

ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ



УЧРЕДИТЕЛЬ: ОБЩЕРОССИЙСКАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ
ОРГАНИЗАЦИЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГОВ
«РОССИЙСКОЕ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»

2024. Том XXVI. № 2

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

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

Л.А. Габбасова (Москва, Россия) – д. м. н.

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

Г. Данович (Лос-Анжелес, США) – профессор

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

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

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

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

О.О. Руммо (Минск, Республика Беларусь) –
академик НАНБ, д. м. н., профессор

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

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

М.Ш. Хубутия (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

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

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

2024. Vol. XXVI. № 2

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

Editor-in-Chief – S.V. Gautier

(Moscow, Russia), MD, PhD, professor, member
of Russian Academy of Sciences (editor of the section
«Organization of transplant care»)

Deputy Chief Editor – O.P. Shevchenko

(Moscow, Russia), MD, PhD, professor
(editor of the section «Transplantomics»)

Scientific Editor – E.A. Stakhanova

(Moscow, Russia), PhD.
E-mail: stahanova.ekaterina@mail.ru

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

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

L.A. Gabbasova (Moscow, Russia) – MD, PhD

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

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

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

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

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

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

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

G.T. Sukhih (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
Ш.Р. Галеев (Москва, Россия) – к. м. н.
Ф. Дельмонико (Бостон, США) – профессор
В.М. Захаревич (Москва, Россия) – д. м. н.
П. Каличинский (Варшава, Польша) – профессор
О.Н. Котенко (Москва, Россия) – д. м. н.
Я. Лерут (Брюссель, Бельгия) – профессор
Ж. Массард (Страсбург, Франция) – профессор
М.Г. Минина (Москва, Россия) – д. м. н., профессор РАН
(редактор раздела «Донорство органов»)
Б.Л. МIRONKOV (Москва, Россия) – д. м. н., профессор
(редактор раздела «Смежные дисциплины»)
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
В.И. Севастьянов (Москва, Россия) – д. б. н., профессор (редактор раздела «Регенеративная медицина и клеточные технологии»)
Т.А. Халилулин (Москва, Россия) – д. м. н.
С.М. Хомяков (Москва, Россия) – к. м. н.
О.М. Цирульников (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
Sh.R. Galeev (Moscow, Russia) – MD, PhD
F. Delmonico (Boston, USA) – MD, professor
V.M. Zakharevich (Moscow, Russia) – MD, PhD
P.J. Kaliciński (Warsaw, Poland) – MD, PhD, professor
O.N. Kotenko (Moscow, Russia) – MD, PhD
J. Lerut (Brussels, Belgium) – MD, PhD, professor
G. Massard (Strasbourg, France) – MD, PhD, professor
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»)
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
V.I. Sevastianov (Moscow, Russia) – PhD, professor
(editor of the section «Regenerative medicine and cellular technology»)
T.A. Khalilulin (Moscow, Russia) – MD, PhD
S.M. Khomyakov (Moscow, Russia) – MD, PhD
O.M. Tsiurlikova (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

Учебник «Трансплантология и искусственные органы»: издание второе, переработанное и дополненное

С.В. Готье

КЛИНИЧЕСКАЯ ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ

Беременность после трансплантации почки: особенности течения, осложнения и исходы

Е.И. Прокопенко, И.Г. Никольская, А.В. Ватазин, Ф.Ф. Бурумкулова, Д.В. Губина

Трансъюгулярное внутривенное портосистемное шунтирование или комбинация неселективных β-блокаторов с эндоскопическим лигированием варикозных вен пищевода в целях профилактики кровотечений у больных циррозом печени, ожидающих трансплантацию

Р.В. Коробка, С.В. Готье, Ю.В. Хоронько, В.Д. Пасечников, Н.Г. Сапронова, И.А. Поршеников, М.В. Малеванный, Е.С. Пак, Д.В. Пасечников

Эндоскопическая полностенная резекция аденокарциномы сигмовидной кишки у реципиента печени

М.Т. Беков, А.Р. Монахов, К.С. Смирнов, Я.С. Якунин, Р.А. Латыпов, Д.О. Олешкевич, О.М. Цирульников, С.В. Готье

Азигопортальное разобщение или комбинация неселективных β-блокаторов с эндоскопическим лигированием варикозных вен пищевода в целях профилактики повторных кровотечений у больных циррозом печени, ожидающих трансплантацию

Р.В. Коробка, С.В. Готье, Ю.В. Хоронько, В.Д. Пасечников, А.М. Шаповалов, М.В. Малеванный, Е.С. Пак, Д.В. Пасечников, Е.В. Тадиева

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ СЕРДЦА И ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ КРОВООБРАЩЕНИЕ

Васкулопатия трансплантата сердца – состояние проблемы

Б.Л. Миронков, Д.Д. Уварова, Н.Н. Колоскова, Ю.В. Сапронова, И.И. Муминов, А.А. Юсова, С.А. Саховский

Мост к лечению рака у больных с хронической сердечной недостаточностью: имплантация устройства поддержки функции левого желудочка перед хирургическим лечением рака желудка

К.Г. Ганаев, С.К. Курбанов, Э.Е. Власова, Е.В. Дзыбинская, Р.С. Латыпов, К.В. Мершин, И.С. Стилиди, А.А. Ширяев, Р.С. Акчурин

CONTENTS

EDITORIAL

- 6 «Transplantology and artificial organs»: second edition, revised and enriched
S.V. Gautier

CLINICAL TRANSPLANTOLOGY

- 8 Pregnancy after kidney transplantation: clinical features, complications and outcomes
E.I. Prokopenko, I.G. Nikolskaya, A.V. Vatazin, F.F. Burumkulova, D.V. Gubina
- 16 Transjugular intrahepatic portosystemic shunt or a combination of nonselective beta blockers and endoscopic variceal ligation for prophylaxis of bleeding in waitlisted cirrhotic patients
R.V. Korobka, S.V. Gautier, Yu.V. Khoronko, V.D. Pasechnikov, N.G. Sapronova, I.A. Porshennikov, M.V. Malevanny, E.S. Pak, D.V. Pasechnikov
- 28 Endoscopic full-thickness resection of sigmoid colon cancer in a liver recipient
M.T. Bekov, A.R. Monakhov, K.S. Smirnov, Ya.S. Yakunin, R.A. Latypov, D.O. Oleshkevich, O.M. Tsurulnikova, S.V. Gautier
- 34 Azygoportal disconnection or a combination of non-selective beta-blockers and endoscopic variceal ligation to prevent recurrent bleeding in patients with cirrhosis awaiting transplantation
R.V. Korobka, S.V. Gautier, Yu.V. Khoronko, V.D. Pasechnikov, A.M. Shapovalov, M.V. Malevanny, E.S. Pak, D.V. Pasechnikov, E.V. Tadiyeva

HEART TRANSPLANTATION AND ASSISTED CIRCULATION

- 42 Cardiac allograft vasculopathy: current review
B.L. Mironkov, D.D. Uvarova, N.N. Koloskova, Yu.V. Sapronova, I.I. Muminov, A.A. Yusova, S.A. Sakhovsky
- 48 Bridge to cancer therapy in patients with chronic heart failure: implantation of a left ventricular assist device before surgical treatment of gastric cancer
K.G. Ganaev, S.K. Kurbanov, E.E. Vlasova, E.V. Dzybinskaya, R.S. Latypov, K.V. Mershin, I.S. Stilidi, A.A. Shiryaev, R.S. Akchurin

Оптимальные стратегии профилактики ишемического реперфузионного повреждения при трансплантации сердца с длительной холодовой ишемией трансплантата (обзор)

А.В. Фомичев, Г.Б. Гармаев, М.О. Жульков, И.С. Зыков, А.Г. Макаев, А.В. Протопопов, А.Р. Таркова, М.Н. Муртазалиев, Я.М. Смирнов, А.Д. Лиманский, А.В. Гусева, К.Н. Калдар, Д.А. Сирота

ДОНОРСТВО ОРГАНОВ

Management and Outcomes of Aneurysms Found in Deceased Donor Livers: A Review of Published Cases

A. González De Godos, B. Pérez Saborido, M. Bailón Cuadrado, D. Pacheco Sánchez

Гипотермическая оксигенированная перфузионная консервация при трансплантации печени от доноров с расширенными критериями

А.В. Шабунин, О.Б. Лоран, Д.Ю. Пушкар, Е.И. Велиев, М.Г. Минина, П.А. Дроздов, С.А. Астапович, Э.А. Лиджиева

Гипотермическая машинная перфузия донорской почки с использованием опытного раствора на основе декстрана-40 и ортотопическая трансплантация (экспериментальное исследование)

В.Г. Шестакова, В.К. Богданов, Р.Д. Павлов, В.М. Терехов, А.С. Тимановский, А.А. Жариков, А.Н. Шибеев, Н.В. Грудинин

ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ПОЧЕЧНАЯ ТЕРАПИЯ

Гиперпаратиреоз у кандидатов на трансплантацию почки и функция околощитовидных желез у реципиентов в ранние сроки послеоперационного периода

О.Н. Ветчинникова

РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

Функциональная эффективность клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы в экспериментальной модели сахарного диабета I типа

Н.В. Баранова, А.С. Пономарева, Л.А. Кирсанова, А.О. Никольская, Г.Н. Бубенцова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

Гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра: результаты шестимесячной имплантации на модели овцы

Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Е.А. Великанова, А.В. Сеницкая, А.В. Миронов, А.Р. Шабеев, М.Ю. Ханова, Е.А. Торгунакова, Л.В. Антонова

51 Optimal strategies for prevention of ischemia-reperfusion injury in heart transplantation with prolonged cold ischemia time (review)

A.V. Fomichev, G.B. Garmaev, M.O. Zhulkov, I.S. Zykov, A.G. Makaev, A.V. Protopopov, A.R. Tarkova, M.N. Murtazaliev, Ya.M. Smirnov, A.D. Limanskiy, A.V. Guseva, K.N. Kaldar, D.A. Sirota

ORGAN DONATION

58 Management and Outcomes of Aneurysms Found in Deceased Donor Livers: A Review of Published Cases

A. González De Godos, B. Pérez Saborido, M. Bailón Cuadrado, D. Pacheco Sánchez

63 Hypothermic oxygenated perfusion in liver transplantation from expanded criteria donors

A.V. Shabunin, O.B. Loran, D.Yu. Pushkar, E.I. Veliev, M.G. Minina, P.A. Drozdov, S.A. Astapovich, E.A. Lidzhieva

73 Hypothermic machine perfusion of a donor kidney using an experimental dextran-40-based preservation solution and orthotopic transplantation (experimental study)

V.G. Shestakova, V.K. Bogdanov, R.D. Pavlov, V.M. Terekhov, A.S. Timanovsky, A.A. Zharikov, A.N. Shibaev, N.V. Grudinin

RENAL REPLACEMENT THERAPY

82 Hyperparathyroidism in kidney transplant candidates and postoperative parathyroid gland function in recipients

O.N. Vetchinnikova

REGENERATIVE MEDICINE AND CELL TECHNOLOGIES

94 Functional efficiency of pancreatic cell-engineered construct in an animal experimental model for type I diabetes

N.V. Baranova, A.S. Ponomareva, L.A. Kirsanova, A.O. Nikolskaya, G.N. Bubentsova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

105 Histologic and genetic features of remodeling of tissue-engineered small-diameter vascular grafts: outcomes of six-month implantation in a sheep model

E.A. Senokosova, E.O. Krivkina, E.A. Velikanova, A.V. Sinitskaya, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, M.Yu. Khanova, E.A. Torgunakova, L.V. Antonova

Получение модели сахарного диабета 1-го типа у мышей с помощью стрептозотоцина
Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, Л.А. Кирсанова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

Влияние путей и доз введения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток на эффективность клеточной терапии (обзор)
Н.В. Пак, Е.В. Мурзина, Н.В. Аксенова, Т.Г. Крылова, В.Н. Александров

Проблема получения клеточной культуры эндотелиальных клеток роговицы для регенеративных целей
Д.С. Островский, С.А. Борзенко, Б.Э. Малюгин, О.П. Антонова, М.Х. Хубецова, Т.З. Керимов

Биомиметический подход к разработке протезов кровеносных сосудов малого диаметра
Е.А. Немец, Ю.В. Белов, К.С. Кирьяков, Н.В. Грудинин, В.К. Богданов, К.С. Филиппов, А.О. Никольская, И.Ю. Тюняева, А.А. Выпрышко, В.М. Захаревич, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

ПАМЯТИ БОРИСА ВАСИЛЬЕВИЧА ФАДИНА

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

- | | |
|-----|--|
| 119 | Obtaining a mouse model of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus
<i>G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, G.N. Bubentsova, L.A. Kirsanova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov</i> |
| 126 | Effect of the delivery route and dose of multipotent mesenchymal stem cells on the efficacy of cell therapy (review)
<i>N.V. Pak, E.V. Murzina, N.V. Aksenova, T.G. Krylova, V.N. Aleksandrov</i> |
| 135 | Challenges of obtaining cultured corneal endothelial cells for regenerative purposes
<i>D.S. Ostrovskiy, S.A. Borzenok, B.E. Malyugin, O.P. Antonova, M.Kh. Khubetsova, T.Z. Kerimov</i> |
| 145 | Biomimetic approach to the design of artificial small-diameter blood vessels
<i>E.A. Nemets, Yu.V. Belov, K.S. Kiryakov, N.V. Grudinin, V.K. Bogdanov, K.S. Filippov, A.O. Nikolskaya, I.Yu. Tyunyaeva, A.A. Vypriyshko, V.M. Zaxarevich, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov</i> |
| 156 | IN MEMORY OF BORIS VASILIEVICH FADIN |
| 157 | INFORMATION |
| 157 | Instructions to authors |
| 162 | On scientific and medical personnel training at Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs |

УЧЕБНИК «ТРАНСПЛАНТОЛОГИЯ И ИСКУССТВЕННЫЕ ОРГАНЫ»: ИЗДАНИЕ ВТОРОЕ, ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

Глубокоуважаемые коллеги!

В 2024 году увидит свет второе издание учебника «Трансплантология и искусственные органы». Первое издание учебника вышло в 2018 г., и его появление явилось значимой вехой в развитии как клинической медицины, так и высшего медицинского образования в нашей стране, обогатившегося еще одной новой дисциплиной в рамках специальности «лечебное дело».

Учебник подготовлен с учетом шестнадцатилетнего опыта преподавания этой дисциплины в ведущем медицинском вузе – Первом МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), а также клинического и научного опыта ведущего трансплантологического центра нашей страны – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России.

Трансплантология – быстро развивающаяся область клинической медицины. Структура и базовое содержание во втором издании учебника сохранены; актуализирована и дополнена информация с учетом произошедших за последние годы изменений. С каждым годом повышается доступность трансплантации жизненно важных органов как вида высокотехнологичной медицинской помощи. Число выполняемых в стране операций по трансплантации солидных органов за последние пять лет возросло на треть; центры трансплантации расположены в 38 субъектах РФ, в том числе в отдаленных регионах нашей страны. Клинические результаты трансплантации соответствуют уровню лучших мировых практик, с достижением полной физической и социальной реабилитации реципиентов, включая репродуктивную функцию и возможность рождения здоровых детей.



«TRANSPLANTOLOGY AND ARTIFICIAL ORGANS»: SECOND EDITION, REVISED AND ENRICHED

Dear colleagues,

The second edition of the textbook «Transplantology and Artificial Organs» will be released in 2024. The first edition was published in 2018, marking a significant milestone in the development of both clinical medicine and higher medical education in our country, which was enriched with one more new discipline within the 'general medicine' specialty.

The textbook has been prepared taking into account our 16 years of experience in teaching this discipline at foremost medical university Sechenov University. The textbook also incorporates various clinical research experiences gained at Russia's leading transplant center, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow.

Transplantology is a rapidly developing field of clinical medicine. The second edition of the textbook has been revised and augmented to reflect changes that have occurred in recent years, while maintaining the structure and basic content. Transplantation of vital organs is increasingly becoming accessible every day as a type of high-tech healthcare. Over the past five years, the number of solid organ transplants performed in the nation has increased by one third; transplant centers can be found in 38 federal subjects of the Russian Federation, including in remote regions of our country. Clinical transplant outcomes at these centers so far are on par with the highest international standards. Organ recipients have been able to achieve full physical and social rehabilitation, including the ability to reproduce and have healthy children.

В связи с необходимостью постоянного увеличения числа трансплантаций органов в РФ, открытием новых трансплантологических центров подготовка врачей в области трансплантологии, а также получение знаний по трансплантологии и искусственным органам врачами различных специальностей имеют актуальное значение в системе высшего профессионального медицинского образования.

Авторы рассчитывают, что переработанное и дополненное второе издание учебника будет востребовано не только студентами, но также может оказать помощь в обучении молодых специалистов, врачей, ученых, аспирантов, так как содержит актуальную и полную информацию по основным разделам трансплантологии, искусственным органам, а также регенеративной медицине и созданию биоискусственных органов.

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



Due to the need for a constant increase in the number of organ transplants in the Russian Federation, the establishment of new transplant centers, training of physicians in the field of transplantology, and acquisition of knowledge on transplantology and artificial organs by doctors of various specialties are all critically important in the higher professional medical education system.

The authors expect that the revised and supplemented second edition of the textbook will not only be in demand among students but also can assist in the training of young specialists, doctors, scientists, graduate students, as it contains current and comprehensive information on the key areas of transplantology, artificial organs, regenerative medicine and manufacture of bioartificial organs.

*Sincerely,
Sergey Gautier,
Fellow, Russian Academy of Sciences
Editor-in-chief, Russian Journal
of Transplantology and Artificial Organs*

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-8-15

БЕРЕМЕННОСТЬ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ: ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ, ОСЛОЖНЕНИЯ И ИСХОДЫ

*Е.И. Прокопенко^{1, 2}, И.Г. Никольская², А.В. Ватазин¹, Ф.Ф. Бурумкулова², Д.В. Губина¹*¹ БУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Российская Федерация² БУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», Москва, Российская Федерация

Беременность у пациенток после трансплантации почки (ТП) стала встречаться чаще, однако риск осложнений и неблагоприятных акушерских исходов в этой группе женщин остается высоким. **Цель:** изучить осложнения и исходы беременности у пациенток с трансплантированной почкой, выживаемость ренальных трансплантатов (РТ) после родов. **Материалы и методы.** В исследование включены 22 беременности у 20 женщин с РТ (трансплантации выполнены в 2006–2020 гг.), группу сравнения составили 20 здоровых женщин, у которых было 20 беременностей. Оценивалась частота и характер осложнений беременности, показатели здоровья новорожденных, исходы беременности. Выживаемость трансплантатов сравнивалась в основной группе и в группе 102 женщин после ТП, не имевших беременностей. **Результаты.** У реципиентов РТ в сравнении со здоровыми женщинами выше была частота преэклампсии – 25 и 0%, $p = 0,047$, задержки роста плода – 30 и 0%, $p = 0,020$, гестационного диабета – 40 и 5%, $p = 0,020$, бессимптомной бактериурии – 35 и 5%, $p = 0,044$, преждевременных родов – 60 и 0%, $p < 0,001$, кесарева сечения – 70 и 10%, $p < 0,001$. Медиана срока родов и массы детей при рождении была значимо ниже у женщин с РТ: 36,0 [33,9; 37,4] в сравнении с 38,9 [38,9; 39,6] нед., $p < 0,001$, и 2405 [2023; 2958] в сравнении с 3355 [3200; 3690] г, $p < 0,001$, соответственно. Частота благоприятных исходов беременности после ТП составила 81,8%, а без учета ранних потерь беременности – 90%. У двух детей выявлены наследственные заболевания с передачей от матери. Выживаемость трансплантатов не различалась у реципиентов РТ, имевших и не имевших беременности, $p = 0,272$. **Выводы.** Исходы беременности у пациенток с РТ в целом благоприятны, вынашивание беременности и роды не влияют на выживаемость трансплантатов. При планировании беременности после ТП необходимо учитывать риск осложнений и возможность передачи потомству наследственных заболеваний.

Ключевые слова: трансплантация почки, иммуносупрессия, беременность, осложнения, исходы беременности, выживаемость ренальных трансплантатов.

PREGNANCY AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION: CLINICAL FEATURES, COMPLICATIONS AND OUTCOMES

*E.I. Prokopenko^{1, 2}, I.G. Nikolskaya², A.V. Vatazin¹, F.F. Burumkulova², D.V. Gubina¹*¹ Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation² Moscow Regional Research Institute of Obstetrics and Gynecology, Moscow, Russian Federation

Pregnancy after kidney transplantation (KT) has become more common, but the risk of complications and adverse obstetric outcomes in this group of women remains high. **Objective:** to study pregnancy complications and outcomes in kidney recipients and renal graft (RG) survival after childbirth. **Material and methods.** The study included 22 pregnancies in 20 women with RG (transplants performed in 2006–2020). The comparison group consisted of 20 healthy women who had 20 pregnancies. Frequency and nature of pregnancy complications, neonatal health indicators, and pregnancy outcomes were evaluated. Graft survival was compared in the main group and in a group of 102 women after KT who did not have pregnancies. **Results.** Compared with healthy women, RG recipients had a higher rate of preeclampsia (25% and 0%, $p = 0.047$), fetal growth restriction (30% and 0%,

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

$p = 0.020$), gestational diabetes (40% and 5%, $p = 0.020$), asymptomatic bacteriuria (35% and 5%, $p = 0.044$), preterm birth (60% and 0%, $p < 0.001$), and cesarean section (70% and 10%, $p < 0.001$). Median gestational age and birth weight were significantly lower in women with RG: 36.0 [33.9; 37.4] vs. 38.9 [38.9; 39.6] weeks, $p < 0.001$, and 2405 [2023; 2958] vs. 3355 [3200; 3690] g, $p < 0.001$, respectively. The rate of favorable pregnancy outcomes after KT was 81.8%, or 90% when early pregnancy loss is excluded. Two children were found to have genetic diseases passed from the mother. Graft survival did not differ between RG recipients with and without pregnancy, $p = 0.272$. **Conclusions.** Pregnancy outcomes in patients with RG are generally favorable, pregnancy and childbirth do not affect graft survival. When planning pregnancy after KT, it is necessary to consider the risk of complications and the possibility of transmitting genetic disorders to offspring.

