Epub 2018 Dec 31. Erratum in: *Am J Transplant.* 2019 Aug; 19 (8): 2393. PMID: 30506630; PMCID: PMC6482056.
 39. *Griekspoor A, Zwart W, Neeffes J, Michalides R.* Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nucl Recept Signal.* 2007 Mar 9; 5: e003. doi: 10.1621/nrs.05003. PMID: 17464358; PMCID: PMC1853070.
 40. *Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM.* Effects of glucocorticoids on gene transcription. *Eur J Pharmacol.* 2004 Oct 1; 500 (1–3): 51–62. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.011. PMID: 15464020.
 41. *Stellato C.* Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc.* 2004; 1 (3):

- 255–263. doi: 10.1513/pats.200402-015MS. PMID: 16113443.
42. Gheith OA, Nematalla AH, Bakr MA, Refaie A, Shokeir AA, Ghoneim MA. Steroid avoidance reduce the cost of morbidities after live-donor renal allografts: a prospective, randomized, controlled study. *Exp Clin Transplant*. 2011 Apr; 9 (2): 121–127. PMID: 21453230.
43. Citterio F. Steroid side effects and their impact on transplantation outcome. *Transplantation*. 2001 Dec 27; 72 (12 Suppl): S75–80. PMID: 11833145.
44. Veenstra DL, Best JH, Hornberger J, Sullivan SD, Hricik DE. Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation. *Am J Kidney Dis*. 1999 May; 33 (5): 829–839. doi: 10.1016/s0272-6386(99)70414-2. PMID: 10213637.
45. Opelz G, Döhler B, Laux G. Collaborative Transplant Study. Long-term prospective study of steroid withdrawal in kidney and heart transplant recipients. *Am J Transplant*. 2005 Apr; 5 (4 Pt 1): 720–728. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00765.x. PMID: 15760395.
46. Hricik DE, O'Toole MA, Schulak JA, Herson J. Steroid-free immunosuppression in cyclosporine-treated renal transplant recipients: a meta-analysis. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Dec; 4 (6): 1300–1305. doi: 10.1681/ASN.V461300. PMID: 8130356.
47. Kasiske BL, Zeier MG, Chapman JR, Craig JC, Ekberg H, Garvey CA et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients: a summary. *Kidney Int*. 2010 Feb; 77 (4): 299–311. doi: 10.1038/ki.2009.377. Epub 2009 Oct 21. PMID: 19847156.
48. Pascual J, Quereda C, Zamora J, Hernández D. Spanish Group for Evidence-Based Medicine in Renal Transplantation. Updated metaanalysis of steroid withdrawal in renal transplant patients on calcineurin inhibitor and mycophenolate mofetil. *Transplant Proc*. 2005 Nov; 37 (9): 3746–3748. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.09.177. PMID: 16386525.
49. Welberry Smith MP, Cherukuri A, Newstead CG, Lewington AJ, Ahmad N, Menon K et al. Alemtuzumab induction in renal transplantation permits safe steroid avoidance with tacrolimus monotherapy: a randomized controlled trial. *Transplantation*. 2013 Dec 27; 96 (12): 1082–1088. doi: 10.1097/TP.0b013e3182a64db9. PMID: 24056618.
50. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R. European Renal Best Practice Work Group on Kidney Transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul; 26 (7): 2099–2106. doi: 10.1093/ndt/gfr169. Epub 2011 May 9. PMID: 21555392.
51. Pascual J. Steroid avoidance or withdrawal in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Dec; 16 (6): 600–605. doi: 10.1097/MOT.0b013e32834c23fa. PMID: 21971514.
52. Pascual J, Royuela A, Galeano C, Crespo M, Zamora J. Very early steroid withdrawal or complete avoidance for kidney transplant recipients: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*. 2012 Feb; 27 (2): 825–832. doi: 10.1093/ndt/gfr374. Epub 2011 Jul 22. PMID: 21785040.
53. Luan FL, Steffick DE, Gadegbeku C, Norman SP, Wolfe R, Ojo AO. Graft and patient survival in kidney transplant recipients selected for *de novo* steroid-free maintenance immunosuppression. *Am J Transplant*. 2009 Jan; 9 (1): 160–168. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02442.x. Epub 2008 Oct 24. PMID: 18976304; PMCID: PMC2626128.
54. Азазиоприн: инструкция по применению [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; c2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Azathioprine: instruction [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennyh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
55. Elion GB. The purine path to chemotherapy. *Science*. 1989 Apr 7; 244 (4900): 41–47. doi: 10.1126/science.2649979. PMID: 2649979.
56. Swann PF, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*. 1996 Aug 23; 273 (5278): 1109–1111. doi: 10.1126/science.273.5278.1109. PMID: 8688098.
57. Karam S, Wali RK. Current State of Immunosuppression: Past, Present, and Future. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2015; 25 (2): 113–134. doi: 10.1615/critrevukaryotgeneexpr.2015011421. PMID: 26080606.
58. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation*. 1995 Aug 15; 60 (3): 225–232. doi: 10.1097/00007890-199508000-00003. PMID: 7645033.
59. Sievers TM, Rossi SJ, Ghobrial RM, Arriola E, Nishimura P, Kawano M, Holt CD. Mycophenolate mofetil. *Pharmacotherapy*. 1997 Nov-Dec; 17 (6): 1178–1197. PMID: 9399601.
60. Микофенолата мофетил [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; c2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Mycophenolate mofetil [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennyh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
61. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem*. 1993 Dec 25; 268 (36): 27286–27290. PMID: 7903306.
62. Eugui EM, Almquist SJ, Muller CD, Allison AC. Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid *in vitro*: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol*. 1991 Feb; 33 (2): 161–173. doi: 10.1111/j.1365-3083.1991.tb03746.x. PMID: 1826793.
63. Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S et al. Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. *Transplant Proc*. 1999 Feb-Mar; 31 (1–2):

- 1250–1252. doi: 10.1016/s0041-1345(98)01984-8. PMID: 10083559.
64. Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2003 Oct; 134 (1): 63–69. doi: 10.1046/j.1365-2249.2003.02269.x. PMID: 12974756; PMCID: PMC1808848.
 65. Gonzalez Molina M, Seron D, Garcia del Moral R, Carrera M, Sola E, Jesus Alferes M et al. Mycophenolate mofetil reduces deterioration of renal function in patients with chronic allograft nephropathy. A follow-up study by the Spanish Cooperative Study Group of Chronic Allograft Nephropathy. *Transplantation*. 2004 Jan 27; 77 (2): 215–220. doi: 10.1097/01.TP.0000100684.59784.FF. PMID: 14742984.
 66. Knight SR, Russell NK, Barcena L, Morris PJ. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review. *Transplantation*. 2009 Mar 27; 87 (6): 785–794. doi: 10.1097/TP.0b013e3181952623. PMID: 19300178.
 67. Provenzani A, Santeusano A, Mathis E, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Poma P et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. *World J Gastroenterol*. 2013 Dec 28; 19 (48): 9156–9173. doi: 10.3748/wjg.v19.i48.9156. PMID: 24409044; PMCID: PMC3882390.
 68. Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*. 1978 Dec 23–30; 2 (8104-5): 1323–1327. doi: 10.1016/s0140-6736(78)91970-0. PMID: 82836.
 69. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson D, Matas AJ. Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2003 Feb; 3 (2): 178–185. doi: 10.1034/j.1600-6143.2003.00010.x. PMID: 12603213.
 70. Гудкова ВВ, Кимельфельд ЕИ, Стаховская ЛВ. Малоизвестный синдром задней обратимой энцефалопатии, требующий неотложной помощи. *Consilium Medicum*. 2018; 20 (2): 84–89. Gudkova VV, Kimel'fel'd EI, Stakhovskaya LV. Maloizvestnyy sindrom zadney obratimoy entsefalopatii, trebuyushchiy neotlozhnoy pomoshchi. *Consilium Medicum*. 2018; 20 (2): 84–89. doi: 10.26442/2075-1753_2018.2.84-89.
 71. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gürkan A et al. ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20; 357 (25): 2562–2575. doi: 10.1056/NEJMoa067411. PMID: 18094377.
 72. Ekberg H, Bernasconi C, Tedesco-Silva H, Vitko S, Hugo C, Demirbas A et al. Calcineurin inhibitor minimization in the Symphony study: observational results 3 years after transplantation. *Am J Transplant*. 2009 Aug; 9 (8): 1876–1885. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02726.x. Epub 2009 Jun 26. PMID: 19563339.
 73. Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Oct; 28 (10): 721–726. doi: 10.7164/antibiotics.28.721. PMID: 1102508.
 74. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokin*. 2004; 43 (2): 83–95. doi: 10.2165/00003088-200443020-00002. PMID: 14748618.
 75. Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by Rapamycin. *Cell Immunol*. 1994 Jul; 156 (2): 493–507. doi: 10.1006/cimm.1994.1193. PMID: 7517796.
 76. Kim HS, Raskova J, Degiannis D, Raska K Jr. Effects of cyclosporine and Rapamycin on immunoglobulin production by preactivated human B cells. *Clin Exp Immunol*. 1994 Jun; 96 (3): 508–512. doi: 10.1111/j.1365-2249.1994.tb06058.x. PMID: 8004821; PMCID: PMC1534564.
 77. Ponticelli C. The pros and the cons of mTOR inhibitors in kidney transplantation. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Feb; 10 (2): 295–305. doi: 10.1586/1744666X.2014.872562. Epub 2013 Dec 30. PMID: 24377908.
 78. Viklický O, Zou H, Müller V, Lacha J, Szabó A, Heemann U. SDZ-RAD предотвращает проявление хронического отторжения у почечных аллотрансплантатов крыс. *Пересадка*. 2000 Фев 27; 69 (4): 497–502. Viklický O, Zou H, Müller V, Lacha J, Szabó A, Heemann U. SDZ-RAD predotvrashchaet proyavlenie khronicheskogo ottozheniya u pochechnykh allotransplantatov krys. *Peresadka*. 2000 Fev 27; 69 (4): 497–502. doi: 10.1097/00007890-200002270-00006. PMID: 10708101.
 79. Kahan BD. Efficacy of sirolimus compared with azathioprine for reduction of acute renal allograft rejection: a randomised multicentre study. The Rapmune US Study Group. *Lancet*. 2000 Jul 15; 356 (9225): 194–202. doi: 10.1016/s0140-6736(00)02480-6. PMID: 10963197.
 80. Garcia R, Machado PG, Felipe CR, Park SI, Spinelli GA, Franco MF et al. Exploratory calcineurin inhibitor-free regimens in living-related kidney transplant recipients. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Apr; 40 (4): 457–465. doi: 10.1590/s0100-879x2007000400003. PMID: 17401488.
 81. Weir MR, Mulgaonkar S, Chan L, Shidban H, Waid TH, Preston D et al. Mycophenolate mofetil-based immunosuppression with sirolimus in renal transplantation: a randomized, controlled Spare-the-Nephron trial. *Kidney Int*. 2011 Apr; 79 (8): 897–907. doi: 10.1038/ki.2010.492. Epub 2010 Dec 29. PMID: 21191361.
 82. Schena FP, Pascoe MD, Alberu J, del Carmen Rial M, Oberbauer R, Brennan DC et al. Sirolimus CONVERT Trial Study Group. Conversion from calcineurin inhibitors to sirolimus maintenance therapy in renal allograft recipients: 24-month efficacy and safety results from the CONVERT trial. *Transplantation*. 2009 Jan 27; 87 (2): 233–242. doi: 10.1097/TP.0b013e3181927a41. PMID: 19155978.

83. Roman A, Ussetti P, Zurbano F, Borro JM, Solé A, Carreño MC, Santos F. A retrospective 12-month study of conversion to everolimus in lung transplant recipients. *Transplant Proc.* 2011 Sep; 43 (7): 2693–2698. doi: 10.1016/j.transproceed.2011.06.028. PMID: 21911148.
84. De Simone P, Nevens F, De Carlis L, Metselaar HJ, Beckebaum S, Saliba F et al. H2304 Study Group. Everolimus with reduced tacrolimus improves renal function in *de novo* liver transplant recipients: a randomized controlled trial. *Am J Transplant.* 2012 Nov; 12 (11): 3008–3020. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04212.x. Epub 2012 Aug 6. PMID: 22882750; PMCID: PMC3533764.
85. Eisen HJ, Kobashigawa J, Starling RC, Pauly DF, Kfoury A, Ross H et al. Everolimus versus mycophenolate mofetil in heart transplantation: a randomized, multicenter trial. *Am J Transplant.* 2013 May; 13 (5): 1203–1216. doi: 10.1111/ajt.12181. Epub 2013 Feb 22. PMID: 23433101.
86. Wang SS, Chou NK, Chi NH, Huang SC, Wu IH, Wang CH et al. Clinical experience of tacrolimus with everolimus in heart transplantation. *Transplant Proc.* 2012 May; 44 (4): 907–909. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.01.094. PMID: 22564581.
87. LaMattina JC, Mezrich JD, Fernandez LA, D'Alessandro AM, Djamali A, Musat AI et al. Native kidney function following liver transplantation using calcineurin inhibitors: single-center analysis with 20 years of follow-up. *Clin Transplant.* 2013 Mar-Apr; 27 (2): 193–202. doi: 10.1111/ctr.12063. Epub 2013 Jan 7. PMID: 23294013; PMCID: PMC3622762.
88. Sterneck M, Kaiser GM, Heyne N, Richter N, Rauchfuss F, Pascher A et al. Everolimus and early calcineurin inhibitor withdrawal: 3-year results from a randomized trial in liver transplantation. *Am J Transplant.* 2014 Mar; 14 (3): 701–710. doi: 10.1111/ajt.12615. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24502384; PMCID: PMC4285226.
89. Finn RS. Current and Future Treatment Strategies for Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Role of mTOR Inhibition. *Liver Cancer.* 2012 Nov; 1 (3–4): 247–256. doi: 10.1159/000343839. PMID: 24159589; PMCID: PMC3760459.
90. Сушков АИ, Мойсюк ЯГ. Белатацепт при трансплантации почки. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2013; 15 (1): 96–105. Sushkov AI, Moysyuk YaG. Belatasept pri transplantatsii pochki. *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov.* 2013; 15 (1): 96–105. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2013-1-96-105>.
91. Белатацепт: описание [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; с2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Belatacept: description [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennykh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
92. Su VC, Harrison J, Rogers C, Ensom MH. Belatacept: a new biologic and its role in kidney transplantation. *Ann Pharmacother.* 2012 Jan; 46 (1): 57–67. doi: 10.1345/aph.1Q537. Epub 2012 Jan 3. PMID: 22215686.
93. Florman S, Vincenti F, Durrbach A, Abouljoud M, Bresnahan B, Garcia VD et al. Outcomes at 7 years post-transplant in black vs nonblack kidney transplant recipients administered belatacept or cyclosporine in BENEFIT and BENEFIT-EXT. *Clin Transplant.* 2018 Apr; 32 (4): e13225. doi: 10.1111/ctr.13225. Epub 2018 Mar 14. PMID: 29461660.
94. Vincenti F, Charpentier B, Vanrenterghem Y, Rostaing L, Bresnahan B, Darji P et al. A phase III study of belatacept-based immunosuppression regimens versus cyclosporine in renal transplant recipients (BENEFIT study). *Am J Transplant.* 2010 Mar; 10 (3): 535–546. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.03005.x. PMID: 20415897.
95. Vanrenterghem Y, Bresnahan B, Campistol J, Durrbach A, Grinyó J, Neumayer HH et al. Belatacept-based regimens are associated with improved cardiovascular and metabolic risk factors compared with cyclosporine in kidney transplant recipients (BENEFIT and BENEFIT-EXT studies). *Transplantation.* 2011 May 15; 91 (9): 976–983. doi: 10.1097/TP.0b013e31820c10eb. PMID: 21372756.
96. Durrbach A, Pestana JM, Pearson T, Vincenti F, Garcia VD, Campistol J et al. A phase III study of belatacept versus cyclosporine in kidney transplants from extended criteria donors (BENEFIT-EXT study). *Am J Transplant.* 2010 Mar; 10 (3): 547–557. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03016.x. PMID: 20415898.
97. Goring SM, Levy AR, Ghement I, Kalsekar A, Eyawo O, L'Italien GJ, Kasiske B. A network meta-analysis of the efficacy of belatacept, cyclosporine and tacrolimus for immunosuppression therapy in adult renal transplant recipients. *Curr Med Res Opin.* 2014 Aug; 30 (8): 1473–1487. doi: 10.1185/03007995.2014.898140. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24628478.
98. Cai J, Terasaki PI. Induction immunosuppression improves long-term graft and patient outcome in organ transplantation: an analysis of United Network for Organ Sharing registry data. *Transplantation.* 2010 Dec 27; 90 (12): 1511–1515. doi: 10.1097/TP.0b013e3181fecfcb. PMID: 21057388.
99. Базиликсимаб [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; с2020-09 [Updated 2022 April 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Basiliximab [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennykh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 April 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
100. 2009 OPTN/SRTR annual report: transplant data 1999–2008 [report on the Internet]. Bethesda, MD: Health Resources and Services Administration, US Department of Health & Human Services; 2009 [cited 20 April 2015].
101. Lentine KL, Smith JM, Hart A, Miller J, Skeans MA, Larkin L et al. OPTN/SRTR 2020 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant.* 2022 Mar; 22 Suppl 2: 21–136. doi: 10.1111/ajt.16982. PMID: 35266618.
102. Wagner SJ, Brennan DC. Induction therapy in renal transplant recipients: how convincing is the current evidence? *Drugs.* 2012 Mar 26; 72 (5): 671–683.

- doi: 10.2165/11631300-000000000-00000. PMID: 22439670.
103. Michallet MC, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard JP. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation*. 2003 Mar 15; 75 (5): 657–662. doi: 10.1097/01.TP.0000053198.99206.E6. PMID: 12640305.
 104. Feng X, Kajigaya S, Solomou EE, Keyvanfar K, Xu X, Raghavachari N et al. Rabbit ATG but not horse ATG promotes expansion of functional CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells *in vitro*. *Blood*. 2008 Apr 1; 111 (7): 3675–3683. doi: 10.1182/blood-2008-01-130146. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18250226; PMCID: PMC2275026.
 105. Жулай ГА, Олейник ЕК. Регуляторные Т-лимфоциты CD4+CD25+FOXP3+. Перспективы применения в иммунотерапии. *Труды Карельского научного центра РАН*. 2012; 2: 3–17. Zhulay GA, Oleynik EK. Regulyatornye T-limfotsity CD4+CD25+FOXP3+. Perspektivy primeneniya v immunoterapii. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra RAN*. 2012; 2: 3–17.
 106. Urbanova M, Brabcova I, Girmanova E, Zelezny F, Vilklicky O. Differential regulation of the nuclear factor-κB pathway by rabbit antithymocyte globulins in kidney transplantation. *Transplantation*. 2012 Mar 27; 93 (6): 589–596. doi: 10.1097/TP.0b013e31824491aa. PMID: 22334040.
 107. Тимоглобулин: инструкция по применению [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; c2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Thymoglobulin: instruction [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennyh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
 108. Deeks ED, Keating GM. Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): a review of its use in the prevention and treatment of acute renal allograft rejection. *Drugs*. 2009 Jul 30; 69 (11): 1483–1512. doi: 10.2165/00003495-200969110-00007. PMID: 19634926.
 109. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Thymoglobulin Induction Study Group. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Nov 9; 355 (19): 1967–1977. doi: 10.1056/NEJMoa060068. PMID: 17093248.
 110. Boggi U, Danesi R, Vistoli F, Del Chiaro M, Signori S, Marchetti P et al. A benefit-risk assessment of basiliximab in renal transplantation. *Drug Saf*. 2004; 27 (2): 91–106. doi: 10.2165/00002018-200427020-00002. PMID: 14717621.
 111. Lawen JG, Davies EA, Mourad G, Oppenheimer F, Molina MG, Rostaing L et al. Simulect International Study Group. Randomized double-blind study of immunoprophylaxis with basiliximab, a chimeric anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody, in combination with mycophenolate mofetil-containing triple therapy in renal transplantation. *Transplantation*. 2003 Jan 15; 75 (1): 37–43. doi: 10.1097/00007890-200301150-00007. PMID: 12544868.
 112. Sugiyama K, Isogai K, Horisawa S, Toyama A, Satoh H, Saito K et al. Comparative study of the cellular pharmacodynamics of tacrolimus in renal transplant recipients treated with and without basiliximab. *Cell Transplant*. 2012; 21 (2–3): 565–570. doi: 10.3727/096368911X605493. PMID: 22793066.
 113. Beniaminovitz A, Itescu S, Lietz K, Donovan M, Burke EM, Groff BD et al. Prevention of rejection in cardiac transplantation by blockade of the interleukin-2 receptor with a monoclonal antibody. *N Engl J Med*. 2000 Mar 2; 342 (9): 613–619. doi: 10.1056/NEJM200003023420902. PMID: 10699160.
 114. Алемтузумаб [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; c2020-09 [Updated 2022 April 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Alemtuzumab [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennyh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 April 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
 115. Prasad N, Gurjer D, Bhadauria D, Gupta A, Srivastava A, Kaul A et al. Is basiliximab induction, a novel risk factor for new onset diabetes after transplantation for living donor renal allograft recipients? *Nephrology (Carlton)*. 2014 Apr; 19 (4): 244–250. doi: 10.1111/nep.12209. PMID: 24447227.
 116. Morris PJ, Russell NK. Alemtuzumab (Campath-1H): a systematic review in organ transplantation. *Transplantation*. 2006 May 27; 81 (10): 1361–1367. doi: 10.1097/01.tp.0000219235.97036.9c. PMID: 16732169.
 117. Calne R, Friend P, Moffatt S, Bradley A, Hale G, Firth J et al. Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet*. 1998 Jun 6; 351 (9117): 1701–1702. doi: 10.1016/S0140-6736(05)77739-4. Erratum in: *Lancet* 1998 Aug 1; 352 (9125): 408. PMID: 9734890.
 118. Kirk AD, Hale DA, Mannon RB, Kleiner DE, Hoffmann SC, Kampen RL et al. Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H). *Transplantation*. 2003 Jul 15; 76 (1): 120–129. doi: 10.1097/01.TP.0000071362.99021.D9. PMID: 12865797.
 119. Hanaway MJ, Woodle ES, Mulgaonkar S, Peddi VR, Kaufman DB, First MR et al. INTAC Study Group. Alemtuzumab induction in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2011 May 19; 364 (20): 1909–1919. doi: 10.1056/NEJMoa1009546. PMID: 21591943.
 120. LaMattina JC, Mezrich JD, Hofmann RM, Foley DP, D'Alessandro AM, Sollinger HW, Pirsch JD. Alemtuzumab as compared to alternative contemporary induction regimens. *Transpl Int*. 2012 May; 25 (5): 518–526. doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01448.x. Epub 2012 Mar 6. PMID: 22394259; PMCID: PMC3665410.
 121. Hurst FP, Altieri M, Nee R, Agodoa LY, Abbott KC, Jindal RM. Poor outcomes in elderly kidney transplant recipients receiving alemtuzumab induction. *Am J Nephrol*. 2011; 34 (6): 534–541. doi: 10.1159/000334092.

- Epub 2011 Nov 18. PMID: 22104284; PMCID: PMC3237278.
122. Knechtle SJ, Pirsch JD, H Fechner J Jr, Becker BN, Friedl A, Colvin RB et al. Campath-1H induction plus Rapamycin monotherapy for renal transplantation: results of a pilot study. *Am J Transplant.* 2003 Jun; 3 (6): 722–730. doi: 10.1034/j.1600-6143.2003.00120.x. PMID: 12780564.
123. Flechner SM, Friend PJ, Brockmann J, Ismail HR, Zilvetti M, Goldfarb D et al. Alemtuzumab induction and sirolimus plus mycophenolate mofetil maintenance for CNJ and steroid-free kidney transplant immunosuppression. *Am J Transplant.* 2005 Dec; 5 (12): 3009–3014. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.01123.x. PMID: 16303017.
124. Ритуксимаб [Internet]. Vidal: Справочник лекарственных средств; c2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>. Rituximab [Internet]. Vidal: Spravochnik lekarstvennyh sredstv; s2020-09 [Updated 2022 July 11]. Available from: <https://www.vidal.ru/>.
125. Vo AA, Lukovsky M, Toyoda M, Wang J, Reinsmoen NL, Lai CH et al. Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation. *N Engl J Med.* 2008 Jul 17; 359 (3): 242–251. doi: 10.1056/NEJMoa0707894. PMID: 18635429.
126. Fuchinoue S, Ishii Y, Sawada T, Murakami T, Iwadoh K, Sannomiya A et al. The 5-year outcome of AB0-incompatible kidney transplantation with rituximab induction. *Transplantation.* 2011 Apr 27; 91 (8): 853–857. doi: 10.1097/TP.0b013e31820f08e8. PMID: 21297552.
127. Столяревич ЕС, Артюхина ЛЮ, Иванова ЕС, Томила НА. Использование комбинированной терапии плазмаферезом, внутривенным человеческим иммуноглобулином и ритуксимабом для лечения хронического отторжения трансплантированной почки. *Нефрология.* 2016; 20 (6): 67–74. Stolyarevich ES, Artyukhina LYu, Ivanova ES, Tomilina NA. Ispol'zovanie kombinirovannoy terapii plazmaferezom, vnutrivennym chelovecheskim immunoglobulinom i rituksimabom dlya lecheniya khronicheskogo ottorzheniya transplantirovannoy pochki. *Nefrologiya.* 2016; 20 (6): 67–74.
128. Tydén G, Genberg H, Tollemar J, Ekberg H, Persson NH, Tufvesson G et al. A randomized, doubleblind, placebo-controlled, study of single-dose rituximab as induction in renal transplantation. *Transplantation.* 2009 May 15; 87 (9): 1325–1329. doi: 10.1097/TP.0b013e3181a235fd. PMID: 19424032.
129. Clatworthy MR, Watson CJ, Plotnek G, Bardsley V, Chaudhry AN, Bradley JA, Smith KG. B-cell-depleting induction therapy and acute cellular rejection. *N Engl J Med.* 2009 Jun 18; 360 (25): 2683–2685. doi: 10.1056/NEJMc0808481. PMID: 19535812; PMCID: PMC4143588.

Статья поступила в редакцию 12.09.2022 г.
The article was submitted to the journal on 12.09.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-39-45

СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННУЮ КАРДИОПАТИЮ И МЕТОДЫ ЕЕ ДИАГНОСТИКИ

Р.М. Муратов, С.И. Бабенко, М.Н. Соркомов

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

В последние годы кардиологам и сердечно-сосудистым хирургам все чаще приходится сталкиваться в своей практике с радиационно-индуцированными сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые описаны в литературе, но клинически мало изучены. Лучевая терапия широко используется при лечении многих видов рака, и несмотря на немалый риск осложнений, метод применяется примерно у 20–55% онкологических больных. Кардиотоксичность, связанная с облучением, проявляется отсроченно, обычно проходит от 10 до 30 лет после лечения. Облучение средостения значительно повышает риск развития неишемической кардиомиопатии. Обзоры по проблеме оценивают распространенность радиационно-индуцированной кардиомиопатии более чем в 10%. В связи с этим важно понимать патофизиологию радиационно-индуцированной болезни сердца, учитывать факторы риска, связанные с лучевым поражением, и своевременно диагностировать патологию.

Ключевые слова: опухоли средостения, лучевая терапия, радиационная кардиомиопатия.

CURRENT VIEW ON RADIATION-INDUCED HEART DISEASE AND METHODS OF ITS DIAGNOSIS

R.M. Muratov, S.I. Babenko, M.N. Sorkomov

Bakulev Scientific Center of Cardiovascular Surgery, Moscow, Russian Federation

In recent years, cardiologists and cardiovascular surgeons are increasingly encountering radiation-induced heart disease (RIHD) in their practice. This complication is described in literature but is poorly understood and clinically challenging. Radiation therapy (RT) is widely used in the treatment of many cancers. Despite the considerable risk of RT complications, it is used in 20–55% of cancer patients. Radiation-associated cardiotoxicity appears to be delayed, typically 10 to 30 years following treatment. Mediastinal irradiation significantly increases the risk of non-ischemic cardiomyopathy. Recent reviews estimate the prevalence of radiation-induced cardiomyopathy at more than 10%. Therefore, it is important to understand the pathophysiology of RIHD, consider risk factors associated with radiation injury, and detect the condition early.

Keywords: mediastinal tumors, radiation therapy, radiation-induced cardiomyopathy.

В последние годы кардиологам и сердечно-сосудистым хирургам все чаще приходится сталкиваться в своей практике с радиационно-индуцированными сердечно-сосудистыми заболеваниями, которые описаны в литературе, но клинически мало изучены. Лучевая терапия широко используется при лечении многих видов рака, и несмотря на немалый риск осложнений, метод применяется примерно у 20–55% онкологических больных. Основной механизм облу-

чения заключается в подавлении пролиферации или индуцировании апоптоза раковых клеток [4]. При использовании высоких доз облучения средостения может быть поврежден практически любой компонент сердца – миокард, перикард, клапаны, коронарные сосуды или проводящая система. В основном к кардиотоксическому эффекту приводит облучение при таких заболеваниях, как лимфома средостения, рак пищевода, тимомы, рак легких (особенно лево-

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

Corresponding author: Maxim Sorkomov. Address: 135, Rublevskoe Shosse, Moscow, 121552, Russian Federation. Phone: (495) 414-78-49. E-mail: sorcommn@gmail.com

сторонний), рак молочной железы (особенно левосторонний). Суммарная доза облучения средостения является основным фактором риска последующего развития сердечно-сосудистых заболеваний. Хотя осложнения могут наблюдаться при любой дозе, но существует линейное увеличение риска клапанных пороков сердца при суммарной дозе облучения выше 30 Гр/м² [1]. Кардиотоксичность, связанная с облучением, проявляется отсроченно, обычно проходит от 10 до 30 лет после лечения. Так, у пациентов с лимфомой Ходжкина в анамнезе, прошедших лучевую терапию, среднее время от постановки диагноза злокачественного новообразования до возникновения сердечных осложнений составляет около 19 лет [2]. Лимфома Ходжкина является одним из наиболее распространенных видов рака у молодых людей и по оценкам заболеваемости составляет 3 на 100 000 населения. Совокупная заболеваемость радиационно-индуцированной ишемической болезнью сердца в отдаленном периоде составляет почти 60% у выживших после лимфомы Ходжкина через 40 лет после облучения с относительным риском в 3,2 раза выше по сравнению с населением в целом, а у 51,4% пациентов при этом развивается 2 и более сердечно-сосудистых заболеваний [13]. Многие исследования подтвердили, что такие сердечно-сосудистые факторы риска, как артериальная гипертензия, сахарный диабет, дислипидемия и ожирение, значительно увеличивают риск сердечно-сосудистых заболеваний и связанных с ними осложнений лучевой терапии [3]. Риски увеличиваются также после химиотерапии и/или при наличии двух и более сердечно-сосудистых факторов риска.

Облучение средостения значительно повышает риск развития неишемической кардиомиопатии. Это и прямой фиброз миокарда, и гипертрофия миокарда, вторичная по отношению к клапанному поражению, и диастолическая дисфункция вследствие констриктивного перикардита. Обзоры по проблеме оценивают распространенность радиационно-индуцированной кардиомиопатии более чем в 10%. В связи с этим важно понимать патофизиологию радиационно-индуцированной болезни сердца, учитывать факторы риска, связанные с лучевым поражением, и своевременно диагностировать патологию.

Сердце состоит из трех слоев ткани: эндокард, миокард и эпикард. Миокард представляет собой высокоvascularизованную ткань с плотностью капилляров, приближающейся к 2800 капилляров/мм². Для сравнения, капиллярная плотность скелетных мышц значительно меньше, примерно 350 капилляров/мм². Субъединица миокарда состоит из сердечных миоцитов, капилляров и стромальной ткани. Каждая субъединица миокарда имеет сеть капилляров и зависит от диффузии для метаболизма питательных веществ, поскольку в ткани нет артериол. Капилляры

полностью окружают отдельные миоциты и в норме всегда открыты для перфузии. Кровоснабжение миокарда имеет решающее значение в работе сердечной мышцы и зависит от степени развития капиллярной системы.

Радиационное поражение характеризуется как острыми, так и хроническими изменениями сердечной ткани [11]. В течение нескольких минут после воздействия ионизирующего излучения повреждение клеток вызывает вазодилатацию и повышенную проницаемость сосудов. Известно, что сами кардиомиоциты устойчивы к радиации. Однако при использовании комбинированного лечения лучевой и химиотерапии риск осложнений значительно возрастает. Согласно классификации Suter и Ewer, все цитостатики разделяются по характеру повреждающего действия на сердечно-сосудистую систему. Выделяют два типа кардиотоксичности. Первый тип – необратимая дисфункция миокарда за счет гибели кардиомиоцитов. Таким воздействием обладают антрациклины. Степень повреждения миокарда в этом случае зависит от кумулятивной дозы. Второй тип – обратимая дисфункция кардиомиоцитов за счет митохондриальных и протеиновых повреждений. Этот тип наиболее характерен для трастузумаба и не зависит от кумулятивной дозы. Выделяют факторы риска кардиотоксичности. Для первого типа это высокая кумулятивная доза, внутривенное болюсное введение препарата, высокая разовая доза, совместное использование других кардиотоксичных препаратов (циклофосфамид, трастузумаб, паклитаксел и др.), предшествующая лучевая терапия, женский пол, возраст менее 15 и более 65 лет, имеющиеся сердечно-сосудистые заболевания (особенно артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца), ожирение, повышение уровня биомаркеров (тропонин) во время или после лечения антрациклинами. Для второго типа: предшествующая или одновременная терапия антрациклинами, фракция выброса левого желудочка менее 55%, имеющиеся сердечно-сосудистые заболевания (особенно артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца), возраст старше 50 лет, индекс массы тела более 25 кг/м².

Одним из наиболее понятных патофизиологических механизмов лучевого воздействия является повреждение макрососудов. Лучевой ожог эндотелия коронарных артерий вызывает воспалительную реакцию в стенке сосуда, в результате высвобождается большое количество цитокинов, ответственных за активацию макрофагов, и как следствие – отложение липопротеинов. Бляшки могут растрескиваться и вызывать тромбоз. Этот процесс в разной степени уменьшает просвет артерии, что приводит к клиническим проявлениям ишемической болезни сердца: стабильной и нестабильной стенокардии, инфаркту миокарда. Механизм, по сути, аналогичен форми-

рованию атеросклеротических бляшек, которые мы наблюдаем при традиционной ишемической болезни сердца, но при лучевом поражении событие происходит в ускоренном режиме.

Сто четырнадцать пациентов были включены в проспективное IRB клиническое исследование для оценки изменений региональной и общей сердечной сократимости после лучевой терапии по поводу рака левой молочной железы. Сканирование перфузии путем проведения сцинтиграфии миокарда с технецием-99 проводили до и после лучевой терапии. Оказалось, что частота новых дефектов перфузии через 6, 12, 18 и 24 месяца после лучевой терапии составила 27, 29, 38 и 42% соответственно. Значительная разница в перфузии миокарда была и между пациентами, у которых объем лучевого поражения левого желудочка был менее или более 5%. Новые дефекты перфузии со временем возникали примерно у 10–20% пациентов при малом объеме поражения левого желудочка (менее 5%) и у 50–60% при исходном объеме поражения более 5%. Частота дискинезии стенок левого желудочка у пациентов с дефектами перфузии и без них составила от 12 до 40% по сравнению с 0 и 9% соответственно [5].

Помимо повреждения крупных сосудов происходит микроваскулярное повреждение миокарда. Радиационно-индуцированное повреждение эндотелиальных клеток считается первичной и основной причиной повреждения миокарда [8]. Оно характеризуется как острыми, так и хроническими изменениями сердечной ткани. В течение нескольких минут после воздействия ионизирующего излучения повреждение клеток вызывает вазодилатацию и повышенную проницаемость сосудов. Поврежденные эндотелиальные клетки вызывают активацию острой воспалительной реакции. Воспалительные цитокины включают хемотаксический фактор моноцитов, фактор некроза опухоли и интерлейкины, включая IL-1, IL-6 и IL-8. Преобладающими клетками в острой фазе являются нейтрофилы, которые появляются во всех слоях сердца в областях, подвергшихся лучевой терапии. Происходит пролиферация, повреждение, отек и дегенерация капилляров, их количество значительно уменьшается. Хотя эндотелиальные клетки могут регенерировать, повреждение капиллярной сети необратимо, а это, естественно, приводит к значительному уменьшению кровоснабжения миокарда.

Радиационное воздействие на сердце вызывает не только повреждение эндотелиальных клеток и уменьшение количества капилляров, но и изменяет коагуляционную функцию и активность тромбоцитов, что приводит к немедленному отложению фибрина. Отложение и высвобождение фактора фон Виллебранда в эндотелиальных клетках увеличивается. Это в конечном счете приводит к увеличению адгезии тромбоцитов и тромбозу капилляров [9].

Острая фаза протекает в течение нескольких дней после проведения лучевой терапии. После этой острой инфильтрации существует период покоя, когда нет явных микроскопических изменений в ткани.

Острая провоспалительная среда является мощным инициатором фиброза [10]. Фибробласты рекрутируются из целого ряда источников: из мезенхимальных клеток, из костного мозга или из переходных эпителиально-мезенхимальных клеток. Однако радиация изменяет биологию профибробластных клеток. Оказалось, что ионизирующее излучение вызывает преждевременную дифференцировку фибробластов. Для нормальной дифференцировки фибробластов требуется 25–35 циклов клеточного деления. После ионизирующего облучения фибробласты-предшественники дифференцируются в постмитотические фибробласты в течение 2–3 недель, что составляет всего 3–4 клеточных цикла. Продолжительность жизни этих терминально дифференцированных радиационно-индуцированных фиброцитов почти на 40–45% короче, чем у естественно дифференцированных клеток. Показано, что эти постмитотические клетки в пять–восемь раз более активны в продукции интерстициальных коллагенов I, III и IV по сравнению с фибробластами-предшественниками. Миофибробласты постоянно активируются в облученных тканях [12].

Хроническое отложение коллагена и других компонентов внеклеточного матрикса может привести к образованию фиброзного рубца, снижающего функциональность пораженной ткани. Патологическое исследование этих поражений показывает повышенное содержание воспалительных клеток, фибробластов и избыточное количество внеклеточного матрикса, такого как коллагены, протеогликаны и фибронектин. Отложение внеклеточного матрикса приводит к поздней патологической дисфункции миоцитов, эндотелиальных клеток сосудов и перикарда [11]. Прогрессирующий фиброз миокарда в конечном итоге приводит к снижению эластичности и растяжимости ткани.

Сердечно-сосудистая система по-разному реагирует на повреждение миокарда, связанное с лучевой терапией, по сравнению с сердечной недостаточностью, связанной с ишемией. При повреждении миокарда, не связанном с лучевой терапией, организм непрерывно активирует симпатическую нервную систему, одновременно подавляя β -адренорецепторы. Напротив, повреждение миокарда, связанное с лучевой терапией, не приводит к активации симпатической нервной системы, но активация β -рецепторов в сердце происходит. Эта активация рецепторов может позволить сердцу стабилизировать сердечный выброс, несмотря на повреждение. По мере прогрессирования степени фиброза миокарда происходит дальнейшее снижение сердечного выброса, и это

совпадает с периодом начала застойной сердечной недостаточности [11].

Рестриктивная кардиомиопатия представляет собой позднюю стадию повреждения миокарда вследствие фиброза с тяжелой диастолической дисфункцией и симптомами сердечной недостаточности. Большинство радиационно-индуцированных поражений миокарда длительное время не имеют клинических симптомов, поэтому частота своевременной диагностики заболевания низкая, всего около 10% [6]. Трансторакальная эхокардиография является оптимальным методом визуализации для диагностики систолической и диастолической дисфункции левого желудочка. Наиболее распространенными эхокардиографическими особенностями являются регионарные нарушения движения стенки (обычно нижней стенки левого желудочка), умеренная гипертрофия левого желудочка и диастолическая дисфункция, которые могут проявляться тяжелой застойной сердечной недостаточностью [7]. В исследовании Paul A. Heidenreich et al. [14] распространенность аномалий движения стенки левого желудочка составила 13% (12/89) для лиц с латентным периодом от двух до 10 лет, 18% (24/132) для латентного периода от 11 до 20 лет и 29% (21/73) для латентного периода более 20 лет после лучевой терапии (не менее 35 Гр) средостения по поводу болезни Ходжкина. Аномалии регионарного движения стенки были независимо связаны с большей биологически эквивалентной дозой (отношение шансов 1,07 на единицу увеличения, 95% ДИ 1,02–1,13) и более старшим возрастом (отношение шансов 1,7 на 10-летнее увеличение, 95% ДИ 1,2–2,4) в дополнение ко времени после облучения.

Авторы исследовали влияние облучения на массу миокарда левого желудочка. Масса левого желудочка была ниже у облученных пациентов, чем у представителей аналогичного пола и возраста в общей популяции (исследование Framingham Heart [15]). Гипертрофия левого желудочка (определяемая как более 163 г/м для мужчин и 121 г/м для женщин) присутствовала у 6% (7/121) женщин и 2% (2/104) мужчин по сравнению с 19% женщин и 16% мужчин. Разница в массе миокарда была обусловлена меньшим диастолическим объемом ЛЖ у пациентов после облучения, так как систолический объем и толщина стенки были аналогичны. Также было обнаружено, что масса желудочков с поправкой на возраст оставалась постоянной или незначительно снижалась с течением времени после облучения. Это противоречит обычному увеличению массы миокарда левого желудочка, которое происходит с возрастом [16]. Когда авторы стратифицировали изменения массы миокарда левого желудочка по возрасту, наблюдалась четкая тенденция к снижению массы с увеличением латентного периода. При многомерном анализе масса желудочков уменьшалась на 0,6 г/м ($p = 0,001$) за

каждый год после облучения, но увеличивалась на 0,8 г/м ($p < 0,0001$) за каждый год с увеличением возраста. Аналогичные результаты наблюдались для толщины межжелудочковой перегородки и задней стенки левого желудочка, которая уменьшалась на 0,05 мм ($p = 0,08$) за каждый год после облучения, но увеличивалась на 0,1 мм ($p < 0,001$) за каждый год с увеличением возраста.

Современные методы визуализации по исследованию деформации миокарда показали, что они могут быть более чувствительными для выявления ранней субклинической дисфункции левого желудочка, чем стандартные показатели, такие как измерение фракции выброса. Стрейн является безразмерной величиной, отражающей изменение длины относительно первоначального состояния [17]. Продольный стрейн отражает изменение длины участка миокарда по длинной оси. Определяемый по короткой оси циркулярный стрейн демонстрирует сокращение циркулярно расположенных волокон миокарда. Поперечный (радиальный) стрейн описывает процессы утолщения/истончения миокардиальных волокон в различные фазы цикла, что происходит благодаря принципу несжимаемости сердечной мышцы.

Глобальная продольная деформация и скорость деформации, оцененные с использованием автоматизированной 2D-спекл-трекинговой эхокардиографии, позволяют выявить минимальные изменения систолической функции левого желудочка. Проспективное исследование BACCARAT было направлено на изучение связи между дозами облучения сердца и субклинической дисфункцией левого желудочка на основе снижения глобальной продольной деформации. В исследование вошли 79 пациентов с лучевой терапией рака молочной железы (64 – левосторонний и 15 – правосторонний) без химиотерапии. Эхокардиографические параметры, включая глобальную продольную деформацию, измеряли до лучевой терапии и через 6 месяцев после. Связь между субклинической дисфункцией левого желудочка, определяемой как снижение глобальной продольной деформации более 10%, и дозами облучения сердца выполняли на основе логистической регрессии. Нерадиационные факторы, связанные с субклинической дисфункцией левого желудочка, включали: возраст, индекс массы тела, артериальную гипертензию, гиперхолестеринемию и эндокринную патологию. Они также были учтены при многофакторном анализе, но оказалось, что не имели существенного значения. Авторы делают вывод, что субклиническая дисфункция левого желудочка может быть обнаружена на ранних стадиях после лучевой терапии по поводу рака молочной железы с помощью измерения глобальной продольной деформации на основе 2D спекл-трекинговой эхокардиографии.

Снижение продольной деформации в период от нескольких дней до 14 месяцев после лучевой терапии ранее наблюдали у пациентов с левосторонним раком молочной железы и другие авторы [18, 20]. Средний показатель снижения продольной деформации по их результатам составил от 5% до почти 15%. Suvi Sirkku Tuohinen et al. обращают внимание также и на региональные изменения, вызванные лучевой терапией. Исследование, проведенное авторами, показало, что изменения соответствовали полям проведения лучевой терапии. У пациентов с левосторонним раком молочной железы наблюдались изменения в апикальной части, тогда как у пациентов с правосторонним раком молочной железы наблюдались изменения в базальных сегментах передней и передне-перегородочной областей, что соответствует зоне, наиболее уязвимой для лучевой терапии [18]. A.F. Yu et al. также провели исследование, целью которого было определить, приводит ли лучевая терапия к ранним изменениям функции левого желудочка. Исследование проводили на основе 2D-эхокардиографической оценки таких параметров, как фракция выброса левого желудочка, индексы деформации миокарда, включая продольную (GLS), радиальную (GRS) и циркулярную деформации (GCS), левожелудочковые диастолические индексы и высокочувствительный тропонин. Оказалось, что в непосредственном периоде лучевой терапии не было предикторов изменения фракции выброса левого желудочка или изменений индексов продольной деформации. Аналогичным образом возраст, гипертония, исходное систолическое артериальное давление и прием сердечных препаратов не были предикторами изменения функции левого желудочка [19].

Электрокардиография редко имеет специфические изменения [14]. Однако частота сердечных сокращений в состоянии покоя выше у пациентов с более длительным периодом наблюдения после лучевой терапии (70 ± 13 ударов/мин в течение периода ≤ 10 лет, 74 ± 12 в период 11–20 лет и 81 ± 10 в период >20 лет). При многомерном анализе (возраст, пол, наличие диабета, гипертония, доза облучения) 10-летний период после облучения независимо предсказывал более высокую частоту сердечных сокращений в состоянии покоя (увеличение на 3,7 удара в минуту, 95% ДИ 1,3–6,1), блокаду правой ветви пучка Гиса (отношение шансов 7,3, 95% ДИ 1,2–45) и наличие аномального зубца Q (отношение шансов 4,9, 95% ДИ 1,7–14).

Магнитно-резонансная томография сердца, выявляя одновременно функциональные и структурные изменения, позволяет диагностировать радиационно-индуцированные коронарные, клапанные, миокардиальные и перикардиальные заболевания. Особенности метода включают характеристику ткани миокарда, основанную на различных релаксацион-

ных свойствах тканей, таких как жир, мышцы и области воспаления. Существенно улучшило диагностику измененного миокарда неишемического генеза использование гадолиния. Изображения, полученные через 5–20 мин после инъекции гадолиния в дозе 0,1–0,2 ммоль/кг, позволяют с беспрецедентным разрешением и высокоспецифичными картинками фиброза и рубцового изменения миокарда описать неишемические кардиомиопатические процессы и предоставить ценную диагностическую и патофизиологическую информацию [21].

Развитие современных методов визуализации позволяет своевременно выявить пациентов с потенциальным риском развития кардиотоксичности, которым требуется дальнейший сердечно-сосудистый мониторинг или кардиопротекторная терапия. Оценка параметров с использованием эхокардиографии и магнитно-резонансной томографии в динамике может способствовать ранней диагностике поражения сердца, до того как разовьется явная сердечная недостаточность. Оценка и своевременное лечение традиционных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний являются первым шагом для профилактики кардиотоксичности. Наконец, у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями высокого риска следует применять первичную профилактику, включая кардиопротекторы и /или препараты, обычно используемые для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Согласно последним исследованиям [22], раннее начало приема ингибиторов АПФ и β -адреноблокаторов и модификация противораковой терапии могут предотвратить развитие кардиального фиброза и снижение фракции выброса левого желудочка в терминальной стадии развития болезни. Однако необходимы дальнейшие многоцентровые исследования для разработки как профилактических, так и лечебных мероприятий.

Фиброз миокарда и васкулопатия из-за прямого токсического воздействия лучевой терапии приводят к ремоделированию желудочков, что, в свою очередь, может увеличить риск развития клапанной дисфункции [23]. Хотя точные патофизиологические механизмы радиационно-индуцированной вальвулопатии до конца не изучены, считается, что облучение оказывает прямое влияние на патологический фиброз и кальцификацию клапанного аппарата. Из-за отсутствия сосудов в ткани клапанов механизм повреждения эндотелия клапанов отличается от радиационно-индуцированного повреждения миокарда и сосудистой сети. На образцах тканей, удаленных во время операции, отсутствуют гистологические маркеры хронического воспаления или неоваскуляризации [24]. Интересно, что в пораженных клапанах отмечаются гистопатологические различия. Так, у пациентов, перенесших лучевую терапию по поводу рака молочной железы, отмечается дегенеративный

кальциноз, в отличие от преимущественно фиброзного процесса у пациентов с лимфомой. Эта разница, вероятно, связана с молодым возрастом, в котором проводилось облучение при лимфоме Ходжкина.

Стратификация риска хирургического лечения клапанной патологии с помощью современных шкал не учитывает побочные эффекты и осложнения, связанные с предшествующей лучевой терапией, и может недооценивать истинный риск. Ретроспективный анализ, проведенный Wu et al. [25] по результатам хирургического лечения 173 пациентов (средний возраст 63 ± 14 лет, 75% женщин, средний EuroSCORE $7,8 \pm 3$) с радиационно-индуцированной болезнью клапанов сердца в сравнении с 305 прооперированными пациентами, сопоставимыми по возрасту, полу и типу процедуры, выявил более высокую долю смертей в группе с постлучевой болезнью сердца, чем в группе сравнения (55% против 28%; $p < 0,001$) в течение среднего периода наблюдения $7,6 \pm 3$ года, несмотря на сопоставимые показатели EuroSCORE. Анализ результатов хирургического лечения клапанной патологии у 60 пациентов с предшествующей лучевой терапией в исследовании Handa et al. показал повышение уровня ранней смертности у пациентов с констриктивным перикардитом (40% против 6%, $p = 0,011$). В той же когорте снижение фракции выброса левого желудочка до операции и более длительное время пережатия аорты также были связаны с ранней смертностью [26].

Среди 230 пациентов в исследовании A.S.Y. Chang et al. [27], перенесших операцию на сердце после торакального облучения, доля периоперационных осложнений, госпитальной и отдаленной смертности была значительно выше у пациентов, получивших обширное радиационное облучение. Поэтому понимание природы радиационного воздействия на сердце и его структуры прежде всего необходимо для определения степени операционного риска до кардиоторакальной операции, что позволит определить наиболее правильную тактику лечения, подчеркивая необходимость междисциплинарного сотрудничества между радиационным онкологом, кардиологом, кардиохирургом и другими специалистами.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Cutter DJ, Schaapveld M, Darby SC, Hauptmann M, van Nimwegen FA, Krol AD et al. Risk of valvular heart disease after treatment for Hodgkin lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2015; 107 (4): djv008. doi: 10.1093/jnci/djv008.
2. Aleman BMP, van den Belt-Dusebout AW, De Bruin ML, van't Veer MB, Baaijens MHA, Boer JPD et al. Late cardiotoxicity after treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2007; 109: 1878–1886. doi: 10.1182/blood-2006-07-034405.
3. Armstrong GT, Oeffinger KC, Chen Y et al. Modifiable risk factors and major cardiac events among adult survivors of childhood cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 3673–80.
4. Quintero-Martinez JA, Cordova-Madera SN, Villarraga HR. Radiation-Induced Heart Disease. *J Clin Med.* 2022 Jan; 11 (1): 146. doi: 10.3390/jcm11010146.
5. Marks LB, Yu X, Prosnitz RG, Zhou SM, Hardenbergh PH, Blazing M et al. The incidence and functional consequences of RT-associated cardiac perfusion defects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005 Sep 1; 63 (1): 214–223. doi: 10.1016/j.ijrobp.2005.01.029.
6. Chang HM, Okwuosa TM, Scarabelli T, Moudgil R, Yeh ETH. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Best Practices in Diagnosis, Prevention, and Management: Part 2. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70: 2552–2565.
7. Filopei J, Frishman W. Radiation-induced heart disease. *Cardiol Rev.* 2012; 20: 184–188.
8. Boerma M, Sridharan V, Mao XW, Nelson GA, Cheema AK, Koturbash I et al. Effects of ionizing radiation on the heart. *Mutat Res.* 2016; 770: 319–327.
9. Boerma M, Kruse JJ, van Loenen M, Klein HR, Bart CI, Zurcher C et al. Increased deposition of von Willebrand factor in the rat heart after local ionizing irradiation. *Strahlenther Onkol.* 2004; 180: 109–116.
10. Yarnold J, Vozenin Brotons M-C. Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol.* 2010; 97 (1): 149–161. doi: 10.1016/j.radonc.2010.09.002.
11. Taunk NK, Haffty BG, Kostis JB, Goyal S. Radiation-Induced Heart Disease: Pathologic Abnormalities and Putative Mechanisms. *Front Oncol.* 2015; 5: 39. doi: 10.3389/fonc.2015.00039.
12. Weigel C, Schmezer P, Plass C, Popanda O. Epigenetics in radiation-induced fibrosis. *Oncogene.* 2014; 55 (12): 1237–1239. doi: 10.1038/onc.2014.145.
13. Van Nimwegen FA, Schaapveld M, Janus CP et al. Cardiovascular disease after Hodgkin lymphoma treatment: 40-year disease risk. *JAMA Intern Med.* 2015; 175: 1007–1017.
14. Heidenreich PA, Hancock SL, Lee BK, Mariscal CS, Schnittger I. Asymptomatic cardiac disease following mediastinal irradiation. *J Am Coll Cardiol.* 2003 Aug 20; 42 (4): 743–749.
15. Levy D, Savage DD, Garrison RJ, Anderson KM, Kannel WB, Castelli WP. Echocardiographic criteria for left ventricular hypertrophy: The Framingham heart study. *Am J Cardiol.* 1987 April 15; 59 (9): 956–960.
16. Fleg JL. Alterations in cardiovascular structure and function with advancing age. *Am J Cardiol.* 1986; 57: 33–44.
17. Снеговой АВ, Виценья МВ, Конн МВ, Ларионова ВВ. Практические рекомендации по коррекции кардиоваскулярной токсичности, индуцированной химиотерапией и таргетными препаратами. *Злокачественные опухоли.* 2016; 4 (S2): 418–427. Snegovoy AV, Vitsenya MV, Kopp MV, Larionova VB. Prakticheskie rekomendatsii po korrektsii kardiovaskulyarnoy tok-

- sichnosti, indutsirovannoy khimioterapiey i targetnymi preparatami. *Zlokachestvennyye opukholi*. 2016; 4 (S2): 418–427. doi: 10.18027/2224-5057-2016-4s2-418-427.
18. Tuohinen SS, Skyttä T, Poutanen T, Huhtala H, Virtanen V, Kellokumpu-Lehtinen PL, Raatikainen P. Radiotherapy-induced global and regional differences in early-stage left-sided versus right-sided breast cancer patients: speckle tracking echocardiography study. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2017 Apr; 33 (4): 463–472. doi: 10.1007/s10554-016-1021.
 19. Yu AF, Ho AY, Braunstein LZ, Thor ME, Lee Chuy K, Eaton A et al. Assessment of early radiation-induced changes in left ventricular function by myocardial strain imaging after breast radiation therapy. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019; 32: 521–528. doi: 10.1016/j.echo.2018.12.009.
 20. Lo Q, Hee L, Batumalai V, Allman C, MacDonald P, Lonergan D et al. Strain Imaging Detects Dose-Dependent Segmental Cardiac Dysfunction in the Acute Phase After Breast Irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2017; 99: 182–190.
 21. Karamitsos TD, Francis JM, Myerson S, Selvanayagam JB, Neubauer S. The role of cardiovascular magnetic resonance imaging in heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Oct 6; 54 (15): 1407–1424. doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.094.
 22. Mavrogeni SI, Sfendouraki E, Markousis-Mavrogenis G, Rigopoulos A, Noutsias M, Kolovou G et al. Cardio-oncology, the myth of Sisyphus, and cardiovascular disease in breast cancer survivors. *Heart Fail Rev*. 2019 Nov; 24 (6): 977–987. doi: 10.1007/s10741-019-09805-1.
 23. Patil S, Pingle SR, Shalaby K, Kim AS. Mediastinal irradiation and valvular heart disease. *Cardiooncology*. 2022 Apr 8; 8 (1): 7.
 24. Van Rijswijk JW, Farag ES, Bouten CVC, de Boer OJ, van der Wal A, de Mol BAJM, Kluin J. Fibrotic aortic valve disease after radiotherapy: an immunohistochemical study in breast cancer and lymphoma patients. *Cardiovasc Pathol*. 2020; 45: 107176. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2019.107176>.
 25. Wu W, Masri A, Popovic ZB et al. Long-term survival of patients with radiation heart disease undergoing cardiac surgery: a cohort study. *Circulation*. 2013; 127 (14): 1476–1484.
 26. Handa N, McGregor CGA, Danielson GK et al. Valvular heart operation in patients with previous mediastinal radiation therapy. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71 (6): 1880–1884.
 27. Chang AS, Smedira NG, Chang CL, Benavides MM, Myhre U, Feng J et al. Cardiac surgery after mediastinal radiation: extent of exposure influences outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 133 (2): 404–413.

Статья поступила в редакцию 14.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 14.07.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-46-53

РАЗРАБОТКА УСТРОЙСТВА КАНЮЛИ ДЛЯ УДАЛЕНИЯ ГАЗОВОЙ ФРАКЦИИ В СИСТЕМАХ ДРЕНАЖА КРОВИ

А.П. Кулешов¹, А.С. Бучнев¹, А.А. Дробышев¹, О.Ю. Есипова¹, **Г.П. Иткин**^{1, 2}

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

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация

Разработка малотравматичных дренажных систем, работа которых направлена на максимально возможное разделение крови и воздуха, является актуальным направлением в современной медицине. Цель данной работы состояла в создании недорогой, удобной в пользовании и малотравматичной системы динамической аспирации крови. Система позволяет эффективно разделить кровь и воздух при заборе крови из раны в условиях вакуума, требуемого для аспирации крови. Принцип действия разработки заключается в разделении жидкой и газовой фракций смеси «кровь–воздух» за счет модификации канюли забора крови. Эффект достигается по технологии применения принципов центробежных сил вращающегося потока «кровь–воздух» в сочетании с подъемными архимедовыми силами.

Ключевые слова: аспирация, АИК, канюля, дренаж крови.

DEVELOPMENT OF A CANNULA DEVICE FOR GAS FRACTION REMOVAL IN SURGICAL DRAINS

A.P. Kuleshov¹, A.S. Buchnev¹, A.A. Drobyshev¹, O.Yu. Esipova¹, **G.P. Itkin**^{1, 2}

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

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

The development of low-traumatic surgical drains aimed at maximum possible separation of blood and air, is an important trend in modern medicine. The objective of this work is to create an inexpensive, user-friendly and low-traumatic dynamic blood aspiration system (DBAS). The system allows effective separation of blood and air when drawing blood from a wound under vacuum conditions required for blood aspiration. The operating principle of the system is to separate liquid and gas fractions of the blood-air mixture by modifying the blood intake cannula. The effect is achieved by applying the principles of centrifugal forces of a rotating blood-air flow combined with Archimedes lift forces.

Keywords: aspiration, CPB, cannula, blood drainage.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в большинстве хирургических операций используется концепция венозного дренажа крови [1, 2]. Она не применялась в целом до недавнего развития инвазивной кардиохирургии наряду с распространением операций на открытом сердце, не требующих переливания крови [3]. Пациенты, перенесшие кардиохирургические вмешательства с сердечно-легочным обходом (СЛО), нуждаются в большом количестве донорской эритроцитарной

массы [4], и значительные данные свидетельствуют о том, что переливания во время операций на сердце увеличивают инфекционные и неинфекционные риски [5–7]. Венозный дренаж для пациентов является приемлемым методом сохранения собственной крови. В процессе процедуры кровь аспирируется из полостей раны с помощью всасывающей канюли, подключенной к системе отсоса крови (роликовый или вакуумный насос). В свою очередь кровь далее попадает в систему рециркуляции, представленную

Для корреспонденции: Кулешов Аркадий Павлович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (915) 292-47-98. E-mail: ilovemylene@yandex.ru

Corresponding author: Arkadiy Kuleshov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (915) 292-47-98. E-mail: ilovemylene@yandex.ru

собирает резервуаром и соединительными трубками (рис. 1).

По мнению специалистов, аспирация крови является основным фактором, травмирующим кровь, и наряду с влиянием микропузырьков воздуха, попадающих в контур кровообращения, увеличивает время реабилитации пациента после хирургического вмешательства. При анализе источников было отмечено, что 79% ($n = 15$) авторов считают, что техника вакуумного дренажа приносит пользу процедуре вспомогательного кровообращения и/или пациенту. Сокращение количества переливаний способствует предотвращению перегрузки банков крови [8–14]. Уменьшение происходит за счет улучшения биохимических показателей, и следовательно, отпадает необходимость в увеличении объема венозного резервуара для поддержания уровня защиты от попадания воздуха в систему.

Сокращение использования препаратов крови способствует снижению послеоперационных осложнений, а методика обеспечивает снижение общего количества крови, уменьшая гемодилюцию [3, 8–15] и поддерживая уровни гематокрита и гемоглобина на приемлемых уровнях.

Однако наряду с увеличением применения венозного дренажа сообщалось о специфических побочных эффектах процедуры. Willcox et al., LaPietra et al., Davila et al., Burch и Locke отдельно сообщили в

отчетах о случаях при исследованиях *in vitro*, в которых система венозного дренажа возвращает пациенту кровь с наличием воздуха [16–19]. Это приводит к возникновению систематических микроэмболий. Микроэмболы часто вызывают значительные церебральные заболевания, обычно проявляющиеся в виде послеоперационного когнитивного дефицита или инсульта [16].

В других исследованиях сообщалось о воздушной эмболии [10, 11, 20, 21]. Было показано, что венозный вакуумный дренаж вызывал почти в 10 раз больше эмболий в артериальной линии по сравнению с пассивным дренажем, несмотря на использование подходящего оборудования. Вышеупомянутая эмболия является следствием образования микропузырьков в жидкости из-за турбулентности, возникающей при прохождении через узкую трубку под высоким давлением. Те же исследования показывают, что только путем сравнения длины методов вакуума и гравитации в ситуации подачи воздуха в венозный контур по венозной линии вакуум позволяет большему объему воздуха поступать в систему.

Были разногласия в отношении наличия высокого уровня гемолиза при использовании вакуума. Большинство авторов считают, что гемолиз, вызванный процедурами с отрицательным давлением, был похож на гемолиз при пассивном дренировании [3, 10, 11, 22]. Однако сравнивая вакуумный дренаж с дре-

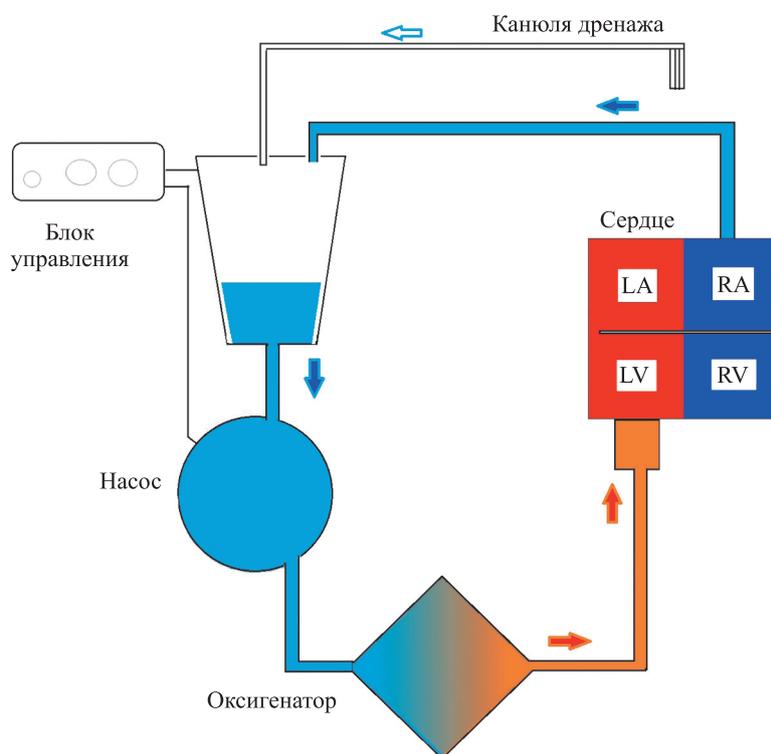


Рис. 1. Система венозного дренажа крови. LA – левое предсердие; RA – правое предсердие; LV – левый желудочек; RV – правый желудочек

Fig. 1. Vacuum-assisted venous drainage. LA – left atrium; RA – right atrium; LV – left ventricle; RV – right ventricle

нажем центробежным насосом, Cirti et al. [23] показали, что вакуумный дренаж вызывает более высокую степень гемолиза, что также было подтверждено в исследованиях Gregoretta et al. [24]. Однако Lau et al. не согласны с этим и показывают сходные уровни гемолиза [25].

В последнее десятилетие усилия многих специалистов, работающих в области искусственного кровообращения, были направлены на разработку новых насосов, мембранных оксигенаторов, которые позво-

лили бы снизить травму крови во время подобных операций. Тем не менее, несмотря на определенные успехи в данном направлении, травма крови представляет все еще большую опасность, и это связано главным образом с травмирующим эффектом системы для аспирации крови. Данная проблема становится особенно актуальной в последнее время, когда значительно изменился возраст больных, подвергаемых открытым полостным операциям, и повысилась длительность периодов реабилитации пациентов. В итоге эффективность систем дренажа крови является важной частью хирургического процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

К основным причинам травмы крови при использовании существующих систем аспирации крови относят:

- массивное перемешивание крови с воздухом в канюле, соединительных трубках и насосе;
- высокие значения вакуума, создаваемого насосом.

Для снижения влияния вышеупомянутых факторов была разработана эргономичная и практичная система динамической аспирации крови (СДАК). Внешний вид модифицированной канюли показан на рис. 2. Система включает трубку забора смеси, на которой располагается специальная насадка и блок сепарации канюли.

Блок сепарации, показанный на рис. 3, имеет узкую часть А, в которой располагается канал подачи смеси 1. Широкая часть В следует после узкой части через плавный переход Б. От насадки забора крови через трубку смесь «жидкость–воздух» поступает во входную трубку блока сепарации, которая является ее продолжением. Канал подачи смеси направлен в утолщенную часть В, в которой вырезаны коническая полость 2, зона фильтрации воздуха 3 и две трубки отвода фракций крови и воздуха 4 и 5, располагающиеся внутри ручки канюли Д.

Одна из трубок (4) является продолжением конической части, и через нее выводится жидкостная фаза с минимальным остатком воздуха. Вторая трубка (5) находится параллельно первой, но соединена с зоной фильтрации, которая расположена вертикально выше конической части. Через данную трубку удаляется воздух, отделенный в процессе течения через коническую часть. В зоне фильтрации устанавливается биоинертная сменная губка для оптимизации процесса сепарации. Замена губки осуществляется посредством открытия верхней крышки.

Коническая часть расположена вертикально с сужением книзу. Относительно сечения конуса входной в него канал расположен под углом. В месте соединения входной канал расположен так, что поток заходит в коническую часть по касательной линии в максимальном радиусе сечения конуса в месте входа. Широкая часть переходит в ручку, разработанную

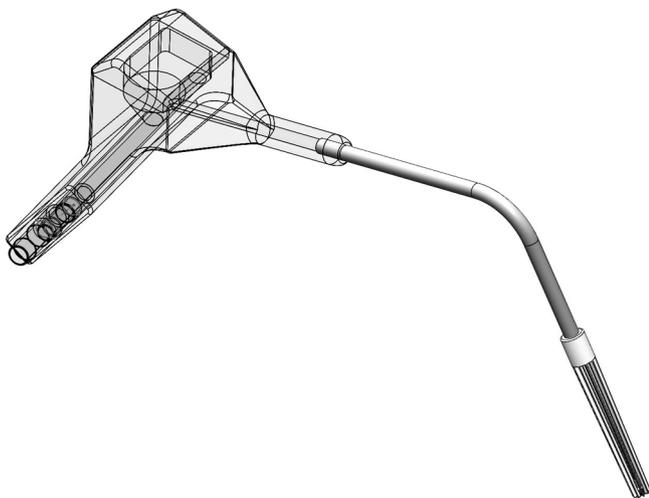


Рис. 2. Внешний вид модифицированной канюли сепарации

Fig. 2. Schematic representation of the modified separation cannula

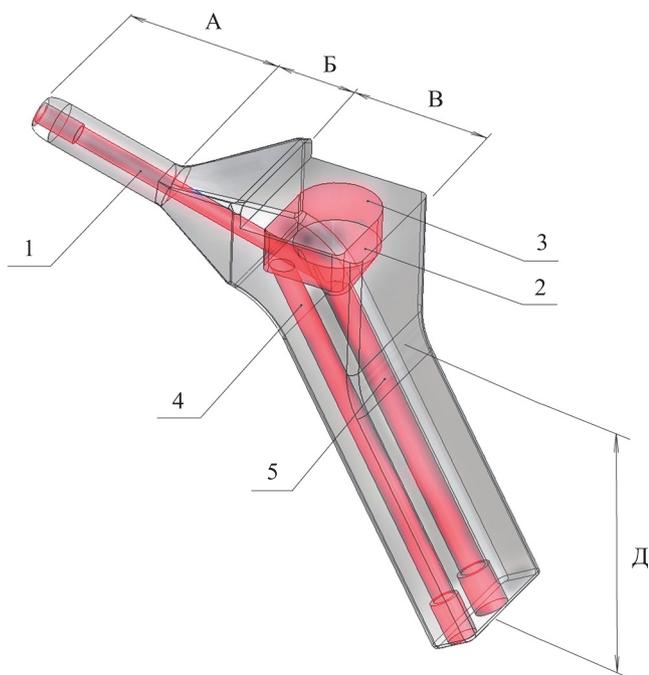


Рис. 3. Внешний вид блока сепарации

Fig. 3. Schematic representation of the separation unit

для удобного удерживания системы. В ручке прорезаны упомянутые ранее каналы для жидкостной и газовой фаз. Каналы оканчиваются выводными штуцерами, и соединены с системой генерации вакуума. Эскиз СДАК в полной комплектации представлен на рис. 4. Поскольку сепарация крови и воздуха должна производиться как можно ближе к ране, рабочая камера устройства вмонтирована в рукоятку канюли для дренирования (рис. 3, Д). Таким образом, после процесса разделения кровь собирается в нижней части рабочей циклонной камеры и аспирируется через отдельный канал (рис. 3, 5) с помощью роликового насоса (рис. 4, 4).

В свою очередь, воздух собирается в верхней части камеры и аспирируется через другой канал (рис. 3, 4) вакуумным роликовым насосом (рис. 4, 5). Кровь и воздух затем подаются раздельно в кардиотомический резервуар (6).

Принцип действия устройства

Смесь «кровь–воздух» под действием вакуума захватывается через наконечник канюли из раны и течет по каналу (рис. 4). Далее смесь поступает на вход циклонной конической камеры под углом к вертикальной оси (рис. 3). Достигается вращение смеси «кровь–воздух», которое поддерживается за счет конического расширения циклонной камеры. Кровь собирается в нижней части форсунки, а воздух за счет центробежной и архимедовой сил собирается в центре вращающегося потока и устремляется в наивысшую точку. Силы, действующие на пузырек воздуха, можно рассмотреть в системе координат, как показано на рис. 5.