Keywords: kidney transplantation, immunosuppression, pregnancy, complications, pregnancy outcomes, renal graft survival.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки (ТП) обеспечивает наиболее высокий уровень медицинской и социальной реабилитации пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) 5-й стадии, что дает возможность многим пациентам с ренальным трансплантатом (РТ), как мужчинам, так и женщинам, осуществлять репродуктивную функцию [1, 2].

В настоящее время случаи беременности у пациенток с трансплантированной почкой перестали быть уникальными, хотя частота наступления беременности в этой когорте в несколько раз меньше, чем в общей популяции [3, 4]. В последние годы у пациенток после ТП с бесплодием даже применяются вспомогательные репродуктивные технологии, в том числе программы экстракорпорального оплодотворения [5, 6]. Тем не менее, несмотря на достаточно высокую частоту рождения живых детей (более 70% в большинстве исследований), беременность у реципиенток РТ сопряжена с повышенным риском осложнений и неблагоприятных исходов. Так, в метаанализе 2019 г., в который вошли 6712 беременностей у 4174 женщин с трансплантированной почкой, частота самопроизвольных выкидышей составила 15,4%, 95% ДИ 13,8–17,2, мертворождений – 5,1%, 95% ДИ 4,0–6,5, преэклампсии (ПЭ) – 21,5%; 95% ДИ 18,5–24,9 (для сравнения популяционная частота ПЭ 2–5%), гестационной артериальной гипертензии (АГ) – 24,1%, 95% ДИ 18,1–31,5, кесарева сечения – 62,6%, 95% ДИ 57,6–67,3, преждевременных родов – 43,1%, 95% ДИ 38,7–47,6 [7]. Показано, что неблагоприятные исходы и осложнения беременности ассоциированы со сниженной функцией РТ до зачатия, особенно в сочетании со значимой протеинурией [8, 9].

Важнейшей проблемой является возможное влияние беременности и родов на функцию и выживаемость РТ. Как отдельные исследования, так и крупный метаанализ, в который было включено 43 исследования, не показали значимого влияния беременности на выживаемость трансплантированной почки, хотя в первые 2 года после родов темпы повышения креатинина сыворотки были несколько

выше по сравнению с женщинами, не имевшими беременностей после ТП [10, 11].

Целью нашего исследования было изучить осложнения и исходы беременности у пациенток с трансплантированной почкой, выживаемость трансплантатов после родов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В продольное наблюдательное исследование было включено 20 пациенток с трансплантированной почкой (среди них одна женщина с трансплантированной почкой и поджелудочной железой), у которых было 22 беременности – основная группа. В группу сравнения исходов беременности вошли 20 беременностей у 20 здоровых женщин, не отличавшихся от беременных после ТП по возрасту, индексу массы тела, числу беременностей в анамнезе. Для оценки влияния беременности и родов на выживаемость ренальных трансплантатов использовалась контрольная группа, в которую были отобраны 102 женщины с трансплантированной почкой, не имевшие беременностей после ТП и сравнимые с основной группой по возрасту, основному заболеванию (причине терминальной хронической почечной недостаточности), иммуносупрессивной терапии.

Каждая беременность рассматривалась как отдельный случай. Трансплантации были выполнены в 2006–2020 гг. в различных трансплантационных центрах; во время беременности, наступившей после ТП, пациентки наблюдались нефрологом и акушером-гинекологом ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Все трансплантации были первыми. В 16 случаях (80%) ТП была выполнена от посмертного донора (в том числе трансплантация почки и панкреатодуоденального комплекса), в 4 (20%) – от живого родственного донора. Причиной развития терминальной хронической почечной недостаточности были следующие заболевания: хронический гломерулонефрит – у 11 (55%) пациенток, врожденные аномалии мочевыделительной системы – у 6 (30%), нефропатия неясного генеза – у 2 (10%), диабетическая нефро-

патия в исходе сахарного диабета 1-го типа – у одной (5%) женщины. Средний возраст на момент ТП составил $27,5 \pm 6,7$ года, средний возраст на момент родов – $33,8 \pm 5,5$ года. В 21 случае беременность наступила спонтанно, в одном была достигнута с помощью экстракорпорального оплодотворения. Первыми по счету были 10 наблюдаемых беременностей, вторыми – 6, третьими, четвертыми и пятыми – по 2 беременности. При наступлении беременности СКФ ренального трансплантата соответствовала ХБП С1 в 5 (22,7%) случаях, ХБП С2 – в 9 (40,9%), ХБП С3 – в 7 (31,8%), ХБП С4 (4,5%) – в одном случае. Пациентке с ХБП С4 трансплантата и уровнем креатинина выше 200 мкмоль/л до зачатия, согласно приказу Минздравсоцразвития РФ от 03.12.2007 № 736, было показано прерывание беременности в ранние сроки по медицинским показаниям, однако женщина категорически настаивала на пролонгировании беременности и подписала официальный отказ от ее прерывания. Артифициальный аборт в первом триместре был предложен еще одной реципиентке РТ, у которой незапланированная беременность наступила на фоне приема тератогенного препарата – микофенолата мофетила; кроме того, у женщины в анамнезе был ишемический инсульт на фоне первичного антифосфолипидного синдрома, что резко повышало риск тромботических осложнений при вынашивании беременности. Однако пациентка также отказалась от прерывания беременности, тератогенный препарат был отменен в ранние сроки гестации. Искусственное прерывание беременности при сроке 20–21 неделя предлагалось женщине, у которой при втором ультразвуковом пренатальном скрининге выявлен серьезный порок развития плода – двусторонний гидронефроз с высоким уровнем обструкции, подозрение на кистозную дисплазию, маловодие, однако получен отказ пациентки.

Все беременные с трансплантированной почкой наблюдались по индивидуальному протоколу с рекомендованной частотой визитов к врачу не реже 1 раза в 2 недели, самоконтролем АД и ЧСС 4 раза в день, контролем показателей клинического анализа крови, суточной протеинурии, сывороточного креатинина не реже 1 раза в 4 недели в первой половине беременности и 1 раза в 14 дней после 20-й недели гестации, проведением микробиологического исследования мочи не реже 1 раза в 4 недели, определением концентрации в крови такролимуса/циклоsporина не реже 1 раза в 2–3 недели, выполнением УЗИ почечного трансплантата 1 раз в 6–8 недель, УЗИ плода с доплерометрией не реже 1 раза в 4 недели (по показаниям – чаще) во второй половине беременности, определением ангиогенного коэффициента sFlt-1/PlGF 1 раз в 4–5 недель, использованием по показаниям глобальных методов оценки системы гемостаза – тромбоэластографии и тромбодинамики. При

сложности подбора антигипертензивной терапии проводилось не только офисное стандартизированное измерение АД, но и суточное мониторирование АД. Диагностика гестационного сахарного диабета (ГСД) проводилась согласно действующим рекомендациям [12].

Всем пациенткам после ТП препараты микофеноловой кислоты с учетом их тератогенного и мутагенного эффектов отменялись или заменялись на азатиоприн не позже 3 мес. до зачатия, за исключением одного случая незапланированной беременности. На этапе планирования отменялись также ингибиторы АПФ, блокаторы рецепторов ангиотензина, статины, уратснижающие препараты (аллопуринол, фебуксостат), варфарин, прямые пероральные антикоагулянты и другие препараты, запрещенные к применению во время беременности.

Все реципиентки РТ во время беременности получали кортикостероиды в минимальных дозах (5–10 мг перорально в пересчете на преднизолон) и препарат из группы ингибиторов кальциневрина: такролимус применялся в 17 (77,3%) случаях, циклоsporин А – в 5 из 22 (22,7%). В 12 из 22 случаев беременности (54,5%) использовался третий компонент иммуносупрессивной терапии – азатиоприн в дозе 50 мг/сут. При наличии хронической АГ проводилось ее лечение разрешенными во время беременности препаратами – метилдопа, дигидропиридиновыми блокаторами кальциевых каналов (нифедипин пролонгированного действия, амлодипин), селективными бета-адреноблокаторами (бисопролол, небиволол) – в виде монотерапии или различных комбинаций. У пациенток с хронической АГ целевым считалось АД 130/80–110/70 мм рт. ст. Все пациентки с трансплантированной почкой получали в рекомендуемых беременным дозах фолаты, витамин D (холекальциферол), калия йодид, антиагреганты с целью профилактики ПЭ – ацетилсалициловую кислоту 150 мг/сут с 13-й по 36-ю неделю гестации (при непереносимости ацетилсалициловой кислоты – дипиридамол 225 мг/сут), а также профилактические дозы низкомолекулярного гепарина в течение всей беременности и 6–8 недель послеродового периода для профилактики тромбоэмболических и ассоциированных с плацентой осложнений. Для лечения анемии применялись препараты железа перорально или внутривенно, в отдельных случаях персистирования анемии на фоне насыщения железом и отсутствия дефицита фолиевой кислоты и витамина B₁₂ – препараты эритропоэтина.

У женщин обеих групп оценивались частота и характер осложнений беременности, показатели здоровья новорожденных, исходы беременности. Неблагоприятным исходом считалось искусственное прерывание желанной беременности в ранние сроки по медицинским показаниям, антенатальная,

интранатальная или постнатальная гибель плода/новорожденного, рождение ребенка с серьезными пороками развития или заболеваниями, приводящими к инвалидности. Благоприятным акушерским исходом признавали рождение живого ребенка без значимых аномалий развития или наследственных заболеваний и выживание его в послеродовом периоде.

Статистическая обработка данных. Показатели с нормальным распределением были представлены как «среднее $\pm$ стандартное отклонение». Показатели с распределением, отличающимся от нормального, описывались как «медиана [первый квартиль; третий квартиль]»; качественные показатели – в долях (процентах) либо в абсолютных значениях. Показатели с распределениями, отличающимися от нормального, сравнивались при помощи U-критерия (критерий Манна–Уитни) для двух независимых выборок. Для оценки значимости различий качественных признаков (долей в группах) использовался точный критерий Фишера, выживаемости почечных трансплантатов – метод Каплана–Майера. В качестве критического уровня значимости различий был принят уровень 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интервал между ТП и родами оказался довольно значительным – его медиана составила 64,1 [49,5; 91,5] мес., то есть беременность наступала в среднем через 5 лет после трансплантации. У беременных с трансплантированной почкой в сравнении со здоро-

выми женщинами была значимо выше частота гестационных осложнений: ПЭ, задержки роста плода, ГСД, анемии и бессимптомной бактериурии (ББУ), также имелась тенденция к более высокой частоте инфекций мочевыводящих путей (табл.). У беременных после ТП отмечалась более высокая частота как преждевременных родов в целом (роды до 37 недель беременности произошли в 60% случаев, в группе сравнения – 0%, $p < 0,001$), так и родов до 34 недель гестации (25% в основной группе и 0% в группе здоровых, $p = 0,047$). Причинами досрочных родов были ПЭ в 4 (33,3%) случаях, признаки страдания плода (декомпенсация фетоплацентарной недостаточности) – в 3 (25%), начало родовой деятельности – в 2 (16,7%), родовое излитие околоплодных вод – в 1 (8,3%), прогрессирующий рост протеинурии – в 1 и обратимое повышение креатинина сыворотки еще в 1 случае.

У пациенток с почечным трансплантатом в сравнении со здоровыми значимо чаще происходило оперативное родоразрешение: частота кесарева сечения в основной группе составила 70%, а в группе контроля была в 7 раз меньше – 10%, $p < 0,001$.

Медиана срока родов, медиана абсолютной массы детей при рождении и массы новорожденных в перцентильной шкале была значимо ниже в группе женщин с трансплантированной почкой, а рожденные дети чаще нуждались в лечении в условиях реанимационного отделения.

Таблица

Осложнения беременности и акушерские исходы у пациенток с трансплантированной почкой и у здоровых женщин

Pregnancy complications and obstetric outcomes in women with a transplanted kidney and in healthy women

Показатель	Пациентки после ТП	Здоровые женщины	p
Частота преэклампсии	5 (25%)	0 (0%)	0,047
Частота внутриутробной задержки роста плода	6 (30%)	0 (0%)	0,020
Частота гестационного сахарного диабета	8 (40%)	1 (5%)	0,020
Частота анемии	17 (85%)	7 (35%)	0,003
Частота бессимптомной бактериурии	7 (35%)	1 (5%)	0,044
Частота активной инфекции мочевыводящих путей	4 (20%)	0 (0%)	0,106
Доля родов до 37 недель гестации	12 (60%)	0 (0%)	<0,001
Доля родов до 34 недель гестации	5 (25%)	0 (0%)	0,047
Частота кесарева сечения	14 (70%)	2 (10%)	<0,001
Срок родов, нед.*	36,0 [33,9; 37,4]	38,9 [38,9; 39,6]	<0,001
Масса тела детей при рождении, г*	2405 [2023; 2958]	3355 [3200; 3690]	<0,001
Масса тела детей при рождении, %*	45 [23; 58]	61 [42; 77]	0,045
Частота перевода новорожденных в РО	9 (45%)	0 (0%)	0,001
Благоприятный исход беременности**	18 (81,8%)	20 (100%)	0,109

Примечание. * – показатель представлен в виде «медиана [Q1; Q3]»; ** – данный показатель рассчитан на 22 случая (все наступившие беременности), все остальные показатели – на 20 беременностей, завершившихся родами.

Note. * – indicator is presented as median [Q1; Q3]; ** – indicator is calculated for 22 cases (all pregnancies that occurred), all other indicators are calculated for 20 pregnancies that ended in childbirth.

Кризис отторжения, потерь ренального трансплантата во время беременности не отмечено. Помимо активной мочевой инфекции, которую перенесла во время беременности каждая пятая беременная с трансплантированной почкой, и ББУ в этой группе наблюдались в период гестации и другие инфекции: простой герпес – в 1 случае, опоясывающий герпес, бактериальная ангина, острый бронхит, пищевая токсикоинфекция – также по одному случаю. Две пациентки во время беременности перенесли COVID-19 в легкой форме, еще у одной женщины отмечено бессимптомное носительство COVID-19 (положительные результаты мазка из носоглотки). У одной реципиентки с хроническим вирусным гепатитом В выявлена репликативная активность вируса во время беременности, гепатологом была назначена на весь гестационный период противовирусная терапия – тенофовир алафенамид 25 мг/сут. В целом инфекционные осложнения наблюдались при 11 из 20 (55%) беременностей, завершившихся родами.

Из 22 беременностей 20 (90,9%) завершились родами, в 2 (9,1%) случаях отмечена в первом триместре неразвивающаяся беременность. Частота рождения живых детей составила 90,9%. Одна новорожденная девочка с диагностированной пренатально серьезной аномалией развития мочевыделительной системы (родители отказались от прерывания беременности), врожденной почечной недостаточностью умерла на 3-и сутки жизни, несмотря на проведение заместительной почечной терапии методом перитонеального диализа. Причиной летального исхода была легочная дисплазия. Еще один ребенок (девочка) унаследовал генетическое заболевание матери – рото-лицепальцевой синдром 1-го типа с X-сцепленным доминантным типом наследования, при этом аномалий внутренних органов у девочки не выявлено, период ранней адаптации протекал в целом благоприятно. Таким образом, если отнестись к последнему случаю, несмотря на выживание ребенка, к неблагоприятным исходам, то благоприятный исход отмечен при 18 из 22 (81,8%) беременностей. Если же не учитывать ранние потери беременности (до срока 13 недель),

которые нередко наблюдаются и в общей популяции, то частота благоприятных исходов составляет 90% (18 из 20 беременностей, достигших срока 20 недель). Дети, рожденные пациентками с трансплантированной почкой, растут и развиваются нормально.

Отдельно мы изучили состояние ренального трансплантата на текущий момент (декабрь 2023 г.) у пациенток, имевших беременность и роды (рис. 1). Медиана сроков наблюдения после родов составила 26,9 [13,2; 47,1] мес. Основная часть женщин продолжает наблюдаться с функционирующим РТ – 72,8%, ушли из-под наблюдения 18,2% реципиенток, 1 пациентка (4,5%) потеряла трансплантат и вернулась на лечение ГД через 4 года после родов, которыми завершилась повторная незапланированная беременность, осложненная развитием ПЭ. Одна пациентка с первичным АФС и двумя инсультами в анамнезе погибла с функционирующим трансплантатом от повторного инсульта через 20 мес. после родов с благоприятным акушерским исходом.

Мы проанализировали выживаемость РТ после родов (рис. 2). 1-летняя выживаемость трансплантатов после родоразрешения составила 100%, 2-летняя – 92,3%, 5-летняя – 73,8%.

Для оценки влияния беременности и родов на выживаемость РТ (с момента выполнения трансплантации) было проведено сравнение выживаемости трансплантированных органов в основной группе и в группе контроля, которую составили женщины с пересаженной почкой, не имевшие беременностей после ТП (рис. 3).

Оказалось, что значимых различий в выживаемости РТ между основной и контрольной группой нет, $p = 0,272$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании наблюдалась достаточно высокая частота благоприятных исходов беременности – 81,8%, а без учета ранних потерь – 90%. Значение этого показателя сравнимо с данными других исследователей [1, 7, 8, 13], несмотря на то что части наших пациенток вынашивание беременности было

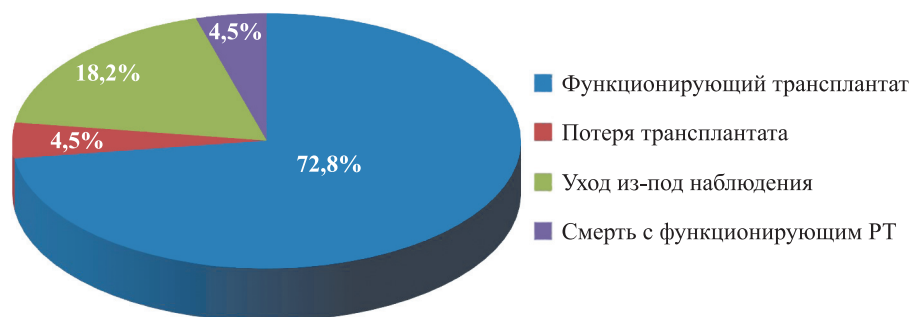


Рис. 1. Статус ренального трансплантата после родов

Fig. 1. Renal graft status after delivery

противопоказано, но были получены отказы от ее прерывания. Частота ПЭ, внутриутробной задержки роста плода, а также досрочных родов, оперативного родоразрешения была более высокой, чем в общей популяции, что совпадает с данными литературы [7, 14, 15]. При этом средние сроки родов (36 [2023; 2958] недель) и масса детей при рождении (2405 [2023; 2958] г) обеспечивали в большинстве случаев благоприятный прогноз для выхаживания новорожденных.

Обращает на себя внимание высокая частота ГСД в нашей когорте беременных – 40%, что выше описываемой в других исследованиях, посвященных

изучению осложнений беременности после ТП – 2–6% [7, 16]. По-видимому, данное различие связано с тем, что мы уделяли особое внимание этому осложнению беременности с учетом неблагоприятного влияния гипергликемии на гестационные исходы и использовали современные критерии диагностики, что могло способствовать улучшению выявления ГСД [12]. Во всех случаях это был ранний ГСД, связанный в значительной степени с диабетогенным действием иммуносупрессивных препаратов – ингибиторов кальциневрина и кортикостероидов.

Предупреждение и лечение инфекционных осложнений играют значимую роль в достижении

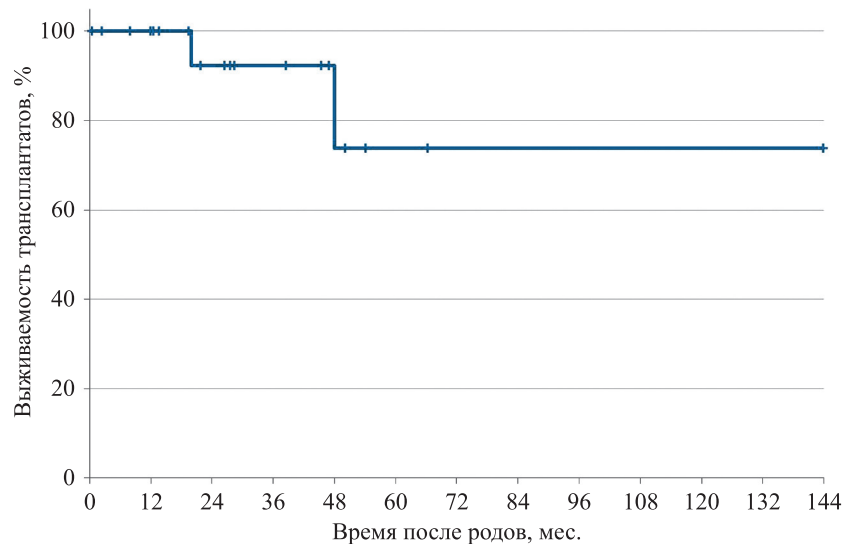


Рис. 2. Выживаемость ренальных трансплантатов после родов

Fig. 2. Kidney graft survival after delivery

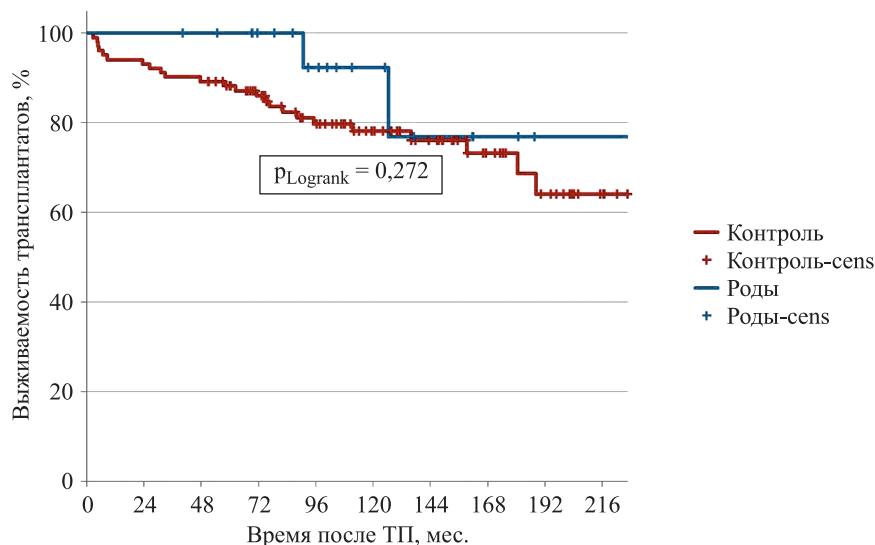


Рис. 3. Выживаемость ренальных трансплантатов (с момента операции) у женщин, имевших и не имевших беременность после трансплантации

Fig. 3. Kidney graft survival (from the time of surgery) in women with and without pregnancy after transplantation

благоприятного исхода беременности у пациенток после ТП. Частота данных осложнений у наших беременных была довольно высокой – 55%, однако тяжелых инфекций не было. Наиболее часто встречалась инфекция мочевыводящих путей – в 7 из 20 случаев (35%), у 4 беременных (20%) была отмечена и ББУ, и активная инфекция. Возможно, в предупреждении тяжелых форм мочевой инфекции имело значение активное антибактериальное лечение всех эпизодов ББУ.

В нашем исследовании во время беременности не отмечалось случаев острого отторжения трансплантата. Вероятно, это связано с небольшим размером нашей когорты. По данным метаанализа, частота отторжения при беременности среди 822 реципиенток РТ составила 9,4% (95% ДИ 6,4–13,7), что оказалось сравнимым с частотой отторжения вне беременности [7, 17]. По-видимому, острое отторжение РТ не является частым осложнением беременности, особенно при тщательном фармакокинетическом контроле и своевременной коррекции иммуносупрессии, хотя риск отторжения все же есть, особенно в первые 2–3 года после родов.

Следует отметить, что большинство неблагоприятных исходов имело место при незапланированных беременностях, когда беременность либо была вообще противопоказана, либо однозначных противопоказаний не было, но не проводилась прегравидарная подготовка. Особой проблемой является возможность наследования ребенком генетического заболевания матери. Нашей пациентке с доказанным рото-лице-пальцевым синдромом 1-го типа с Х-сцепленным доминантным типом наследования и поликистозом почек, риском передачи 50% независимо от пола, абсолютной летальностью для плодов мужского пола консилиумом с участием генетика было рекомендовано достижение беременности в программе ЭКО с последующим выполнением преимплантационного генетического тестирования с целью выбора эмбрионов женского пола с благоприятным прогнозом по заболеванию. Однако пациентка не согласилась с предложенной тактикой и забеременела спонтанно, что привело к передаче заболевания ребенку, но поскольку пол плода оказался женским, непосредственной угрозы жизни в период внутриутробного развития и в неонатальном периоде не отмечалось. Еще у одной пациентки, которая не проходила прегравидарную подготовку и впервые пришла на прием уже с беременностью, основным диагнозом была аномалия развития мочевыводящих путей – нейромышечная дисплазия обоих мочеточников, уретерогидронефроз справа, гипоплазия левой почки, при этом наследственный характер заболевания не предполагался. При первом скрининговом УЗИ плода аномалий не было выявлено, однако при проведении УЗИ в 20 недель у плода обнаружен по-

рок развития – двусторонний гидронефроз, высокий уровень обструкции, подозрение на кистозную дисплазию почек, маловодие. Родители отказались от прерывания беременности, и, к сожалению, перинатальный исход был неблагоприятным. Мы не можем исключить наследственный характер заболевания в этом случае, поэтому пациентке в случае планирования повторной беременности следует выполнить секвенирование экзона. У пациентов с САКУТ-синдромом (сочетанными врожденными аномалиями почек и мочевых путей) при двустороннем поражении моногенные аномалии могут быть выявлены в 22% случаев [18]. Таким образом, несмотря на относительно невысокую частоту наследственных заболеваний среди беременных с РТ, необходимо помнить о возможной передаче заболеваний детям и о преимуществах применения (при наличии установленных мутаций) современных вспомогательных репродуктивных технологий.

При сравнении выживаемости трансплантатов у наших пациенток, выносивших беременность, и не имевших беременностей после ТП, сравнимых по возрасту, основному заболеванию и характеру иммуносупрессии, не было выявлено статистически значимых различий, что не противоречит данным других исследователей [10, 11]. Однако с учетом того, что беременность обычно разрешают пациенткам с изначально удовлетворительной функцией РТ и без серьезных иммунологических и неиммунологических осложнений, такое сравнение может быть не совсем корректным. В какой-то степени эти «преимущества» при анализе исходов могут быть нивелированы теми случаями, когда беременность наступает незапланированно у пациенток с неидеальной функцией РТ или другими противопоказаниями к осуществлению репродуктивной функции, но женщины настаивают на пролонгировании беременности. Еще раз подчеркнем, что у пациенток с трансплантированной почкой отсутствие планирования беременности и прегравидарной подготовки способно негативно влиять на акушерские и нефрологические исходы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пациентки с трансплантированной почкой могут успешно вынашивать беременность при условии тщательного отбора, прегравидарной подготовки и индивидуального ведения, несмотря на более высокую частоту осложнений беременности в сравнении со здоровыми женщинами. При планировании беременности после ТП следует помнить о возможности передачи наследственных заболеваний потомству: при отсутствии противопоказаний может быть выполнено ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием и отбором для переноса здоровых эмбрионов. По-видимому, вынашивание беременно-

сти значимо не влияет на выживаемость ренального трансплантата, хотя необходимы дальнейшие исследования в этой области.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Chandra A, Midtvedt K, Åsberg A, Eide IA. Immunosuppression and reproductive health after kidney transplantation. *Transplantation*. 2019; 103 (11): e325–e333. doi: 10.1097/TP.0000000000002903.
2. Jesudason S, Williamson A, Huuskes B, Hewawasam E. Parenthood with kidney failure: answering questions patients ask about pregnancy. *Kidney Int Rep*. 2022; 7 (7): 1477–1492. doi: 10.1016/j.ekir.2022.04.081.
3. Gill JS, Zalunardo N, Rose C, Tonelli M. The pregnancy rate and live birth rate in kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009; 9 (7): 1541–1549. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02662.x.
4. Salvadori M, Tsalouchos A. Fertility and pregnancy in end stage kidney failure patients and after renal transplantation: an update. *Transplantology*. 2021; 2: 92–108. doi: 10.3390/transplantology2020010.
5. 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.
6. Прокопенко ЕИ, Гурьева ВМ, Петрухин ВА, Краснопольская КВ, Бурумкулова ФФ, Губина ДВ. Беременность после экстракорпорального оплодотворения у пациентки с трансплантированной почкой: клиническое наблюдение и обзор литературы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (4): 15–23. Prokopenko EI, Guryeva VM, Petrukhin VA, Krasnopol'skaya KV, Burumkulova FF, Gubina DV. IVF pregnancy after kidney transplantation: clinical case and literature review. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (4): 15–23. doi: 10.15825/1995-1191-2022-4-15-23.
7. 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.
8. Schwarz A, Schmitt R, Einecke G, Keller F, Bode U, Haller H, Guenter HH. Graft function and pregnancy outcomes after kidney transplantation. *BMC Nephrol*. 2022; 23 (1): 27. doi: 10.1186/s12882-022-02665-2.
9. Tangren J, Bathini L, Jeyakumar N, Dixon SN, Ray J, Wald R et al. Pre-pregnancy eGFR and the risk of adverse maternal and fetal outcomes: a population-based study. *J Am Soc Nephrol*. 2023; 34 (4): 656–667. doi: 10.1681/ASN.0000000000000053.
10. Kaatz R, Latartara E, Bachmann F, Lachmann N, Koch N, Zukunft B et al. Pregnancy after kidney transplantation-impact of functional renal reserve, slope of eGFR before pregnancy, and intensity of immunosuppression on kidney function and maternal health. *J Clin Med*. 2023; 12 (4): 1545. doi: 10.3390/jcm12041545.
11. Van Buren MC, Schellekens A, Groenhof TKJ, van Reekum F, van de Wetering J, Paauw ND, Lely AT. Long-term graft survival and graft function following pregnancy in kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Transplantation*. 2020; 104 (8): 1675–1685. doi: 10.1097/TP.0000000000003026.
12. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Под ред. И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 11-й выпуск. М., 2023; 157. Standards of specialized diabetes care. Edited by I.I. Dedov, M.V. Shestakova, A.Yu. Mayorov. 11th Edition. M., 2023; 157. doi: 10.14341/DM13042.
13. Gosselink ME, van Buren MC, Kooiman J, Groen H, Ganzevoort W, van Hamersvelt HW et al. A nationwide Dutch cohort study shows relatively good pregnancy outcomes after kidney transplantation and finds risk factors for adverse outcomes. *Kidney Int*. 2022; 102 (4): 866–875. doi: 10.1016/j.kint.2022.06.006.
14. Kovač D, Kovač L, Mertelj T, Steblovnik L. Pregnancy after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2021; 53 (3): 1080–1084. doi: 10.1016/j.transproceed.2020.11.003.
15. Mariano S, Guida JPS, Sousa MV, Parpinelli MA, Surita FG, Mazzali M, Costa ML. Pregnancy among women with kidney transplantation: a 20-years single-center registry. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2019; 41 (7): 419–424. doi: 10.1055/s-0039-1688834.
16. Devresse A, Jassogne C, Hubinont C, Debiève F, De Meyer M, Mourad M et al. Pregnancy outcomes after kidney transplantation and long-term evolution of children: a single center experience. *Transplant Proc*. 2022; 54 (3): 652–657. doi: 10.1016/j.transproceed.2022.01.019.
17. Tanriover B, Jaikaransingh V, MacConmara MP, Parekh JR, Levea SL, Ariyamuthu VK et al. Acute rejection rates and graft outcomes according to induction regimen among recipients of kidneys from deceased donors treated with tacrolimus and mycophenolate. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016; 11 (9): 1650–1661. doi: 10.2215/CJN.13171215.
18. Riedhammer KM, Ćomić J, Tasic V, Putnik J, Abazi-Emirani N, Paripovic A et al. Exome sequencing in individuals with congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT): a single-center experience. *Eur J Hum Genet*. 2023; 31 (6): 674–680. doi: 10.1038/s41431-023-01331-x.

Статья поступила в редакцию 11.01.2024 г.

The article was submitted to the journal on 11.01.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-16-27

ТРАНСЪЮГУЛЯРНОЕ ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОЕ ПОРТОСИСТЕМНОЕ ШУНТИРОВАНИЕ ИЛИ КОМБИНАЦИЯ НЕСЕЛЕКТИВНЫХ β -БЛОКАТОРОВ С ЭНДОСКОПИЧЕСКИМ ЛИГИРОВАНИЕМ ВАРИКОЗНЫХ ВЕН ПИЩЕВОДА В ЦЕЛЯХ ПРОФИЛАКТИКИ КРОВОТЕЧЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ, ОЖИДАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ

Р.В. Коробка^{1, 2}, С.В. Готье^{3, 4}, Ю.В. Хоронько², В.Д. Пасечников^{1, 5}, Н.Г. Сапронова², И.А. Поршенников^{6, 7}, М.В. Малеванный^{1, 2}, Е.С. Пак^{1, 2}, Д.В. Пасечников⁵

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

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация

⁶ ГБУЗ Новосибирской области «Государственная Новосибирская областная клиническая больница», Новосибирск, Российская Федерация

⁷ ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

Цель: обоснование выбора оптимального метода профилактики и снижения риска кровотечений из варикозных вен пищевода (ВВП) и кардии у больных с декомпенсированным циррозом печени, включенных в лист ожидания трансплантации печени (ТП). **Материалы и методы.** Пациентам с резистентным и не резистентным к терапии диуретиками асцитом проведена профилактика повторных кровотечений посредством TIPS или комбинации ЭЛ + НСББ. **Результаты.** Количество лейкоцитов, уровень концентрации Na и выраженности поражений печени по классификации Child–Turcotte–Pugh (СТР) у больных с резистентным асцитом (РА) имели значимые различия при сравнении лиц, получавших комбинацию ЭЛ + НСББ или подвергшихся TIPS. У больных с не РА значимые различия были получены для количества тромбоцитов крови, концентраций альбумина и Na в крови, выраженности поражений печени по СТР при сравнении в группах ЭЛ + НСББ и TIPS. У больных с РА частота варикозных узлов (ВУ) 2-й степени, получавших ЭЛ + НСББ, была значимо выше, чем при TIPS. Частота ВУ 3-й степени была достоверно выше у больных с TIPS, чем в группе ЭЛ + НСББ. У больных с не РА частота ВУ 2-й и 3-й степени не имела значимых различий при сравнении этих показателей у пациентов обеих групп. Пропорция пациентов с классом В по СТР была значимо выше как у больных с РА, так и у отвечающих на диуретики при различных методах профилактики повторных кровотечений. Пропорции пациентов класса С по СТР при обеих формах асцита были значимо выше у пациентов группы ЭЛ + НСББ в сравнении с группой TIPS. В период ожидания ТП в течение 2 лет от начала проведения профилактики кровотечений у больных с РА повторные кровотечения развились у 78,4%, подвергшихся имплантации TIPS, а у больных группы ЭЛ + НСББ в те же сроки повторные кровотечения развились в 100% случаев. Методом Каплана–Майера с определением

Для корреспонденции: Пасечников Виктор Дмитриевич. Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Авиационная, 21. Тел. (962) 447-75-13. E-mail: passetchnikov@mail.ru

Corresponding author: Victor Pasechnikov. Address: 21, Aviatzionnaya str., Stavropol, 355017, Russian Federation. Phone: (962) 447-75-13. E-mail: passetchnikov@mail.ru

Log-Rank-критерия было установлено значимое различие между долями пациентов с развитием повторных кровотечений из ВУ в группах ЭЛ + НСББ или TIPS при обеих формах асцита.

Ключевые слова: лист ожидания трансплантации печени, асцит, повторные кровотечения из варикозов, эндоскопическое лигирование варикозных узлов, неселективные β -блокаторы, имплантация TIPS.

TRANSJUGULAR INTRAHEPATIC PORTOSYSTEMIC SHUNT OR A COMBINATION OF NONSELECTIVE BETA BLOCKERS AND ENDOSCOPIC VARICEAL LIGATION FOR PROPHYLAXIS OF BLEEDING IN WAITLISTED CIRRHOTIC PATIENTS

R.V. Korobka^{1, 2}, S.V. Gautier^{3, 4}, Yu.V. Khoronko², V.D. Pasechnikov^{1, 5}, N.G. Sapronova², I.A. Porshennikov^{6, 7}, M.V. Malevanny^{1, 2}, E.S. Pak^{1, 2}, D.V. Pasechnikov⁵

¹ Rostov Regional Clinical Hospital, Rostov-on-Don, Russian Federation

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

³ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

⁴ Sechenov University, Moscow, Russian Federation

⁵ Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

⁶ Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russian Federation

⁷ Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Objective: to substantiate the choice of an optimal method of preventing and reducing the risk of variceal bleeding (VB) and cardia in patients with decompensated cirrhosis who have been enlisted for liver transplantation (LT). **Materials and methods.** Patients with diuretic-resistant and diuretic-responsive ascites underwent prophylaxis for recurrent bleeding via transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) or a combination of endoscopic variceal ligation (EVL) and nonselective beta-blockers (NSBB). **Results.** Leukocyte counts, Na levels, and Child–Turcotte–Pugh (CTP) liver disease class in patients with diuretic-resistant ascites had significant differences when comparing individuals who received EVL + NSBB or underwent TIPS. In diuretic-responsive patients, there were significant differences for blood platelet count, albumin and Na levels, and CTP class when comparing EVL + NSBB and TIPS groups. In diuretic-resistant patients, incidence of grade 2 varices in EVL + NSBB group was significantly higher than in TIPS. Incidence of grade 3 varices was significantly higher in TIPS patients than in EVL + NSBB cohort. In diuretic-responsive patients, incidence of grade 2 and 3 varices had no significant differences when comparing these indicators in both groups. The proportion of patients with CTP class B was significantly higher both in diuretic-resistant and diuretic-responsive patients with various methods of rebleeding prophylaxis. The proportions of CTP class C patients with both forms of ascites were significantly higher in EVL + NSBB group than in TIPS. During the LT wait period within 2 years from the start of bleeding prophylaxis in diuretic-resistant patients, 78.4% of patients who underwent TIPS implantation developed recurrent bleeding, 100% of EVL + NSBB group within the same time frame, developed recurrent bleeding. Using the Kaplan–Meier estimate with the Log-Rank test, we were able to establish that there is a significant difference between the proportions of patients with recurrent VB in EVL + NSBB or TIPS groups with both forms of ascites.

Keywords: liver transplant waiting list, ascites, recurrent VB, endoscopic variceal ligation, nonselective beta blockers, TIPS implantation.

ВВЕДЕНИЕ

Кровотечения из варикозных вен пищевода (ВВП) – это распространенные, серьезные осложнения портальной гипертензии (ПГ), являющейся маркером декомпенсации цирроза печени (ЦП) [1, 2] и высокой летальности [3]. Первый эпизод кровотечения из варикозных узлов (ВУ) случается с частотой, превышающей 85% у больных декомпенсирован-

ной формой ЦП [4]. У пациентов, восстановившихся после первого эпизода кровотечения, риск повторных кровотечений составляет 60% в первый год с летальностью до 33% [2]. В других публикациях сообщается о 30% пациентов с первым эпизодом кровотечений из ВВП в течение первых двух лет [5]. Авторы исследования установили, что после первого эпизода кровотечения из ВВП как минимум 60% из

них предрасположены к развитию повторных кровотечений с риском летальности, составляющим 30% в случае, если им не проводится вторичная профилактика [6, 9]. Но даже в случае проведения вторичной профилактики кровотечений комбинацией неселективных β -блокаторов (НСББ) и эндоскопического лигирования (ЭЛ) ВВП в соответствии с руководством American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) [2] и Рекомендациями по ведению больных с ПГ – Baveno VI и Baveno VII [7, 8] риск повторных кровотечений в течение 2 лет после первого эпизода нарастает с 29 до 57%, а риск развития летального исхода увеличивается с 16 до 26% [10].

Главным предиктором ранних повторных кровотечений и высокой летальности во время острого повторного кровотечения у больных с ЦП, ожидающих трансплантацию печени (ТП), является рост градиента внутрипеченочного давления (ГВПД), достигающего величины 20 мм рт. ст. и более [11, 12]. Показано, что у пациентов, ожидающих ТП, каждое увеличение ГВПД на 1 мм рт. ст. предсказывает увеличение риска летального исхода на 3% в течение 19 месяцев пребывания в листе ожидания (ЛО) [13].

Как установлено исследованиями, ЭЛ не является мерой сдерживания роста ГВПД в процессе прогрессии ЦП [11–13], а НСББ снижает уровень этого показателя в незначительной мере (пропранолол – на 10,1–23,2%, карведилол – на 18,6–27,7%) [14]. К тому же ответная реакция на применение пропранолола или карведилола при высоком ГВПД выявила две категории лиц: респондеров и нон-респондеров [14–16], что снижает эффективность комбинированной терапии НСББ и ЭЛ, которая хорошо себя зарекомендовала при первичной профилактике кровотечений из ВВП [17]. La Mura et al. [16] установили, что частота первичных или повторных кровотечений из ВУ в течение 1 года составила 7% у респондеров острого гемодинамического ответа на использование пропранолола и 21% – у нон-респондеров.

Таким образом, при величине ГВПД или его аналога – градиента портального давления (ГПД) ≥ 25 мм рт. ст. ни ЭЛ, ни терапия НСББ, ни их совместное применение не являются эффективными методами профилактики кровотечений из ВВП при ожидании ТП в течение 2 и более лет [18].

Фактически ЭЛ в комбинации с НСББ, хотя и считается стандартом при проведении профилактики повторных кровотечений из ВВП, никогда не рассматривались как единственная и неоспоримая стратегия [19].

В последние годы широкое распространение получила инвазивная процедура трансъюгулярного внутрипеченочного портосистемного шунтирования (TIPS), и многие рандомизированные клинические исследования (РКИ) подтвердили, что эта методика превосходит другие методы лечения, в целях про-

филактики повторных кровотечений. Тем не менее следует признать, что использование TIPS не привело к значимому повышению показателей выживаемости пациентов [10, 20].

Имплантирование TIPS, снижая уровень показателя ГПВД или ГПД, является, таким образом, методом выбора в том случае, когда терапия первой линии (комбинация ЭЛ и НСББ) является неэффективной [21, 22]. Проведение имплантации TIPS после второго или третьего (и/или более) эпизодов рецидивов кровотечения из ВВП (в особенности, если они повторяются через короткие промежутки времени) показано пациентам с гемодинамической и клинической стабильностью с оптимальными и регулируемые факторами риска осложнений этой процедуры [23].

В большинстве РКИ пациенты включались в исследование в течение от 24 до 96 часов после случившегося кровотечения [24].