При вхождении пузырька воздуха в циклонную камеру его движение в вертикальном направлении по оси y обусловлено поданным вакуумом P_1 с жидкостного канала, вакуумом с воздушного канала P_2 ,

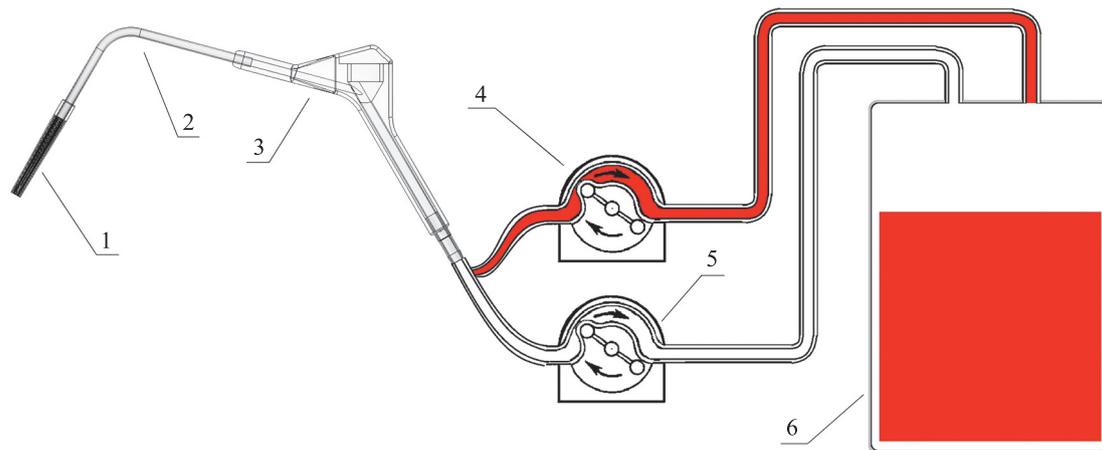


Рис. 4. Внешний вид СДАК: 1 – заборная канюля; 2 – трубка подачи смеси «жидкость–воздух»; 3 – сепаратор; 4 – роликовый насос крови; 5 – роликовый насос воздуха; 6 – кардиотомический резервуар

Fig. 4. Schematic representation of the dynamic blood aspiration system: 1 – suction cannula; 2 – liquid-air mixture supply tube; 3 – separator; 4 – roller blood pump; 5 – roller air pump; 6 – cardiomy tank

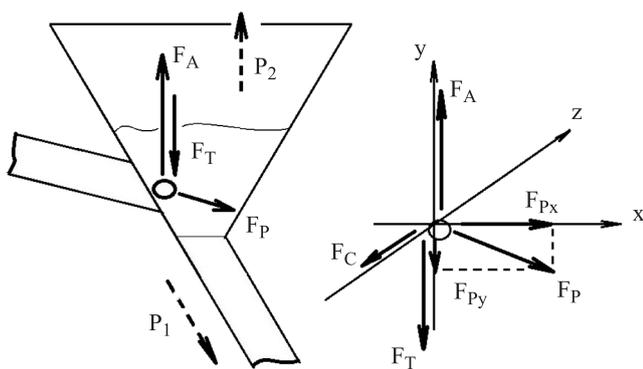


Рис. 5. Расстановка сил, действующих на пузырек воздуха

Fig. 5. The position of forces acting on air bubble

силой Архимеда F_A , силой вязкого трения F_T . Весом пузырька было решено пренебречь ввиду слабого влияния данного параметра в данных условиях. Так как канал забора смеси входит в циклонную камеру по касательной и вертикальным углом α , в плоскости xu вакуум можно рассмотреть как проекцию силы потока F_p на ось y . В плоскости xu на пузырек будет действовать сила вязкого трения F_{Ty} как противовес движению пузырька. Получим основное стационарное уравнение всплытия пузырьков:

$$F_A - F_{Py} - F_{Ty} + F_2 = 0.$$

В случае отсутствия или слабого влияния вакуума P_2 и при снижении силы F_2 решение системы урав-

нений приводит к определению скорости всплытия пузырька и вычислению начальной скорости вращения в циклонной камере:

$$v_y = \frac{1}{18} \frac{\rho g D_b^2}{\eta} - \frac{32}{3} \frac{LQ}{\pi d^2 D_b} \cdot \sin \alpha,$$

где v_y – скорость всплытия пузырька воздуха, ρ – плотность крови, g – ускорение свободного падения, η – вязкость крови, α – угол захода канала забора крови в циклонную камеру, L – длина канала забора крови, D_b – диаметр исследуемого пузырька воздуха, Q – расход крови.

Скорость всплытия, как следует из анализа уравнения, определяется в большей степени величиной расхода крови, который производит насос, и углом α . Оценка зависимости вакуума и эффективности сепарации является частью процесса первичной разработки СДАК.

Компьютерная модель устройства

Была разработана трехмерная математическая модель СДАК течения вязкой жидкости с наличием пузырьков жидкости различного диаметра в программном обеспечении COMSOL Multiphysics. В результате исследований получена картина движения жидкой и газовой фракций, пример которой показан на рис. 6. Граничные условия расчетов включали в себя значение вакуума до 50 мм рт. ст. Нами был применен режим многофазного моделирования течения крови и воздуха.

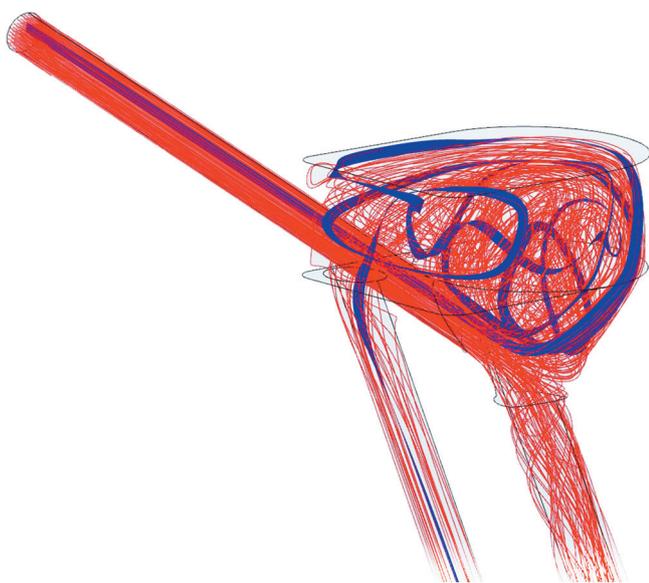


Рис. 6. Пример моделирования течения фракций в условиях вакуума 20 мм рт. ст. при диаметре пузырьков воздуха 4 мм

Fig. 6. An example of simulation of fraction flow in a 20 mm Hg vacuum with 4 mm air bubble diameter

В качестве искомого параметра был введен критерий количества воздушной фракции, отделенной от жидкости после течения в циклонной камере. В качестве критерия сходимости был определен критерий сходимости 10^{-4} по давлению. Использована модель турбулентности $k-\epsilon$ для моделирования поля течения. Была получена достаточно тонкая сетка, состоящая из тетраэдрических ячеек общим количеством 80 000 элементов.

Пример расчета показывает механику движения фракций при условии расхода жидкости 0,5 л/мин. Можно наблюдать синие линии траекторий движения пузырьков воздуха диаметром до 4 мм в потоке крови, показанном красными линиями. Расчет проведен в условиях объема воздуха в крови, равного 10% общего потока.

Большая часть воздушного потока с некоторым количеством крови (не более 0,05 л/мин) сепарруется в воздушный канал. Объемный расход был создан в условиях вакуума 20 мм рт. ст. Тем самым воздух и вакуум снижают влияние на дальнейшее продвижение крови в кардиотомический резервуар. В воздушном канале кровь испытывает сильное воздействие всех факторов тромбоза, но объем данной фракции снижен до минимального значения

Гидродинамический стенд

Первоначально оценка эффективности СДАК производилась на гидродинамическом стенде визуально по характеру зоны концентрации пузырьков воздуха, а также по изменению состава смеси «воздух–жидкость» после трубки забора (рис. 7). Однако на практике из-за невозможности наблюдать пузырьки воздуха в достаточно широком диапазоне изменения были применены электронные устройства подсчета микропузырьков. Система вакуума представлена двумя насосами, в данном случае это насос роликового типа, способный развивать требуемые значения вакуума для каналов вывода жидкости и газа, и система вакуумного отсоса.

Стенд включает роликовый насос (9), который устанавливает требуемый для исследований вакуум и расход жидкости, регистрируемый расходомером (6). Вывод воздуха осуществляется в резервуар вакуумного отсоса (8) посредством канала (3), а вывод крови – через канал (4). Пузырьки разного диаметра вводятся в кардиотомический резервуар (2) через шприц (5), подключенный к устройству впрыска, на котором регулируется объем подаваемой газовой фракции. Канюля (1) устанавливается в резервуар, который имитирует рану пациента.

Расход измеряли с помощью ультразвукового расходомера (Transonic Systems Inc., США), а давление – датчиками (Edwards Life Sciences, США) (7). Для регистрации гемодинамических параметров

использовали многоканальный модуль ANGIOTON (Biosoft-M, Россия) с записью на персональном компьютере в программе Pumpax (Biosoft-M, Россия). Первоначально в качестве рабочей жидкости использовалась вода.

Для соединения различных элементов стенда использовалась стандартная силиконовая трубка 3/8". Во время исследования роликовый насос работал на стандартных конфигурациях для клинического использования, для достижения расхода в диапазоне от 0 до 1 л/мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Величина вакуума, необходимого для дренирования смеси «газ–жидкость» (Г-Ж), определялась на стенде при условиях производительности насоса до 1 л/мин. Измерение вакуума проводилось на входе в роликовый насос. При этом переменной величиной было процентное содержание воздуха в смеси от 0 до 50%. На рис. 8 представлена зависимость величины необходимого вакуума для дренирования различного расхода крови (при постоянном расходе роликового насоса).



Рис. 7. Гидродинамический стенд: 1 – канюля; 2 – кардиотомический резервуар; 3 – воздушный канал; 4 – жидкостный канал; 5 – устройство подачи воздуха; 6 – датчик измерения потока / подсчета МП; 7 – датчик измерения вакуума; 8 – система вакуумного отсоса; 9 – роликовый насос

Fig. 7. Hydrodynamic bench: 1 – cannula; 2 – cardiotomy tank; 3 – air channel; 4 – liquid channel; 5 – air supply device; 6 – flow measurement / microbubble counting sensor; 7 – vacuum measurement sensor; 8 – vacuum suction tank; 9 – roller pump

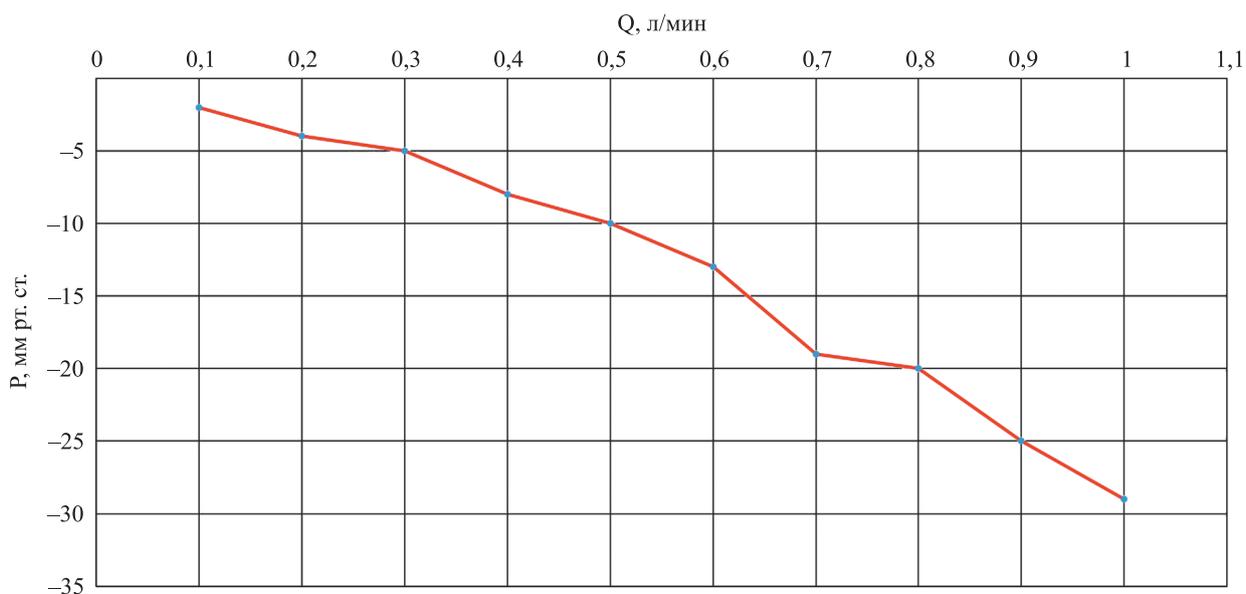


Рис. 8. График зависимости расхода системы от приложенного вакуума

Fig. 8. A graph of flow rate versus applied vacuum

Как видно из рис. 8, величина вакуума изменяется от слабоотрицательного давления, определяемого разностью перепада между местом всасывания и входом в насос, до величины -29 мм рт. ст. при расходе 1 л/мин. Картина сепарации пузырьков при рассчитанном вакууме показана на рис. 9.

Полученные результаты подтверждают, что в процессе сепарации смеси Г-Ж КПД одновременно снижается и при увеличении вакуума, который, как известно, существенно влияет на травму форменных элементов крови, и при увеличении объема поданного воздуха. Рабочий диапазон расхода, применяемый в условиях проведения хирургических операций, составляет до 0,5 л/мин с эффективностью сепарации в среднем более 50% и в условиях вакуума не более 10–15 мм рт. ст.

Учитывая, что вязкость крови ($\mu = 4,2 \times 10^{-3}$ кг/(м·с), плотность $\rho = 1054$ кг/м³) даже в условиях дилуции во время экстракорпорального кровообращения в 2–3 раза выше вязкости воды, величина необходимого вакуума должна быть выше, чем в проведенных нами измерениях.

В разработанном устройстве для дренирования крови с предварительной сепарацией необходимо выбрать производительность по линиям всасывания крови и воздуха. В основном режиме дренирования

количество воздуха может в несколько раз превышать количество крови. В таком случае часть воздуха будет попадать в канал крови, перетекая в роторный насос, что составляет наиболее опасный с точки зрения гемолиза режим. Во избежание негативных последствий данного режима производительность канала воздуха можно повысить в несколько раз относительно производительности канала отсасывания крови. В условиях дренирования крови без воздуха кровь будет дренироваться по обоим каналам. В условиях дренирования при простом использования канюли воздух будет также дренироваться по обоим каналам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен альтернативный метод, основанный на физических принципах центробежного воздействия и архимедовых сил на микропузырьки воздуха для их эффективного выведения из системы отсоса крови в условиях хирургических операций с применением АИК. Разработана система динамической аспирации крови для минимизации газовой фракции для систем возврата крови в контур АИК.

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

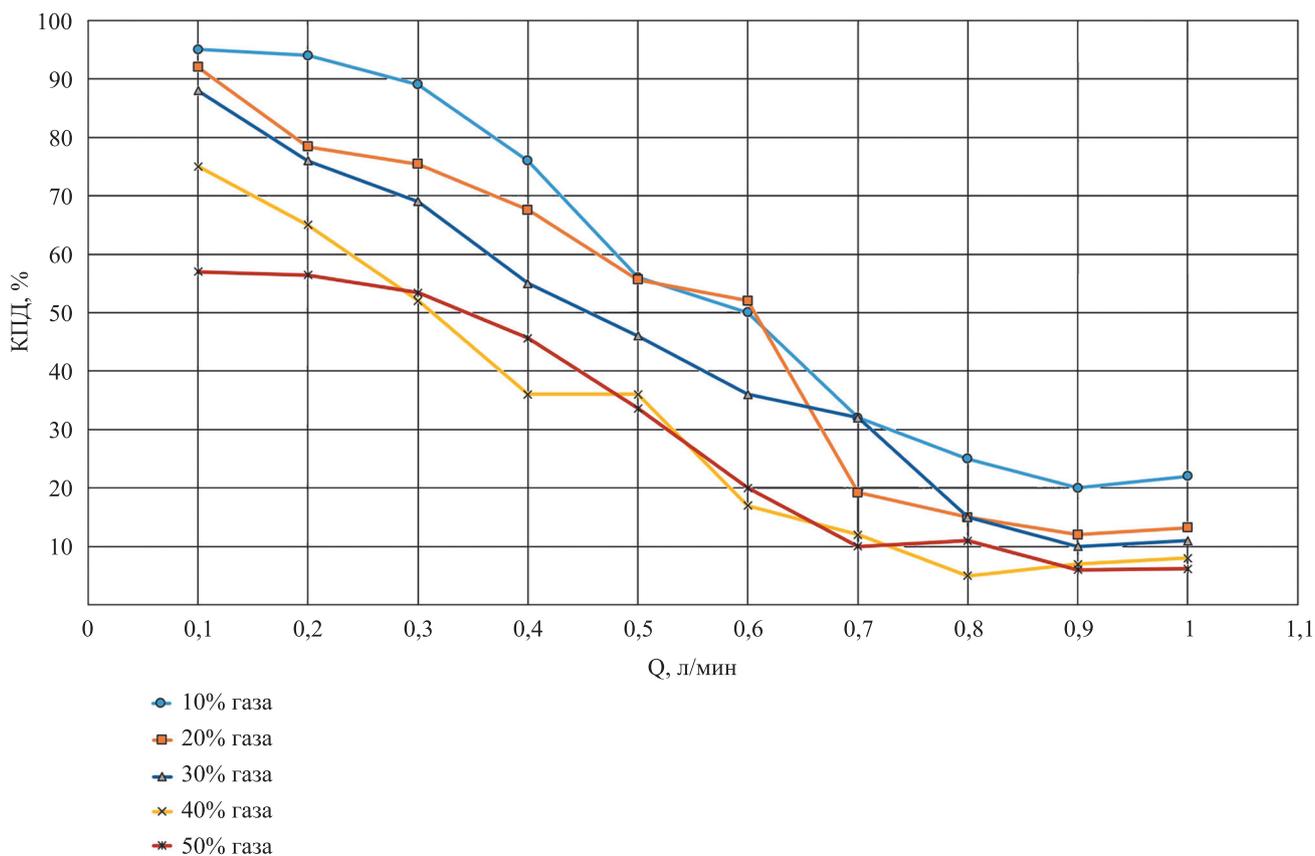


Рис. 9. График эффективности сепарации

Fig. 9. Separation efficiency

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Jones RE, Donald DE, Swan HJ, Harshbarger HG, Kirklin JW, Wood EH. Apparatus of the Gibbon type for mechanical bypass of the heart and lungs; preliminary report. *Proc Staff Meet Mayo Clinic*. 1955; 30: 105–113.
2. Miller BJ. Laboratory work preceding the first clinical application of cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 2003; 18: 145–154.
3. Hayashi Y, Kagisaki K, Yamaguchi T, Sakaguchi T, Naka Y, Sawa Y et al. Clinical application of vacuum-assisted cardiopulmonary bypass with a pressure relief valve. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001; 20: 621–626.
4. Mazer CD, Whitlock RP, Fergusson DA, Hall J, Belle-Cote E, Connolly K et al. Restrictive or liberal red-cell transfusion for cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2017; 377: 2133–2144.
5. Vamvakas EC, Carven JH. Transfusion and postoperative pneumonia in coronary artery bypass graft surgery: effect of the length of storage of transfused red cells. *Transfusion*. 1999; 39: 701–710.
6. Karamlou T, Schultz JM, Silliman C, Sandquist C, You J, Shen I et al. Using a miniaturized circuit and an asanguineous prime to reduce neutrophil-mediated organ dysfunction following infant cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80: 6–13; discussion 13–14.
7. Vlaar AP, Juffermans NP. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *Lancet*. 2013; 382: 984–994.
8. Taketani S, Sawa Y, Masai T, Ichikawa H, Kagisaki K, Yamaguchi T et al. A novel technique for cardiopulmonary bypass using vacuum system for venous drainage with pressure relief valve: an experimental study. *Artif Organs*. 1998; 22 (4): 337–341.
9. Chalegre ST, Salerno PR, Salerno LMVO, Melo ARS, Pinheiro AC, Frazão CS et al. Drenagem venosa assistida a vácuo na circulação extracorpórea e necessidade de hemotransfusão: experiência de serviço. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2011; 26 (1): 122–127.
10. Zangrillo A, Garozzo FA, Biondi-Zoccai G, Pappalardo F, Monaco F, Crivellari M et al. Miniaturized cardiopulmonary bypass improves short-term outcome in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized controlled studies. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010; 139 (5): 1162–1169.
11. Nasso G, Costantini C, Petralia A, Del Prete A, Lopriore V, Fattouch K et al. A new extracorporeal vacuum-assisted device to optimize cardiopulmonary bypass. Comparison with the conventional system. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2011; 12 (4): 591–595.
12. Banbury MK, White JA, Blackstone EH, Cosgrove 3rd DM. Vacuum-assisted venous return reduces blood usage. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003; 126 (3): 680–687.
13. Bevilacqua S, Matteucci S, Ferrarini M, Kacila M, Ripoli A, Baroni A et al. Biochemical evaluation of vacuum-assisted venous drainage: a randomized, prospective study. *Perfusion*. 2002; 17 (1): 57–61.
14. Nakanishi K, Shichijo T, Shinkawa Y, Takeuchi S, Nakai M, Kato G et al. Usefulness of vacuum-assisted cardiopulmonary bypass circuit for pediatric open-heart surgery in reducing homologous blood transfusion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001; 20 (2): 233–238.
15. Pappalardo F, Corno C, Franco A, Giardina, Scandroglio AM, Landoni G et al. Reduction of hemodilution in small adults undergoing open heart surgery: a prospective randomized trial. *Perfusion*. 2007; 22 (5): 317–322.
16. Willcox TW, Mitchell SJ, Gorman DF. Venous air in the bypass circuit: a source of arterial line emboli exacerbated by vacuum-assisted drainage. *Ann Thorac Surg*. 1999; 68: 1285–1289.
17. LaPietra A, Grossi EA, Pua BB, Esposito RA, Galloway AC, Derivaux CC et al. Assisted venous drainage presents the risk of undetected air microembolism. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000; 120: 856–863.
18. Davila RM, Rawles T, Mack MJ. Venoarterial air embolus: a complication of vacuum-assisted venous drainage. *Ann Thorac Surg*. 2001; 71: 1369–1371.
19. Burch TM, Locke AQ. Air lock and embolism upon attempted initiation of cardiopulmonary bypass while using vacuum-assisted venous drainage. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2012; 26: 468–470.
20. Colangelo N, Torracca L, Lapenna E, Moriggia S, Crescenzi G, Alfieri O. Vacuum-assisted venous drainage in extrathoracic cardiopulmonary bypass management during minimally invasive cardiac surgery. *Perfusion*. 2006; 21 (6): 361–365.
21. Kiyama H, Imazeki T, Katayama Y, Murai N, Mukouyama M, Yamauti N. Vacuum-assisted venous drainage in single-access minimally invasive cardiac surgery. *J Artif Organs*. 2003; 6 (1): 20–24.
22. Murai N, Cho M, Okada S, Chiba T, Saito M, Shioguchi S et al. Venous drainage method for cardiopulmonary bypass in single-access minimally invasive cardiac surgery: siphon and vacuum-assisted drainage. *J Artif Organs*. 2005; 8 (2): 91–94.
23. Cirri S, Negri L, Babbini M, Latis G, Khlal B, Tarelli G et al. Haemolysis due to active venous drainage during cardiopulmonary bypass: comparison of two different techniques. *Perfusion*. 2001; 16 (4): 313–318.
24. Gregoretti S. Suction-induced hemolysis at various vacuum pressures: implications for intraoperative blood salvage. *Transfusion*. 1996; 36 (1): 57–60.
25. Lau CL, Posther KE, Stephenson GR, Lodge A, Lawson JH, Darling EM et al. Mini-circuit cardiopulmonary bypass with vacuum assisted venous drainage. Feasibility of an asanguineous prime in the neonate. *Perfusion*. 1999; 14 (5): 389–396.

Статья поступила в редакцию 13.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 13.07.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-54-59

МЕХАНИЧЕСКАЯ ПОДДЕРЖКА ЛИМФОЦИРКУЛЯЦИИ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ДЕКОМПЕНСИРОВАННОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ. ИССЛЕДОВАНИЕ НА ГИДРОДИНАМИЧЕСКОМ СТЕНДЕ

А.С. Бучнев¹, Г.П. Иткин^{1, 2}, А.А. Дробышев¹, А.П. Кулешов¹, О.Ю. Есипова¹,
А.И. Сырбу¹

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

² ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, Российская Федерация

Цель работы. Исследование эффективности нового метода механической поддержки лимфоциркуляции в условиях моделирования острой декомпенсированной сердечной недостаточности (ОДСН) за счет локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из грудного потока. **Материалы и методы.** Основные компоненты устройства: катетер со встроенными входным и выходным механическими клапанами, предназначенный для введения в левую плечеголовную вену через левую внутреннюю яремную вену, с экстракорпоральной системой привода, выполненной в виде бесклапанного насоса-пульсатора с ударным выбросом 10 мл и контроллером, обеспечивающим заданную частоту и скважность импульсов разрежения/давления. Принцип действия устройства основан на локальном снижении венозного давления в зоне выхода лимфы из грудного протока (в зоне слияния левых внутренней яремной и подключичной вен). **Результаты.** При моделировании на гидродинамическом стенде гемодинамики, соответствующей условиям ОДСН, верхний венозный поток через левую плечеголовную вену составлял 0,4 л/мин, давление в области выхода лимфы из грудного потока за счет работы устройства механической поддержки снижалось с 20–25 до 0–5 мм рт. ст. при соотношении длительности фазы всасывания/нагнетания 0,2/0,8 при частоте работы насоса-пульсатора от 30 до 60 уд/мин.

Ключевые слова: лимфатическая система, грудной проток, сердечная недостаточность, локальное понижение венозного давления, катетер, насос-пульсатор.

MECHANIZED LYMPHATIC DRAINAGE IN ACUTE DECOMPENSATED HEART FAILURE. A STUDY ON A HYDRODYNAMIC TEST BENCH

A.S. Buchnev¹, G.P. Itkin^{1, 2}, A.A. Drobyshev¹, A.P. Kuleshov¹, O.Yu. Esipova¹, A.I. Syrbu¹

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

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russian Federation

Objective: to investigate the effectiveness of a new mechanized lymphatic drainage method in acute decompensated heart failure (ADHF) modeling through local reduction in venous pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic duct. **Materials and methods.** Main components of the device are a catheter with built-in inlet and outlet mechanical valves designed for insertion into the left brachiocephalic vein through the left internal jugular vein. It comes with an extracorporeal drive system made as a valveless pulsator pump with a 10 ml shock discharge and a controller ensuring preset frequency and pressure/rarefaction duty cycle. The operating principle of the device is based on local reduction of venous pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic

Для корреспонденции: Бучнев Александр Сергеевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (926) 470-09-88. E-mail: labbts@mail.ru

Corresponding author: Alexander Buchnev. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (926) 470-09-88. E-mail: labbts@mail.ru

duct (in the junction of the left internal jugular and subclavian veins). **Results.** When modeling hydrodynamics under ADHF conditions on a hydrodynamic test bench, the upper venous flow through the left brachiocephalic vein was 0.4 l/min, the pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic duct, was decreased from 20–25 mmHg to 0–5 mmHg due to operation of the mechanized drainage device with suction/injection phase duration ratio 0.2/0.8 and pulsator pump operating frequency from 30 to 60 beats/min.

Keywords: lymphatic system, thoracic duct, heart failure, local decrease in venous pressure, catheter, pulsator pump.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, ОДСН остается наиболее частой причиной экстренной госпитализации с необходимостью проведения интенсивной терапии и сопровождается высокой смертностью данных пациентов. Примерно половина пациентов с ОДСН выписываются из больницы не полностью восстановленными, и около 25% пациентов требуется повторная госпитализация в течение одного месяца, а более 50% повторно госпитализируются через 6 месяцев и почти 66% от общего числа из них умирают [1–4].

Одним из основных симптомов заболевания ОДСН являются явления отека органов и тканей, связанные с затруднениями оттока лимфы в венозную систему из-за повышения центрального венозного давления (ЦВД) [5–10]. При этом средства фармакотерапии, основанные на применении петлевых диуретиков, имеют ограниченный прогресс в улучшении состояния этих пациентов, многие из кото-

рых становятся резистентными к проведению такой терапии [11–14].

Как известно, в условиях физиологической нормы $\frac{3}{4}$ лимфы стекает в левую подключичную вену через левый грудной проток (ГП), а $\frac{1}{4}$ лимфы стекает через правый лимфатический проток в правую подключичную вену. В условиях ОДСН повышение центрального венозного давления (ЦВД) затрудняет отток лимфы в венозную систему. Фармакотерапия больных с ОДСН, основанная на применении петлевых диуретиков, имеет ограниченный прогресс в улучшении состояния этих пациентов, при этом во многих случаях наблюдается резистентность на введение таких диуретиков [15, 16]. Это стимулировало разработку целого ряда новых методов, направленных на нормализацию лимфообращения у данных пациентов. В отдельных ранних работах было показано, что у пациентов с ОДСН внешняя декомпрессия ГП может улучшить такие симптомы заболевания, как одышка, ортапноэ, анорексия [17]. Внешний дренаж ГП может привести к значительному метаболическому, иммунологическому и жидкостному дисбалансу. Также описана операция шунтирования ГП в легочную вену, которая является сложной хирургической процедурой [18, 19]. Поэтому остается достаточно острой проблема создания условий для локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из ГП.

Одна из первых разработок такой системы, предложенная компанией WhiteSwell, основана на использовании осевого насоса, встроенного во внутривенный венозный катетер, вводимый в левую внутреннюю яремную вену с забором крови из области выхода лимфы из ГП и выбросом крови в левую плечеголовную вену (рис. 1) [20, 21].

Устройство локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из грудного потока основано на использовании внутривенного катетера (1) с установленным в него осевым насосом (2) с механическим приводом с помощью вала от внешнего привода (3). Катетер вводится в левую внутреннюю яремную вену (5) до входа в левую плечеголовную вену (6), при этом для снижения вероятности тромбоза в пространство между приводным тросом насоса и катетером постоянно вводится гепарин [22], что потенциально может приводить к кровотечению при проведении данной процедуры.

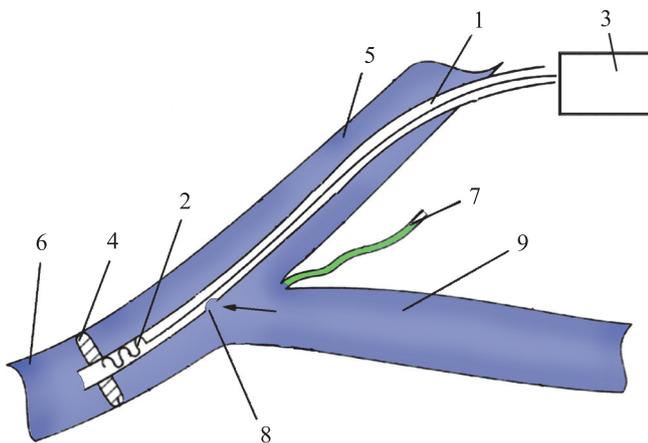


Рис. 1. Схема устройства локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из ГП WhiteSwell: 1 – внутривенный катетер; 2 – осевой насос; 3 – внешний привод насоса; 4 – раздуваемый баллончик катетера; 5 – внутренняя яремная вена; 6 – плечеголовная вена; 7 – грудной проток; 8 – дистальный всасывающий патрубок; 9 – левая подключичная вена

Fig. 1. Schematic diagram of the device for local reduction of venous pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic duct. WhiteSwell. 1 – intravenous catheter; 2 – axial pump; 3 – external pump drive; 4 – inflatable balloon catheter; 5 – internal jugular vein; 6 – brachiocephalic vein; 7 – thoracic duct; 8 – distal suction branch pipe; 9 – left subclavian vein

Локальное снижение венозного давления в области выхода лимфы из грудного потока (7) осуществляется за счет забора крови через дренажное отверстие (8), расположенное в зоне слияния левых внутренней яремной и подключичной (9) вен и выброса крови в плечеголовную вену на выходе осевого насоса. Для повышения эффективности работы системы на выходе катетера установлен раздуваемый баллончик (4), частично или полностью перекрывающий поток крови через левую плечеголовную вену.

На данную систему с 2016-го по 2021 год было получено более 20 патентов. Однако до настоящего времени не вышло ни одной публикации о реализации данных проектов в эксперименте и клинической практике. Предварительные расчеты показывают, что для эффективного локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из ГП в такой системе необходимо создать поток 0,8–1 л/мин. Как показывают простые расчеты, в условиях ОДСН при 50% снижении сердечного выброса общий венозный поток в верхних отделах системы кровообращения также снижается на 50% и составляет 0,8 л/мин (по 0,4 л/мин для левого и правого отделов). Поэтому необходимый для снижения локального давления в области выхода лимфы из ГП поток 0,8–1 л/мин может привести к венозному застою в правых верхних отделах вен. Для решения данной проблемы нами был предложен способ и устройство, основанные на импульсном формировании потока крови в области выхода лимфы из ГП (рис. 2) [23].

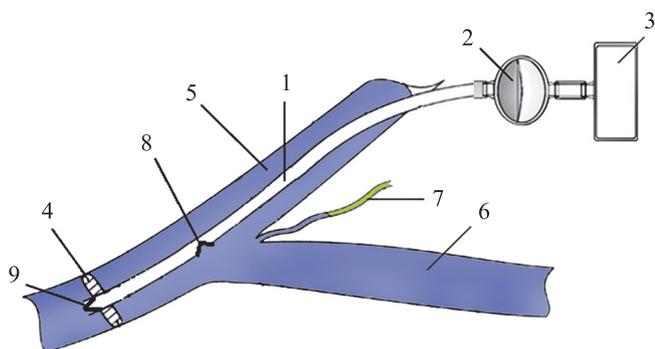


Рис. 2. Новый способ и устройство локального снижения венозного давления в области выхода лимфы из ГП: 1 – внутривенный катетер; 2 – бесклапанный насос; 3 – внешний привод бесклапанного насоса; 4 – раздуваемый баллончик катетера; 5 – левая внутренняя яремная вена; 6 – левая плечеголовная вена; 7 – грудной проток; 8 – входной клапан; 9 – выходной клапан

Fig. 2. A new method and device for local reduction of venous pressure in the site of lymphatic drainage from the TD. 1 – intravenous catheter; 2 – valveless pump; 3 – external drive of the valveless pump; 4 – inflatable balloon catheter; 5 – left internal jugular vein; 6 – left brachiocephalic vein; 7 – thoracic duct; 8 – inlet valve; 9 – outlet valve

Устройство содержит катетер (1), вводимый через левую внутреннюю яремную вену (5), подключенный к бесклапанному насосу (2) с пневмоприводом (3). При этом снижение локального давления в области выхода лимфы (7) реализуется за счет смещения объема крови из заданного пространства через входной клапан (8) в венозном катетере в камеру бесклапанного насоса. Таким образом, на период фазы всасывания создаются условия снижения локального давления в зоне выхода лимфы из ГП (по аналогии с режимом работы системы WhiteSwell). В фазе нагнетания бесклапанного насоса объем крови возвращается в систему венозного кровообращения через выходной клапан (9) катетера. Таким образом, средний поток при этом через левую плечеголовную вену сохраняется на уровне исходного потока (0,4 л/мин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки эффективной работы системы механической поддержки ЛС был разработан гидродинамический стенд (ГС), имитирующий верхний левый плечеголовный отдел венозного русла (рис. 3). ГС включает в себя: насос Rotaflow (Maquet Inc., Германия) (1), обеспечивающий венозную циркуляцию в условиях ОДСН на уровне 0,4 л/мин, венозный резервуар (2), имитирующий вход в правое предсердие при ЦВД в диапазоне 20–25 мм рт. ст., левую верхнюю венозную систему, включающую имитатор левой внутренней яремной вены (3), левую подключичную вену (4) и левую плечеголовную вену (7) с имитатором грудного протока (5).

В имитатор внутренней яремной вены введен катетер (6) с внутренним диаметром 5 мм до входа в левую плечеголовную вену, имеющий входной клапан (8), расположенный на уровне слияния левой внутренней яремной вены и левой подключичной вены (т. е. в зоне выхода лимфы из ГП), и выходной механический клапан (9) на дистальном конце катетера. Катетер герметично соединен с наружным бесклапанным насосом (10) с гибкой диафрагмой объемом 20 мл, приводимым в действие от пневматического привода «Синус ИС» (МЗЭМА, Россия) (11) с заданной частотой и скважностью импульсов давления/разрежения. Для повышения эффективности работы устройства за входным клапаном на наружной стенке катетера установлен раздуваемый баллончик (12), связанный через порт с отдельным каналом (13) катетера для наполнения баллончика газом или жидкостью, обеспечивающим частичное/полное перекрытие просвета между левой плечеголовной веной и внешним диаметром баллончика.

Скорость потока жидкости регистрировалась с помощью ультразвукового датчика TS420 (Transonic Systems, Inc, США) (14, 15). Давление в системе устанавливали на уровне 20 ± 5 мм рт. ст. и регистрировали с помощью датчиков давления (Edwards,

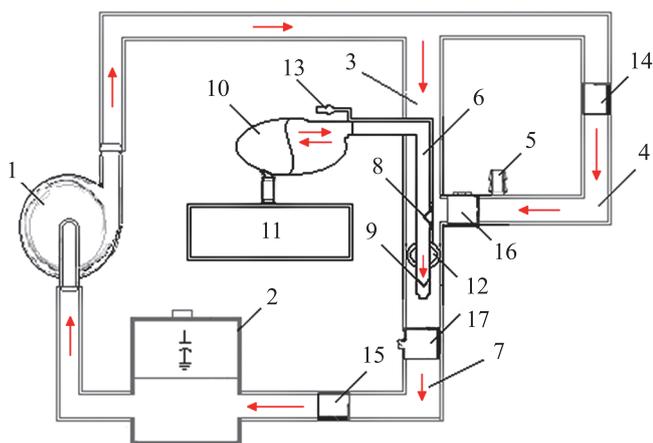


Рис. 3. Принципиальная схема гидродинамического стенда: 1 – центробежный насос Rotaflow; 2 – венозный резервуар; 3 – левая внутренняя яремная вена; 4 – левая подключичная вена; 5 – грудной проток; 6 – внутривенный катетер; 7 – плечеголовная вена; 8 – входной клапан катетера; 9 – выходной клапан катетера; 10 – бесклапанный насос; 11 – привод бесклапанного насоса; 12 – раздуваемый баллончик катетера; 13 – катетер для наполнения баллончика; 14 – датчики потока жидкости в левой подключичной вене; 15 – датчики потока жидкости в контуре; 16 – датчик давления, расположенный в области грудного протока; 17 – датчик давления в области правого предсердия

Fig. 3. Schematic diagram of hydrodynamic test bench. 1 – rotaflo centrifugal pump; 2 – venous reservoir; 3 – left internal jugular vein; 4 – left subclavian vein; 5 – thoracic duct; 6 – intravenous catheter; 7 – brachiocephalic vein; 8 – inlet catheter valve; 9 – outlet catheter valve; 10 – valveless pump; 11 – valveless pump drive; 12 – inflatable balloon catheter; 13 – balloon filling catheter; 14 – fluid flow sensors in the left subclavian vein; 15 – fluid flow sensors in the circuit; 16 – pressure sensor located in the thoracic duct site; 17 – pressure sensor in right atrium site

США) (16, 17) при помощи многоканального модуля измерения гидродинамических параметров «Ангиотон» (Biosoft-М, Россия) с выводом данных на персональный компьютер для регистрации и обработки.

Работа системы определяется частотой работы бесклапанного насоса и соотношением длительностей фаз всасывание/нагнетание. В режиме всасывания жидкости бесклапанным насосом через входной клапан катетера давление в области слияния левой внутренней яремной и левой подключичной вен будет снижаться, создавая условия для выхода лимфы из ГП в венозную систему. В режиме нагнетания бесклапанный насос выбрасывает забранный объем крови через выходной клапан катетера в левую плечеголовную вену. Для поддержания заданного среднего кровотока через левую плечеголовную вену на уровне 0,4 л/мин (в соответствии с условиями венозного кровообращения при ОДСН) в данном исследовании выбрана частота работы бесклапанного насоса 50 уд/мин при соотношении длительности фазы всасывания/нагнетания 0,2/0,8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На ГС проведены испытания устройства механической поддержки ЛС (УМПЛ) с изменением частотных параметров бесклапанного насоса. На основании полученных данных специалист может устанавливать подходящий режим работы УМПЛ для наибольшей разгрузки (понижения венозного давления в области оттока лимфы из грудного протока). Полученные данные сведены в таблицу.

Эффект работы УМПЛ показан на рис. 4, на котором представлена динамика венозного давления, полученная на гидродинамическом стенде в усло-

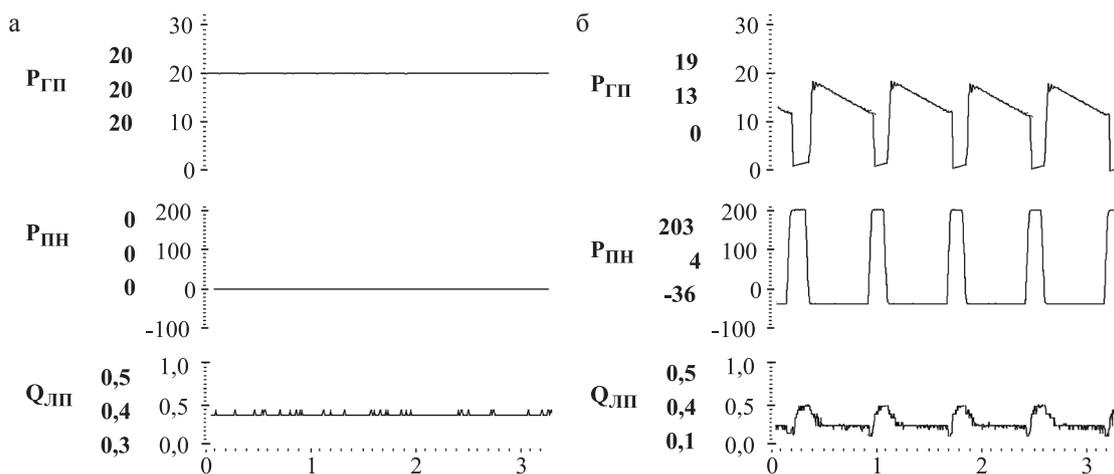


Рис. 4. Гемодинамика кровообращения, полученная в условиях моделирования ОДСН (а) и при работе устройства механической поддержки лимфообращения (б). $P_{ГП}$ – давление в области оттока в грудном протоке; $P_{ПН}$ – пневматическое давление привода бесклапанного насоса; $Q_{ЛП}$ – поток в имитаторе левой плечеголовной вены

Fig. 4. Circulatory hemodynamics obtained in ADHF simulation conditions (a) and during operation of the mechanized lymphatic drainage device (б). $P_{ГП}$ – pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic duct; $P_{ПН}$ – pneumatic pressure of the valveless pump drive; $Q_{ЛП}$ – flow in the left brachiocephalic vein simulator

Таблица

Гемодинамические переменные в условиях моделирования ОДСН при работе бесклапанного насоса на разной частоте

Hemodynamic variables in ADHF simulation condition when a valveless pump is operated at different frequencies

F, уд/мин	P _{ГП} , мм рт. ст.	P _{ЦВД} , мм рт. ст.	tc/td
20	-2 ± 1	20 ± 2	1/4
30	0 ± 1	20 ± 2	1/4
40	2 ± 1	20 ± 2	1/4
50	4 ± 1	20 ± 2	1/4
60	5 ± 1	20 ± 2	1/4

Примечание. F – частота работы бесклапанного насоса; P_{ГП} – венозное давление в области оттока лимфы из грудного протока; P_{ЦВД} – центральное венозное давление; tc/td – соотношение длительности систолы/диастолы бесклапанного насоса.

Note. F – valveless pump frequency; P_{ГП} – venous pressure in the site of lymphatic drainage from the thoracic duct; P_{ЦВД} – central venous pressure; tc/td – systole/diastole duration ratio of the valveless pump.

вии ОДСН и при работе УМПЛ в зоне выхода лимфы из ГП.

В результате работы бесклапанного насоса при ударном выбросе 10 мл в фазе всасывания венозное давление снижалось с 20 ± 5 до 0 ± 3 мм рт. ст. при частоте работы насоса 30 уд/мин и скважности всасывания/нагнетания 0,2/0,8. Таким образом, в течение большего периода цикла работы УМПЛ создаются условия, обеспечивающие нормализацию выхода лимфы из ГП. Средний поток крови через левую плечеголовную вену сохраняется и равен $0,4 \pm 0,1$ л/мин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании представлены конструкция и предварительные характеристики предлагаемого устройства механической поддержки лимфоциркуляции, предназначенного для облегчения симптомов лимфедемы у пациентов с ОДСН. Испытания на гидродинамическом стенде подтверждают возможность с помощью данного устройства нормализовать лимфоциркуляцию из ГП в венозное русло за счет локального снижения венозного давления до 0 мм рт. ст. в условиях ОДСН в рамках общих целевых критериев. Данное устройство может рассматриваться как один из вариантов восстановления лимфообращения у пациентов с ОДСН для эффективного лечения достаточно большой группы пациентов с ОДСН при минимальной медикаментозной терапии с помощью диуретиков или гемодиализа и снятия симптомов отека органов и тканей до нормального

уровня с минимальной антитромбогенной терапией. Кроме того, данное устройство может в дальнейшем использоваться для нормализации лимфоциркуляции в легочном контуре для снятия симптомов отека легких [24].

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ambrosy AP, Fonarow GC, Butler J, Chioncel O, Greene SJ, Vaduganathan M et al. The global health and economic burden of hospitalizations for heart failure: lessons learned from hospitalized heart failure registries. *J Am Coll Cardiol.* 2014; 63 (12): 1123–1133.
2. Jencks SF, Williams MV, Coleman EA. Rehospitalizations among patients in the Medicare fee-for-service program. *N Engl J Med.* 2009; 360 (14): 1418–1428.
3. Setoguchi S, Stevenson LW, Schneeweiss S. Repeated hospitalizations predict mortality in the community population with heart failure. *Am Heart J.* 2007; 154 (2): 260–266.
4. Chang PP, Wruck LM, Shahar E, Rossi JS, Loehr LR, Russell SD. Trends in hospitalizations and survival of acute decompensated heart failure in four US communities (2005–2014): ARIC Study Community Surveillance. *Circulation.* 2018; 138 (1): 12–24.
5. Fallick C, Sobotka PA, Dunlap ME. Sympathetically mediated changes in capacitance: redistribution of the venous reservoir as a cause of decompensation. *Circ Heart Fail.* 2011; 4 (5): 669–675.
6. Burkhoff D, Tyberg JV. Why does pulmonary venous pressure rise after onset of LV dysfunction: a theoretical analysis. *Am J Physiol.* 1993; 265 (5 Pt 2): H1819–H1828.
7. Itkin M, Rockson SG, Burkhoff D. Pathophysiology of the Lymphatic System in Patients With Heart Failure: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol.* 2021; 78 (3): 278–290.
8. Szabo G, Magyar Z. Effect of increased systemic venous pressure on lymph pressure and flow. *Am J Physiol.* 1967; 212 (6): 1469–1474.
9. Brace RA, Valenzuela GJ. Effects of outflow pressure and vascular volume loading on thoracic duct lymph flow in adult sheep. *Am J Physiol.* 1990; 258 (1 Pt 2): R240–244.
10. Laine GA, Allen SJ, Katz J, Gabel JC, Drake RE. Outflow pressure reduces lymph flow rate from various tissues. *Microvasc Res.* 1987; 33 (1): 135–142.
11. Lucas C, Johnson W, Hamilton MA, Fonarow GC, Woo MA, Flavell CM et al. Freedom from congestion predicts good survival despite previous class IV symptoms of heart failure. *Am Heart J.* 2000; 140 (6): 840–847.

12. Mullens W, Verbrugge FH, Nijst P, Tang WHW. Renal sodium avidity in heart failure: from pathophysiology to treatment strategies. *Eur Heart J*. 2017; 38 (24): 1872–1882.
13. Voors AA, Greenberg BH, Pang PS, Levin B, Hua TA et al. Diuretic response in patients with acute decompensated heart failure: characteristics and clinical outcome – an analysis from RELAX-AHF. *Eur J Heart Fail*. 2014; 16 (11): 1230–1240.
14. 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 (19): 1284–1293.
15. Rouvière H, Tobias MJ. Anatomy of the Human Lymphatic System. 1938. *BJS (British Journal of Surgery)*. 1939; 27 (Issue 105): 194–195.
16. Scallan JP, Zawieja SD, Castorena-Gonzalez JA, Davis MJ. Lymphatic pumping: mechanics, mechanisms and malfunction. *J Physiol*. 2016; 594 (20): 5749–5768.
17. 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.
18. Drake RE, Teague RA, Gabel JC. Lymphatic drainage reduces intestinal edema and fluid loss. *Lymphology*. 1998; 31 (2): 68–73.
19. Cole WR, Witte MH, Kash SL, Rodger M, Bleisch VR, Muelheims GH. Thoracic Duct-to-Pulmonary Vein Shunt in the Treatment of Experimental Right Heart Failure. *Circulation*. 1967; 36 (4): 539–543.
20. US 2016/0331378 A1 System and methods for reduction pressure at an outflow of duct Nitzan Y., Yacjby M., Feld T. 2016.
21. US 2018/0250456 A1 System and methods for reduction pressure at an outflow of duct Nitzan Y., Yacjby M., Rar S., Chen S., Inbar O., 2018.
22. US 2020/0397963 A1. Intravascular catheters. Nitzan Y. 2020.
23. RU 2021107668 A. Заявка: 2021107668 от 23.03.2021.
24. Uhley HN, Leeds SE, Sampson JJ, Freadman M. Role of pulmonary lymphatics in chronic pulmonary edema. *Circ Res*. 1962; 11: 966–970.

*Статья поступила в редакцию 15.09.2022 г.
The article was submitted to the journal on 15.09.2022*

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-60-72

КОРРЕКЦИЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПУТЕМ ИМПЛАНТАЦИИ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ: МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, Н.А. Онищенко¹, А.В. Гречина², М.Е. Крашенинников⁴,
А.О. Никольская¹, Е.А. Волкова¹, Н.П. Можейко¹, Н.А. Бояринова², А.В. Люндун⁴,
Г.А. Пьявченко², Л.И. Давыдова³, А.Ю. Архипова^{5, 6}, В.Г. Бозуш³, С.В. Готье^{1, 2}

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

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

³ ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

⁶ МГУ-ППИ, Шэньчжэнь, КНР

Цель: на экспериментальной модели хронической печеночной недостаточности (ХПН) изучить эффективность коррекции морфофункциональных характеристик состояния печени с помощью имплантируемых в нее клеточно-инженерных конструкций (КИК). **Материалы и методы.** Опыты проведены на крысах-самцах породы Вистар (n = 80) в возрасте 6–8 месяцев с исходной массой 230–250 г. Моделирование ХПН осуществляли путем затравки крыс 60% масляным раствором CCl₄ по модифицированной схеме в течение 42 суток. В качестве матрикса для изготовления КИК использовали микрогель на основе рекомбинантного спидроина rS1/9. Клеточным компонентом КИК служили аллогенные клетки печени (КП) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (ММСК КМ) здорового донора. Эффективность корригирующего воздействия имплантируемых КИК оценивали на экспериментальной модели ХПН (n = 60) в двух группах крыс: 1-я группа – контроль (n = 20), в паренхиму поврежденной печени вводили 1 мл физиологического раствора; 2-я группа – экспериментальная (n = 40), в паренхиму поврежденной печени имплантировали КИК, содержащие аллогенные КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1 в объеме 1 мл. Для осуществления длительного наблюдения за состоянием КИК их маркировали путем дополнительного включения в состав Цитодекса-3. Эффективность регуляторного воздействия КИК на восстановительные процессы в печени оценивали с помощью биохимических, морфологических и морфометрических методов, а также метода проточной цитофлуометрии на сроке 90 суток после имплантации. **Результаты.** В контрольной группе летальность при моделировании ХПН составила 25%. Летальность в экспериментальной группе с ХПН при имплантации КИК отсутствовала. Установлено корригирующее воздействие КИК на используемые биохимические и морфологические показатели состояния печени при ХПН в течение 90 суток наблюдения при сопутствующем сохранении структурного гомеостаза клеток в имплантируемых КИК. **Заключение.** Использование КИК, имплантируемых в печень, позволяет осуществлять эффективную коррекцию ХПН путем активации восстановительных процессов в поврежденной печени, которая обусловлена длительным сохранением структурного гомеостаза клеток, включенных в состав КИК.

Ключевые слова: регенеративная медицина, коррекция хронической печеночной недостаточности, матрикс, микрогель, клетки печени, ММСК КМ, клеточно-инженерные конструкции.

Для корреспонденции: Шагидулин Мурат Юнусович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

Corresponding author: Murat Shagidulin. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (499) 196-87-90. E-mail: dr.shagidulin@mail.ru

TREATMENT OF CHRONIC LIVER DISEASE USING CELL-ENGINEERED CONSTRUCTS: MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS

M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, N.A. Onishchenko¹, A.V. Grechina², M.E. Krasheninnikov⁴, A.O. Nikolskaya¹, E.A. Volkova¹, N.P. Mogeiko¹, N.A. Boiarinova², A.V. Lyundup⁴, G.A. Piavchenko², L.I. Davydova³, A.Yu. Arhipova^{5, 6}, V.G. Bogush³, S.V. Gautier^{1, 2}

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Kurchatov Institute, Moscow, Russian Federation

⁴ RUDN University, Moscow, Russian Federation

⁵ Moscow State University, Moscow, Russian Federation

⁶ Shenzhen MSU-BIT University, Shenzhen, China

Objective: to study the effectiveness of correcting the morphofunctional characteristics of the liver in an experimental model of chronic liver disease (CLD), using implanted cell-engineered constructs (CECs). **Materials and methods.** Experiments were carried out on male Wistar rats (n = 80) aged 6–8 months with an initial weight of 230–250 g. CLD was modeled by inoculating the rats with 60% CCl₄ oil solution for 42 days based on a modified scheme. Microgel based on recombinant spidroin rS1/9 was used as a matrix for CECs fabrication. Allogeneic liver cells (LCs) and multipotent bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) from a healthy donor were used as the cellular component of the CECs. The effectiveness of the corrective effect of the implanted CECs was assessed in an experimental CLD model (n = 60) in two groups of rats: Group 1 (control, n = 20, 1 mL of saline solution was injected into the damaged liver parenchyma) and Group 2 (experimental, n = 40, CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs in a 5 : 1 ratio in a volume of 1 mL were implanted into the damaged liver parenchyma). For long-term monitoring of the CEC state, the CECs were labeled by additional inclusion in Cytodex-3. The effectiveness of the regulatory effect of CECs on regenerative processes in the liver was evaluated using biochemical, morphological and morphometric techniques, as well as by flow cytometry at 90 days after implantation. **Results.** In the control group, the mortality rate in CLD was 25%. There was no death in the experimental group with CLD after CEC implantation. The CECs were found to have a corrective effect on the biochemical and morphological parameters of the liver in CLD during 90 days of follow-up, with concomitant preservation of structural cellular homeostasis in the implanted CECs. **Conclusion.** Implantation of CECs in the liver facilitates effective correction of CLD by activating regenerative processes in the damaged liver, which is due to long-term preservation of structural cellular homeostasis in the CECs.

Keywords: regenerative medicine, chronic liver disease treatment, matrix, microgel, liver cells, bone marrow-derived mesenchymal stem cells, cell-engineered constructs.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении последних десятилетий в нашей стране, как и во всем мире, выявлен значительный рост числа тяжелых хронических заболеваний печени, приводящих к декомпенсированной хронической печеночной недостаточности (ХПН). Заболевание характеризуется прогрессирующим течением, что требует осуществления постоянных корригирующих воздействий. Среди применяемых методов лечения трансплантация печени является наиболее эффективным и единственно радикальным в отношении длительного выживания больных методом лечения хронических болезней печени в терминальной стадии [1, 2].

Основной задачей современного этапа развития трансплантологии остается обеспечение доступ-

ности трансплантации органов всем нуждающимся пациентам. Потребность в трансплантации печени составляет ежегодно не менее 20 на 1 млн населения [1]. Однако прогрессивно нарастающий дефицит донорских органов ограничивает применение этого высокотехнологического вида помощи, в связи с чем число пациентов, находящихся в листе ожидания, продолжает расти [2–5]. Неуклонный рост хронических заболеваний печени [3], приводящий к ее необратимому повреждению, требует поиска новых эффективных методов лечения.

Анализ работ, проведенных в области трансплантологии и искусственных органов, свидетельствует о появлении принципиально нового подхода к восстановительному лечению поврежденных жизненно важных органов, основанного на технологиях

тканевой инженерии и регенеративной медицины (ТИРМ) [6].

В связи с вышеизложенным разработка биомедицинских технологий поддержки функций печени у пациентов при декомпенсированной ХПН, и особенно у пациентов, находящихся в листе ожидания трансплантации печени, является актуальным направлением современной медицины [5].

Одним из ведущих направлений ТИРМ является разработка методов коррекции функций пораженной печени при ХПН путем создания новой функционально активной ткани печени, способной на определенный срок устранить дефицит функций поврежденной печени, особенно в предтрансплантационном периоде.

К настоящему времени проведен ряд исследований по применению клеточно-инженерных конструкций (КИК), в состав которых входили матриксы из биополимерных материалов, клетки печени (КП) и мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (ММСК КМ) [7, 8]. Однако исследований по применению микрогеля на основе рекомбинантных спидроинов для изготовления КИК с целью коррекции и лечения ХПН мы в литературе не обнаружили.

Используемый в работе рекомбинантный спидроин rS1/9 создан на основе белка, ген которого был ранее разработан, синтезирован и клонирован в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [9]. Рекомбинантный спидроин rS1/9 является аналогом природного белка каркасной нити паутины паука-кругопряда *Nephila clavipes* – спидроина 1, молекулярная масса 94 кДа и изоэлектрическая точка pI = 10,3, т. е. положительно заряжен во всем диапазоне физиологических значений pH. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что 2D- и 3D-материалы/изделия на основе rS1/9 характеризуются отсутствием токсичности и аллергенности, медленной резорбцией в организме животных, способностью поддерживать адгезию и пролиферации разных типов клеток [10]. Из раствора рекомбинантного спидроина rS1/9 был сформирован гидрогель, из которого путем механического дробления был получен микрогель, представляющий собой суспензию микрогелевых частиц размером от 100 до 300 мкм, обладающих выраженным регенеративным эффектом [11].

Цель работы: на экспериментальной модели ХПН исследовать возможность долгосрочной коррекции и восстановления функций печени с помощью имплантации клеточно-инженерной конструкции на основе микрогеля из rS1/9, содержащего аллогенные клетки печени и ММСК КМ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных задач экспериментальные исследования проводили на крысах-самцах породы Вистар ($n = 80$) в возрасте 6–8 месяцев с исходной массой 230–250 г. Животных содержали в условиях вивария при температуре 18–20 °С на смешанном рационе питания при свободном доступе к воде. Эксперименты на животных проводили с 9 до 19 часов при комнатной температуре ($t = 22–24$ °С), что исключало суточные колебания митотической активности клеток печени, относительная влажность равнялась 50–65%, цикл освещения был двенадцати-часовым, а смена объема воздуха помещения в час была десятикратной. Рацион вивария для крыс был стандартным: животные питались комбинированным кормом для лабораторных животных (микробиологический статус соответствовал ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных 55 животных»), фильтрованная водопроводная вода *ad libitum* доставлялась в стандартных питьевых бутылочках (микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»). Эксперименты и все манипуляции с животными выполняли согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Осуществляли моделирование ХПН путем пролонгированной заправки крыс-самцов породы Вистар четыреххлористым углеродом по модифицированной нами схеме в течение 42 суток [8].

Донорами аллогенных клеток печени (КП) и ММСК КМ были крысы-самцы породы Вистар в возрасте 5–6 месяцев, весом 150–230 г.

Работа по выделению клеток и их культивированию проводилась в соответствии с общими принципами осуществления культуральных исследований. Приготовление культуры ММСК КМ осуществляли по общепринятой методике [8].

Приготовление культуры КП, ее использование также осуществляли по известной методике [12].

При изготовлении КИК сначала проводили предварительное сокультивирование изолированных КП ($2,5–4,0 \times 10^6$ клеток/см³) и ММСК КМ ($0,5–0,8 \times 10^6$ клеток/см³) в течение 3 суток, используя определенное соотношение этих клеток (КП : ММСК КМ = 5 : 1). В культуру сокультивированных клеток дополнительно вносили 150 мкл суспензии микрогеля на основе rS1/9 для их адгезии и добавляли Цитодекс-3 (объем 150 мкл) для приобретения возможности оценки состояния клеточного материала в составе

КИК на длительных сроках после имплантации их в печень.

На 7-е сутки после окончания затравки крысы, выжившие после моделирования ХПН ($n = 60$), были разделены на 2 группы опытов. Группа 1 – контроль ($n = 20$), в которой в паренхиму печени животным вводили физиологический раствор (ХПН + 1,0 мл физиологического раствора,). Группа 2 – экспериментальная ($n = 40$), в паренхиму печени путем ее обкалывания вводили КИК, состоящие из микрогеля rS1/9, аллогенных КП и ММСК КМ = 5 : 1, а также Цитодекс-3 в объеме 1 мл.

Культивирование дрожжей, выделение и очистку рекомбинантного спидроина rS1/9, приготовление гидрогеля и микрогеля на его основе проводили, как описано ранее, в соответствии с ранее опубликованным протоколом [11].

Анализ морфологии поверхности гидрогеля осуществляли на микроскопе CamscanS2 (Cambridge Instruments, Великобритания). Изображения были получены с помощью программного обеспечения MicroCapture (SMA, Россия).

Контроль адекватности созданных моделей ХПН и эффективности коррекции возникших морфофункциональных нарушений в печени с помощью КИК оценивали по уровню летальности и выживаемости животных, по морфологическим и морфометрическим характеристикам состояния печени, а также самих КИК. Функциональную эффективность применения КИК оценивали по значениям биохимических показателей крови. После моделирования ХПН и использованной терапии выживших животных выводили из эксперимента на 90-е сутки путем внутрибрюшинного введения тиопентала натрия в дозировке, вызывающей остановку дыхания. На аутопсии биоптаты печени подвергались морфологическим и морфометрическим исследованиям. Иммуносупрессию не применяли.

Прижизненный забор крови у крыс для биохимических исследований осуществляли под эфирным наркозом путем насечки кончика хвоста. Функцию печени (АлАТ, АсАТ, ЩФ) исследовали на биохимическом анализаторе Reflotron™ («Roche», Швейцария) при использовании специальных тест-полосок Reflotron.

Для морфологических исследований использовали печень от животных групп 1 и 2. Изучали состояние регенерационных процессов в печени, как в зонах имплантации КИК, так и вне зон имплантации КИК. Оценивали данные световой микроскопии при окрашивании срезов гематоксилином и эозином, по Маллори, по Ван-Гизону (микроскоп Leica DM 6000 В с камерой Leica LTDCN 9435, Германия).

Морфометрический анализ осуществляли с использованием морфометрической программы

ImageScopeM (ООО «Системы для микроскопии и анализа», Россия) с использованием микроскопа Leica DM 1000 и камеры Leica LTDCN 9435 DFC 295 (LeicaCamera AG, Германия). Морфометрически определяли: наличие цирроза (подсчет количества ложных долек); удельную площадь соединительной ткани (в % отношении к общей площади среза печени) [13, 14]; осуществляли подсчет количества двуядерных гепатоцитов (на 10 полей зрения при увеличении $\times 400$), гепатоцитов с признаками жировой дистрофии, гепатоцитов с дегенерирующими ядрами и внутриядерными липидными включениями; площадь кровеносных сосудов и желчных протоков (в ‰).

Для верификации и структурного анализа срезов ткани печени проводили обработку изображений с помощью AI (Artificial Intelligence) анализа. Данный метод является эффективным способом анализа и представления полученных результатов [15, 16] и позволяет наглядно дифференцировать структуры в ткани на основе ее тинкториальных свойств.

Преобразование изображений гистологических срезов печени в виде трехмерного пространства было выполнено в программе MATLAB (MATLAB Corporation, USA). Выделяли следующие типы структур: «оксифильная цитоплазма гепатоцитов», «базофильные ядра гепатоцитов», «волоконистая соединительная ткань», «межклеточное вещество» и «пустые пространства (просвет сосудов, адипоциты)». Исходное изображение было преобразовано в серую шкалу. После этого была построена трехмерная 3D-модель с учетом добавленных констант для каждого серошкального изображения. Построенные модели и псевдоокрашивание были индивидуальны для каждого изображения [17].

Для контроля жизнеспособности клеток в первичной культуре использовали окраску метиленовым синим [18].

Проводили также подсчет концентрации Т-регуляторных клеток ($CD4^+$, $CD25^+$, FoxP3) в крови, которые отражают степень иммунной толерантности организма на аллогенные клетки в составе КИК, используя проточный цитофлуориметр (BeckmanCoulter, США). Для этого лимфоциты крови метили крысиными антителами $CD4^+$, $CD25^+$ и FoxP3 фирмы «eBioscience» (США).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью компьютерного статистического пакета Biostat; достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента с учетом поправки Бонферонни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$ (Статистический пакет, рекомендованный ВОЗ, EpiInfo 5.0). Актуриальную выживаемость животных в течение года после моделирования ХПН (контроль) и на фоне ее коррекции путем им-

плантации КИК рассчитывали по Kaplan–Meier при помощи статистического пакета программы Statistica for Windows, v. 12.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Жизнеспособность первичной культуры ММСК КМ составляла $94 \pm 2\%$. Клеточная суспензия, приготовленная из донорской печени, содержала $\sim 95\text{--}98\%$ гепатоцитов и $\sim 5\text{--}2\%$ непаренхиматозных клеток, жизнеспособность их составляла $76 \pm 4\%$. Разделение клеток на паренхиматозные и непаренхиматозные не проводили.

Структура поверхности микрогеля была проанализирована с помощью СЭМ. Микрогель представляет собой микрочастицы со средним размером от 100 до 300 мкм и ярко выраженной рельефной поверх-

ностью; поверхностные элементы гидрогеля включают наноструктуры диаметром от 100 до 300 нм и микроструктуры размером от 10 до 30 мкм (рис. 1).

После получения первичной культуры клеток мы считали необходимым осуществить их предварительное культивирование для устранения стрессорного повреждения в процессе выделения, а также для активизации их клеточных функций. Для этого ММСК КМ культивировали в течение 7 суток, а затем сокультивировали с введенными в культуру КП в течение последующих 3 суток. Сокультивирование клеток выполняли не только в стационарном, но и во вращательном режиме (1,5–2,0 об/мин) для имитации условий массообмена, обеспечиваемого с помощью кровообращения, т. к. только в этих условиях можно обеспечить длительную жизнеспособность и проли-

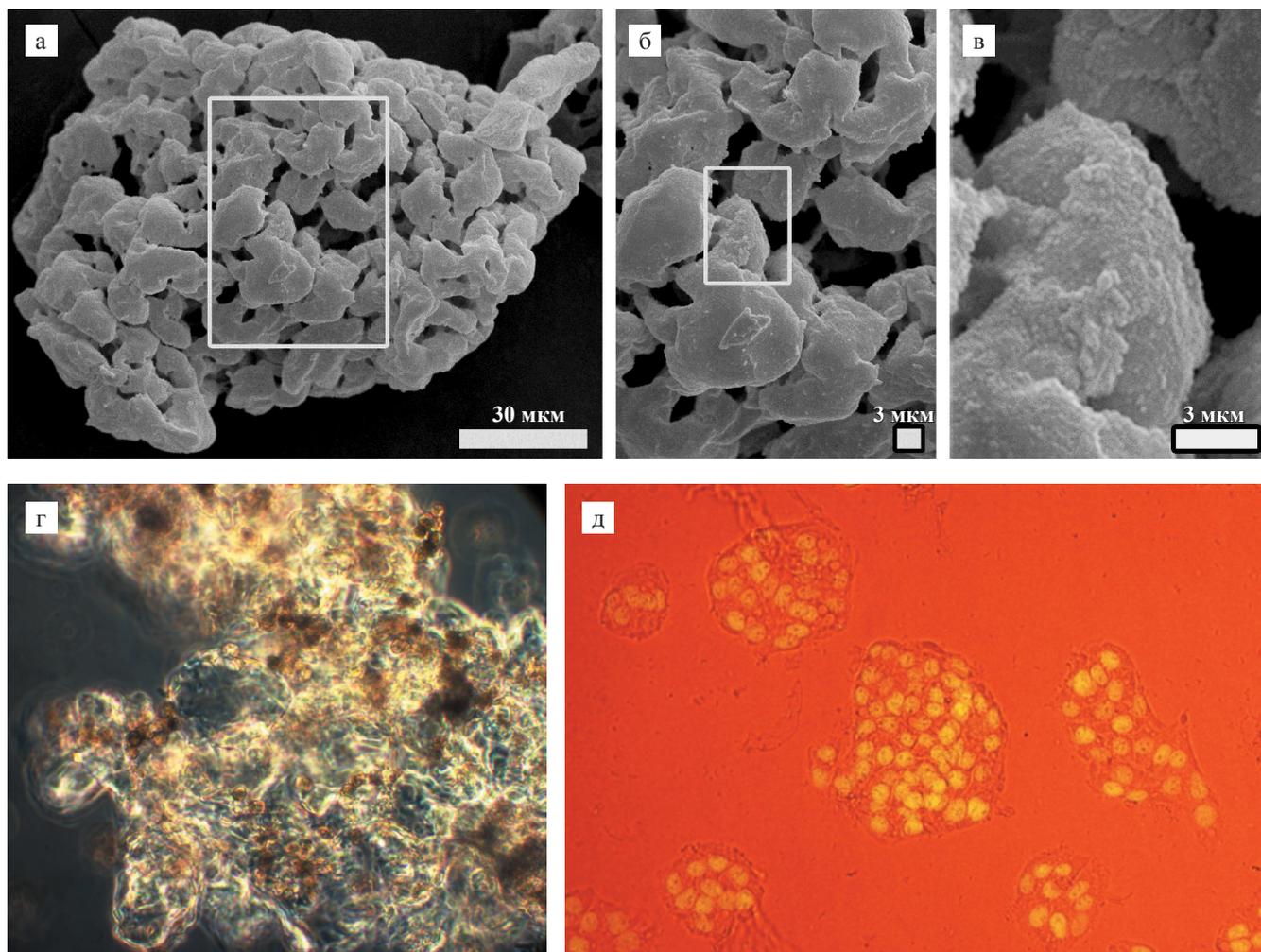


Рис. 1. Структура микрогеля на основе rS1/9: а – СЭМ-изображение частицы микрогеля, масштабная линейка 30 мкм; б и в – увеличенное изображение области в белой рамке, масштабная линейка 3 мкм; г – сокультивация КП и ММСК КМ на rS1/9, фазовый контраст, $\times 400$; д – окраска на специфический гепатоцитарный ядерный антиген 4 (HNF-4), флуоресцентная микроскопия + фазовый контраст, $\times 200$

Fig. 1. Structure of rS1/9-based microgel: а – SEM image of microgel particle (scale bar = 30 μm); б and в – enlarged image of the area in a white frame (scale bar = 30 μm); г – Co-cultivation of LCs and BM-MSCs on rS1/9, phase contrast microscopy images (400 \times magnification); д – Staining for specific hepatocyte nuclear antigen 4 (HNF-4), fluorescence microscopy + phase contrast (200 \times magnification)

феративную активность КП при сокультивировании с ММСК КМ. Для определения пригодности rS1/9 для адгезии КП провели исследования, которые подтвердили активную адгезию КП на поверхности rS1/9.

В процессе моделирования ХПН летальность составила 25%. Далее в контрольной группе (группа 1) после окончания затравки гибель животных не прекратилась: погибло 5 крыс из 20 (25%), что, по нашему мнению, подтверждает адекватность выбранной модели формирования ХПН. В экспериментальной группе (группа 2) летальности на этом сроке (90 суток) не было. Актуриальная выживаемость на этапе затравки и при лечении представлена на рис. 2.

На начальном этапе исследований изучали нормальную структуру ткани печени. Выявлена однородная паренхима печени, образованная печеночными балками из гепатоцитов, с расположенными между ними синусоидными капиллярами в виде щелевидных пространств, а также определялось наличие эндотелия и просвета капилляров и вен (рис. 3, а–в).

После окончания затравки (42 суток) на 7-е сутки выявляли: изменения балочной структуры печеночных долек, выраженный полиморфизм паренхиматозных клеток, жировую дистрофию гепатоцитов, кариорексис, кариолизис, некроз гепатоцитов. Выявляли массивную жировую дистрофию гепатоцитов и формирование ложных долек (рис. 3, г–е).

К 90-м суткам после моделирования ХПН в контрольной группе наступала субтотальная перестройка гисто-архитектоники печени с замещением нормальной паренхимы ложными долями. Склеротические

изменения (фиброз) проявлялись образованием коллагеновых волокон по ходу портальных трактов и формированием порто-портальных и порто-центральных септ с образованием ложных долек. Выявлялись очаговые некрозы гепатоцитов, расширение и полнокровие синусоидов и полнокровие центральных вен. В паренхиме печени отмечали редкую лимфоидно-клеточную инфильтрацию, пролиферацию гистиобластов и гистоцитов. В экспериментальной группе к 90-м суткам наблюдали существенно меньшую выраженность токсического поражения печени по сравнению с контролем. Отмечали отчетливо выраженную положительную динамику восстановления печеночной паренхимы. Архитектоника печени практически полностью восстанавливалась, отмечался регресс жировой дистрофии и переход ее в мелкокапельную форму, выявляли восстановление структуры печеночной дольки. Появлялись сохраненные гепатоциты без признаков дистрофии вокруг вен; архитектура балок восстанавливалась, формирование ложных долек не определялось (рис. 3, ж), тогда как в контроле имели место появление ложных долек и выраженная белковая дистрофия гепатоцитов, склероз и фиброз паренхимы печени.