Исследования, в которых бы проводились сравнения эффективности TIPS и комбинации ЭЛ и НСББ в профилактике повторных кровотечений из ВВП, чрезвычайно редки [20, 23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В сравнительное ретроспективное исследование вошли 163 наблюдения пациентов с состоявшимися кровотечениями из ВВП, ожидавших ТП в период с 2016-го по 2023 г.

Критерии включения: наличие у пациентов не резистентного и резистентного к диуретикам асцита, наличие одного или более эпизодов кровотечения из ВВП во время пребывания в ЛОТП, полная абстиненция, подтвержденная заключениями наркологов как минимум в течение 3 месяцев до включения в ЛОТП, у больных с алкогольной этиологией ЦП, вирусные ЦП (HBV- или HCV-ассоциированной этиологии), смешанная (алкогольно-вирусная) этиология ЦП, В и С классы ЦП по классификации Child–Turcotte–Pugh (СТР).

Критерии исключения: пациенты с гепатоцеллюлярным раком и с другими опухолями, сопровождающимися развитием асцита, печеночная энцефалопатия (ПЭ) второй и выше стадии, инфекционные заболевания, тромбоз портальной вены, противопоказания к применению НСББ (брадиаритмия, бронхальная астма, обструктивная болезнь легких), сахарный диабет.

Пациенты, вошедшие в исследование, были разделены на две группы: первую группу составили 130 пациентов с асцитом, резистентным к диуретикам, вторую – 33 пациента с асцитом, не резистентным к диуретикам. В обеих группах были выделены подгруппы. В первой группе: 1а – пациенты, получавшие комбинацию ЭЛ и НСББ ($n = 77$), 1б – пациенты с имплантацией TIPS ($n = 53$). Соответственно, во второй группе были также созданы подгруппы:

2а – пациенты, получавшие комбинацию ЭЛ и НСББ (n = 9), 2б – пациенты с имплантацией TIPS (n = 24).

Демографические, клинические и лабораторные показатели были получены из постоянной непрерывно обновляющейся электронной базы данных пациентов, находившихся под наблюдением специалистов после их включения в ЛОТП, после одобрения исследования локальным этическим комитетом при Центре хирургии и координации донорства Ростовской областной клинической больницы. При стабильном состоянии пациентов кратность повторных исследований (клинические и биохимические анализы крови, показатели гемостаза, расчет индекса MELD-Na и класса поражения печени по СТР) составила три месяца.

При стабильном состоянии пациентов ультразвуковое исследование органов брюшной полости проводилось через каждые 6 месяцев после первичного обследования пациентов.

Эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) проводилась для скрининга ВУ с высоким риском кровотечения из ВВП у всех пациентов.

Рекомендации комитета экспертов Baveno VI [7] и Всемирной ассоциации гастроэнтерологов (WGO) [24] послужили основой для выделения пациентов с ВУ, требующих проведения неотложной терапии (ВУ среднего и большого размера).

Критериями диагностики резистентного асцита являлись: отсутствие ответа на мочегонные средства, снижение уровня Na в плазме крови (<125 ммоль/л), увеличение жидкости в брюшной полости (5–6 баллов по шкале CIRAS) [25]. Выраженность асцита, не резистентного к проводимой терапии мочегонными средствами, определялась по критериям экспертов International Ascites Club [26]. Среднее артериальное давление (САД) определяли по формуле: $САД = (ДД) + \frac{1}{3}(СД - ДД)$, где СД – систолическое давление, ДД – диастолическое давление [27].

Для проведения терапии первой линии, рекомендованной экспертами для профилактики повторных кровотечений из ВВП пищевода [2, 7, 8], использовали β^1 -адреноблокаторы (пропранолол, надолол) и β^1 -, β^2 - и α^1 -адреноблокатор (карведилол). Стартовая доза пропранолола составила 40 мг/сут, максимальная – 240 мг/сут. Стартовая доза надолола составила 40 мг/сут, максимальная – 80 мг/сут. Стартовая доза карведилола составляла 6,25 мг/сут, максимальная доза – 25 мг/сут.

Дозы всех препаратов подвергались коррекции в случае изменения показателей артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС) и САД.

Пациенты получали мочегонные средства, а у больных с асцитом, резистентных к терапии мочегонными препаратами, проводился парацентез.

У больных с вирусными ЦП проводилась противовирусная терапия нуклеозидными аналогами (HBV) и комбинацией препаратов с прямым антивирусным воздействием (HCV), согласно рекомендациям по лечению пациентов, находящихся в ЛОТП [28].

ЭЛ проводили с помощью ЭГДС и набора для перевязки ВВП, начиная с желудочно-пищеводного соединения и продолжая эту процедуру в проксимальном направлении. Количество резиновых лигатур (от 2 до 4) определялось размерами ВУ. В соответствии с рекомендациями добивались облитерации всех ВУ, соответствующих критериям неотложной терапии [7, 24], посредством повторных ЭЛ. Контроль облитерации осуществляли с помощью ЭГДС с кратностью 3 месяца. В случае обнаружения рецидивов (появления новых ВУ) проводились повторные ЭЛ.

Имплантация TIPS проводилась в соответствии с рекомендациями по лечению больных с декомпенсированной формой ЦП [29, 30] под местной анестезией с внутривенной седацией анальгетиками. Для проведения имплантации использовали набор инструментов RUPS-100 (Cook Medical®, США), включая интродьюсер Flexor Check-Flo и изогнутый катетер Rösch. После пункции правой внутренней яремной вены (ПВЯВ) под рентгеноскопическим контролем продвигали стандартный ангиографический проводник через верхнюю полую вену (ВПВ) и предсердный синус в нижнюю полую вену (НПВ), размещая его J-образный конец на уровне, несколько превышающем устья печеночных вен (ПВ). По проводнику проводили интродьюсер Flexor Check-Flo с изогнутым катетером Rösch и помещали их в правой печеночной вене (ППВ) ближе к ее устью. Во время оперативного вмешательства формировали внутрипеченочный канал (туннель), идущий от ППВ к правой ветви или бифуркации воротной вены (ВВ), используя иглу Rösch-Uchida и баллон, проводимый по проводнику. После извлечения баллона по проводнику имплантировали стент-графт, представляющий собой трубчатую металлическую сетку, покрытую внутри специальным герметичным пластиком – политетрафторэтиленом (PTFE).

Для анализа полученных данных использовали статистическую программу IBM SPSS Statistics (версия 23). Анализ параметров с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с уровнем значимости Лиллиефорса для проверки на нормальность позволил определить тип распределения полученных переменных величин показателей выборок (нормальное распределение или его отсутствие). При нормальном распределении переменные величины анализировались с вычислением средних арифметических значений (M) с определением стандартного отклонения (SD), значимость различий между сравниваемыми величинами определялась по t-критерию Стьюдента. При отсутствии нормального распределения пере-

менные величины представлялись медианой (Me) и интерквартильным размахом (IQR – интервал между 25-м и 75-м процентилями). Для определения значимости различий между переменными использовали непараметрические критерии: Уилкоксона для парных сравнений зависимых переменных, а Хи-квадрат Пирсона – для сравнения независимых переменных. Для сравнения выборок с малым количеством переменных использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий). Использовался также дисперсионный анализ (ANOVA-тест). Анализ частот переменных и их долей (%) применяли в случае сравнения качественных параметров. Значение $p < 0,05$ принято в качестве критерия статистической значимости между сравниваемыми показателями. Пропорцию пациентов с наступившими повторными кровотечениями в сравниваемых группах, а также риск наступления проверяемого события (кровотечения) определяли методом Каплана–Майера. Значимость различий между сравниваемыми кривыми определяли посредством вычисления логарифмического критерия [Log-Rank (Mantel-Cox)].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 и 2 представлены демографические, клинические, лабораторные показатели, величины показателя индекса MELD-Na в группах больных с асцитом, резистентным и не резистентным к терапии диуретиками, получавших НСББ в комбинации с процедурой ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS в период ожидания ТП.

Как видно из представленных таблиц, демографические и большая часть лабораторных и инструментальных показателей пациентов, получавших терапию НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS в группах больных с резистентным и не резистентным к диуретикам асцитом, не имели значимых различий.

Исключение составили показатели количества лейкоцитов крови, концентрации Na в крови и выраженности поражений печени по классификации СТР у больных с асцитом, резистентным к терапии диуретиками, имевших значимые различия при сравнении подгрупп 1а и 1б. Также при сравнении показателей в подгруппах больных 2а и 2б у больных с не резистентным асцитом значимые различия были получены для количества тромбоцитов крови, концентраций альбумина и Na в крови, выраженности поражений печени по классификации СТР.

В табл. 3 и 4 представлены данные гендерного состава, а также этиологии ЦП, класса СТР и степени выраженности ВУ у пациентов, получавших терапию НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS в группах больных с резистентным и не резистентным к диуретикам асцитом. В сравниваемых подгруппах пациентов преобладала вирусная этиология декомпенсированного ЦП. В табл. 3 показано, что у больных, ожидающих ТП, с асцитом, резистентным к терапии диуретиками, частота ВУ 2-й степени в подгруппе 1а (получавших комбинацию ЭЛ и НСББ) была значимо выше, чем в подгруппе 1б (подвергшихся имплантации TIPS). В то же время частота обнаружения ВУ 3-й степени

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей пациентов с асцитом, резистентным к диуретикам (1-я группа), получавших терапию НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS (нормальное распределение и распределение, отличающееся от нормального)

Comparative characteristics of patients with diuretic-resistant ascites (group 1), who received NSBB therapy plus EVL or underwent TIPS implantation (normal and non-normal distribution)

Показатель	Подгруппа 1а ЭЛ + НСББ (n = 73)	Подгруппа 1б TIPS (n = 37)	Достоверность различий
Нормальное распределение (M ± SD)			
Возраст	48,82 ± 10,59	51,46 ± 10,67	0,22
Гемоглобин, г/л	87,91 ± 11,68	87,00 ± 11,39	0,32
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	3,38 ± 1,20	4,31 ± 1,68	0,01
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	84,41 ± 44,15	109,73 ± 78,65	0,03
Альбумин плазмы, г/л	29,85 ± 3,06	30,38 ± 2,76	0,38
MELD-Na	21,92 ± 3,09	20,76 ± 3,06	0,06
САД, мм рт. ст.	78,22 ± 20,65	79,35 ± 21,12	0,23
Распределение, отличающееся от нормального (Me; IQR)			
МНО	1,90 (1,70–2,05)	1,90 (1,60–2,10)	0,45
Билирубин, мкмоль/л	81,00 (64,50–105,00)	74,00 (64,50–77,50)	0,07
Креатинин, мкмоль/л	112,00 (97,00–127,00)	109,00 (101,50–121,00)	0,59
Na, ммоль/л	136,60 (135,00–138,50)	132,00 (129,50–135,50)	0,001
СТР (баллы)	2,00 (2,00–2,00)	11,00 (8,50–14,00)	0,001

была достоверно выше в подгруппе 1б, чем в подгруппе 1а. У больных с асцитом, отвечающих на терапию диуретиками (табл. 4), частота ВУ 2-й и 3-й степени не имела значимых различий при сравнении этих показателей в подгруппах 2а и 2б (получавших ЭЛ в комбинации с НСББ и подвергшихся процедуре имплантации TIPS соответственно). При сравнении тяжести поражения печени по классификации СТР класса А провести анализ не представилось возможным по причине отсутствия таковых пациентов в подгруппах 1а и 2а (с резистентными и не резистентными формами асцита). Пропорция пациентов с классом В по классификации СТР была значимо

выше, как у больных с асцитом, резистентным к терапии диуретиками, так и у отвечающих на диуретики пациентов (подгруппы 1а и 1б соответственно). Пропорции пациентов с классом С по классификации СТР при обеих формах асцита были значимо выше в подгруппах пациентов 1а и 2а, получавших терапию комбинацией ЭЛ и НСББ, в сравнении с подгруппами 2а и 2б, подвергшихся имплантации TIPS.

Во время ожидания ТП в период от 24 до 48 недель наблюдения в ЛО (2-летний период от начала проведения профилактики кровотечений) у больных с асцитом, резистентных к терапии диуретиками, повторные кровотечения развились у 29 из 37 па-

Таблица 2

Сравнительная характеристика показателей пациентов с нерезистентным асцитом (группа 2), получавших терапию НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS (нормальное распределение и распределение, отличающееся от нормального)

Comparative characteristics of patients with non-resistant ascites (group 2), who received NSBB therapy plus EVL or underwent TIPS implantation (normal and non-normal distribution)

Показатель	Подгруппа 2а ЭЛ + НСББ (n = 16)	Подгруппа 2б TIPS (n = 18)	Достоверность различий
Нормальное распределение (M ± SD)			
Возраст	46,45 ± 7,98	48,50 ± 10,18	0,12
Гемоглобин, г/л	88,91 ± 10,32	87,38 ± 9,63	0,17
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	4,76 ± 1,51	4,96 ± 1,86	0,10
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	80,17 ± 44,05	131,11 ± 52,15	0,04
Альбумин плазмы, г/л	26,33 ± 5,20	31,61 ± 2,48	0,03
MELD-Na	21,30 ± 3,49	19,38 ± 2,28	0,13
САД, мм рт. ст.	79,67 ± 22,43	81,44 ± 23,42	0,19
Распределение, отличающееся от нормального (Me; IQR)			
МНО	1,75 (1,48–2,00)	1,70 (1,38–1,95)	0,50
Билирубин, мкмоль/л	107,50 (42,50–652,50)	79,50 (57,00–161,25)	0,55
Креатинин, мкмоль/л	99,00 (77,25–104,25)	98,00 (82,25–117,25)	0,64
Na, ммоль/л	136,00 (136,00–137,25)	132,00 (130,00–132,00)	0,001
СТР (баллы)	2,00 (2,00–2,00)	8,00 (7,00–9,00)	0,003

Таблица 3

Сравнительная характеристика клинических и гендерных показателей пациентов с резистентным асцитом, получавших терапию НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS

Comparative characteristics of clinical and gender parameters of patients with resistant ascites, who received NSBB therapy plus EVL or underwent TIPS implantation

Показатель	Подгруппа 1а НСББ + ЭЛ (n = 73)	Подгруппа 1б TIPS (n = 37)	Достоверность различий
Мужской пол	41 (56,2%)	21 (56,8%)	0,11
Вирусная этиология ЦП	35 (48,0%)	19 (32,4%)	0,001
Алкогольная этиология ЦП	19 (26,0%)	9 (24,3%)	0,13
Другая этиология ЦП	19 (26,0%)	9 (24,3%)	0,14
ВУ, степень 2	19 (26,0%)	4 (10,8%)	0,001
ВУ, степень 3	54 (74,0%)	33 (89,2%)	0,001
СТР, класс А	0	1 (2,7%)	–
СТР, класс В	6 (8,2%)	9 (24,3%)	0,001
СТР, класс С	67 (91,8%)	27 (73,0%)	0,04

циентов (78,4%), подвергшихся имплантации TIPS. В то же время повторные кровотечения в те же сроки развились у всех пациентов, получивших комбинацию ЭЛ и НСББ (100%).

При использовании метода Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,023$) между долями пациентов с развитием повторных кровотечений из ВУ в сравниваемых группах (рис. 1).

На рис. 2 представлена диаграмма кумулятивного риска развития повторных кровотечений в сравниваемых группах пациентов. Кумулятивный риск развития повторных кровотечений в подгруппе больных, получивших комбинацию ЭЛ и НСББ, в два и более раза превышает аналогичный показатель в подгруппе больных, подвергшихся имплантации TIPS (значимое различие с использованием критерия Log-Rank = 0,023).

В период ожидания ТП (от 24 до 48 недель наблюдения в ЛО – 2 года от начала проведения профилактики кровотечений) у больных с асцитом, не резистентным к терапии диуретиками, повторные кровотечения развились у 8 из 18 пациентов (44,4%), подвергшихся имплантации TIPS.

В подгруппе больных, получивших терапию посредством комбинации ЭЛ и НСББ, в те же сроки повторные кровотечения развились у всех пациентов (100%).

При использовании метода Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,049$) между долями пациентов с развитием повторных кровотечений из ВУ в сравниваемых группах (рис. 3).

На рис. 4 представлена диаграмма кумулятивного риска развития повторных кровотечений в сравниваемых группах пациентов. Кумулятивный риск развития повторных кровотечений в подгруппе

больных, получивших комбинацию ЭЛ и НСББ, в полтора раза превышает аналогичный показатель в подгруппе больных, подвергшихся имплантации TIPS (значимое различие с использованием критерия Log-Rank = 0,023).

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашем исследовании показан высокий уровень повторных кровотечений при резистентном и не резистентном к терапии диуретиками асците у пациентов, ожидающих ТП в течение 24–48 недель, получавших профилактическую терапию комбинацией инвазивной процедуры – ЭЛ с приемом НСББ (терапия первой линии) или подвергшихся имплантации TIPS, рассматривающейся в современных руководствах как терапия второй линии [8]. Отметим, что первые рецидивы кровотечений произошли в первые 8–10 недель от начала проведения вторичной профилактики повторных кровотечений при обеих формах асцита и обоих методах профилактики. Однако при увеличении срока ожидания ТП (>10 недель от начала профилактических мероприятий) пропорция больных с повторными кровотечениями стала значительно выше и достигла 100% у больных с обеими формами асцита в случае использования терапии первой линии, в то время как использование терапии второй линии дало достоверно меньшую частоту повторных кровотечений к окончанию срока наблюдения за пациентами с обеими формами асцита.

Мы нашли всего пять опубликованных исследований и один метаанализ (при анализе базы данных PubMed вплоть до января 2024 г.), целью которых был сравнительный анализ влияния имплантации TIPS или комбинации ЭЛ и НСББ на частоту повторных кровотечений у больных с декомпенсированной формой ЦП.

Таблица 4

Сравнительная характеристика клинических и гендерных показателей пациентов с асцитом, не резистентным к терапии диуретиками, получавших НСББ в комбинации с ЭЛ или подвергшихся имплантации TIPS

Comparative characteristics of clinical and gender parameters of patients with diuretic-responsive ascites, who received NSBB plus EVL or underwent TIPS implantation

Показатель	Подгруппа 2а ЭЛ + НСББ (n = 16)	Подгруппа 2б TIPS (n = 18)	Достоверность различий
Мужской пол	12 (75,01%)	14 (77,7%)	0,16
Вирусная этиология ЦП	12 (75,0%)	12 (66,7%)	0,03
Алкогольная этиология ЦП	6 (25,0%)	4 (22,2%)	0,22
Другая этиология ЦП	0	2 (11,1%)	–
ВУ, степень 2	2 (12,5%)	2 (11,1%)	0,23
ВУ, степень 3	14 (87,5%)	16 (88,9%)	0,24
СТР, класс А	0	1 (13,5%)	–
СТР, класс В	5 (8,2%)	14 (18,9%)	0,001
СТР, класс С	11 (91,8%)	3 (67,6%)	0,008

К таким же результатам, как и в нашем исследовании, пришли Zhou et al. [31], сравнившие эффективность и безопасность имплантации TIPS или комби-

нации ЭЛ и НСББ (пропранолола) в целях вторичной профилактики кровотечений из ВВП. Исследование показало, что доля пациентов без повторных крово-

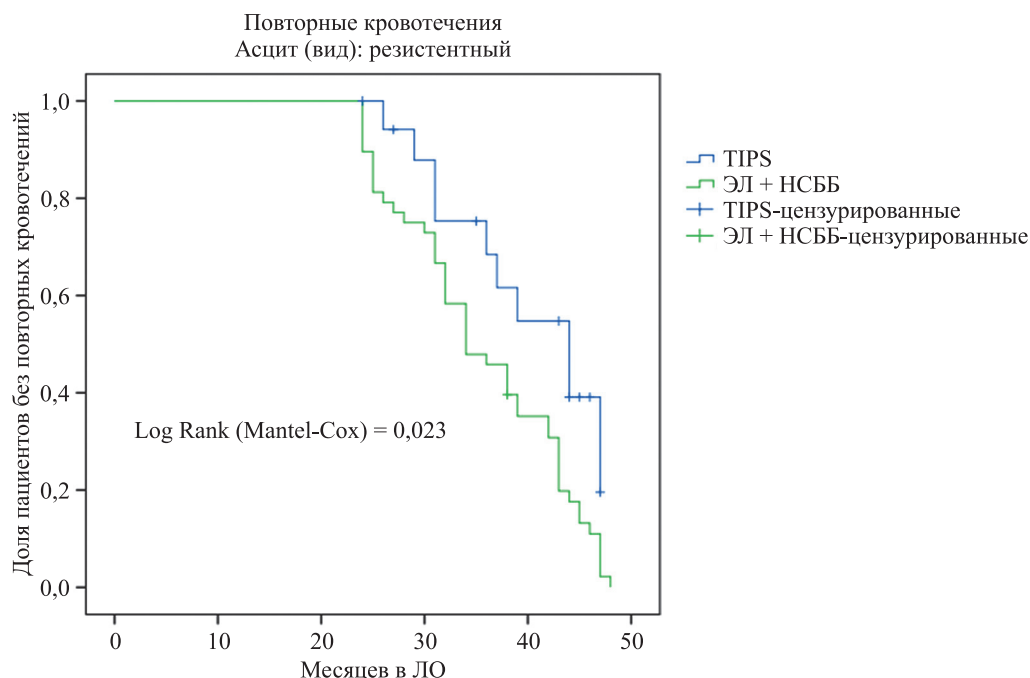


Рис. 1. Доля пациентов с асцитом, резистентным к диуретикам, у которых развились повторные кровотечения, подвергшихся имплантации TIPS или получивших терапию в виде комбинации НСББ и ЭЛ (метод Каплана–Майера с Log-Rank-критерием)

Fig. 1. Proportion of rebleeding patients with diuretic-resistant ascites, who underwent TIPS implantation or received NSBB + EVL (Kaplan–Meier method with Log-Rank test)