Для объективизации полученных результатов осуществляли количественную и полуколичественную оценку структурных изменений, возникающих в ткани печени при ХПН без лечения и при использовании КИК. Были проведены морфометрические исследования состояния клеток паренхимы печени (подсчет количества гепатоцитов с признаками жи-

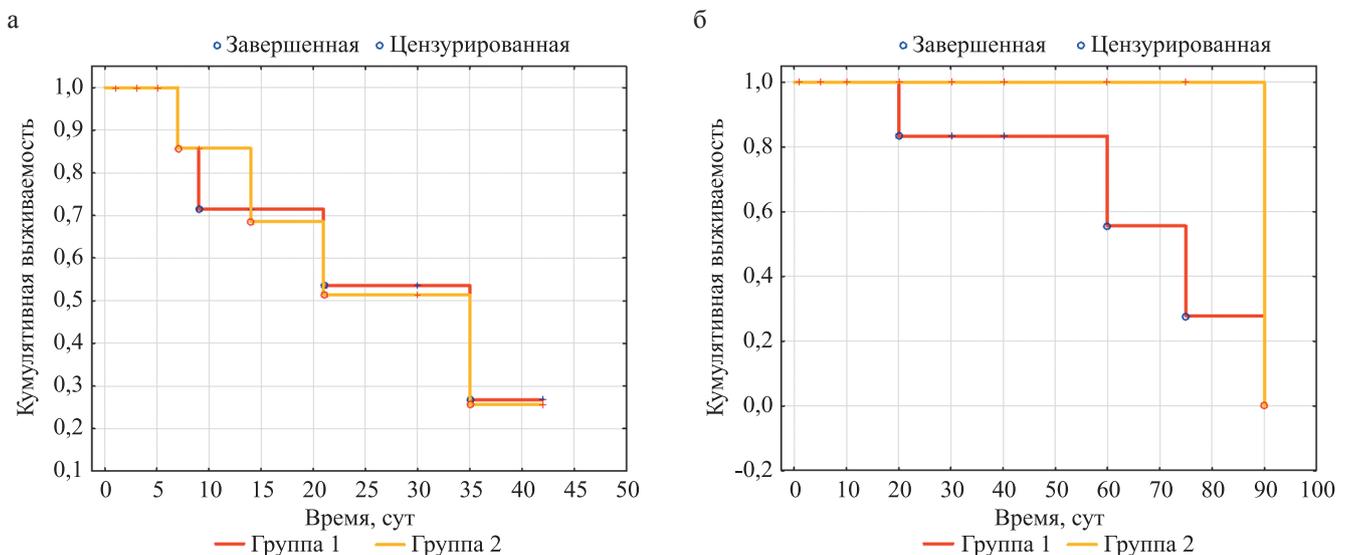


Рис. 2. Актуриальная выживаемость животных (по Каплану–Майеру): а – в процессе моделирования ХПН: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -1,000$, $Sum = 670,00$, $Var = 76,32$, $Test\ statistic = -0,037655$, $p = 0,96996$; б – в процессе лечения ХПН: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -11,00$, $Sum = 238,00$, $Var = 62,632$, $Test\ statistic = -1,32676$, $p = 0,18459$

Fig. 2. Actuarial survival (according to Kaplan–Meier estimate): а – during CLD modeling: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -1,000$, $Sum = 670.00$, $Var = 76.32$, $Test\ statistic = -0.037655$, $p = 0.96996$; б – during CLD treatment: Gehan’s Wilcoxon Test (Spreadsheet1) $WW = -11.00$, $Sum = 238.00$, $Var = 62.632$, $Test\ statistic = -1.32676$, $p = 0.18459$

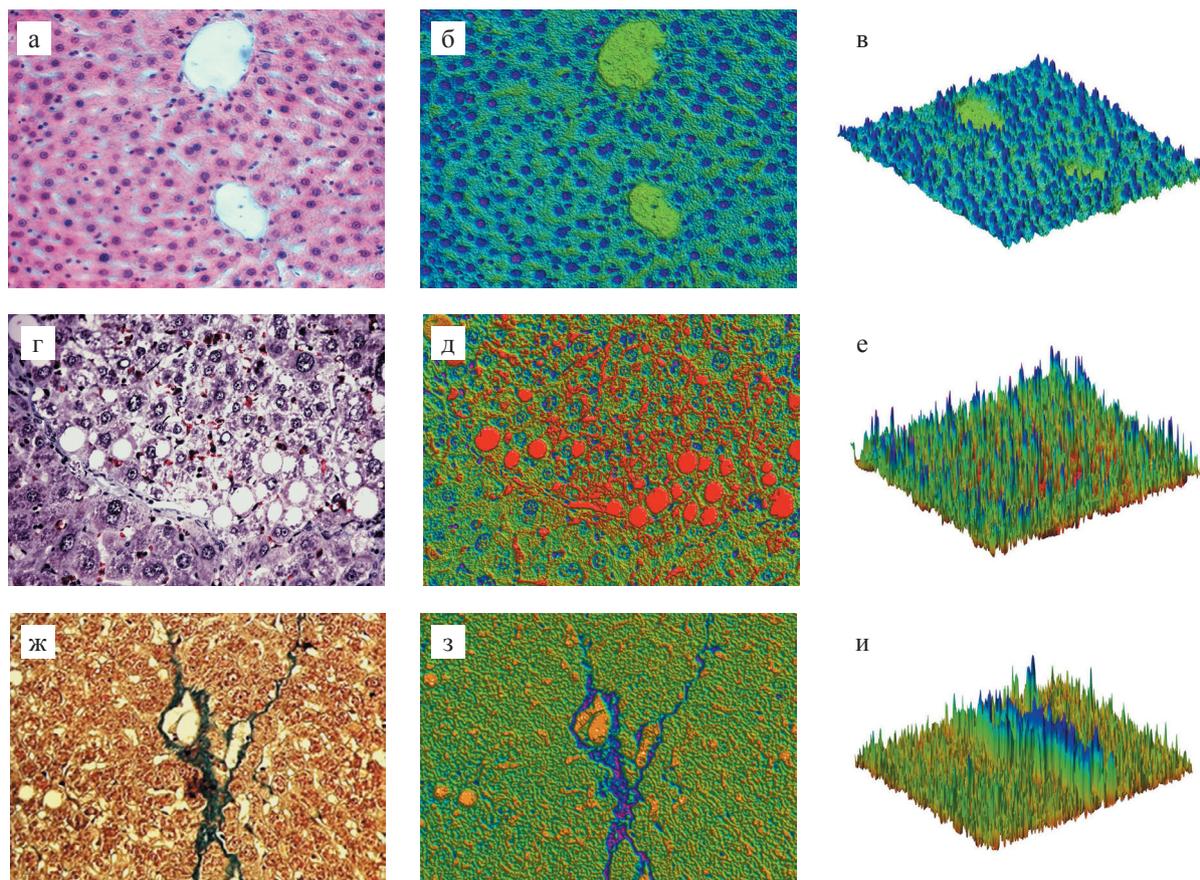


Рис. 3. Гистологические и псевдоокрашенные 2D- и 3D-препараты печени: а – гистологические препараты здоровой печени: центральная часть дольки с сохранными структурами с наличием двух центральных вен, балочное строение не нарушено, зернистая белковая дистрофия гепатоцитов, незначительное расширение синусоидов, окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$; б, в – на псевдоокрашенных 2D и 3D выявлена общая структура паренхимы органа без патологических изменений, гепатоциты с оксифильной окраской цитоплазмы и базофильными ядрами и нормальным соотношением ядер и цитоплазмы, синусоидальные капилляры не расширены, цитоплазма гепатоцитов псевдоокрашена голубым, ядра – синим, синусоидальные пространства и просвет сосудов – зеленым, базофильные ядра гепатоцитов – сиреневый; г – гистологический препарат печени на 7-е сутки после окончания моделирования ХПН: начальное формирование фиброзной ткани, очаговая белковая зернистая дистрофия гепатоцитов, значительная группа клеток в состоянии баллонной дистрофии и некроза, очаговая крупно- и мелкокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, расширение и полнокровие синусоидов, в паренхиме редкая лимфоидно-клеточная инфильтрация, окраска по Ван-Гизону, $\times 400$; д, е – жировая дистрофия гепатоцитов со сдвигом ядерно-цитоплазматического соотношения: гепатоциты с увеличенным объемом цитоплазмы, выявляются участки фиброза, на псевдоокрашенных 2D и 3D (д, е) изображениях цитоплазма гепатоцитов – зеленый цвет, ядра гепатоцитов – синий и фиолетовый цвет для выраженных гиперхромных тинкториальных свойств, красный цвет для пустых мест, преимущественно в гепатоцитах с жировой дистрофией; ж – гистологический препарат печени на 90-е сутки: ХПН + имплантация КИК с КП и ММСК КМ (группа 2), центральная часть дольки с сохранными структурами, окраска по Ван-Гизону, $\times 200$; з, и – цитоплазма гепатоцитов зеленого цвета, их ядра – синего и фиолетового при выраженной гиперхромной тинкториальности, преобладающие пустые места в гепатоцитах с жировой дистрофией – красного цвета

Fig. 3. Histological and pseudostained 2D and 3D liver preparations: а – tissue specimens of healthy liver: Central part of the lobule with preserved structures with the presence of two central veins. Balloon structure is not disturbed, granular hepatocyte dystrophy, slight expansion of sinusoids. H&E staining ($200\times$ magnification); б, в – pseudo-stained 2D and 3D images revealed the general structure of organ parenchyma without pathological changes. Hepatocytes with oxyphilic staining of cytoplasm and basophilic nuclei and a normal nuclear-cytoplasmic ratio, sinusoidal capillaries were not dilated. Hepatocyte cytoplasm is pseudostained in blue, nuclei are blue, sinusoidal spaces and vascular lumen are green, basophilic hepatocyte nuclei are lilac; г – liver tissue specimen on day 7 after the end of CLD modeling: initial formation of fibrous tissue, focal proteinaceous granular degeneration of hepatocytes, significant group of cells in a state of ballooning degeneration and necrosis. Focal large- and small-drop fatty degeneration in hepatocytes. Sinusoidal dilatation and plethora. Rare lymphoid-cell infiltration in the parenchyma. Van Gieson's staining ($400\times$ magnification); д, е – fatty degeneration of hepatocytes with a shift in nuclear-cytoplasmic ratio: hepatocytes with increased volume of cytoplasm. Areas of fibrosis are identified. On pseudo-stained 2D and 3D (д, е) images, hepatocyte cytoplasm is green, hepatocyte nuclei are blue and purple for pronounced hyperchromic tinctorial properties. Red color for empty spaces, predominantly in hepatocytes with fatty degeneration; ж – liver tissue specimen at day 90: CLD + CEC implantation with LCs and BM-MSCs (group 2). Central part of the lobule with preserved structures. Van Gieson's staining ($200\times$ magnification); з, и – hepatocyte cytoplasm is green, their nuclei are blue and purple with pronounced tinctorial properties, the prevailing empty spaces in hepatocytes with fatty degeneration are red

ровой дистрофии, с дегенерирующими ядрами, с внутриядерными липидными включениями и подсчет количества двуядерных гепатоцитов), а также непаренхиматозных структур (определение удельной площади соединительной ткани и количества ложных долек в печени), включая площадь кровеносных сосудов и желчных протоков в ткани печени на сроке 90 суток после моделирования ХПН (рис. 4, а, б).

При морфометрическом исследовании состояния непаренхиматозных структур (определение удельной площади соединительной ткани и количества ложных долек в печени) на сроке 90 суток было установлено, что под влиянием КИК происходит восстановление паренхимы печени, а также снижение удельной площади соединительной ткани печени (рис. 4, а) и количества ложных долек в ней (рис. 4, б). В то же время в контрольной группе происходило увеличение этих показателей до 8,2 и 2,8% соответственно.

Было установлено также, что при лечении с помощью КИК (экспериментальная группа 2) происходит быстрое и достоверное снижение количества гепатоцитов – с признаками жировой дистрофии, с дегенерирующими ядрами, с внутриядерными липидными включениями – и более выраженное достоверное повышение количества двуядерных гепатоцитов. Причем вышеуказанные изменения сочетались с выраженным позитивным клиническим эффектом. На сроке 90 суток отмечали также нормализацию площади кровеносных сосудов и желчных протоков в ткани печени по сравнению с контрольной группой (рис. 4, в–з).

Вышеприведенные исследования позволили заключить, что восстановительные процессы как в непаренхиматозных, так и в паренхиматозных структурах ткани печени при ХПН интенсифицируются только при использовании КИК с аллогенными КП и ММСК КМ.

Выявленные особенности регенерации печени при использовании КИК с аллогенными КП и ММСК КМ обусловили необходимость изучения гистологического состояния самих КИК и примыкающей к ним ткани печени на сроке 90 суток после имплантации.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что аллогенные КП в составе КИК при имплантации в печень реципиента в течение длительного времени (90 суток) сохраняют свою жизнеспособность и пролиферативную активность, причем без признаков их отторжения, несмотря на отсутствие иммуносупрессии (рис. 5, а–е).

Гистологический и модельный трехмерный анализ состояния гепатоцитов в КИК, имплантированных в паренхиму печени при ХПН, показал, что структурные изменения гепатоцитов в составе КИК хорошо различимы в гистологических препаратах. Они четко идентифицируются различным цветовым окрашиванием, что позволяет выделять разные

структуры. Таким образом, имплантация КИК, содержащих микрогель на основе rS1/9 и аллогенные КП и ММСК КМ, приводит к положительным структурным изменениям в паренхиме печени на фоне длительного сохранения, развития и поддержания нормального структурного гомеостаза гепатоцитов в составе КИК.

Можно полагать, что длительное отсутствие отчетливо выраженных признаков иммунного отторжения КИК, содержащих в своем составе аллогенные клетки (КП и ММСК КМ), является следствием локальной реализации присущих ММСК КМ иммуномодулирующих и толерогенных свойств, которые защищают КИК от их иммунного отторжения и позволяют им длительно и эффективно функционировать.

Исследование крови на содержание Т-регуляторных клеток методом проточной цитофлуометрии подтвердило, что у крыс с ХПН, леченных методом имплантации КИК с аллогенными КП и ММСК КМ, через 90 суток, так же как и у здоровых, отмечалось сохранение в крови исходного уровня концентрации $CD4^+$, $CD25^+$, $Foxp3^+$ Т-регуляторных клеток (рис. 6).

В то же время по сравнению с контрольной группой в экспериментальной группе к 90-м суткам имело место достоверное повышение содержания этого пула Т-регуляторных клеток. Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что поддержание в течение длительного времени жизнеспособности пересаженных аллогенных КП и ММСК КМ в составе КИК обусловлено индуцируемой и поддерживаемой ММСК КМ иммунологической толерантностью в организме.

Параллельно выполненные исследования функционального состояния печени путем динамического измерения биохимических показателей сыворотки крови подтвердили развитие устойчивого токсического повреждения печени сразу после моделирования ХПН. Развитие ХПН сопровождалось тяжелым нарушением функциональных показателей печени: АлАТ, АсАТ и ЩФ сразу в течение первых 7 суток после окончания затравки были резко повышены у животных 1-й и 2-й групп. Однако в экспериментальной группе с имплантацией КИК в течение первых 30 суток наблюдался быстрый темп нормализации исследуемых биохимических показателей (АлАТ, АсАТ, ЩФ) и их полное восстановление к концу срока наблюдения.

При дальнейшем наблюдении в группе животных с имплантацией КИК биохимические показатели, характеризующие цитолитический синдром, оставались в пределах нормы, тогда как в контроле (группа 1) эти показатели оставались повышенными в течение 90 суток. Это объясняет 25% летальность на исследуемом сроке в контрольной группе.

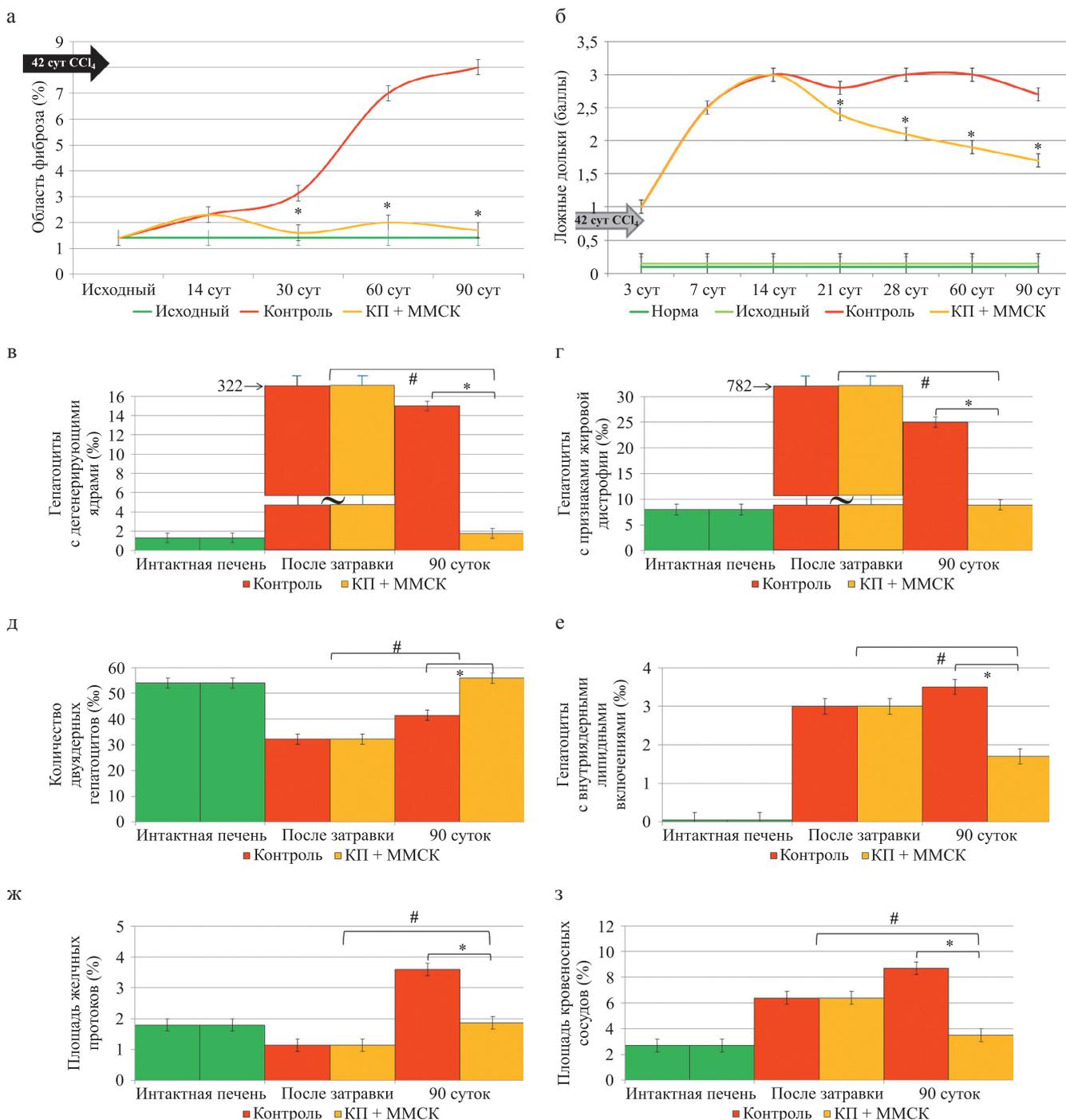


Рис. 4. Динамическая морфометрическая оценка состояния непаренхиматозных структур при моделировании ХПН без и с имплантацией КИК на сроке 90 суток: а – изменение удельной площади соединительной ткани (%), у интактных животных среднее значение показателя удельной площади соединительной ткани составляло 1,4%; б – изменение количества ложных долек в печени; в–з – динамическая морфометрическая оценка состояния характеристик гепатоцитов печени крыс, желчных протоков и кровеносных сосудов при моделировании ХПН без и с имплантацией КИК на сроке 90 суток. 1-я группа – контроль (физиоствор); 2-я группа – применение КИК с аллогенными КП: ММСК КМ = 5 : 1. * – различие достоверно по сравнению с уровнем показателя в печени крыс в контроле (1-я группа), $p < 0,05$; # – различие достоверно по сравнению с уровнем показателя в печени крыс в период после затравки, $p < 0,05$

Fig. 4. Dynamic morphometric assessment of the state of nonparenchymal structures in CLD simulation without and with CEC implantation at day 90: а – change in the specific area of the connective tissue (%). In intact animals, the average value of the specific area of the connective tissue was 1.4%; б – change in the number of false lobules in the liver; в–з – dynamic morphometric assessment of the characteristics of rat liver hepatocytes, bile ducts and blood vessels in CLD simulation without and with CEC implantation at day 90. Group 1 – control (saline); group 2 – CEC with allogeneic LCs : BM-MSCs = 5 : 1. * – the difference is significant compared to the level of this indicator in the liver of control rats (group 1); $p < 0.05$; # – the difference is significant in comparison with the level this indicator in the liver of rats after inoculation, $p < 0.05$

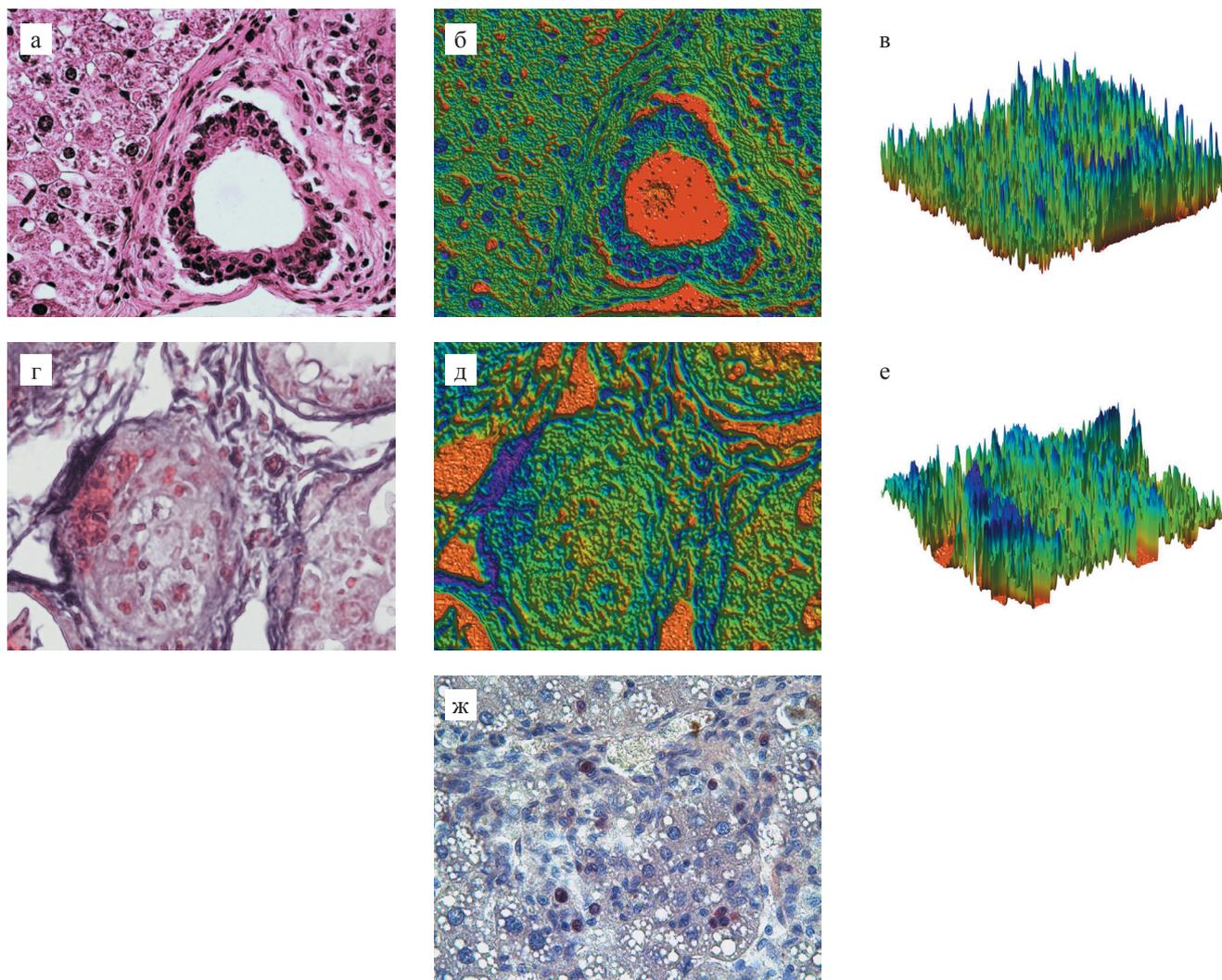


Рис. 5. Гистологическая структура КИК печени с аллогенными КП и ММСК КМ (2-я группа) на сроке 90 суток: а – пересаженные гепатоциты в составе КИК, окраска гематоксилином-эозином. $\times 400$; б, в – выявлены структурно развивающиеся нормальные гепатоциты, встречаются гипертрофические гепатоциты, ограниченные фиброзной соединительно-тканной капсулой, форма и соотношение ядер и цитоплазмы смещаются к нормальным параметрам гепатоцитов, на изображениях после псевдоокрашивания клеточная цитоплазма – зеленый цвет, ядра – синий цвет с фиолетовыми включениями, в более темных тонах ядра гепатоцитов в клеточно-инженерной конструкции, просвет псевдоокрашен красным; г – пересаженные гепатоциты в составе КИК, окраска гематоксилином-эозином. $\times 400$; д, е – после разрушения соединительно-тканной капсулы нормальные гепатоциты распространяются на соседние участки и замещают дистрофические гепатоциты, волокнистая соединительно-тканная капсула распадается, и рядом с ее первичной границей располагаются нормальные гепатоциты, на изображениях после псевдоокрашивания (д, е) нормальные гепатоциты: клеточная цитоплазма зеленого цвета, синие ядра, более темные ядра фиолетового цвета в клеточно-инженерной конструкции, просветы – красного цвета; ж – специфически PCNA-положительные клетки – светло-коричневые с темно-коричневыми ядрами, гепатоциты – оксифильные цитоплазмы и базофильные ядра, окрашивание PCNA по стандартным протоколам с дополнительным окрашиванием гематоксилином-эозином. $\times 100$

Fig. 5. Histological structure of hepatic CECs with allogeneic LCs and BM-MSCs (group 2) at day 90: a – transplanted hepatocytes as a part of CECs. H&E staining ($400\times$ magnification); б, в – there are structurally developing normal hepatocytes, hypertrophic hepatocytes, limited by fibrous connective tissue capsule, the shape and nuclear-cytoplasmic shifted to normal hepatocyte parameters. On the images after pseudo-coloring, the cell cytoplasm is green, nuclei are blue with purple inclusions, hepatocyte nuclei are in darker tones in a cell-engineered construct, the lumen is pseudo-stained red; г – transplanted hepatocytes as part of CECs. H&E staining ($400\times$ magnification); д, е – after destruction of the connective-tissue capsule, normal hepatocytes spread to neighboring areas and replace dystrophic hepatocytes. The fibrous connective tissue capsule disintegrates, and normal hepatocytes are located near its primary border. Images after pseudo-staining (д, е) show normal hepatocytes: cell cytoplasm is green, nuclei are blue, darker nuclei are purple in the cell-engineered construct, lumen is red; ж, specifically PCNA-positive cells – light brown with dark brown nuclei, hepatocytes – oxyphilic cytoplasm and basophilic nuclei, PCNA staining by standard protocols with additional H&E staining ($100\times$ magnification)

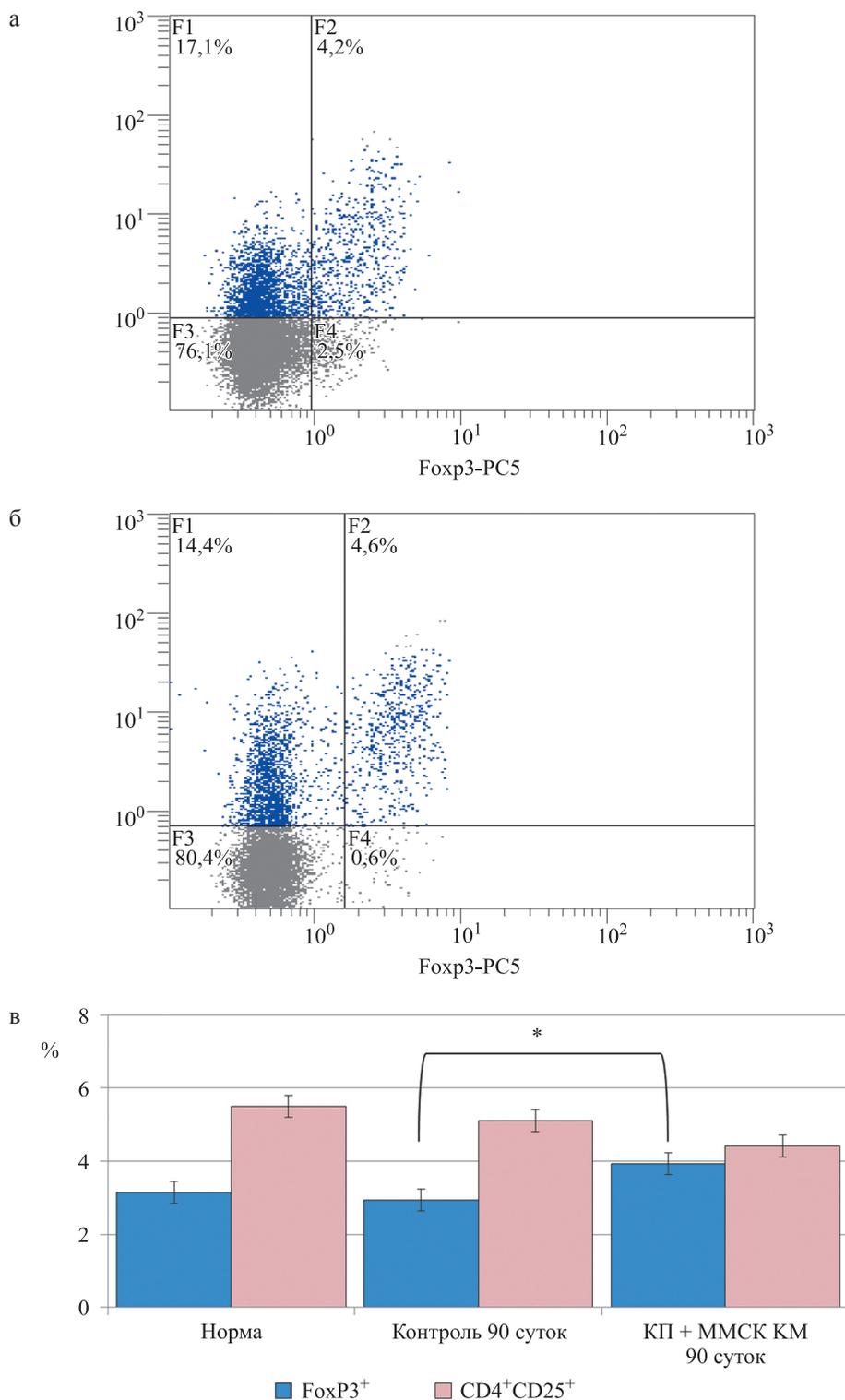


Рис. 6. Содержание CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ Т-регуляторных клеток в периферической крови крыс: а – норма; б – через 90 суток после моделирования ХПН и имплантации КИК, содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, опыты без иммуносупрессии, проточная цитофлуометрия; в – графическое изображение концентрации Т-лимфоцитов, содержащих маркеры CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ в периферической крови здоровых, контрольных крыс после моделирования ХПН и имплантации КИК, содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, в экспериментах через 90 суток без иммуносупрессии (%), проточная цитофлуометрия. * – p < 0,05 по отношению к норме

Fig. 6. Levels of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells in the peripheral blood of rats: a – normal; б – day 90 after CLD modeling and implantation of CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs, experiments without immunosuppression. Flow cytometry; в – graphical representation of levels of T lymphocytes containing CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺ markers in peripheral blood of healthy, control rats after CLD modeling and implantation of CECs containing allogeneic LCs and BM-MSCs, in experiments at day 90 without immunosuppression (%). Flow cytometry. * – p < 0.05 versus norm

Таким образом, быстрый темп нормализации ферментов цитолитического синдрома, гистологической структуры поврежденной ткани печени, большая выраженность снижения удельной площади соединительной ткани, а также сниженное количество гепатоцитов с жировой дистрофией и дегенерирующими ядрами в ткани печени крыс через 90 суток после окончания моделирования ХПН и использования КИК в экспериментальной группе позволяют констатировать, что имплантируемые КИК, изготовленные на основе rS1/9, в состав которых включены аллогенные КП и ММСК КМ в отношении 5 : 1, эффективно модулируют регенерационные процессы в ткани поврежденной печени, и это, очевидно, обусловлено длительно сохраняющимся морфофункциональным гомеостазом в новообразованной гепатоподобной структуре самих КИК, которая формируется и поддерживается после имплантации КИК факторами, продуцируемыми поврежденной печенью в организм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение возможности эффективной коррекции морфофункциональных нарушений в печени при моделировании ХПН с помощью КИК, имплантируемых в ткань печени, показало, что КИК, изготовленные на основе микрогеля rS1/9 и содержащие аллогенные КП и ММСК КМ в соотношении 5 : 1, способствуют активации регенерационных процессов в поврежденной печени и восстановлению ее функционального и морфологического состояния: развивается быстрая нормализация уровня цитолитических ферментов в крови, пролиферация гепатоцитов и снижение площади соединительной ткани в печени). Было установлено также, что на протяжении всего срока наблюдения в структурах имплантированных КИК отмечалось сохранение морфофункционального гомеостаза КП, включенных в их состав. Результаты проведенных исследований позволяют выдвинуть предположение, что клетки, включенные в состав КИК, становятся центрами формирования новообразованной и длительно функционирующей гепатоподобной ткани, которая, продуцируя биорегуляторные факторы, активировать и поддерживает восстановительные процессы в поврежденной печени. Полученные результаты позволили также выдвинуть предположение, что длительное выживание и функционирование аллогенных КП в имплантируемых КИК обусловлено участием ММСК КМ и rS1/9, содержащихся в их составе, в поддержании иммунной толерантности организма, за счет которой КИК интегрируются в поврежденную печень и симбиотически поддерживают друг друга.

Наши исследования показали, что имплантация КИК в поврежденную печень создает новые многочисленные центры активации восстановительных

процессов. Эти центры были выявлены гистологически и проведенным трехмерным анализом структурных изменений в ткани печени и в КИК; выявляемые позитивные структурные изменения в печени оказались отчетливо заметны в гистологических препаратах и были также идентифицированы различным цветным окрашиванием структурных элементов печени в 2D- и 3D-изображениях.

Результаты проведенных исследований позволяют нам заключить, что имплантация КИК, созданных на основе микрогеля rS1/9 и содержащих аллогенные КП и ММСК КМ, может стать эффективным методом коррекции и лечения ХПН, а также поддержания функции поврежденной печени у больных, находящихся в листе ожидания на трансплантацию печени.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-1357.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантология и искусственные органы: учебник / Под ред. акад. РАН С.В. Готье. М.: Лаборатория знаний, 2018; 319. *Transplantologija i iskusstvennye organy: uchebnik / Pod red. akad. RAN S.V. Gautier. M.: Laboratorija znaniy, 2018; 319.*
2. Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА, 2008; 246. *Gautier SV, Konstantinov BA, Cirul'nikova OM. Transplantacija pecheni. M.: MIA, 2008; 246.*
3. Mokdad A, Lopez A, Shahraz S, Lozano R, Mokdad A, Stanaway J et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC. Med.* 2014; 12: 145. doi: 10.1186/s12916-014-0145-y.
4. World health statistics 2021: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342703>.
5. www.eurotransplant.nl/files/statistics.
6. Atala A. Building Organs for the Future. *Transplantation.* 2016; 100: 1595–15956. doi: 10.1097/TP.0000000000001301.
7. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований биомедицинских клеточных продуктов / Под ред. акад. В.А. Ткачука. М.: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2017; 256. *Metodicheskie rekomendacii po provedeniju doklinicheskikh issledovanij biomedicinskih kletochnyh produktov / Pod red. akad. V.A. Tkachuka. M.: Moskovskij gosudarstvennyj universitet imeni M.V. Lomonosova, 2017; 256.*
8. Шагидулин МЮ. Разработка и экспериментальное исследование клеточно-инженерных конструкций

- печени для лечения печеночной недостаточности: дис. ... докт. мед. наук. М., 2015; 257. *Shagidulin MJu*. Razrabotka i jeksperimental'noe issledovanie kletочно-inzhenernyh konstrukcij pečeni dlja lečenija pečenočnoj nedostatočnosti. [Dissertation]. М., 2015; 257.
9. *Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI et al*. A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009; 4 (1): 17–27. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.013.
 10. *Debabov V, Bogush V*. Recombinant Spidroins as the Basis for New Materials. *ACS Biomater Sci Eng*. 2020; 6: 3745–3761. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00109>.
 11. *Nosenko MA, Moysenovich AM, Zvartsev RV, Arkhipova AY, Zhdanova AS, Agapov II et al*. Novel Biodegradable Polymeric Microparticles Facilitate Scarless Wound Healing by Promoting Re-epithelialization and Inhibiting Fibrosis. *Front Immunol*. 2018; 9: 2851. doi: 10.3389/fimmu.2018.02851. eCollection 2018.
 12. *Готье СВ, Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ, Севастьянов ВИ*. Способ и трансплантат для лечения печеночной недостаточности. Патент № 2010110063/14(014141). 03.03.2011. *Gautier SV, Shagidulin MJu, Onishhenko NA, Krashe-ninnikov ME, Sevast'janov VI*. Sposob i transplantat dlja lečenija pečenočnoj nedostatočnosti. Patent № 2010110063/14(014141). 03.03.2011.
 13. *Автандилов ГГ*. Медицинская морфометрия: руководство. М.: Медицина, 1990; 384. *Avtandi-lov GG*. Medicinskaja morfometrija: rukovodstvo. М.: Medicina, 1990; 384.
 14. *Ishak K et al*. Гистологическая оценка стадии и степени хронического гепатита. *Клиническая гепатология*. 2010; 2: 8–11. *Ishak K et al*. Gistologičeskaja ocenka stadii i stepeni hroničeskogo gepatita. *Kliničeskaja gepatologija*. 2010; 2: 8–11.
 15. *Pradhan P, Guo S, Ryabchikov O, Popp J, Bocklitz TW*. Deep learning a boon for biophotonics? *J Biophotonics*. 2020; 13: e201960186. <https://doi.org/10.1002/jbio.201960186>.
 16. *Rivenson Y, Wang H, Wei Z et al*. Virtual histological staining of unlabelled tissue-autofluorescence images via deep learning. *Nat Biomed Eng*. 2019; 3: 466–477. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0362-y>.
 17. *Macenko M, Niethammer M, Marron JS, Borland D, Woosley JT, Guan X et al*. A method for normalizing histology slides for quantitative analysis. *2009 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*. 2009: 1107–1110. doi: 10.1109/ISBI.2009.5193250.
 18. *Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME et al*. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*. 2013; 87 (8): 1315–1530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5.

Статья поступила в редакцию 17.05.2022 г.
The article was submitted to the journal on 17.05.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-73-84

БИОСОВМЕСТИМЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ МЕЛКОДИСПЕРСНОЙ 3D-МАТРИЦЫ ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ХРЯЦА СВИНЬИ

Е.А. Немец¹, А.Э. Лажко³, А.М. Григорьев¹, Ю.Б. Басок¹, А.Д. Кириллова¹,
В.И. Севастьянов^{1, 2}

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

² АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Российская Федерация

В отличие от децеллюляризации мягких тканей для использования их в качестве тканеспецифических матриц при создании тканеинженерных конструкций децеллюляризация хрящевой ткани требует привлечения нескольких методов обработки, что может отрицательно влиять на биосовместимые и функциональные свойства нативного внеклеточного матрикса. **Цель работы:** исследование биосовместимых и функциональных свойств тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из хряща свиньи, децеллюляризованного последовательной обработкой химическими, физическими и ферментативными методами. **Материалы и методы.** Для децеллюляризации микродисперсные частицы хряща (МЧХ), полученные методом криопомола, инкубировали в растворах детергентов (додецилсульфат натрия и Triton X-100) с последующей обработкой сверхкритическим диоксидом углерода (ск-СО₂) с добавлением этанола (10% по объему) и ДНКазой I типа. Для определения генотоксичности децеллюляризованных МЧХ (ДМЧХ) использовали мутационный тест Эймса на *Salmonella typhimurium*. Местное и общетоксическое действие, а также резорбцию ДМЧХ исследовали *in vivo* на половозрелых аутбредных крысах. Образцы ДМЧХ (10 мг) имплантировали в мышечную ткань бедра. Жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч) при культивировании на ДМЧХ анализировали методом прижизненной микроскопии с окрашиванием флуоресцентным красителем Calcein AM. Метаболическую активность клеток оценивали с использованием PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. **Результаты.** Доказано, что имплантированные в мышцу крысы ДМЧХ свиньи после обработки ск-СО₂ не оказывают местного и общетоксического действия, не проявляют генотоксичности и отрицательного действия на репродуктивную систему животных. После 6 месяцев эксперимента *in vivo* резорбируется большая часть (87%) имплантированного децеллюляризованного хряща. Показали, что полученные матрицы способны поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч. **Заключение.** Образцы ДМЧХ свиньи соответствуют требованиям, предъявляемым к биосовместимым медицинским изделиям по показателям местного и общетоксического действия, гено- и репродуктивной токсичности, и могут быть рекомендованы в качестве матрицы при создании клеточно- и тканеинженерных конструкций хрящевой ткани.

Ключевые слова: суставной хрящ, децеллюляризация, 3D-матрица, резорбция, биосовместимость, МСК жировой ткани, адгезия, пролиферация, тканеинженерная конструкция.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

Corresponding author: Evgenij Nemets. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (903) 579-23-79. E-mail: evgnemets@yandex.ru

BIOCOMPATIBLE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF A MICRODISPERSED TISSUE-SPECIFIC 3D MATRIX FROM DECELLULARIZED PORCINE CARTILAGE

E.A. Nemets¹, A.E. Lazhko³, A.M. Grigoriev¹, Yu.B. Basok¹, A.D. Kirillova¹, V.I. Sevastianov^{1, 2}

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

² Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russian Federation

³ Moscow State University, Moscow, Russian Federation

In contrast to decellularization of soft tissues for use as tissue-specific matrices in the creation of tissue-engineered constructs, decellularization of cartilage tissue requires several processing techniques, which can negatively affect the biocompatibility and functional properties of the native extracellular matrix (ECM). **Objective:** to study the biocompatible and functional properties of microdispersed tissue-specific 3D matrix from a porcine cartilage that is decellularized by sequential use of chemical, physical and enzymatic techniques. **Materials and methods.** For decellularization, microdispersed cartilage particles (MCPs), obtained by cryomilling, were incubated in detergent solutions (sodium dodecyl sulfate and Triton X-100), then treated with supercritical carbon dioxide (scCO₂) with 10% ethanol and DNase I. The Ames test (*Salmonella typhimurium* reverse mutation assay) was used to determine the genotoxicity of decellularized microdispersed cartilage particles (dMCPs). Local and general toxic effects, as well as resorption of dMCPs were studied *in vivo* on sexually mature outbred rats. Decellularized MCP specimens (10 mg) were implanted into the thigh muscle tissue. Viability of human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells (hAdMSCs), when cultured on dMCPs, was analyzed by *in vivo* microscopy, stained with fluorescent Calcein AM dye. Cell metabolic activity was assessed using PrestoBlue™ Cell Viability Reagent. **Results.** It has been proven that porcine dMCPs implanted in rat muscle after treatment with scCO₂ do not exhibit local and general toxic effects, and do not show genotoxicity and negative effects on the reproductive system of animals. After 6 months of *in vivo* experiment, most (87%) of the implanted decellularized cartilage was resorbed. It was shown that the resulting matrices are able to support adhesion and proliferation of hAdMSCs. **Conclusion.** Porcine dMCP specimens are suitable for biocompatible medical products in terms of local and general toxic effects, genotoxicity and reproductive toxicity, and can be used as a matrix for creating cell- and tissue-engineered cartilage constructs.

Keywords: articular cartilage, decellularization, 3D matrix, resorption, biocompatibility, adipose-derived MSCs, adhesion, proliferation, tissue-engineered construct.

ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени для создания биомедицинских продуктов для технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины разработан ряд биосовместимых 3D-матриц (*синонимы:* матриксы, каркасы, носители) из резорбируемых синтетических [1, 2] и природных полимеров [1, 3, 4], в той или иной степени моделирующих свойства естественного внеклеточного матрикса (ВКМ). Однако 3D-матрицы из полимерных материалов не обладают тканеспецифическими свойствами, характерными для ВКМ, способного выполнять не только функции каркаса, но и избирательно поддерживать процессы адгезии, пролиферации и дифференцировки клеток конкретной ткани или органа [5]. В связи с этим наблюдается большой интерес к 3D-матрицам из децеллюляризованных аллогенных или ксеногенных тканей [6–8]. Основная проблема технологии децеллюляризации состоит в необходимости максимально полного удаления клеточного материала с наиболее возможной

степенью сохранения морфологии, состава, биохимических и механических свойств нативного ВКМ. В связи с тем что на полноту децеллюляризации оказывают влияние множество факторов, таких как вид донора, размеры и целостность органа, вид ткани, ее структура и плотность и др., не может быть универсального протокола децеллюляризации [9, 10]. К настоящему времени разработан широкий спектр протоколов децеллюляризации с использованием физических, химических, ферментативных методов обработки и их комбинации [11–13].

Среди физических методов перспективным представляется применение сверхкритических флюидов, характеризующихся нулевым поверхностным натяжением, пониженной вязкостью, повышенной растворяющей способностью и способностью глубоко проникать в объем материалов [14–16]. Наибольший интерес представляет сверхкритический диоксид углерода (ск-CO₂) [17], критическая точка которого достигается при достаточно низкой температуре

(31,1 °C), а также благодаря легкости его удаления простым сбросом давления после обработки и нетоксичности. Одновременно может происходить экстракция растворимых в ск-СО₂ токсичных соединений, что приводит к повышению биосовместимых свойств полученных материалов, децеллюляризованных с применением цитотоксичных детергентов [18]. Так как ск-СО₂ является не полярным соединением, для повышения эффективности обработку проводят в присутствии полярного агента, например, этанола. Добавление этанола позволяет повысить как эффективность децеллюляризации тканей с высокой плотностью [19, 20], так и сохранность таких важных компонентов ВКМ, как коллагены, гликозаминогликаны, адгезивные белки (фибронектин, ламинин и другие) и ангиогенные факторы [21].

Высокая плотность хряща усложняет достижение полноты децеллюляризации, затрудняя диффузию поверхностно-активных веществ и выведение клеточного детрита. В предыдущих работах было показано, что для достижения полноты децеллюляризации хрящевой ткани необходимо использовать протокол, включающий как химические (обработка поверхностно-активными веществами), так и физические (сверхкритические флюиды, циклическое замораживание—оттаивание) методы обработки или ферментативные (обработка ДНКазой, РНКазой) методы воздействия на ткань [22, 23].

Целью данной работы было исследовать биосовместимые и матриксные свойства мелкодисперсной 3D-матрицы из хряща свиньи, децеллюляризованного последовательной обработкой химическими, физическими и ферментативными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бедренные и коленные свиные суставы 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 хрящ срезали с суставных поверхностей скальпелем, нарезали фрагментами размером 0,5 × 0,5 × 0,1 см, замораживали при –80 °C и хранили при этой температуре до момента начала криопомола.

Микродисперсные частицы хряща (МЧХ) получали в криомельнице CryoMill (Retch GmbH, Германия). Помол производили в условиях постоянного контакта размольного стакана с жидким азотом при частоте 25 Гц в течение 4 минут. Фракция частиц с размерами 30–100 мкм была выделена с применением сит с соответствующим размером ячеек.

Децеллюляризацию МЧХ проводили согласно ранее разработанной методике [22]. МЧХ обрабатывали при комнатной температуре и периодическом перемешивании на магнитной мешалке (3 раза в сутки, 1 час, 200 об/мин) в трех сменах фосфат-

но-солевого буфера (ФСБ) (рН = 7,4), содержащего натриевую соль додецилсульфат натрия (SDS) и повышающую концентрацию Тритона X-100 (1, 2 и 3% соответственно).

Затем МЧХ тщательно отмывали от остатков детергентов в трех сменах ФСБ, содержащего антибиотик (ампициллин, 20 мкг/мл) и антимикотик (амфотерицин В, 2 мкг/мл), в течение 72 часов при комнатной температуре.

На втором этапе МЧХ обрабатывали в атмосфере ск-СО₂ на установке Speed SFE (Applied Separations, США) при давлении 300 Бар, температуре +35 °C, скорости потока ск-СО₂ 2,5 ± 0,5 мл/мин в течение 8–24 часов. Этанол в концентрации 10% по объему был использован в качестве модификатора полярности.

Для повышения эффективности удаления ДНК из МЧХ свиньи использовали ДНКазу I типа (New England Biolabs Inc., США) в концентрации 50 Е/мл в 10 ммоль Трис-НСl буферном растворе (рН 7,6), содержащем 2,5 ммоль MgCl₂, 0,5 ммоль CaCl₂. Время обработки при температуре 37 °C составляло 48 часов.

Образцы децеллюляризованных МЧХ (ДМЧХ) стерилизовали γ -излучением в дозе 1,5 Мрад.

Перед исследованием образцы ДМЧХ хранили при температуре –20 °C.

Определение содержания ДНК

Выделение ДНК из образцов МЧХ (n = 3) и ДМЧХ (n = 3) массой 25 мг проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Для определения абсолютного количества ДНК использовали калибровочную кривую ДНК бактериофага λ (Invitrogen, США) (0–1000 нг/мл).

Сканирующая электронная микроскопия поверхности образцов

Образцы микродисперсных частиц хряща МЧХ и ДМЧХ обезвоживали в растворах этилового спирта возрастающих концентраций по схеме: 50% спирт – 3 мин, 50% спирт – 3 мин, 70% спирт – 3 мин, 90% спирт – 6 мин, 96% спирт – 6 мин; сушили на воздухе и наклеивали на столики для электронной микроскопии с помощью двустороннего скотча.

Токопроводящее покрытие получали методом ионного напыления золота в течение 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА на установке JFC-1600 (JEOL, Япония). Исследование морфологии МЧХ осуществляли с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6360LA (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 5 кВ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСОВМЕСТИМЫХ СВОЙСТВ ДМЧХ

А. Исследования *in vitro*

Генотоксичность

Так как в процессе децеллюляризации используются потенциально генотоксичные вещества (детергенты) и не удается полностью удалить ДНК из МЧХ, не исключено, что при клиническом применении децеллюляризованного хряща в составе он может влиять на генетический материал пациента.

Генотоксичность образцов ДМЧХ оценивали мутационным тестом Эймса на *Salmonella typhimurium*, представляющим собой бактериальную тест-систему для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии тестируемых образцов и(или) их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.

Использовали набор индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*, полученный из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП «ГосНИИгенетика», имеющих соответствующие сертификаты.

Для приготовления вытяжки 25 мг ДМЧХ выдерживали 3 суток при температуре 37 °С в 1 мл стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Испытывали пять концентраций вытяжки: исходный раствор и четыре последовательные 5-кратные разведения в 0,9% растворе натрия хлорида. Эксперимент сопровождался положительными контролями, в качестве которых использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров.

Для метаболической активации была использована фракция S9 печени самцов крыс Wistar, которым за 5 дней до забоя вводили индуктор микросомальных ферментов Совол, 300 мг/кг, однократно внутривентриально.

После инкубации в течение 48 часов у групп индикаторных штаммов подсчитывали количество ревертантных колоний. Средние значения по показателю «количество ревертантных колоний» для групп, обработанных препаратом, сравнивали одновременно с соответствующими группами негативного контроля.

Если вещество и(или) его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium*. Мутагенный эффект в соответствии с общепринятыми подходами считали значимым, если среднее количество колоний ревертантов на чашку в опытном варианте превышало таковое в контрольном варианте в 2 и более раз.

Б. Исследования *in vivo* репродуктивной токсичности, местного и общетоксического действия

Эксперименты проводили на половозрелых аутбредных крысах. Содержание и все манипуляции с животными выполняли согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986), а также в соответствии с ГОСТ 33216-2014 Межгосударственный стандарт «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Репродуктивная токсичность

В случае когда генотоксический эффект действует не только на соматические, но и на половые клетки, изменения могут стать наследственными. Для исследования влияния на генеративную функцию и эмбриотоксическое действие в антенатальном и постнатальном периодах развития генотоксического эффекта на половые клетки была изучена репродуктивная токсичность ДМЧХ.

Животных распределяли на группы по 6 самцов и 12 самок в группе: контрольные самцы, контрольные самки, самцы с образцами ДМЧХ и самки с образцами ДМЧХ. Контролем служили ложнопериорированные крысы.

Через 14 дней после имплантации самцов и самок ссаживали в соотношении 1 : 2 (один самец и 2 самки) на срок 14 суток. Каждое утро у самок брали вагинальные мазки и определяли в них наличие сперматозоидов. При обнаружении сперматозоидов крысу взвешивали, отсаживали в отдельную клетку и начинали отсчет срока беременности, считая день обнаружения сперматозоидов первым днем беременности.

В течение исследования проводили общее клиническое наблюдение, определяли массу тела, потребление корма и воды.

Часть беременных самок подвергали эвтаназии на 20-е сутки беременности, плоды осматривали, взвешивали и измеряли кранио-каудальный размер. Подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантаций и количество живых и погибших плодов. На основании полученных данных определяли уровень пред- и постимплантационной смертности плодов. Другую половину самок оставляли до родов для наблюдения за развитием потомства в течение 5 суток. По окончании исследования взрослых животных подвергали эвтаназии. После регистрации смерти у самок удаляли яичники, у самцов семенники и придатки семенников. Органы репродуктивной системы животных изучали макроскопически.

чески на наличие аномальных или патологических изменений, взвешивали на весах VIBRA AJ-1200CE (ShinkoDenshiCo., Ltd, Япония) с дальнейшим расчетом относительной массы органов (процентное отношение массы органа к массе тела животного). Яичники и семенники фиксировали в 10–15% нейтральном формалине. После фиксации на гистопроцессоре TLP-144 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) проводили гистологическую проводку. Затем на станции заливки ESD-2800 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) готовили парафиновые блоки. Далее с помощью ротационного микротомы RMD-4000 (ООО «МедТехникаПоинт», Россия) получали срезы толщиной 3–4 мкм, которые наклеивали на предметное стекло, депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью микроскопа биологического Leica DM1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Местное и общетоксическое действие

Имплантиацию образца (навеску 10 мг) в мышечную ткань бедра животных выполняли в стерильных условиях под действием анестетика Золетил 100 (Вирбак, Франция) в дозе 15 мг/кг. Контролем служили ложноперированные животные, которым проводили операцию без имплантации образцов.

Для изучения местного действия через 28 суток, 2, 3, и 6 месяцев после имплантации образцов ДМЧХ животных подвергали эвтаназии ингаляцией двуокси углерода. Результаты оценивали макроскопически и с помощью гистологических методов исследования. По результатам полуколичественной оценки [24] определяли класс реактивности исследуемого материала по сравнению с контрольным образцом (в баллах): отсутствие реакции или минимальная (от 0,0 до 2,9); легкая реакция (от 3,0 до 8,9); умеренная реакция (от 9,0 до 15,0); серьезная реакция (15,1 и более).

Общетоксическое действие исследовали на сроке до 2 месяцев имплантации одновременно с оценкой их местного действия. Анализ состояния животных включал в себя: выживаемость и внешний вид, массу, поведение (возбудимость, агрессивность), реакцию на внешние раздражители, болевую реакцию, потребление корма и воды. Через 2 месяца у животных забирали кровь для клинического (гематологический анализатор Mindray BC-2800-vet (Mindray, Китай) и биохимического (биохимический фотометр «Стат факс 4500+» (Awareness Technology Inc., США) исследований и мочу (URISCAN Optima, YD Diagnostics Corporation, Корея). Забирали и взвешивали следующие органы: сердце, легкие, тимус, печень, селезенку, почки и головной мозг. Взвешивание органов животных осуществляли с помощью весов

Shinko, AJ-1200CE (Shinko Denshi Co., Ltd, Япония). Окрашенные гематоксилином-эозином гистологические препараты сердца, легких, тимуса, печени, селезенки, кишечника, почки, головного мозга и региональных лимфатических узлов исследовали с помощью микроскопа биологического LeicaDM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Степень резорбции имплантированных образцов определяли морфометрически при помощи компьютерной морфометрической программы LAS Interactive Measurement Module.

Вырезанные участки органов и тканей фиксировали в 10–15% растворе нейтрального формалина с последующей заливкой в парафин. Готовили срезы толщиной 5–7 мкм. Гистологические препараты исследовали методом световой микроскопии с помощью микроскопа биологического LeicaDM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия).

Исследование способности ДМЧХ поддерживать адгезию и пролиферацию клеток (функциональные свойства)

Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека (МСК ЖТч) 3-го пассажа выделяли и культивировали в полной ростовой среде (ПРС) по стандартной методике [25].

Эксперименты с адгезией и пролиферацией проводили с применением культуры мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК ЖТч). Данные клетки способны дифференцироваться в хондрогенном направлении с последующим образованием хрящевой ткани. Для исключения возможности клеточного роста вне поверхности матрикса эксперимент проводили в полипропиленовых пробирках. 5 мг ДМЧХ в асептических условиях помещали в стерильные пробирки, добавляли ПРС и инкубировали 24 ч при температуре +37 °С для насыщения средой. Через сутки готовили клеточную суспензию МСК ЖТч с концентрацией 500 000 клеток/мл, из пробирок удаляли излишки среды и добавляли в каждую пробирку по 1 мл клеточной суспензии. Пробирки помещали в штатив и встряхивали на лабораторном шейкере MultiBio 3D (Biosan, Латвия) в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего пробирки помещали в CO₂-инкубатор и культивировали при температуре +37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 ± 1% CO₂.

Для оценки взаимодействия клеток и образцов ДМЧХ методами прижизненной микроскопии использовали окрашивание флуоресцентными красителями системы Calcein AM (Thermo Fisher Scientific, США).

Определение метаболической активности клеток проводили с помощью теста с реактивом PrestoBlue™

(Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Спектрофотометрический анализ выполняли на планшетном ридере Tecan Spark 10M (Tecan Trading AG, Швейцария). Количество клеток определяли согласно построенной калибровочной кривой.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010. Вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистическую достоверность различий оценивали по t -критерию Стьюдента. Достоверным считали различие данных групп при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате децеллюляризации количество ДНК снижается с 367 ± 53 нг/мг до 7 ± 1 нг/мг ткани, что составляет менее 2% от исходного значения и свидетельствует о высокой эффективности процесса децеллюляризации [26]. При этом в морфологии поверхности нативного и децеллюляризованного хряща наблюдаются значимые различия (рис. 1).

Структура поверхности исходной хрящевой ткани гладкая (рис. 1). Определяются клеточные лакуны, характерные для ткани суставного хряща, в которых визуализировались очертания клеток. В случае децеллюляризованного хряща наблюдается отсутствие клеток в лакунах на поверхности микрочастиц, что также свидетельствует об эффективности обработки.

Генотоксичность

Количество колоний ревертантов в контроле (растворитель) было в пределах колебаний спонтанно-

го уровня для данных штаммов. Ответ штаммов на стандартные мутагены был в пределах обычных уровней.

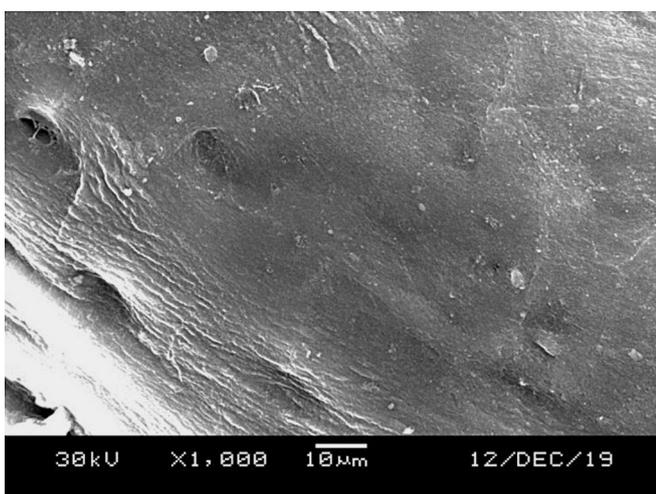
Децеллюляризованные тканеспецифические матриксы из МЧХ свиньи в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5 и 25 мг/мл не индуцируют генные мутации у тестовых штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98 и TA 97 без системы метаболической активации и в ее присутствии. Во всех вариантах эксперимента кратность превышения среднего числа колоний ревертантов на чашку в опытах над таковым в контроле была менее 2 раз.

Таким образом, экспериментальные образцы ДМЧХ свиньи, полученные в результате последовательной обработки детергентами и ск- CO_2 , не обладают генотоксичностью.

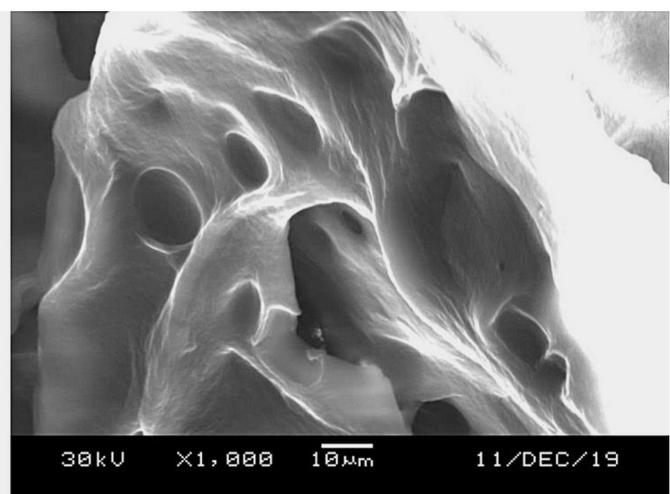
Местное действие

Заживление операционной раны у животных опытных и контрольной групп происходило первичным натяжением. Ни у одного животного не обнаружено явлений отторжения имплантатов, нагноения, расхождения швов и других послеоперационных осложнений. Вокруг всех образцов по периферии в окружающей мышечной ткани не отмечено некрозов, кровоизлияний, гранулем и выраженного отека. В области имплантации матриксов признаки воспаления отсутствовали. Признаков раздражения и воспаления тканей при макроскопическом исследовании не выявлено, рубцовой ткани не обнаружено.

Реакция тканей на оперативное вмешательство и последующую имплантацию образцов децеллюляризованного хряща свиньи протекала по обычной схеме, характерной для раневого процесса и реакции



Исходный хрящ



Децеллюляризованный хрящ

Рис. 1. Изменение структуры микрочастиц хряща свиньи в результате децеллюляризации

Fig. 1. Changes in the structure of porcine cartilage microparticles as a result of decellularization

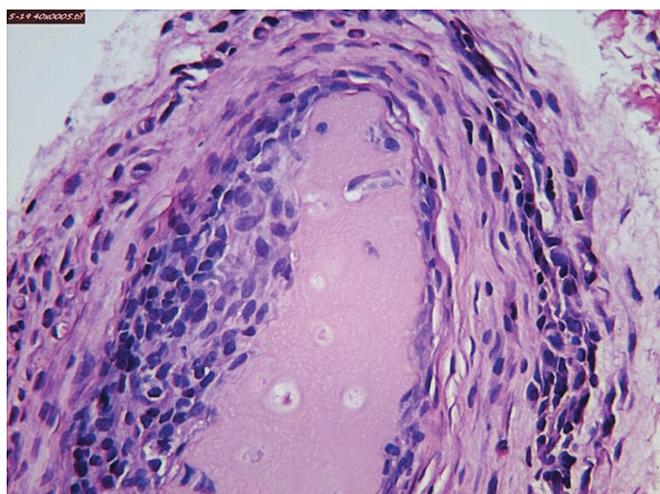
на инородное тело, включая стадии травматического воспаления и образование соединительной ткани.

Микроскопическая картина на 28-е сутки имплантации образцов ДМЧХ (рис. 2) характеризовалась наличием тонкой капсулы вокруг имплантата, состоящей из плотной волокнистой соединительной ткани. Прорастания соединительной ткани в имплантаты не отмечено. По периферии в окружающей фиброзно-мышечной ткани некрозов, кровоизлияний, лимфогистиоцитарной инфильтрации и отека не наблюдали. В капсуле и окружающих тканях отмечалась лимфомакрофагальная инфильтрация, а также наличие единичных гигантских клеток, что свидетельствует о начальных стадиях резорбции. Среди клеток соединительной ткани преобладали клетки фибробластического ряда: мезенхимные клетки, фибробласты, фиброциты. В окружающих тканях

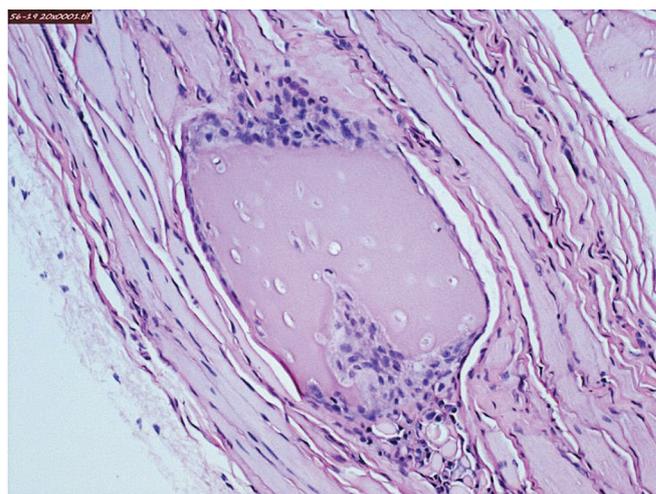
обнаруживалось небольшое количество нейтрофилов. Отмечался скудный васкулярный рисунок.

На 28-е сутки после имплантации наблюдалась слабо выраженная резорбция образцов ДМЧХ. Средняя площадь одной имплантированной частицы ДМЧХ на группу животных составляла 13867 ± 964 мкм². Отчетливо выделялась центральная часть имплантата, не заселенная клетками. На периферии регистрировалась активная инфильтрация макрофагами.

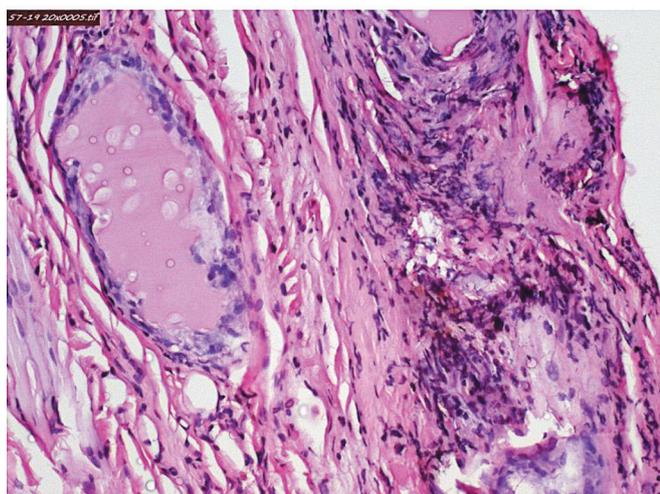
Спустя 2 месяца (рис. 2) место имплантации покрыто волосным покровом и визуально не определяется. Наблюдаются признаки регенерации в виде мышечно-соединительной ткани. Регенерат был представлен тонкими пучками коллагеновых волокон, инфильтрированных фибробластами и фиброцитами. В строме отмечено наличие мелких сосудов,



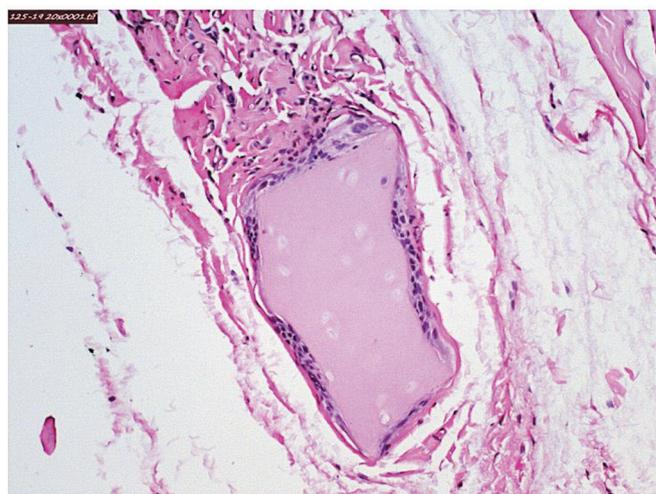
28-е сутки



2 месяца



3 месяца



6 месяцев

Рис. 2. Реакция тканей на имплантацию частиц децеллюляризованного хряща свиньи. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

Fig. 2. Tissue response to implantation of decellularized porcine cartilage particles. H&E staining. $\times 400$

миоцитов, образующих почки роста и тяжи новообразованных тонких мышечных волокон.

На сроке 3 месяца (рис. 2) имплантат представляет собой овал, капсула вокруг него отсутствует. Наблюдали интенсивную резорбцию матрикса макрофагами по периферии. В сравнении с 30 сутками имплантации материал резорбировался на ~44%. Средняя площадь имплантата составляла 7644 ± 155 мкм². Структура не подвергшегося резорбции ДМЧХ не была изменена. Наблюдали макрофагальную реакцию на периферии имплантата с присутствием лимфоцитов.

Через 6 месяцев после имплантации (рис. 2) вокруг образцов ДМЧХ формировалась тонкая капсула из коллагеновых волокон, что является показателем высокой биосовместимости. При этом количество активных макрофагов в тканях, примыкающих к имплантатам, по-прежнему оставалось на высоком уровне. На периферии имплантированных частиц, резорбированных на ~87% (средняя площадь имплантата составляла 1759 ± 1482 мкм²), наблюдали образование зрелой соединительной ткани в виде пучков коллагеновых волокон и прилегающих к ним фиброцитов.

Медленная резорбция может быть связана с высокой плотностью хрящевой ткани, затрудняющей проникновение клеток и диффузию веществ в объем ДМЧХ. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ДМЧХ в качестве мат-

рицы при формировании *in vitro* и *in vivo* тканевого эквивалента хряща.

На рис. 3 приведены результаты полуколичественной оценки биологического действия имплантированных образцов. Местное действие ДМЧХ на окружающие ткани снижается в течение шести месяцев имплантации от уровня «легкая реакция» тканей (от 3,0 до 8,9 балла) до уровня «отсутствие реакции или минимальная» (0,0–2,9 балла). Заметим, что изменение характера реакции тканей на ДМЧХ происходит в течение времени резорбции основной массы имплантируемых частиц.

Таким образом, мелкодисперсные частицы децеллюляризованного хряща свиньи и продукты их резорбции не проявляют отрицательного биологического действия на прилегающие к имплантату ткани.

Общетоксическое действие

В течение 2 месяцев эксперимента животные контрольной и опытной групп были здоровыми. Ни у одной из крыс не было отмечено изменений внешнего вида и поведения в сторону угнетения или возбуждения. Масса тела крыс на протяжении эксперимента имела положительную динамику и не отличалась между группами.

Имплантация исследуемых образцов ДМЧХ не повлияла на гемопоэз в организме крыс. Достоверных различий средних показателей клинического

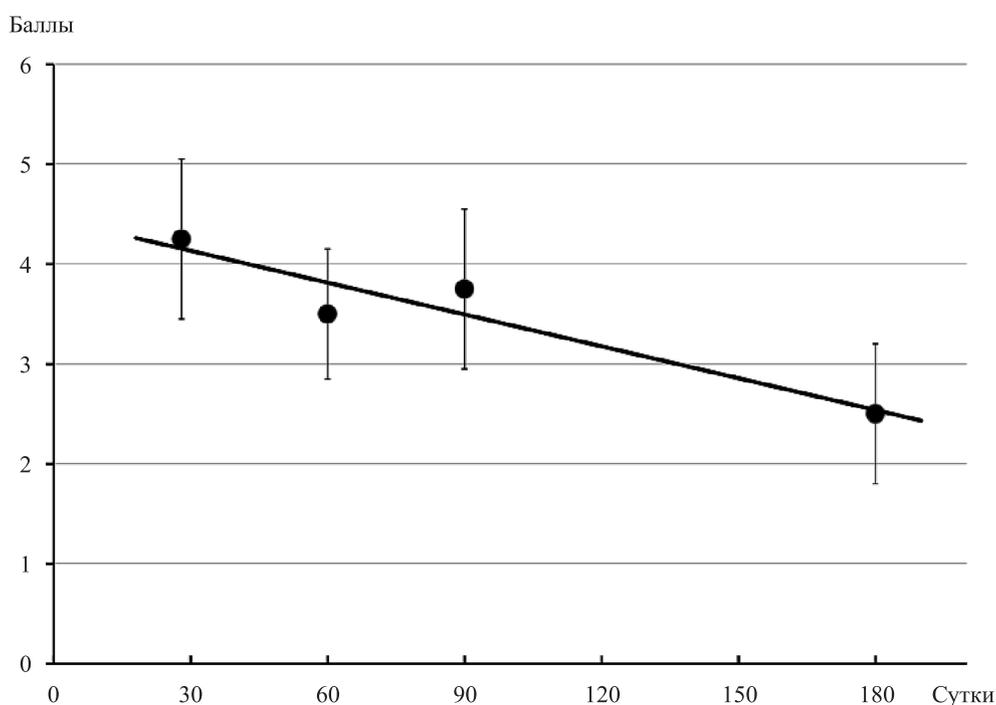


Рис. 3. Полуколичественная оценка реакции тканей на имплантацию частиц децеллюляризованного хряща свиньи

Fig. 3. Semi-quantitative assessment of tissue response to implantation of porcine decellularized cartilage particles

анализа крови крыс между животными контрольной и опытной групп не было.