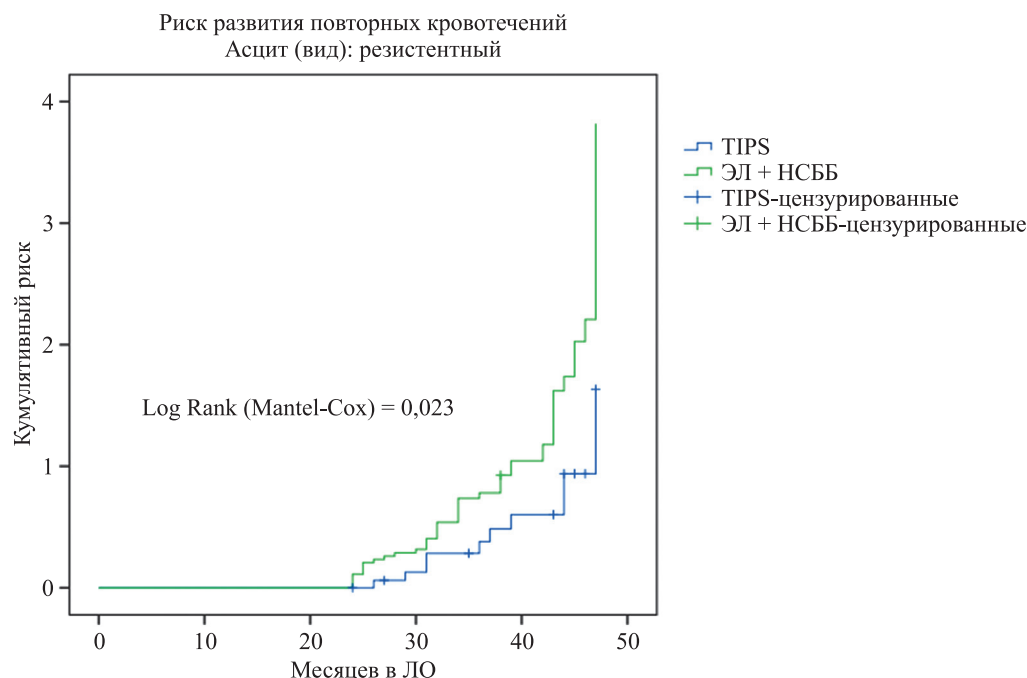


Рис. 2. Кумулятивный риск развития повторных кровотечений у больных с резистентной формой асцита, подвергшихся имплантации TIPS или комбинации ЭЛ и НСББ

Fig. 2. Cumulative risk of recurrent bleeding in patients with resistant ascites who underwent TIPS implantation or received EVL + NSBB

течений была выше в группе пациентов с имплантацией TIPS, чем в группе получивших профилактику в форме комбинации ЭЛ и НСББ (93 и 62% соответ-

ственно, $p < 0,001$). Авторы заключили, что в сравнении с комбинацией ЭЛ и НСББ TIPS, покрытый PTFE, значительно уменьшает уровень повторных

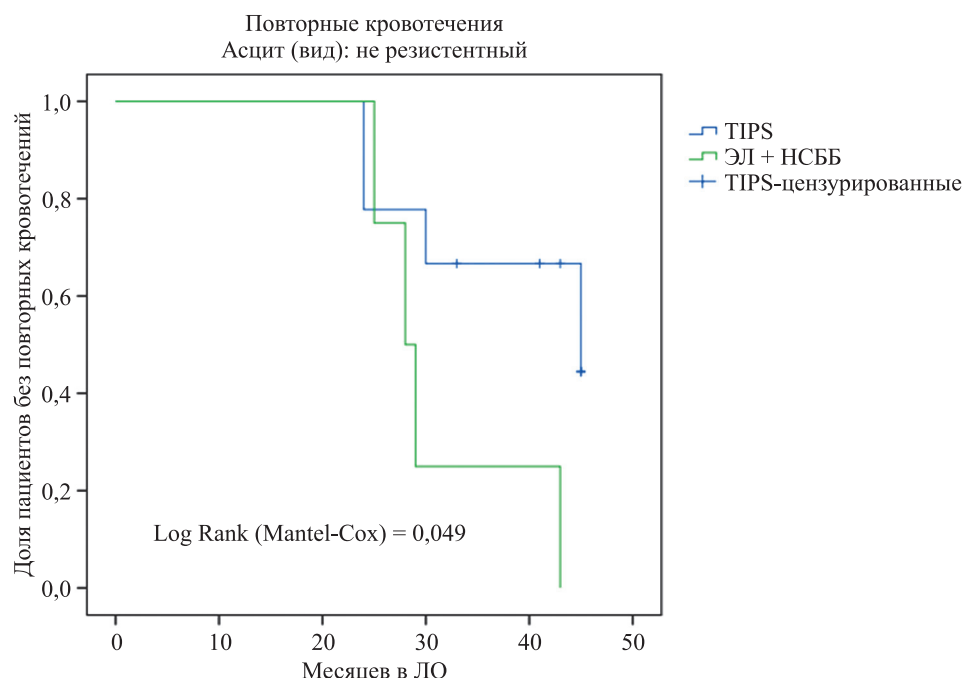


Рис. 3. Доля пациентов с асцитом, не резистентным к диуретикам, подвергшихся имплантации TIPS или получивших терапию в виде комбинации НСББ и ЭЛ, у которых развились повторные кровотечения (метод Каплана–Майера с Log-Rank-критерием)

Fig. 3. Proportion of rebleeding patients with diuretic-responsive, who underwent TIPS implantation or received NSBB + EVL (Kaplan–Meier method with Log-Rank test)

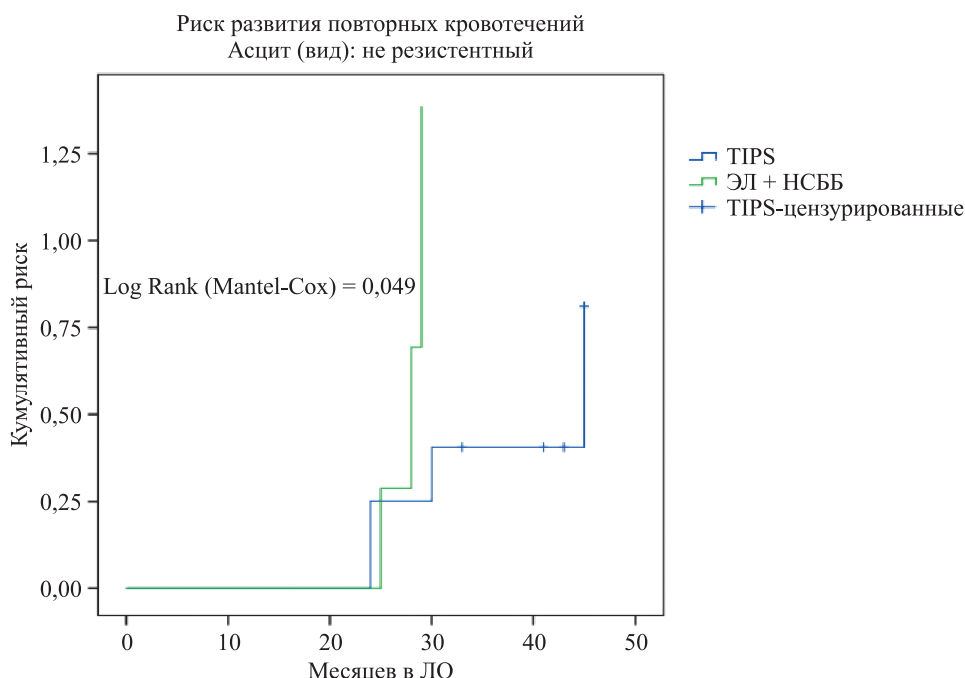


Рис. 4. Кумулятивный риск развития повторных кровотечений у больных с нерезистентной формой асцита, подвергшихся имплантации TIPS или комбинации ЭЛ и НСББ

Fig. 4. Cumulative risk of recurrent bleeding in patients with diuretic-responsive ascites who underwent TIPS implantation or EVL + NSBB

кровотечений у больных с декомпенсированным ЦП и КЗПГ с уровнем ГПВД ≥ 20 мм рт. ст.

Ранее в исследованиях, сравнивавших эффективность имплантации покрытого PTFE TIPS с комбинацией ЭЛ и НСББ [10, 20, 32, 33], было показано значимое различие первого метода над вторым при проведении профилактики повторных кровотечений. Немаловажно, что использование TIPS, покрытого PTFE, не увеличило риск развития летальности пациентов или риск развития ПЭ.

Miao et al. [19] провели метаанализ РКИ в целях сравнительной оценки эффективности всех предложенных методов профилактики повторной терапии у больных с декомпенсированным ЦП. Авторы включили в метаанализ 48 РКИ с общим количеством 4415 пациентов с ЦП и ПГ, имевших в анамнезе эпизод недавно происшедшего кровотечения из ВВП. Анализ был проведен посредством изучения международных баз данных, включая EMBASE, PubMed и Cochrane Database of Controlled Trials вплоть до декабря 2019 г.

Авторы метаанализа заключили, что комбинация НСББ и изосорбида моонитрата значимо больше снижает летальность пациентов, чем комбинация ЭЛ и НСББ (63,9 и 49,6% соответственно). Имплантация TIPS более эффективна в профилактике повторных кровотечений (98,8%), но не оказывает существенного влияния на выживаемость пациентов.

Риск развития повторных кровотечений в нашем исследовании был значимо выше в подгруппе больных, получавших комбинацию ЭЛ и НСББ, чем в подгруппе больных ЦП, подвергшихся имплантации TIPS. Отметим, что в нашем исследовании развитие повторных кровотечений происходило у больных с асцитом, резистентным и не резистентным к терапии диуретиками, с высоким показателем индекса MELD-Na, а также со значимой пропорцией пациентов с ВУ 2-й и 3-й степени выраженности.

Известно, что главным фактором риска развития повторных кровотечений из ВВП является рост ГПВД, достигающего высоких цифр (≥ 20 мм рт. ст.) [11, 12, 33]. Увеличение пропорции пациентов с повторными кровотечениями при обеих формах асцита у лиц, получавших комбинацию ЭЛ и НСББ в нашем исследовании, в сравнении с пациентами, подвергшимися имплантации TIPS, определенно связано с ростом ГПВД при ожидании ТП в течение 2 и более лет. Как установлено Liu et al. [18], при росте ГПВД или ГПД ≥ 25 мм рт. ст. ни ЭЛ, ни НСББ-терапия, ни их совместное применение не обеспечивают надежной профилактики повторных кровотечений из ВВП. К подобному заключению пришли Zhang et al. [33], показавшие, что TIPS более эффективны, чем пропранолол в комбинации с ЭЛ у больных с ЦП, имеющим высокий уровень ГПВД (≥ 20 мм рт. ст.).

Кроме ГПВД ≥ 20 мм рт. ст. к другим факторам риска повторных кровотечений у больных, получавших комбинацию НСББ и ЭЛ, относят асцит, ПЭ, индекс MELD > 12 [34], что согласуется с нашим исследованием. Несомненно, к факторам риска развития повторных кровотечений из ВВП следует отнести выявленные нами ВУ пищевода средней и высокой степени градации при обеих формах асцита. В исследовании, проведенном Irisawa et al. [35], показано, что фактором риска повторных кровотечений является именно размер (диаметр) околопищеводных ВУ.

Как снизить риск развития повторных кровотечений? Оптимальной стратегией предупреждения повторных кровотечений является раннее использование имплантации TIPS. Концепция «pre-emptive TIPS» (ранняя имплантация стента, упреждающая риск повторных кровотечений) была впервые внедрена Monescillo et al. [36], которые показали, что у пациентов с ГПВД ≥ 20 мм рт. ст. имплантация стента в первые 24 часа после стабилизации состояния пациента на фоне случившегося первого эпизода кровотечения обеспечивает большую выживаемость и меньший уровень развития повторных кровотечений из ВВП, чем применение стандартной профилактической терапии.

Ardevol et al. [34] подтвердили эту концепцию, показав, что раннее использование TIPS после развития эпизода первого кровотечения значимо снижает риск развития повторных кровотечений.

К ограничениям этого подхода относится необходимость измерения ГПВД для принятия решения о выборе метода профилактики повторных кровотечений из ВВП. Эта методика доступна далеко не всем медицинским центрам, и ее внедрение может рассматриваться как перспектива улучшения диагностики ПГ и выбора метода профилактики повторных кровотечений из ВВП при длительном сроке ожидания ТП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлен высокий уровень повторных кровотечений при обеих формах асцита у пациентов, ожидающих ТП в течение 24–48 недель после включения в ЛО.

Вероятными индикаторами риска повторных кровотечений у пациентов, включенных в исследование, являются наличие асцита, высокий показатель индекса MELD-Na (≥ 19), высокая степень размера (диаметра) ВУ.

Профилактика повторных кровотечений в указанные сроки пребывания в ЛО при ожидании ТП

более эффективна при имплантации TIPS, нежели использование комбинации ЭЛ и НСББ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Liu L, Nie Y, Liu Q, Zhu X. A Practical Model for Predicting Esophageal Variceal Rebleeding in Patients with Hepatitis B-Associated Cirrhosis. *Int J Clin Pract*. 2023 Aug 3; 2023: 9701841. doi: 10.1155/2023/9701841.
2. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology* 2017; 65: 310–335. doi: 10.1002/hep.28906.
3. Коробка ВЛ, Пак ЕС, Шаповалов АМ, Кострыкин МЮ, Ткачев АВ. Оценка четырехлетнего ведения листа ожидания трансплантации печени Ростовской области: перспективы снижения смертности в листе. *Медицинский вестник Юга России*. 2019; 10 (3): 32–39. Korobka VL, Pak ES, Shapovalov AM, Kostyrykin MYu, Tkachev AV. Analysis of four-year management of the waiting list for liver transplantation in Rostov region: prospects for reducing mortality of candidates listed for liver transplantation. *Medical Herald of the South of Russia*. 2019; 10 (3): 32–39. (In Russ.). doi: 10.21886/2219-8075-2019-10-3-32-39.
4. Kovalak M, Lake J, Mattek N, Eisen G, Lieberman D, Zaman A. Endoscopic screening for varices in cirrhotic patients: data from a national endoscopic database. *Gastrointest Endosc*. 2007 Jan; 65 (1): 82–88. PMID: 17185084. doi: 10.1016/j.gie.2006.08.023.
5. North Italian Endoscopic Club for the Study and Treatment of Esophageal Varices. Prediction of the first variceal hemorrhage in patients with cirrhosis of the liver and esophageal varices. A prospective multicenter study. *N Engl J Med*. 1988 Oct 13; 319 (15): 983–989. doi: 10.1056/NEJM198810133191505.
6. Bosch J, García-Pagán JC. Prevention of variceal rebleeding. *Lancet*. 2003 Mar 15; 361 (9361): 952–954. doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12778-X.
7. De Franchis R. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol* 2015; 63: 743–752. doi: 10.1016/j.jhep.2015.05.022.
8. De Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C. Baveno VII Faculty. Baveno VII – Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol*. 2022; 76 (4): 959–974. doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.022.
9. Garcia-Tsao G, Bosch J. Varices and Variceal Hemorrhage in Cirrhosis: A New View of an Old Problem. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015; 13: 2109–2117. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.012.
10. Lv Y, Qi X, He C, Wang Z, Yin Z, Niu J et al. Covered TIPS versus endoscopic band ligation plus propranolol for the prevention of variceal rebleeding in cirrhotic patients with portal vein thrombosis: a randomised controlled trial. *Gut*. 2018 Dec; 67 (12): 2156–2168. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314634.
11. Abraldes JG, Villanueva C, Bañares R, Aracil C, Catalina MV, Garcí A-Pagán JC, Bosch J. Hepatic venous pressure gradient and prognosis in patients with acute variceal bleeding treated with pharmacologic and endoscopic therapy. *J Hepatol*. 2008 Feb; 48 (2): 229–236. doi: 10.1016/j.jhep.2007.10.008.
12. Moitinho E, Escorsell A, Bandi JC, Salmerón JM, García-Pagán JC, Rodés J, Bosch J. Prognostic value of early measurements of portal pressure in acute variceal bleeding. *Gastroenterology*. 1999 Sep; 117 (3): 626–631. PMID: 10464138. doi: 10.1016/s0016-5085(99)70455-5.
13. Ripoll C, Bañares R, Rincón D, Catalina MV, Lo Iacono O, Salcedo M et al. Influence of hepatic venous pressure gradient on the prediction of survival of patients with cirrhosis in the MELD Era. *Hepatology*. 2005 Oct; 42 (4): 793–801. doi: 10.1002/hep.20871.
14. Sinagra E, Perricone G, D'Amico M, Tinè F, D'Amico G. Systematic review with meta-analysis: the haemodynamic effects of carvedilol compared with propranolol for portal hypertension in cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Mar; 39 (6): 557–568. doi: 10.1111/apt.12634.
15. Hofer BS, Simbrunner B, Bauer DJM, Paternostro R, Schwabl P, Scheiner B et al. Acute hemodynamic response to propranolol predicts bleeding and nonbleeding decompensation in patients with cirrhosis. *Hepatology Commun*. 2022 Sep; 6 (9): 2569–2580. doi: 10.1002/hep4.2021.
16. La Mura V, Abraldes JG, Raffa S, Retto O, Berzigotti A, García-Pagán JC, Bosch J. Prognostic value of acute hemodynamic response to i.v. propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol*. 2009 Aug; 51 (2): 279–287. Epub 2009 May 24. PMID: 19501930. doi: 10.1016/j.jhep.2009.04.015.
17. Коробка ВЛ, Пасечников ВД, Коробка РВ, Пак ЕС, Шаповалов АМ. 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. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (3): 42–50. Korobka VL, Pasechnikov VD, Korobka RV, Pak ES, Shapovalov AM. Use of endoscopic band ligation alone and in combination with nonselective beta blockers for prevention of variceal bleeding in ascites patients on the liver transplant waiting list. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (3): 42–50. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2022-3-42-50.
18. Liu J, Shi Q, Xiao S, Zhou C, Zhou B, Yuan F et al. Using transjugular intrahepatic portosystemic shunt as the first-line therapy in secondary prophylaxis of variceal hemorrhage. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb; 35 (2): 278–283. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31222830; PMCID: PMC7027763. doi: 10.1111/jgh.14761.
19. Miao Z, Lu J, Yan J, Lu L, Ye B, Gu M. Comparison of Therapies for Secondary Prophylaxis of Esophageal Va-

- riceal Bleeding in Cirrhosis: A Network Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Clin Ther*. 2020 Jul; 42 (7): 1246–1275.e3. doi: 10.1016/j.clinthera.2020.04.014.
20. Holster IL, Tjwa ET, Moelker A, Wils A, Hansen BE, Vermeijden JR et al. Covered transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus endoscopic therapy + β -blocker for prevention of variceal rebleeding. *Hepatology*. 2016 Feb; 63 (2): 581–589. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26517576. doi: 10.1002/hep.28318.
 21. Rössle M. TIPS: 25 years later. *J Hepatol*. 2013 Nov; 59 (5): 1081–1093. Epub 2013 Jun 25. PMID: 23811307. doi: 10.1016/j.jhep.2013.06.014.
 22. Boregowda U, Umapathy C, Halim N, Desai M, Nanjappa A, Arekapudi S et al. Update on the management of gastrointestinal varices. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2019 Jan 21; 10 (1): 1–21. doi: 10.4292/wjgpt.v10.i1.1.
 23. Korsic S, Stabuc B, Skok P, Popovic P. TIPS vs. endoscopic treatment for prevention of recurrent variceal bleeding: a long-term follow-up of 126 patients. *Radiol Oncol*. 2021 Jan 26; 55 (2): 164–171. doi: 10.2478/raon-2021-0006.
 24. Варикозное расширение вен пищевода. Практические рекомендации Всемирной гастроэнтерологической организации. Esophageal Varices. Practice Guideline of World Gastroenterology Organisation. Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/esophageal-varices-russian-2014.pdf>.
 25. Gantzel RH, Aagaard NK, Vilstrup H, Watson H, Grønbaek H, Jepsen P. Development and validation of the Cirrhotic Ascites Severity model-A patient-reported outcome-based model to predict 1-year mortality. *Hepatol Commun*. 2022 Nov; 6 (11): 3175–3185. doi: 10.1002/hep4.2065.
 26. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology*. 2003; 38 (1): 258–266. doi: 10.1053/jhep.2003.50315.
 27. DeMers D, Wachs D. Physiology, Mean Arterial Pressure. [Updated 2023 Apr 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538226>.
 28. Хубутия МШ, Восканян СЭ, Сюткин ВЕ, Чуланов ВП, Новрузбеков МС, Пасечников ВД и др. Рекомендации по профилактике и лечению инфекций вирусами гепатита В и С у больных, находящихся в Листе ожидания трансплантации печени, и реципиентов печени. *Трансплантология*. 2020; 12 (3): 231–244. Khubutiya MSh, Voskanyan SE, Syutkin VE, Chulanov VP, Novruzbekov MS, Pasechnikov VD et al. Recommendations for the prevention and treatment of hepatitis B and C infection in patients on the waiting list for liver transplantation and in liver transplant recipients. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2020; 12 (3): 231–244. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23873/2074-0506-2020-12-3-231-244.
 29. Boike JR, Thomburg BG, Asrani SK, Fallon MB, Fortune BE, Izzy MJ et al. North American Practice-Based Recommendations for Transjugular Intrahepatic Portosystemic Shunts in Portal Hypertension. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022; 20 (8): 1636–1662.e36. PMID: 34274511 doi: 10.1016/j.cgh.2021.07.018.
 30. Büttner L, Aigner A, Pick L, Brittinger J, Stelb CJ, Böning G, Steitparth F. 25 years of experience with transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): changes in patient selection and procedural aspects. *Insights Imaging*. 2022; 13 (1): 73. PMID: 35416547. doi: 10.1186/s13244-022-01216-5.
 31. Zhou Y, Zhang W, Zhang Z, Luo J, Gu J, Liu Q et al. PTFE-covered TIPS is an effective treatment for secondary preventing variceal rebleeding in cirrhotic patients with high risks. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Sep; 32 (9): 1235–1243. PMID: 32744824; PMCID: PMC7423526. doi: 10.1097/MEG.0000000000001686.
 32. Sauerbruch T, Mengel M, Dollinger M, Zipprich A, Rössle M, Panther E et al. Prevention of Rebleeding From Esophageal Varices in Patients With Cirrhosis Receiving Small-Diameter Stents Versus Hemodynamically Controlled Medical Therapy. *Gastroenterology*. 2015 Sep; 149 (3): 660–668.e1. Epub 2015 May 16. PMID: 25989386. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.011.
 33. Zhang M, Wang G, Zhao L, Wu Z, Zhang W, Zhang C. Second prophylaxis of variceal bleeding in cirrhotic patients with a high HVP. *Scand J Gastroenterol*. 2016 Dec; 51 (12): 1502–1506. Epub 2016 Jul 5. PMID: 27379704. doi: 10.1080/00365521.2016.1193218.
 34. Ardevol A, Alvarado-Tapias E, Garcia-Guix M, Brujats A, Gonzalez L, Hernández-Gea V et al. Early rebleeding increases mortality of variceal bleeders on secondary prophylaxis with β -blockers and ligation. *Dig Liver Dis*. 2020 Sep; 52 (9): 1017–1025. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32653417. doi: 10.1016/j.dld.2020.06.005.
 35. Irisawa A, Saito A, Obara K, Shibukawa G, Takagi T, Shishido H et al. Endoscopic recurrence of esophageal varices is associated with the specific EUS abnormalities: severe periesophageal collateral veins and large perforating veins. *Gastrointest Endosc*. 2001 Jan; 53 (1): 77–84. PMID: 11154493. doi: 10.1067/mge.2001.108479.
 36. Monescillo A, Martínez-Lagares F, Ruiz-del-Arbol L, Sierra A, Guevara C, Jiménez E et al. Influence of portal hypertension and its early decompression by TIPS placement on the outcome of variceal bleeding. *Hepatology*. 2004 Oct; 40 (4): 793–801. PMID: 15382120. doi: 10.1002/hep.20386.

Статья поступила в редакцию 09.02.2024 г.
The article was submitted to the journal on 09.02.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-28-33

ЭНДОСКОПИЧЕСКАЯ ПОЛНОСТЕННАЯ РЕЗЕКЦИЯ АДЕНОКАРЦИНОМЫ СИГМОВИДНОЙ КИШКИ У РЕЦИПИЕНТА ПЕЧЕНИ

М.Т. Беков¹, А.Р. Монахов^{1, 2}, К.С. Смирнов¹, Я.С. Якунин¹, Р.А. Латыпов¹,
Д.О. Олешкевич¹, О.М. Цирульникова^{1, 2}, 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

Реципиенты солидных органов имеют более высокие риски возникновения онкологических новообразований в сравнение с популяцией. В основном это обусловлено приемом иммуносупрессивной терапии. Колоректальный рак является одним из часто встречающихся онкологических заболеваний у реципиентов. В данной статье приведен опыт применения эндоскопической полностенной резекции аденокарциномы сигмовидной кишки у реципиента печени.

Ключевые слова: трансплантация солидных органов, онкологическая заболеваемость, колоректальный рак, эндоскопическая полностенная резекция.

ENDOSCOPIC FULL-THICKNESS RESECTION OF SIGMOID COLON CANCER IN A LIVER RECIPIENT

М.Т. Bekov¹, А.Р. Monakhov^{1, 2}, К.С. Smirnov¹, Ya.S. Yakunin¹, R.A. Latypov¹,
D.O. Oleshkevich¹, O.M. Tsirulnikova^{1, 2}, 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

Compared with the general population, solid organ transplant recipients have a higher cancer risk. This is mainly due to the use of immunosuppressive therapy. Colorectal cancer is one of the most common cancers in recipients. This paper presents the experience of endoscopic full-thickness resection (EFTR) of a sigmoid colon cancer in a liver recipient.

Keywords: solid organ transplantation, cancer morbidity, colorectal cancer, endoscopic full-thickness resection.

Трансплантация органов является операцией выбора при возникновении терминальных стадий множества заболеваний, особенно когда лимит консервативной терапии исчерпан [1]. В мировой практике отмечается стойкая тенденция к увеличению количества выполняемых пересадок жизненно важных органов как от посмертных, так и от родственных доноров [2]. Ежегодно на территории Российской

Федерации увеличивается количество региональных центров, в которых выполняется трансплантация. Так, в 2022 году число трансплантаций органов в РФ увеличилось на 10,0% по сравнению с 2021 годом. За 2022 год в России было выполнено 2555 трансплантаций солидных органов [3].

Реципиенты солидных органов находятся в группе риска возникновения злокачественных новообразо-

Для корреспонденции: Беков Максат Турдумаматович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1.
Тел. (926) 399-49-75. E-mail: doctorbekov@gmail.com

Corresponding author: Maksat Bekov. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (926) 399-49-75. E-mail: doctorbekov@gmail.com

ваний [4]. Во многом это обусловлено приемом иммуносупрессивных препаратов, предотвращающих возникновение иммунологических осложнений после трансплантации [5].

У пациентов с трансплантированным органом риск развития колоректального рака (КРР) выше, чем в популяции [6]. В 2016 году М. Safaeian et al. проанализировали случаи возникновения колоректального рака у реципиентов солидных органов. Авторами было проанализировано 790 случаев возникновения колоректального рака у 224 098 реципиентов различных органов. Отмечалось увеличение количества рака проксимальных отделов толстой кишки, в то время как частота рака дистальных отделов не была увеличена, а частота рака прямой кишки была снижена в сравнении с популяцией.

Согласно данным многоцентровых анализов, риск развития КРР был заметно выше у реципиентов легких, операция которым выполнялась по поводу муковисцидоза [6–8].

J.M. Park et al. проанализировали частоту возникновения колоректального рака у реципиентов почек [9]. Авторы отметили повышение риска возникновения аденом толстой кишки и КРР у пациентов с наличием вируса Эпштейна–Барр и цитомегаловируса.

Заболеваемость колоректальным раком значительно выше у реципиентов печени, трансплантация которым выполнена по поводу первичного склерозирующего холангита, а также при наличии воспалительных заболеваний кишечника [10–11].

В многоцентровом исследовании М. Sagastagoitia-Fornie et al. был проанализирован исход 6244 трансплантаций сердца. КРР был обнаружен у 116 реципиентов. Заболеваемость КРР увеличивалась с 56,6 на 100 000 человеко-лет среди лиц моложе 45 лет до 436,4 на 100 000 человеко-лет среди лиц старше 64 лет [12].

Хирургическое вмешательство является основным методом радикального лечения пациентов с колоректальным раком [13]. При раннем раке толстой кишки 0–1-й степени рекомендуется использование органосохраняющей операции, такой как эндоскопическая резекция слизистой с диссекцией в подслизистом слое.

Эндоскопическая полностенная резекция (EFTR) с использованием специального устройства (FTRD) в ряде случаев способна заменить хирургическую резекцию. Процедура EFTR изображена схематично на рис. 1.

G. Andrisani et al. выполнили эндоскопическую полностенную резекцию 110 пациентам [14]. Основными показаниями были рецидивирующее возникновение аденомы (39 случаев), неполная резекция при эндоскопическом удалении опухолевых образований (26 случаев), отсутствие лифтинга при выполнении диссекции в подслизистом слое (12 случаев), а также аденомы с вовлечением аппендикса (2 случая), подслизистые образования (10 случаев), карцинома T1 (16 случаев) и прочие. Средний размер образований составил 20 мм (диапазон 6–42 мм). У семи пациен-

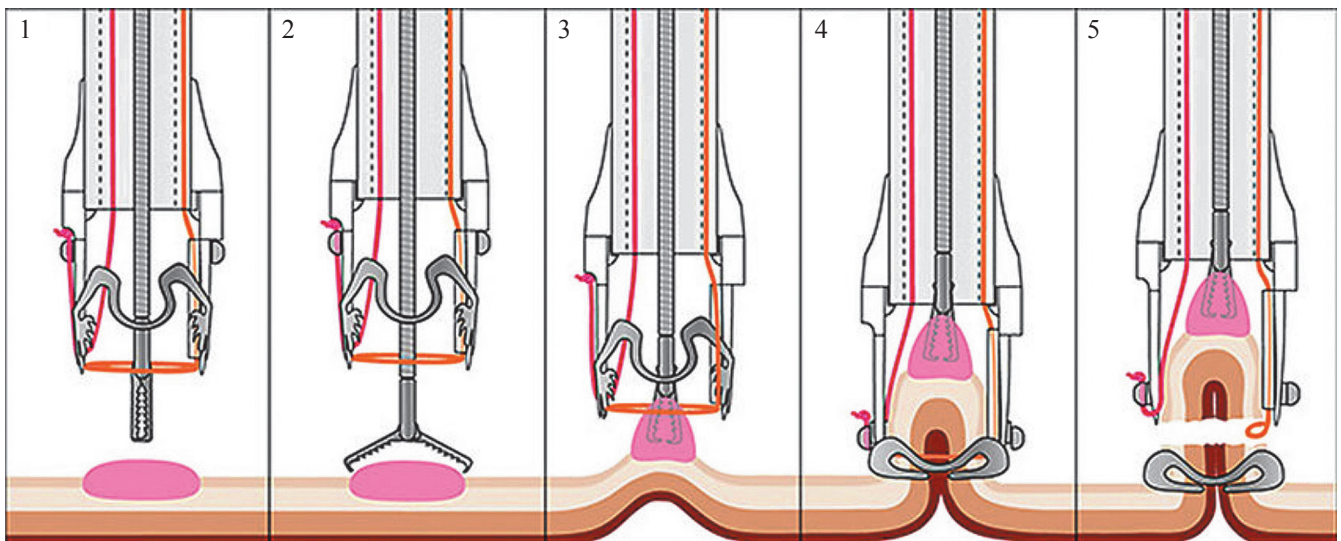


Рис. 1. Эндоскопическая полностенная резекция: 1 – маркировка области оперативного вмешательства; 2 – захват патологических тканей с помощью форцепта; 3 – тракция тканей в просвет колпачка; 4 – наложение клипсы; 5 – закрытие клипсы и разрез тканей с помощью электрохирургии (источник: www.ovesco.com)

Fig 1. The EFTR system is presented: 1 – marking of the surgical intervention site; 2 – grasping of the target tissue with a forceps; 3 – retrieval of the target tissue within cap and fixation; 4 – release of the clip; 5 – closure of the snare and tissue incision using electrocautery (source: www.ovesco.com)

тов отмечалось сохранение остаточной опухолевой ткани.

Р. Aepli et al. сообщали об использовании EFTR у 33 пациентов с эпителиальными образованиями толстой кишки [15]. Основными показаниями были рецидивирующее возникновение аденомы и отсутствие лифтинга при выполнении диссекции в подслизистом слое. В 31 случае удалось достигнуть полного удаления патологических тканей. В трех случаях отмечалось кровотечение в послеоперационном периоде, в одном – перфорация стенки кишки.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациент К. 54 лет, в августе 2019 года появились жалобы на общую слабость, увеличение живота в размерах. В сентябре 2019 года отмечались эпизоды кровавой рвоты, мелены. Тогда же диагностирован цирроз печени токсической этиологии (регулярное употребление алкоголя каждую неделю, абстиненция с 2019 года) с синдромом портальной гипертензии (асцитический синдром, варикозное расширение вен пищевода (ВРВП) III степени по N. Soehendra, K. Binmoeller). Проведено несколько сеансов лапароцентеза, суммарно эвакуировано до 30 литров асцитической жидкости. В октябре 2019 года выполнено эндоскопическое лигирование варикозно расширенных вен пищевода (ЭЛВРВП). Послеоперационный период протекал без осложнений. В ноябре 2019 года диагностирован пристеночный тромбоз воротной вены, по поводу которого была назначена терапия апиксабаном в дозировке 2,5 мг 2 раза в сутки. В 2020 году выполнено повторное ЭЛВРВП III степени, без осложнений. Спустя месяц после оперативного вмешательства отмечены признаки прогрессирования портального тромбоза с распространением на верхнюю брыжеечную вену. С декабря 2020 года отмечалось нарастание отчетно-асцитического синдрома.

В марте 2021 года пациент обратился в НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова. Проведено комплексное обследование, установлен диагноз: цирроз печени алиментарно-токсического генеза, декомпенсация, класс B по Чайлд–Пью, MELDNa 12, осложненный синдромом портальной гипертензии (асцит, ВРВП), печеночно-клеточной недостаточности (коагулопатия, гипербилирубинемия, печеночная энцефалопатия 1-й ст.). Из сопутствующих заболеваний диагностированы: сахарный диабет 2-го типа; артериальная гипертензия 2-й степени, 2-й стадии, риск 3; желчекаменная болезнь с холециститом. В связи с тяжестью состояния по основному заболеванию и бесперспективностью консервативной терапии радикальным методом лечения являлась трансплантация печени. В связи с отсутствием про-

тивопоказаний пациент включен в лист ожидания органа от посмертного донора.

В апреле 2021 года в рамках подготовки к трансплантации печени амбулаторно выполнена колоноскопия, по результатам которой обнаружены аденоматозные эпителиальные образования ободочной и прямой кишки. Подготовка к исследованию проводилась препаратом на основе макрогола. Качество подготовки оценивалось как неудовлетворительное (4 балла по Бостонской шкале: левые отделы (LS) – 1, поперечно-ободочная кишка (TS) – 1, правые отделы (RS) – 2). Рекомендована плановая эндоскопическая полипэктомия в условиях стационара. Однако от госпитализации пациент отказался.

В июле 2021 года выполнена ортотопическая трансплантация печени от посмертного АВ0-совместимого донора по классической методике. Индукция иммуносупрессивной терапии базиликсимабом 20 мг и метилпреднизолоном 500 мг с последующим уменьшением дозировки метилпреднизолона и переходом на пероральный прием с суточной дозировкой 6 мг. Гладкое течение послеоперационного периода. Со 2-х суток начат прием второго компонента иммуносупрессивной терапии – такролимуса, с постепенным набором целевых значений концентрации препарата. На 5-е сутки начат прием микофенолата мофетила по 1000 мг 2 раза в сутки. В связи со стабилизацией состояния, удовлетворительной функцией трансплантата, отсутствием показаний к продолжению стационарного лечения пациент выписан на 11-е сутки после трансплантации печени под амбулаторный контроль.

Регулярные явки на амбулаторный контроль с проведением клинко-лабораторно-инструментального мониторинга состояния трансплантата и общесоматического статуса. С августа 2021 года конверсия на такролимус пролонгированного действия с достижением целевых значений концентрации препарата в крови.

В декабре 2021 года отмечалось увеличение концентрации альфа-фетопротеина в сыворотке крови до 17,13 МЕ/мл. В январе 2022 года выполнена диагностическая колоноскопия, по результатам которой обнаружены: 3 эпителиальных образования восходящей ободочной кишки диаметром до 6 мм, тип 0-Is по Парижской классификации, тип 2 по классификации NICE; 3 эпителиальных образования поперечной ободочной кишки диаметром до 6 мм, тип 0-Ia по Парижской классификации, тип 2 по классификации NICE; 2 эпителиальных образования прямой кишки диаметром до 6 мм, тип 0-Is по Парижской классификации, тип 2 по классификации NICE. Выполнена эндоскопическая полипэктомия «холодной» петлей с последующим гистологическим исследованием. Так-

же в сигмовидной кишке, на расстоянии 30–35 см от ануса, определялось образование диаметром до 7–8 мм, тип 0-IIa+IIc по Парижской классификации, тип 3 по классификации NICE, с центральным втяжением. Эпителиальный рисунок местами стертый, в режиме узкоспектральной визуализации (NBI) определялись искривленные разнокалиберные сосуды (рис. 2). При инструментальной пальпации отмечалась инфильтрация стенки, однако сохранялась незначительная подвижность при тракции. Взята биопсия. Также выполнена эндоскопическая маркировка новообразования маркером BlackEye. Подготовка к исследованию проводилась препаратом на основе макрогола с добавлением аскорбиновой кислоты. Качество подготовки оценивалось как удовлетворительное (6 баллов по Бостонской шкале: левые отделы (LS) – 2, поперечно-ободочная кишка (TS) – 2, правые отделы (RS) – 2).

По результатам гистологического исследования удаленных эпителиальных образований выявлены тубулярные аденомы толстой кишки со слабой дисплазией. Гистологическая картина эпителиального образования сигмовидной кишки представлена высокодифференцированной аденокарциномой (low-grade).

Проведен онкологический поиск, включающий компьютерную томографию головного мозга, органов грудной клетки и брюшной полости с внутривенным контрастированием, эзофагогастродуоденоскопию, позитронно-эмиссионную томографию. Признаков метастатического поражения не обнаружено. Учитывая размеры опухолевого образования, отсутствие метастазов, распространенность процесса

(pT1N0M0, I ст.), принято решение о выполнении эндоскопической полностенной резекции рака сигмовидной кишки.

В феврале 2022 года в условиях операционной под внутривенной седацией выполнена эндоскопическая полностенная резекция сигмовидной кишки с помощью системы наложения клипс OTSC и эндоскопических клипс Ovesco® (Ovesco AG, Германия) (видеоэндоскопическая система Olympus Evis Exera III, колоноскоп CF-190L – Olympus Corporation, Япония). С помощью биопсийных щипцов типа «Аллигатор» (Endo Stars LLC, Россия) выполнена тракция образования в просвет устройства для наложения клипс с захватом стенки кишки с неизменной слизистой оболочкой. Следующим этапом выполнено наложение клипсы Ovesco® в пределах здоровых тканей. Эпителиальное образование удалено в режиме ENDO CUT Q (эффект – 3, ширина резания – 1, интервал резания – 6) (ERBE VIO 300D, Erbe Elektromedizin, Германия). Удаленный фрагмент извлечен из просвета кишки. При ревизии признаков остаточной опухолевой ткани не обнаружено (рис. 3).

По результатам гистологического исследования определяются многочисленные фрагменты слизистой оболочки толстой кишки с инвазивным ростом высокодифференцированной аденокарциномы, в строении умеренно выраженная лимфоцитарно-лейкоцитарная инфильтрация. Край резекции интактный.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Пациент выписан из стационара на 7-е сутки после оперативного вмешательства.