Для выявления возможного повреждающего воздействия исследуемых образцов на печень, сердце и костную ткань в сыворотке крови животных определяли активность щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансфераз. Анализ полученных данных не выявил различий между группами в активности изучаемых ферментов и содержании общего билирубина, а также показателей белкового обмена в организме животных.

Введение исследуемых образцов крысам не повлияло на показатели мочи по сравнению с контрольной группой. Белок, глюкоза, билирубин, уробилиноген, нитриты, кетоновые тела, лейкоциты и аскорбиновая кислота в моче животных отсутствовали или находились ниже отметки первого значения, определяемого прибором Uriscan Optima как положительное.

При макроскопическом исследовании отчетливого влияния исследуемых образцов на состояние внутренних органов крыс не установлено. Различий между контрольной и опытной группами не обнаружено.

При гистологическом исследовании отчетливого влияния исследуемых образцов на состояние внутренних органов крыс не установлено. Не выявлено различий между контрольной и опытной группами.

Следовательно, образцы тканеспецифических матриц децеллюляризованного хряща свиньи не проявляют системного токсического действия на организм животных.

Репродуктивная токсичность

При наблюдении за половым поведением животных после ссаживания отмечено, что латентный пе-

риод и длительность половой активности у опытных самцов (с имплантированными образцами ДМЧХ) соответствовали контрольным самцам (ложнооперированные).

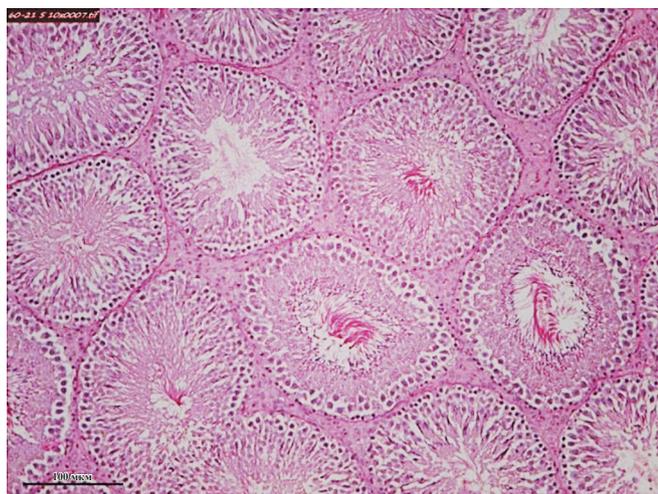
На протяжении беременности поведение самок опытных групп было аналогично контрольным животным. В период гестации прибавка массы беременных крыс опытных групп не отличалась от показателей контрольной группы.

Часть беременных самок подвергали эвтаназии на 20-й день беременности. На вскрытии подсчитывали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации в матке, количество живых и мертвых плодов, количество резорбций. При внешнем осмотре ни у одного эмбриона не было выявлено аномалий развития.

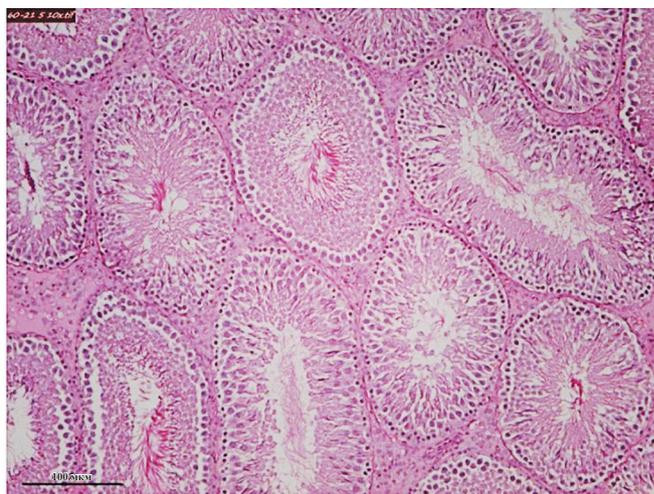
Часть беременных самок оставляли до родов, с целью наблюдения за выживаемостью и развитием потомства в течение 5 дней. Продолжительность беременности, количество рожденных крысят, их масса и кранио-каудальный размер статистически не отличались между опытными и контрольной группами. Мертворожденных не было ни у одной самки. После родов все самки проявляли инстинкт материнства. Выживаемость потомства в течение 5 суток составила 100% во всех группах. Развитие крысят в течение этого периода происходило без отклонений.

При гистологическом исследовании семенников (рис. 4) не было установлено изменений морфологической структуры органа и повреждения сперматогенного эпителия ни в одном случае, а аналогичное исследование яичников крыс не выявило морфологических изменений в органе (рис. 5).

Из полученных результатов следует, что имплантированные в мышечную ткань образцы ДМЧХ, как



Контрольная группа



Группа с имплантированным ДМЧХ

Рис. 4. Гистологический срез семенника крысы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 4. Histological section of rat testis. H&E staining. $\times 100$

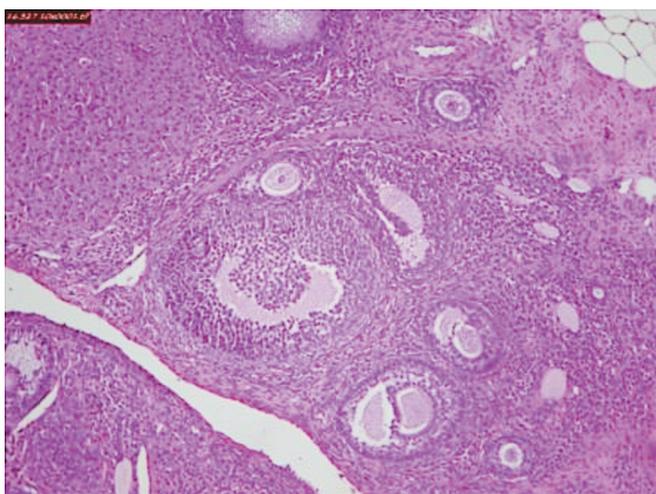
до спаривания животных, так и во время гестации, не проявляют отрицательного действия на репродуктивную систему животных.

Взаимодействие тканеспецифического матрикса из децеллюляризованного хряща свиньи с клетками

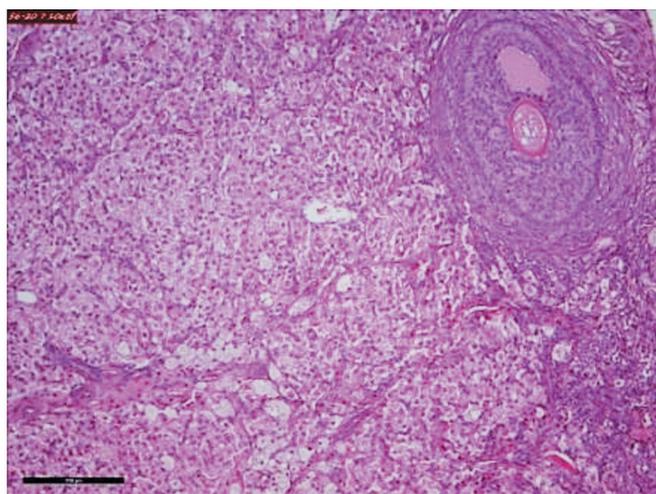
К 3-м суткам эксперимента количество пролиферирующих адгезированных МСК ЖТч составило $112 \pm 10 \times 10^3$ клеток/мм², а на 7-е сутки эксперимента количество пролиферирующих клеток удвоилось.

Исследование жизнеспособности клеток с применением красителя Calcein AM показало, что к 3-м суткам эксперимента визуализируется пролиферация клеток, равномерно распределенных по поверхности матрикса (рис. 6).

Морфология клеток нормальная, фибробластоподобная. К 7-м суткам количество клеток увеличивается, прикрепившиеся клетки равномерно распределены по поверхности матриксов ДМЧХ, имеют распластанную фибробластоподобную морфологию, сохраняют жизнеспособность и нормальную морфологию.



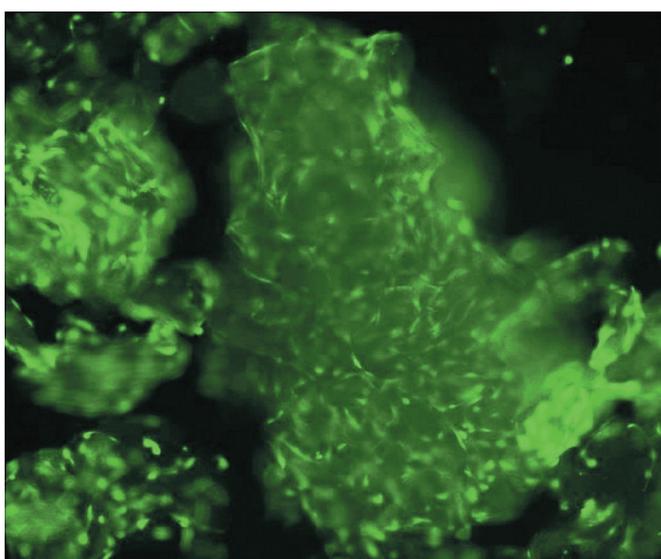
Контрольная группа



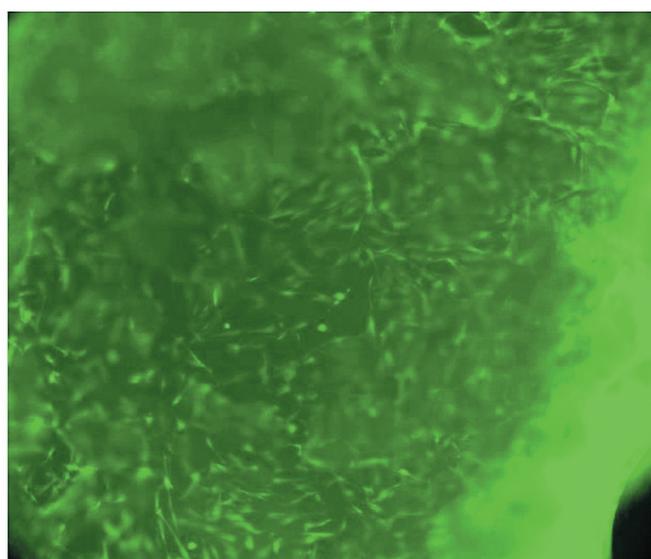
Группа с имплантированным ДМЧХ

Рис. 5. Гистологический срез яичника крысы. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

Fig. 5. Histological section of rat ovary. H&E staining. $\times 100$



3 суток



7 суток

Рис. 6. МСК ЖТч на децеллюляризованных микродисперсных частицах хряща свиньи. Окрасивание Calcein AM. $\times 100$

Fig. 6. hAdMSCs cultured on decellularized microdispersed porcine cartilage particles. Calcein AM staining. $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказана эффективность применения последовательной обработки ПАВ, ск-СО₂ и ДНКазой для получения биосовместимого тканеспецифического матрикса из ксеногенного материала – децеллюляризованного суставного хряща свиньи.

Проведенные эксперименты показали, что образцы мелкодисперсных децеллюляризованных тканей хряща свиньи не проявляют отрицательного биологического действия по показателям местного и общетоксического действия, гено- и репродуктивной токсичности и способны поддерживать адгезию и пролиферацию МСК ЖТч.

Таким образом, полученный ксеногенный тканеспецифический мелкодисперсный матрикс может быть рекомендован для создания тканевых эквивалентов хрящевой ткани человека.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-15-00251).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Reddy MSB, Ponnammam D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers (Basel)*. 2021; 13 (7): 1105. doi: 10.3390/polym13071105.
- Jafari M, Paknejad Z, Rad MR, Motamedian SR, Eghbal MJ, Nadjmi N et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017; 105 (2): 431–459. doi: 10.1002/jbm.b.33547.
- Song R, Murphy M, Li C, Ting K, Soo C, Zheng Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des Devel Ther*. 2018; 12: 3117–3145. doi: 10.2147/DDDT.S165440.
- Vasilets VN, Surguchenko VA, Ponomareva AS, Nemets EA, Sevastianov VI, Bae JW et al. Effects of surface properties of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) on adhesion and proliferation of mouse fibroblasts. *Macromolecular Research*. 2015; 23: 205–213. doi: 10.1007/s13233-015-3025-1.
- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1840 (8): 2506–2519. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.010.
- Paulo Zambon J, Atala A, Yoo JJ. Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. *Methods*. 2020; 171: 3–10. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.09.016.
- Gupta SK, Mishra NC, Dhasmana A. Decellularization methods for scaffold fabrication. *Methods Mol Biol*. 2018; 1577: 1–10. doi: 10.1007/7651_2017_34.
- 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.
- Philips C, Campos F, Roosens A, Sánchez-Quevedo MDC, Declercq H, Carriel V. Qualitative and quantitative evaluation of a novel detergent-based method for decellularization of peripheral nerves. *Ann Biomed Eng*. 2018; 46 (11): 1921–1937. doi: 10.1007/s10439-018-2082-y.
- Mendibil U, Ruiz-Hernandez R, Retegi-Carrion S, Garcia-Urquia N, Olalde-Graells B, Abarrategi A. Tissue-specific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds. *Int J Mol Sci*. 2020; 21 (15): 5447. doi: 10.3390/ijms21155447.
- Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: from processing techniques to applications. *Biomed Res Int*. 2017; 2017: 9831534. doi: 10.1155/2017/9831534.
- Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices: a systematic review and future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2018; 19 (12): 4117. doi: 10.3390/ijms19124117.
- Sevastianov VI, Basok YB, Kirsanova LA, Grigoriev AM, Kirillova AD, Nemets EA et al. A comparison of the capacity of mesenchymal stromal cells for cartilage regeneration depending on collagen-based injectable biomimetic scaffold type. *Life*. 2021; 11 (8): 756. doi: 10.3390/life11080756.
- Song C, Luo Y, Liu Y, Li S, Xi Z, Zhao L et al. Fabrication of PCL scaffolds by supercritical CO₂ foaming based on the combined effects of rheological and crystallization properties. *Polymers (Basel)*. 2020; 12 (4): 780. doi: 10.3390/polym12040780.
- Gil-Ramirez A, Rosmark O, Spégel P, Swärd K, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt A.K et al. Pressurized carbon dioxide as a potential tool for decellularization of pulmonary arteries for transplant purposes. *Sci Reports*. 2020; 10 (1): 4031. doi: 10.1038/s41598-020-60827-4.
- Алексеев ЕС, Алентьев АЮ, Белова АС, Богдан ВИ, Богдан ТВ, Быстрова АВ и др. Сверхкритические флюиды в химии. *Успехи химии*. 2020; 89 (12): 1337–1427. Alekseev ES, Alentiev AYU, Belova AS, Bogdan VI, Bogdan TV, Bystrova AV et al. Supercritical fluids in chemistry. *Russ Chem Rev*. 2020; 89 (12): 1337–1427. [In Russ]. doi: 10.1070/RCR4932.
- Разгонова МП, Захаренко АМ, Сергиевич АА, Каленик ТК, Голохваст КС. Сверхкритические флюиды: теория, этапы становления, современное применение: учебное пособие. СПб.: Лань, 2019; 192. Razgonova MP, Zakharenko AM, Sergievich AA, Kalenik TK, Golokhvast KS. Sverxkriticheskie flyuidy: teoriya, e'tapy stanovleniya, sovremennoe primenenie: uchebnoe posobie. SPb.: Lan', 2019; 192.
- Nemets EA, Malkova AP, Dukhina GA, Lazhko AE, Basok YB, Kirillova AD et al. Effect of supercritical carbon dioxide on the in vivo biocompatible and resorptive properties of tissue-specific scaffolds from decellularized pig liver fragments. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2022; 13: 413–420. doi: 10.1134/S2075113322020319.

19. *Ingrosso F, Ruiz-López MF.* Modeling solvation in supercritical CO₂. *Chemphyschem.* 2017; 18: 2560–2572. doi: 10.1002/cphc.201700434.
20. *Sevastianov VI, Nemets EA, Lazhko AE, Basok YuB, Kirsanova LA, Kirillova AD.* Application of supercritical fluids for complete decellularization of porcine cartilage. *Journal of Physics: Conference Series.* XV International Russian Chinese Symposium «New Materials and Technologies». 2019; 1347 (1): 012081. doi: 10.1088/1742-6596/1347/1/012081.
21. *Seo Y, Jung Y, Kim SH.* Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis. *Acta Biomater.* 2018; 67: 270–281. doi: 10.1016/j.actbio.2017.11.046.
22. *Nemets EA, Lazhko AE, Basok YuB, Kirsanova LA, Kirillova AD, Sevastianov VI.* Preparation of tissue-specific matrix from decellularized porcine cartilage. *Russian Journal of Physical Chemistry B.* 2020; 14: 1245–1251. doi: 10.1134/S1990793120080059.
23. *Huang Z, Godkin O, Schulze-Tanzil G.* The challenge in using mesenchymal stromal cells for recellularization of decellularized cartilage. *Stem Cell Rev Rep.* 2017 Feb; 13 (1): 50–67. doi: 10.1007/s12015-016-9699-8.
24. ГОСТ ISO 10993-6. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации. GOST ISO 10993-6. Izdeliya medicinskie. Ocenka biologicheskogo dejstviya medicinskix izdelij. Chast' 6. Issledovanie mestnogo dejstviya posle implantacii.
25. *Basok YB, Kirillova AD, Grigoryev AM, Kirsanova LA, Nemets EA, Sevastianov VI.* Fabrication of microdispersed tissue-specific decellularized matrix from porcine articular cartilage. *Inorganic Materials: Applied Research.* 2020; 11 (5): 1153–1159. doi: 10.1134/S2075113320050044.
26. *Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF.* An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011; 32: 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.

*Статья поступила в редакцию 20.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 20.07.2022*

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-85-93

АПОПТОТИЧЕСКИЕ МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА УСКОРЯЮТ РЕГЕНЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОБШИРНОЙ РЕЗЕКЦИИ

Н.А. Онищенко¹, А.О. Никольская¹, З.З. Гоникова¹, Л.А. Кирсанова¹, М.Ю. Шагидулин^{1, 2}, В.И. Севастьянов¹

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

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

Цель: на модели обширной резекции печени (ОРП) сравнить эффективность регенерационных процессов в печени при использовании апоптотических моноклеарных клеток костного мозга (аМККМ) и интактных моноклеарных клеток костного мозга (иМККМ) от здоровых животных. **Материалы и методы.** Крыс-самцов породы Вистар ($n = 77$) с моделью ОРП (70–75%) разделили на 3 группы: группа 1 – контроль с однократным внутривенным введением физиологического раствора, группа 2 – с однократным внутривенным введением несортированных иМККМ в дозе $30\text{--}35 \times 10^6$ и группа 3 – с однократным внутривенным введением аМККМ в той же дозе. В динамике контролировали восстановление биохимических показателей функции и массы печени, а также возникающие микроструктурные изменения гепатоцитов в гистологических препаратах, оценивая митотическую активность гепатоцитов в течение первых 7–10 дней после ОРП. **Результаты.** Установлено, что в группе 2 и в группе 3 по сравнению с группой 1 отсутствовала летальность после моделирования ОРП, а также имела место более быстрая нормализация биохимических показателей функции печени (к 10–14-м суткам). Митотическая активность гепатоцитов в группе 3 резко возрастала уже на 1-е сутки, и митотический индекс (МИ) в среднем составлял 14%, достигая в отдельных экспериментах 20,9%; в контроле к этому сроку МИ оставался на исходном уровне, а в группе 2 МИ составил только 3,2%. В группе 3 отмечено также более быстрое восстановление массы печени после ОРП до исходных значений уже к 8–10-м суткам, тогда как в группе 2 – к 12–14-м суткам, а в группе 1 – к 17–20-м суткам. Было высказано предположение, что более выраженное повышение эффективности регенерационных процессов в печени после ОРП в группе 3 после применения аМККМ обусловлено высвобождением из этих клеток большого спектра образовавшихся паракринных факторов, в том числе различных классов молекул РНК, участвующих в регенерационном процессе. **Заключение.** аМККМ обладают более эффективным адаптивным и регуляторным потенциалом по сравнению с иМККМ, т. к. ускоренно формируют в клетках поврежденной печени перестройки, обеспечивающие более раннее и мощное включение адресной регенерационной программы.

Ключевые слова: апоптотические клетки костного мозга, регенерация, резекция печени.

Для корреспонденции: Гоникова Залина Залимгериевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (966) 188-33-33. E-mail: zalina3392@gmail.com

Corresponding author: Zalina Gonikova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (966) 188-33-33. E-mail: zalina3393@gmail.com

APOPTOTIC BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS ACCELERATE LIVER REGENERATION AFTER EXTENDED RESECTION

N.A. Onishchenko¹, A.O. Nikolskaya¹, Z.Z. Gonikova¹, L.A. Kirsanova¹, M.Yu. Shagidulin^{1, 2}, V.I. Sevastianov¹

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

Objective: to compare the efficiency of regenerative processes in the liver using apoptotic bone marrow-derived mononuclear cells (BMMCs) and intact BMMCs from healthy animals on an extended liver resection (ELR) model. **Materials and methods.** Male Wistar rats (n = 77) with an ELR model (70–75%) were divided into 3 groups: group 1 (control with a single intraperitoneal injection of saline), group 2 (single intraperitoneal injection of unsorted intact BMMCs at a dose of $30\text{--}35 \times 10^6$, and group 3 (single intraperitoneal injection of apoptotic BMMCs at the same dose). Restoration of biochemical parameters of liver function and mass, as well as the emerging microstructural changes in hepatocytes in histological preparations, were monitored by assessing hepatocyte mitotic activity (MA) during the first 7–10 days after ELR. **Results.** It was found that in groups 2 and 3, as compared with group 1, there was no death after ELR modeling, and that the biochemical parameters of liver function normalized more rapidly (at days 10–14). Hepatocyte MA in group 3 sharply increased as early as on day 1, and mitotic index (MI) averaged 14%, reaching 20.9% in some experiments; MI in the control group remained at the baseline by this time, while in group 2, MI was only 3.2%. In group 3, liver mass recovered more rapidly after ELR to baseline values already at days 8–10, whereas the recovery was at day 12–14 and day 17–20 in group 2 and group 1, respectively. It was suggested that the more pronounced increase in the efficiency of regenerative processes in the liver after ELR in group 3 after using apoptotic BMMCs was due to the release from these cells of a large spectrum of formed paracrine factors, including various classes of RNA molecules involved in the regeneration process. **Conclusion.** Apoptotic BMMCs have a more effective adaptive and regulatory potential than intact BMMCs because reorganizations are rapidly formed in the damaged liver cells, providing an early and more powerful activation of the targeted regenerative program.

Keywords: apoptotic bone marrow cells, regeneration, liver resection.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что повреждение печени, как и других органов, стимулирует в них адаптационные процессы, которые, в свою очередь, активируют эволюционно запрограммированные механизмы восстановительной регенерации. Между тем при тяжелом хроническом или обширном остром повреждении печени (в условиях гибели значительной массы клеток) оставшиеся клетки вынуждены выполнять свои функции с повышенной нагрузкой, превышающей эволюционно запрограммированную норму расхода клеточной энергии на эти процессы.

В создавшихся условиях за счет развивающегося энергодефицита в клетках печени резко тормозится включение механизмов восстановительной регенерации, что, как полагают, является следствием недостаточной эффективности процессов адаптации, энергетически обеспечивающих регенерационный процесс.

По современным представлениям, адаптивная перестройка метаболизма в тканях начинается с развития в них процессов клеточной аутофагии [1–3]. Поэтому исходно сниженный уровень активности клеточной аутофагии в органе предопределяет низ-

кий регенерационный потенциал оставшихся клеток и недостаточную эффективность восстановительных процессов [4–6]. Для активации регенерационных процессов в поврежденных органах было предложено использовать гемопоэтические и стромальные клетки костного мозга (ККМ), обладающие, как известно, в организме наиболее высоким регенерационным потенциалом. Однако опыт клинического применения ККМ оказался не столь убедительным и не всегда воспроизводимым [7, 8], что заставило исследователей приступить непосредственно к изучению механизмов индукции регенерационных процессов, вызванных ККМ, для повышения терапевтической эффективности их применения. Была выдвинута гипотеза об определяющей регуляторной роли апоптотически измененных ККМ, продуцирующих паракринные факторы в состоянии апоптоза [9]. Справедливость этой гипотезы впоследствии была доказана [10] и многократно подтверждена [11, 12]. К настоящему времени уже утвердилось мнение, что именно апоптотические клетки выделяют в организм рост-стимулирующие сигналы в виде нановезикул [13], липидов [14], экзосом, различных микро-РНК, белков [15] и других компонентов, име-

нуемых секреторами. В результате происходит не только ускорение восстановительных процессов в организме, но и повышается их эффективность путем иммуномодулирующего воздействия и блокирования воспалительных реакций [16, 17].

Существующие представления о механизмах индукции регенерационных процессов позволяют предположить, что для выработки в поврежденном органе эффективного регенерационного ответа клеток сила воздействия адаптирующего стресс-сигнала должна быть достаточно высокой, чтобы усилить выраженность процесса аутофагии и даже достигнуть клетками состояния обратимого апоптоза, но не должна превышать эволюционно запрограммированный ответ, т. е. быть физиологичной. Такими свойствами – адекватного и физиологичного адаптогена, – очевидно, и обладают апоптотические ККМ, которые, как было уже показано [11], обеспечивают в организме обновление и восполнение клеточного состава крови и иммунной системы.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности повышения регенерационной активности клеток печени после обширной резекции путем применения в качестве адаптирующего и регуляторного стресс-сигнала апоптотических мононуклеарных ККМ (аМККМ) здорового донора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на крысах-самцах породы Wistar весом 250–300 г ($n = 77$). Животных содержали в условиях вивария при температуре 18–20 °С на смешанном рационе питания при свободном доступе к воде. Эксперименты на животных проводились в утренние часы при комнатной температуре ($t = 22–24$ °С), что исключало влияние суточных колебаний митотической активности клеток печени. Относительная влажность равнялась 50–65%, цикл освещения был двенадцатичасовым, а смена объема воздуха помещения в час была десятикратной. Питание животных осуществляли стандартным комбинированным кормом для лабораторных животных (микробиологический статус соответствовал ГОСТ Р 51849-2001 «Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных»). Фильтрованная водопроводная вода *ad libitum* доставлялась в стандартных питьевых бутылочках (микробиологический статус воды соответствовал СанПиН 2.1.4.1074-01 «Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения»). Эксперименты и все манипуляции с животными проводились согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals

Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Способность аМККМ усиливать регенерационные сигналы и адресно доставлять их в ткань поврежденной печени изучали на модели обширной (70–75%) резекции печени (ОРП) у крыс, которая сопровождается активацией механизмов гипертрофической регенерации с выраженной митотической активностью гепатоцитов в оставшейся части органа [18].

Перед моделированием ОРП оперируемых крыс ($n = 65$) наркотизировали ингаляционно диэтиловым эфиром, затем с соблюдением правил асептики и антисептики вскрывали брюшную полость, вывели печень в рану и последовательно накладывали лигатуры на основания срединной, левой боковой и правой верхней долей печени, после чего их удаляли (всего 70–75% общей массы печени). Операцию и последующие исследования всегда проводили в период с 10 до 12 часов, когда суточный ритм митотической активности клеток печени минимален. В раннем послеоперационном периоде у оперированных животных всегда развивалась клиническая картина острой печеночной недостаточности.

Для доказательства возможности усиления регенерационной активности клеток в поврежденной печени с помощью аМККМ использовали в качестве доноров здоровых крыс без ОРП ($n = 12$). Из костного мозга этих крыс получали несортированную мононуклеарную (гемопозитическую) фракцию клеток для последующего введения в дозе $30–35 \times 10^6$ клеток крысам с ОРП. Все животные после ОРП были разделены на 3 группы: группа 1 – контрольная ($n = 25$), в которой крысам однократно внутрибрюшинно вводили по 1,0–1,5 мл физиологического раствора; группа 2 ($n = 25$) и группа 3 ($n = 15$) – опытные, в которых через 3–5 часов после моделирования ОРП однократно внутрибрюшинно вводили несортированные мононуклеарные ККМ ($30–35 \times 10^6$ клеток в 1,5 мл физиологического раствора), причем в группе 2 – свежeweделенные интактные (иМККМ), а в группе 3 – аМККМ. аМККМ получали путем инкубации свежeweделенных МККМ в консервирующем ион-сбалансированном растворе Кустодиол (раствор НТК – Бредшнейдера) при температуре 4–6 °С в течение 48 часов, т. к., согласно нашим исследованиям [19], при указанных режимах хранения содержание аМККМ (клеток-секретом) в состоянии раннего обратимого апоптоза было достоверно выраженным и достигало $44,8 \pm 0,9\%$, а содержание аМККМ в состоянии позднего необратимого апоптоза в составе клеточного пула не превышало 2–8% ($p < 0,02$).

Динамику восстановления печеночного гомеостаза в организме крыс после ОРП и введения ККМ (интактных и апоптотических) исследовали стан-

дартными методами на биохимическом анализаторе Arik-test (Германия) по содержанию в сыворотке крови в раннем послеоперационном периоде (в течение 14 суток) общего количества белка и билирубина. Также измеряли активность печеночных ферментов цитолиза: аланиновой аминотрансферазы (АлАТ), аспарагиновой аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Оценивали темп преодоления критической массы остатка печени и восстановления его до исходных значений после ОРП в течение 20–22 суток. Для этого у каждого оперированного животного сразу после ОРП взвешивали резецированную часть печени, которую принимали за 70% от общей массы печени, затем на основании результатов взвешивания рассчитывали исходную массу печени для каждого животного. Далее на каждом исследуемом сроке эксплантировали оставшуюся печень, путем взвешивания определяли ее массу, и полученные значения сравнивали с рассчитанной исходной массой печени для данного животного.

Степень выраженности индукционного воздействия ОРП на восстановительные процессы в печени при моделировании критической травмы (группа 1), а также изменение характера восстановительных процессов в печени после ОРП на фоне введения иМККМ (группа 2) и аМККМ (группа 3) определяли количественно по степени изменения микроструктурного состояния клеток печени в гистологических препаратах. Для этого в группах 1, 2 и 3 исследовали митотическую активность гепатоцитов в остатке печени через 24, 36, 48 и 72 часа, а также на 5, 7 и 10-е сутки после ОРП. В указанные сроки иссекали печень и готовили из нее гистологические препараты, окрашивая тканевые срезы гематоксилином и эозином. Проводили гистологический анализ препаратов (микроскоп фирмы Leica DM, Германия), а также определение в 30 полях зрения количества делящихся гепатоцитов с последующим расчетом митотического индекса (МИ) в промилле (‰).

Достоверность различия исследуемых показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительное исследование восстановления показателей печеночного гомеостаза в 3 группах показало, что в контрольной группе 1 из 25 крыс погибло 5 животных в течение первых 5 суток после резекции печени (летальность составила 20%). В опытных группах 2 и 3 (введение иМККМ ($n = 25$) и аМККМ ($n = 15$) соответственно) погибших животных не было в течение всего срока наблюдения. Отсутствие летальности в этих группах сопровождалось более высоким темпом восстановления печеночного гомеостаза в организме, что выражалось

в более ранней нормализации показателей общего белка и цитолитических ферментов (АлАТ, АсАТ и ЩФ) в сыворотке крови по сравнению с группой 1.

Установлено, что у крыс 2-й и 3-й групп показатели цитолиза, как и в группе 1, нарастали в течение первых 3 суток, но затем в группе 3 более резко, чем в группе 2, стабилизировались и восстанавливались уже к 10–14-м суткам. Сниженный уровень общего белка после ОРП в этих группах также восстанавливался к концу срока наблюдения (14-е сутки), тогда как в контрольной группе нормализации всех исследуемых показателей не наступало к концу срока наблюдения. Более высокий темп восстановления печеночного гомеостаза в организме в группах 2 и 3 по сравнению с контролем можно объяснить более высокой активностью восстановительных и пролиферативных процессов в клетках оставшейся части печени, которая была обусловлена введением иМККМ и аМККМ. Действительно, при сравнительном изучении митотической активности гепатоцитов в печени после ОРП во всех трех исследуемых группах было установлено быстрое повышение митотической активности гепатоцитов по сравнению с исходным уровнем (до ОРП митотический индекс – МИ составлял 0,2–0,3‰). При этом темп развития и степень выраженности подъема митотической активности во 2-й и 3-й группах были выше, чем в контрольной группе (рис. 1).

Так, в группе 1 (контроль) значение митотического индекса достигало максимума 5,378‰ (36 ми-

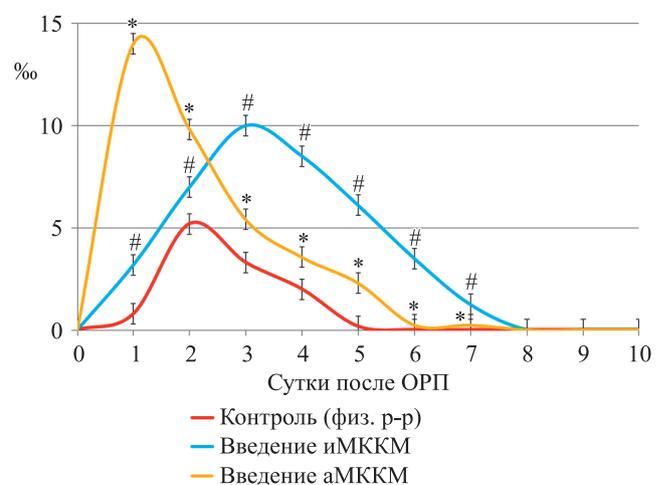


Рис 1. Динамика изменения митотического индекса (МИ) гепатоцитов в печени крыс после обширной резекции печени (‰) в 3 группах опытов. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с введением аМККМ

Fig. 1. Changes in mitotic index in hepatocytes in the liver of rats after ELR (‰) in 3 experimental groups. * – $p < 0.05$ compared to control; # – $p < 0.05$ compared to injection of apoptotic BMMCs

тозов на 6653 клетки) через 48 часов после ОРП. В группе 2 МИ через 48 часов составлял 6,11% (60 митозов на 8448 клеток) с максимумом 10,5% через 72 часа (93 митоза на 8858 клеток). В группе 3 значения МИ достигали максимума уже через 24 часа после моделирования ОРП. В среднем это составляло 14% (135 митозов на 9762 клеток), но в отдельных экспериментах МИ достигал 20,9%. Таким образом, из максимальных значений МИ в трех исследуемых группах следует, что аМККМ практически в 1,5 раза повышают митотическую активность гепатоцитов по сравнению с введением иМККМ и почти в 3 раза повышают митотическую активность гепатоцитов по сравнению с контролем. Важно отметить, что аМККМ не только более интенсивно, но и ускоренно реализуют свой регуляторный эффект

(уже через 24 часа после моделирования ОРП) по сравнению с контролем и применением свежeweыделенных ККМ. Этот факт может быть обусловлен тем, что аККМ сразу после введения в организм обеспечивают доставку и продукцию уже образовавшегося в апоптотических клетках комплекса многочисленных рост-стимулирующих сигнальных молекул и регуляторных факторов [20], которые обеспечивают более раннюю интенсивную активацию восстановительных и пролиферативных процессов в очаге повреждения. Максимально высокую и раннюю активацию митотической активности гепатоцитов в ткани печени после моделирования ОРП и применения аМККМ демонстрирует также рис. 2.

Видно, что через 24 часа только в группе 3 при введении аМККМ (рис. 2, г) наступала ранняя

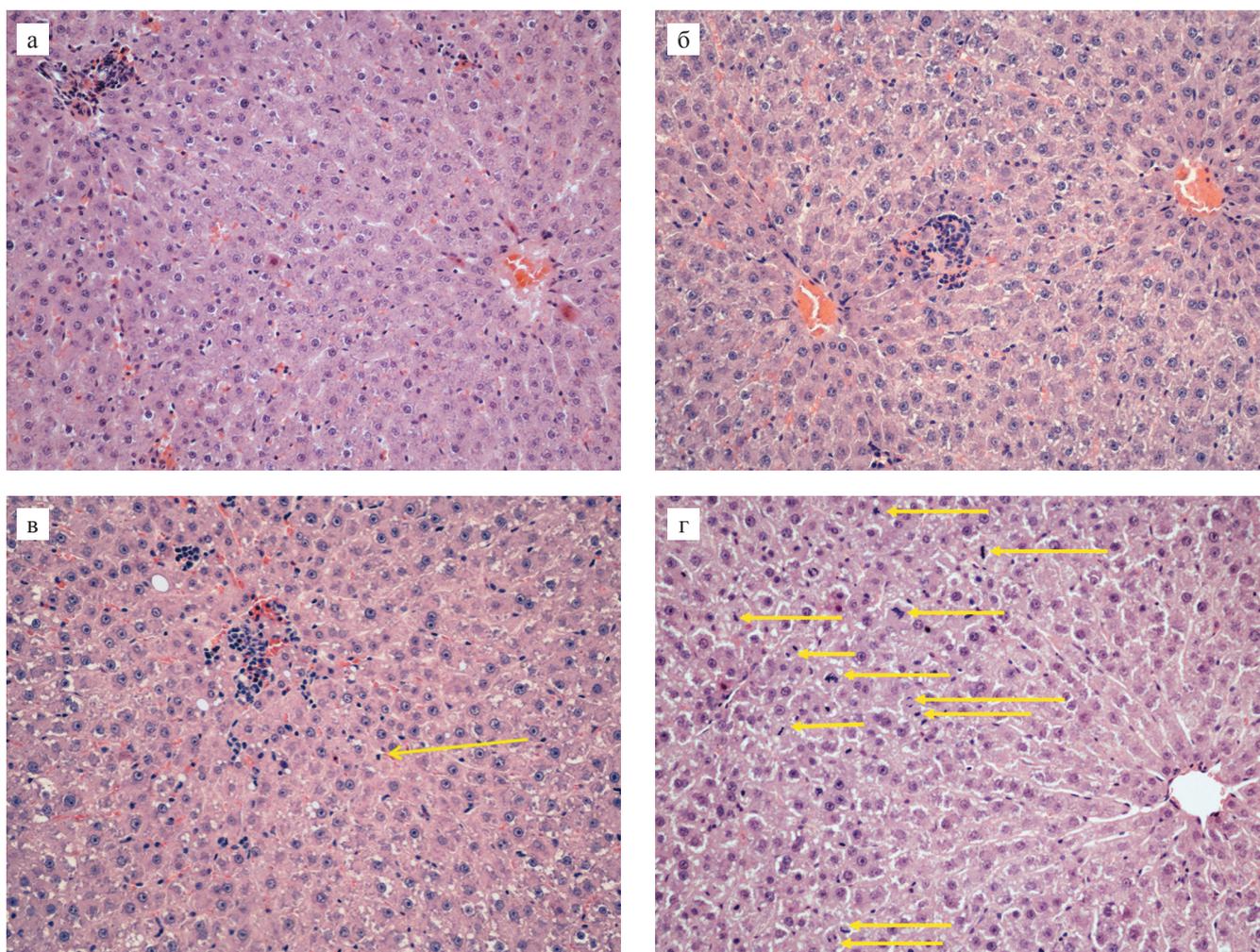


Рис. 2. Митотическая активность гепатоцитов в печени крыс до и через 24 часа после ОРП и введения МККМ: а – исходный уровень (до ОРП); б – группа 1 (контроль), введение физиологического раствора; в – группа 2, введение иМККМ; г – группа 3, введение аМККМ. Стрелками указаны гепатоциты на разных стадиях митоза. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Fig. 2. Hepatocyte mitotic activity in rat liver before and 24 hours after ELR and injection of BMMCs: a – baseline (before ELR); б – group 1 (control), saline injection; в – group 2, injection of intact BMMCs; г – group 3, injection of apoptotic BMMCs. Arrows indicate hepatocytes at different stages of mitosis. H&E stain, 200 \times magnification

и максимальная активация митотической активности гепатоцитов, тогда как в опытах с применением свежеработанных иМККМ (рис. 2, в) митотическая активность только начинала усиливаться. В контроле (рис. 2, б) с введением физиологического раствора митотическая активность на этом сроке вообще отсутствовала, но максимально усиливалась только через 48 часов. Кроме того, в клетках печени крыс в группах 2 и 3 через 24 часа после моделирования ОРП появляются признаки диффузной мелкокапельной вакуольной дистрофии гепатоцитов, что, как известно [21], является морфологическим маркером развивающейся аутофагии клеток. При этом наибольшая выраженность аутофагии клеток печени (рис. 3)

отмечалась через 48 часов в группе 3 с введением аМККМ (рис. 3, г).

Морфологическое исследование печени подтверждает более выраженную способность аМККМ по сравнению с иМККМ стимулировать в клетках адаптивные изменения на начальных сроках после повреждения для оптимальной энергетической перестройки метаболизма в клетках и раннего запуска восстановительных и митотических процессов в поврежденном органе [2].

Еще одним подтверждением более выраженного индукционного воздействия аМККМ на регенерационные процессы в печени по сравнению с иМККМ служит динамика восстановления массы печени

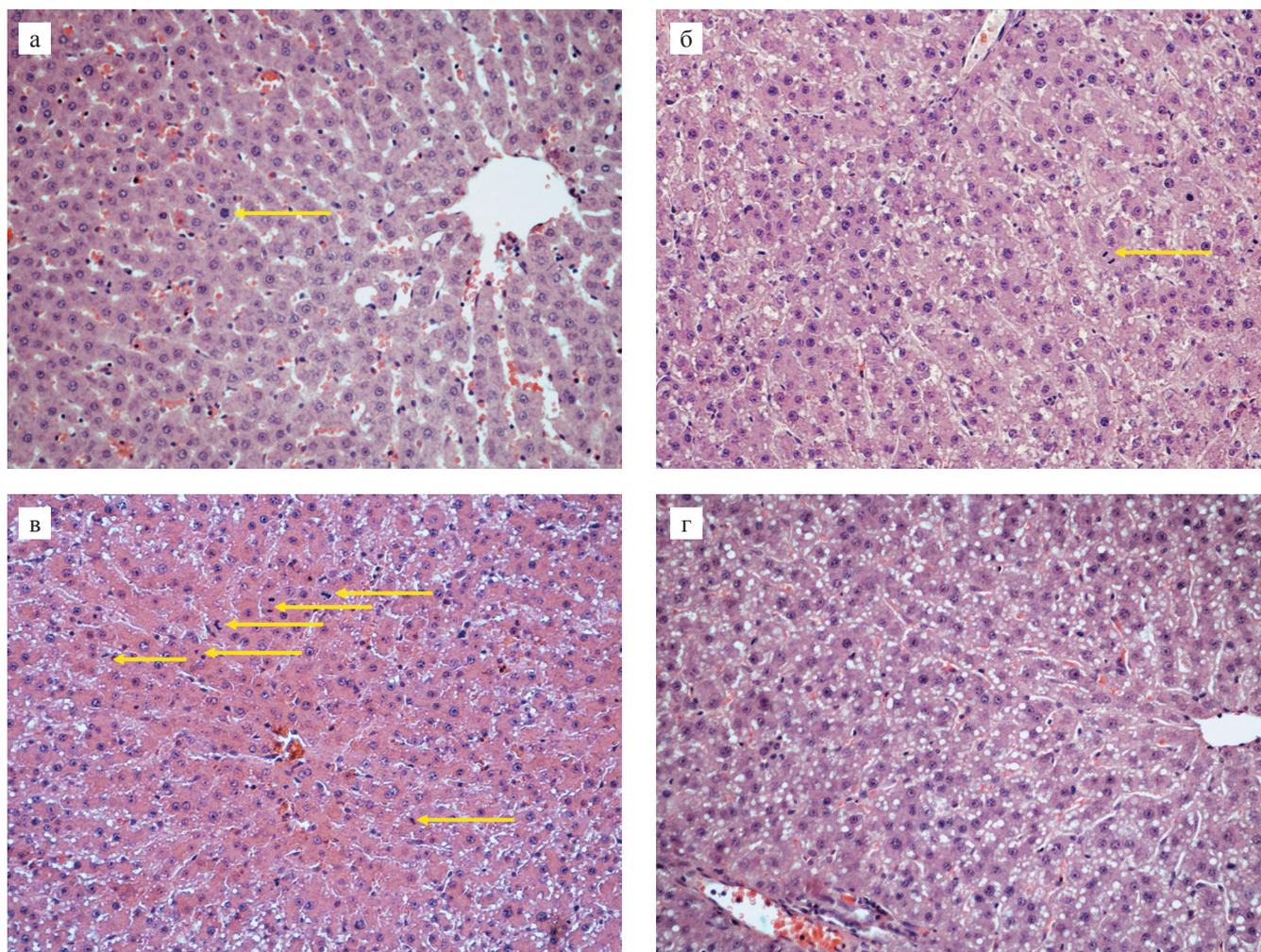


Рис. 3. Гистологическая структура печени крыс до и через 48 часов после моделирования ОРП и введения МККМ. Изменение морфологии гепатоцитов: а – исходное состояние (до ОРП); б – группа 1 (контроль), введение физиологического раствора; в – группа 2, введение иМККМ; г – группа 3, введение аМККМ. Стрелками указаны гепатоциты на разных стадиях митоза. Окраска гематоксилином и эозином, ×200

Fig. 3. Histological structure of the rat liver before and 48 hours after ELR modeling and BMMC injection. Changes in hepatocyte morphology: a – baseline (before ELR), б – group 1 (control), saline injection; в – group 2, injection of intact BMMCs; г – group 3, injection of apoptotic BMMCs. Arrows indicate hepatocytes at different stages of mitosis. H&E stain, 200× magnification

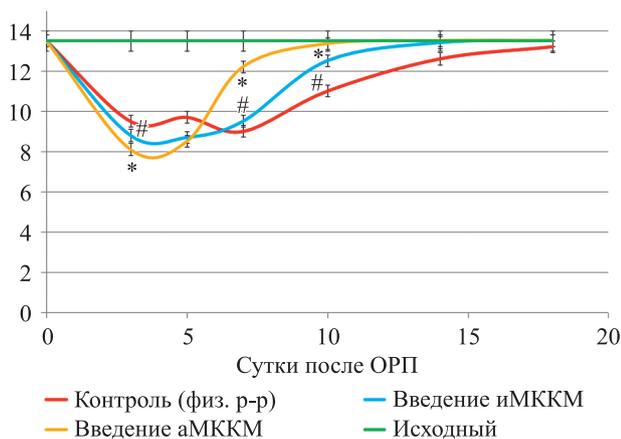


Рис. 4. Динамика восстановления массы печени крыс после ее обширной резекции в 3 группах опытов: с введением физиологического раствора, с введением иМККМ и с введением аМККМ (в граммах). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем; # – $p < 0,05$ по сравнению с введением аМККМ

Fig. 4. Recovery of rat liver mass after extended resection in 3 experimental groups: with saline injection, with injection of intact BMCMs and with injection of apoptotic BMCMs (in grams). * – $p < 0.05$ compared to control; # – $p < 0.05$ compared to injection of apoptotic BMCMs

в трех исследуемых группах животных с моделированием ОРП (рис. 4).

Наиболее ускоренный темп восстановления массы печени наблюдается в группе 3, где через 3–5 часов после ОРП внутривентриально вводили аМККМ в дозе $30\text{--}35 \times 10^6$ клеток. Восстановление массы печени в этой группе наступало к 8–10-м суткам. Введение иМККМ в той же дозе в группе 2 также ускоряло репаративные процессы в остатке резецированной печени, но восстановление массы печени до исходных значений в этой группе происходило на 12–14-е сутки, т. е. восстановление происходило в более замедленном темпе. В группе 1 (контроль) восстановление массы печени при введении физиологического раствора наблюдалось на 17–20-е сутки. Ранее мы показали [22], что внутривентриальное введение крысам общей РНК в дозе 30 мкг / 100 г веса, полученной из свежесекретированных иМККМ, также интенсифицировало регенеративную активность клеток печени после моделирования ОРП. При этом регенерационный ответ печени на введение общей РНК из иМККМ был выше, чем на введение свежесекретированных иМККМ. Так, при введении общей РНК из иМККМ значение МИ через 48 часов составило 23,4%, а при введении иМККМ – 6,96%, а восстановление массы печени наступало на 10–12-е сутки и на 14–18-е сутки соответственно. Сходство в направленности и более высокой результативности регуляции восстановительных процессов при введении

общей РНК как из свежесекретированных иМККМ, так и из аМККМ – по сравнению со свежесекретированными иМККМ позволяет предположить следующий механизм. В процессе выделения общей РНК из иМККМ эти клетки также подвергаются воздействию апоптоза. Развитие апоптоза клеток, как известно, способствует появлению у таких клеток способности продуцировать многочисленные и разнообразные паракринные факторы, включая различные типы РНК и микроРНК [9, 15]. Накапливающиеся паракринные факторы апоптотических клеток и оказывают дополнительно мощное стресс-регуляторное воздействие на восстановительные процессы в поврежденных органах.

Полученные результаты, по нашему мнению, свидетельствуют о том, что аМККМ, введенные в организм на фоне ОРП, действуют в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточных систем как адекватный эволюционно выработанный адаптоген. Этот адаптоген предназначен включать и оптимизировать резервы выживания клеток в поврежденном органе путем резкого и ускоренного переключения в них эволюционно запрограммированных механизмов гибели клеток (таких как аутофагия и обратимый апоптоз) на пролиферацию клеток. Возможность существования в клетках таких механизмов переключения, находящихся в коактивированном состоянии, обсуждается в работах [23, 24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных результатов следует:

- на ранних сроках после моделирования обширной резекции печени аМККМ и свежесекретированные иМККМ усиливают митотическую активность клеток печени по сравнению с контролем (введение физиологического раствора). Однако выраженность усиления активационного воздействия на пролиферацию клеток печени при использовании аМККМ существенно выше, чем при использовании иМККМ. При внутривентриальном введении аМККМ параметр МИ достигает максимальных значений через 24 часа, тогда как при введении иМККМ – только через 72 часа;
- ранняя вакуолизация цитоплазмы гепатоцитов в печени после моделирования ОРП, являющаяся морфологическим маркером аутофагии клеток и отражающая активацию эволюционно запрограммированного процесса их адаптации на повреждение, развивается во всех группах опытов уже через 24 часа, но более интенсивно через 48 часов. Более выраженная ранняя вакуолизация в группе 3 (введение аМККМ) по сравнению с группой 2 (иМККМ) и группой 1 (физиологический раствор) свидетельствует о более высоких регуляторных возможностях аМККМ;

– аМККМ и иМККМ обеспечивают адресную передачу регенерационных сигналов в резецированную печень и ускоряют в ней регенерационный процесс. Однако темп ускорения репаративных процессов и сроки восстановления массы печени до исходных значений при введении аМККМ были выше (8–10-е сутки), чем при использовании иМККМ (12–14-е сутки) и физиологического раствора (18–20-е сутки).

Все вышеизложенное позволяет считать, что аМККМ за счет приобретения ими более мощного регуляторного стресс-индуцированного потенциала в отличие от иМККМ обладают более выраженными адаптирующими и регуляторными свойствами, которые создают в организме более прочный фундамент для осуществления адресной и более эффективной регенерационной программы. Рост интенсивности адаптирующего воздействия аМККМ за счет выделения многочисленных и разнообразных паракринных факторов (в том числе различных типов РНК) способствует ранней и более эффективной активации процессов аутофагии клеток печени после ОРП, которые и индуцируют отчетливое повышение регенерационной активности, а также сокращение сроков восстановления массы резецированной печени до исходных значений.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lin CW, Chen YS, Lin CC, Chen YJ, Lee PH, Kuo PL et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep*. 2015 Oct 30; 5: 15807. doi: 10.1038/srep15807.
2. Cheng Y, Wang B, Zhou H, Dang S, Jin M, Shi Y et al. Autophagy is required for maintenance of liver progenitor cell functionality. *Cell Physiol Biochem*. 2015; 36 (3): 1163–1174. https://doi.org/10.1159/000430287.
3. Lv H, Fan X, Wang L, Feng H, Ci X. Daphnetin alleviates lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute liver failure via the inhibition of NLRP3, MAPK and NF-κB, and the induction of autophagy. *Int J Biol Macromol*. 2018 Nov; 119: 240–248. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.101.
4. Oami T, Watanabe E, Hatano M, Teratake Y, Fujimura L, Sakamoto A et al. Blocking liver autophagy accelerates apoptosis and mitochondrial injury in hepatocytes and reduces time to mortality in a murine sepsis model. *Shock*. 2018 Oct; 50 (4): 427–434. https://doi.org/10.1097/shk.0000000000001040.
5. Shen Y, Malik SA, Amir M, Kumar P, Cingolani F, Wen J et al. Decreased Hepatocyte Autophagy Leads to Synergistic IL-1β and TNF Mouse Liver Injury and Inflammation. *Hepatology*. 2020 Aug; 72 (2): 595–608. doi: 10.1002/hep.31209.
6. Ruart M, Chavarria L, Campreciós G, Suárez-Herrera N, Montironi C, Sergi Guixé-Muntet et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury. *J Hepatol*. 2019 Mar; 70 (3): 458–469. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.015.
7. Carvalho AB, Quintannilha LF, Dias AS et al. Bone marrow multipotent mesenchymal stem cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*. 2008; 26: 1307–1314. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143.
8. Dai LJ, Li HY et al. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res*. 2009; 2 (1): 16–25. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.04.017.
9. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46: 1799–1802. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.07.053.
10. Ankersmit HJ, Hoetzenecker K, Diel W et al. Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *Eur J Clin Invest*. 2009; 39: 445–456. https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02111.x.
11. Beer L, Mildner M, Gyöngyösi M, Ankersmit HJ. Peripheral blood mononuclear cell secretome for tissue repair. *Apoptosis*. 2016; 21: 1336–1353. doi: 10.1007/s10495-016-1292-8.
12. Gneccchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cells in tissue repair. *Methods Mol Biol*. 2016; 1416: 123–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
13. Sirois I, Raymond MA, Brassard N et al. Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for anti-apoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ*. 2011; 18: 549–562. https://doi.org/10.1038/cdd.2010.126.
14. Huang Q, Li F, Liu X et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat Med*. 2011; 17: 860–866. https://doi.org/10.1038/nm.2385.
15. Beer L, Zimmermann M, Mitterbauer A et al. Analysis of the secretome of apoptotic peripheral blood mononuclear cells: impact of released proteins and exosomes for tissue regeneration. *Sci Rep*. 2015; 5: 16662. https://doi.org/10.1038/srep16662.
16. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 14080–14085. https://doi.org/10.1073/pnas.0700326104.
17. Zhang M, Xu S, Han Y, Cao X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF-β. *Hepatology*. 2011; 53: 306–316. https://doi.org/10.1002/hep.24029.

18. Ельчанинов АВ, Фатхудинов ТХ. Регенерация печени млекопитающих: Межклеточные взаимодействия. М.: Наука, 2020; 126. *Yel'chaninov AV, Fatkhudinov TKh. Regeneratsiya pecheni mlekopitayushchikh: Mezhkлетochnyye vzaimodeystviya.* М.: Nauka, 2020; 126.
19. Онищенко НА, Фоменко ЕВ, Никольская АО, Гоникова ЗЗ, Шагидулин МЮ, Баясин МВ и др. К механизму активации восстановительных процессов в печени при использовании общей РНК клеток костного мозга. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2020; XXII (3): 134–142. *Onishchenko NA, Fomenko EV, Nikolskaya AO, Gonikova ZZ, Shagidulin MYu, Balyasin MV et al. Activation of regenerative processes in the liver when using cell-bone marrow total RNA.* *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2020; 22 (3): 134–142. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-3-134-142>.
20. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2008; 29: 2851–2858. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehn456>.
21. Потаннев МП. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого. *Иммунология.* 2014; 2: 95–102. *Potapnev MP. Autophagia, apoptosis, cell necrosis and immune recognition of their and someone else's.* *Immunology.* 2014; 2: 95–102.
22. 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, Sevastianov VI. The comparative analysis of the effectiveness of stimulation of liver regeneration by bone marrow cells and total RNA of these cells.* *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.* 2019; 21 (1): 113–121. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-1-113-121>.
23. Газизов ИМ, Гумерова АА, Киясов АП. Апоптоз в регенерационном гистогенезе печени после частичной гепатэктомии у крыс. *Гены и клетки.* 2015; 10 (3): 22–26. *Gazizov IM, Gumerova AA, Kiyasov AP. Apoptosis in regenerative histogenesis of the liver after partial hepatectomy in rats.* *Genes and cells.* 2015; 10 (3): 22–26. eLIBRARY ID: 26280345.
24. Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferations and apoptosis. *J Clin Invest.* 2002 Feb 15; 109 (4): 437–442. doi: 10.1172/JCI15077.

*Статья поступила в редакцию 08.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 08.07.2022*

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-94-108

ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ СОСУДИСТЫЕ ЗАПЛАТЫ – СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ ПРЕКЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

Л.В. Антонова¹, А.В. Миронов¹, А.Р. Шабаев¹, В.Н. Сильников², Е.О. Кривкина¹,
В.Г. Матвеева¹, Е.А. Великанова¹, Е.А. Сенокосова¹, М.Ю. Ханова¹, В.В. Севостьянова¹,
Т.В. Глушкова¹, Р.А. Мухамадияров¹, Л.С. Барбараиш¹

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

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Российская Федерация

Проведение каротидной эндартерэктомии с использованием заплаты – наиболее эффективный способ лечения стеноза сонной артерии. Однако применение существующих сосудистых заплат часто ассоциировано с возникновением тромбоза, рестеноза, кальцификации и других осложнений. **Цель исследования:** разработать биodeградируемые заплаты для артериальной реконструкции, содержащие в своем составе VEGF или RGD, и в сравнительном аспекте оценить их биосовместимость и эффективность в экспериментах *in vitro* и в ходе преclinical испытаний на модели крупных лабораторных животных. **Материалы и методы.** Биodeградируемые заплаты из смеси полигидроксипропаноата/валерата (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), PHBV) и поликапролактона (poly(ε-caprolactone), PCL) изготовлены методом электроспиннинга и модифицированы фактором роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) или пептидной последовательностью аргинин–глицин–аспарагиновая кислота (RGD) в различных конфигурациях. В экспериментах *in vitro* оценивали структуру поверхности, физико-механические и гемосовместимые свойства. В экспериментах *in vivo* оценивали эффективность разработанных сосудистых заплат в течение 6 месяцев после имплантации в сонную артерию 12 овец. Качество ремоделирования изучали с помощью гистологического и иммунофлуоресцентного исследований эксплантационных образцов. **Результаты.** Заплаты PHBV/PCL/VEGF обладали физико-механическими характеристиками, более приближенными к аналогичным показателям нативных сосудов, а методика их биофункционализации приводила к наименьшему падению прочностных показателей относительно немодифицированных аналогов PHBV/PCL. Модифицирование RGD-пептидами в 2 раза снижало прочность полимерных заплат, не оказывая влияния на их упруго-деформативные свойства. Инкорпорирование VEGF в полимерные волокна снижало агрегацию тромбоцитов при контакте с поверхностью заплат PHBV/PCL/VEGF и не увеличивало гемолиз эритроцитов. Спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец на основе заплат PHBV/PCL/VEGF формировалась полноценная новообразованная сосудистая ткань без признаков сопутствующего воспаления и кальцификации, что свидетельствует о высокой эффективности инкорпорированного в состав заплаты сосудистого эндотелиального фактора роста. Напротив, заплаты, модифицированные различными конфигурациями RGD-пептидов, объединяло наличие гиперплазии неоинтимы и хроническое гранулематозное воспаление, присутствовавшее в стенке заплат и развившееся в процессе биорезорбции полимерного каркаса. **Заключение.** Заплаты PHBV/PCL/VEGF обладали лучшей биосовместимостью и более пригодны для реконструкции сосудистой стенки по сравнению с PHBV/PCL/RGD.

Ключевые слова: сосудистая заплата, тканевая инженерия, полигидроксипропаноат/валерат, поликапролактон, фактор роста эндотелия сосудов, RGD-пептиды, биodeградируемые полимеры, эндотелизация.

Для корреспонденции: Антонова Лариса Валерьевна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6.
Тел. (905) 906-04-51. E-mail: antonova.la@mail.ru

Corresponding author: Larisa Antonova. Address: 6, Sosnovy Boulevard, Kemerovo, 650002, Russian Federation.
Phone: (905) 906-04-51. E-mail: antonova.la@mail.ru

TISSUE-ENGINEERED VASCULAR PATCHES: COMPARATIVE CHARACTERISTICS AND PRECLINICAL TEST RESULTS IN A SHEEP MODEL

L.V. Antonova¹, A.V. Mironov¹, A.R. Shabaev¹, V.N. Silnikov², E.O. Krivkina¹,
V.G. Matveeva¹, E.A. Velikanova¹, E.A. Senokosova¹, M.Yu. Khanova¹, V.V. Sevostyanova¹,
T.V. Glushkova¹, R.A. Mukhamadiyarov¹, L.S. Barbarash¹

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

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russian Federation

Carotid endarterectomy (CEA) with patch angioplasty is the most effective treatment for carotid artery stenosis. However, the use of existing vascular patches is often associated with thrombosis, restenosis, calcification and other complications. **Objective:** to develop biodegradable patches for arterial reconstruction, containing vascular endothelial growth factor (VEGF) or arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD), and comparatively evaluate their biocompatibility and efficacy in in vitro experiments and during preclinical trials in large laboratory animal models. **Materials and methods.** Biodegradable patches, made from a mixture of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) and poly(ϵ -caprolactone) (PCL), were fabricated by electrospinning and modified with VEGF or the peptide sequence RGD in different configurations. In in vitro experiments, the surface structure, physicochemical and hemocompatibility properties were evaluated. In in vivo experiments, we evaluated the effectiveness of the developed vascular patches for 6 months after implantation into the carotid artery of 12 sheep. The quality of remodeling was assessed using histological and immunofluorescence studies of explanted specimens. **Results.** The PHBV/PCL/VEGF patches had physicochemical characteristics closer to those of native vessels and their biofunctionalization method resulted in the smallest drop in strength characteristics compared with their unmodified PHBV/PCL counterparts. Modification with RGD peptides reduced the strength of the polymer patches by a factor of 2 without affecting their stress-strain behavior. Incorporation of VEGF into polymer fibers reduced platelet aggregation upon contact with the surface of the PHBV/PCL/VEGF patches and did not increase erythrocyte hemolysis. At month 6 of implantation into the carotid artery of sheep, the PHBV/PCL/VEGF patches formed a complete newly formed vascular tissue without signs of associated inflammation and calcification. This indicates the high efficiency of the VEGF incorporated into the patch. In contrast, the patches modified with different configurations of RGD peptides combined the presence of neointimal hyperplasia and chronic granulomatous inflammation present in the patch wall and developed during bioresorption of the polymer scaffold. **Conclusion.** PHBV/PCL/VEGF patches have better biocompatibility and are more suitable for vascular wall reconstruction than PHBV/PCL/RGD patches.

Keywords: vascular patch, tissue engineering, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), poly(ϵ -caprolactone), vascular endothelial growth factor, RGD peptides, biodegradable polymers, endothelialization.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности и инвалидизации населения всего мира. При этом лидерство сохраняется за атеросклерозом, вследствие которого происходит образование и увеличение атероматозной бляшки, что приводит к нарушению проходимости сосуда и ухудшению кровоснабжения тканей. При этом атеросклероз внутренней сонной артерии (ВСА), приводящий к каротидному стенозу, является причиной 10–15% всех случаев инсульта [1].

Основными способами хирургического лечения стеноза сонной артерии являются каротидная эндартерэктомия (КЭА) и стентирование [2]. В свою очередь, КЭА является «золотым стандартом» хирургического лечения и профилактики острого нарушения мозгового кровообращения, демонстрируя существ-

венное преимущество у асимптомных и симптомных больных с высокой степенью стеноза ВСА [2]. Однако наличие пролонгированных бляшек затрудняет выполнение данной процедуры стандартным и наиболее часто применяемым на практике эверсионным способом каротидной эндартерэктомии. В связи с этим хирурги вынуждены прибегать к закрытию артериотомного доступа с помощью заплаты [3, 4].

На сегодняшний день опубликовано большое количество работ со сравнительными результатами реконструкции сонной артерии с использованием биологических и синтетических заплат. S. Ren с коллегами не выявили разницы по частоте смертности, инсульта и рестеноза при использовании аутоветны, PTFE и Dacron [5]. Однако среднее время оперативного вмешательства было значительно больше при использовании PTFE или Dacron за счет длительного

гемостаза при кровотечениях из проколов иглы, тогда как в случае ангиопластики сонной артерии биологическим материалом (ксеноперикардом) отмечено значительное снижение кровотечений через проколы иглы. При этом использование искусственных заплат ассоциировано с инфицированием и тромбозом, а ксеноперикарда – с высоким риском кальцификации [5].

В недавнем метаанализе восьми рандомизированных контролируемых исследований по оценке эффективности использования заплат PTFE, Dacron и бычьего перикарда не обнаружено достоверных различий по широкому спектру осложнений, включая стеноз в отдаленном периоде [6].

По данным отечественных авторов, частота периперикардальных инсультов в группе с пластикой артерии ксеноперикардом составила 1,5%, а ишемических инсультов в ранний послеоперационный период – 0,26%, при этом данные осложнения не выявлены в группе с заплатами PTFE [7]. В отдаленные сроки наблюдения частота развития гемодинамически значимых рестенозов ВСА более 70% была выше при использовании заплат из PTFE (31,2%), чем при применении ксеноперикардальных лоскутов (9,8%).

Тканеинженерные сосудистые заплаты помогут избежать проблем, возникающих при использовании существующих материалов, благодаря восстановлению собственных тканей в месте имплантации. Для достижения такого результата биodeградируемый матрикс должен обладать высокой биосовместимостью, обеспечивать миграцию клеток в толщу материала, их пролиферацию и дифференцировку. При этом необходимость быстрого формирования из аутологичных клеток эндотелиального монослоя на внутренней поверхности заплат потребовала поиска способов стимуляции этого процесса. В ряде работ было показано, что большой потенциал в стимуляции эндотелизации и регенерации сосудистой стенки на основе тканеинженерного матрикса имеет фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) [8, 9]. Являясь основным ангиогенным фактором роста, VEGF стимулирует миграцию и выживание эндотелиальных клеток, а также привлечение прогениторных клеток из тока крови [10, 11].

Пептиды с последовательностью аргинил–глицил–аспарагиновая кислота (RGD) присутствуют в составе большинства белков внеклеточного матрикса. RGD-последовательность можно считать общим интегрин-связывающим мотивом [12]. Тем не менее тропность к эндотелиальным клеткам делает RGD идеальными агентами для модифицирования тканеинженерных конструкций, контактирующих с кровью и требующих скорейшей эндотелизации поверхности. При этом для модифицирования можно использовать как пептидные последовательности, полученные в ходе процедуры экстракции из при-

родного материала, так и искусственно синтезированные. Последние имеют ряд преимуществ: снижен риск иммунного ответа и инфекции, который может быть связан с недостаточной степенью очистки природного материала. При сравнении функциональных свойств естественных RGD-содержащих белков и их искусственных аналогов последние оказались более эффективны [13].

Таким образом, используемые на сегодняшний день заплаты не могут в полной степени удовлетворить потребности сосудистой хирургии, в том числе из-за отсутствия функциональной активности в плане формирования новообразованной сосудистой ткани на своей основе. Поэтому вопрос выбора заплаты, которая отвечала бы всем требованиям, необходимым для снижения риска развития осложнений в раннем и отдаленном послеоперационных периодах, остается по-прежнему актуальным.

Цель исследования – разработать биodeградируемые заплаты для артериальной реконструкции, содержащие в своем составе VEGF или RGD, и в сравнительном аспекте оценить их биосовместимость и эффективность в экспериментах *in vitro* и в ходе преclinical испытаний на модели крупных лабораторных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Изготовление биodeградируемых заплат с VEGF

Полимерные матриксы изготавливали методом эмульсионного электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония) по протоколу, описанному ранее [14]. Готовили смесь полимеров 5% полигидроксипропанат/валерат (poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate); PHBV, Sigma-Aldrich, США) и 10% поликапролактон (poly(ϵ -caprolactone), PCL, Sigma-Aldrich, США) в трихлорметане в соотношении 1 : 2. Далее в полимерный раствор в соотношении 20 : 1 вводили сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF (Sigma-Aldrich, США), разведенный в физиологическом растворе до концентрации 10 мкг/мл. Эмульсионный электроспиннинг проводили при следующих параметрах: напряжение – 20 кВ, скорость подачи раствора – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора – 200 об/мин, расстояние до коллектора – 15 см, игла – 22G. В качестве коллектора использовали металлический штифт диаметром 8,0 мм. Перед снятием со штифта матрикс разрезали вдоль и снимали отслаивающимися движениями.

В качестве группы контроля выступили немодифицированные заплаты, изготовленные методом электроспиннинга из полимерной смеси PHBV/PCL в трихлорметане в соотношении 1 : 2.

В качестве группы сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут «КемПериплас-Нео»

(ЗАО «НеоКор», Россия), который в настоящее время активно используется в клинике при проведении каротидной эндартерэктомии в качестве сосудистой заплаты.

2. Оценка распределения VEGF в процессе инкорпорирования в состав биодegradуемых заплат PNBV/PCL

Для оценки предполагаемой картины распределения VEGF, вводимого в жидкой фазе в раствор полимера, применена аналоговая технология инкорпорирования в состав PNBV/PCL-матрикса бычьего сывороточного альбумина (BSA), меченого флуорохромной меткой. Для этого раствор PNBV/PCL в хлороформе смешивали с раствором BSA-Texas Red® (Invitrogen, США) в фосфатно-солевом буфере (10 мкг/мл) в соотношении 20 : 1. Электроспиннинг проводили при напряжении 20 кВ, скорости подачи 0,5 мл/ч, в качестве коллектора использовали предметное стекло для микроскопии. Полученные образцы исследовали на микроскопе Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием светофильтра BP 546/12 FT 580 LP 590.

3. Изготовление биодegradуемых заплат с RGD и детекция аргининсодержащего пептида на поверхности заплат

Полимерные матрицы изготавливали методом электроспиннинга на установке Nanon-01A (MECC CO, Япония) по протоколу, описанному ранее [15].

Перед модификацией RGD-пептидами с поверхности матриц PNBV/PCL удаляли остатки масел и пыли, используя смесь 2-пропанола и воды в соотношении 1 : 1 с дальнейшим промыванием деионизированной водой. С целью активации полимерных поверхностей матрицы обрабатывали 10% этилендиамином (ЭДА), растворенным в 2-пропаноле при 37 °С в течение 1 часа. Затем матрицы тщательно промывали 0,3% раствором Tween-20 в деионизированной воде и высушивали на воздухе.

Далее в соответствии с ранее описанной методикой проводили первичную модификацию поверхности заплат аминокетонами, используя в качестве линкерной группы амин 4,7,10-триокса-1,13-тридекандиамин (Sigma-Aldrich, США) [16]. Дальнейшую модификацию поверхности заплат PNBV/PCL осуществляли RGD-содержащими пептидами производства «НаноТех-С» (Россия): RGDK (P1), AhRGD (P2), c[RGDFK] (P3) [16]. Таким образом, было получено 3 разновидности RGD-модифицированных заплат: PNBV/PCL/P1, PNBV/PCL/P2, PNBV/PCL/P3.

Методика определения наличия аргининсодержащего пептида была проведена по методу Сака-

гуччи [17]. В качестве положительного контроля использовали раствор аргинина / аспарагиновой кислоты (1 мг/мл в деионизированной воде). Референсные значения были взяты из работы Sedaghati et al. [18]. Окрашивание образца в оранжево-красный цвет свидетельствовало о наличии гуанидиниевой группы аргинина.