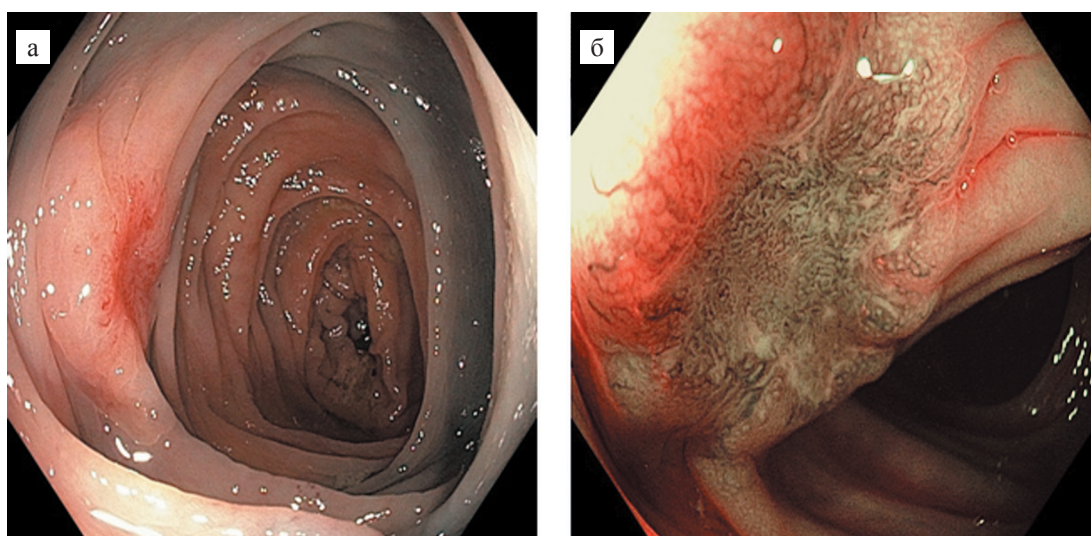


Рис. 2. Эпителиальное образование сигмовидной кишки: а – в белом цвете; б – в режиме узкоспектральной визуализации, отмечается выраженный «неоангиогенез» – признак злокачественного роста

Fig. 2. Epithelial formation of the sigmoid colon: a – in white color; б – in narrow-spectral imaging mode, there is pronounced «neoangiogenesis», a sign of malignant growth

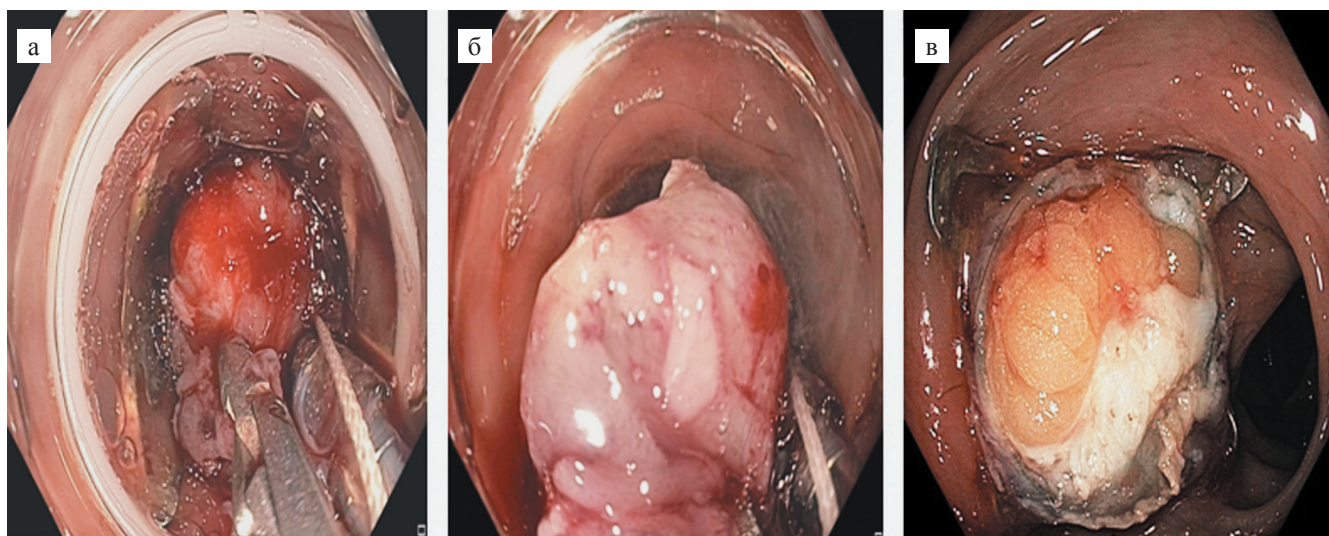


Рис. 3. Этапы оперативного вмешательства: а – захват опухолевой ткани и тракция в просвет колпачка; б – фрагмент стенки сигмовидной кишки резецирован с помощью электрохирургии; в – ревизия после удаления аденокарциномы

Fig. 3. Surgical intervention stages: а – grasping of the tumor tissue and retrieval within cap; б – fragment of the sigmoid colon wall resected using electrosurgery; в – revision after adenocarcinoma removal

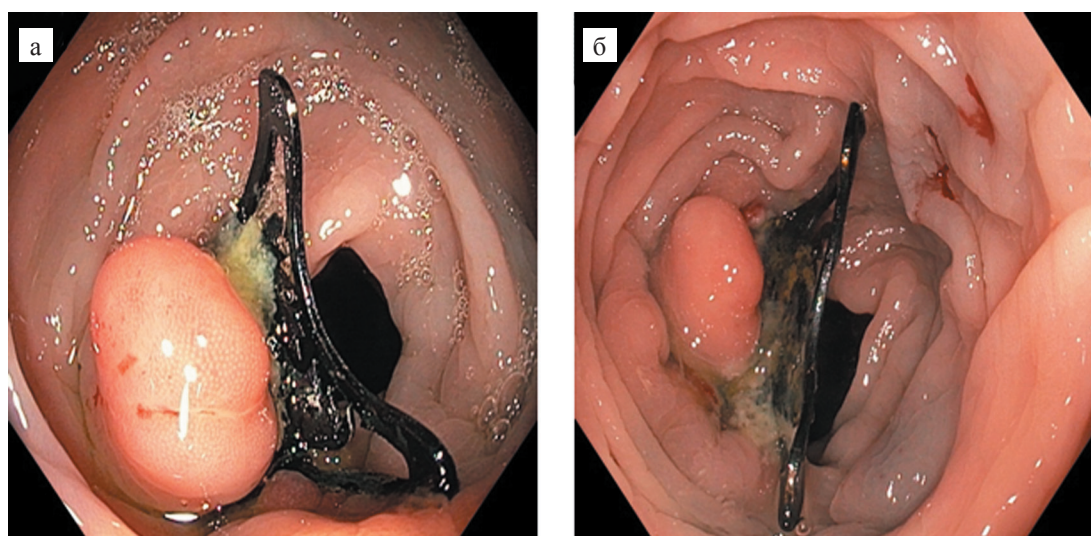


Рис. 4. Контрольная колоноскопия после эндоскопической полностенной резекции рака сигмовидной кишки: а – спустя 6 месяцев; б – спустя 1 год 6 месяцев (клипса продолжает находиться в просвете кишки)

Fig. 4. Control colonoscopy after EFTR of sigmoid colon cancer: а – at 6 months; б – at 1 year 6 months (the clip is still in the intestinal lumen)

При выполнении контрольной колоноскопии спустя 6 месяцев и 1 год 6 месяцев после эндоскопической полностенной резекции рака сигмовидной кишки данных за рецидив не получено (рис. 4). На момент написания статьи срок наблюдения составляет 2 года.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реципиенты солидных органов имеют повышенный риск возникновения онкологических заболеваний, в том числе колоректального рака, особенно с увеличением возраста пациентов и сроков с момента

трансплантации. Эта статистическая закономерность во многом обусловлена приемом иммуносупрессивных препаратов по жизненным показаниям.

Данная когорта пациентов требует более тщательного скрининга онкологических заболеваний.

«Золотым стандартом» скрининга колоректального рака является выполнение колоноскопии. Диагностическая ценность данной методики зависит как от качественной подготовки, включающей соблюдение специализированной диеты с исключением продуктов, богатых клетчаткой, сплит-прием препаратов на

основе макрогола, так и проведение исследования на оборудовании экспертного уровня с применением водоструйной помпы и инсуффлятора углекислого газа.

Применение эндоскопической полностенной резекции эпителиальных образований толстой кишки в случае технической возможности, а также при отсутствии противопоказаний может являться альтернативой хирургической резекции кишки. EFTR способна снизить частоту осложнений, связанных с хирургическим вмешательством, сроки госпитализации, а также может быть рассмотрена у пациентов, которым полостная операция противопоказана ввиду высоких анестезиологических рисков.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Трансплантология и искусственные органы. Под ред. С.В. Готье. М.: Лаборатория знаний, 2018; 319. *Transplantologiya i iskusstvennyye organy. Pod red. S.V. Gautier. M.: Laboratoriya znaniy, 2018; 319.*
2. <https://www.irodat.org> [Internet]. International Registry In Organ Donation And Transplantation. Available from: <https://www.irodat.org>.
3. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2022 году. XV сообщение регистра Российского трансплантологического общества. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (3): 8–30. *Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2022. 15th Report from the Registry of the Russian Transplant Society. Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2023; 25 (3): 8–30. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-8-30>.
4. Buell JF, Gross TG, Woodle ES. Malignancy after transplantation. *Transplantation*. 2005; 80 (2S): S254–S264. doi: 10.1097/01.tp.0000186382.81130.ba.
5. Penn I. Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug safety*. 2000; 23 (2): 101–113. doi: 10.2165/00002018-200023020-00002.
6. Safaeian M, Robbins HA, Berndt SI, Lynch CF, Fraumeni JF Jr, Engels EA. Risk of Colorectal Cancer After Solid Organ Transplantation in the United States. *Am J Transplant*. 2016 Mar; 16 (3): 960–967. doi: 10.1111/ajt.13549.
7. Meyer KC, Francois ML, Thomas HK, Radford KL, Hawes DS, Mack TL et al. Colon cancer in lung transplant recipients with CF: increased risk and results of screening. *J Cyst Fibros*. 2011 Sep; 10 (5): 366–369. doi: 10.1016/j.jcf.2011.05.003.
8. Merchea A, Shahjehan F, Croome KP, Cochuyt JJ, Li Z, Colibaseanu DT, Kasi PM. Colorectal Cancer Characteristics and Outcomes after Solid Organ Transplantation. *J Oncol*. 2019 Feb 28; 2019: 5796108. doi: 10.1155/2019/5796108.
9. Park JM, Choi MG, Kim SW, Chung IS, Yang CW, Kim YS et al. Increased incidence of colorectal malignancies in renal transplant recipients: a case control study. *Am J Transplant*. 2010 Sep; 10 (9): 2043–2050. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03231.x.
10. Singh S, Edakkanambeth Varayil J, Loftus EV Jr, Talwalkar JA. Incidence of colorectal cancer after liver transplantation for primary sclerosing cholangitis: a systematic review and meta-analysis. *Liver Transpl*. 2013 Dec; 19 (12): 1361–1369. doi: 10.1002/lt.23741.
11. Silva MA, Jambulingam PS, Mirza DF. Colorectal cancer after orthotopic liver transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Oct; 56 (1): 147–153. doi: 10.1016/j.critrevonc.2004.12.013.
12. Sagastagoitia-Fornie M, Morán-Fernández L, Blázquez-Bermejo Z, Díaz-Molina B, Gómez-Bueno M, Almenar-Bonet L et al. Incidence and Prognosis of Colorectal Cancer After Heart Transplantation: Data From the Spanish Post-Heart Transplant Tumor Registry. *Transpl Int*. 2023 May 19; 36: 11042. doi: 10.3389/ti.2023.11042.
13. Федянин МЮ, Ачкасов СИ, Болотина ЛВ, Гладков ОА, Глебовская ВВ, Гордеев СС и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению рака ободочной кишки и ректосигмоидного соединения. *Злокачественные опухоли*. 2021; 11 (3s2-1): 330–372. *Fedyanin MYu, Achkasov SI, Bolotina LV, Gladkov OA, Glebovskaya VV, Gordeev SS i dr. Prakticheskie rekomendatsii po lekarstvennomu lecheniyu raka obodochnoy kishki i rektosigmoidnogo soedineniya. Zlokachestvennyye opukholi*. 2021; 11 (3s2-1): 330–372. doi: 10.18027/2224-5057-2021-11-3s2-22.
14. Andrisani G, Soriani P, Manno M, Pizzicannella M, Pugliese F, Mutignani M et al. Colo-rectal endoscopic full-thickness resection (EFTR) with the over-the-scope device (FTRD®): A multicenter Italian experience. *Dig Liver Dis*. 2019 Mar; 51 (3): 375–381. doi: 10.1016/j.dld.2018.09.030.
15. Aepli P, Criblez D, Baumeler S, Borovicka J, Frei R. Endoscopic full thickness resection (EFTR) of colorectal neoplasms with the Full Thickness Resection Device (FTRD): Clinical experience from two tertiary referral centers in Switzerland. *United European Gastroenterol J*. 2018 Apr; 6 (3): 463–470. doi: 10.1177/2050640617728001.

*Статья поступила в редакцию 12.02.2024 г.
The article was submitted to the journal on 12.02.2024*

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-34-41

АЗИГОПОРТАЛЬНОЕ РАЗОБЩЕНИЕ ИЛИ КОМБИНАЦИЯ НЕСЕЛЕКТИВНЫХ β -БЛОКАТОРОВ С ЭНДОСКОПИЧЕСКИМ ЛИГИРОВАНИЕМ ВАРИКОЗНЫХ ВЕН ПИЩЕВОДА В ЦЕЛЯХ ПРОФИЛАКТИКИ ПОВТОРНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ У БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ, ОЖИДАЮЩИХ ТРАНСПЛАНТАЦИЮ

Р.В. Коробка^{1, 2}, С.В. Готье^{3, 4}, Ю.В. Хоронько², В.Д. Пасечников^{1, 5}, А.М. Шаповалов¹, М.В. Малеванный^{1, 2}, Е.С. Пак^{1, 2}, Д.В. Пасечников⁵, Е.В. Тадиева^{1, 2}

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

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

⁴ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Российская Федерация

⁵ ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, Российская Федерация

Цель: сравнить эффективность операции азигопортального разобщения (АПР) и комбинации эндоскопического лигирования варикозных узлов (ЭЛВУ) с неселективными β -блокаторами (НСББ) в профилактике повторных кровотечений (ПК) из варикозных вен пищевода (ВВП). Сравнить частоту развития кровотечений из варикозных узлов (ВУ) желудка после этих манипуляций у больных с декомпенсированным циррозом печени (ЦП), включенных в лист ожидания (ЛО) трансплантации печени (ТП). **Материалы и методы.** Пациентам с декомпенсированным ЦП проведена профилактика ПК посредством операции АПР или комбинации ЭЛВУ с НСББ. **Результаты.** Не было отмечено значимых различий в клинических, лабораторных, демографических параметрах, показателях MELD-Na и классов ЦП по Child–Turcotte–Pugh (СТР), частотах обнаружения ВУ среднего и большого размера в подгруппах пациентов с различными методами профилактики ПК. В период ожидания ТП, в течение 2 лет от начала проведения профилактики кровотечений, не было отмечено ни одного эпизода ПК из ВВП у больных с декомпенсированным ЦП, подвергшихся операции АПР. В те же сроки в группе больных, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ, развитие ПК из ВВП произошло в 100% случаев. Методом Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,0001$) между долями пациентов без развития ПК из ВВП в группах, подвергшихся операции АПР и комбинации ЭЛ с НСББ. В то же время у больных, подвергшихся операции АПР, в 48,1% случаев развились кровотечения из ВУ желудка, которые отсутствовали в 100% случаев у больных, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ. Методом Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,0001$) между долями пациентов без развития кровотечений из ВУ желудка в группах, подвергшихся процедуре ЭЛ в комбинации с приемом НСББ и операции АПР.

Ключевые слова: лист ожидания трансплантации печени, повторные кровотечения из варикозов пищевода, кровотечения из варикозов желудка, эндоскопическое лигирование варикозных узлов, неселективные β -блокаторы, азигопортальное разобщение.

Для корреспонденции: Пасечников Виктор Дмитриевич. Адрес: 355017, Ставрополь, ул. Авиационная, 21. Тел. (962) 447-75-13. E-mail: passetchnikov@mail.ru

Corresponding author: Victor Pasechnikov. Address: 21, Aviatzionnaya str., Stavropol, 355017, Russian Federation. Phone: (962) 447-75-13. E-mail: passetchnikov@mail.ru

AZYGOPORTAL DISCONNECTION OR A COMBINATION OF NON-SELECTIVE BETA-BLOCKERS AND ENDOSCOPIC VARICEAL LIGATION TO PREVENT RECURRENT BLEEDING IN PATIENTS WITH CIRRHOSIS AWAITING TRANSPLANTATION

R.V. Korobka^{1, 2}, S.V. Gautier^{3, 4}, Yu.V. Khoronko², V.D. Pasechnikov^{1, 5}, A.M. Shapovalov¹, M.V. Malevanny^{1, 2}, E.S. Pak^{1, 2}, D.V. Pasechnikov⁵, E.V. Tadiyeva^{1, 2}

¹ Rostov Regional Clinical Hospital, Rostov-on-Don, Russian Federation

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

³ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

⁴ Sechenov University, Moscow, Russian Federation

⁵ Stavropol State Medical University, Stavropol, Russian Federation

Objective: to compare the efficacy of azygoportal disconnection (APD) surgery and a combination between endoscopic variceal ligation (EVL) and non-selective beta-blockers (NSBBs) in the prevention of recurrent variceal bleeding (RVB). To compare the incidence of gastric variceal bleeding (GVB) after these manipulations in patients with decompensated cirrhosis waitlisted for liver transplantation (LTx). **Materials and methods.** Patients with decompensated cirrhosis underwent RVB prophylaxis by APD surgery or by a combination of EVL and NSBBs. **Results.** There were no significant differences in clinical, laboratory, demographic parameters, MELD-Na and Child–Turcotte–Pugh (CTP) scores, and frequencies of medium- and large-sized varicose veins among subgroups of patients with different RVB prophylaxis methods. Patients with decompensated cirrhosis who underwent APD surgery did not experience any RVB episodes during the LTx waiting period, which lasted two years from the start of bleeding prophylaxis. In the same period, RVB occurred in 100% of cases in the EVL plus NSBBs group. Using the Kaplan–Meier method with the Log-Rank test, a significant difference ($p = 0.0001$) was found between the proportions of non-RVB patients in the APD and EVL + NSBBs groups. In the meantime, 48.1% of patients who had APD surgery developed GVB, while 100% of cases in EVL + NSBBs group did not. The Kaplan–Meier method with the Log-Rank test revealed a significant difference ($p = 0.0001$) between the proportion of non-GVB patients in EVL + NSBBs and APD groups.

Keywords: liver transplant waiting list, recurrent variceal bleeding, gastric variceal bleeding, endoscopic variceal ligation, nonselective beta-blockers, azygoportal disconnection.

ВВЕДЕНИЕ

Переход компенсированной стадии цирроза печени (ЦП) к декомпенсированной, являясь показанием для включения в лист ожидания трансплантации печени (ЛО ТП) [1], сопровождается развитием клинически значимой стадии портальной гипертензии (КЗПГ), при которой ведущей причиной летальности среди больных, ожидающих ТП, являются кровотечения из варикозных вен пищевода (ВВП) [1–3]. Известно, что после первого эпизода кровотечения из ВВП существует высокая вероятность развития повторного кровотечения (ПК) в течение 2–3 дней после стабилизации состояния пациента, достигающая частоты вплоть до 60% в течение недели, в случае если не проводятся мероприятия по профилактике этого осложнения КЗПГ [4, 5]. Установлено, что вторичная профилактика ПК, проводимая этой категории пациентов, не исключает риска их развития у 60% пациентов в течение 1 года [6] и у 29–57% в течение двух лет после первого эпизода кровотечения [7].

Для профилактики развития ПК из ВВП экспертами Baveno VII рекомендована «терапия первой линии», включающая процедуру эндоскопического лигирования варикозных узлов (ЭЛ ВУ) в комбинации с традиционными неселективными β -блокаторами (НСББ) или карведилолом [1], а в случае непереносимости медикаментозной терапии или противопоказаний для проведения ЭЛ предлагается использование любого из компонентов этой комбинации. В качестве терапии «второй линии» совет экспертов рекомендует имплантацию внутрипеченочного портосистемного шунта (TIPS) [1].

Несмотря на то что имплантация TIPS эффективно снижает уровень КЗПГ, предупреждая ПК, использование этого подхода рассматривается как этап к последующему проведению ТП вследствие рецидива ПК за счет блока стента [8] и последующего развития портосистемной печеночной энцефалопатии (ПЭ) [9].

Наряду с имплантацией TIPS в целях профилактики кровотечений из ВВП предложена операция

азигопортального разобщения (АПР) в различных модификациях [10, 11]. Нами ранее показана высокая эффективность операции АПР в профилактике кровотечений из ВВП у пациентов, ожидающих ТП [12].

Цель: сравнить эффективность операции АПР и комбинации ЭЛВУ с НСББ в профилактике ПК из ВВП. Сравнить частоту развития кровотечений из ВУ желудка после этих манипуляций у больных с декомпенсированным ЦП, включенных в ЛО, ожидающих ТП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В сравнительное ретроспективное исследование нами включено 177 пациентов с декомпенсированным ЦП, находившихся в ЛОТП в период с 2016-го по 2023 г., имевших в анамнезе как минимум один эпизод кровотечения из ВВП.

Критерии включения: наличие ≥ 1 кровотечения из ВВП у больных с декомпенсированным ЦП во время пребывания в ЛОТП, вирусный (HBV- или HCV-ассоциированной этиологии), алкогольный, или смешанной этиологии (алкогольно-вирусный) ЦП, полная абстиненция, подтвержденная заключениями наркологов как минимум в течение 3 месяцев до включения в ЛОТП больных с алкогольной этиологией ЦП, В и С классы ЦП по классификации Child–Turcotte–Pugh (СТР).

Критерии исключения: гепатоцеллюлярный рак или другие опухоли, инфекционные заболевания, тромбоз портальной вены (ТПВ), противопоказания к применению НСББ (брадиаритмия, бронхиальная астма, обструктивная болезнь легких), сахарный диабет.

Первую группу пациентов, включенных в исследование, составили 150 пациентов с развившимся первым эпизодом кровотечения, подвергшиеся процедуре ЭЛ в комбинации с приемом НСББ. При неудаче терапии первой линии при профилактике повторных кровотечений (эндоскопическое лигирование в комбинации с приемом неселективных бета-блокаторов) после стабилизации состояния больного вследствие состоявшегося кровотечения 27 пациентам в плановом порядке проводили АПР.

Все параметры, включенные для последующего анализа из непрерывно обновляющейся электронной базы данных пациентов (демографические, клинические и лабораторные показатели), были получены после одобрения исследования локальным этическим комитетом. Наблюдение за пациентами, включающее повторные исследования лабораторных показателей, последующий контроль назначения медикаментозной терапии, осуществлялось специалистами Центра хирургии и координации донорства Ростовской областной клинической больницы.

При включении пациентов в ЛОТП проводили обследование, включающее лабораторные и инс-

трументальные исследования, кратность которых при стабильном состоянии больных (клинические и биохимические анализы крови, показатели гемостаза, расчет индекса MELD-Na и класса поражения печени по СТР) равнялась 3 месяцам, а УЗИ органов брюшной полости – 6 месяцам. При развитии нестабильного состояния больных лабораторные и инструментальные исследования проводились по показаниям.

Скрининг ВУ с высоким риском кровотечения из ВВП (ВУ среднего и большого размера) у всех пациентов проводили посредством ЭГДС в соответствии с Рекомендациями комитета экспертов Baveno VI [13] и Всемирной ассоциации гастроэнтерологов (WGO) [14].

Выраженность контролируемого диуретиками асцита определяли с помощью критериев экспертов International Ascites Club (IAC) [15]. Для диагностики асцита, резистентного к терапии мочегонными средствами, использовали критерии экспертов IAC [15], а также шкалу CIRAS [16], включающую клинические (отсутствие ответа на прием мочегонных средств, увеличение количества жидкости в брюшной полости) и лабораторные (показатель концентрации Na в плазме крови < 125 ммоль/л) критерии. В случае набора 5–6 баллов по этой шкале диагноз «асцит, резистентный к терапии диуретиками» считался вполне определенным [16].

Пациенты с ответом на терапию получали мочегонные средства; больным с асцитом, резистентным к терапии мочегонными препаратами, проводили парацентез.