4. Оценка структуры поверхности сосудистых заплат до и после имплантации в сонную артерию овец

До имплантации образцы заплат PNBV/PCL, PNBV/PCL/VEGF, PNBV/PCL/RGD и «КемПериплас-Нео» размером 0,5 × 0,5 см подвергали золотопалладиевому напылению с получением покрытия толщиной 15 нм при использовании системы для напыления EM ACE200 (Leica Mikrosysteme GmbH, Австрия) и изучали на сканирующем электронном микроскопе S-3400N (Hitachi, Япония) в условиях высокого вакуума при ускоряющем напряжении 10 кВ.

5. Физико-механические испытания сосудистых заплат

Вырубку образцов немодифицированных и модифицированных заплат (n = 6 в каждой группе) осуществляли в продольном направлении. Механические свойства сосудистых заплат PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/RGD оценивали в условиях одноосного растяжения образцов на универсальной испытательной машине (Zwick/Roell, Германия) по методике, описанной ранее [14]. Оценку прочности и упругодеформативных свойств проводили с использованием датчика с номинальной силой 50 Н и скорости перемещения траверсы при испытании 10 мм/мин. Прочность материала оценивали по максимальному напряжению при растяжении (МПа). Эластичность и жесткость материала оценивали по относительному удлинению, скорректированному с учетом характера разрушения образцов (%), и модулю Юнга (МПа). Для измерения толщины образцов использовали толщиномер с пределом допустимой погрешности ±0,01 мм (измерительное усилие не более 1,5 Н). В качестве контроля использовали сонную артерию овцы и внутреннюю грудную артерию человека (*A. mammaria*). Сегменты *A. mammaria* человека забирали при проведении операции аортокоронарного шунтирования у пациентов, подписавших Договор информированного согласия на взятие материала. В качестве групп сравнения использовали ксеноперикардальный лоскут «КемПериплас-Нео» (ЗАО «НеоКор», Россия) и немодифицированные образцы PNBV/PCL. Вырубку образцов осуществляли в продольном направлении.

6. Оценка гемосовместимых свойств заплат

С целью оценки гемосовместимых свойств разработанных заплат исследовали гемолиз эритроцитов и агрегацию тромбоцитов после контакта свежей цитратной крови и обогащенной тромбоцитами плазмы с поверхностью заплат. Исследования выполнены в соответствии с методиками, описанными в статье [19].

7. Имплантация биодеградируемых сосудистых заплат в сонную артерию овец

Серия экспериментов проведена на овцах эдильбаевской породы массой 42–45 кг, все животные – несуклящие самки. Животные оперированы последовательно. При выполнении экспериментальных исследований руководствовались требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г., Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, принципами Европейской конвенции (г. Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Работа одобрена локальным этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» (протокол № 15 от 11.09.2018 г.).

Была проведена имплантация в сонную артерию овец биодеградируемых сосудистых заплат PNBV/PCL/VEGF ($n = 3$), PNBV/PCL/P1 ($n = 3$), PNBV/PCL/P2 ($n = 3$) и PNBV/PCL/P1 ($n = 3$). Размер заплат $40,0 \times 4,0$ мм. Продолжительность наблюдения после имплантации составила 6 месяцев.

Анестезиологическое пособие: премедикация – ксилазин (Ксиланит) 0,05–0,25 мл на 10 кг массы животного + атропин 1 мг в/м; вводный наркоз – 5–7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд после вводится атракурия безилат (Риделат) в/в, доза 0,5–0,6 мг/кг. Интубация трахеи эндотрахеальной трубкой диаметром 9,0. Поддержание наркоза: Севоран 2–4 об%, Риделат вводили путем непрерывной инфузии со скоростью 0,3–0,6 мг/кг/ч.

Мониторинг: АД, ЧСС, SpO₂. ИВЛ: ЧД – 12–15/мин, РЕЕР 7–9 mbar, ДО 6–8 мл/кг, FiO₂ – 40–60%.

Основной этап: доступ к сонной артерии; системная гепаринизация – 5000 ЕД в/в; пережатие сонной артерии, продольный разрез сонной артерии длиной 40 мм, имплантация сосудистых заплат размером 40×4 мм отдельными узловыми швами нитью Prolene 6/0 (Ethicon, США). Стандартный протокол профилактики воздушной эмболии и запуск кровотока; ушивание раны нитью Vicril 2,0 (Ethicon, США); обработка шва клеем БФ, эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл; экстубация.

Интраоперационное медикаментозное введение: инфузия 0,9% NaCl 500 мл – в/в капельно; Аксетин (цефуросим) 1,5 г – в/в капельно.

Послеоперационное медикаментозное ведение: антибиотикотерапия (Аксетин (цефуросим) 1,5 г – в/м 2 р/сут + эноксапарин натрия подкожно 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл в течение 5 дней. При доказанной проходимости сосудов с имплантированными заплатами: клопидогрел 75 мг перорально 1 р/сут + гепарин натрия 5000 ЕД подкожно 2 р/сут).

Послеоперационный УЗ-скрининг проходимости сосудов с заплатами выполняли спустя 1 и 5 суток, далее – 1 раз в 3 месяца вплоть до предполагаемого срока вывода животного из эксперимента.

8. Гистологическое исследование эксплантированных образцов биодеградируемых сосудистых заплат

Эксплантированные образцы сосудистых заплат с прилегающими участками сонной артерии делили на 2 части. Одну часть замораживали при температуре -140 °С для последующего иммунофлуоресцентного исследования. Вторую часть использовали для осуществления гистологического исследования с использованием окрасок гематоксилином-эозином, по Ван-Гизону и ализариновым красным С, технология которых описана ранее [14].

После каждого вида окрашивания все образцы исследовали с помощью световой микроскопии с использованием микроскопа AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 50$, $\times 100$ и $\times 200$.

9. Иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных образцов биодеградируемых сосудистых заплат

Из замороженных участков эксплантированных сосудистых заплат изготовлены серийные криосрезы толщиной 8 мкм с помощью криотома (Thermo Scientific, США). Препараты фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин. Перед окраской на внутриклеточные маркеры проводили пермеабиллизацию срезов обработкой раствором Triton-X100 (Sigma-Aldrich, США) в течение 15 мин. Далее срезы окрашивали первичными антителами в следующих сочетаниях: кроличьи антитела к CD31 (Abcam, Великобритания) и мышьиные антитела к α -актину гладкомышечных клеток (α -SMA, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к фактору фон Виллебранда (vWF, Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену IV типа (Abcam, Великобритания) и мышьиные антитела к коллагену I типа (Abcam, Великобритания); кроличьи антитела к коллагену III типа (Novus Biologicals, США). Срезы инкубировали с антителами в течение ночи

при 4 °С, затем со вторичными антителами козы к IgG кролика, конъюгированными с Alexa Fluor 488-conjugated (Thermo Fisher, США), и антителами козы к IgG мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 555-conjugated (Thermo Fisher Scientific, США), в течение 1 часа при комнатной температуре. На всех этапах окрашивания для промежуточной отмывки срезов использовали фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,1% Tween (Sigma-Aldrich, США). Для удаления автофлуоресценции срезы обрабатывали Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, США) по методике производителя. Ядра контрастировали при помощи окраски DAPI (10 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) в течение 30 минут. Окрашенные препараты заключали под покровное стекло с использованием монтирующей среды ProLong (Thermo Fisher, США). Препараты анализировали с помощью сканирующего лазерного микроскопа конфокального микроскопа LSM 700 (Carl Zeiss, Германия).

10. Статистическая обработка данных

Анализ полученных данных проводили с помощью Prism (Graph Pad Software). Нормальность

распределения оценивали критерием Колмогорова – Смирнова. При сравнении двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни. При сравнении трех и более независимых групп применяли непараметрический критерий Краскела–Уоллиса, при попарном сравнении групп использовали критерий Данна. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы и 25-го и 75-го перцентиля Me (25%; 75%).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изготовления биодеградируемых сосудистых заплат с VEGF использована технология эмульсионного электроспиннинга, с помощью которой можно вводить в состав полимерного волокна биологически активные молекулы, способные в дальнейшем контролироваться и стабильно высвобождаться из матрикса в процессе его резорбции [20–22].

Для оценки картины распределения VEGF, вводимого в жидкой фазе в раствор полимера, выполнен аналоговый эксперимент с бычьим сывороточным альбумином, меченым флуорохромной меткой Texas Red и инкорпорированным в состав матрикса PHBV/PCL. На рис. 1, а, б, видно, что водные домены

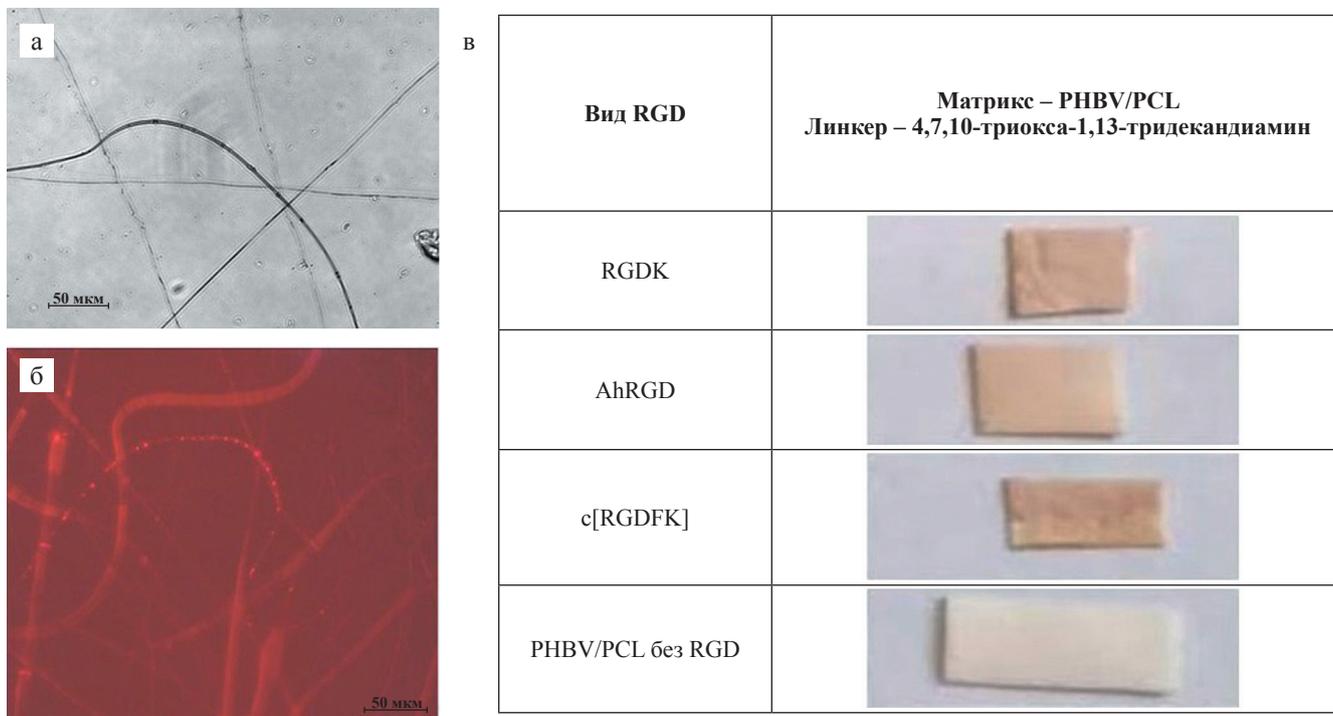


Рис. 1. Результаты тестов, подтверждающие включение/присоединение биологически активных пептидов в структуру / к поверхности матрикса: а, б – инкорпорирование флуоресцентно меченого BSA в состав матрикса PHBV/PCL в процессе эмульсионного электроспиннинга: а – световая микроскопия, $\times 400$; б – флуоресцентная микроскопия, $\times 400$; в – результаты детекции RGD-пептидов на поверхности матриксов PHBV/PCL, полученные с использованием теста Сакагучи

Fig. 1. Test results confirming the incorporation/attachment of bioactive peptides into the structure/ to the matrix surface: а, б – incorporation of fluorescein-labeled BSA into the PHBV/PCL scaffold during emulsion electrospinning: а – light microscopy ($400\times$); б – fluorescence microscopy ($400\times$); в – results of RGD peptide detection on the surface of PHBV/PCL scaffold obtained using Sakaguchi test

с BSA-Texas Red равномерно распределены в толще полимерного волокна по всей его длине. При этом нарушении структуры волокна не выявлено.

Модифицирование RGD-пептидами биodeградируемых заплат PHBV/PCL, изготовленных методом электроспиннинга, было выполнено для биофункционализации внутренней поверхности заплат с целью привлечения и полноценной адгезии зрелых и прогениторных эндотелиальных клеток и формирования эндотелиального монослоя. Трипептид RGD выбран в качестве модифицирующего агента, так как является сайтом клеточной адгезии и присутствует в структуре большинства белков естественного внеклеточного матрикса. Посредством химического синтеза были получены три конфигурации RGD: RGDK (линейная конфигурация молекулы, последовательность Arg-Gly-Asp-Lys), AhRGD (линейная конфигурация молекулы, последовательность Ah-Arg-Gly-Asp и с[RGDFK] (циклическая конфигурация молекулы, последовательность с[Arg-Gly-Asp-Phe-Lys]).

При синтезе линейной молекулы RGDK использовали L-лизин, который содержит две аминогруппы (-NH₂) и одну карбоксильную группу (-COOH) и используется для поверхностной модификации различных материалов с целью повышения их адгезивных свойств и улучшения биосовместимости [23]. При синтезе линейной молекулы AhRGD к базовому адгезивному трипептиду аргинин-глицин-аспарагиновая кислота был присоединен синтетический аналог L-лизина – аминокaproновая кислота (Ah). Аминокaproновая кислота используется в медицинской практике как антифибринолитический препарат в силу своей способности тормозить процесс фибринолиза. Циклические конфигурации RGD с постоянной геометрией молекулы, по литературным данным, способны демонстрировать максимальное сродство с клеточными рецепторами в сравнении с их линейными аналогами [24]. Поэтому третьей разновидностью RGD, использованного для проведения поверхностной модификации сосудистых заплат, стал циклический RGD-пептид с[RGDFK].

Ранее нами было доказано, что длина линкера значимо влияет на доступность RGD-пептидов для рецепторов клеток, поэтому в настоящей работе при аминокaproнолизе поверхности матриксов PHBV/PCL был использован протяженный гидрофильный линкер 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine [16]. Введение RGD-пептида выполняли посредством кросс-сшивающего реагента. Наличие пептидов на полимерной поверхности подтверждено с использованием теста Сакагучи на наличие аргинина (рис. 1, в) [17]. После ковалентной пришивки RGD-пептида светло-желтая окраска не исчезала после промывки образцов полимерных заплат PHBV/PCL/RGD. Светло-желтое окрашивание немодифицированных аналогов PHBV/

PCL, не содержащих на своей поверхности RGD, исчезало при промывках.

Структурные особенности заплат

Сканирующая электронная микроскопия поверхности биodeградируемых сосудистых заплат проведена в сравнении с ксеноперикардальной заплатой «КемПериплас-Нео» (ЗАО «Неокор», г. Кемерово), которая активно используется в клинике при эндартерэктомии внутренних сонных артерий. Показана сохранность нативной архитектоники ксеноперикардального лоскута, заключающаяся в рельефности, обусловленной извитостью коллагеновых волокон. Высокая плотность расположения коллагеновых волокон обусловила отсутствие пор.

Сканирующая электронная микроскопия поверхности полимерных заплат до имплантации в сосудистое русло показала, что все биodeградируемые образцы, как немодифицированные, так и содержащие VEGF или RGD, имели высокопористую структуру и состояли из микроразмерных разнонаправленных волокон (рис. 2). Диаметр волокон PHBV/PCL/VEGF составил $1,47 \pm 0,67$ мкм и был в 1,8 раза меньше данного показателя для PHBV/PCL/RGD и немодифицированных PHBV/PCL ($2,64 \pm 1,14$ мкм; $p < 0,05$), что связано с использованием эмульсионного электроспиннинга для изготовления заплат с VEGF.

Дополнительное модифицирование RGD не приводило к изменению архитектоники поверхности заплат (рис. 2).

Механические свойства заплат

Результаты механических испытаний демонстрируют, что прочность заплат PHBV/PCL/VEGF была в 1,7 раза меньше, чем у заплат PHBV/PCL, не содержащих VEGF ($p < 0,05$) (табл. 1). Однако при этом прочность PHBV/PCL/VEGF полностью соответствовала таковой у внутренней грудной артерии человека и в 1,9 раза превышала прочность сонной артерии овцы. Сила, прикладываемая к образцу до начала его разрушения, у заплат PHBV/PCL/VEGF была в 2,1 раза выше, чем у *A. mammaria*, в 1,9 раза выше, чем у сонной артерии овцы, и в 1,5 раза ниже, чем у образцов PHBV/PCL ($p < 0,05$). Отличия показателей между PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL могут быть связаны с тем, что водные домены с ростовым фактором внутри волокна создают дополнительные точки, не способные выдерживать нагрузку. В этих местах чаще всего происходит повреждение полимерной нити, что и влечет за собой снижение прочности и уменьшение силы, необходимой для разрыва.

Также не наблюдали достоверного изменения относительного удлинения в полимерных заплатах после введения ростового фактора по сравнению

с немодифицированными аналогами (табл. 1). Введение VEGF позволило снизить жесткость полимерного матрикса в 1,3 раза ($p < 0,05$).

При предварительном изучении физико-механических свойств биodeградируемых заплат, поверхность которых была модифицирована различны-

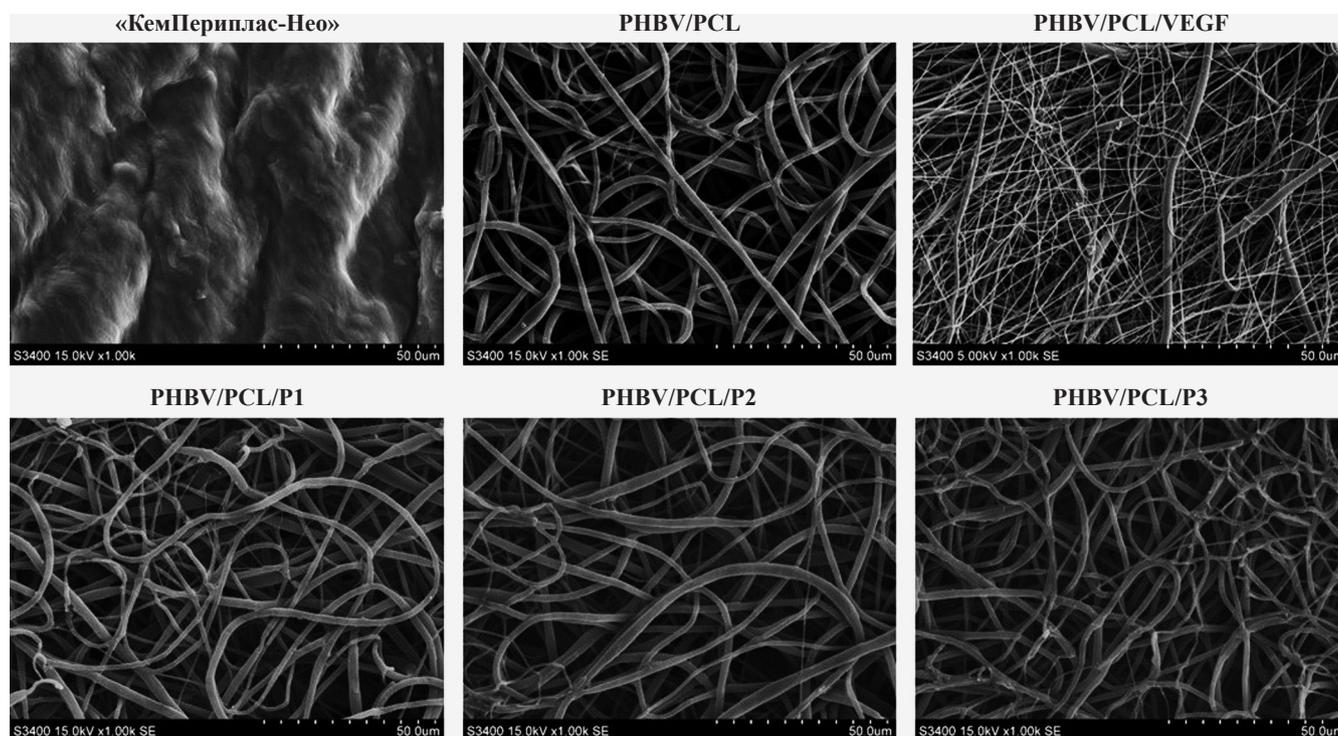


Рис. 2. Морфология внутренней поверхности сосудистых заплат из PHBV/PCL, PHBV/PCL/VEGF, PHBV/PCL/RGD и ксеноперикардальной заплаты «КемПериплас-Нео». Сканирующая электронная микроскопия, $\times 1000$

Fig. 2. Morphology of the inner surface of vascular patches PHBV/PCL, PHBV/PCL/VEGF, PHBV/PCL/RGD and xeno-pericardial patch KemPeriplas-Neo. Scanning electron microscopy, $1000\times$

Таблица 1

Физико-механические свойства полимерных заплат PHBV/PCL до и после инкорпорирования VEGF и модифицирования RGD в сравнении с лоскутом «КемПериплас-Нео» и *A. mammaria*. Данные представлены как Me (25–75%)

Physicomechanical properties of PHBV/PCL polymer patches before and after VEGF incorporation or RGD modification in comparison with the KemPeriplas-Neo flap and *A. mammaria*. Data are presented as Me (25–75%)

	Напряжение, МПа	F_{\max} , Н	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа	Толщина образца, мм
PHBV/PCL	3,9 (2,88–4,5)*/**#	3,0 (2,59–3,3)*/**#	102,7 (79,37–106,3)*/**#	21,8 (19,2–25,2)*/**#	0,4 (0,35–0,5)*
PHBV/PCL/VEGF	2,25 (2,14–2,6)**#	1,97 (1,82–2,3)*#	81,83 (77,0–103,4)*/**	16,9 (15,5–17,5)*/**#	0,43 (0,4–0,5)*
PHBV/PCL/RGD	1,2 (1,12–1,3)*#	1,3 (1,2–1,4)*#	102,6 (80,38–144,1)*/**#	21,8 (20,15–23,9)*/**#	0,5 (0,49–0,5)*
Сонная артерия овцы	1,2 (1,06–1,9)*	1,01 (0,88–1,42)	158,5 (126,0–169,5)*	0,49 (0,39–0,66)*	0,25 (0,23–0,3)
<i>A. mammaria</i> человека	2,48 (1,36–3,25)**	0,92 (0,59–1,72)	29,72 (23,51–39,62)**	2,42 (1,87–3,19)**	0,27 (0,24–0,3)#
«КемПериплас-Нео»	10,06 (9,12–21,38)*/**#	15,4 (12,6–26,2)*/**#	64,96 (61,08–72,6)*/**#	1,11 (1,02–1,34)#	0,69 (0,63–0,7)*

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно *A. mammaria*; ** – $p < 0,05$ относительно сонной артерии овцы; # – $p < 0,05$ относительно PHBV/PCL; # – $p < 0,05$ относительно «КемПериплас-Нео».

Note. * – $p < 0.05$ versus *A. mammaria*; ** – $p < 0.05$ versus sheep carotid artery; # – $p < 0.05$ versus PHBV/PCL; # – $p < 0.05$ versus KemPeriplas-Neo.

ми RGD-содержащими пептидами, достоверных межгрупповых различий не выявлено. Поэтому для дальнейшего сравнения физико-механических параметров модифицированных заплат с немодифицированными аналогами, ксеноперикардальным лоскутом и нативными сосудами человека и овцы все образцы заплат, модифицированные RGD-пептидами, были объединены в одну группу – PHBCV/PCL/RGD.

Выявлено, что прочность PHBV/PCL/RGD была идентична прочности сонной артерии овцы, но оказалась в 2 раза ниже, чем у *A. mammaria* ($p < 0,05$). Сила, приложенная к образцу до начала его разрушения, у заплат PHBV/PCL/RGD не отличалась от аналогичного показателя нативных сосудов, но была в 1,5 раза ниже, чем у заплат PHBV/PCL/VEGF, и в 2,3 раза ниже, чем у немодифицированных PHBV/PCL ($p < 0,05$). Относительное удлинение всех биодеградируемых заплат не отличалось между собой, но было в среднем в 3,2 раза выше, чем у *A. mammaria*, в 1,5 раза выше, чем у ксеноперикардальных заплат, и в 1,7 раза ниже, чем у сонной артерии овцы ($p < 0,05$). Модуль Юнга у немодифицированных заплат и за-

плат PHBV/PCL/RGD превысил аналогичный показатель сонной артерии овцы в 44 раза, *A. mammaria* – в 9 раз, ксеноперикардального лоскута – в 19,6 раза, образцов PHBV/PCL/VEGF – в 1,3 раза ($p < 0,05$).

Все биодеградируемые сосудистые заплаты вне зависимости от способа проведенной модификации были достоверно менее прочными и более жесткими, чем ксеноперикардальный лоскут, на что указали такие показатели, как напряжение, сила и модуль Юнга (табл. 1). Однако «КемПериплас-Нео» по своим физико-механическим характеристикам значительно отличался и от *A. mammaria*, и от сонной артерии овцы. Так, напряжение и сила, приложенная к образцу до начала его разрушения, у ксеноперикарда оказалась в 4 и 16,7 раза выше, чем у *A. mammaria*, и в 8,4 и 15,2 раза выше, чем у сонной артерии овцы ($p < 0,05$). При этом модуль Юнга у «КемПериплас-Нео» оказался в 2,6 раза ниже, чем у внутренней грудной артерии, и в 2,3 раза ниже, чем у сонной артерии овцы, хотя толщина ксеноперикардального лоскута в 2,6 раза превышала толщину стенок нативных сосудов ($p < 0,05$).

Таким образом, заплаты PHBV/PCL/VEGF обладали физико-механическими характеристиками, более приближенными к аналогичным показателям нативных сосудов, а методика их биофункционализации приводила к наименьшему падению прочностных показателей относительно немодифицированных аналогов PHBV/PCL. Модифицирование RGD снижало прочность полимерных заплат, не оказывая влияния на их упруго-деформативные свойства.

Таблица 2

Степень гемолиза эритроцитов и максимум агрегации тромбоцитов крови человека после контакта с полимерными заплатами PHBV/PCL до и после модифицирования VEGF или RGD в сравнении с ксеноперикардальным лоскутом «КемПериплас-Нео»

Degree of hemolysis and maximum aggregation of human blood platelets after contact with PHBV/PCL polymer patches before and after VEGF incorporation or RGD modification in comparison with xeno-pericardial flap KemPeriplas-Neo

Вид образца	Степень гемолиза эритроцитов, %	Максимум агрегации тромбоцитов, %
	Me (25–75%)	Me (25–75%)
PHBV/PCL	0,5 (0–1,01)*	87,23 (83,95–89,84)*■
PHBV/PCL/VEGF	0,5 (0–1,01)*	81,35 (81,01–88,51)*
PHBV/PCL/RGD	0,72 (0–0,72)*	86,15 (82,24–87,43)*■
«КемПериплас-Нео»	2,12 (0,9–3,95)	93,32 (84,24–96,42)■
Интактная обогащенная тромбоцитами плазма	–	74,65 (72,45–75,31)

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно значений для лоскута «КемПериплас-Нео»; ■ – $p < 0,05$ относительно интактной обогащенной тромбоцитами плазмы.

Note. * – $p < 0,05$ versus values for the KemPeriplas-Neo flap; ■ – $p < 0,05$ versus intact platelet-rich plasma.

Результаты гемолиза эритроцитов

Степень гемолиза эритроцитов после контакта с модифицированными VEGF, RGD, а также немодифицированными заплатами PHBV/PCL составила соответственно 0,5; 0,72 и 0,5%, без статистически достоверных различий (табл. 2), что подтверждает их высокую гемосовместимость [25].

Уровень гемолиза эритроцитов после их контакта с поверхностью лоскутов «КемПериплас-Нео» в 3 раза превысил таковые после контакта эритроцитов с поверхностью биодеградируемых заплат, однако не вышел за пределы допустимых значений [25].

Результаты агрегации тромбоцитов

Результаты проведенного исследования показали, что агрегационная активность тромбоцитов при контакте с поверхностью заплат PHBV/PCL и PHBV/PCL/RGD превышала данный показатель интактной ОТП в 1,2 раза ($p < 0,05$). Максимум агрегации тромбоцитов после контакта с образцами PHBV/PCL/VEGF был самым низким среди всех биодеградируемых образцов.

При контакте тромбоцитов с поверхностью лоскута «КемПериплас-Нео» выявлено самое значительное повышение максимума агрегации до 93,32% (84,24; 96,42), что в 1,3 раза превысило максимум агрегации тромбоцитов интактной ОТП ($p < 0,05$). Достоверной разницы между ксеноперикардальным лоскутом и заплатами PNBV/PCL до и после модифицирования VEGF или RGD не выявлено (табл. 2).

Таким образом, полимерные заплаты PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/RGD вызывали меньшую степень гемолиза эритроцитов и агрегации тромбоцитов, чем лоскут «КемПериплас-Нео».

Результаты имплантации биodeградируемых сосудистых заплат в сонную артерию овец

Ранее на модели крысы нами была изучена биосовместимость и эффективность заплат с VEGF и различными конфигурациями RGD в сравнительном аспекте с немодифицированными заплатами PNBV/PCL и ксеноперикардальными лоскутами «КемПериплас-Нео» [14, 16]. Биodeградируемые заплаты демонстрировали удобство в имплантации. На протяжении всего эксперимента не отмечали кровотечений и нарушений целостности имплантатов. Было доказано, что спустя 12 месяцев имплантации сосуды, протезированные PNBV/PCL/VEGF, характеризовались 100% проходимостью и отсутствием гиперплазии неоинтимы. Зрелый эндотелиальный монослой на внутренней поверхности заплат PNBV/PCL/VEGF полностью формировался через 3 месяца, в то время как на немодифицированных аналогах PNBV/PCL – только через 12 месяцев. Ремоделирование заплат сопровождалось их заселением клетками с формированием внеклеточного матрикса.

При долгосрочной имплантации в аорту крыс заплат PNBV/PCL/RGD доказано, что на их основе способны формироваться элементы новообразованной сосудистой ткани: происходит как миграция клеточных элементов в толщу заплат, так и образование неоинтимальной выстилки с эндотелиальным слоем со стороны просвета сосуда, в особенности при модифицировании заплат пептидами P3 и P1 [16].

Полимерные заплаты PNBV/PCL, модифицированные VEGF или RGD, подвергались незначительному кальцинозу спустя 12 месяцев имплантации в аорту крыс. При этом заплаты PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/P1 демонстрировали максимальную устойчивость к процессам кальцификации.

Ксеноперикардальные лоскуты «КемПериплас-Нео» были не способны поддерживать на своей основе развитие новообразованной сосудистой ткани и эндотелиального слоя, а также склонны к кальцификации уже после одного месяца имплантации в аорту крысы. Спустя 12 месяцев имплантации лоскутов

«КемПериплас-Нео» выявлено массивное отложение кристаллического кальция в 100% имплантированных лоскутов и расслоение их стенки, приведшее к деформации формы. Также спустя 12 месяцев имплантации в 50% ксеноперикардальных лоскутов обнаружена гиперплазия неоинтимы, толщина которой почти в 3 раза превосходила толщину стенки аорты крысы [14, 16].

Проведенные испытания на модели крысы подтвердили низкую эффективность и биосовместимость ксеноперикардальных лоскутов и недостаточную способность немодифицированных PNBV/PCL формировать на своей основе новообразованную сосудистую ткань. Поэтому в протокол преклинических испытаний на овцах были включены только заплаты PNBV/PCL/VEGF, PNBV/PCL/P1, PNBV/PCL/P2, PNBV/PCL/P3.

Для имплантации разработанных сосудистых заплат использовали овечью модель, которая является оптимальной для тестирования сердечно-сосудистых имплантатов *in vivo*, так как пригодна для «моделирования наихудшего случая» вследствие повышенной склонности их сосудов к кальцификации, а крови – к гиперкоагуляции. Поэтому использование овечьей модели позволяет провести максимально строгое тестирование сосудистых протезов, в том числе на предмет их дегенерации *in vivo* [26–30]. Помимо этого, овцы считаются оптимальной животной моделью для оценки роста, проходимости, эндотелизации, тромборезистентности и постимплантационной визуализации изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии.

Известно, что высокая пористость тканеинженерного матрикса и наноразмерные волокна в его структуре способны обеспечить клеточную миграцию внутрь матрикса и раннюю эндотелизацию его поверхности за счет схожести структуры поверхности со структурой естественного внеклеточного матрикса и большей площади взаимодействия клеток и искусственного матрикса [31–33]. В свою очередь, эффективная инфильтрация клеток в толщу пористого материала способствует его лучшей интеграции с нативными тканями в месте имплантации.

Две овцы (с имплантированными заплатами PNBV/PCL/P1 и PNBV/PCL/P2) не дожили до предполагаемого срока вывода из эксперимента, погибнув спустя 14 дней из-за образования массивных паравазальных гематом вокруг оперированных сосудов. Скорее всего, это было связано с микроповреждениями стенки заплат, возникшими в ответ на пульсовую волну после имплантации, так как сразу после имплантации кровотечения из зон наложенных швов не наблюдали и гемостаз был достигнут в течение 2 минут.

Все овцы с имплантированными заплатами PNBV/PCL/VEGF и PNBV/PCL/P3 дожили до предполагае-

мого срока вывода из эксперимента. На протяжении шести месяцев наблюдения сосуды с имплантированными заплатами сохраняли свою проходимость. Аневризматического расширения сосудов в зоне имплантированных заплат не обнаружено. Однако во всех сосудах с заплатами, содержащими RGD, выявлено повышение скорости кровотока, что может быть косвенным отображением сужения просвета сосуда.

По результатам морфологического исследования (гистологическое исследование и сканирующая электронная микроскопия) заплат с сосудистым эндотелиальным фактором роста видно, что спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец на основе данных заплат сформировалась полноценная трехслойная новообразованная сосудистая ткань (рис. 3).

Тонкая неоинтима, покрытая слоем эндотелиоподобных клеток со стороны просвета сосуда, выстилала всю внутреннюю поверхность заплат. Основную толщу неоинтимы составили гладкомышечные клетки. Далее следовала собственно заплата. Отмечены процессы видимой биодеградации полимерного матрикса, сопровождавшиеся нарушением его целостности, видимой только при микроскопии образцов. Заплата PNBV/PCL/VEGF была заполнена клеточными элементами (макрофагами, фибробластоподобными и гладкомышечными клетками, немногочисленными гигантскими клетками инородного тела), пронизана пучками коллагеновых волокон. В толще заплат встречались *vasa vasorum*. Внешний слой заплат содержал все структурные элементы, свойственные естественному адвентициальному слою: волокна коллагена, фибробласты и фиброциты, единичные гигантские клетки инородного тела, лимфоидные фолликулы и *vasa vasorum*. Признаки кальцификации отсутствовали.

При изучении гистологической картины эксплантированных образцов заплат PNBV/PCL/RGD получена однотипная картина – во всех образцах присутствовала гиперплазия неоинтимы. Толщина неоинтимы при этом соответствовала толщине стенки самой заплаты. Поверхность неоинтимы, обращенная в просвет сосуда, была покрыта монослоем клеток. Стенки заплат были частично резорбированы и содержали умеренное количество гигантских многоядерных клеток инородного тела. Также в стенках заплат присутствовали макрофаги, гладкомышечные и фибробластоподобные клетки, пучки коллагеновых волокон, формировались *vasa vasorum*.

Гистологическое исследование с окраской ализариновым красным С показало, что отложение кальция в эксплантированных заплатах PNBV/PCL/RGD отсутствовало.

Большая протяженность имплантированных заплат позволила при проведении иммунофлуоресцентного исследования выполнить срезы таким образом,

чтобы напротив заплат находилась стенка сонной артерии, в которую имплантировали заплату (рис. 4). Данное расположение привело к лучшей визуализации сходства новообразованной сосудистой ткани, сформированной на основе заплат за 6 месяцев их имплантации, с нативной сонной артерией овцы. Доказано, что неоинтима, сформировавшаяся на внутренней поверхности заплат PNBV/PCL/VEGF, состояла из гладкомышечных клеток, о чем свидетельствовало присутствие в клетках α -актина. Со стороны просвета сосуда неоинтима на всем своем протяжении была выстлана зрелыми эндотелиальными клетками CD31+, секреторирующими фактор фон Виллебранда vWF+. Коллаген IV типа формировал базальную мембрану, на которой располагались эндотелиальные клетки, и в большом количестве определялся как в толще стенки заплаты, так и в стенке сонной артерии овцы. Коллаген III типа формировался во всей толще заплат с преимущественной концентрацией у базальной мембраны и в неоинтимае.

Таким образом, на основе биодеградируемой заплаты VEGF спустя 6 месяцев ее имплантации в сонную артерию овцы формировалась полноценная новообразованная сосудистая ткань. Исключение составил эластин, который не определялся ни после имплантации заплат в аорту крыс, ни после имплантации заплат в сонную артерию овец. Тем не менее инкорпорированный VEGF способствовал гармонизации процессов формирования ткани *in situ* без признаков развития хронического гранулематозного воспаления, гиперплазии неоинтимы и кальцификации.

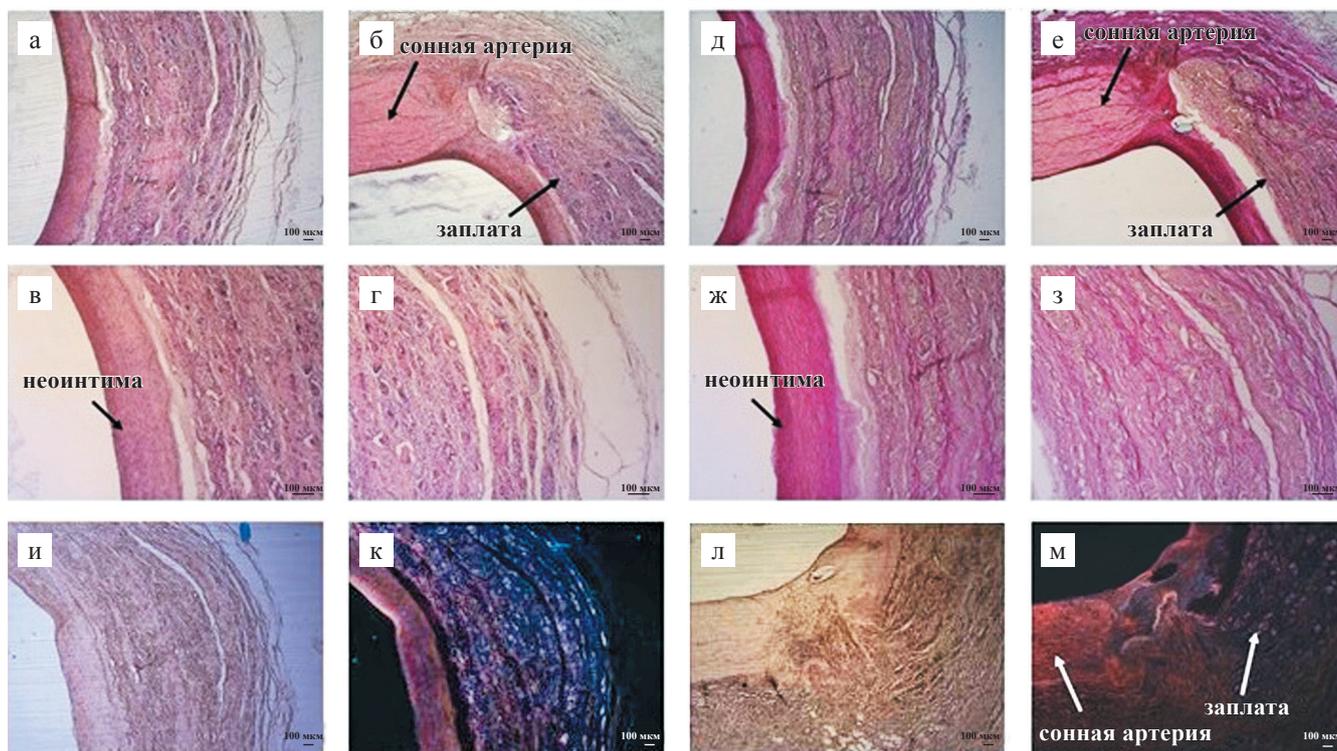
При проведении иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплат PNBV/PCL/RGD выявлены те же структурные элементы новообразованной сосудистой ткани, что и в заплатах PNBV/PCL/VEGF: эндотелиальный монослой, состоявший из зрелых эндотелиальных клеток CD31+vWF+; коллаген I, III и IV типа. Однако обращает на себя внимание большее количество гладкомышечных клеток в неоинтимае и высокая общая клеточность стенки заплат, обусловленная наличием хронического гранулематозного воспаления, а также меньшее количество коллагена III типа относительно заплат PNBV/PCL/VEGF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективность использования проангиогенного ростового фактора VEGF и различных конфигураций RGD-пептидов, а также различных подходов к модифицированию изделия была оценена в сравнительном аспекте *in vitro* и в преclinical испытаниях на модели овцы.

Выявленное преимущество биодеградируемых заплат PNBV/PCL/VEGF заключалось в том, что инкорпорирование VEGF в состав заплаты в процессе ее

PHBV/PCL/VEGF



PHBV/PCL/RGD

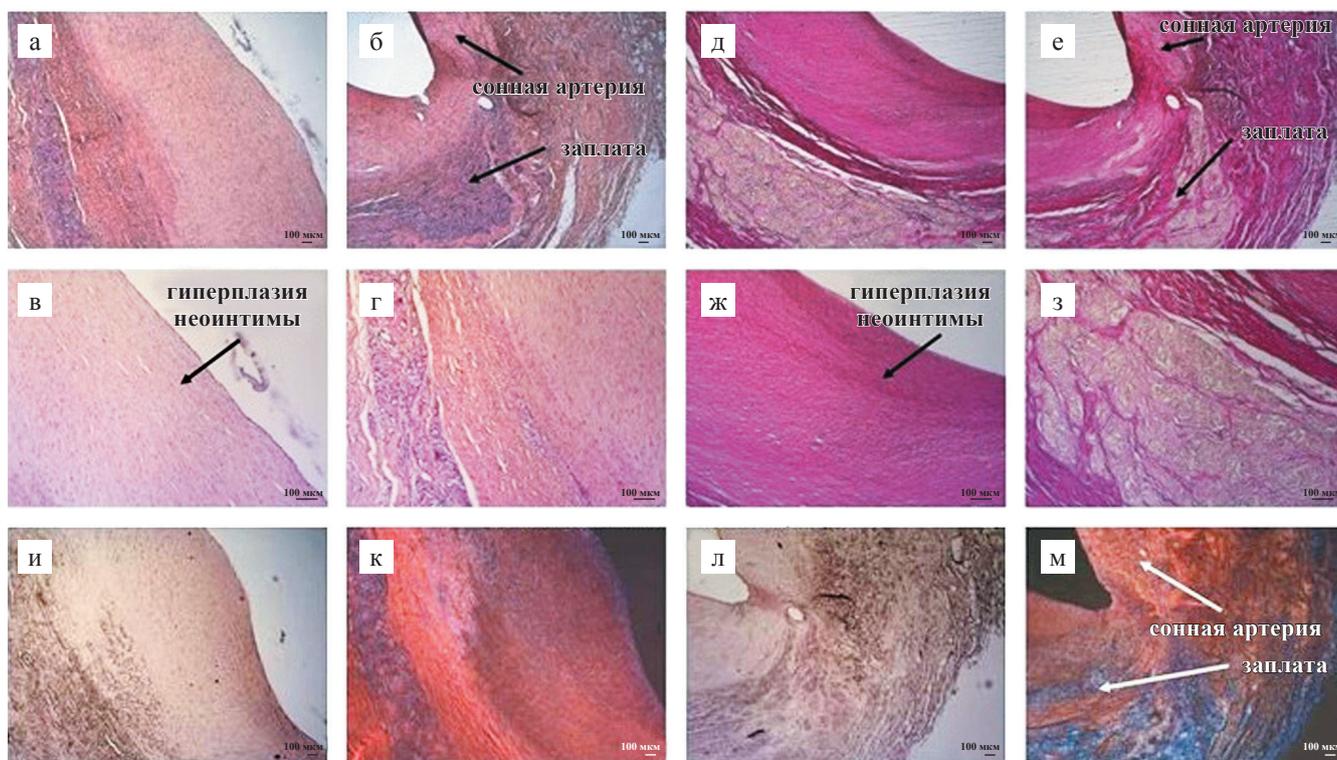


Рис. 3. Результаты гистологического исследования сосудистых заплат PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD спустя 6 месяцев имплантации в сонную артерию овец: а–г – окраска гематоксилином-эозином; д–з – окраска по Ван-Гизону; и–м – окраска ализариновым красным С (и, л – световая микроскопия; к, м – флуоресцентная микроскопия); а, д, и, к – центральная часть заплат; б, е, л, м – стык заплат и сонной артерии в зоне анастомоза; в, ж – внутренний и средний слой стенки заплат; г, з – средний и наружный слой стенки заплат; а, б, д, е, и–м – $\times 50$, в, г, ж, з – $\times 100$

Fig. 3. Results of histological examination of vascular patches PHBV/PCL/VEGF and PHBV/PCL/RGD after 6 months of implantation in the carotid artery of sheep: а–г – hematoxylin-eosin staining; д–з – staining according to Van Gieson; и–м – staining with alizarin red C (и, л – light microscopy; к, м – fluorescence microscopy); а, д, и, к – the central part of the patch; б, е, л, м – junction of the patch and the carotid artery in the anastomosis zone; в, ж – inner and middle layer of the patch wall; г, з – middle and outer layer of the patch wall; а, б, д, е, и–м – $\times 50$, в, г, ж, з – $\times 100$

изготовления методом эмульсионного электроспиннинга и отсутствие последующих манипуляций по модифицированию поверхности с использованием агрессивных поверхностно-активных веществ привело к сохранению физико-механических характеристик заплат, не снижая прочности и не увеличивая жесткости конечного изделия, что наблюдали после модифицирования RGD-пептидами поверхности биodeградируемых заплат. Гемосовместимость заплат PHBV/PCL/VEGF оказалась самой высокой даже в сравнении с ксеноперикардальным лоскутом, который активно используется в клинике.

На овечьей модели заплаты с RGD вне зависимости от конфигурации пептида способствовали эндотелизации, однако провоцировали гиперплазию неоинтимы и гранулематозное воспаление, тогда как заплаты PHBV/PCL/VEGF на модели овцы продемонстрировали оптимальную способность формировать на своей основе здоровую новообразованную сосудистую ткань с формированием тонкой неоинти-

мы, выстланной эндотелием, среднего гладкомышечного слоя и адвентиции, содержащей все основные структурные элементы, свойственные данному слою: пучки коллагеновых волокон, фибробластоподобные клетки и *vasa vasorum*. Все это свидетельствует о высокой эффективности инкорпорированного в состав заплат сосудистого эндотелиального фактора роста.

Исследование выполнено в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-0001 «Молекулярные, клеточные и биомеханические механизмы патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний в разработке новых методов лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы на основе персонализированной фармакотерапии, внедрения малоинвазивных медицинских изделий, биоматериалов и тканеинженерных имплантатов».

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

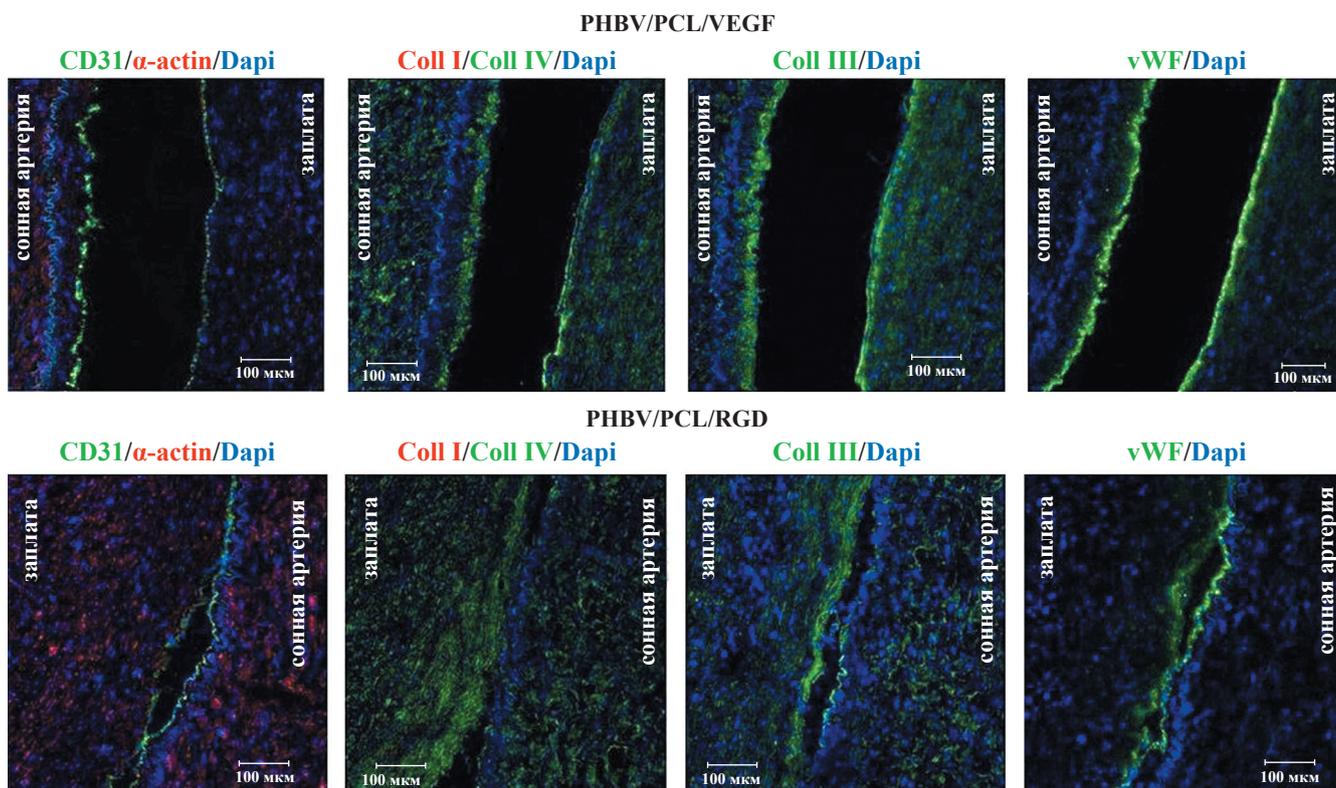


Рис. 4. Результаты иммунофлуоресцентного исследования эксплантированных заплат PHBV/PCL/VEGF и PHBV/PCL/RGD с прилегающими участками сонной артерии овцы: панель CD31/α-actin/Dapi: зрелые эндотелиальные клетки (зеленое свечение), гладкомышечные и прочие клетки, содержащие α-actin (красное свечение); панель Coll I/Coll IV/Dapi: коллаген I типа (красное свечение), коллаген IV типа (зеленое свечение); панель Coll III/Dapi: коллаген III типа (зеленое свечение); панель vWF/Dapi: фактор фон Виллебранда (зеленое свечение). Ядра всех клеток окрашены ядерным красителем Dapi (синее свечение). ×100

Fig. 4. Results of immunofluorescence study of explanted PHBV/PCL/VEGF and PHBV/PCL/RGD patches with surrounding sections of the sheep carotid artery: CD31/alpha actin/Dapi panel: mature endothelial cells (green glow), smooth muscle and other cells containing alpha actin (red glow); panel Coll I/Coll IV/Dapi: collagen type I (red glow), collagen type IV (green glow); Coll III/Dapi panel: collagen type III (green glow); vWF/Dapi panel: von Willebrand factor (green glow). The nuclei of all cells were stained with Dapi nuclear dye (blue glow)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Bonati LH, Dobson J, Featherstone RL, Ederle J, van der Worp HB, de Borst GJ, Mali et al. Long-term outcomes after stenting versus endarterectomy for treatment of symptomatic carotid stenosis: the international carotid stenting study (ICSS) randomised trial. *Lancet*. 2015; 385: 529–38. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61184-3. PMID: 25453443.
2. Abbott AL, Paraskevas KI, Kakkos SK, Golledge J, Eckstein HH, Diaz-Sandoval LJ et al. Systematic review of guidelines for the management of asymptomatic and symptomatic carotid stenosis. *Stroke*. 2015; 46: 3288–3301. doi: 10.1161/strokeaha.115.003390. PMID: 26451020.
3. Гавриленко АВ, Куклин АВ, Фомина ВВ. Классическая и эверсионная каротидная эндартерэктомия у пациентов со стенозом внутренней сонной артерии. *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2018; (2): 87–92. Gavrilenko AV, Kuklin AV, Fomina VV. Conventional and eversion carotid endarterectomy for internal carotid artery stenosis. *Pirogov Russian Journal of Surgery = Khirurgiya. Zurnal im. N.I. Pirogova*. 2018; (2): 87–92. [In Russ]. doi: 10.17116/hirurgia2018287-92.
4. Zannetti S, Cao P, De Rango P, Giordano G, Parlani G, Lenti M et al. Intraoperative assessment of technical perfection in carotid endarterectomy: a prospective analysis of 1305 completion procedures. Collaborators of the EVEREST study group. Eversion versus standard carotid endarterectomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999; 18 (1): 52–8. doi: 10.1053/ejvs.1999.0856. PMID: 10388640.
5. Ren S, Li X, Wen J, Zhang W, Liu P. Systematic review of randomized controlled trials of different types of patch materials during carotid endarterectomy. *PLoS one*. 2013; 8 (1): e55050. PMID: 23383053. doi: 10.1371/journal.pone.0055050.
6. Texakalidis P, Giannopoulos S, Charisis N, Giannopoulos S, Karasavvidis T, Koullias G et al. A meta-analysis of randomized trials comparing bovine pericardium and other patch materials for carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. 2018; 68 (4): 1241–1256. doi: 10.1016/j.jvs.2018.07.023. PMID: 30244928.
7. Карпенко АА, Кужугет РА, Стародубцев ВВ, Игнатенко ПВ, Ким ИН, Горбатов ВН. Непосредственные и отдаленные результаты различных методов реконструкции каротидной бифуркации. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2013; 17 (1): 21–24. Karpenko AA, Kuzhuget RA, Starodubtsev VB, Ignatenko PV, Kim IN, Gorbatykh VN. Immediate and long-term outcomes of carotid bifurcation remodeling. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2013; 17 (1): 21–24. [In Russ]. doi: 10.21688/1681-3472-2013-1-21-24.
8. Antonova LV, Sevostyanova VV, Mironov AV, Krivkina EO, Velikanova EA, Matveeva VG et al. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases*. 2018; 7 (2): 25–36. doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36.
9. Smith RJ, Yi T, Nasiri B, Breuer CK, Andreadis ST. Implantation of VEGF-functionalized cell-free vascular grafts: regenerative and immunological response. *The FASEB Journal*. 2019; 33 (4): 5089–5100. doi: 10.1096/fj.201801856R.
10. Krilleke D, Ng YS, Shima DT. The heparin-binding domain confers diverse functions of VEGF-A in development and disease: A structure-function study. *Biochemical Society Transactions*. 2009; 37 (6): 1201–1206. doi: 10.1530/JOE-15-0342. PMID: 19909247.
11. Miyazu K, Kawahara D, Ohtake H, Watanabe G, Matsuda T. Luminal surface design of electrospun small-diameter graft aiming at *in situ* capture of endothelial progenitor cell. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010; 94 (1): 53–63. doi: 10.1002/jbm.b.31623.
12. Wang F, Li Y, Shen Y, Wang A, Wang S, Xie T. The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14 (7): 13447–1362. doi: 10.3390/ijms140713447. PMID: 23807504.
13. Hsu SH, Chu WP, Lin YS, Chiang YL, Chen DC, Tsai CL. The effect of an RGD-containing fusion protein CBD-RGD in promoting cellular adhesion. *Journal of Biotechnology*. 2004; 111 (2): 143–150. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.03.014. PMID: 15219401.
14. Севостьянова ВВ, Миронов АВ, Антонова ЛВ, Кривкина ЕО, Матвеева ВГ, Великанова ЕА и др. Тканеинженерная заплатка, модифицированная фактором роста эндотелия сосудов, для реконструкции сосудистой стенки. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2020; 24 (4): 114–128. Sevostyanova VV, Mironov AV, Antonova LV, Krivkina EO, Matveeva VG, Velikanova EA et al. Tissue-engineered patch modified by vascular endothelial growth factor for reconstruction of vascular wall. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2020; 24 (4): 114–128. [In Russ]. doi: 10.21688/1681-3472-2020-4-114-128.
15. Антонова ЛВ, Сильников ВН, Ханова МЮ, Королева ЛС, Серпокрялова ИЮ, Великанова ЕА и др. Оценка адгезии, пролиферации и жизнеспособности эндотелиальных клеток пупочной вены человека, культивируемых на поверхности биodeградируемых нетканых матриц, модифицированных RGD-пептидами. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (1): 142–152. Antonova LV, Silnikov VN, Khanova MYu, Koroleva LS, Serpokrilova IYu, Velikanova EA et al. Adhesion, proliferation and viability of human umbilical vein endothelial cells cultured on the surface of biodegradable non-woven matrices modified with RGD peptides. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (1): 142–152. [In Russ]. doi: 10.15825/1995-1191-2019-1-142-152.
16. Sevostyanova VV, Antonova LV, Mironov AV, Yuzhalin AE, Silnikov VN, Glushkova TV et al. Biodegradable patches for arterial reconstruction modified with RGD peptides: results of an experimental study. *ACS Omega*. 2020; 5 (34): 21700–21711. doi: 10.1021/acsomega.0c02593. PMID: 32905385.

17. Lin HB, Sun W, Mosher DF, Garciaecheverria C, Schaufelberger K, Lelkes PI et al. Synthesis, Surface, and Cell Adhesion Properties of Polyurethanes Containing Covalently Grafted RGD-peptides. *J Biomed Mater Res.* 1994; 28 (3): 329–342. doi: 10.1002/jbm.820280307. PMID: 8077248.
18. Sedaghati T, Jell G, Seifalian A. Investigation of Schwann cell behaviour on RGD-functionalised bioabsorbable nanocomposite for peripheral nerve regeneration. *New Biotechnology.* 2014; 31 (3): 203–213. doi: 10.1016/j.nbt.2014.01.002. PMID: 24503165.
19. Антонова ЛВ, Миронов АВ, Сильников ВН, Глушкова ТВ, Кривкина ЕО, Акентьева ТН и др. Биодegradуемые сосудистые заплатки: сравнительная характеристика физико-механических и гемосовместимых свойств. *Якутский медицинский журнал.* 2019; 4 (68): 35–39. Antonova LV, Mironov AV, Silnikov VN, Glushkova TV, Krivkina EO, Akent'eva TN et al. Biodegradable vascular patches: comparative characteristics of physical-mechanical and hemocompatible properties. *Yakut Medical Journal.* 2019; 4 (68): 35–39. doi: 10.25789/YMJ.2019.68.08.
20. Wei K, Li Y, Mugishima H, Teramoto A, Abe K. Fabrication of core-sheath structured fibers for model drug release and tissue engineering by emulsion electrospinning. *Biotechnology Journal.* 2012; 7 (5): 677–685. doi: 10.1002/biot.201000473. PMID: 22125296.
21. Spano F, Quarta A, Martelli C, Ottobrini L, Rossi RM, Giglic G et al. Fibrous scaffolds fabricated by emulsion electrospinning: from hosting capacity to *in vivo* biocompatibility. *Nanoscale.* 2016; 8 (17): 9293–9303. doi: 10.1039/C6NR00782A.
22. Yarin R.L. Coaxial electrospinning and emulsion electrospinning of core-shell fibers. *Polymers for Advanced Technologies.* 2011; 22 (3): 310–317. doi: 10.1002/pat.1781.
23. Ward AS, Cormier JM. Operative techniques in arterial surgery Dordrecht: Springer Netherlands. 1986.
24. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003; 24 (24): 4385–4415. doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0. PMID: 12922151.
25. Jolee Bartrom BS. ASTM Hemolysis. *NAMSA.* 2008; 1–12.
26. Malm CJ, Risberg B, Bodin A, Bäckdahl H, Johansson BR, Gatenholm P et al. Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model. *Scand Cardiovasc J.* 2012; 46 (1): 57–62. doi: 10.3109/14017431.2011.623788. PMID: 22029845.
27. Ahmed M, Hamilton G, Seifalian AM. The performance of a small-calibre graft for vascular reconstructions in a senescent sheep model. *Biomaterials.* 2014; 35 (33): 9033–9040. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.008. PMID: 25106769.
28. Thomas LV, Lekshmi V, Nair PD. Tissue engineered vascular grafts – preclinical aspects. *Int J Cardiol.* 2013; 167 (4): 1091–1100. PMID: 23040078. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.069.
29. Swartz DD, Andreadis ST. Animal models for vascular tissue-engineering. *Curr Opin Biotechnol.* 2013; 24 (5): 916–925. doi: 10.1016/j.copbio.2013.05.005. PMID: 23769861.
30. Hoerstrup SP, Cummings Mrcs I, Lachat M, Schoen FJ, Jenni R, Leschka S et al. Functional growth in tissue-engineered living, vascular grafts: follow-up at 100 weeks in a large animal model. *Circulation.* 2006; 114 (1 Suppl): I159–I166. doi: 10.1161/circulationaha.105.001172. PMID: 16820566.
31. Catto V, Fare S, Freddi G, Tanzi MC. Vascular tissue engineering: recent advances in small diameter blood vessel regeneration. *ISRN Vasc Med.* 2014; 923030. doi: 10.1155/2014/923030.
32. Matsuzaki Yu, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang Yu-C, Miyamoto S, Kelly J et al. The effect of pore diameter on neo-tissue formation in electrospun biodegradable tissue-engineered arterial grafts in a large animal model. *Acta Biomater.* 2020; 115: 176–184. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.011. PMID: 32822820.
33. Matsuzaki Yu, Miyamoto S, Miyachi H, Iwaki R, Shoji T, Blum K et al. Improvement of a Novel Small-diameter Tissue-engineered Arterial Graft With Heparin Conjugation. *Ann. Thorac. Surg.* 2021; 111 (4): 1234–1241. doi: 10.1016/j.actbio.2020.08.011. PMID: 32822820.

Статья поступила в редакцию 02.06.2022 г.
The article was submitted to the journal on 02.06.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-109-117

ВЛИЯНИЕ БИОМАТРИКСОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ИНСУЛИНПРОДУЦИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

A.S. Пономарева, Н.В. Баранова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов

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

Культивирование островков Лангерганса с биоматриксами – миметиками внеклеточного матрикса (ВКМ) может обеспечивать характерное для островков нативное микроокружение, что является одним из основных условий создания тканевого эквивалента поджелудочной железы (ПЖ). **Цель работы:** сравнение секреторной способности жизнеспособных панкреатических островков человека в монокультуре (контрольная группа) и культивированных в присутствии двух биоматрикса: биополимерного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса (опытная группа 1) и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной ПЖ посмертного донора (опытная группа 2). **Материалы и методы.** Островки Лангерганса выделяли из хвостовой части ПЖ по методике с использованием коллагеназы. Жизнеспособность культивированных островков определяли методом флуоресцентного окрашивания витальным красителем, секреторную способность – методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Результаты.** Панкреатические островки, культивированные с биоматриксами, не проявляли признаков деградации и фрагментации и оставались жизнеспособными в течение всего срока наблюдения (7 суток). В монокультуре островков на этом сроке происходили значительные деструктивные изменения. Базальная концентрация инсулина в опытных группах 1 и 2 на первые сутки культивирования повышалась на 18,8 и 39,5% по сравнению с контрольной группой, на четвертые сутки инкубации – на 72,8 и 102,7%, на седьмые сутки – на 146,4 и 174,6% соответственно. Уровень секреции инсулина островков с тканеспецифическим матриксом был на 17,4% выше, чем при культивировании с биополимерным коллагенсодержащим матриксом. **Заключение.** Биополимерный и тканеспецифический миметики ВКМ способствуют не только сохранению жизнеспособности изолированных островков Лангерганса, но и поддержанию их инсулинпродуцирующей функции в течение 7 суток на более высоком уровне по сравнению с монокультурой. В условиях проведенных экспериментов выявлено незначительное потенциальное преимущество применения тканеспецифического матрикса по сравнению с биополимерным матриксом для создания тканевого эквивалента поджелудочной железы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, культивирование островков Лангерганса, инсулинпродуцирующая функция, тканеспецифический матрикс, биополимерный матрикс.

IN VITRO EFFECT OF BIOSCAFFOLDS ON VIABILITY AND INSULIN-PRODUCING FUNCTION OF HUMAN ISLETS OF LANGERHANS

A.S. Ponomareva, N.V. Baranova, I.A. Miloserdov, V.I. Sevastianov

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

Introduction. The culture of islets of Langerhans with bioscaffolds – extracellular matrix (ECM) mimetics – can provide a native microenvironment suitable for islets. This is one of the main conditions for creating a pancreatic tissue equivalent. **Objective:** to compare the secretory capacity of viable human pancreatic islets in monoculture (control group) and cultured in the presence of two bioscaffolds: biopolymer collagen-based hydrogel scaffold (experimental group 1) and tissue-specific scaffold from decellularized deceased donor pancreas (experimental

Для корреспонденции: Пономарева Анна Сергеевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел.: (499) 196-26-61, (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

Corresponding author: Anna Ponomareva. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (499) 196-26-61, (926) 585-23-73. E-mail: a.s.ponomareva@gmail.com

group 2). **Materials and methods.** Islets of Langerhans were isolated from the caudal pancreas using a collagenase technique. The viability of cultured islets was accessed by vital fluorescence staining, while secretory capacity was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results.** Pancreatic islets cultured with bioscaffolds showed no signs of degradation and fragmentation, they remained viable throughout the entire period of observation (7 days). The monoculture of islets showed significant destructive changes during this period. Basal insulin levels in experimental groups 1 and 2 increased by 18.8% and 39.5% on day 1 of culture compared to the control group, by 72.8% and 102.7% on day 4 of incubation, and by 146.4% and 174.6% on day 7, respectively. The insulin secretion level of islets with tissue-specific scaffolds was 17.4% higher than that when cultured with biopolymer collagen-based scaffolds. **Conclusion.** Biopolymer and tissue-specific ECM mimetics contribute not only to preservation of the viability of isolated islets of Langerhans but also maintain their insulin secretion capacity for 7 days at a higher level in comparison with monoculture. The experiments revealed that the use of a tissue-specific scaffold for the creation of a pancreatic tissue equivalent has slight potential advantage over biopolymer scaffold.

Keywords: pancreas, culture of the islets of Langerhans, insulin-producing function, tissue-specific scaffold, biopolymer scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

К одному из направлений технологий тканевой инженерии и регенеративной медицины относится создание тканевого эквивалента эндокринного отдела поджелудочной железы (ПЖ) [1]. Заболеваемость сахарным диабетом 1-го типа (СД1) в мире увеличивается из года в год [2], а совершенствование традиционного метода лечения – инсулинотерапии [3] – не спасает больных от развития тяжелых осложнений, таких как диабетические ангиопатия и нейропатия [4, 5]. Аллотрансплантация панкреатических островков способна обеспечить инсулинонезависимость больных на определенный срок, не подвергая пациентов серьезному хирургическому вмешательству, как при трансплантации ПЖ [6–8], но существенным недостатком такого метода лечения является низкая функциональная активность островков, обусловленная действием ряда повреждающих факторов во время процедур выделения и культивирования.

Известно, что в основе механизма развития СД1 является аутоиммунное повреждение β -клеток островков Лангерганса, что приводит к истощению пула этих клеток и постепенно нарастающей, прогрессирующей недостаточности синтеза эндогенного инсулина [9].

Панкреатические островки в процессе выделения подвергаются воздействию ряда повреждающих факторов, таких как ишемия, окислительный стресс, возможное цитотоксическое действие фермента. В процессе культивирования островки претерпевают фрагментацию и деградацию из-за нарушения иннервации и васкуляризации, обеспечиваемых в организме внеклеточным матриксом (ВКМ) [10, 11]. ВКМ, участвуя в процессах морфогенеза, дифференцировки, внутриклеточной передачи сигналов, экспрессии генов, адгезии, миграции, пролиферации, секреции и выживания панкреатических островков [12], способствует сохранению целостности

структуры островков, что является необходимым условием их функционирования.

Ранее нами была изучена возможность получения жизнеспособных изолированных панкреатических островков из фрагмента хвостовой части донорской ПЖ человека по методике с использованием коллагеназы [13]. Представляется существенным в пост-изоляцияционный период обеспечить для островков микроокружение, характерное для нативного ВКМ *in situ*. Такая задача может быть решена в результате создания тканевого эквивалента ПЖ, состоящего из островковых клеток и биоматрикса, который в наибольшей степени может имитировать структуру и состав ВКМ для сохранения жизнеспособности и функциональной активности изолированных островков *in vitro* и *in vivo* [14].

К таким биоматриксам относится коммерчески доступный биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс), зарегистрированный в России для клинического применения как биоимплантат «Композиция микрогетерогенного коллагенсодержащего геля *Сфера*[®]ГЕЛЬ» (АО «БИОМИР сервис, г. Краснознаменск). *Сфера*[®]ГЕЛЬ, производимый из компонентов тканей сельскохозяйственных животных методом экстракции уксусной кислотой, содержит основные компоненты ВКМ: пептиды частично гидролизованного коллагена, гликопротеины, уроновые кислоты и факторы роста, необходимые для жизнедеятельности клеток, синтеза экзогенных уроновых кислот, протеогликанов и коллагена [15].

Наиболее перспективными компонентами тканевых эквивалентов ПЖ представляются тканеспецифические биоматрицы, изготовленные из децеллюляризованной ПЖ или ее фрагментов (ДПЖ-матрикс) [16–18]. Разработка всех протоколов децеллюляризации ПЖ направлена на сохранение структурных, биохимических и биомеханических свойств нативного ВКМ с максимально полным удалением клеточного

материала (включая антигенный) для минимизации иммунного ответа на имплантацию ДПЖ-матрикса [19–21]. Присутствие основных компонентов ВКМ в децеллюляризованном панкреатическом каркасе, таких как структурные белки (коллагены I, III, IV, V и VI типа, эластин, фибронектин и ламинин), гликопротеины и факторы клеточной адгезии, позволяет создавать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток и максимально имитировать свойства ВКМ [22]. Сохранение архитектуры ВКМ в ДПЖ-матриксе также влияет на выживаемость и секреторную функцию островков [23, 24]. Данные научной литературы и результаты наших исследований демонстрируют увеличение секреции инсулина панкреатическими островками свиньи [25] и островками крысы [18], культивированными в присутствии тканеспецифических матриксов аллогенного происхождения, по сравнению с монокультурой островков.

Цель работы заключалась в сравнении инсулин-продуцирующей функции жизнеспособных панкреатических островков человека в монокультуре и культивированных в присутствии двух биоматриксов: биополимерного микрогетерогенного коллагенсодержащего гидрогелевого матрикса и тканеспецифического матрикса из децеллюляризованной поджелудочной железы (ПЖ) человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

Для выделения панкреатических островков и получения тканеспецифического децеллюляризованного матрикса использовали хвостовую часть ПЖ, полученную в результате мультиорганного забора органов посмертных доноров и не пригодную для трансплантации.

Выделение и идентификация островков Лангерганса

Для получения островков Лангерганса небольшой фрагмент (~2,0 г) хвостовой части ПЖ механически измельчали (1,5 × 1,5 × 1,5 мм) и инкубировали в растворе коллагеназы NB1 (активность 20 PZ U/g ткани) с нейтральной протеазой NP (активность 1,5 DMC U/g ткани) (Serva, Германия) в течение 10–15 мин при 37 °С. Действие ферментов останавливали добавлением трехкратного объема холодного (4 °С) раствора Хэнкса (ПанЭко, Россия), с последующим фильтрованием через металлическое сито с диаметром ячеек 0,4–0,6 мм. Для очистки островков был подобран режим центрифугирования, позволяющий отказаться от использования градиента плотности фиколла (1 мин при скорости 900 об/мин, затем 2 мин при скорости 1300 об/мин).

Островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США) непосредственно после выделения. Для этого часть суспензии смешивали с раствором дитизона в соотношении 2 : 1 и инкубировали 20–30 мин при температуре 37 °С. Дитизон избирательно окрашивал панкреатические островки в красно-оранжевый цвет, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными. Свежевыделенные островки ресуспендировали в ростовой среде и использовали в эксперименте не позднее 24 часов после выделения.

Биополимерный микрогетерогенный коллагенсодержащий гидрогель (БМКГ-матрикс)

Одним из биоматриксов была выбрана инъекционная форма БМКГ (торговое название *Сфера*[®] ГЕЛЬ, производитель АО «Биомир сервис», Россия). БМКГ-матрикс состоит из микрочастиц (145,79 ± 0,09 мкм) склерального коллагена 1-го типа, сшитого γ -излучением (1,5 Мрад), и гомогенного гидрогеля, содержащего низкомолекулярные и высокомолекулярные компоненты ВКМ, в соотношении 1 : 1 [15]. Гетерогенная составляющая БМКГ-матрикса имеет пористую структуру микрочастиц с размером пор 2–4 мкм, что является положительным свойством в процессах неоваскуляризации и неиннервации тканеинженерных конструкций на его основе [18].

Тканеспецифический матрикс из децеллюляризованной поджелудочной железы (ДПЖ-матрикс)

В качестве тканеспецифического биомиметика ВКМ использовали биоматрикс, представляющий собой мелкодисперсные фрагменты децеллюляризованной панкреатической ткани человека. Методика получения ДПЖ-матрикса (рис. 1) была разработана ранее [21].

Протокол децеллюляризации включал в себя 3 цикла замораживания (при температуре –80 °С) и оттаивания (до температуры +37 °С) фрагментов ПЖ с последующим механическим измельчением ткани до размеров не более 1 × 1 × 2 мм. Измельченные фрагменты обрабатывали при комнатной температуре в трех сменах буферного раствора (pH = 7,4), содержащего 0,1% додецилсульфата натрия и повышающую концентрацию Тритона X100 (1, 2 и 3% соответственно) (Sigma, США), в условиях постоянного перемешивания в течение 24 ч. На конечной стадии процесса децеллюляризации мелкодисперсные фрагменты ДПЖ-матрикса тщательно отмывали от остатков поверхностно-активных веществ в течение 72 часов в трех сменах буферного раствора, содержащего антибиотик/антимикотик.

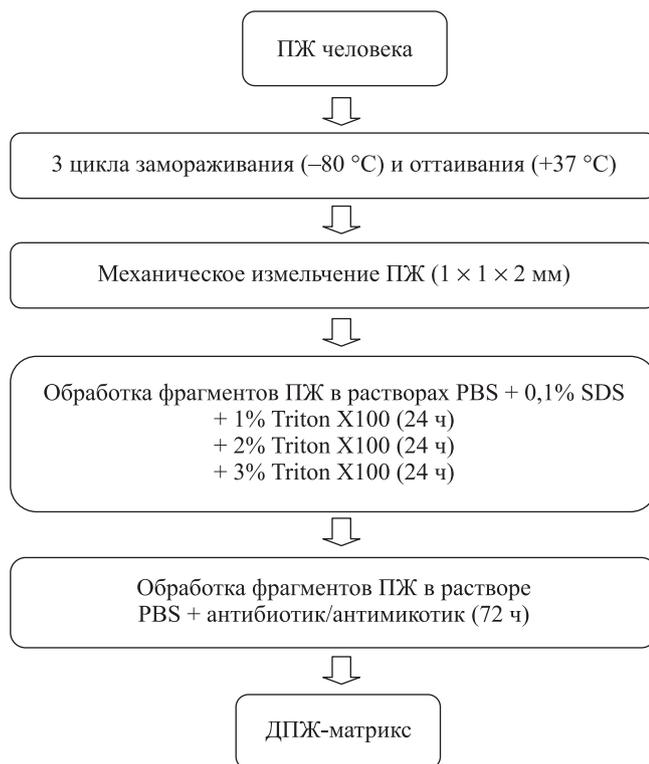


Рис. 1. Схематическое изображение этапов получения тканеспецифического матрикса из панкреатической ткани

Fig. 1. Schematic representation of the stages for obtaining tissue-specific scaffold from pancreatic tissue

Образцы мелкодисперсного ДПЖ-матрикса подвергали дегидратации с помощью фильтровальной бумаги, взвешивали и вносили в криопробирки по $20,0 \pm 0,1$ мг, стерилизовали γ -излучением (1,5 Мрад) и замораживали при температуре -80 °С. Срок хранения стерильных замороженных образцов ДПЖ-матрикса с сохранением биохимических и структурных свойств не более 1 года.

ДПЖ-матрикс содержит коллаген I типа и эластин, обладает низкой иммуногенностью (не более 0,1% ДНК), не цитотоксичен и сохраняет морфофункциональные свойства нативного ВКМ панкреатической ткани относительно адгезии и пролиферации клеточных культур [21].

Культивирование островков Лангерганса

Равное количество выделенных островков (~200) вносили в три культуральных флакона 25 см² (Greiner bio-one, Германия). В первый культуральный флакон (контроль) матрикс не добавляли. Во второй и третий культуральные флаконы вносили $20,0 \pm 0,1$ мг БМКГ-матрикса (опытная группа I) и $20,0 \pm 0,1$ мг ДПЖ-матрикса (опытная группа II) соответственно. Все островки культивировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л)

(ПанЭко, Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), Hepes (Gibco by Life technologies™, США), 2 mM L-глутамин (ПанЭко, Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco by Life technologies™, США). Культивирование островков проводили в стандартных условиях при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, с ежедневным визуальным мониторингом и фотосъемкой с помощью инвертированного микроскопа (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой. Смену культуральной среды осуществляли на сроках 1, 4 и 7 суток с целью отбора проб для последующего исследования на содержание инсулина.

Определение жизнеспособности

Жизнеспособность свежeweделенных островков, а также островков, культивированных в контрольной и опытных группах, оценивали на 1, 4 и 7-е сутки с помощью набора LIVE/DEAD® Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular probes® by Life technologies™, США). Для окрашивания LIVE/DEAD® часть суспензии островков (монокультуры или с матриксами) помещали в чашку Петри, смешивали с приготовленным рабочим раствором красителя в соотношении 1 : 2 и инкубировали в темноте в течение 15–30 мин. Результат оценивали с помощью люминесцентного микроскопа (Nikon, Япония).

Определение инсулинпродуцирующей функции

Для определения инсулинпродуцирующей функции островков контрольной и опытных групп на сроках 1, 4 и 7 суток в культуральных флаконах проводили замену ростовой среды. После 1 часа инкубации в прежних условиях (37 °С, 5% CO₂) осуществляли отбор проб ростовой среды из всех флаконов. Пробы хранили в замороженном состоянии (-23 °С) для последующего ИФА-исследования.

Базальную концентрацию инсулина в культуральной среде контрольной и опытных групп определяли с помощью набора для ИФА ELISA Kit for insulin Human SEA448 Hu-96 (Cloud-Clone Corp., США) согласно инструкции производителя.

В данном варианте ИФА используется метод конкурентного ингибирования. Моноклональное антитело, специфичное к инсулину, предварительно нанесено на микропланшет. Запускается реакция конкурентного ингибирования между меченым биотинилированной ферментативной меткой инсулином и немеченым инсулином (стандарт и образцы культуральной среды) с предварительно нанесенным антителом, специфичным к инсулину. После инкубации со всеми реагентами набора добавляли раствор субстрата, который реагировал с комплексом для получения сигнала в виде окрашенного продукта.

Интенсивность этого сигнала выражалась через оптическую плотность, которая обратно пропорциональна концентрации инсулина в исследуемых образцах. Обратная корреляция между концентрацией инсулина в образце и интенсивностью сигнала отображается в виде стандартной кривой с логарифмической функцией.

Результаты количественного метода ИФА рассчитывали, измеряя оптическую плотность на микропланшетном ридере Spark 10M (TecanTrading AG, Швейцария) с программным обеспечением Spark Control™ Magellan V1.2.20 на длинах волн 450 и 550 нм для учета оптических дефектов микропланшета. Полученные данные обрабатывали с помощью программы SPSS26.0. Представленные результаты продемонстрированы в виде среднего значения \pm среднеквадратичное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свежевыделенные островки Лангерганса

С помощью инвертированного микроскопа наблюдали значительное количество свежевыделенных островков различных размеров с преимущественно округлой формой и гладкой поверхностью (рис. 2, а). Остатки экзокринной ткани выявлялись следующим образом: ацинарные клетки создавали определенную шероховатость на поверхности некоторых островков и не окрашивались дитизином. В то же время дитизон окрашивал панкреатические островки в оранжево-красный цвет, что позволяло легко их идентифицировать (рис. 2, б).

Прижизненное окрашивание LIVE/DEAD® свежевыделенных островков осложнялось наличием сильной фоновой яркости из-за присутствия клеток ацинарной ткани вокруг островков или в культуральной среде. Тем не менее отдельные живые клетки в структуре островков были четко визуализированы (рис. 2, в).

Жизнеспособность островков Лангерганса

Монокультура островков

Наблюдение в инвертированном микроскопе показало, что большинство островков, культивируемых без биоматрикса (контрольная группа), в течение первых трех суток инкубации сохраняли свою форму и целостность. Лишь немногие из них обнаруживали признаки фрагментации или подвергались разрушению.

Окрашивание LIVE/DEAD® в люминесцентном микроскопе продемонстрировало зеленую флуоресценцию островков, подтверждающую их жизнеспособность (рис. 3, а). Некоторые, окрашенные в красный цвет этидиум гомодимером, погибшие ацинарные клетки обнаруживались в культуральной среде, окружающей островки.

После 3 суток культивирования морфология островков в контрольной группе менялась. В некоторых островках обнаруживали появление полостей, признаки фрагментации, поверхность значительного количества островков приобретала неровные очертания, становилась бугристой (рис. 3, б). Прижизненное окрашивание LIVE/DEAD® на сроках 4–7 суток культивирования выявило в сохранившихся островках погибшие клетки с красной флуоресценцией (рис. 3, в). Таким образом, к недельному сроку культивирования без биоматрикса островки претерпевали значительные деструктивные изменения.

Островки Лангерганса в присутствии БМКГ-матрикса

Островки, культивируемые с БМКГ-матриksom (опытная группа 1), оставались целостными, не подвергались фрагментации и деградации в течение всего периода наблюдения (7 суток). На вторые сутки инкубации наблюдали адгезию островков к гладкой поверхности БМКГ-матрикса (рис. 4, а), прикрепившиеся островки свободно флотировали

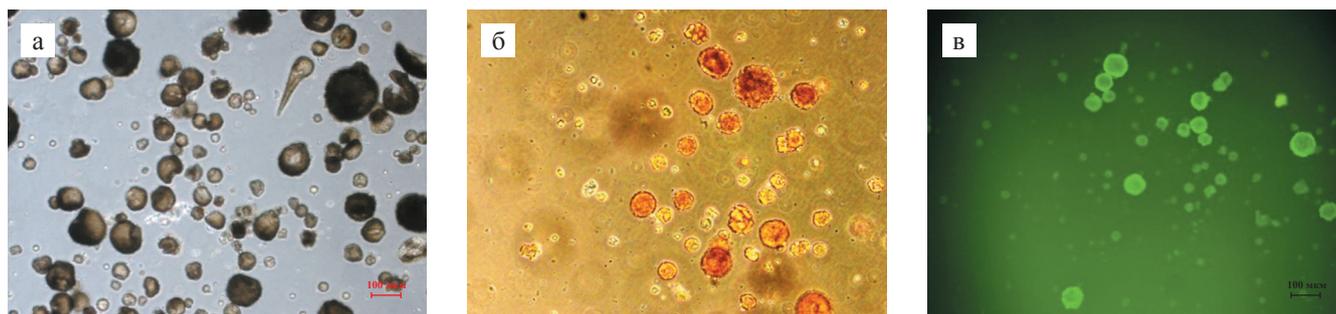


Рис. 2. Свежевыделенные островки Лангерганса человека: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – окрашивание дитизином; в – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD®. Бар 100 мкм

Fig. 2. Freshly isolated human islets of Langerhans: а – inverted phase-contrast microscopy; б – dithizone staining; в – LIVE/DEAD® fluorescence staining. Bar 100 μ m

в культуральной среде. Флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®], проведенное на сроках 1, 4 и 7 суток инкубации, подтвердило жизнеспособность островков опытной группы 1 (рис. 4, б).

Островки Лангерганса в присутствии ДПЖ-матрикса

Островки, культивированные с ДПЖ-матриksom (опытная группа 2), так же, как и в опытной группе 1, не проявляли признаков деструкции и фрагментации в течение всего срока наблюдения (7 суток). На вторые сутки инкубации с ДПЖ-матриksom большая часть островков проявляла адгезивные качества и осаждалась на волокнистую поверхность матрикса (рис. 5, а), оставшиеся в культуральной среде островки продолжили флотировать. Прижизненное окрашивание островков опытной группы 2 LIVE/

DEAD[®], проведенное на сроке 1, 4 и 7 суток инкубации, подтвердило жизнеспособность сохранившихся островков (рис. 5, б).

Инсулинпродуцирующая функция панкреатических островков

Инсулинпродуцирующую функцию исследуемых островков определяли на сроках 1, 4 и 7 суток. Сравнительный анализ секреции инсулина опытных групп 1 и 2 проводили относительно контрольной группы.

После первых суток культивирования концентрация инсулина в опытных группах 1 и 2 была выше на 18,8% ($46,78 \pm 1,29$ пкг/мл) и на 39,5% ($54,93 \pm 1,58$ пкг/мл) по сравнению с контрольной группой ($39,37 \pm 1,25$ пкг/мл); на четвертые сутки ин-

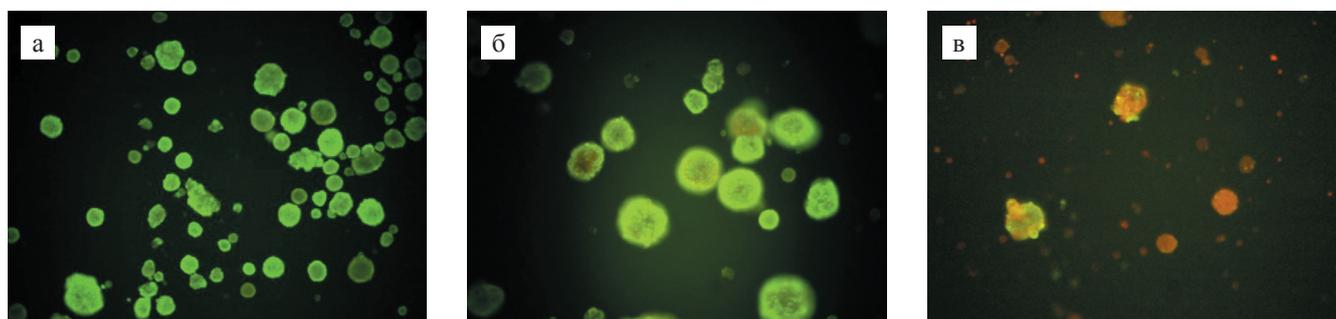


Рис. 3. Монокультура островков Лангерганса человека (контрольная группа). Флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®]: а – 3 суток культивирования, бар 100 мкм; б – 4 суток культивирования, бар 200 мкм; в – 7 суток культивирования, бар 100 мкм

fig. 3. Monoculture of human islets of Langerhans (control group): а – 3 days of culture, bar 100 μm; б – 4 days of culture, bar 200 μm; в – 7 days of culture, bar 100 μm

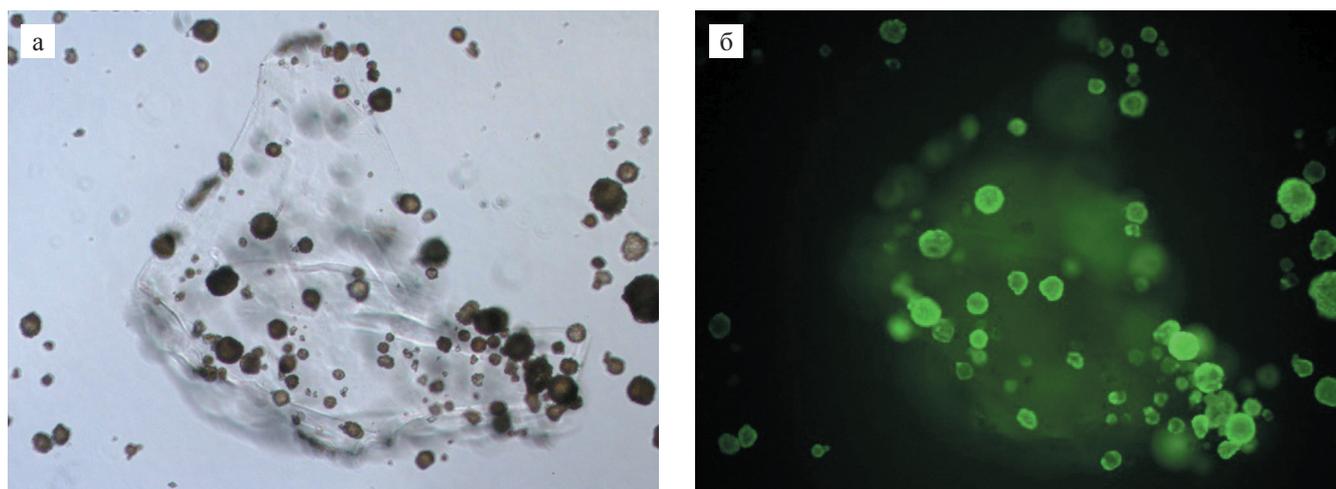


Рис. 4. Островки Лангерганса человека, культивированные с биополимерным коллагенсодержащим матриksom (БМКГ-матриksom). 7 суток культивирования: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD[®]. Бар 100 мкм

Fig. 4. Human Langerhans islets cultured with biopolymer collagen-containing scaffold (BMCH scaffold). 7 days of culture: а – inverted phase contrast microscopy; б – fluorescence, LIVE/DEAD[®]. Bar 100 μm

кубации – на 72,8% ($41,65 \pm 0,81$ пкг/мл) и 102,7% ($48,88 \pm 1,32$ пкг/мл) соответственно по сравнению с контрольной группой ($24,11 \pm 0,58$ пкг/мл). На сроке 7 суток наблюдали еще более значимую разницу между концентрациями инсулина опытных групп 1 ($32,9 \pm 1,08$ пкг/мл) и 2 ($36,66 \pm 1,38$ пкг/мл) и контрольной группы ($13,35 \pm 0,55$ пкг/мл) (табл.).

Позитивное влияние биоматрикса на инсулин-продуцирующую функцию островков проявляется в различии концентраций гормона в контрольной и опытных группах на всех сроках исследования (рис. 6). Значимую разницу между концентрациями

Таблица

Сравнительный анализ содержания инсулина (%) в опытных группах относительно контрольной группы (монокультура островков)
Comparative analysis of insulin levels (%) in the experimental groups relative to the control group (monoculture of islets)

Сутки	Островки + БМКГ-матрикс (опытная группа 1), %	Островки + ДПЖ-матрикс (опытная группа 2), %
1	$18,8 \pm 3,3$	$39,5 \pm 4,0$
4	$72,8 \pm 3,4$	$102,7 \pm 5,5$
7	$146,4 \pm 8,1$	$174,6 \pm 10,3$

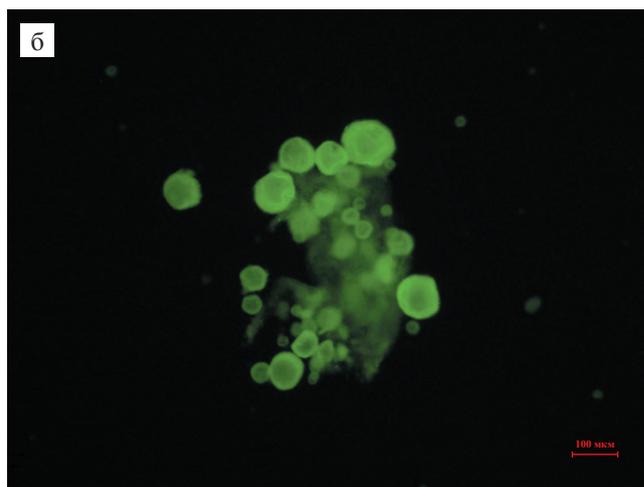
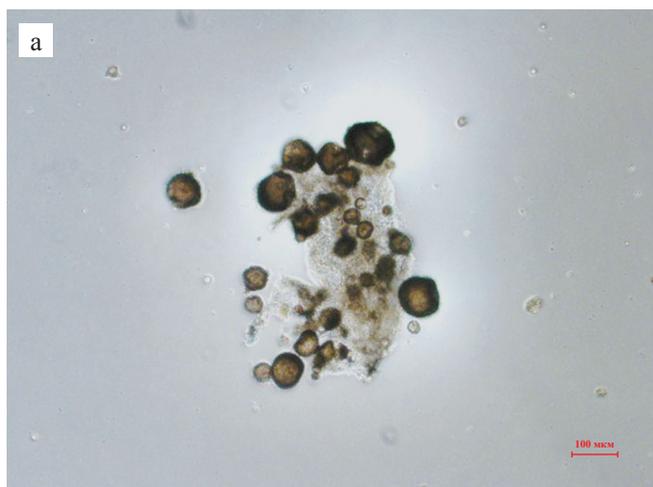


Рис. 5. Островки Лангерганса человека, культивированные с тканеспецифическим матриксом из децеллюляризованной поджелудочной железы человека (ДПЖ-матрикс). 7 суток культивирования: а – инвертированная фазово-контрастная микроскопия; б – флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD®. Бар 100 мкм

Fig. 5. Human Langerhans islets cultured with tissue-specific scaffold from decellularized pancreas (DP scaffold). 7 days incubation: а – inverted phase contrast microscopy; б – fluorescence, LIVE/DEAD®. Bar 100 μm

инсулина опытных групп 1 и 2 и контролем можно объяснить деструктивными изменениями монокультуры островков после трех суток культивирования, что подтверждается данными флуоресцентного окрашивания островков на разных сроках. Положительная тенденция влияния биополимерного и тканеспецифического миметиков ВКМ на секреторную функцию островков в процентном отношении сохранялась на протяжении всего срока наблюдения, несмотря на то что концентрация инсулина, выраженная в абсолютных значениях, с увеличением срока культивирования снижалась.

Уровень секреции инсулина на первые и четвертые сутки культивирования островков в группе 2 был на $17,37 \pm 0,05\%$ выше, чем в группе 1; на седьмые сутки – выше на $11,43\%$. Таким образом, выявлено незначительное преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса по сравнению с БМКГ-матриксом при культивировании панкреатических

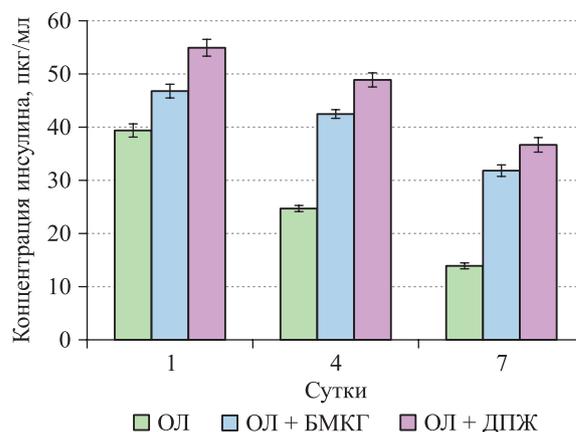


Рис. 6. Инсулинпродуцирующая функция островков Лангерганса человека в контрольной и опытных группах. ОЛ – островки Лангерганса. $p < 0,05$

Fig. 6. Insulin-producing function of human islets of Langerhans in control and experimental groups. ОЛ – islets of Langerhans. $p < 0.05$

островков человека. Ранее нами была исследована инсулинпродуцирующая функция островков крысы, культивированных в присутствии БМКГ-матрикса и матрикса из децеллюляризованной ПЖ крысы [18]. Сравнительный анализ секреции инсулина показал более выраженное влияние исследованных биоматрикса на островки крысы, чем на островки человека, при этом уровень секреции инсулина островков крысы, культивированных в присутствии ДПЖ-матрикса, был на 35,5% выше, чем у островков крысы, культивированных в присутствии БМКГ-матрикса.

Проведенное исследование показало, что изолированные островки человека, культивированные в присутствии биоматрикса, могут сохраняться в стандартных условиях инкубации без существенных потерь морфофункциональных свойств и жизнеспособности в течение 7 суток. Такой способ сохранения островкового потенциала *in vitro* перед имплантацией пациентам с СД1, вероятно, увеличит сроки функционирования островков *in vivo* и в постимплантационном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Культивирование изолированных островков Лангерганса с биополимерным и тканеспецифическим миметиками внеклеточного матрикса способствует не только сохранению жизнеспособности островков, но и поддержанию их секреторной функции в течение 7 суток на более высоком уровне по сравнению с культивированием островков без биоматрикса. В условиях проведенных экспериментов выявлено незначительное потенциальное преимущество применения тканеспецифического ДПЖ-матрикса по сравнению с БМКГ-матриksom для создания тканевого эквивалента поджелудочной железы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kumar N, Joisher H, Ganguly A. Polymeric scaffolds for pancreatic tissue engineering: a review. *Rev Diabet Stud*. 2018; 14 (4): 334–353.
2. Creusot RJ, Battaglia M, Roncarolo MG et al. Concise review: cell-based therapies and other non-traditional approaches for type 1 diabetes. *Stem Cells*. 2016; 34 (4): 809–819.
3. Gururaj Setty S, Crasto W, Jarvis J et al. New insulins and newer insulin regimens: a review of their role in improving glycaemic control in patients with diabetes. *Postgrad Med J*. 2016; 92 (1085): 152–164.
4. Gan MJ, Albanese-O'Neill A, Haller MJ. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2012; 42 (10): 269–291.
5. Mannucci E, Monami M, Dicembrini I et al. Achieving HbA1c targets in clinical trials and in the real world: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest*. 2014; 37 (5): 477–495.
6. Bottino R, Knoll MF, Knoll CA et al. The future of islet transplantation is now. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5: 202.
7. Shapiro AM, Pokrywczynska M, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13 (5): 268–277.
8. Maffi P, Secchi A. Clinical results of islet transplantation. *Pharmacol Res*. 2015; 98: 86–91.
9. Ehlers MR. Strategies for clinical trials in type 1 diabetes. *J Autoimmun*. 2016; 71: 88–96.
10. Bosco D, Armanet M, Morel P et al. Unique arrangement of alpha- and beta-cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*. 2010; 59 (5): 1202–1210.
11. Amer LD, Mahoney MJ and Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue engineering*. 2014; 20 (5): 455–467.
12. Riopel M, Wang K. Collagen matrix support of pancreatic islet survival and function. *Frontiers in Bioscience*. 2014; 19: 77–90. doi: 10.2741/4196.
13. Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Баранова НВ, Бубенцова ГН, Милосердов ИА, Волкова ЕА, Севастьянов ВИ. Методика выделения жизнеспособных островков Лангерганса из фрагмента хвостовой части поджелудочной железы человека. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2018; 20 (4): 76–82. Ponomareva AS, Kirsanova LA, Baranova NV, Bubentsova GN, Miloserdov IA, Volkova EA, Sevastianov VI. A technique for separating viable islets of Langerhans from a fragment of human pancreatic tail. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (4): 76–82. doi.org/10.15825/1995-1191-2018-4-76-82.
14. Llacua LA, Faas MM, de Vos P. Extracellular matrix molecules and their potential contribution to the function of transplanted pancreatic islets. *Diabetologia*. 2018; 61 (6): 1261–1272.
15. Севастьянов ВИ, Перова НВ. Инъекционный гетерогенный биополимерный гидрогель для заместительной и регенеративной хирургии и способ его получения. Патент на изобретение РФ № 2433828. 2011. Sevastianov VI, Perova NV. Injectable heterogeneous biopolymer hydrogel for replacement and regenerative surgery and the method of its preparation. [Patent for invention of the Russian Federation No. 2433828]. 2011.
16. Goh SK, Bertera S, Olsen P et al. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772.
17. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine neopancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017; 2 (7): 41777. doi: 10.1038/srep41777.
18. Sevastianov VI, Baranova NV, Kirsanova LA, Ponomareva AS, Basok YuB, Nemets EA, Gautier SV. Comparative analysis of the influence of extracellular matrix

- biomimetics on the viability and insulin-producing function of isolated pancreatic islets. *J Gene Engg Bio Res*. 2021; 3 (2): 17–25.
19. Rana D, Zreigat H, Benkirane-Jessel N et al. Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017; 11 (4): 942–965.
 20. Shirakigawa N, Ijima H. Decellularized tissue engineering. *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications*. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017; 66: 185–226.
 21. Пономарева АС, Кирсанова ЛА, Баранова НВ, Сургученко ВА, Бубенцова ГН, Басок ЮБ и др. Децеллюляризация фрагмента донорской поджелудочной железы для получения тканеспецифического матрикса. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (1): 123–133. Ponomareva AS, Kirsanova LA, Baranova NV, Surguchenko VA, Bubentsova GN, Basok YuB et al. Decellularization of donor pancreatic fragment to obtain a tissue-specific matrix scaffold. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (1): 123–133. doi: 10.15825/1995-1191-2020-1-123-133.
 22. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Sci Rep*. 2018; 8 (1): 10452.
 23. Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018; 12 (5): 1230–1237.
 24. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, Orlando G. Extracellular matrix scaffold technology for bioartificial pancreas engineering: state of the art and future challenges. *J DiabSci Technol*. 2014; 8 (1): 159–169. doi: 10.1177/1932296813519558.
 25. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling J, Pareta R, Mack D, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.

Статья поступила в редакцию 22.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 22.07.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-118-123

ПРЕДИКТОРЫ СТЕАТОЗА У ДОНОРОВ ПЕЧЕНИ

М.Г. Минина^{1, 2}, Д.В. Воронов¹, А.А. Невредимов¹, Э.А. Тенчурина¹

¹ ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», Московский городской координационный центр органного донорства, Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Стеатоз рассматривается как фактор риска при трансплантации донорской печени. Макростеатоз (>50%) ассоциируется с первичной дисфункцией трансплантата и может вызывать снижение долгосрочной выживаемости реципиентов. **Цель исследования:** выявить предикторы макровезикулярного стеатоза печени (>50%) путем анализа характеристик донора. **Материалы и методы.** В ретроспективное исследование вошли 525 потенциальных доноров печени в период с 1 января 2019 года по 31 декабря 2020 года. Исследование клинико-морфологических характеристик доноров выполнено с использованием логистической регрессии и ROC-анализа. Пороговые значения показателей, продемонстрировавших статистическую достоверность в мультивариантном анализе в качестве предикторов стеатоза печени >50%, получены посредством ROC-анализа на основании расчета оптимальной точки отсечения. **Результаты.** Сахарный диабет, причина смерти донора (черепно-мозговая травма), а также значения показателей АЛТ >90 ед/л, АСТ >110 ед/л явились предикторами стеатоза >50%, выявленного по данным нулевой биопсии у донора. Практически идентичные показатели чувствительности и специфичности определены в ROC-анализе у ферментов печени – АЛТ, АСТ, составившие 69,1; 80,6 и 72,2; 81,1 соответственно. С учетом полученных значений, мы можем говорить, что при повышении уровня ферментов печени в крови донора с высокой степенью вероятности следует ожидать повреждения паренхимы печени, но невысокий уровень чувствительности указывает на возможную многофакторность повреждения печени, и одним из факторов может быть стеатоз, но может наблюдаться и отсутствие какого-либо повреждения паренхимы. Вместе с тем достаточно высокая специфичность, выявленная в ROC-анализе для ферментов печени, является достоверным признаком отсутствия стеатоза при значениях ферментов меньше пороговых. **Заключение.** Пороговые значения, установленные для АЛТ, АСТ, и соответствующие им уровни чувствительности и специфичности указывают на относительно невысокий прогностический уровень данных показателей в контексте наличия у донора выраженного стеатоза, что позволяет, тем не менее, использовать модели, построенные на их основе, в качестве скрининговых при первичной оценке доноров печени.

Ключевые слова: стеатоз, доноры печени с расширенными критериями, метаболически ассоциированная жировая болезнь печени.

PREDICTORS OF HEPATIC STEATOSIS IN LIVING LIVER DONORS

M.G. Minina^{1, 2}, D.V. Voronov¹, A.A. Nevredimov¹, E.A. Tenchurina¹

¹ Botkin City Clinical Hospital, Moscow, Russian Federation

² Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Fatty liver disease (steatosis) is considered a risk factor in donor liver transplantation (LT). Macrosteatosis (>50%) is associated with primary graft dysfunction and may reduce long-term recipient survival. **Objective:** to identify predictors of macrovesicular steatosis (>50%) by analyzing donor characteristics. **Materials and methods.** The retrospective study included 525 potential liver donors between January 1, 2019 and December 31, 2020. Clinical and morphological characteristics of donors were studied using logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) analysis. Threshold values of parameters demonstrating statistical significance in multivariate analysis as predictors of >50% hepatic steatosis were obtained by ROC analysis based on calculation of the optimal cutoff point. **Results.** Diabetes mellitus (DM), cause of donor's death (traumatic brain injury), alanine transaminase

Для корреспонденции: Тенчурина Эльмира Анвяровна. Адрес: 125284, Москва, 2-й Боткинский пр-д, 5. Тел. (967) 113-87-64. E-mail: arimle@inbox.ru

Corresponding author: Elmira Tenchurina. Address: 5, Vtoroy Botkinsky proezd, Moscow, 125284, Russian Federation. Phone: (967) 113-87-64. E-mail: arimle@inbox.ru

(ALT) >90 units/L and aspartate transaminase (AST) >110 units/L were predictors of >50% steatosis, revealed by time-zero biopsy in the donor. Almost identical sensitivity and specificity indicators were determined in ROC analysis for liver enzymes – ALT and AST – which were 69.1 and 80.6; 72.2 and 81.1, respectively. Given the obtained values, we can say that with elevated levels of liver enzymes in the donor's blood, there is a high degree of probability of liver parenchymal damage, but low sensitivity indicates possible multifactoriality of liver damage, and fatty liver disease may be one of the factors, but there may also be no damage to the liver parenchyma. At the same time, the rather high specificity revealed in ROC analysis for liver enzymes is a reliable sign of the absence of fatty liver disease at enzyme values less than the threshold. **Conclusion.** The thresholds established for ALT and AST and their corresponding levels of sensitivity and specificity indicate that these parameters have a relatively low predictive level in the context of the presence of severe fatty liver disease in a donor. This allows, nevertheless, to use models built on their basis as screening models in the primary evaluation of liver donors.

Keywords: steatosis, extended criteria liver donors, metabolic associated fatty liver disease.

ВВЕДЕНИЕ

Стеатоз донорской печени является независимым фактором риска, оказывающим существенное влияние на развитие посттрансплантационных осложнений, таких как реперфузионное повреждение, ранняя дисфункция трансплантата, и выживаемость реципиентов в целом. Согласно исследованиям, наибольшее негативное влияние на эффективность трансплантации печени и развитие осложнений после нее оказывает тяжелый уровень макровезикулярного стеатоза, составляющий 50% и более [1]. Около 30–51% донорских трансплантатов печени имеют ту или иную степень стеатоза [2, 3]. На сегодняшний день отмечается повышение распространенности стеатоза печени из-за увеличения числа доноров с ожирением и неалкогольным жировым гепатозом печени в анамнезе [4, 5].

«Золотым стандартом» диагностики стеатоза печени у доноров по-прежнему остается так называемая нулевая биопсия печени, выполненная в процессе лапаротомии [6, 7]. Вместе с тем еще на этапе первичной оценки донора специалисты донорской службы должны ориентировочно прогнозировать уровень возможного стеатоза, исходя из доступных клинических характеристик донора. Подобные исследования проводились зарубежными авторами, которые выявили положительную корреляцию между стеатозом печени и индексом массы тела (ИМТ) [10, 11]. В исследовании M.E. Rinella et al. был выполнен сравнительный анализ прогностической ценности ИМТ, результатов биохимического анализа ферментов печени, визуализирующих исследований у потенциальных живых доноров печени в качестве возможных индикаторов степени тяжести стеатоза, подтвержденного морфологически. Так, авторами была доказана корреляция между ИМТ и степенью стеатоза [12]. Другое исследование продемонстрировало, что такие показатели, как кожные складки на теле, уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) и сывороточный уровень липидов коррелируют с выраженностью жирового гепатоза, правда, незначительно [13]. Jeong-Hoon Lee et al. разрабо-

тан индекс стеатоза печени: в ходе многофакторного анализа выявлено, что отношение сывороточной аланинаминотрансферазы (АЛТ) к сывороточной аспартатаминотрансферазе (АСТ), а также индекс массы тела (ИМТ) и сахарный диабет (СД) могут выступать независимыми факторами риска жирового гепатоза [14]. При этом значение индекса стеатоза печени <30 исключает стеатоз печени, а значение >60 достоверно говорит о его наличии.

Ориентировочный уровень стеатоза у донора может быть также определен хирургом-трансплантологом в процессе лапаротомии путем визуализации и пальпации печени. В качестве достоинства этого метода можно отметить его очевидную простоту в осуществлении. Тем не менее точность макроскопической оценки прямо пропорционально зависит от степени выраженности стеатоза и составляет 71% для выраженного, 46% – для среднего и лишь 17% – для умеренного стеатоза [7–9]. По данным отечественных исследователей, позитивная прогнозирующая оценка при визуальном осмотре составила 65,6% при выраженном макровезикулярном стеатозе, в то же время частота гипердиагностики макростеатоза составила 10,0% при визуальной оценке [7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное исследование вошли 525 потенциальных доноров печени в период с 1 января 2019 года по 31 декабря 2020 года. В ходе исследования пул потенциальных доноров был разделен на три группы в зависимости от степени выраженности морфологически подтвержденного стеатоза печени. Оценка клинико-морфологических характеристик была выполнена посредством логистической регрессии и ROC-анализа. Пограничные значения показателей, продемонстрировавших статистическую достоверность в мультивариантном анализе, в качестве предикторов стеатоза печени >50%, получены в ROC-анализе на основании расчета оптимального порога отсечения. В четырехпольной таблице сопряженности рассчитаны показатели чувствительности

и специфичности для характеристик с переменными значениями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для анализа клинических характеристик доноров весь пул эффективных доноров печени, включенных в исследование, разделили на три группы в зависимости от степени жирового гепатоза по данным «нулевой» биопсии печени у донора: группа 1 – стеатоз ≤30%, группа 2 – стеатоз 31–50%, группа 3 – стеатоз >50%. Доноры в количестве 58/525 человек (11,1%), у которых не было выполнено по тем или иным причинам морфологическое исследование, были исключены из данного анализа.

Обращает на себя внимание, что в группах 2 и 3 более половины доноров, 51,3% и 58,6% соответственно, имели ИМТ менее 30, при этом количество доноров в % с ИМТ ≥30, свидетельствующим о наличии ожирения, практически идентично во 2-й и 3-й группах, в 3-й группе отмечается даже некоторое снижение доноров с ожирением. Более детальный анализ доноров выявил, что разница показателей ИМТ в группах 2 и 3 обусловлена тем, что у доноров с субтотальным и тотальным стеатозом печени, предположительно алкогольного генеза, ИМТ был низкий, что послужило фактором искажения значимости этого показателя при уровне стеатоза печени >50%. Аналогично ЧМТ в качестве причины смерти преобладала у доноров с алкогольным гепатитом в анамнезе, что подтверждается имеющимися данными – удельный вес доноров с ЧМТ в группе со

стеатозом >50% составил 33,3%, тогда как в группе со стеатозом ≤30% – 17,9%. Среднее значение показателя тромбоцитов крови у доноров печени в группе 3 со стеатозом >50% составило $183,6 \times 10^9/\text{л}$, что ниже аналогичного показателя в 1-й и 2-й группах, и мы полагаем, что данный факт может быть связан со снижением выработки в печени с субтотальным жировым гепатозом тромбopoэтина (гликопротеинового гормона, вырабатываемого главным образом печенью). В исследовании Markus Peck-Radosavljevic et al. изучалась тромбоцитопения <50 000/мкл у пациентов с хроническими заболеваниями печени в результате снижения выработки в ней тромбopoэтина [16]. Таким образом, теоретически тромбоцитопения может служить неспецифическим показателем снижения функции печени, в том числе и на фоне стеатоза, и, по нашему мнению, данный факт требует дальнейшего изучения. Трансаминазы АЛТ и АСТ, как наиболее известные маркеры повреждения печени, вплоть до некроза, в группе 3 со стеатозом >50% в среднем значении имеют наибольшие показатели, 88,6 и 124,1 ЕД/л соответственно. Частота встречаемости СД у доноров группы 3 более чем в 2 раза выше относительно группы 1 – 7,6% vs 20,9% (табл. 1). Среднее значение общего билирубина крови у доноров во всех группах не превышает референсных значений, вместе с тем отмечается некоторое увеличение уровня общего билирубина в группах со стеатозом относительно группы 1.

Далее выполнен логистический регрессионный анализ с целью выявления достоверных предикторов

Таблица 1

Сравнительный анализ групп ЭД в зависимости от степени стеатоза
Comparative analysis of effective liver donor groups depending on steatosis grade

Факторы	Группа 1	Группа 2	Группа 3	p
	Стеатоз 0–30%, n = 341	Стеатоз 31–50%, n = 39	Стеатоз >50%, n = 87	
Возраст, лет, ср. (min–max)	48,8 (19–68)	51,2 (29–63)	49,0 (28–67)	0,46
Пол, муж. / жен., n (%)	233 (68,3) / 108 (31,7)	26 (66,7) / 13 (33,3)	64 (73,6) / 23 (26,4)	0,60
ОНМК / ЧМТ, n (%)	280 (82,1) / 61 (17,9)	33 (84,6) / 6 (15,4)	58 (66,7) / 29 (33,3)	0,004
ИМТ, кг/м ² , n (%)	<30	251 (74,0)	20 (51,3)	0,001
	≥30	88 (26,0)	19 (48,7)	
СД, n (%)	26 (7,6)	4 (10,3)	18 (20,9)	0,001
ГБ, n (%)	166 (48,7)	21 (58,3)	40 (46,0)	0,744
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$, ср. (min–max)	232,8 (14–567)	200,9 (66–330)	183,6 (18–469)	<0,0001
Лактат артериальной крови, ммоль/л, ср. (min–max)	2,9 (0,4–17,0)	3,0 (0,7–8,9)	3,4 (0,90–15,0)	0,308
АЛТ, ед/л, ср. (min–max)	41,6 (1,8–783)	58,7 (15,6–459,0)	88,6 (6,60–319,0)	<0,0001
АСТ, ед/л, ср. (min–max)	45,5 (1,5–947)	70,2 (7,1–729)	124,1 (16,9–729,6)	<0,0001
Общий билирубин, мкмоль/л, ср. (min–max)	11,8 (2,2–72)	17,2 (3,7–88,5)	16,5 (3,4–58,0)	<0,0001
Печень экспл. / не экспл., n (%)	284 / 57 (83,3 / 16,7)	17 / 22 (43,6 / 56,4)	15 / 72 (17,2 / 82,8)	<0,0001

Примечание. ср. – среднее значение.

Note. ср. – average value.

Таблица 2

Логистическая регрессия характеристик донора и стеатоза печени >50%, выявленного по данным «нулевой» биопсии у доноров
Logistic regression of donor characteristics and >50% liver steatosis detected by time-zero biopsy in donors

Факторы	ОШ	95% ДИ, min-max	p
Возраст, лет	1,003	0,984–1,022	0,737
Пол, м/ж	1,250	0,786–1,989	0,346
Причина смерти, ОНМК / ЧМТ	1,903	1,172–3,088	0,009
ИМТ, кг/м ²	1,045	1,008–1,084	0,017
ГБ	0,972	0,638–1,479	0,893
СД	2,908	1,576–5,364	0,001
АЛТ, ед/л	1,009	1,005–1,013	<0,0001
АСТ, ед/л	1,011	1,007–1,014	<0,0001
Общий билирубин, мкмоль/л,	1,033	1,015–1,052	<0,0001
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	0,993	0,991–0,996	<0,0001
Глюкоза, ммоль/л	1,042	0,991–1,094	0,106

Примечание. ОШ – отношение шансов; ДИ – доверительный интервал.

Note. ОШ – odds ratio; ДИ – confidence interval.

стеатоза >50%. Учитывались характеристики донора, показавшие в логистической регрессии статистическую значимость $p < 0,05$. Продемонстрировали статистическую значимость в контексте прогнозирования наличия тяжелого стеатоза у доноров печени следующие факторы: причина смерти донора – ЧМТ, ИМТ ≥ 30 кг/м², наличие СД у доноров, причем у фактора «сахарный диабет» выявлено достаточно высокое значение ОШ, составившее 2,91, повышенные ферменты печени, общий билирубин крови, снижение уровня тромбоцитов. Возраст – важный фактор оценки донорской печени для трансплантации, но доказанной взаимосвязи с уровнем стеатоза печени выявлено не было. В различных публикациях встречаются данные, что соотношение возраста и пола является основным физиологическим предиктором риска развития стеатоза печени [17], но если в молодом возрасте жировой гепатоз чаще встречается у мужчин [18], то при достижении 50 лет в равной степени у мужчин и у женщин. Средний возраст потенциальных доноров печени в группе 3 со стеатозом >50% составил 49,0 года, что сопоставимо с вышеприведенными данными и подтверждает полученные нами результаты об отсутствии связи между частотой возникновения тяжелого стеатоза печени и возрастом и(или) полом донора. Стеатоз печени снижает клиренс инсулина и оказывает негативное влияние на инсулинорезистентность печени, что приводит к повышению уровня глюкозы в плазме крови, компенсаторной гиперинсулинемии и прогрессированию СД 2-го типа [19]. В нашем исследовании уровень глюкозы крови не показал взаимосвязи с тяжелым стеатозом печени, и повышенный уровень глюкозы крови, выявляемый у доноров, мы склонны связывать с состоянием смерти головного мозга донора. Такой фактор, как тромбоциты крови, несмотря на то что продемонстрировал достоверную взаимосвязь со стеатозом печени >50%, мы сочли очень вариабельным и неспецифичным и исключили из финальных предикторов (табл. 2).

Для проведения ROC-анализа мы отобрали количественные донорские факторы: ИМТ, АЛТ, АСТ, общий билирубин крови. Количественная оценка ROC-анализа характеризуется показателем AUC (англ. Area Under Curve, площадь под кривой). Чем выше показатель AUC, тем качественнее классификатор (фактор), при этом значение AUC = 0,5 и менее демонстрирует низкие прогностические возможности того или иного фактора. На рисунке представлены ROC-кривые и значения AUC для показателей ИМТ, АЛТ, АСТ и общего билирубина крови 0,567; 0,774; 0,750; 0,648 соответственно. Наибольшим прогностическим значением в отношении макростеатоза >50% обладают показатели АЛТ и АСТ крови донора, AUC которых равен 0,774 и 0,750 соответственно. Показатели ИМТ донора и общий билирубин крови

были исключены в качестве предикторов стеатоза >50% в связи с невысокими значениями AUC. Таким образом, высокие значения общего билирубина крови и повышенная масса тела не рассматриваются нами в качестве скрининговых предикторов стеатоза у донора (рис.).

В ROC-анализе путем вычислений получены значения оптимального порога отсечения, чтобы можно было использовать изучаемые модели прогнозирования тяжелого стеатоза доноров на практике. Так, для показателей АЛТ и АСТ пороги отсечения составили 90 и 110 ЕД/л соответственно.

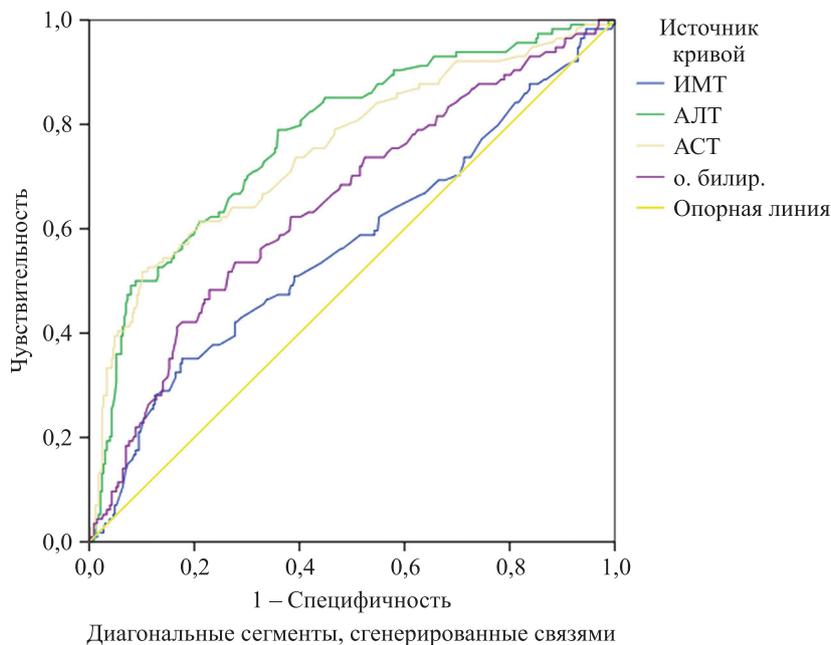
С учетом установленных пороговых значений, в формате таблицы сопряженности, получены значения чувствительности и специфичности для показателей АЛТ и АСТ (табл. 3, 4).

Практически идентичные показатели чувствительности и специфичности выявлены у ферментов печени – АЛТ, АСТ, составившие 69,1; 80,6 и 72,2; 81,1% соответственно. С учетом полученных значений мы можем говорить, что при повышении уровня печеночных ферментов до уровня выявленных нами пороговых значений и более с высокой степенью вероятности следует ожидать повреждения паренхимы печени, но невысокий уровень чувствительности указывает на возможную многофакторность таких повреждений, и одним из факторов может быть стеатоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены предикторы морфологически подтвержденного стеатоза >50% у доноров печени. Воз-

раст донора, пол, уровень глюкозы крови не являются достоверными предикторами стеатоза печени >50%. Показатели ИМТ и общий билирубин крови имеют



Площадь под кривой

Переменные результата проверки	Область	Стандартная ошибка	Асимптотическая знач.	Асимптотический 95% доверительный интервал	
				Нижняя граница	Верхняя граница
ИМТ	0,567	0,033	0,034	0,503	0,631
АЛТ	0,774	0,026	0,000	0,723	0,825
АСТ	0,750	0,028	0,000	0,695	0,805
Общий билирубин	0,648	0,030	0,000	0,589	0,708

Рис. ROC-кривые и площадь под кривой ИМТ, АЛТ, АСТ и общего билирубина

Fig. ROC curves and AUC for BMI, ALT, AST and TBil

Таблица 3

Чувствительность и специфичность для АЛТ
Sensitivity and specificity for ALT

	АЛТ <90	АЛТ >90	Всего
Стеатоз <50	324	17	341
Стеатоз >50	78	38	116
Всего	402	55	457
Специфичность	324 : (324 + 78) × 100%		80,6
Чувствительность	38 : (38 + 17) × 100%		69,1

Таблица 4

Чувствительность и специфичность для АСТ
Sensitivity and specificity for AST

	АСТ <110	АСТ >110	Всего
Стеатоз <50	327	15	342
Стеатоз >50	76	39	115
Всего	403	54	457
Специфичность	327 : (327 + 76) × 100%		81,1
Чувствительность	39 : (39 + 15) × 100%		72,2

низкое значение AUC (0,56 и 0,645 соответственно) в ROC-анализе, в связи с чем, по нашему мнению, в качестве скрининговых предикторов этой патологии использоваться не могут. Такой фактор, как тромбоцитопения, несмотря на то что продемонстрировал достоверную корреляцию со стеатозом печени >50%, тем не менее, слишком вариабелен и неспецифичен и может быть связан с различными причинами, которые не учитывались в данном исследовании. ЧМТ в качестве причины смерти донора коррелирует с тотальным и субтотальным стеатозом печени алкогольного генеза. Среди рассматриваемых возможных предикторов стеатоза печени >50% у трансминаз (АЛТ, АСТ) при относительно невысокой чувствительности (69,1 и 72,2% соответственно) была выявлена приемлемая специфичность (80,6 и 81,1% соответственно), что означает, что при повышении данных показателей (АЛТ >90 ЕД/л, АСТ >110 ЕД/л) у потенциального донора печени с определенной долей вероятности можно прогнозировать значимый жировой гепатоз. Достоверную взаимосвязь со стеатозом >50% продемонстрировал фактор СД у доноров печени. Диагноз сахарного диабета 2-го типа и значения АЛТ и АСТ выше пороговых точек отсечения должны повысить настороженность у специалистов в ходе первичной оценки донора относительно наличия у него тяжелого стеатоза.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Steggerda JA, Bloom BM, Nouredin M, Brennan TV, Tsuyoshi T, Nissen NN et al. Higher thresholds for the utilization of steatotic allografts in liver transplantation: Analysis from a U.S. national database. *PLoS ONE*. 2020; 2 (4): 15.
2. Verran D, Kusyk T, Painter D et al. Clinical experience gained from the use of 120 steatotic donor livers for orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl*. 2003; 9 (5): 500–505.
3. Halon A, Patrzalek D, Rabczynski J. Hepatic steatosis in liver transplant donors: rare phenomenon or common feature of donor population? *Transplant Proc*. 2006; 38 (1): 193–195.
4. Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology*. 2018; 67 (1): 123–133.
5. Pais R, Barritt AS, Calmus Y et al. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol*. 2016; 65 (6):1245–1257.
6. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien P-A, Port RJ et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2008; 14 (12): 1694–1707.
7. Хубутия МИШ, Гуляев ВА, Зими́на ЛН, Новрузбеков МС, Минина МГ. Комплексная оценка состояния печени после выполнения лапаротомии у мультиорганных доноров. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012; (14): 1. Hubutija MSh, Guljaev VA, Zimina LN, Novruzbekov MS, Minina MG. Kompleksnaja ocenka sostojanija pecheni posle vypolnenija laparotomii u mul'tiorgannyh donorov. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2012; (14): 1.
8. Fiorentino M, Vasuri F, Ravaioli M, Ridolfi L, Grigioni WF, Pinna AD, D'Errico-Grigioni A. Predictive value of frozen-section analysis in the histological assessment of steatosis before liver transplantation. *Liver Transpl*. 2009; 15 (12): 1821–1825.
9. Brunt EM. Surgical assessment of significant steatosis in donor livers: The beginning of the end for frozen-section analysis? *Liver Transpl*. 2013; 19 (4): 360–361.
10. Guzzaloni G, Grugni G, Minocci A, Moro D, Morabito F. Liver steatosis in juvenile obesity: Correlations with lipid profile, hepatic biochemical parameters and glycemic and insulinemic responses to an oral glucose tolerance test. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; (24): 772–776.
11. Monsour HP Jr, Wood RP, Ozaki C, Katz S, Clark J, Dyer C et al. Utility of preoperative liver biopsy in live-related donor patients for liver transplantation. *Transplant Proc*. 1994; 26: 138–139.
12. Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J et al. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl*. 2001; 7 (5): 409–414.
13. Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F et al. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med*. 2000; 132: 112–117.
14. Lee, Jeong-Hoon et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Digestive and Liver Disease*. 2009; 42 (7): 503–508.
15. Cesaretti M, Addeo P, Schiavo L, Anty R, Iannelli I. Assessment of Liver Graft Steatosis: Where Do We Stand? *Liver Transpl*. 2019; 25 (3): 500–509.
16. Peck-Radosavljevic M. Thrombocytopenia in chronic liver disease. *Liver Int*. 2017 Jun; 37 (6): 778–793.
17. Lonardo A, Bellentani S et al. Epidemiological modifiers of non-alcoholic fatty liver disease: focus on high-risk groups. *Dig Liver Dis*. 2015; 47: 997–1006.
18. Lonardo A, Carani C, Carulli N et al. 'Endocrine NAFLD' a hormonocentric perspective of nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis. *J Hepatol*. 2006; 44: 1196–1207.
19. Kotronen A, Juurinen L, Tiikkainen M, Vehkavaara S, Yki-Jarvinen H: Increased liver fat, impaired insulin clearance, and hepatic and adipose tissue insulin resistance in type 2 diabetes. *Gastroenterology*. 2008; 135 (1): 122–130.
20. Fernandez-Real JM, Menendez JA, Moreno-Navarrete JM, Bluher M, Vazquez-Martin A, Vazquez MJ, Ortega F, Dieguez C, Fruhbeck G, Ricart W: Extracellular fatty acid synthase: a possible surrogate biomarker of insulin resistance. *Diabetes*. 2010; 59 (6): 1506–1511.

*Статья поступила в редакцию 25.08.2022 г.
The article was submitted to the journal on 25.08.2022*

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-124-134

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ДОНОРОВ СО СМЕРТЬЮ МОЗГА ПРИ ПЕРЕСАДКЕ ПОЧЕК

Д.О. Кузьмин^{1, 2}, В.А. Мануковский¹, С.Ф. Багненко², О.Н. Резник^{1, 2, 4}, А.Н. Ананьев^{1, 2},
О.А. Воробьева³, С.Л. Воробьев³, Д.В. Гоголев^{1, 2}, В.С. Дайнеко^{1, 4}, А.А. Кутенков^{1, 2},
Н.А. Чичагова^{1, 2}, И.В. Ульянкина^{1, 2}

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

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

³ Национальный центр клинической морфологической диагностики, Санкт-Петербург, Российская Федерация

⁴ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Целью данного исследования явилась разработка протокола медикаментозной защиты трансплантатов для повышения эффективности пересадки почек с помощью применения препарата поликлональных антител (ПКАТ) за счет элиминации из кровотока донора активированных форм нейтрофилов, хемо- и цитокинов, снижения уровня экспрессии молекул адгезии на эндотелии сосудов почек на предтрансплантационном этапе. **Материалы и методы.** В 2017 году нами был разработан и впервые применен протокол лекарственной коррекции ишемически-реперфузионного повреждения (ИРП) у донора с установленным диагнозом «смерть головного мозга» (ДСМ). Учитывая ограниченный временной интервал после процедуры диагностики смерти мозга, препарат «Тимоглобулин» (Sanofi Genzyme, Франция) вводился в организм донора в дозе 8 мг/кг внутривенно в течение 6 часов. Перед введением препарата и непосредственно перед началом холодовой перфузии выполнялся развернутый клинический анализ крови и биопсии трансплантатов почек. В исследуемую группу были включены 10 ДСМ (ср. возраст – 39,3 ± 4,4 года), которым вводился антииммунитарный иммуноглобулин (АТГ), группой сравнения были 10 ДСМ (ср. возраст – 38,5 ± 4,3 года) без применения нового протокола. Донорские почки были пересажены 40 реципиентам (ср. возраст – 47,5 ± 4,3 года), которые также были разделены на 2 группы, в зависимости от полученного трансплантата (с АТГ и без АТГ). В центре органного донорства сформирован биобанк образцов от доноров различных категорий, в т. ч. с применением протокола терапевтической коррекции ИРП, и реципиентов для ретроспективной оценки эффективности применения ПКАТ. **Результаты.** По данным проведенной оценки результатов клинического анализа крови, в группе с введением АТГ наблюдалась устойчивая лейкопения (нейтропения и лимфопения) $1,46 \pm 0,18 \times 10^9/\text{л}$. У 15 (75%) реципиентов почек, полученных от доноров с введением АТГ, наблюдалась немедленная функция трансплантата, в контрольной группе – у 10 (50%) реципиентов. **Выводы.** Полученные данные свидетельствуют о перспективности внедрения предложенного протокола в клиническую практику, что позволит улучшить качество получаемых трансплантатов, их пригодность к дальнейшей пересадке, увеличить срок функционирования трансплантата за счет элиминации лейкоцитов как фактора возникновения ИРП, предупреждения развития ранней трансплантационной нефропатии, увеличения «донорского пула» за счет использования доноров с расширенными критериями (ДРК).

Ключевые слова: донорство и трансплантация органов, ишемия-реперфузия, поликлональные антитела.

Для корреспонденции: Кузьмин Денис Олегович. Адрес: 197345, Санкт-Петербург, ул. Будапештская, д. 3. Тел. (904) 648-68-38. E-mail: drkuzmind@gmail.com

Corresponding author: Denis Kuzmin. Address: 3, Budapestskaya str., St. Petersburg, 197345, Russian Federation. Phone: (904) 648-68-38. E-mail: drkuzmind@gmail.com

USE OF POLYCLONAL ANTIBODIES IN BRAIN-DEAD DONORS IN KIDNEY TRANSPLANTATION

D.O. Kuzmin^{1, 2}, V.A. Manukovsky¹, S.F. Bagnenko², O.N. Reznik^{1, 2, 4}, A.N. Ananiev^{1, 2}, O.A. Vorobyeva³, S.L. Vorobyev³, D.V. Gogolev^{1, 2}, V.S. Daineko^{1, 4}, A.A. Kutenkov^{1, 2}, N.A. Chichagova^{1, 2}, I.V. Uliankina^{1, 2}

¹ St. Petersburg Research Institute of Emergency Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

² Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

³ National Center for Clinical Morphological Diagnostics, St. Petersburg, Russian Federation

⁴ North-Western State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Objective. The objective of this study is to develop a therapeutic strategy for protecting grafts in order to improve the efficiency of kidney transplantation (KT) using polyclonal antibodies (pAbs) through elimination of activated forms of neutrophils, chemo- and cytokines from the donor's bloodstream, and a decrease in the level of expression of adhesion molecules on the renal vascular endothelium at the pre-transplant stage. **Materials and methods.** In 2017, we developed and for the first time applied a therapeutic strategy for ischemia-reperfusion injury (IRI) in a brain-dead donor (BDD). Given the limited time interval after brain death has been diagnosed, Timoglobulin (Sanofi Genzyme, France) was administered to the donor at a dose of 8 mg/kg intravenously for 6 hours. Before drug administration and immediately before the start of cold perfusion, a complete blood count and renal transplant biopsy were performed. The study group included 10 BDDs (mean age 39.3 ± 4.4 years) who received anti-thymocyte globulin (ATG). The comparison group included 10 BDDs (mean age 38.5 ± 4.3 years) who did not undergo the new strategy. Donor kidneys were transplanted to 40 recipients (average age 47.5 ± 4.3 years), who were also divided into 2 groups, depending on the graft received (with and without ATG). At the organ donation center, a biobank of specimens from donors of various categories, including those using the IRI therapeutic strategy and recipients for retrospective assessment of the effectiveness of pAbs, was formed. **Results.** Clinical blood test results show that in the ATG group, there was stable leukopenia (neutropenia and lymphopenia) of $1.46 \pm 0.18 \times 10^9/l$. Fifteen (75%) recipients of kidneys obtained from donors with ATG had immediate graft function; in the control group – 10 (50%) recipients. **Conclusion.** Data obtained testify to the prospects of implementing the proposed strategy in clinical practice, which will improve the quality of the resulting grafts and their suitability for subsequent transplantation, prolong graft functioning due to elimination of leukocytes as a factor of IRI, prevention of early allograft nephropathy, increase in the donor pool by using expanded criteria donors (ECDs).

Keywords: organ donation and transplantation, ischemia-reperfusion injury, polyclonal antibodies.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация является радикальным хирургическим методом лечения пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Поэтому общепризнано, что пересадка почки представляет собой преимущественный метод лечения и обеспечивает лучшую выживаемость по сравнению с долгосрочным диализным лечением, а также предпочтительнее с точки зрения качества и продолжительности жизни реципиента [1]. Однако во всем мире отмечается дефицит подходящих донорских органов, и такой метод лечения остается малодоступным. Количество пересаженных почек в мире в 2020 г. составило всего 75 664 [GODT. Global Observatory on Donation and Transplantation. 2020. <http://www.transplant-observatory.org/reports>. Доступ 1 августа 2021].

На протяжении многих лет основным источником донорских органов были доноры с установленным диагнозом «смерть головного мозга» (ДСМ), органы которых считались идеальными. Однако постоянный

дефицит донорских органов послужил причиной использования для пересадки трансплантатов, полученных от доноров с расширенными критериями (ДПК). Данную категорию доноров раньше можно было расценивать как дополнительный ресурс трансплантации, однако на сегодняшний день он становится основным [2]. Использование ресурса ДПК, к которым относятся все доноры старше 60 лет, или в возрасте 50 лет и более, при наличии таких сопутствующих состояний, как артериальная гипертензия в анамнезе, уровень креатинина плазмы выше 132 мкмоль/л непосредственно перед процедурой эксплантации, сахарный диабет, избыточная масса тела (индекс массы тела >30), может приводить к высокому риску отсроченной функции [3]. Тем не менее данная категория доноров считается приемлемым ресурсом для трансплантации почек [4].

Отсроченная функция трансплантата и неудовлетворительные отдаленные результаты пересадки остаются основным препятствием для расширения

донорского пула. Для пересадки почек от ДРК характерно развитие более выраженного ИРП. Это вызвано нестабильностью гемодинамики у такого рода доноров, и как следствие, в почках у них развивается сложный комплекс событий, который характеризуется более тяжелым течением острого повреждения трансплантата [5].

Отсроченная функция наблюдается из-за сложного патофизиологического комплекса событий, связанных с ишемическим и гипоксическим повреждением и реперфузией после гипотермической консервации с длительным периодом восстановления после острого канальцевого некроза [6]. Некоторые исследователи считают, что у 23–38% реципиентов почки от посмертного донора, получающих лечение гемодиализом в течение первой недели после пересадки, риск потери трансплантата увеличивается до 40%. Значительная часть почек, полученных от доноров старше 50 лет или от доноров с высоким уровнем сывороточного креатинина, не используется [7].

Ключевыми патологическими механизмами, кумулятивное действие которых приводит к резкому снижению функционального резерва органов или, при наиболее неблагоприятном сценарии, необратимым изменениям, приводящим к непригодности для трансплантации, являются системная воспалительная реакция, каскад клеточной адгезии и активация лейкоцитов [8]. Наибольшее значение при этом имеет время нестабильности гемодинамики, тепловой ишемии и происходящая при этом «мобилизация лейкоцитов», имеющая мишенью микроциркуляторное русло и эндотелий органов. После запуска кровотока активированные нейтрофилы становятся главным источником продукции свободных радикалов и ферментов лизиса [9]. Необходимо отметить, что активация молекул адгезии инициирует миграцию нейтрофилов в трансплантат и лейкоцитарную инфильтрацию тканей в целом еще на донорском этапе, что еще более потенцирует реперфузионное повреждение почек в организме реципиента. Таким образом, ИРП способствует увеличению продолжительности пребывания в стационаре и уменьшению выживаемости трансплантата [10].

В свою очередь, ведущую роль в развитии ИРП играют активированные формы лейкоцитов. Массовая адгезия лейкоцитов к стенкам сосудов и друг к другу приводит в конечном счете к образованию крупных лейкоцитарных конгломератов, которые закупоривают просвет сосудов и резко ухудшают венозный отток. В таких скоплениях отдельные лейкоциты довольно сильно фиксированы друг к другу, но сами конгломераты разных размеров и иногда слабо фиксированы к стенке сосуда, поэтому через несколько минут после образования они смываются кровью и уносятся в более крупные сосуды. Однако в терминальные периоды кислородного голодания

тканей конгломераты сохраняются, и, по выражению К.П. Иванова (1992 г.), они останавливают «поезда эритроцитов», возникают лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия, что приводит к окклюзии сосудов все большего диаметра и к их деформации. Этим впоследствии объясняется трудность или невозможность восстановления микроциркуляции после глубокой гипоксии [11]. После восстановления кровотока главным действующим фактором ИРП становятся активированные нейтрофилы, продуцирующие свободные радикалы и ферменты лизиса [12].

Установлено, что в то время, когда начинается процесс ишемии-реперфузии, отмечается активация нейтрофилов и дальнейшее повреждение ткани путем высвобождения активной формы кислорода (АФК), протеиназ и катионных пептидов [13]. Под воздействием провоспалительных цитокинов и адгезивного каскада активируется никотинамид аденин динуклеотидфосфат (НАДФН)-оксидаза, что вызывает продукцию большого количества АФК нейтрофилами [14]. Нейтрофилы блокируют капиллярное русло, предотвращая реперфузию, что приводит к некрозу тканей и усилению иммунного ответа [15]. Нейтрофилы секретируют провоспалительные цитокины и хемокины, создавая положительную обратную связь [16]. Кроме того, миграция нейтрофилов вызывает потерю целостности эпителиального барьера и снижает регуляцию молекул адгезии [17].

ИРП инициируется эпизодом ишемии, когда в части или целом органе ограничивается кровоснабжение, вызывая гибель клеток, которая дополнительно усугубляется при возобновлении кровотока. Ишемия приводит к гипоксии тканей, которая вызывает накопление метаболитов и АФК, а именно супероксида, пероксида водорода и гидроксильных радикалов. АФК увеличивают количество внутриклеточного кальция, вызывая изменения рН и одновременно истощая запасы аденазинтрифосфорной кислоты, что приводит к повреждению клеточных органелл и некрозу клеток. Длительные периоды ишемии, продолжающиеся от нескольких минут до получаса, вызывают необратимые эффекты, которые усиливаются при реперфузии. Во время реперфузии ишемизированная ткань наполняется кислородом. Это активирует метаболиты и АФК, что приводит к воспалительной реакции, вызывающей ишемически-реперфузионное повреждение [18].

По мнению Z. V. Schofield et al. (2013), ИРП – это сложный физиологический процесс, но неоспоримую ведущую роль в нем играют нейтрофилы, которые могут проникать в поврежденную ткань уже через несколько минут после активации. Цитокины, АФК и система комплемента также имеют важное значение в патогенезе ИРП, поскольку они поддерживают, активируют и усиливают деструктивную функцию нейтрофилов. Тем не менее недавние исследования

снова обратили внимание на роль нейтрофилов как ключевого игрока в патофизиологии ИРП [12].

При растущем дефиците донорских органов, все более широком использовании органов субоптимального качества особое значение приобрело изучение патофизиологических процессов, развивающихся в организме посмертного донора. Понимание основ патологических изменений в трансплантатах позволяет рассматривать новые возможности воздействия на них, в том числе посредством применения новых методик лекарственной терапии на дотрансплантационном этапе в организме донора, которые могут послужить эффективным средством увеличения продолжительности службы трансплантатов, полученных в том числе и от ДРК [19].

Белки ЕpСAM (Epithelial cell adhesion molecule; молекула клеточной адгезии эпителия) экспрессируются на мембране эпителиальных почечных клеток, где она участвует в клеточных и межклеточных взаимодействиях. Степень экспрессии ЕpСAM значительно увеличивается в процессе восстановления почечной ткани и коррелирует с тяжестью последствий ИРП. Регенерация ткани трансплантата требует очень высокого уровня экспрессии ЕpСAM для развития процессов клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки [20]. Предполагается, что длительная и массивная экспрессия ЕpСAM ассоциирована с его тропностью к процессам пролиферации и адгезии клеток, что наблюдается после ИРП. Таким образом, регуляция экспрессии ЕpСAM прямо связана с потребностью в регенерации почечной ткани [21].

Во всем мире ведутся исследования, направленные на поиск высокоспецифичных биомаркеров неблагоприятных состояний в трансплантации. Создание трансплантационных биобанков, сформированных по стандартной методике, должно гарантировать получение достоверных статистических и клинических данных, в результате оценки которых должны быть введены новые способы терапевтической коррекции ИРП в организме донора. Сбор, обработка и хранение различных типов образцов на всех этапах донорского процесса, во время трансплантации органов, а также в послеоперационном периоде могут служить основой создания уникальных биобанков. Такие биобанки будут представлять собой матрицу для «сквозных» проспективных лонгитюдных исследований. Использование современных геномных технологий, в том числе секвенирования следующего поколения, позволит системно подойти к изучению ишемии-реперфузии и генетических основ реакций отторжения трансплантата, обеспечит индивидуальный подход к назначению иммуносупрессивных препаратов исходя из генетических профилей донора и реципиента. В долгосрочной перспективе можно будет решать более смелые задачи, такие как изучение процес-

сов «умирания» с точным определением момента наступления необратимых изменений. Это позволит пересмотреть существующие критерии определения пригодности органов для трансплантации, отойти от эмпирического подхода к генетически обоснованному [22].

Цель исследования: разработать и внедрить новый способ лекарственной терапии на дотрансплантационном этапе в организме ДСМ, который может послужить эффективным средством увеличения продолжительности службы трансплантатов, полученных от ДРК, повышения эффективности пересадки почек за счет применения поликлональных антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На заседании Локального этического комитета при Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте скорой помощи им. И.И. Джанелидзе от 15 марта 2017 года одобрено исследование «Применение поликлональных антител у доноров со смертью мозга при пересадке почек» и разрешена его дальнейшая разработка на базе ГУ «СПб НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе». Настоящее исследование начато в марте 2017 года, пятилетние результаты оценивались в июле 2022 года.

Согласно официальной инструкции препарата поликлональных антител «Тимоглобулин» (Sanofi Genzyme, Франция), через 1 сутки после введения у пациента развивается глубокая лимфопения (снижение количества лимфоцитов более чем на 50% по сравнению с исходным значением). Новый способ терапевтического применения препарата, традиционно используемого только для лечения стероидрезистентных кризов отторжения у реципиентов, представляется эффективным методом улучшения качества почечных трансплантатов за счет «выключения» лейкоцитарного звена ИРП, что, по нашей гипотезе, положительно скажется на долгосрочных результатах трансплантации.

Учитывая имеющееся ограничение по времени на введение препарата ДСМ (соответствует временному отрезку, требующемуся на процедуру диагностики смерти мозга у донора), было принято эмпирическое решение о четырехкратном увеличении дозы препарата для достижения максимальной редукции количества мобилизованных лейкоцитов. Таким образом, была разработана авторская методика применения поликлональных антител у ДСМ при пересадке почек.

После первичного осмотра ДСМ бригадой в составе анестезиолога-реаниматолога и хирурга КЦОД, а также трансплантационного координатора стационара и принятия решения о начале процедуры диагностики смерти головного мозга и планировании эксплантации почек препарат «Тимоглобулин» (Thymoglobulin) производства Джензайм Поликло-

налс С.А.С. (Франция) (Genzyme Polyclonals, S.A.S.) вводился в организм донора в течение 6 часов в 4-кратной терапевтической дозе. Дозировка препарата составила 8 мг/кг массы тела. Препарат растворялся в 50,0 мл физиологического раствора, вводился в центральный венозный катетер с использованием инфузионного одношприцевого насоса 0,14 мл/мин.

Перед введением препарата и непосредственно перед началом холодной перфузии выполнялся развернутый клинический анализ крови. В исследуемую группу были включены 10 ДСМ (ср. возраст – 39,3 ± 4,4 года), которым вводился антитимоцитарный иммуноглобулин (АТГ), группой сравнения были 10 ДСМ (ср. возраст – 38,5 ± 4,3 года) без применения нового протокола. Донорские почки были пересажены 20 реципиентам исследуемой группы (средний возраст – 42,3 ± 3,1 года) и 20 реципиентам контрольной группы (средний возраст – 41,2 ± 3,3 года) в зависимости от полученного трансплантата (с АТГ и без АТГ). Общая характеристика групп приведена в табл. 1 и 2.

В 2015 году на базе Санкт-Петербургского координационного центра донорства впервые в Российской Федерации создан трансплантационный биобанк.

В биобанке сформирована коллекция биологических образцов от доноров и реципиентов, позволяющая выполнить ретроспективные иммуногистохимические исследования биоптатов трансплантатов почки для оценки эффективности применения ПКАТ для редукции ИРП у ДСМ на предэксплантационном этапе. Для функционирования трансплантационного биобанка выполняется квалифицированный сбор, обработка, характеристика и хранение образцов. Стандартизирована работа с документацией, базами данных, разработаны алгоритмы первичной обработки и хранения биобразцов, контроля надлежащего состояния проб.

Материалом исследования послужили инцизионные биоптаты почечных трансплантатов. Гистологическое исследование ткани почек выполнялось на базе ООО «Национальный центр клинической морфологической диагностики» следующими методами:

- 1) светооптическое исследование выполнено на парафиновых срезах с использованием следующих окрасок: гематоксилин-эозин, PAS-реакция;
- 2) иммуногистохимическое исследование выполнено иммунопероксидазным методом с использованием антител к молекуле клеточной адгезии эпителия (ЕpCAM).

Таблица 1

Общая характеристика групп доноров
General characteristics of donor groups

Характеристика	Контрольная группа (без применения АТГ), n = 10	Исследуемая группа (с применением АТГ), n = 10	Значение p
Возраст, годы	38,5 ± 4,3	39,3 ± 4,4	0,08
Диагноз	ОНМК	4 (40%)	4 (40%)
	ЧМТ	2 (20%)	1 (10%)
	Разрыв аневризмы ГМ	4 (40%)	6 (60%)
Креатинин, мкмоль/л	66,5 ± 6,9	68,9 ± 7,3	
Мочевина, ммоль/л	4,9 ± 0,5	5,6 ± 0,6	

Таблица 2

Общая характеристика групп реципиентов
General characteristics of recipient groups

Характеристика	Контрольная группа (без применения АТГ), n = 20	Исследуемая группа (с применением АТГ), n = 20	Значение p
Возраст, годы	41,2 ± 3,3	42,3 ± 3,1	0,09
Диагноз	ХГН	15 (75%)	15 (75%)
	АДПП	3 (15%)	2 (10%)
	ГБ III ст.	2 (10%)	3 (15%)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для проверки клинических данных выполнено иммуногистохимическое исследование биоптатов трансплантатов почек. В биоптатах трансплантатов почек от ДСМ группы сравнения светооптическое исследование материала продемонстрировало сохранную гистоархитектонику почечной паренхимы. Клубочки с одноконтурной капиллярной стенкой, без признаков мезангиальной и эндокапиллярной гиперклеточности, без сегментарного гломерулосклероза и полулуний. Определяется артериальная вакуолизация цитоплазмы эпителия проксимальных извитых канальцев. Признаки тубуло-интерстициального фиброза отсутствуют. Стенки артериол и артерий мелкого калибра без патологических изменений. Иммуногистохимическое исследование показало положительную экспрессию молекул клеточной адгезии эпителия в цитоплазме эпителия дистальных извитых канальцев и ее отсутствие в других структурах ткани почки (рис. 1).

Оценка гистоморфологических данных, свидетельствующих о полученном ишемическом повреждении, проводилась по наличию положительной экспрессии молекул ЕpCAM в цитоплазме эпителия дистальных извитых канальцев. По данным исследования биоптатов трансплантатов почек от ДСМ исследуемой группы, на светооптическом уровне гистологическая картина осталась прежней. Иммуногистохимическое исследование, в свою очередь,

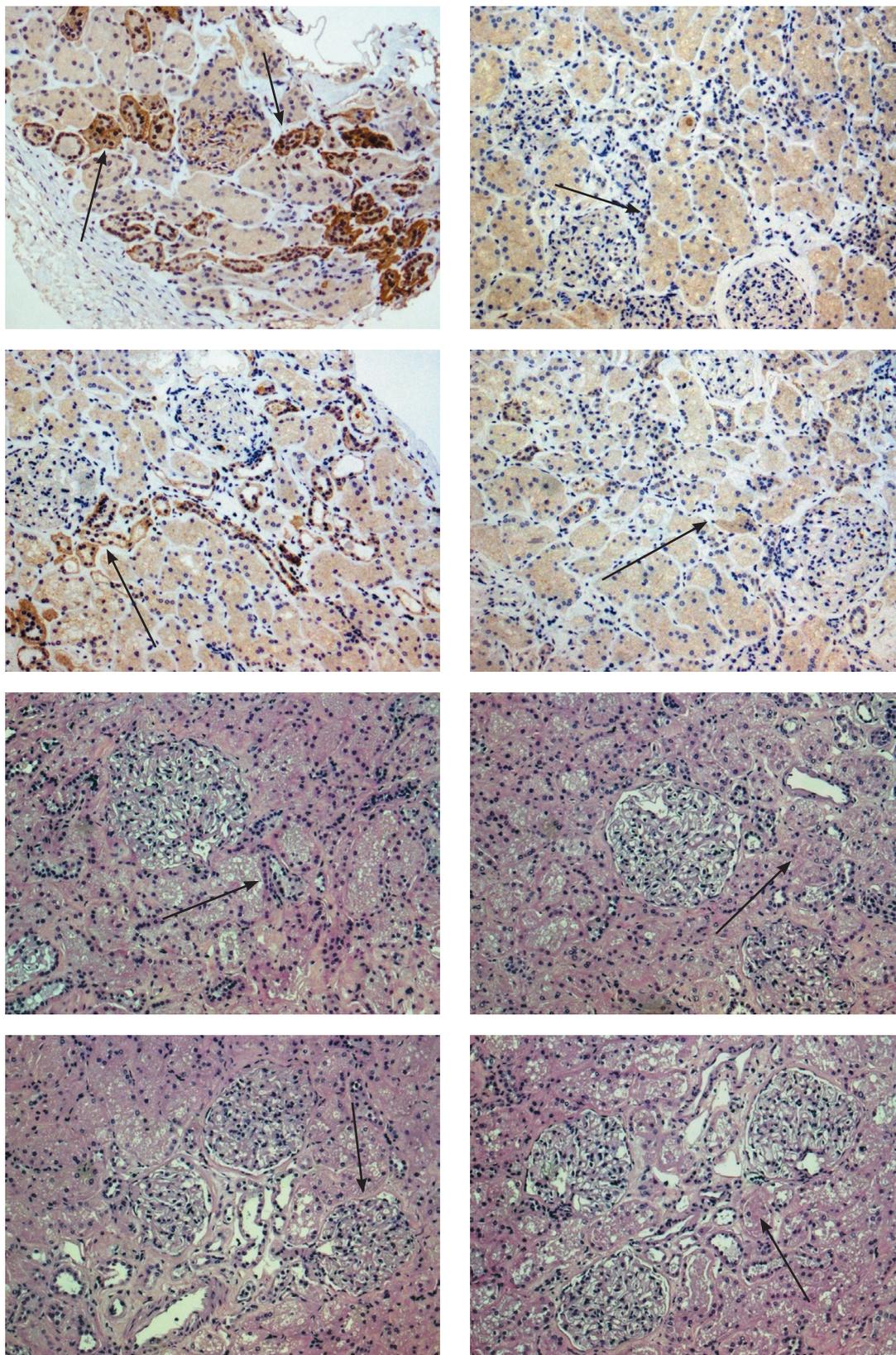


Рис. 1. Иммуногистохимическое исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от ДСМ группы сравнения и исследуемой группы. В группе сравнения наблюдается положительная экспрессия EpCAM в цитоплазме дистальных извитых канальцев – указана стрелками на рисунках в левом столбце. В исследуемой группе наблюдается отсутствие экспрессии EpCAM во всех структурах ткани почки – указано стрелками на рисунках в правом столбце

Fig. 1. Immunohistochemistry in null kidney graft biopsies from BDDs in the comparison group and the study group. In the comparison group there is a positive expression of EpCAM in the epithelial cytoplasm of the distal convoluted tubules – indicated by arrows in the figures in the left column. In the study group, there is no EpCAM expression in all renal tissue structures – indicated by arrows in the figures in the right column

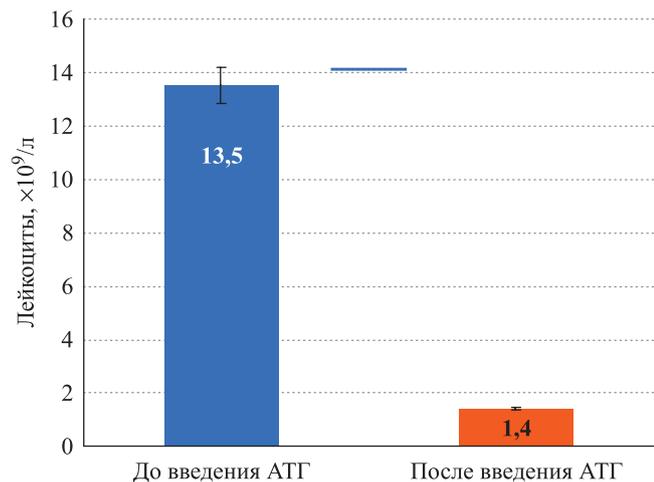


Рис. 2. Уровень лейкоцитов крови у ДСМ в исследуемых группах до и через 6 часов после введения АТГ

Fig. 2. WBC count in BDDs in the study groups before and 6 hours after ATG injection

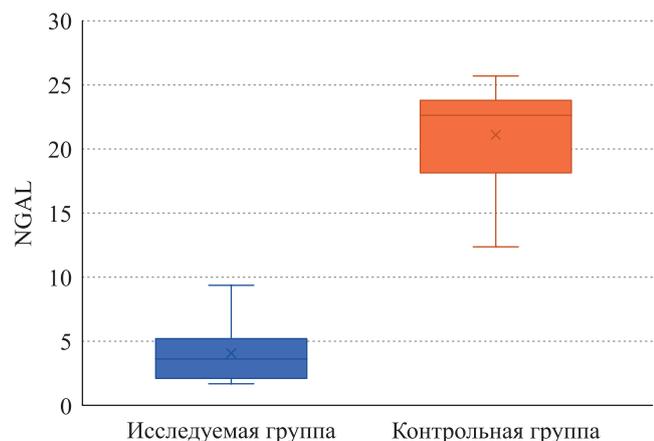


Рис. 3. Уровень NGAL в моче у ДСМ исследуемой и контрольной группы

Fig. 3. Urinary NGAL levels in BDDs in the study and control groups



Рис. 4. Немедленная функция трансплантатов почки у реципиентов в исследуемых группах. * – p = 0,0008 по сравнению с контрольной группой

Fig. 4. Immediate function of kidney grafts in recipients in the study groups. * – p = 0.0008 compared to the control group

продемонстрировало изменение экспрессии ЕрСАМ, а именно полное отсутствие таковой во всех структурах ткани почки, в том числе в цитоплазме эпителия дистальных извитых канальцев.

По данным проведенной оценки результатов клинического анализа крови групп сравнения, в исследуемой группе наблюдалась устойчивая лейкопения (нейтропения и лимфопения) $1,46 \pm 0,18 \times 10^9/\text{л}$ (рис. 2).

Также по лабораторным данным в моче у ДСМ контрольной группы определяется значительно более высокий уровень Липокалина 2 (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocain, NGAL) по сравнению с ДСМ исследуемой группы (рис. 3).

Прогностическая и диагностическая ценность NGAL при остром повреждении почек (ОПП) объясняется тем, что он выделяется с мочой после ишемического повреждения почечной паренхимы и по праву считается «почечным тропонином».

Высокий уровень NGAL у ДСМ контрольной группы демонстрирует тубулярные повреждения, которые предшествуют острому повреждению почек.

У 15 (75%) реципиентов почек, полученных от доноров с введением АТГ, наблюдалась немедленная функция трансплантата, в то время как в группе без применения нового протокола – у 10 (50%) реципиентов (табл. 3, рис. 4).

Через 5 лет после трансплантации уровни сывороточного креатинина и мочевины были ниже у реципиентов почек от доноров, которым вводился АТГ (табл. 3, рис. 5 и 6).

У 15 (75%) реципиентов почек, полученных от доноров с введением ПКАТ, наблюдалась немедленная функция трансплантата, в группе сравнения – у 10 (50%) реципиентов. Пятилетняя выживаемость трансплантатов составила 100% (n = 20) в груп-

Таблица 3

Оценка функции трансплантата почки у реципиентов двух групп

Assessment of kidney transplant function in two groups of recipients

Характеристика		Контрольная группа (без применения АТГ), n = 20	Исследуемая группа (с применением АТГ), n = 20	Значение p
Функция трансплантата	Немедленная	10 (50%)	15 (75%)	0,002
	Отсроченная	10 (50%)	5 (25%)	
Креатинин, мкмоль/л (через 5 лет)		127,0 ± 6,8	101,0 ± 6,3	0,07
Мочевина, ммоль/л (через 5 лет)		8,1 ± 0,9	7,8 ± 1,1	0,08

пе ПККАТ, в отличие от 75% (n = 15) в группе сравнения. Уровень сывороточного креатинина через 5 лет после трансплантации в среднем у реципиентов почек от ДСК с использованием ПККАТ – 0,101 ммоль/л и 0,127 ммоль/л – в группе сравнения.

Кривые Каплана–Майера были построены для оценки выживаемости реципиентов и трансплантатов почек исследуемой группы и группы сравнения (рис. 7 и 8).

АТГ, вводимый донорам, может предотвратить последствия ишемически-реперфузионной травмы при трансплантации почки благодаря снижению степени некроза и апоптоза и улучшить почечную

функцию, что объясняется снижением экспрессии провоспалительных медиаторов.

Кроме того, учитывая функции и механизмы регуляции экспрессии белка ЕрСАМ, можно сделать вывод о том, что результаты выполненного нами иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантатов почек демонстрируют эффективность применения ПККАТ у ДСК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Существенная проблема трансплантации заключается в возможности использовать органы от ДРК, не ставя под угрозу немедленную функцию и дол-

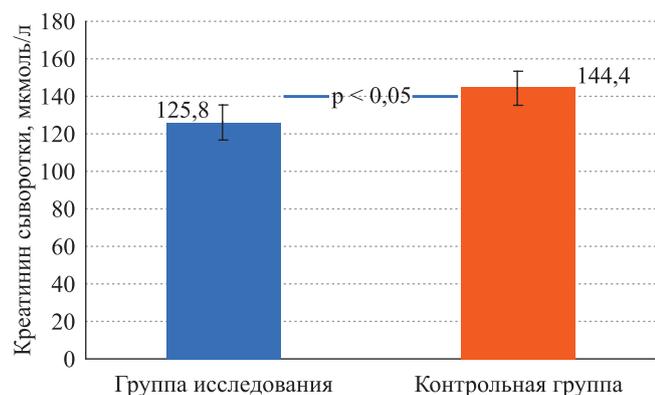


Рис. 5. Уровень сывороточного креатинина у реципиентов через 5 лет после трансплантации почки в исследуемых группах

Fig. 5. Serum creatinine levels in recipients 5 years after kidney transplantation in the study groups

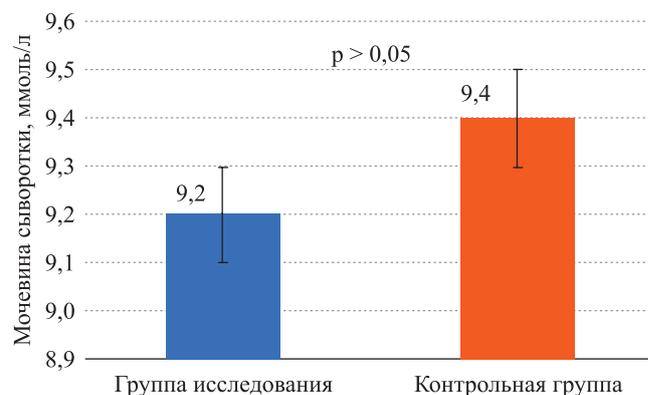


Рис. 6. Уровень сывороточной мочевины у реципиентов через 5 лет после трансплантации в сравниваемых группах

Fig. 6. Serum/plasma urea level in recipients 5 years after transplantation in the compared groups

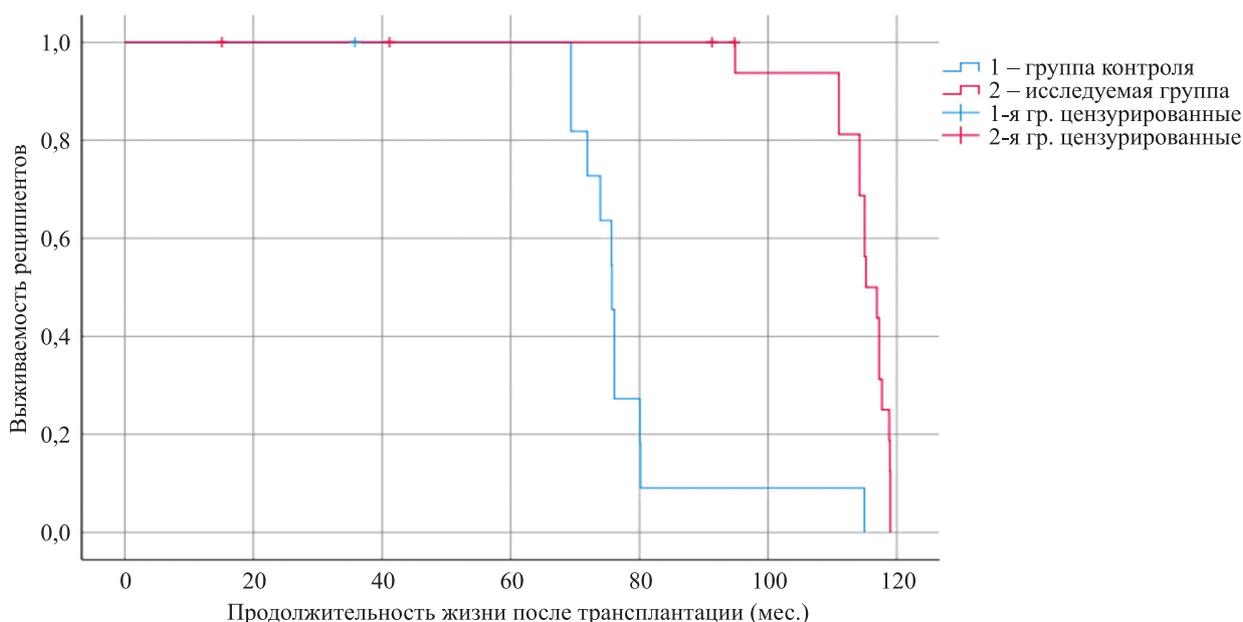


Рис. 7. Оценка выживаемости реципиентов

Fig. 7. Assessment of recipient survival

госрочную выживаемость трансплантата. Поэтому крайне важно оптимизировать состояние каждого органа еще до пересадки, а также свести к минимуму дополнительные повреждения для достижения наилучшей функции и избежать первично не функционирующего трансплантата, отсроченной функции или острого отторжения.

В последнее десятилетие появилось больше информации о сложной патофизиологии ИРП, что открывает двери для новых терапевтических средств, направленных на редукцию последствий ишемии-реперфузии, гипоксии тканей как результата блокирования микроциркуляторного русла рекрутированными лейкоцитами. Но существующие методы коррекции последствий ИРП представлены методами экстракорпоральной фильтрации и целым арсеналом терапевтических опций, которые, однако, все еще остаются компромиссом между желательным эффектом и клинической реальностью. Несмотря на значимое продвижение в изучении процесса, лежащего в основе механизмов нарушения функции почечного трансплантата, методы лечения по-прежнему недостаточны, а результаты остаются неоднозначными.

Впервые в клинической практике трансплантации почек нами была предложена новая оригинальная схема коррекции ИРП у ДСМ. Мы предлагаем новый способ защиты трансплантатов за счет элиминации из кровообращения донора активированных форм нейтрофилов, снижения уровня экспрессии молекул адгезии на эндотелии сосудов почек, что достигается введением ПККАТ в организм ДСМ до эксплантации.

Препарат «Тимоглобулин» является поливалентным лекарственным средством, тропным к множеству антигенов-мишеней, которые можно классифицировать как антигены иммунного ответа, молекулы адгезии и клеточного транспорта. В этом отношении терапевтическое применение препарата ПККАТ у ДСМ, ранее используемого только для лечения реципиентов, представляется эффективным методом улучшения качества почечных трансплантатов за счет редукции лейкоцитарного звена ИРП, что положительно скажется на долгосрочных результатах трансплантации. Однако в доступной нам литературе не встретилось сообщений о применении препарата ПККАТ у ДСМ для улучшения качества трансплантатов почек.

Разработанный протокол включает в себя следующий алгоритм действий при планировании эксплантации почек: после первичного осмотра ДСМ бригадой в составе трансплантационного координатора стационара, анестезиолога-реаниматолога и хирурга КЦОД, получения отрицательных результатов серологического исследования на вирусные инфекционные агенты и принятия решения о начале процедуры диагностики смерти головного мозга препарат «Тимоглобулин» вводился в организм донора в дозировке 8 мг/кг массы тела. Учитывая имеющееся ограничение по времени на введение препарата ДСМ (соответствует временному отрезку, требующемуся на процедуру диагностики смерти мозга у донора), было принято эмпирическое решение о четырехкратном увеличении дозы препарата для достижения мак-

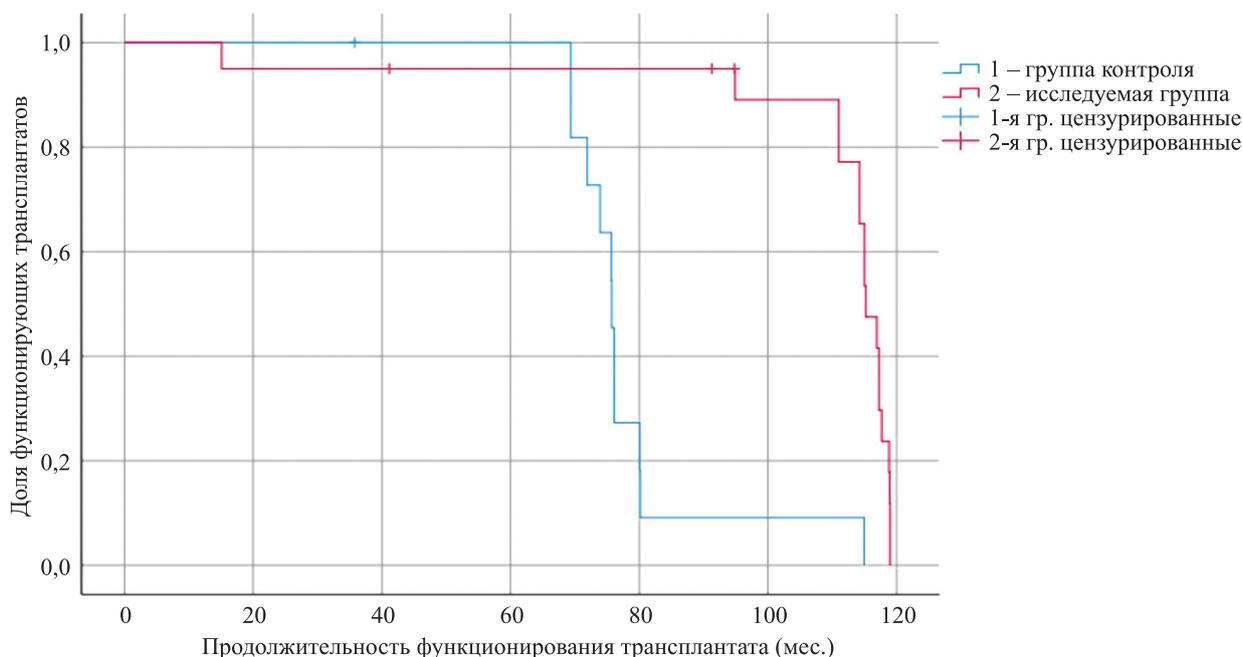


Рис. 8. Оценка выживаемости трансплантатов почек

Fig. 8. Assessment of kidney graft survival

симальной редукции количества мобилизованных лейкоцитов.

Наша гипотеза требовала не только клинической верификации, но и морфологического подтверждения, что трудно осуществить «здесь и сейчас». Было важно сохранить биообразцы от ДСМ и реципиентов для будущих исследований, для чего создан трансплантационный биобанк, представляющий собой коллекцию биологических образцов и связанную с ними информацию в доступной для анализа форме.

Результаты свидетельствуют о перспективности внедрения предложенного протокола в клинические рекомендации, что позволит улучшить качество получаемых трансплантатов, их пригодность к дальнейшей пересадке, увеличить срок функционирования трансплантата за счет предупреждения развития ранней трансплантационной нефропатии, увеличить донорский пул за счет использования ДРК, минимизировать вероятность острого отторжения у реципиентов, уменьшить продолжительность пребывания в стационаре, и следовательно, снизить экономические затраты. Настоящий протокол с применением препарата «Тимоглобулин» демонстрирует необходимость разработки аналогичного отечественного препарата, направленного на снижение лейкоцитарной агрессии в организме ДСМ.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности внедрения предложенного протокола в клиническую практику, что позволит улучшить качество получаемых трансплантатов почек, их пригодность к дальнейшей пересадке, увеличить срок функционирования трансплантата за счет элиминации лейкоцитов как фактора развития ИРП, предупреждения ранней трансплантационной нефропатии, увеличения донорского пула за счет использования ДРК. Для ретро- и проспективной оценки трансплантационных органов установлена целесообразность формирования биобанков в центрах донорства и отделениях трансплантации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *McFarlane PA.* Should patients remain on intensive hemodialysis rather than choosing to receive a kidney transplant? *Seminars in Dialysis.* 2010; 23: 516–519. doi: 10.1111/j.1525-139X.2010.00740.x. PMID: 21039877.
2. *Bahadur MM, Binnani P, Gupta R, Pattewar S.* Marginal donor kidney in a marginal recipient: Five year follow-up. *Indian J Nephrol.* 2010; 20 (2): 100–102. doi: 10.4103/0971-4065.65306. PMID: 20835327.
3. *Barba J, Zudaire J, Robles JE, Rosell D, Berian JM, Pascual I.* Complications of kidney transplantation with grafts from expanded criteria donors. *World J Urol.* 2013; 31: 893–899. doi: 10.1007/s00345-012-0831-3. PMID: 22290479.
4. *Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schumouder RL.* Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation.* 1997; 63: 968–974. doi: 10.1097/00007890-199704150-00011. PMID: 9112349.
5. *Perico N, Gaspari F, Remuzzi G.* Assessing Renal Function by GFR Prediction Equations in Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2005; 5: 1175–1176. doi: 10.1111/j.1600-6143.2005.00939.x. PMID: 15888019.
6. *De Vries DK, Lindeman JHN, Ringers J, Reinders MEJ, Rabelink TJ, Schaapherder AFM.* Donor brain death predisposes human kidney grafts to a proinflammatory reaction after transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2011; 11 (5): 1064–1070. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03466.x. PMID: 21449948.
7. *Yarlagadda SG, Coca SG, Formica Jr RN, Poggio ED, Parikh CR.* Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009; 24 (3): 1039–1047. doi: 10.1093/ndt/gfn667. PMID: 19103734.
8. *Hashemi P et al.* NETosis in ischemic/reperfusion injuries: An organ-based review. *Life Sci.* 2022; 290: 120158. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120158. PMID: 34822798.
9. *Cahilog Z et al.* The Role of Neutrophil NETosis in Organ Injury: Novel Inflammatory Cell Death Mechanisms. *Inflammation.* 2020; 43 (6): 2021–2032. doi: 10.1007/s10753-020-01294-x. PMID: 32830308.
10. *Nakamura K, Kageyama S, Kupiec-Weglinski JW.* Innate immunity in ischemia-reperfusion injury and graft rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2019; 24 (6): 687–693. doi: 10.1097/MOT.0000000000000709. PMID: 31592839.
11. *Иванов КП, Левкович ЮИ.* Изменение микроциркуляции при лейкоцитозе. *Физиол журн.* 1992; 76: 321–326. *Ivanov KP, Levkovich JI.* Izmenenie mikroциркуляcii pri lejkocitoze. *Fiziol zhurn.* 1992; 76: 321–326.
12. *Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA.* Neutrophils – a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2013; 40 (6): 463–70. doi: 10.1097/SHK.0000000000000044. PMID: 24088997.
13. *Liew PX, Kubes P.* The neutrophil’s role during health and disease. *Physiological reviews.* 2019; 99 (2): 1223–1248. doi: 10.1152/physrev.00012.2018.
14. *Carbone F, Bonaventura A, Montecucco F.* Neutrophil-Related Oxidants Drive Heart and Brain Remodeling After Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Physiol.* 2020; 10: 1587. doi: 10.3389/fphys.2019.01587. PMID: 32116732.
15. *Tejchman K et al.* The Role of Endothelins, IL-18, and NGAL in Kidney Hypothermic Machine Perfusion. *Biomedicines.* 2021; 9 (4): 417. doi: 10.3390/biomedicines9040417. PMID: 33924469.

16. Qi H, Yang S, Zhang L. Neutrophil Extracellular Traps and Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis and Thrombosis. *Front Immunol.* 2017; 8: 928. doi: 10.3389/fimmu.2017.00928. PMID: 28824648.

17. Mittal M et al. Neutrophil Activation of Endothelial Cell-Expressed TRPM2 Mediates Transendothelial Neutrophil Migration and Vascular Injury. *Circ Res.* 2017; 121 (9): 1081–1091. doi: 10.1161/circresaha.117.311747. PMID: 28790198.

18. Urisono Y et al. Von Willebrand Factor Aggravates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury by Promoting Neutrophil Recruitment in Mice. *Thromb Haemost.* 2018; 118 (4): 700–708. doi: 10.1055/s-0038-1636529. PMID: 29618155.

19. Fernández AR, Sánchez-Tarjuelo R, Cravedi P, Ochando J, López-Hoyos M. Review: Ischemia Reperfusion Injury-A Translational Perspective in Organ Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (22): 8549. doi: 10.3390/ijms21228549. PMID: 33202744.

20. Trzpis M et al. Expression of EPCAM is up-regulated during regeneration of renal epithelia. *J Pathol.* 2008; 216 (2): 201–208. doi: 10.1002/path.2396. PMID: 18702175.

21. Akhtar AM et al. In vivo quantification of VCAM-1 expression in renal ischemia reperfusion injury using non-invasive magnetic resonance molecular imaging. *PLoS One.* 2010; 5 (9): 34–35. doi: 10.1371/journal.pone.0012800. PMID: 20877722.

22. Hanif Z et al. Role of biobanks in transplantation. *Annals of medicine and surgery.* 2018; 28: 30–33. doi: 10.1016/j.amsu.2018.02.007.

Статья поступила в редакцию 05.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 05.07.2022

УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!

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

Подписной индекс нашего издания нашего издания в каталоге почты России – **ПН380**



Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		ПН380 (индекс издания)								
			количество комплектов								
на 2023 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
(почтовый индекс)				(адрес)							
Кому											
				(фамилия, инициалы)							

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		ПН380 (индекс издания)								
	пв	место	ли-тер								
ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА											
			на журнал	ПН380 (индекс издания)							
стоимость	подписки пере-адресовки	руб.	коп.	количество комплектов							
		руб.	коп.								
на 2023 год по месяцам											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Куда											
(почтовый индекс)				(адрес)							
Кому											
				(фамилия, инициалы)							

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-135-144

РЕКОНСТРУКЦИЯ ГОРТАНОГЛОТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ ЭПИТЕЛИЗИРОВАННЫХ ЛОСКУТОВ

И.В. Ребрикова^{1, 2}, Е.А. Воротеяк³, О.С. Роговая³, А.П. Поляков^{1, 2}, А.В. Мордовский¹, М.В. Ратушный¹, А.Д. Каприн¹, А.В. Васильев³

¹ Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Российская Федерация

³ ФГБУН «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова Российской академии наук», Москва, Российская Федерация

После удаления распространенных злокачественных опухолей гортаноглотки и гортани образуются дефекты верхних пищеварительных путей, для устранения которых необходимы слизистая оболочка и мышечный компонент. **Целью** данного исследования является разработка методики реконструкции гортаноглотки с использованием преламинированных пекторальных лоскутов с аналогом эпителия слизистой оболочки из аутологичных эпителиальных пластов. **Материалы и методы.** Девяти пациентам выполнена реконструкция гортаноглотки биоинженерными преламинированными пекторальными лоскутами с восстановлением слизистой оболочки тканеинженерными аутологичными эпителиальными клеточными пластами, которые были получены путем культивирования *in vitro* клеток, выделенных из предварительно полученных у пациентов биоптатов кожи. **Результаты.** Во всех случаях было восстановлено пероральное питание. У одного (11%) пациента был выявлен стеноз глотки. Многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута выявлен в 67% случаев через 2 недели после преламинации, в 89% случаев – через 4 недели после реконструкции и в 100% случаев – через 3, 6, 12, 24 месяца после реконструкции. **Заключение.** Реконструкция с использованием преламинированных биоинженерных лоскутов позволяет воссоздать анатомическую целостность и функцию гортаноглотки.

Ключевые слова: дефекты гортаноглотки, реконструкция, преламинированный пекторальный лоскут, тканевая инженерия, эпителиальные пласты, кератиноциты.

HYPHARYNGEAL RECONSTRUCTION USING PRELAMINATED AUTOLOGOUS BIO-ENGINEERED PECTORALIS MAJOR FLAPS

I.V. Rebrikova^{1, 2}, E.A. Vorotelyak³, O.S. Rogovaya³, A.P. Polyakov^{1, 2}, A.V. Mordovskiy¹, M.V. Ratushnyy¹, A.D. Kaprin¹, A.V. Vasiliev³

¹ National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

² RUDN University, Moscow, Russian Federation

³ Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russian Federation

After removal of metastatic malignant tumors of the hypopharynx and larynx, hypopharyngeal defects are formed. To restore the hypopharynx, a mucosa and a muscular component are needed. The **objective** of this study is to develop a hypopharyngeal reconstruction technique using prelaminated pectoralis major flap with mucosal epithelium analogue from autologous epithelial layers. **Materials and methods.** Nine patients underwent reconstruction of the hypopharynx using bioengineered prelaminated pectoralis major flaps. The mucosa was restored by tissue-engineered autologous epithelial cell layers that were obtained by culturing *in vitro* cells isolated from skin biopsies that were previously obtained from patients. **Results.** Oral nutrition was restored in all cases.

Для корреспонденции: Роговая Ольга Сергеевна. Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова, 26. Тел. (499) 135-40-81. E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Corresponding author: Olga Rogovaya. Address: 26, Vavilova str., Moscow, 119334, Russian Federation. Phone: (499) 135-40-81. E-mail: Rogovaya26f@gmail.com

Pharyngeal stenosis was detected in one (11%) patient. A stratified squamous epithelium on the pectoral fascia was revealed in 67% of cases at week 2 after prelamination, in 89% of cases at week 4 after reconstruction and in 100% of cases at month 3, 6, 12 and 24 after reconstruction. **Conclusion.** Reconstruction using prelaminated bioengineered flaps allows recreating the anatomical integrity and function of the hypopharynx.

Keywords: hypopharyngeal defects, reconstruction, prelaminated pectoralis major flap, tissue engineering, epithelial layers, keratinocytes.

ВВЕДЕНИЕ

Пациенты с запущенными стадиями рака гортаноглотки и гортани (III и IV стадии) чаще всего являются кандидатами на комбинированное онкологическое лечение, сочетающее обширную хирургическую резекцию и реконструкцию с адъювантной лучевой или химиолучевой терапией. Иногда операция ограничивается удалением опухоли без реконструктивного этапа в связи с наличием выраженных сопутствующих заболеваний или лечением в неспециализированных клиниках.

Для реконструкции гортаноглотки применяют различные варианты лоскутов, в том числе местные с области шеи, перемещенные регионарные с области грудной клетки, перемещенные висцеральные, свободные микрохирургические кожно-фасциальные, кожно-мышечные, висцеральные и др. [1, 2]. Основным недостатком кожных лоскутов является рост волос в просвет глотки. Висцеральные лоскуты неприменимы у соматически ослабленных пациентов; их применение ограничено сопутствующей патологией органов брюшной полости и ранее выполненными вмешательствами на органах брюшной полости.

Идеальным материалом для реконструкции является аутологичная идентичная ткань, формирование которой включает минимально инвазивные процедуры на донорском участке. Известны попытки решить эти вопросы методами тканевой инженерии. Фрагменты эпителия слизистой оболочки были культивированы для использования в качестве биоматериалов [1]. Описано использование культивированных эпителиальных клеток для восстановления слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта. После резекции опухоли ротовой полости и эндоскопической резекции пищевода хирурги имплантировали тканеинженерные эпителиальные клеточные пласты на подлежащую ткань [3–5]. Важно отметить, что эпителиально-стромальное взаимодействие является ключевой детерминантой фенотипической динамики эпителия при гомеостазе и при повреждении. На эпителий и на направление дифференцировки эпителиальных стволовых клеток влияют подлежащие стромальные клетки, продуцирующие комплекс сигнальных молекул [6, 7].

Преламинация превращает нативный аксиальный лоскут в многослойный путем добавления соответствующих структур для композитной реконструк-

ции [8]. Это процесс, включающий имплантацию тканей или конструкторов в кровоснабжающее микроокружение до их переноса непосредственно в область дефекта [8–10].

Цель настоящего исследования – разработка методики реконструкции гортаноглотки преламинированными лоскутами с восстановлением слизистой оболочки тканеинженерными аутологичными эпителиальными клеточными пластами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Заявление об этике

Проведено проспективное исследование с января 2018-го по декабрь 2019 года в МНИОИ им. П.А. Герцена – филиале ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. Исследование было рассмотрено и одобрено локальным этическим комитетом. Все пациенты подписали информированное согласие.

Пациенты

В исследование включены 9 пациентов с дефектами гортаноглотки после хирургического лечения по поводу злокачественных опухолей гортани. Они не были кандидатами на микрохирургическую реконструкцию из-за сопутствующей патологии. Во всех случаях реконструкция выполнялась отсроченно.

Характеристики пациентов представлены в таблице: восемь мужчин и одна женщина; возраст от 57 до 82 лет (медиана: 69,5). При гистологическом исследовании во всех случаях был плоскоклеточный рак. Шесть пациентов имели первичные опухоли III и IVA стадий. Шести пациентам с первичными опухолями гортани послеоперационная стадия была определена в соответствии с классификацией TNM 8-го пересмотра (разработанной и принятой Американским объединенным комитетом по исследованию рака AJCC и Международным союзом по борьбе с раком UICC). Опухолевый процесс у этих пациентов соответствовал индексам: T4a (n = 4), T3 (n = 2), N0 (n = 5), N2c (n = 1). Три пациента были с рецидивами опухолей после химиолучевой терапии. Всем пациентам выполняли ларингэктомию, резекцию гортаноглотки и одностороннюю и/или двустороннюю лимфаденэктомию в зависимости от состояния шейных узлов. Восемью пациентам проведена лучевая или химиолучевая терапия в соответствии с этапами противоопухолевого лечения до реконструктивного

этапа. Большинство пациентов имели сопутствующую патологию по индексу ACE-27. Дефект гортаноглотки после удаления опухоли был частичным с сохранением фрагмента слизистой оболочки задней стенки глотки во всех случаях (рис. 1, а).

Изготовление пластов аутологических клеток

Для выделения аутологических эпителиальных клеток использовали биоптат кожи с волосистой части головы пациента. Резекцию фрагмента кожи выполняли под местной анестезией, рану ушивали узловыми швами нитью Vicryl® 3,0. После взятия биоптата его помещали в специальный контейнер с транспортной средой (DMEM с 0,4 мг/мл гентамицина) и транспортировали в Институт биологии развития РАН. Процедуру выделения эпителиальных клеток проводили в день взятия биоптата. Все процедуры

выделения, культивирования и переноса клеточных культур на биополимерные матрицы проводили строго в асептических условиях в лаборатории.

Выделение эпидермальных кератиноцитов

Биоптаты кожи, полученные от донора, разрезали на полоски шириной 3 × 10 мм, промывали раствором PBS, помещали в 0,2% раствор диспазы (Sigma) и инкубировали при 4 °С в течение 18 часов. После ферментации эпидермис отделяли от дермы по линии базальной мембраны, промывали раствором PBS и проводили дополнительную ферментацию раствором трипсина в течение 10 минут для получения одноклеточной суспензии. Суспензию центрифугировали при 1000 об/мин в течение 6 минут, удаляли надосадочную жидкость, а осадок суспендировали в культуральной среде для кератиноцитов.

Таблица

Демографические данные, методы лечения и периоды наблюдения

Demographic data, treatment modality, and follow-up periods

Пациент	Возраст	Пол	Локализация опухоли	Стадия	TNM	Первичная или рецидив	ЛТ/ХЛТ (Гр)	Предоперационная коморбидность (ACE-27)	Период наблюдения (мес.)
1	65	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (40)	Тяжелая Grade 3	27
2	59	Ж	гортань	IVA	T3N2cM0	Перв.	ЛТ (50)	Тяжелая Grade 3	25
3	57	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (46)	Умеренная Grade 2	24
4	61	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ХЛТ (59, 6)	Тяжелая Grade 3	20
5	60	М	гортань	IVA	T4aN0M0	Перв.	ЛТ (50)	Тяжелая Grade 3	27
6	65	М	гортань	III	T3N0M0	Перв.		Тяжелая Grade 3	22
7	63	М	гортань		гT4aN0M0	Рец.	ХЛТ (66)	Умеренная Grade 2	27
8	70	М	гортань		гT4aN0M0	Рец.	ЛТ (50)	Умеренная Grade 2	24
9	82	М	гортань		гT4aN0M0	Рец.	ХЛТ (70)	Тяжелая Grade 3	10

Примечание. ЛТ – лучевая терапия; ХЛТ – химиолучевая терапия; Гр – Грей.

Note. ЛТ – radiation therapy; ХЛТ – chemoradiotherapy; Гр – Gray.

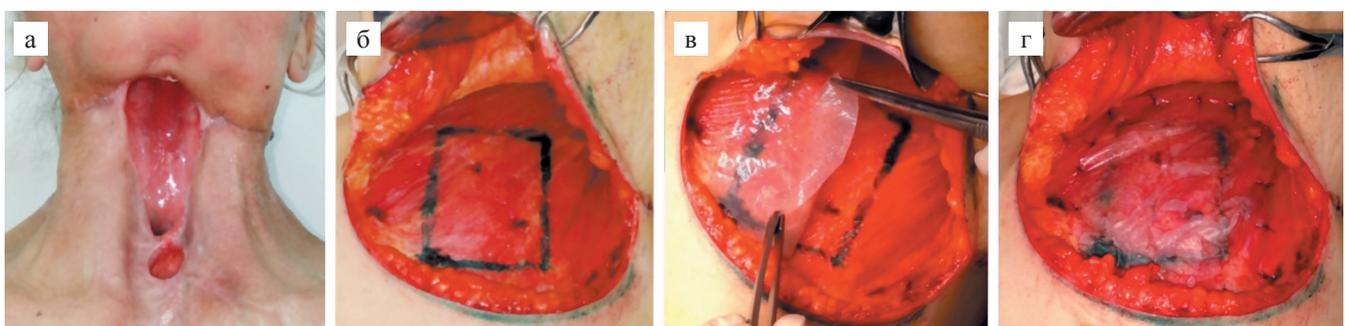


Рис. 1. Первый этап реконструктивной операции: а – пациентка с фарингостомой после комбинированного лечения рака гортани IVA стадии; б – хирургический доступ для преламинации; в – имплантация пласта эпителиальных клеток на фасцию большой грудной мышцы; г – изоляция пласта эпителиальных клеток пленкой

Fig. 1. The first stage of reconstructive surgery: а – patient with pharyngostomy after combined treatment of stage IVA laryngeal cancer; б – surgical access for prelamination; в – implantation of epithelial cell layer on the pectoral fascia; г – isolation of epithelial cell sheet with film

Культивирование эпидермальных кератиноцитов

Суспензию кератиноцитов высевали во флаконы для культивирования площадью 75 см^2 (Costar) в концентрации 2×10^5 клеток/мл по 15 мл. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C и влажности насыщения в среде Keratinocyte-SFM (Gibco). Клетки выращивали при регулярной смене среды (каждые 2 дня) в течение 3–6 недель до образования субконфлюэнтного слоя. Дату фарингопластики назначали в зависимости от скорости роста клеток пациента.

Иммуногистохимический и иммунофлуоресцентный анализ

Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 минут, после чего проводили иммунофлуоресцентное определение маркера кератиноцитов с использованием первых антител фирмы Abscam против цитокератина 14 (ck14) (ab181595) и маркера стволовых и ранних прогениторных клеток эпидермиса – p63 (ab124762) по рекомендованной производителем методике. После инкубации препараты промывали PBS, а затем для визуализации добавляли раствор вторых антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa Fluor 555 и Alexa Fluor 488 (ThermoFisher).

Иммуногистохимическое выявление маркеров кератиноцитов на поверхности мышечного лоскута проводили на гистологических препаратах, которые были окрашены на маркер общих цитокератинов – PanCk (ab7753) и p63 (ab124762). Были использованы первичные антитела фирмы Abscam по рекомендованной производителем методике, для визуализации продуктов реакции был использован пероксиазный метод и вторые антитела с комплексом стрептовидин-DAV, с последующим докрасиванием гематоксилин-эозином.

Посадка и выращивание клеточных культур на матрице

Для формирования клеточного слоя культивируемые кератиноциты высевали на поверхность матрицы, представляющей собой пластину толщиной 0,3–0,5 мм, состоящую из гиалуроновой кислоты и коллагена. Эпидермальные кератиноциты отделяли от культурального флакона с помощью смеси растворов трипсина и Версена (1 : 1). Суспензию эпидермальных кератиноцитов высевали в чашку Петри с помещенной в нее матрицей плотностью 4×10^5 клеток/ см^2 . Затем полученный пласт с кератиноцитами инкубировали в стандартных условиях, при 37°C , 5% CO_2 . Биоинженерный аутологичный пласт был готов к использованию примерно через 5–7 дней, в течение которых эпидермальные колонии образывали

вали конфлюэнтный слой на поверхности матрицы. Количество клеток по истечении этого срока должно быть $80 \pm 20 \times 10^5$ клеток/ см^2 . Готовые эпителиальные пласты на матрице упаковывали в стерильную упаковку и использовали в течение 12 часов.

Оценка жизнеспособности клеток на поверхности эпителиальных клеточных пластов

Фрагмент готового клеточного пласта помещали в лунку 48-луночного планшета и добавляли 0,5 мл рабочего раствора Calcein AM (BD Pharmingen). После 30-минутной инкубации клеточный пласт визуализировали под флуоресцентным микроскопом Olympus IX73 (оборудование ЦКП, Институт биологии развития РАН). Полученные микрофотографии позволили оценить морфологию жизнеспособных клеток и их распределение на поверхности матрицы.

Реконструктивные этапы

На первом этапе выполняли преламинацию биоинженерного мышечно-эпителиального лоскута.

Вначале формировали хирургический доступ к большой грудной мышце (рис. 1, б). Трансплантат, выращенный из аутологичных эпителиальных клеток пациента на матрице, имплантировали на фасцию большой грудной мышцы и фиксировали нитью Vicryl 5.0 (рис. 1, в). На него накладывали латексную пленку и фиксировали нитью Prolen 3.0 (рис. 1, г). Пласты эпителиальных клеток оставляли таким образом приживаться на 3 недели.

На втором этапе выполняли реконструкцию гортаноглотки. Вначале проводили мобилизацию краев фарингостомы (рис. 2, а). При формировании преламинированного пекторального мышечно-эпителиального лоскута большая грудная мышца была мобилизована от грудной стенки и перемещена на область дефекта, как при традиционной хирургической технике (рис. 2, б). Размер мышечного фрагмента пекторального лоскута определяли в соответствии с размером дефекта мягких тканей шеи. Поверхность большой грудной мышцы с преламинированным клеточным пластом (биоинженерный мышечно-эпителиальный лоскут) ориентировали так, чтобы она была направлена в просвет гортаноглотки (рис. 2, в). Биоинженерный фрагмент моделировали по размерам дефекта слизистой оболочки гортаноглотки и фиксировали с помощью нити Vicryl 2.0 к мобилизованным краям слизистой оболочки гортаноглотки по периметру фарингостомы (рис. 2, г). Мягкие ткани восстанавливали мышечной частью лоскута.

Послеоперационный период

Перед началом перорального питания всем пациентам выполняли рентгенографию гортаноглотки и шейного отдела пищевода для определения состоятельности, проходимости вновь сформированного органа и оценки функции глотания. При отсутствии признаков выхода контрастного препарата за контуры верхних пищеварительных путей назогастральный зонд удаляли, и пациенты начинали питание через рот. Оценка результатов проводилась через 2, 4 недели и 3, 6, 12, 24 месяца после фарингопластики. Выполнялась рентгенография глотки и пищевода с контрастным препаратом и видеофарингоскопия с биопсией. Биопсию биоинженерного фрагмента преламинированного лоскута с гистологическим исследованием проводили через 3 недели после преламинации, 2, 4 недели и 3, 6, 12, 24 месяца после фарингопластики.

Статистический анализ

Для анализа лечения и результатов использовалась только описательная статистика. Автор и соавторы имели доступ к данным, рассмотрели и одобрили окончательный вариант рукописи.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Всем пациентам была выполнена реконструкция гортаноглотки с использованием биоинженерного преламинированного мышечно-эпителиального пекторального лоскута, как описано выше.

Клетки, полученные от пациентов, проходящих курс противоопухолевой терапии, в первые несколько суток после выделения показывают низкую скорость роста и высокую чувствительность к условиям куль-

тивирования, поэтому для наращивания необходимой клеточной массы их выращивали в культуральных флаконах на специальной низкокальциевой, стимулирующей пролиферацию среде культивирования (рис. 3, а, б). Иммунофлуоресцентное исследование на этапе формирования клетками стабильной монослойной культуры выявило наличие типичных клеток эпителия, экспрессирующих маркер кератиноцитов – sk14 и большого количества клеток, положительных по маркеру стволовых и ранних прогениторных клеток эпидермиса р63 (рис. 3, б). После того как клетки формировали нормальный эпителиальный пласт, их переносили на биосовместимую матрицу. Основа используемой матрицы – коллагены и гиалуроновая кислота, толщина 0,5 мм. Таким образом, для каждого пациента создавали аутотрансплантат эпителиальной ткани площадью от 60 до 80 см² (рис. 3, в). Контроль наличия живых клеток в составе трансплантата осуществляли на флуоресцентном микроскопе, предварительно окрашивая небольшой участок трансплантата витальным красителем Calcein AM (рис. 3, г).

При гистологическом исследовании через 3 недели после преламинации выявлены участки с колониями кератиноцитов на поверхности мышечного лоскута (рис. 4). Положительная экспрессия цитокератинов (рис. 4, б) и специфического белка р63, характерная для кератиноцитов базального слоя кожи (рис. 4, г), указывает на принадлежность этих клеток к клеткам эпителиальной ткани. Это подтверждает то, что кератиноциты присутствовали на большой грудной мышце в течение 3 недель после трансплантации. Таким образом, через 3 недели предварительной подготовки мышечно-эпителиального лоскута

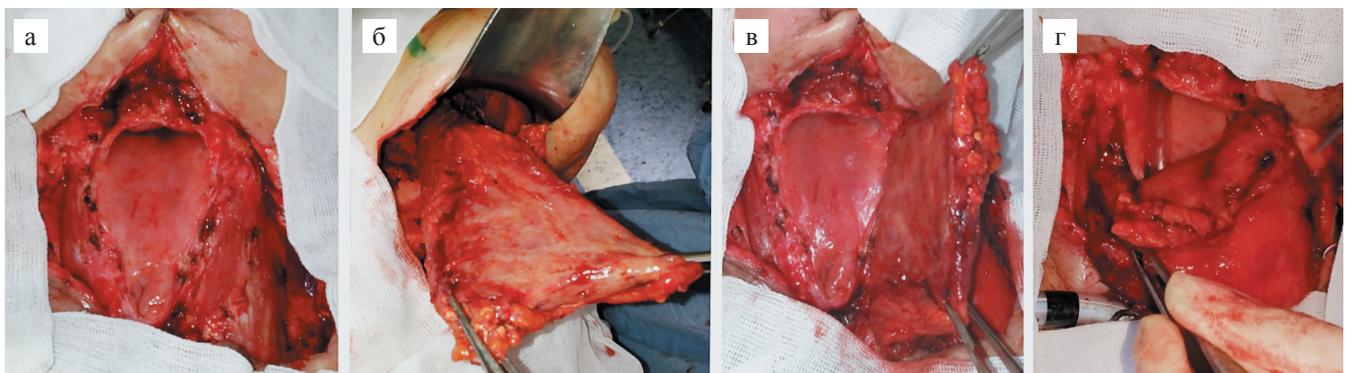


Рис. 2. Реконструкция глотки с использованием преламинированного биоинженерного пекторального лоскута: а – мобилизованные края фарингостомы; б – преламинированный биоинженерный пекторальный лоскут; в – перемещение на шею биоинженерного пекторального лоскута; г – фиксация преламинированного участка лоскута к мобилизованным краям слизистой оболочки по периметру фарингостомы

Fig. 2. Pharyngeal reconstruction using a prelaminated bioengineered pectoral flap: а – mobilized edges of the pharyngostoma; б – prelaminated bioengineered pectoral flap; в – movement of the bioengineered pectoral flap to the neck; г – fixation of the prelaminated flap section to the mobilized mucosa edges along the perimeter of the pharyngostoma

мы считали его готовым к реконструктивному этапу операции.

Средний период послеоперационного наблюдения составил 23,1 месяца (диапазон 10–27 месяцев). Видеофарингоскопия глотки и пищевода больных показала, что область имплантации эпителиально-клеточных пластов через 3, 6, 12, 24 месяца макроскопически неотличима от окружающей слизистой оболочки (рис. 5, а, в).

При гистологических исследованиях мы наблюдали многослойный плоский эпителий на фасции пекторального лоскута через 2 недели после фарингопластики в 78% случаев, через 4 недели после фарингопластики – в 89% случаев (рис. 5, б), через 3,

6, 12, 24 месяца после фарингопластики – в 100% случаев (рис. 5, г).

Питание через рот было восстановлено во всех случаях. Общее среднее время до возобновления питания составило 18 дней после операции (диапазон 14–22 дня). Средняя продолжительность послеоперационного пребывания в стационаре составила 17,5 дня (от 16 до 19 дней). Голосовая функция была восстановлена за счет имплантации голосового протеза в 78% случаев.

Некрозов лоскутов не зарегистрировано. Свищ наблюдали у 4 пациентов (44%). Причиной замедленного заживления ран и формирования несостоятельности швов в области швов глотки могла быть

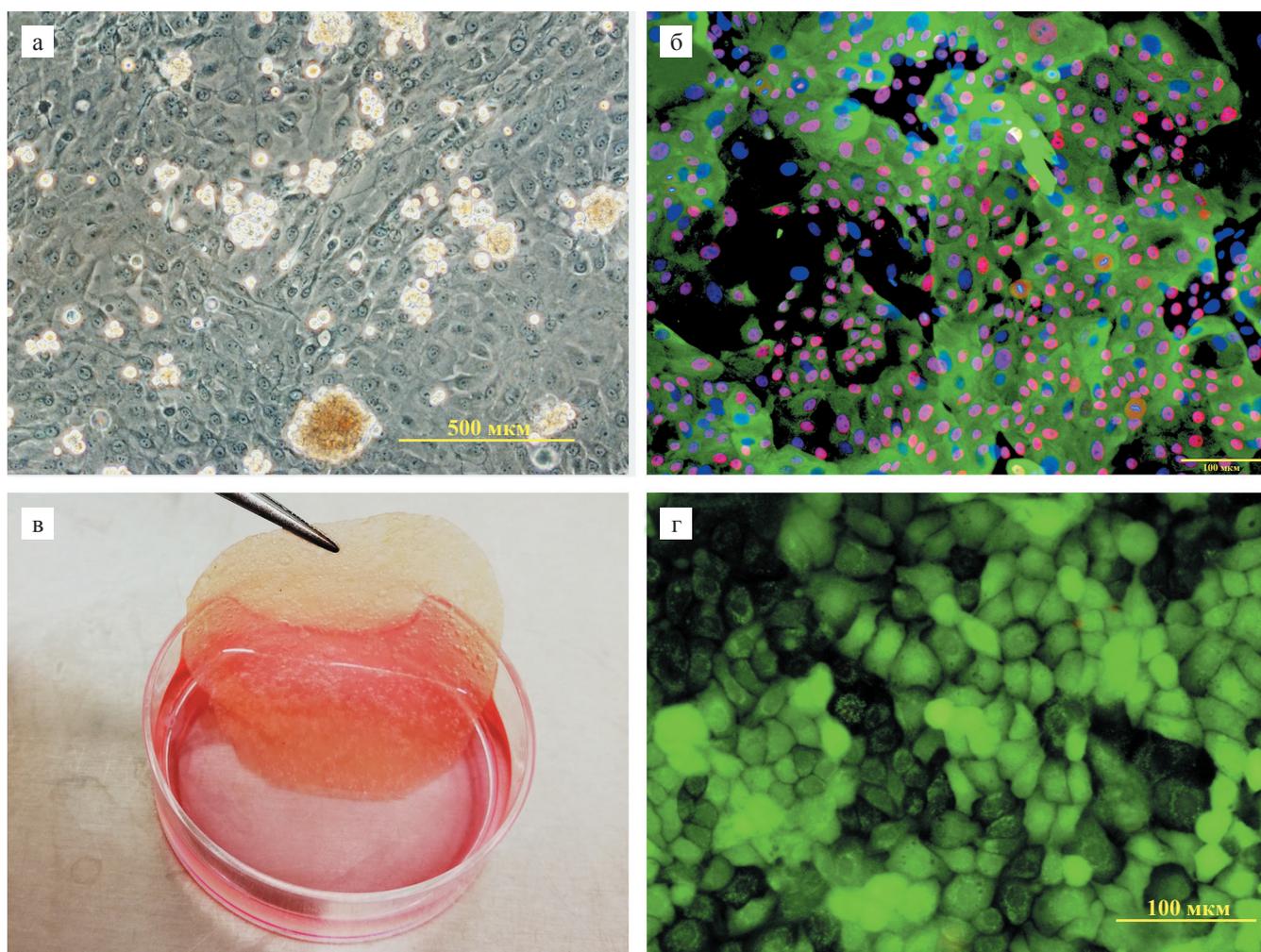


Рис. 3. Подготовка клеточного трансплантата. Культура аутологических кератиноцитов больного через 4 недели культивирования: а – фазовый контраст; б – иммунофлуоресцентное обнаружение специфического маркера кератиноцитов – ck14 (зеленое окрашивание), специфического эпидермального фактора транскрипции p63 (красное окрашивание), ядра окрашены DAPI (синее окрашивание); в – готовый к использованию трансплантат, внешний вид; г – микрофотография кератиноцитов человека, выращенных на поверхности матрицы, выявление жизнеспособных клеток с помощью витального красителя Calcein AM (зеленое окрашивание)

Fig. 3. Cell graft preparation. Culture of patient’s autologous keratinocytes at week 4 of cultivation: а – phase-contrast; б – immunofluorescence identification of keratinocyte-specific marker ck14 (green staining), specific epidermal transcription factor p63 (red staining), nuclei stained with DAPI (blue staining); в – ready-to-use graft, appearance; г – micrograph of human keratinocytes grown on matrix surface, detection of viable cells using viability dye Calcein AM (green staining)

проведенная до фарингопластики лучевая/химиолучевая терапия и алиментарная недостаточность. У всех пациентов свищи формировались в области анастомоза между верхним краем лоскута и основанием языка, закрывались в течение 7–10 дней после проведенной консервативной терапии и перевязок без необходимости дополнительного хирургического вмешательства. У одного пациента был стеноз гортаноглотки в области нижнего края фиксации лоскута. Выполнено бужирование области стеноза, в результате чего просвет гортаноглотки достиг диаметра 1 см. У этого пациента имеются трудности с глотанием только твердой пищи. Нагноение донорской области наблюдали у одного пациента, после проведения консервативной терапии и перевязок рана зажила.

ОБСУЖДЕНИЕ

Реконструкция верхних отделов пищеварительных путей после ларингэктомии с резекцией гортаноглотки остается серьезной проблемой для хирургов, занимающихся опухолями головы и шеи, так как в большинстве случаев выполняется после лучевой/химиолучевой терапии у соматически ослабленных пациентов [11]. Для устранения обширных дефектов после хирургического лечения применяются различные варианты реконструкции [12]. Метод реконструкции зависит от состояния здоровья пациента, возможностей клиники, размера и состава дефекта, лучевого анамнеза, предшествующих операций. Соматически ослабленные пациенты с высоким риском послеоперационных осложнений редко являются

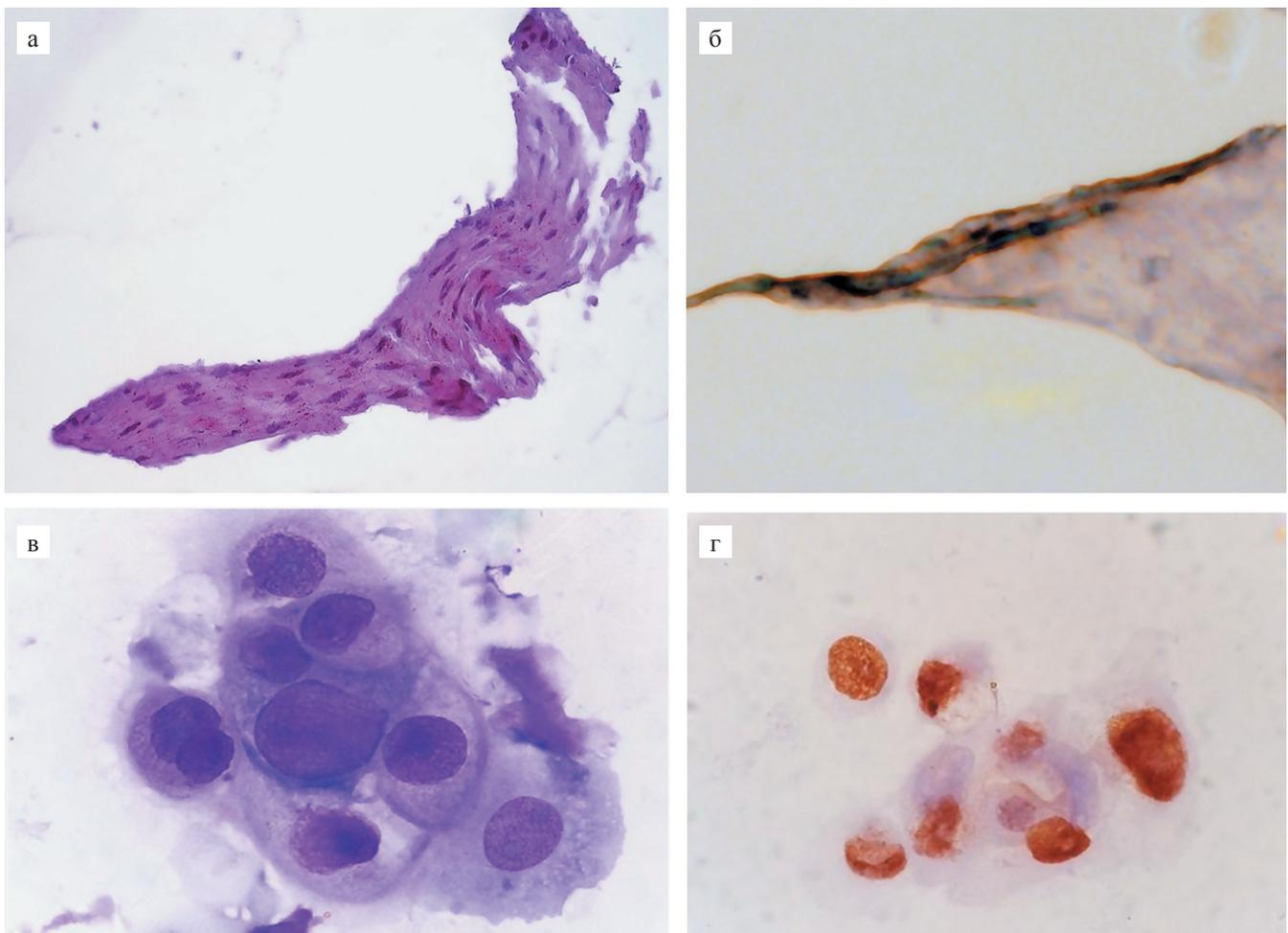


Рис. 4. Биоптат мышечного среза через 3 недели преламинации с эквивалентом эпителиальной ткани: а – фрагмент мышечной ткани из зоны трансплантации, окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$; б – иммуногистохимическое исследование, экспрессия общих цитокератинов, окрашивание DAB, $\times 100$; в – цитологическое исследование поверхности мышечного лоскута с готовым аналогом, окраска гематоксилином и эозином, $\times 1000$; г – иммуногистохимическое выявление эпидермального фактора транскрипции p63 в ядрах клеток, окрашивание DAB, $\times 1000$

Fig. 4. Biopsy of muscle slice at week 3 of prelamination with epithelial tissue equivalent: а – a fragment of muscle tissue from the transplantation area (H&E staining, $100\times$); б – immunohistochemistry, expression of common cytokeratins (DAB staining, $100\times$); в – cytological study of muscle flap surface with a ready-made analog (H&E staining, $1000\times$); г – immunohistochemical detection of epidermal transcription factor p63 (DAB, $1000\times$) in cell nuclei

приемлемыми кандидатами для микрохирургических операций. Из-за этих ограничивающих факторов перемещенные лоскуты остаются предпочтительным методом [13]. Биоинженерный лоскут в ряде случаев может быть хорошей альтернативой стандартным кожно-мышечным лоскутам. Развитие биоинженерных технологий позволяет создавать тканевые аналоги слизистой оболочки, используемые для восстановления слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта, полости рта, уретры, мочевого пузыря, влагалища и роговицы. Восстановление поврежденной эпителиальной ткани в таком случае происходит за счет того, что в составе трансплантата есть аутологичные низкодифференцированные клетки базального слоя эпидермиса, которые могут

пролиферировать и встраиваться в место дефекта. При этом окружающие биоинженерную конструкцию ткани оказывают влияние на входящие в его состав клетки. В частности, было установлено, что клетки роговицы способны к трансдифференцировке в клетки эпидермиса под действием сигналов из эмбриональной дермы [14]. Пластичность эпидермальных кератиноцитов наблюдали и в опытах по трансплантации клеток в уретру. Показано, что через три недели после трансплантации в уретру аутологичных EGFP-экспрессирующих кератиноцитов кожи кроликов они восстанавливают уротелий, проявляя признаки экспрессии специфического маркера [15]. Недавно была продемонстрирована способность клеток пищевода к дифференцировке в кожном на-

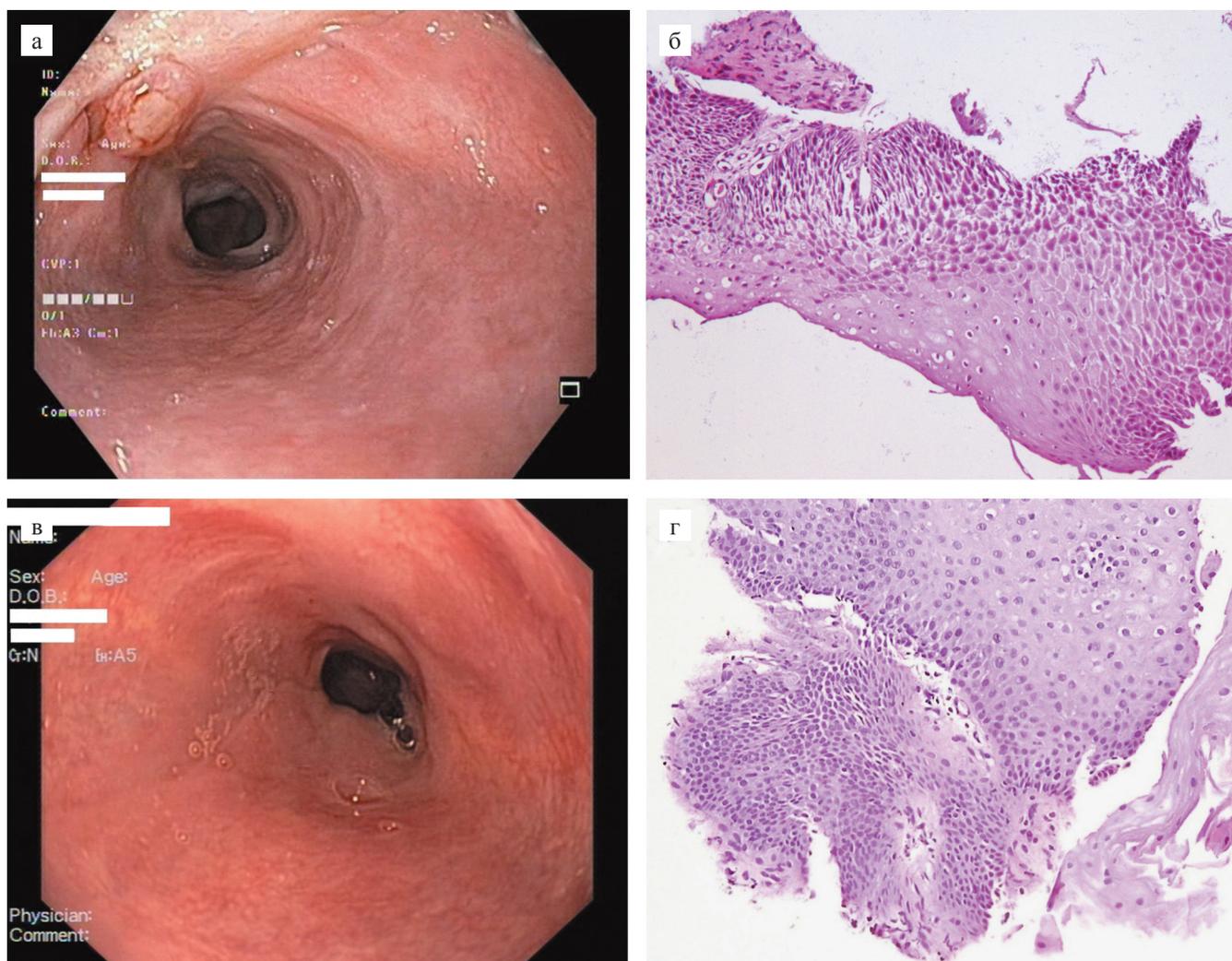


Рис. 5. Данные послеоперационных исследований: а – видеофарингоскопия через 4 недели после фарингопластики; б – при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий, окраска гематоксилином и эозином; в – видеофарингоскопия через 24 месяца после фарингопластики; г – при 100-кратном увеличении показан многослойный плоский эпителий с пролиферацией базальных слоев, окраска гематоксилином и эозином

Fig. 5. Postoperative data: а – videolaryngoscopy at week 4 after pharyngoplasty; б – H&E, at 100× magnification shows stratified squamous epithelium; в – videolaryngoscopy at month 24 after pharyngoplasty; г – H&E, at 100× magnification shows stratified squamous epithelium with basal layer proliferation

правлении под влиянием стромы взрослой кожи [16]. Поскольку собственно гортаноглотка выстлана неороговевающим многослойным плоским эпителием, было резонно предположить, что эпидермис весьма пригоден для его замены. В увлажненной среде эпидермальные кератиноциты теряют способность к ороговению, как это происходит в культуральных условиях. Таким образом, они вполне могут выполнять функции эпителия глотки. Ранее было опубликовано исследование, в котором для реконструкции гортаноглотки использовали перемещенный мышечный трансплантат, состоящий из большой грудной мышцы с предварительно имплантированным тканевым эквивалентом слизистой оболочки, созданным на основе культивированных донорских кератиноцитов. Донорские клетки, используемые в качестве эпителиального слоя в таких конструкциях, способны временно выполнять функцию барьерного эпителия, обеспечивая надежное приживание трансплантата в зоне реципиентных тканей, а также модифицировали раневую поверхность, стимулируя собственную эпителизацию раны [5].

При устранении дефектов гортаноглотки после удаления местнораспространенных опухолей необходимо комплексное восстановление мягких тканей и слизистой оболочки, а также нормального функционирования пищеварительного тракта и голосовой функции. Преламинация культивированных клеток на хорошо кровоснабженную ткань большой грудной мышцы позволяет создавать лоскуты с требуемыми свойствами: на поверхности мышцы успевает сформироваться слой эпителиальных клеток, которые вместе с мышечной тканью возможно формировать по размерам существующего дефекта. Мы использовали биоинженерные преламинированные лоскуты для реконструкции обширных дефектов гортаноглотки. Использование выращенного из кожи пациента эпителиального пласта вместо полнослойного аутодермоплатки позволяет избежать таких осложнений, как врастание волос в просвет гортани, стенозирование просвета верхних пищеварительных путей в послеоперационном периоде. Осложнения в виде свищей, наблюдаемые у пациентов в нашем исследовании, составляют 44%, что сопоставимо с известной из литературных данных частотой свищей у пациентов, получивших предоперационное облучение, которое колеблется от 13 до 50% [17]. У 56,5% пациентов после реконструктивных операций с использованием кожно-мышечных лоскутов описывают затруднение глотания твердой пищи, а у 21,7% – трудности при глотании как твердой, так и жидкой пищи [17]. В нашем исследовании у 1 (11%) больного был стеноз глотки, который после проведения бужирования стал причиной проблем с глотанием только твердой пищи. На основании проведен-

ных послеоперационных наблюдений можно сделать вывод, что разработанная нами методика позволяет восстановить анатомию и функции гортаноглотки идентичными тканями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование методики реконструкции гортаноглотки преламинированным биоинженерным лоскутом позволило воссоздать анатомическую целостность и функцию гортаноглотки во всех описанных 9 клинических случаях.

Работа завершена в рамках раздела Государственного задания ИБР РАН № 0088-2021-0016 и Гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-4667.2018.7.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kim Evans KF, Mardini S, Salgado CJ, Chen HC. Esophagus and hypopharyngeal reconstruction. *Semin Plast Surg.* 2010; 24 (2): 219–226. doi: 10.1055/s-0030-1255339.
2. Rauchenwald T, Dejaco D, Morandi EM et al. The Pectoralis Major Island Flap: Short Scar Modified Muscle-Sparing Harvesting Technique Improves Aesthetic Outcome in Reconstructive Head and Neck Surgery. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2019; 81 (5–6): 327–337. doi: 10.1159/000503008.
3. Jonas E, Sjöqvist S, Elbe P et al. Transplantation of tissue-engineered cell sheets for stricture prevention after endoscopic submucosal dissection of the oesophagus. *United European Gastroenterol J.* 2016; 4 (6): 741–753. doi: 10.1177/20506406166631205.
4. Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, Kinoshita S, Kanamura N. Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0125391. doi: 10.1371/journal.pone.0125391.
5. Чиссов ВИ, Решетов ИВ, Васильев АВ, Кравцов СА, Терских ВВ, Батухтина ЕВ и др. Клинические аспекты биоинженерной реконструкции глотки у онкологических больных. *Онкохирургия.* 2012; 4 (3): 29–33. Chissov VI, Reshetov IV, Vasil'ev AV, Kravtsov SA, Terskikh VV, Batukhtina EV i dr. Klinicheskie aspekty bioinzhenernoy rekonstruktsii glotki u onkologicheskikh bol'nykh. *Onkokhirurgiya.* 2012; 4 (3): 29–33.
6. Pereira D, Sequeira I. A Scarless Healing Tale: Comparing Homeostasis and Wound Healing of Oral Mucosa With Skin and Oesophagus. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9: 682143. doi: 10.3389/fcell.2021.682143.
7. Wang J, He J, Zhu M et al. Cellular Heterogeneity and Plasticity of Skin Epithelial Cells in Wound Healing

- and Tumorigenesis. *Stem Cell Rev and Rep.* 2022; doi: 10.1007/s12015-021-10295-8.
8. Pribaz JJ, Fine NA. Prelamination: defining the prefabricated flap – a case report and review. *Microsurgery.* 1994; 15 (9): 618–623. doi: 10.1002/micr.1920150903.
 9. Pribaz JJ, Fine NA. Prefabricated and prelaminated flaps for head and neck reconstruction. *Clin Plast Surg.* 2001; 28 (2): 261–272.
 10. Pribaz JJ, Maitz PK, Fine NA. Flap prefabrication using the «vascular crane» principle: an experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg.* 1994; Jun, 47 (4): 250–256. doi: 10.1016/0007-1226(94)90007-8.
 11. Pribaz JJ, Fine N, Orgill DP. Flap prefabrication in the head and neck: a 10-year experience. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103 (3): 808–820. doi: 10.1097/00006534-199903000-00006.
 12. Wang Q, Chen R, Zhou S. Successful management of the supraclavicular artery island flap combined with a sternohyoid muscle flap for hypopharyngeal and laryngeal reconstruction. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98 (41): e17499. doi: 10.1097/MD.00000000000017499.
 13. Ki SH, Choi JH, Sim SH. Reconstructive Trends in Post-Ablation Patients with Esophagus and Hypopharynx Defect. *Arch Craniofac Surg.* 2015; 16 (3): 105–113. doi: 10.7181/acfs.2015.16.3.105.
 14. Pearton DJ, Yang Y, Dhouailly D. Transdifferentiation of corneal epithelium into epidermis occurs by means of a multistep process triggered by dermal developmental signals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 (10): 3714–3719.
 15. Роговая ОС, Файзулин АК, Васильев АВ, Кононов АВ, Терских ВВ. Реконструкция эпителия уретры кролика с помощью кератиноцитов кожи. *Acta Naturae.* 2015; 7 (1): 74–81. Rogovaya OS, Fayzulin AK, Vasiliev AV, Kononov AV, Terskikh VV. Reconstruction of Rabbit Urethral Epithelium with Skin Keratinocytes. *Acta Naturae.* 2015; 7 (1): 70–77.
 16. Bejar MT, Jimenez-gomez P, Moutsopoulos I, Colom B, Han S. Defining the transcriptional signature of esophageal-to-skin lineage conversion. 2021; bioRxiv [Preprint]. doi: 10.1101/2021.02.19.431899.
 17. Somuk BT, Çiftçi O, Aygenç E. Evaluation of Cases Who Underwent Reconstruction Through Pectoralis Major Myocutaneous Flap after Laryngopharyngectomy. *Turk Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 54 (2): 58–62. doi: 10.5152/tao.2016.1603.

Статья поступила в редакцию 05.07.2022 г.
The article was submitted to the journal on 05.07.2022

DOI: 10.15825/1995-1191-2022-4-145-151

КОРОНАРНЫЙ ПАРАДОКС

В.В. Честухин¹, Ф.А. Бляхман^{2, 3}

¹ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения Москвы», Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Российская Федерация

³ ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» Минобрнауки Российской Федерации, Екатеринбург, Российская Федерация

Работа представляет собой научно-образовательный аналитический обзор, предназначенный для практикующих кардиологов. Цель обзора – обратить внимание врачей на роль сократительной функции миокарда в регуляции коронарного кровотока. Рассмотрен фундаментальный феномен компрессии (сдавливания) артерий в стенке левого желудочка, создающий препятствие течению крови в систолическую часть сердечного цикла. Это явление формально напоминает функциональный стеноз коронарных артерий. На основе анализа литературы дано толкование позитивному вкладу компрессии артерий в коронарную гемодинамику. Понимание механических взаимоотношений сократительной и коронарной систем в сердечной стенке может быть полезно практикующим врачам при выборе тактики лечения пациентов, оптимизации левожелудочкового обхода при операциях на сердце, а также повышения эффективности адаптации трансплантированного сердца.

Ключевые слова: сердце, левый желудочек, коронарные артерии, сократимость миокарда, компрессия артерий, коронарный кровоток.

CORONARY PARADOX

V.V. Chestukhin¹, F.A. Blyakhman^{2, 3}

¹ Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russian Federation

² Ural State Medical University, Ekaterinburg, Russian Federation

³ Ural Federal University, Ekaterinburg, Russian Federation

This work is a scientific and educational analytical review intended for practicing cardiologists. The purpose of the review is to draw physicians' attention to the role of myocardial contractility in the regulation of coronary circulation. We consider the fundamental phenomenon of arterial compression (squeezing) in the left ventricular (LV) wall, creating an obstruction to blood flow during cardiac systole. This phenomenon formally resembles functional coronary artery stenosis. Based on a review of the literature, the positive role of arterial compression in coronary hemodynamics is interpreted. Understanding the mechanical relationship between the contractile and coronary systems in the cardiac wall may be useful for practicing physicians when choosing treatment tactics for patients, optimizing LV bypass during heart surgeries, and improving the efficiency of adaptation of the transplanted heart.

Keywords: heart, left ventricle, coronary arteries, myocardial contractility, arterial compression, coronary circulation.

ВВЕДЕНИЕ

Сердце – это биологический насос, обеспечивающий циркуляцию крови во всех тканях организма. В отличие от остальных органов сердце участвует в собственном кровоснабжении для реализации механической функции миокарда. Таким образом, сократительная система сердца и система жизнеобес-

печения миокарда, содержащая разветвленную сеть кровеносных сосудов, конструктивно сосредоточены в сердечной стенке и тесно связаны между собой.

Гемодинамика в проксимальных отделах коронарных артерий принципиально отличается от течения крови в остальных артериях организма, где движение крови непосредственно связано с систолической

Для корреспонденции: Бляхман Феликс Абрамович. Адрес: 620028, Екатеринбург, ул. Репина, д. 3. Тел. (343) 214-86-96. E-mail: feliks.blyakhman@urfu.ru

Corresponding author: Felix Blyakhman. Address: 3, Repina str., Ekaterinburg, 620028, Russian Federation. Phone: (343) 214-86-96. E-mail: feliks.blyakhman@urfu.ru

частью сердечного цикла. Точнее, с фазой изгнания крови левым желудочком (ЛЖ), во время которой возникает градиент давления в сосудистой системе, определяющий движущую силу в течении крови.

Общепринято, что в коронарной системе систолический кровоток ограничен и основные гемодинамические события происходят в диастолическую часть сердечного цикла. На такую особенность коронарного кровотока было обращено внимание еще в 1695 году [1]. Автор отметил, что при релаксации сердца коронарные сосуды заполняются, а при сокращении – опорожняются. В первой половине прошлого столетия было экспериментально подтверждено, что во время сокращения сердца коронарный артериальный приток затруднен, а венозный отток увеличивается [2, 3].

Можно считать доказанным, что отмеченные особенности коронарной гемодинамики являются следствием механической функции сердечной стенки, приводящей к сдавливанию определенной части коронарных артерий и снижению коронарного кровотока [4–7]. Этот феномен на первый взгляд выглядит парадоксальным, поскольку сократительная функция миокарда препятствует коронарному кровообращению.

Настоящая работа призвана обратить внимание кардиологов на означенное противоречие, которое мы условно назвали «коронарный парадокс». На основе анализа литературы мы сделаем попытку дать обоснованное толкование наличию нетривиальной связи между механическими явлениями в сердечной стенке и гемодинамическими событиями в коронарных артериях ЛЖ. Данная проблематика является предметом многолетних дискуссий специалистов в сфере физиологии кровообращения, однако остается не в фокусе пристального внимания практикующих врачей.

ФЕНОМЕН КОРОНАРНОГО ПАРАДОКСА

На рис. 1 приведена синхронная запись результатов измерения давления в аорте, правом и левом желудочках; объемной скорости кровотока в проксимальных отделах правой коронарной артерии и передней межжелудочковой ветви (ПМЖВ) левой коронарной артерии, а также объемной скорости течения крови в большой сердечной вене.

Рисунок наглядно иллюстрирует, что с началом механического цикла ЛЖ объемная скорость кровотока в ПМЖВ резко уменьшается, и в период изгнания ЛЖ крови (возрастание давления в аорте) увеличивается незначительно. Однако с наступлением фазы изоволюмического расслабления ЛЖ (момент закрытия аортального клапана) происходит существенное увеличение скорости коронарного кровотока.

Ограничение коронарного кровотока в систолу ЛЖ можно наблюдать у клинически здоровых людей

при аномальном прохождении части эпикардиальной артерии в миокарде. В таких случаях на коронарограмме визуализируется выраженный систолический стеноз, исчезающий с началом диастолы. Данный феномен именуют «мышечными мостиками», и он, как правило, не сопровождается симптомами ишемической болезни сердца [9].

На рис. 2 в качестве примера приведены два кадра ангиограммы, зафиксированные нами в систолу и диастолу ЛЖ у пациента с подозрением на ИБС. Хорошо видно, что просвет ПМЖВ левой коронарной артерии в систолу резко сужается, а с началом диастолы восстанавливается. Мышечные мостики наглядно демонстрируют эффект пережатия артерии при сокращении ЛЖ.

Между тем в нормальном сердце механическое препятствие кровотоку в систолу ЛЖ происходит на уровне системы макроциркуляции крови в сердечной

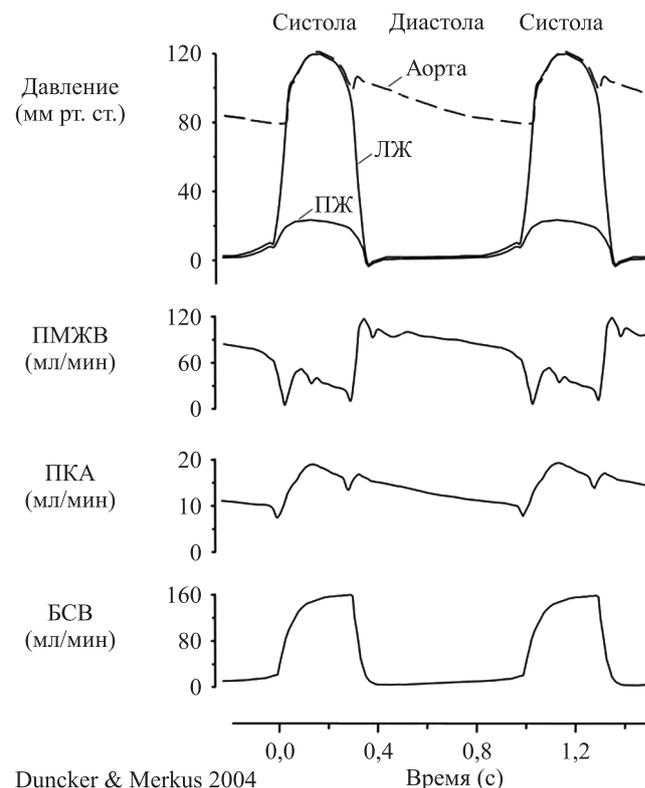


Рис. 1. Динамика давления (верхняя панель) и объемной скорости кровотока в различных отделах сердца: ЛЖ – левый желудочек; ПЖ – правый желудочек; ПМЖВ – передняя межжелудочковая ветвь; ПКА – правая коронарная артерия; БСВ – большая сердечная вена. Диаграмма заимствована из презентации доклада Dirk J. Duncker (2014) в открытом доступе [8]

Fig. 1. Dynamics of pressure (upper panel) and Volumetric blood flow velocity in different parts of the heart: ЛЖ – left ventricle; ПЖ – right ventricle; ПМЖВ – anterior interventricular artery; ПКА – right coronary artery; БСВ – great cardiac vein. The diagram is borrowed from a presentation by Dirk J. Duncker (2014) in open access [8]

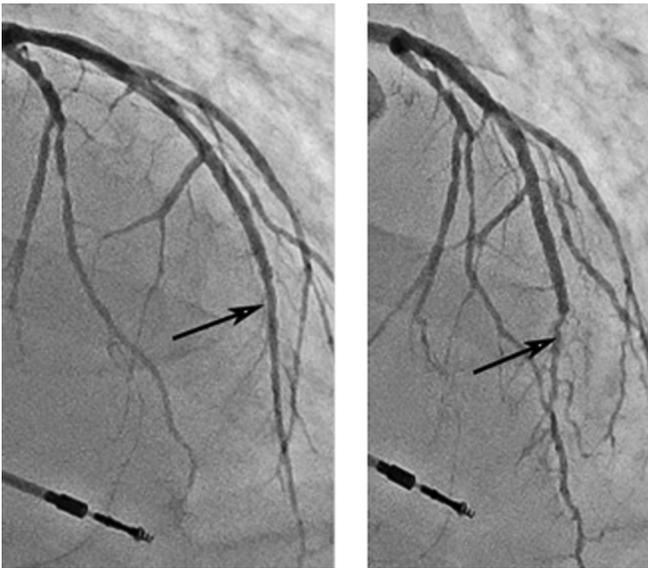


Рис. 2. Пример визуализации левой коронарной артерии с «миокардиальным мостиком» (местоположение указано стрелкой) в конце диастолы (слева) и в конце систолы ЛЖ (справа)

Fig. 2. An example of left coronary artery imaging with myocardial bridge (location indicated by arrow) at the end of diastole (left) and at the end of LV systole (right)

стенке, в частности, в интрамуральных (перфорирующих миокард) артериях диаметром меньше 500 мкм и артериолах диаметром не менее 100 мкм [10]. Эти сосуды расположены в соединительно-тканых прослойках между пучками мышечных волокон, распространяются из эпикарда до субэндокардиального сплетения в стенке ЛЖ [6].

Напротив, на уровне микроциркуляции крови в сосудах диаметром менее 100 мкм влияния сокращения сердечной мышцы на просвет артерий практически не наблюдается [11, 12]. Сдавливанию артериальных сосудов в системе микроциркуляции в систолу ЛЖ препятствуют два фактора. Во-первых, артериолы малого калибра расположены параллельно кардиомиоцитам, и во-вторых, каждый артериальный сосуд окружен двумя венулами. Фактически эти сосуды демпфируют сдавливание артериол со стороны сокращающихся миоцитов, при этом диаметр венул изменяется значительно, с 48 мкм в диастолу до 31 мкм в систолу ЛЖ. Благодаря двум перечисленным факторам обеспечивается защитный эффект, позволяющий сохранять просвет артериол системы микроциркуляции практически неизменным: 38 мкм в систолу и 39 мкм в диастолу ЛЖ [13].

Таким образом, «**коронарный парадокс**» есть феномен гемодинамически значимой компрессии перфорирующих сосудов системы макроциркуляции коронарного кровотока ЛЖ в систолическую часть сердечного цикла. В его основе лежат механические взаимоотношения между миокардом и коронарными

артериями, которые предопределены особенностями структуры сердца, и ЛЖ в частности.

МЕХАНИЗМЫ КОМПРЕССИИ АРТЕРИЙ В СИСТОЛУ ЛЖ

Известен ряд гипотез, объясняющих механизм возникновения препятствия коронарному кровотоку в систолу ЛЖ. В целом эти гипотезы в определенной мере подкреплены фактами, и их можно разделить на две основные группы. К первой относятся функциональные модели, объясняющие опосредованное действие миокарда на просвет коронарных артерий за счет возрастания внутримиокардиального давления в сердечной стенке в систолу. Вторая группа предположений рассматривает прямое механическое действие миокарда на коронарные артерии.

Опосредованный механизм компрессии артерий представлен двумя базовыми моделями: «водопада» [14] и «внутримиокардиального насоса» [15]. Обе модели основаны на предположении о том, что сокращение миокарда увеличивает внутримиокардиальное давление в сердечной стенке, которое действует на внешнюю поверхность артерии. При этом просвет сосуда уменьшается и сопротивление кровотоку возрастает.

Модель «водопада» утверждает, что скорость тока крови в коронарной системе в систолу ЛЖ будет определяться разницей между давлением в области пережатия артерии и венозным давлением, деленной на периферическое сопротивление сосудов. Дополнительно к этому модель «внутримиокардиального насоса» предполагает, что в систолу ЛЖ сжатие артерий перемещает кровь во взаимно противоположных направлениях подобно насосу [16]. Достоинством модели «интрамиокардиального насоса» по отношению к модели «водопада» является то, что она может объяснить ретроградный кровоток в артериях, а также увеличение венозного оттока в систолическую часть сердечного цикла.

Существование прямого (механического) действия миокарда на коронарный кровоток было убедительно продемонстрировано на изолированном сердце кошки [17] и сердце собаки *in situ* [18]. В этих экспериментах создавались условия для изоволюмических и изобарических сокращений ЛЖ. В первом случае давление в желудочке возрастало при неизменном объеме камеры, то есть сердечный выброс отсутствовал. В случае изобарического сокращения давление в камере поддерживалось постоянным с момента возбуждения миокарда, при этом объем ЛЖ уменьшался, то есть изгнание крови начиналось непосредственно с началом механического цикла сердца. Авторы установили, что вне зависимости от принципиально разной динамики давления в ЛЖ, наблюдался одинаковый эффект снижения коронарного кровотока в систолу.

Для объяснения механизма прямого действия сердечной мышцы на коронарный кровоток предложены несколько базовых моделей, три из которых выглядят наиболее реалистичными. Это модели «переменного эластанса» (*varying elastance*), «укорочения и утолщения мышцы» (*muscle shortening and thickening*) и «деформации сосудов» (*vascular deformation*). Все модели подразумевают непосредственную механическую связь между коронарными сосудами и миокардом в сердечной стенке.

Модель «переменного эластанса» базируется на концепции изменяющейся упругости миокарда в систолу ЛЖ [19]. На субклеточном уровне увеличение жесткости кардиомиоцита связано с взаимодействием мажорных белков саркомера (миозина с актином). После возбуждения сердечных клеток упругость миокарда существенно возрастает, причем чем выше сократимость клеток, тем больше активная жесткость мышцы и больше эластанс. Упругая сила в миокарде оказывает давление на стенки артерии, вследствие чего просвет и объем крови в сосудах уменьшается в местах их сдавливания [20].

Модель «укорочения и утолщения мышцы» основана на положении о постоянстве объема кардиомиоцитов во все фазы сердечного цикла. Поэтому укорочение сердечных клеток в систолу ЛЖ сопровождается увеличением их поперечного размера, что оказывает давление на сосуды [21]. Предложенный механизм компрессии артерий может быть реализован как в раннем, так и в позднем периодах систолы ЛЖ, где в той или иной степени имеет место укорочение и утолщение миокарда в силу высокой степени структурной неоднородности в стенке ЛЖ [5].

Модель «деформации сосудов» связывает сокращение миокарда с коронарным кровотоком не только за счет изменения просвета артерий, но и за счет влияния механики сердечной мышцы на извилистость сосудов, углов разветвлений в местах их бифуркации [22]. Считается, что предложенный механизм может проявляться преимущественно в системе микроциркуляции коронарного кровотока.

Следует отметить, что все рассмотренные механизмы опосредованного и прямого влияния сократительной функции миокарда на динамику крови в коронарных артериях в достаточной мере обоснованы, но не являются универсальными. Вероятно, тот или иной феномен циркуляции крови в систолу ЛЖ может быть объяснен совокупным действием механизмов в зависимости от конкретных условий. Вместе с тем важно подчеркнуть, что в контексте темы настоящего изложения любой из рассмотренных механизмов объясняет лимитирующее действие сокращения миокарда на ток крови в сосудах сердца в систолу ЛЖ.

ВКЛАД КОМПРЕССИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ В КРОВΟΣНАБЖЕНИЕ МИОКАРДА

Систолический вклад ЛЖ в коронарный кровоток составляет порядка 20–25% от общего за механический цикл сердца [6, 23]. Это обстоятельство явилось основанием для того, чтобы говорить о лимитирующем эффекте контрактильной функции миокарда на коронарный кровоток. Бытует мнение, что систолическая компрессия (сдавливание) артерий сердца является «вынужденной ситуацией», негативно влияющей на коронарное кровообращение. Ниже мы попытаемся сформулировать возможные механизмы в поддержку гипотезы о позитивном вкладе «коронарного парадокса» в циркуляцию крови в сосудах сердца.

Итак, систола сердца возникает сразу после электрического возбуждения миокарда и начинается с фазы изоволюмического сокращения ЛЖ, которая протекает при закрытых клапанах и занимает короткий промежуток времени (50–70 мс). В этот период кардиомиоциты генерируют силу, активная жесткость клеток быстро увеличивается, что приводит к возрастанию механического напряжения в стенке ЛЖ, внутрижелудочкового и внутримиекардиального давлений.

В конечном счете совокупность перечисленных событий обеспечивает компрессию перфорирующих артерий, в результате чего объемная скорость кровотока в проксимальных отделах коронарного русла быстро снижается практически до нулевого значения (см. рис. 1). В некоторых случаях в этот период сердечного цикла можно наблюдать и ретроградный ток крови, то есть в направлении к аорте [3, 24]. Это означает, что в местах сдавливания перфорирующих артерий происходит не просто ограничение кровотока, но возникает движущая сила (давление на сосуды), обеспечивающая течение крови. Механизм такого действия миокарда на артерии хорошо описывается в рамках концепций «внутримиекардиального насоса» [15] и/или «переменного эластанса» [19, 20] (см. выше). Вклад фазы изоволюмического сокращения ЛЖ в кровоснабжение миокарда обычно не учитывается из-за отсутствия возможности его количественной оценки.

Изоволюмическая часть систолы ЛЖ переходит в фазу изгнания крови в аорту. Кардиомиоциты в этот период существенно укорачиваются, активная жесткость клеток продолжает увеличиваться до максимального значения. Давление в аорте возрастает до величины конечно-систолического давления в ЛЖ. По отношению к системной гемодинамике, где течение крови определяется артериовенозной разницей в давлении, коронарный кровоток критическим образом отличается из-за предварительной компрессии перфорирующих артерий в фазу изоволюмического сокращения ЛЖ. Подобно изменению гемодинамики

при стенозе артерии увеличение сопротивления кровотоку в раннюю систолу приводит к снижению его объемных характеристик, показателей систолического и пульсового давления и возникновению градиента давления в артериях на уровне их сужения.

В системе коронарной макроциркуляции ЛЖ течение крови в фазу изгнания определяется разницей давления в аорте и перфорирующих артериях. Компрессия перфорирующих артерий в эту часть сердечного цикла продолжает увеличиваться, и следовательно, вносит дополнительный насосный вклад в антеградный кровоток ниже уровня сдавливания артерий. Систолический вклад компрессии артерий в коронарный кровоток может быть объяснен в рамках любой или всех известных концепций, рассмотренных выше.

Обращают на себя внимание немногочисленные исследования, в которых изучались функциональные различия механики миокарда и кровотока в слоях сердечной стенки. В частности, были показаны существенные осевые различия как в региональной работе миокарда, так и в плотности перфузии по толщине стенки. Взаимосвязь между этими характеристиками также была продемонстрирована [25, 26].

Известные факты позволяют предположить, что в систолу ЛЖ происходит не просто компрессия перфорирующих коронарных артерий, но скоординированное в пространстве и во времени последовательное сдавливание участков сосуда вдоль его оси. С точки зрения концепций «внутримиокардиального насоса» и/или «переменного эластанса» данное обстоятельство увеличивает производительность перекачивания крови в соответствующем направлении. Это подобно принципу работы перистальтического насоса, где объемная скорость течения жидкости прямо зависит от количества роликов, пережимающих трубку.

Следует добавить, что в системе прекапиллярных артериол коронарной микроциркуляции также имеет место компрессионный вклад миокарда, но на вены, окружающие артериолы [13]. Данный факт дает основание говорить о наличии насосного вклада сердечной мышцы в венозный отток в систолу ЛЖ.

Таким образом, механическая (сократительная функция) миокарда в систолу ЛЖ определяет коронарный кровоток за счет двух факторов: 1) компрессии перфорирующих артерий, которая начинается еще до повышения артериального давления, и 2) увеличения давления в аорте. В контексте «коронарного парадокса» ЛЖ формально можно рассматривать как механический насос двойного предназначения, с одной стороны, обеспечивающий глобальную гемодинамику для организма в целом, с другой – насос для коронарной циркуляции крови в частности.

Диастолическая часть сердечного цикла начинается с фазы изоволюмического расслабления ЛЖ, когда актин-миозиновое взаимодействие в саркомерах кар-

диомиоцитов быстро сходит на нет. При этом жесткость миокарда, внутримыокардиальное давление и давление в ЛЖ быстро уменьшаются при постоянном объеме камеры. На рис. 1 хорошо видно, что за короткий промежуток времени (~50 мс) объемная скорость кровотока в ПМЖВ левой коронарной артерии резко увеличивается и приобретает максимальное значение к началу фазы диастолического наполнения ЛЖ.

Рассмотренный гемодинамический феномен принято называть эффектом «присасывания» или декомпрессии в коронарных артериях [27, 28]. В его основе лежит быстрое снижение упругости в сердечной стенке при расслаблении миокарда, которое приводит к восстановлению просвета перфорирующих артерий за короткий промежуток времени. Резкое уменьшение гидродинамического сопротивления артерий сопровождается увеличением градиента между давлением в проксимальном и дистальном отделах коронарной системы, что приводит к быстрому заполнению артерий кровью ниже мест сдавливания сосудов в систолу ЛЖ. В дальнейшем течение крови в диастолу ЛЖ определяется артериовенозной разницей давления и периферическим сопротивлением в коронарной системе.

Таким образом, феномен компрессии артерий реализует свое действие на коронарную гемодинамику во все фазы сердечного цикла с момента возбуждения миокарда. Сдавливание коронарных артерий обеспечивает не только систолический вклад в коронарный кровоток, например, по принципу «внутримиокардиального насоса», но и задает условия течения крови по сосудам сердца в диастолу ЛЖ. Соотношение систолического и диастолического вкладов «коронарного парадокса» в сердечную гемодинамику зависит от инотропного состояния миокарда. Это играет важную роль при адаптации сердца к возрастающей нагрузке, вне зависимости от того, является ли она физической или связана с развитием патологических процессов в сердце [5, 7, 29].

РОЛЬ КОМПРЕССИИ КОРОНАРНЫХ АРТЕРИЙ В СЕРДЦЕ

История изучения коронарного кровообращения насчитывает более трех столетий. Складывающиеся веками научные представления о регуляции тока крови в сосудах сердца были основаны на исследовании гемодинамики в крупных коронарных артериях. Развитие современных медицинских диагностических технологий в последние несколько десятилетий позволило по-новому взглянуть на многие аспекты регуляции коронарного кровотока за счет появления возможности для оценки течения крови в системе микроциркуляции. В частности, стало понятно, что в норме кровотоки в разветвленной сети капилляров не пульсирующий, имеет скорость ~0,5 мм/с при давлении порядка 25–35 мм рт. ст. [30]. Можно считать,

что такие гемодинамические параметры оптимальны для реализации метаболических процессов «кровь – кардиомиоцит». Однако каким образом достигается эта оптимальность, пока до конца не ясно.

В покое сократительная деятельность миокарда обеспечивает в аорте систолическое давление порядка 110–120 мм рт. ст. с пульсовым давлением примерно 40 мм рт. ст. Коронарная система, находясь в непосредственной близости с сердцем, испытывает примерно такие же гемодинамические нагрузки в крупных субэпикардиальных артериях. Принимая во внимание небольшую протяженность коронарной системы в сравнении с большим кругом кровообращения, можно предположить, что граничные условия давления на входе коронарной системы избыточны для обеспечения необходимых параметров в системе микроциркуляции крови в сердце.

Компрессия перфорирующих артерий в систолу ЛЖ повышает сопротивление кровотоку, уменьшает артериовенозную разницу давления в системе, и следовательно, препятствует гидродинамическому удару в дистальных отделах коронарного русла. По своей сути «коронарный парадокс» является неким «систолическим барьером» на пути течения крови на входе коронарной гемодинамической системы.

Обратим внимание на то, что принцип «систолического барьера» реализован и в системе мозгового кровообращения, где демпфирующую роль потоку крови в систолу ЛЖ выполняют распрямляющиеся сифоны (S-образные изгибы) магистральных артерий [31]. Интересно, что более удаленные от устья аорты органы подобной защиты не имеют.

Априори препятствие току крови в крупных коронарных артериях должно снижать эффективность ЛЖ. Однако, как было отмечено выше, природа смогла «превратить» кажущиеся на первый взгляд недостатки в конструкции сердца в преимущества его функционирования. Действительно, наличие компрессии артериальных сосудов способно оптимизировать коронарную гемодинамику во все фазы сердечного цикла, обеспечив тем самым условия течения крови, необходимые для обменных процессов в кардиомиоцитах. Следовательно, «коронарный парадокс» можно рассматривать как неотъемлемый детерминант в системе регуляции коронарного кровообращения.

В заключение следует сказать, что затронутая проблематика является предметом непрекращающихся дискуссий [6, 7]. Связано это с необычайной сложностью изучения коронарной системы, в которой все звенья регулирования тесно взаимосвязаны между собой. Это касается не только взаимных гуморальных влияний между миокардом и гладкой мускулатурой коронарных сосудов, но и механических взаимодействий, обусловленных структурной неоднородностью сердца, и левого желудочка в частности [32].

В этой работе мы старались убедить заинтересованного читателя в том, что систолическая компрессия артерий есть не «вынужденное», а строго «обоснованное» природное явление. Явление, направленное на решение задачи оптимизации совместной деятельности контрактильной и коронарной систем в конструкции биологического насоса. Мы надеемся, что предложенная в работе трактовка фактов дает основание говорить о том, что систолический вклад ЛЖ в коронарный кровоток явно недооценен. Понимание роли «коронарного парадокса» в сердце может быть полезно практикующим врачам при выборе тактики лечения пациентов, оптимизации левожелудочкового обхода при операциях на сердце, а также для повышения эффективности адаптации трансплантированного сердца.

Ф.А. Бляхман признателен Российскому научному фонду за финансовую поддержку при подготовке настоящей работы (Грант РФФ № 22-71-10071 «Гемореологическое моделирование течений в коронарных артериях для нужд персонализированной диагностики и лечения ишемической болезни сердца»).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Scaramucci J. De motu cordis, theorema sextum. *Theoremata familiaria de physico-medicis lucubrationibus iuncta leges mecanicas*. 1695: 70–81.
2. Anrep GV, Cruickshank EW, Downing AC, Subba RA. The coronary circulation in relation to the cardiac cycle. *Heart*. 1927; 14: 111–133.
3. Gregg DE, Green HD. Registration and interpretation of normal phasic inflow into the left coronary artery by an improved differential manometric method. *Am J Physiol*. 1940; 130: 114–125.
4. Gregg DE, Sabiston DC. Effect of cardiac contraction on coronary blood flow. *Circulation*. 1957; 15: 14–20.
5. Westerhof N, Boer C, Lamberts RR, Sipkema P. Crosstalk between cardiac muscle and coronary vasculature. *Physiol Rev*. 2006; 86: 1263–1308. doi: 10.1152/physrev.00029.2005.
6. Duncker DJ, Koller A, Mercus D, Canty Jr JM. Regulation of coronary blood flow in health and ischemic heart disease. *Progress in Cardiovascular Disease*. 2015; 57 (5): 409–422. doi: 10.1016/j.pcad.2014.12.002.
7. Goodwill AG, Dick GM, Kiel AM, Tune JD. Regulation of coronary blood flow. *Compr Physiol*. 2017; 7: 321–382. doi: 10.1002/cphy.c160016.
8. Duncker DJ. Regulation of Coronary Blood Flow. ETP. <https://www.escardio.org/static-file/Escardio/education/live-events/courses/education-resource/101-Duncker.pdf>.
9. Murtaza G, Mukherjee D, Gharacholou SM, Nanjundappa A, Lavie CJ, Khan AA et al. An updated review on myocardial bridging. *Cardiovascular Revasculari-*

- zation Medicine. 2020; 21 (9): 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.carrev.2020.02.014>.
10. Rizzoni D, De Ciuceis C, Salvetti M, Paini A, Rossini C, Agabiti-Rosei C, Muiesan ML. Interactions between macro- and micro-circulation: are they relevant? *High Blood Press. Cardiovasc Prev.* 2015; 22: 119–128. doi: 10.1007/s40292-015-0086-3.
 11. Motwani M, Kidambi A, Uddin A, Sourbron S, Greenwood JP, Plein S. Quantification of myocardial blood with cardiovascular magnetic resonance throughout the cardiac cycle. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance.* 2015; 17 (1): 4. doi: 10.1186/s12968-015-0107-3.
 12. Kuhl JT, George RT, Merha VC, Lind JJ, Chen M, Arai AE et al. Endocardial – epicardial distribution of myocardial perfusion reserve assessed by multidetector computer tomography in symptomatic patients without significant coronary artery disease: insights from the CORES320 multicentre study. *European Heart Journal Cardiovascular Imaging.* 2016; 17 (7): 779–787. doi: 10.1093/ehjci/jev206.
 13. Westerhof N, Sipkema P, Vist M. How cardiac contraction affects the coronary vasculature. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 430: 111–121. doi: 10.1007/978-1-4615-5959-7_10.
 14. Downey JM, Kirk ES. Inhibition of coronary blood flow by a vascular waterfall mechanism. *Circ Res.* 1975; 36: 753–760. doi: 10.1161/01.res.36.6.753.
 15. Spaan JA, Breuls NP, Laird JD. Diastolic-systolic coronary flow differences are caused by intramyocardial pump action in the anesthetized dog. *Circ Res.* 1981; 49: 584–593. doi: 10.1161/01.res.49.3.584.
 16. Spaan JA, Breuls NP, Laird JD. Forward coronary flow normally seen in systole is the result of both forward and concealed back flow. *Basic Res Cardiol.* 1981; 76: 582–586. doi: 10.1007/BF01908365.
 17. Krams R, van Haelst AC, Sipkema P, Westerhof N. Can coronary systolic-diastolic flow differences be predicted by left ventricular pressure or time-varying intramyocardial elastance? *Basic Res Cardiol.* 1989; 84: 149–159. doi: 10.1007/BF01907924.
 18. Van Winkle DM, Swafford Jr AN, Downey JM. Subendocardial coronary compression in beating dog hearts is independent of pressure in the ventricular lumen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1991; 261 (2 Pt 2): H500–H505. doi: 10.1152/ajpheart.1991.261.2.H500.
 19. Suga H, Sagawa K, Shoukas AA. Load independence of the instantaneous pressure-volume ratio of the canine left ventricle and effects of epinephrine and heart rate on the ratio. *Circ Res.* 1973; 32: 314–322. <https://doi.org/10.1161/01.res.32.3.314>.
 20. Krams R, Sipkema P, Zegers J, Westerhof N. Contractility is the main determinant of coronary systolic flow impediment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1989; 257: H1936–H1944. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.6.H1936>.
 21. Willemsen MJ, Duncker DJ, Krams R, Dijkman MA, Lamberts RR, Sipkema P, Westerhof N. Decrease in coronary vasculature volume in systole augments cardiac con- traction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: 731–737. doi: 10.1152/ajpheart.2001.281.2.H731.
 22. Fibich G, Lanir Y, Liron N, Abovsky M. Modeling of coronary capillary flow. *Adv Exp Ved Biol.* 1993; 346: 137–150. doi: 10.1007/978-1-4615-2946-0_13.
 23. Chilian WM, Eastham CL, Marcus ML. Microvascular distribution of coronary vascular resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol.* 1986; 251 (4): H779–H788. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1986.251.4.H779>.
 24. Starodumov IO, Sokolov SY, Alexandrov DV, Zubarev AY, Bessonov IS, Chestukhin VV, Blyakhman FA. Modelling of hemodynamics in bifurcation lesions of coronary arteries before and after myocardial revascularization. *Phil Trans R Soc A.* 2022; 380: 20200303. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0303>.
 25. Forte E, Punzo B, Gentile F, Salvatore M, Cavaliere C, Cademartiri F. Normal patterns of left ventricle rest myocardial perfusion assessed by third-generation cardiac computed tomography. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2020; 40: 30–36. doi: 10.1111/cpf.12598.
 26. Namani R, Lee LC, Lanir Y, Kaimovitz B, Shavik SM, Kassab GS. Effects of myocardial function and systemic circulation on regional coronary perfusion. *J Appl Physiol.* 2020; 128: 1106–1122. doi: 10.1152/japplphysiol.00450.2019.
 27. Davies JE, Whinnett ZI, Francis DP, Manisty CH, Aguado-Sierra J, Willson K et al. Evidence of a dominant backward-propagating «Suction» wave responsible for diastolic coronary filling in humans, attenuated in left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 2006; 113: 1768–1778. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.105.603050>.
 28. Ladwiniec A, White PA, Sukhjinder S. Diastolic backward-traveling decompression (Suction) wave correlates with simultaneously acquired indices of diastolic function and is reduced in left ventricular stunning. *Circ Cardiovasc Interv.* 2016; 9 (9): 1–9. doi: 10.1161/circinterventions.116.003779.
 29. Sabbah HN, Marzilli M, Liu ZL, Stein PD. Coronary extravascular compression influence systolic coronary blood flow. *Heart Vessels.* 1986; 2: 140–146. doi: 10.1007/BF02128139.
 30. Jacob M, Chahhell D, Becker BF. Regulation of blood flow and volume exchange across the microcirculation. *Crit Care.* 2016; 20 (1): 319. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1485-0>.
 31. Schubert T, Santini F, Stalder AF, Bock J, Meckel S, Bonati L et al. Dampening of blood-flow pulsatility along the carotid siphon: does form follow function? *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011; 32 (6): 1107–1112. doi: 10.3174/ajnr.A2426.
 32. Blyakhman F. Left ventricular inhomogeneity and the heart's functional reserve. *The cardiac pumping and perfusion engineering.* Ghista D, Ng E, eds. Singapore: World Scientific Press, 2007: 17–56. doi: 10.1142/9789812775597_0002.

Статья поступила в редакцию 04.08.2022 г.
The article was submitted to the journal on 04.08.2022



ПАМЯТИ ПРОФЕССОРА ГЕОРГИЯ ПИНКУСОВИЧА ИТКИНА

2 ноября 2022 года на 84-м году ушел из жизни старейший сотрудник и почетный профессор Национального медицинского исследовательского центра трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова, один из основоположников создания отечественных аппаратов искусственного и вспомогательного кровообращения доктор биологических наук, профессор Георгий Пинкусович Иткин.

Долгая творческая жизнь Георгия Пинкусовича была связана с Институтом, затем с Центром трансплантологии и искусственных органов и посвящена решению задач изучения, разработки, создания систем механической поддержки кровообращения.

Георгий Пинкусович Иткин родился 5 августа 1939 года в Москве; в 1962 году окончил Московский авиационный институт. В 1966 году начал работу в лаборатории искусственного сердца НИИКиЭХ, возглавляемой

проф. В.И. Шумаковым, с тех пор продолжал трудиться в нашем Центре, создавая системы механической поддержки кровообращения. В 1975 году Г.П. Иткин защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата технических наук, а в 1989 году – диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук, посвященную разработке и комплексному анализу методов и средств временного замещения сердца. До последних дней Георгий Пинкусович руководил лабораторией биотехнических систем.

За годы активной и плодотворной работы под руководством Г.П. Иткина были созданы первые отечественные системы управления искусственным сердцем, математические модели физиологических процессов, неинвазивные методы исследования, методики стендовых испытаний систем, замещающих сердце. Разработка системы автоматического управления искусственным сердцем позволила добиться длительного выживания телят с искусственным сердцем (теленочек Олимп прожил 102 дня). Все достижения в экспериментах по длительной имплантации искусственного сердца телятам и в дальнейшем его клинической апробации непосредственно связаны с именем Г.П. Иткина.

Иткин участвовал в разработке систем управления и стендовых исследованиях в рамках советско-американского межправительственного соглашения по искусственному сердцу, тесно работал с выдающимися учеными мирового уровня из США, Японии, Европы – пионерами разработки искусственного сердца и аппаратов вспомогательного кровообращения В.И. Шумаковым, М. Дебеки, У. Кольфом, Р. Джарвиком, Т. Акутсу и другими.

Одним из важнейших достижений Г.П. Иткина является первый отечественный имплантируемый насос вспомогательного кровообращения (ВИШ), который в 2012 году был успешно имплантирован пациенту, а основанные на этой разработке модели имплантируются пациентам и по сей день.

Георгий Пинкусович воспитал целую плеяду учеников и последователей, продолжающих его дело. Лаборатория биотехнических систем под его руководством стала одним из ведущих подразделений в стране в области разработки и испытаний систем искусственного сердца и вспомогательного кровообращения; сотрудники лаборатории решают сложнейшие проблемы конструирования и создания систем вспомогательного кровообращения.

Талантливый генератор и превосходный реализатор множества новых идей, за свою плодотворную и активную жизнь Георгий Пинкусович создал более 200 научных работ и более 50 патентов. Георгий Пинкусович Иткин – известный в стране и мире яркий ученый, почетный изобретатель СССР и РФ, удостоен медали «Академик В.И. Шумаков», звания «Почетный профессор НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова». Преданный науке, Георгий Пинкусович Иткин внес неоценимый вклад в ее развитие. Он был добродушным и доброжелательным человеком, отличным собеседником и любимым учителем.

Память о замечательном человеке, великом ученом навсегда сохранится в сердцах коллег и благодарных учеников.

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^{1,2}, А.В. Аксенова¹, А.А. Улыбышева^{1,3}, Н.П. Можейко¹, Е.А. Никитина¹, В.И. Орлов¹, Е.А. Стаханова¹, А.О. Шевченко^{1,2}

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

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

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

Для корреспонденции:

Аксенова Александра Владимировна

Адрес:

Тел.:

E-mail:

Comparative analysis of diagnostic significance of biomarkers' panels in cardiac recipients in the long term period after transplantation

O.P. Shevchenko^{1,2}, A.V. Aksyonova¹, A.A. Ulybysheva^{1,3}, N.P. Mozheiko¹, E.A. Nikitina¹, V.I. Orlov¹, E.A. Stakhanova¹, A.O. Shevchenko^{1,2}

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

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Corresponding author:

Aksyonova Alexandra Vladimirovna

Address:

Phone:

E-mail:

2. Реферат

К каждой статье должен быть приложен реферат на русском и английском языках. Объем текста реферата для оригинальной статьи – не более 300 слов, для обзора литературы, клинического наблюдения – не более 200 слов. Реферат должен полностью соответствовать содержанию работы. Англоязычная версия реферата статьи должна по смыслу и структуре соответствовать русскоязычной и быть грамотной с точки зрения английского языка. Для перевода реферата не допускается использование электронных программ-переводчиков (например, Google Переводчик) без последующей редакции.

В реферате не следует употреблять аббревиатуры без предварительного раскрытия.

Реферат *оригинальной статьи* должен содержать следующие разделы:

Цель (Objective),

Материалы и методы (Materials and methods),

Результаты (Results),

Заключение (Conclusion).

В реферате следует представить наиболее существенные результаты проведенных исследований.

Нельзя писать: «*Проведен сравнительный анализ чувствительности и специфичности...*».

Следует писать: «*Чувствительность составила ...% и ...%, $p =$, специфичность соответственно ...% и ...%, $p =$ ».*

3. Ключевые слова

В конце реферата должны быть приведены ключевые слова (*keywords*) на русском и английском языках. Для выбора ключевых слов на английском языке следует использовать тезаурус Национальной медицинской библиотеки США – Medical Subject Headings – MeSH. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

4. Указание о конфликте интересов

Автор обязан уведомить редактора о реальном или потенциальном конфликте интересов, включив информацию о конфликте интересов в соответствующий раздел статьи. Если конфликта интересов нет, автор должен также сообщить об этом. Пример формулировки: «Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов».

Данная информация приводится перед текстом статьи.

5. Текст статьи

Оригинальная статья должна включать следующие разделы:

- Введение
- Материалы и методы
- Результаты
- Обсуждение
- Заключение
- Список литературы

Обзорная статья должна содержать анализ литературы с представлением современных источников (в основном за последние 5 лет).

Клиническое наблюдение должно быть хорошо иллюстрировано (отражать суть проблемы) и содержать обсуждение вопроса с использованием данных литературы.

Библиографические ссылки в тексте статьи обозначаются порядковым номером в квадратных скобках: [1], [2, 5], [14–18] и **в списке литературы представляются по порядку упоминания в тексте независимо от языка ссылки.**

Все величины, приведенные в статье, должны быть выражены или дублированы в единицах СИ.

6. Список литературы / References

Автор несет полную ответственность за точность данных, приведенных в приставленном списке литературы. В списке литературы ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

Список литературы представляется на отдельной странице. Ссылки на источники располагаются в порядке цитирования и приводятся на языке оригинала.

Названия журналов на русском языке в списке литературы не сокращаются. Если русскоязычный журнал имеет также название на английском языке, оно может быть указано в ссылке после транслитерированного названия. Названия иностранных журналов могут сокращаться в соответствии с вариантом сокращения, принятым конкретным журналом.

Если цитируемая статья имеет DOI (digital object identifier, цифровой идентификатор объекта) и/или PMID (PubMed), его/их необходимо указать в конце ссылки.

В ссылках на русскоязычные статьи, имеющие также название на английском языке, вначале приводится русское, а затем английское название. Если статья не имеет английского названия, ссылка приводится вначале на русском языке, а затем в транслитерированном виде, начиная на той же строке. Транслитерацию рекомендуется выполнять на сайте <http://www.translit.ru> в формате BGN.

В ссылке на неанглоязычные статьи после выходных данных необходимо указать язык публикации и наличие резюме на английском языке, например: [In Russ, English abstract].

Для составления описаний в списке литературы используется стандарт на библиографическую ссылку NLM – National Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). Если количество авторов не превышает 6, в библиографическом описании указываются все авторы. Если количество авторов более 6, следует указать шесть первых авторов и добавить «и др.» (et al.).

Примеры библиографических описаний

1. *Статья из русскоязычного журнала, имеющая англоязычное название*

Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2015 году. VIII сообщение регистра Российского трансплантологического общества. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2016; 18 (2): 6–26. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in Russian Federation in 2015. 8th report of National Register. Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs. 2016; 18 (2): 6–26. [In Russ, English abstract] DOI:10.15825/1995-1191-2016-2-6-26.

2. *Статья из русскоязычного журнала, не имеющая англоязычного названия*
Трапезникова МФ, Филиппов ПЯ, Перлин ДВ, Кулачков СМ. Лечение стриктур мочеточника после трансплантации почки. *Урология и нефрология*. 1994; 3: 42–45. Trapeznikova MF, Filiptsev PYa, Perlin DV, Kulachkov SM. Lechenie striktur mochetochnika posle transplantatsii pochki. *Urologiya i nefrologiya*. 1994; 3: 42–45.
3. *Статья из англоязычного журнала*
Goldstein DJ, Oz MC, Rose EA. Implantable left ventricular assist devices. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1522–1533.
4. *Англоязычная монография*
Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
5. *Русскоязычная монография*
Готье СВ, Константинов БА, Цирульникова ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА (2008), 246 с. Gautier SV, Konstantinov BA, Tsi-rulnikova OM. *Transplantatsiya pecheni*. М.: МИА (2008), 246.
6. *Диссертация (автореферат диссертации)*
Орлова ОВ. Роль маркеров воспаления, тромбоза, неоангиогенеза и апоптоза в прогнозировании васкулопатии сердечного трансплантата: дис. ... докт. мед. наук. М., 2009, 84 с. Orlova OV. Rol' markerov vospaleniya, tromboza, neoangiogeneza i apoptoza v progno-

zirovanii vaskulopatii serdechnogo transplantata. [Dissertation]. М., 2009, 84.

7. *Ресурс в сети Internet*
Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Требования к таблицам и иллюстрациям

Таблицы следует помещать в текст статьи, они должны иметь нумерованный заголовок и четко обозначенные графы, удобные и понятные для чтения. Данные таблицы должны соответствовать цифрам в тексте, однако не должны дублировать представленную в нем информацию. Ссылки на таблицы в тексте обязательны.

Иллюстрации и рисунки должны быть представлены в электронном виде (формат JPEG или TIF с разрешением не менее 300 точек на дюйм и размером не менее 6 × 9 см), в объеме, близком к 1 Мб. Рисунок должен содержать все авторские обозначения – стрелки, цифры, указатели и пр. Подписи к рисункам должны быть представлены в отдельном файле с расширением *.doc. Сначала дается название, а затем объясняются все цифровые и буквенные обозначения.

Названия таблиц, иллюстраций и рисунков, а также объяснения к ним должны быть представлены на русском и английском языках.

Статьи направлять в редакцию журнала по адресу:

123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1, ФГБУ «НМИЦ ТИО им. академика В.И. Шумакова»,
«Вестник трансплантологии и искусственных органов»
E-mail: vestniktranspl@gmail.com

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 Library of Medicine (http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html). If the number of authors does not exceed 6, the bibliographic description includes all the authors. If the number of authors is more, only the first six authors should be indicated and then add et al.

Requirements for tables and figures

Tables should be placed into the text; they should have numbered heading and clearly labeled graphs, convenient and simple to read. Table's data must comply with the numbers in the text, but should not duplicate the information therein. Table references in the text are required.

Illustrations and drawings should be submitted in electronic format (JPEG or TIFF format with a resolution of at least 300 dpi and no smaller than 6 × 9 cm), in a volume of close to 1 MB. Drawings must include all copyright symbols – arrows, numbers, signs, etc. Figure captions should be submitted in a separate file with the extension *.doc. First, the name is given, then all arithmetic and alphabetical symbols (lettering) are explained.

Articles should be addressed to the Editor at:

Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs
V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs
1, Shchukinskaya ul., Moscow 123182, Russian Federation
E-mail: vestniktranspl@gmail.com

**ФГБУ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ШУМАКОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ОТДЕЛ ПОДГОТОВКИ НАУЧНЫХ И МЕДИЦИНСКИХ КАДРОВ**

Лицензия на осуществление образовательной деятельности № 2643 от 21.09.2017 г.

Россия, 123182, г. Москва, ул. Щукинская, д. 1, тел. 8 (499) 193-87-62

ФГБУ «НМИЦ ТИО имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России является ведущим научно-исследовательским медицинским учреждением, успешно развивающим одно из приоритетных направлений в современной хирургической науке – трансплантологию.

В Центре осуществляются все виды трансплантации органов пациентам от 3 месяцев до старшего возраста, проводятся все виды кардиохирургических вмешательств. Учреждение оснащено новейшим высокотехнологичным оборудованием, на котором работают высококвалифицированные научные кадры и медицинские специалисты – доктора наук, осуществляющие подготовку врачей и научных работников для регионов Российской Федерации.

На базе клинических отделений Центра организовано проведение циклов повышения квалификации продолжительностью 72 и 144 часа по следующим дополнительным профессиональным программам:

- Анестезиологические пособия и интенсивная терапия при трансплантации жизненно важных органов.
- Болезни почек, почечная недостаточность и заместительная почечная терапия.
- Донорство в клинической трансплантологии.
- Клиническая трансплантация печени.
- Клиническая трансплантация печени у детей.
- Клиническая трансплантация почки.
- Клиническая трансплантация сердца.
- Основы трансплантологии и искусственных органов.
- Патологическая анатомия у больных после аллотрансплантации органов и имплантации искусственных органов.
- Трансплантационная иммунология и иммуносупрессия.
- Деятельность операционной медицинской сестры в клинической трансплантологии.

*Гарантийное письмо на обучение специалистов от организаций высылать на электронную почту.
E-mail: dim_vel@mail.ru*

Консультации организованы в отделе подготовки научных и медицинских кадров (Щукинская, 1, новый корпус, 9-й этаж, ученый секретарь – д. 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 5.12.22.

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 ____

ПЕРЕЧЕНЬ МАТЕРИАЛОВ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В 2022 ГОДУ В ЖУРНАЛЕ «ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ»

КЛИНИЧЕСКАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

- Д.А. Гранов, И.И. Тилеубергенов, В.Н. Жуйков, А.Р. Шералиев, А.А. Поликарпов, А.В. Моисеенко*
Комбинированное лечение нерезектабельной гилусной холангиокарциномы с последующей трансплантацией печени..... № 1 (7–14)
- И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*
Трансплантация печени пациентам с первичным билиарным холангитом (обзор литературы)..... № 1 (15–22)
- З.Т. Маткаримов, Ф.Ш. Бахритдинов, Р.А. Ибадов, А.С. Суюмов, К.О. Махмудов, А.Р. Ахмедов, Ш.И. Шерназаров, М.О. Рустамов, З.У. Абдугафуров, У.М. Саатова, Ж.Б. Уринов*
История и опыт трансплантации почки в Узбекистане № 1 (23–30)
- A.D. Smagulov, M.S. Rysmakhanov, Zh.M. Koishybayev, Y.B. Sultangereyev, N.M. Mussin*
Application of indocyanine green fluorescence for ureter imaging: review..... № 1 (31–35)
- С.В. Арзуманов, Н.В. Поляков, А.Б. Рябов, Д.А. Галицкая*
Ауто трансплантация почки – метод лечения поражения мочеточника в урологической и онкологической практике № 1 (36–47)
- У.Р. Салимов, И.О. Стома, А.Е. Щерба, А.М. Федорук, А.А. Ковалев, О.О. Руммо*
«Микробиом» осложнений после трансплантации печени..... № 2 (8–22)
- А.В. Шабунин, И.П. Парфенов, М.Г. Минина, В.В. Бедин, П.А. Дроздов, О.Н. Левина, Г.С. Михайляни, И.В. Нестеренко, Д.А. Макеев, О.С. Журавель, Н.А. Онгоев*
Программа трансплантации печени в Боткинской больнице. Опыт 100 операций..... № 2 (23–30)
- А.Д. Никогосова, Д.В. Умрик, О.М. Цирульникова*
HBV-инфекция у пациентов после трансплантации печени (обзор литературы)..... № 2 (31–38)
- И.М. Ильинский, О.М. Цирульникова*
Исторические аспекты и современное представление об аутоиммунном гепатите. Когда показана трансплантация печени? (Обзор литературы)..... № 2 (39–50)
- В.В. Боровик, А.А. Поликарпов, Д.А. Гранов*
Химиоэмболизация печеночной артерии и развитие ранних артериальных осложнений после трансплантации печени по поводу гепатоцеллюлярной карциномы..... № 3 (32–36)
- А.Д. Никогосова, Д.В. Умрик, О.М. Цирульникова*
HBV-инфекция de novo у пациентов после трансплантации печени..... № 3 (37–41)
- В.Л. Коробка, В.Д. Пасечников, Р.В. Коробка, Е.С. Пак, А.М. Шаповалов*
Использование эндоскопического лигирования варикозных узлов в комбинации с неселективными β-блокаторами, или самостоятельно, в профилактике кровотечений у больных с асцитом, включенных в лист ожидания трансплантации печени..... № 3 (42–50)
- А.М. Талызин, С.В. Журавель, М.Ш. Хубутия, Е.А. Тарабрин, Н.К. Кузнецова*
Опыт применения инвазивного гемодинамического мониторинга с помощью пре- и транспульмональной термодилуции при трансплантации легких № 3 (51–56)
- А.А. Киришин, А.Ю. Терезулов, А.Р. Киришина*
Ранняя диагностика и лечение синдрома обкрадывания селезеночной артерией после трансплантации печени..... № 3 (57–63)
- С.И. Зубенко, А.Р. Монахов, М.А. Болдырев, В.Р. Салимов, А.Д. Смолянинова, С.В. Готье*
Факторы риска при трансплантации печени от посмертного донора: опыт одного центра..... № 4 (7–14)
- Е.И. Прокопенко, В.М. Гурьева, В.А. Петрухин, К.В. Краснополяская, Ф.Ф. Бурумкулова, Д.В. Губина*
Беременность после экстракорпорального оплодотворения у пациентки с трансплантированной почкой: клиническое наблюдение и обзор литературы № 4 (15–23)
- Ш.Р. Галеев, С.В. Готье*
Риски и пути профилактики нарушения функции почек при проведении медикаментозной иммуносупрессии у реципиентов солидных органов..... № 4 (24–38)

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕРДЦА И ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ КРОВООБРАЩЕНИЕ

- Н.Н. Колоскова, А.О. Шевченко*
Роль синдрома физического истощения (frailty) при отборе пациентов на трансплантацию сердца № 2 (51–57)
- М.Р. Зайнетдинов, М.Н. Мухарямов, Р.К. Джорджжикия, И.И. Вагизов, М.А. Мирошниченко, И.В. Абдулъянов, Р.Р. Хамзин, Д.И. Абдулганиева, Е.В. Дьякова, А.Ж. Баялиева, Н.Ф. Гизатуллина, Н.Ю. Стекольщикова, М.М. Миннуллин, Р.Н. Хайруллин*
Трансплантация сердца и коронавирусная инфекция (COVID-19) в раннем послеоперационном периоде у пациента с гипертрофической обструктивной кардиомиопатией: клинический случай..... № 2 (58–64)
- В.Н. Попцов, В.М. Захаревич, Е.А. Спирина, Н.Н. Колоскова, В.В. Пчельников, В.М. Хатуцкий, А.И. Скокова, А.В. Фомичев, Э.З. Алиев, В.В. Боронова, А.В. Березняк, А.К. Солодовникова*
Периоперационный период при трансплантации с экстремально длительным (более 6 часов) сроком ишемии донорского сердца № 3 (64–73)

<i>А.Ю. Гончарова, Н.Н. Колоскова, В.Н. Попцов, В.М. Захаревич, Н.П. Можейко, А.Р. Закирьянов, Н.Н. Сайфуллина, К.С. Кирьяков, С.В. Готье</i> Клинический случай трансплантации сердца пациенту с саркомой сердца	№ 3 (74–79)
<i>Р.М. Муратов, С.И. Бабенко, М.Н. Соркомов</i> Современный взгляд на радиационно-индуцированную кардиопатию и методы ее диагностики	№ 4 (39–45)
<i>А.П. Кулешов, А.С. Бучнев, А.А. Дробышев, О.Ю. Есипова, Г.П. Иткин</i> Разработка устройства канюли для удаления газовой фракции в системах дренажа крови.....	№ 4 (46–53)
<i>А.С. Бучнев, Г.П. Иткин, А.А. Дробышев, А.П. Кулешов, О.Ю. Есипова, А.И. Сырбу</i> Механическая поддержка лимфоциркуляции в условиях острой декомпенсированной сердечной недостаточности. Исследование на гидродинамическом стенде	№ 4 (54–59)

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

<i>Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, В.И. Севастьянов</i> Разработка подходов к бесферментному получению островковой ткани из поджелудочной железы	№ 1 (48–55)
<i>А.И. Шайхалиев, М.С. Краснов, Е.В. Сидорский, В.П. Ямскова, В.И. Лозинский</i> Индукция остеогенеза костной ткани нижней челюсти кролика с использованием криогенно-структурированного губчатого альбуминового 3D-носителя, нагруженного биорегулятором	№ 1 (56–63)
<i>А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, Л.А. Кирсанова, Г.Н. Бубенцова, Е.А. Немец, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов</i> Определение оптимального режима децеллюляризации поджелудочной железы с учетом морфологических особенностей панкреатической ткани.....	№ 1 (64–71)
<i>Н.А. Онищенко, З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, В.И. Севастьянов</i> Программируемая гибель клеток и заболевания печени	№ 1 (72–88)
<i>Е.Г. Кузнецова, О.М. Курьлева, Л.А. Саломатина, Л.А. Кирсанова, З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Н.П. Шмерко, В.И. Севастьянов</i> Влияние трансдермальной терапевтической системы иммуномодулятора на регенерационную активность печени.....	№ 1 (89–95)
<i>А.Е. Костюнин</i> Структурная дегенерация биологических протезов клапанов сердца: имеются ли общие механизмы с атеросклерозом и кальцинирующим аортальным стенозом?	№ 1 (96–106)
<i>Э.Б. Макарова, М.А. Корч, Ф.А. Фадеев, Д.Г. Близначев, А.В. Бугаёва, Т.Ф. Шкляр, А.П. Сафронов, К.А. Нохрин, Ф.А. Бляхман</i> Тестирование гидрогеля р-НЕМА в качестве имплантационного материала для замещения костно-хрящевых дефектов у животных	№ 2 (71–82)
<i>А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, В.А. Сургученко, Н.П. Шмерко, В.К. Кулакова, Р.В. Иванов, В.И. Лозинский, А.М. Суббот, В.И. Севастьянов</i> Криогенно-структурированный гидрогель на основе желатина как резорбируемая макропористая матрица для биомедицинских технологий.....	№ 2 (83–93)
<i>Л.В. Антонова, Е.О. Кривкина, М.Ю. Ханова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева, А.В. Миронов, А.Р. Шабаев, Е.А. Сенокосова, Т.В. Глушкова, М.Ю. Синицкий, Р.А. Мухамадияров, Л.С. Барбараи</i> Результаты преклинических испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели овцы.....	№ 3 (80–93)
<i>М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, А.В. Гречина, М.Е. Крашенинников, А.О. Никольская, Е.А. Волкова, Н.П. Можейко, Н.А. Бояринова, А.В. Ляндуп, Г.А. Пьявченко, Л.И. Давыдова, А.Ю. Архипова, В.Г. Бозуш, С.В. Готье</i> Коррекция хронической печеночной недостаточности в эксперименте путем имплантации клеточно-инженерных конструкций: морфофункциональные характеристики	№ 4 (60–72)
<i>Е.А. Немец, А.Э. Лажко, А.М. Григорьев, Ю.Б. Басок, А.Д. Кириллова, В.И. Севастьянов</i> Биосовместимые и функциональные свойства тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из децеллюляризованного хряща свиньи	№ 4 (73–84)
<i>Н.А. Онищенко, А.О. Никольская, З.З. Гоникова, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, В.И. Севастьянов</i> Апоптотические мононуклеарные клетки костного мозга ускоряют регенерационные процессы в печени после обширной резекции	№ 4 (85–93)
<i>Л.В. Антонова, А.В. Миронов, А.Р. Шабаев, В.Н. Сильников, Е.О. Кривкина, В.Г. Матвеева, Е.А. Великанова, Е.А. Сенокосова, М.Ю. Ханова, В.В. Севостьянова, Т.В. Глушкова, Р.А. Мухамадияров, Л.С. Барбараи</i> Тканеинженерные сосудистые заплатки – сравнительная характеристика и результаты преклинических испытаний на модели овцы.....	№ 4 (94–108)
<i>А.С. Пономарева, Н.В. Баранова, И.А. Милосердов, В.И. Севастьянов</i> Влияние биоматрикса на жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию островков Лангерганса человека <i>in vitro</i>	№ 4 (109–117)

ТРАНСПЛАНТОМИКА

<i>А.В. Дерюгина, О.П. Абаева, С.В. Романов, М.В. Ведунова, Е.Н. Рябова, С.А. Васенин, Н.А. Титова</i> Белковый состав и функциональные показатели мембран эритроцитов при трансплантации печени и почки.....	№ 1 (107–116)
<i>Р.М. Курабекова, О.М. Цирульникова, С.Ю. Олешкевич, И.Е. Пашкова, Г.А. Олэфиренко</i> Влияние системы гормона роста / ИФР-1 на функцию трансплантата и иммунный ответ у детей – реципиентов печени	№ 2 (65–70)

О.Р. Быстрова, Е.А. Стаханова, М.И. Ильчук, А.А. Улыбышева, О.Е. Гичкун, Д.А. Сайдулаев, О.П. Шевченко
 Биомаркеры фиброза трансплантированной почки..... № 3 (94–101)

ДОНОРСТВО ОРГАНОВ

R.M. Muaid, T. Chesney
 Q-Methodology to Identify perceptions of deceased organ donation in the UK..... № 1 (117–125)

R.S. Bahador, P. Mangolian, J. Farokhzadian, S.S. Afrazandeh, E. Noohi
 Analysis of implications of organ donation on living donors in southeastern Iran: A qualitative study..... № 1 (126–136)

А.А. Анисимов, Э.С. Гильметдинова, М.А. Мулендеева, А.Ю. Анисимов
 Отношение молодежи в Республике Татарстан к органному донорству..... № 1 (137–142)

А.В. Шабунин, М.Г. Минина, П.В. Дроздов, И.В. Нестеренко, Д.А. Макеев, О.С. Журавель, Л.Р. Каранетян, С.А. Астапович
 Первый опыт применения машинной холодной оксигенированной перфузии почечного трансплантата от доноров с расширенными критериями № 1 (143–150)

С.В. Готье, О.М. Цирульников, И.В. Паиков, Д.О. Олешкевич, И.А. Филатов, В.К. Богданов, Д.М. Бондаренко, Н.П. Можейко, А.А. Карпов, Н.С. Буненков, Н.В. Грудинин
 Нормотермическая ex vivo перфузия изолированных легких в эксперименте с использованием отечественного перфузионного аппаратного комплекса № 2 (94–101)

А.В. Шабунин, М.Г. Минина, П.А. Дроздов, В.М. Севостьянов, И.В. Нестеренко, Д.А. Макеев, О.С. Журавель
 Асистолическое донорство почек с использованием автоматизированной системы компрессии грудной клетки и машинной оксигенированной холодной перфузии (первый опыт в Российской Федерации) № 2 (102–107)

М.Г. Минина, Д.В. Воронов, Э.А. Тенчурина
 Эволюция донорства печени в Москве. Движение в направлении расширенных критериев донорства № 3 (102–110)

М.О. Жульков, Д.А. Сирота, И.С. Зыков, А.К. Сабетов, Х.А. Агаева, А.Г. Макаев, Д.М. Осинцев, А.П. Надеев, В.Е. Кливер, Е.Э. Кливер, А.М. Волков, А.Р. Таркова, А.В. Фомичев, А.М. Чернявский
 Результаты исследования эффективности прямой коронарной персусфляции как метода кондиционирования донорского сердца..... № 3 (111–120)

М.Г. Минина, Д.В. Воронов, А.А. Невредимов, Э.А. Тенчурина
 Предикторы стеатоза у доноров печени..... № 4 (118–123)

Д.О. Кузьмин, В.А. Мануковский, С.Ф. Багненко, О.Н. Резник, А.Н. Ананьев, О.А. Воробьева, С.Л. Воробьев, Д.В. Гоголев, В.С. Дайнеко, А.А. Кутенков, Н.А. Чичагова, И.В. Ульяновина
 Применение поликлональных антител у доноров со смертью мозга при пересадке почек..... № 4 (124–134)

ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЙ ПОМОЩИ

Е.В. Каракулина, С.М. Хомяков, О.А. Александрова, И.В. Лысыков, С.В. Шеденко, С.В. Готье
 Пути совершенствования нормативно-правового регулирования вопросов организации трансплантации (пересадки) органов и(или) тканей человека в Российской Федерации № 2 (108–118)

СМЕЖНЫЕ ДИСЦИПЛИНЫ

Е.Г. Кузнецова, О.М. Курьлева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, В.Ю. Белов, З.З. Гоникова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов
 О возможности терапевтического действия после окончания аппликации трансдермальной системы доставки лекарственных веществ № 2 (119–124)

А.А. Жариков, Д.А. Сайдулаев, С.В. Садовников, И.А. Милосердов
 Эффективность хирургических методов коррекции морбидного ожирения и возможности их использования у больных с терминальной стадией хронической болезни почек при подготовке к трансплантации почки № 2 (125–133)

Д.М. Бондаренко, А.Г. Собигова, Г.А. Акопов, А.С. Иванов, М.К. Луговский, А.Ф. Афанасьев, Р.Ю. Бангаров
 Опыт применения новой методики селективной перфузии головного мозга при реконструктивных вмешательствах на восходящем отделе и дуге аорты..... № 3 (121–129)

И.В. Ребрикова, Е.А. Воротеляк, О.С. Роговая, А.П. Поляков, А.В. Мордовский, М.В. Ратушный, А.Д. Каприн, А.В. Васильев
 Реконструкция гортаноглотки с использованием аутологических тканеинженерных эпителизированных лоскутов..... № 4 (135–144)

В.В. Честухин, Ф.А. Бляхман
 Коронарный парадокс..... № 4 (145–151)

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Р.О. Кантария, О.Н. Ветчинникова, С.А. Пасов, В.А. Дудаков
 Успешная хирургическая коррекция расслоения восходящего отдела аорты у пациента с трансплантированной почкой..... № 2 (134–145)

P. Iablonskii, F. Ius, I. Tudorache, A. Martens, S. Sarikouch, J. Salman, A. Haverich, S. Cebotari
 Decellularized homograft for aortic valve replacement two years after lung transplantation..... № 3 (130–132)

Ш.Р. Галеев, Р.Е. Шульгин, Ш.Ю. Бижиев, Д.М. Гадаборшиев
 Двухэтапная реконструктивно-пластическая операция по поводу гигантской олеогранулемы половых органов у пациента с трансплантированной почкой № 3 (133–138)