После внутривенной аналгезии (седации) пациентам стандартным способом с использованием набора для перевязки ВУ и видеоэзофагогастроуденоскопа проводилась процедура ЭЛ. Лигирование ВУ проводили в проксимальном направлении, начиная с зоны желудочно-пищеводного соединения. Количество используемых резиновых лигатур варьировало от 2 до 4 – определялось размерами ВУ. Процедуру ЭЛ проводили с целью облитерации всех ВУ, соответствующих критериям проведения неотложной терапии [13, 14]. Проведение повторных ЭГДС с кратностью 3 месяца служило методом контроля, и в случае обнаружения новых ВУ процедура ЭЛ повторялась до полной облитерации новых ВУ.

Для проведения операции АПР под тотальной внутривенной анестезией по стандартной методике выполняли верхнесрединную лапаротомию. С целью адекватной визуализации кардиального отдела желудка и абдоминального отдела пищевода пищеводно-желудочный переход низводили вместе с клетчаткой. Выделяли блуждающий нерв. Выполняли селективную проксимальную ваготомию. Осуществляли мобилизацию дна желудка и ретроперитонеальной части кардии с пересечением сосу-

дов желудочно-селезеночной связки и ветвей левых желудочных артерии и вены. На протяжении 6–8 см выше кардиального жома с выделением, перевязкой и пересечением всех коллатералей выделяли абдоминальный отдел пищевода, после чего осуществляли его полное пересечение на расстоянии 2–3 см от пищеводно-желудочной выемки. Используя линейный сшивающий аппарат, выполняли резекцию части кардии, обращенной к пищеводу, отступив 4–5 см от пищеводно-желудочного угла. Вторым рядом серозно-мышечных швов укрепляли линию аппаратного шва культи желудка. Тело желудка сопоставляли с пищеводом путем перемещения его культи в направлении печени. Далее формировали новый связочный аппарат путем фиксации пищевода к ножкам диафрагмы двумя швами-связками. На передней стенке тела желудка визуальным образом определяли наименее васкуляризованную зону, где следующим этапом формировали двухрядный эзофагогастроанастомоз (ЭГА) прецизионным швом мононитью ПДС 5/0. Затем формировали арефлюксную кардию: пищевод и зону ЭГА оборачивали дном желудка, которое подшивали и фиксировали узловыми серозно-мышечными швами к переднебоковым поверхностям пищевода и к правой и левой ножкам диафрагмы, ближе к их грудной части. Далее одиночными серозно-мышечными швами дно желудка фиксировали к большой кривизне и передней стенке ниже ЭГА, чем завершали формирование арефлюксной кардии.

Анализ полученных данных проведен посредством пакета статистической программы IBM SPSS Statistics (версия 23). Тип распределения полученных переменных величин исследуемых выборок определен с помощью критерия Колмогорова–Смирнова и уровня значимости Лилефорса. В случае обнаруже-

ния нормального типа распределения переменных величин последующий анализ включал вычисление средних арифметических значений (M) и определение стандартного отклонения (SD). Значимость различий между сравниваемыми величинами определяли по t-критерию Стьюдента, используя значение $p < 0,05$ в качестве критерия. Определение медианы (Me) с интерквартильным размахом (IQR – интервал между 25-м и 75-м процентилями) использовали для последующего анализа переменных величин при типе распределения, отличного от нормального. Для определения значимости различий при проведении парных сравнений зависимых переменных использовали критерий Уилкоксона, применяемый в непараметрическом анализе; при проведении сравнения независимых переменных – Хи-квадрат Пирсона. Для сравнения переменных при выборке малого размера использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий). Для проведения дисперсионного анализа применяли ANOVA-тест. Таблицы сопряженности использовали в анализе качественных параметров – частот переменных и их долей (%); для выборок малых размеров использовали точный тест Фишера в целях оценки значимости взаимосвязи между двумя переменными.

Пропорции пациентов без наступившего ПК в сравниваемых группах определяли методом Каплана–Майера. Значимость различий между сравниваемыми кривыми (пропорциями пациентов) определяли посредством вычисления логарифмического критерия [Log-Rank (Mantel-Cox)].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 представлены демографические, клинические, лабораторные показатели, величины показателя индекса MELD-Na в группах больных, под-

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей пациентов, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ, и пациентов, подвергшихся операции АПР (нормальное распределение и распределение, отличающееся от нормального)

Comparative characteristics of EVL + NSBBs and APD patients (normal and non-normal distribution)

Показатель	ЭЛ + НСББ (n = 150), M ± SD	АПР (n = 27), M ± SD	Достоверность различий
Нормальное распределение (M ± SD)			
Возраст	49,76 ± 11,02	52,34 ± 10,89	p > 0,05
Гемоглобин, г/л	89,96 ± 12,04	87,67 ± 11,99	p > 0,05
Лейкоциты, ×10 ⁹ /л	3,46 ± 1,13	3,79 ± 1,75	p > 0,05
Тромбоциты, ×10 ⁹ /л	89,35 ± 34,45	93,56 ± 42,23	p > 0,05
Альбумин плазмы, г/л	31,12 ± 3,21	30,45 ± 2,89	p > 0,05
MELD-Na	22,01 ± 3,11	21,92 ± 3,14	p > 0,05
Распределение, отличающееся от нормального (Me; IQR)			
МНО	1,92 (1,65–2,10)	1,90 (1,62–2,12)	p > 0,05
Билирубин, мкмоль/л	86,5 (66,50–115,00)	84,0 (62,50–112,50)	p > 0,05
Креатинин, мкмоль/л	110,2 (97,5–128,20)	109,4 (98,5–122,25)	p > 0,05
Na, ммоль/л	136,8 (132,0–140,5)	135,2 (128,5–142,5)	p > 0,05
СТР (баллы)	12,00 (8,00–14,50)	11,00 (8,50–14,00)	p > 0,05

вергшихся процедуре ЭЛ в комбинации с приемом НСББ или подвергшихся операции АПР в период ожидания ТП.

В табл. 2 представлены данные гендерного состава, а также этиологии ЦП, класса СТР и степени выраженности ВУ у пациентов, подвергшихся ЭЛ в комбинации с приемом НСББ или подвергшихся операции АПР.

Сравниваемые группы (табл. 1 и 2) были однородны по демографическим, клиническим и лабораторным показателям, а также по величинам индексов MELD-Na, классам В и С по СТР, частоте ВУ среднего (2-й степени) и большого (3-й степени) размера.

В период ожидания ТП в течение 2 лет от начала проведения профилактики кровотечений у больных, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ, ПК развились у всех пациентов (100%). В период ожидания ТП в течение 2 лет от начала проведения профилактики кровотечений не было отмечено ни одного эпизода ПК из ВВП у больных с декомпенсированным ЦП, подвергшихся операции АПР.

Методом Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,0001$) между долями пациентов без развития ПК из ВВП в группах, подвергшихся операции АПР и комбинации ЭЛ с НСББ (рис. 1).

Таблица 2

Сравнительная характеристика клинических и гендерных показателей пациентов, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ, и пациентов, подвергшихся операции АПР

Comparison of clinical and gender characteristics of EVL + NSBBs and APD patients

Показатель	ЭЛ + НСББ (n = 150)	АПР (n = 27)	Достоверность различий
Мужской пол	85 (56,6%)	15 (55,6%)	$p > 0,05$
Вирусная этиология ЦП	72 (48,0%)	13 (48,1%)	$p > 0,05$
Алкогольная этиология ЦП	39 (26,0%)	8 (29,6%)	$p > 0,05$
Другая этиология ЦП	39 (26,0%)	6 (22,3%)	$p > 0,05$
ВУ, степень 2	40 (26,6%)	7 (25,9%)	$p > 0,05$
ВУ, степень 3	110 (73,4%)	20 (74,1%)	$p > 0,05$
СТР, класс А	4 (2,7%)	1 (3,7%)	$p > 0,05$
СТР, класс В	37 (24,7%)	7 (25,9%)	$p > 0,05$
СТР, класс С	109 (72,6%)	19 (70,4%)	$p > 0,05$

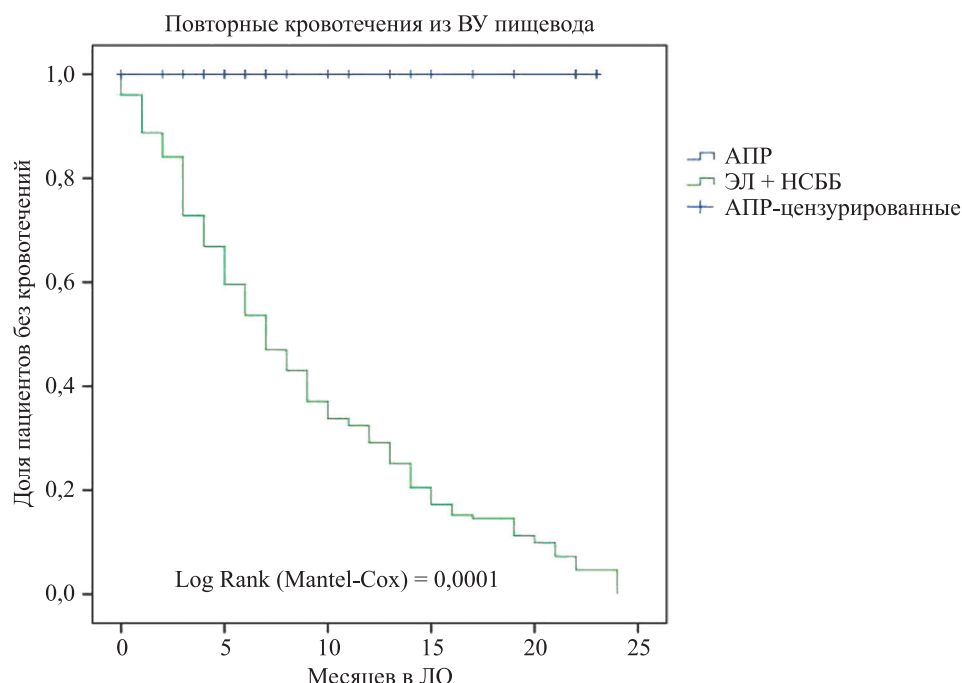


Рис. 1. Пропорции пациентов без развития ПК, подвергшихся операции АПР или ЭЛ в комбинации с НСББ (метод Каплана–Майера с Log-Rank-критерием)

Fig. 1. Proportions of non-RVB patients who underwent APD surgery or received EVL + NSBB therapy (Kaplan–Meier method with Log-Rank test)

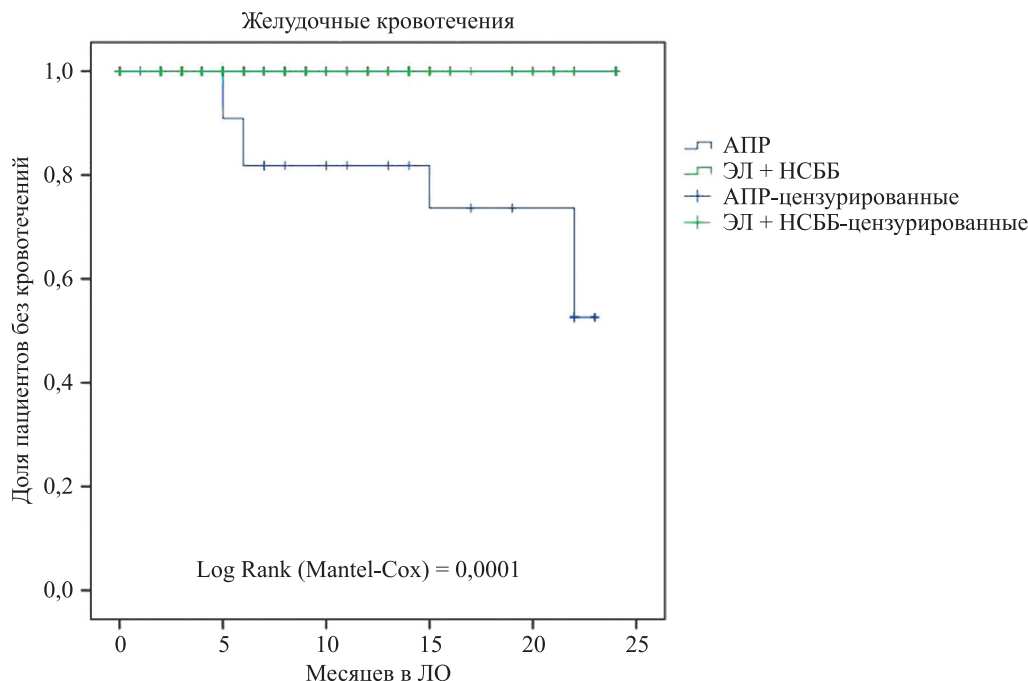


Рис. 2. Пропорции пациентов без развития кровотечений из ВУ желудка, подвергшихся операции АПР или ЭЛ в комбинации с НСББ (метод Каплана–Майера с Log-Rank-критерием)

Fig. 2. Proportions of patients with no gastric variceal bleeding who underwent APD surgery or received EVL + NSBB therapy (Kaplan–Meier method with Log-Rank test)

В то же время у больных, подвергшихся операции АПР, в 48,1% случаев развились кровотечения из ВУ желудка, которые отсутствовали в 100% случаев у больных, подвергшихся процедуре ЭЛВУ в комбинации с приемом НСББ. Методом Каплана–Майера с определением Log-Rank-критерия было установлено значимое различие ($p = 0,0001$) между долями пациентов без развития кровотечений из ВУ желудка в группах, подвергшихся операции АПР или процедуре ЭЛ в комбинации с приемом НСББ (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Соответственно рекомендациям экспертов вторичная профилактика ПК из ВВП осуществляется посредством процедуры ЭЛ в сочетании с приемом традиционных НСББ или карведилола (терапия 1-й линии) [1]. В нашем исследовании показана высокая частота ПК у пациентов, ожидавших ТП в течение 24 месяцев, которым проводилась вторичная профилактика посредством использования терапии первой линии (ЭЛ в комбинации с приемом НСББ). Развитие ПК на фоне этой стратегии профилактики началось уже с первых недель от проведения процедуры ЭЛ в комбинации с приемом НСББ и продолжилось вплоть до 24 месяцев (100% случаев). По данным Garcia-Tsao et al. [6], риск развития ПК в течение года составляет 60%, несмотря на проводимую профилактику кровотечений.

Установлено, что главным фактором риска развития ПК из ВВП является рост градиента внутрипеченочного портального давления (ГПВД) [17]. Liu et al. [18] установлено, что главной причиной развития ПК являлся рост ГПВД, достигающий высоких цифр (≥ 25 мм рт. ст.). Авторы исследования отметили, что ни ЭЛ, ни прием НСББ, ни комбинация ЭЛ с приемом НСББ не обеспечивали надежной профилактики ПК из ВВП. Это вполне объяснимо следующими фактами. Во-первых, установлено, что процедура ЭЛВУ не влияет на рост ГПВД при прогрессии КЗПГ [19], во-вторых, прием НСББ не обеспечивает желаемого снижения уровня этого показателя [20]. Незначительный уровень снижения ГПВД при использовании пропранолола (10,1–23,2%) и карведилола (18,6–27,7%) [20], возможно, связан с отсутствием ответа на прием этих препаратов у части пациентов [20, 21].

Мы полагаем, что наличие респондеров и нон-респондеров на НСББ среди пациентов с КЗПГ обуславливает снижение эффективности вторичной профилактики ПК с помощью процедуры ЭЛ в сочетании с приемом β -блокаторов. Установлено, что частота ПК у нон-респондеров значительно превышает аналогичный показатель у респондеров острого гемодинамического ответа на использование пропранолола [22].

Нами установлено отсутствие ПК из ВВП в течение 2 лет ожидания ТП у больных с декомпенсированным ЦП, подвергшихся операции АПР. Операцию

АПР проводили в соответствии с оригинальной методикой (патент РФ № 2412657 от 27.02.2011) [11]. Ранее нами было показано успешное использование этой операции в профилактике ПК из ВВП с отсутствием рецидивов кровотечений в течение 3 лет [23].

Однако, несмотря на отсутствие ПК из ВВП в течение 2 лет, в настоящем исследовании показано развитие кровотечений из ВУ желудка, которое составило 48,1% случаев в указанные сроки наблюдения. В то же время использование процедуры ЭЛ в комбинации с приемом НСББ не привело к развитию кровотечений из ВУ желудка ни в одном случае.

Различие в частоте кровотечений из ВУ желудка при использовании ЭЛ в комбинации с приемом НСББ и при выполнении АПР, на наш взгляд, объясняется динамикой ГПВД после этих инвазивных вмешательств. Abraldes et al. [19] установлено, что выполнение ЭЛ не влияет на рост ГПВД, а Sinagra et al. [20] установили незначительное снижение ГПВД после терапии пропранололом или карведилолом. В то же время операция АПР, обуславливая разобщение портокавальных связей и уменьшая приток крови к варикозно расширенным венам кардиоэзофагеальной области, не обеспечивает снижение ГПВД и может осложняться развитием кровотечений из ВУ желудка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Операция АПР является эффективным методом профилактики ПК из ВВП в случае невозможности провести альтернативное лечение, включая имплантацию TIPS или ТП.

После выполнения АПР необходимо проведение повторных ЭГДС с целью ранней диагностики вновь развившихся ВУ в желудке с последующей процедурой ЭЛ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. De Franchis R, Bosch J, Garcia-Tsao G, Reiberger T, Ripoll C; Baveno VII Faculty. Baveno VII – Renewing consensus in portal hypertension. *J Hepatol*. 2022; 76 (4): 959–974. PMID: 35120736. doi: 10.1016/j.jhep.2021.12.022.
2. Liu L, Nie Y, Liu Q, Zhu X. A Practical Model for Predicting Esophageal Variceal Rebleeding in Patients with Hepatitis B-Associated Cirrhosis. *Int J Clin Pract*. 2023 Aug 3; 2023: 9701841. doi: 10.1155/2023/9701841.
3. Коробка ВЛ, Пак ЕС, Шаповалов АМ, Кострыкин МЮ, Ткачев АВ. Оценка четырехлетнего ведения листа ожидания трансплантации печени Ростовской области: перспективы снижения смертности в листе. *Медицинский вестник Юга России*. 2019; 10 (3): 32–39. Korobka VL, Pak ES, Shapovalov AM, Kostrykin MYu, Tkachev AV. Analysis of four-year management of the waiting list for liver transplantation in Rostov region: prospects for reducing mortality of candidates listed for liver transplantation. *Medical Herald of the South of Russia*. 2019; 10 (3): 32–39. [In Russ, English abstract]. doi: 10.21886/2219-8075-2019-10-3-32-39.
4. Garcia-Tsao G, Bosch J. Varices and Variceal Hemorrhage in Cirrhosis: A New View of an Old Problem. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015; 13: 2109–2117. doi: 10.1016/j.cgh.2015.07.012.
5. Asghar S, Mustafa J, Rehman HU, Farooq MK, Waheed MU, Shahid S. Predictors Of Re-Bleeding After Oesophageal Variceal Banding In Cirrhotic Patients At 4 Weeks. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2023 Feb-Mar; 35 (1): 99–103. PMID: 36849386.
6. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: Risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the study of liver diseases. *Hepatology*. 2017; 65: 310–335. doi: 10.1002/hep.28906.
7. Lv Y, Qi X, He C, Wang Z, Yin Z, Niu J et al. Covered TIPS versus endoscopic band ligation plus propranolol for the prevention of variceal rebleeding in cirrhotic patients with portal vein thrombosis: a randomised controlled trial. *Gut*. 2018 Dec; 67 (12): 2156–2168. doi: 10.1136/gutjnl-2017-314634.
8. Bucsics T, Schoder M, Goeschl N, Schwabl P, Mandorfer M, Diermayr M et al. Rebleeding rates and survival after early transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) in clinical practice. *Dig Liver Dis*. 2017 Dec; 49 (12): 1360–1367. doi: 10.1016/j.dld.2017.08.002.
9. Bodzin AS, Baker TB. Liver Transplantation Today: Where We Are Now and Where We Are Going. *Liver Transpl*. 2018 Oct; 24 (10): 1470–1475. doi: 10.1002/lt.25320.
10. Назыров ФГ, Девятков АВ, Бабаджанов АХ, Салимов УР. Эволюция технологий азигопортального разобщения в профилактике кровотечений портального генеза. *Анналы хирургической гепатологии*. 2018; 23 (1): 65–73. Nazyrov FG, Devyatov AV, Babadzhanov AKh, Salimov UR. Evolution of Azigoportal Disassociation Technologies in Prevention of Bleedings of Portal Genesis. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of HPB surgery*. 2018; 23 (1): 65–73. [In Russ, English abstract]. doi: 10.16931/1995-5464.2018165-73.
11. Коробка ВЛ, Шаповалов АМ, Данильчук ОЯ, Коробка РВ. Способ хирургического лечения и профилактики рецидива кровотечений при варикозном расширении вен пищевода и кардиального отдела желудка. *Патент на изобретение RU 2412657 C1*, 27.02.2011. Заявка № 2009128518/14 от 23.07.2009. Korobka VL, Shapovalov AM, Danil'chuk OYa, Korobka RV. Sposob khirurgicheskogo lecheniya i profilaktiki retsidiva krvotечeniya pri varikoznom rasshirenii ven pishchevoda i kardial'nogo otdela zheludka. Patent na izobretenie RU 2412657 C1, 27.02.2011. Zayavka № 2009128518/14 ot 23.07.2009.
12. Коробка ВЛ, Кострыкин МЮ, Шаповалов АМ. Лечение кровотечений из варикозно расширенных вен

- пищевода у больных из листа ожидания трансплантации печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (4): 58–64. Korobka VL, Kostykin MYu, Shapovalov AM. Management of variceal bleeding in the liver transplant waiting list. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (4): 58–64. [In Russ, English abstract]. doi: 10.15825/1995-1191-2020-4-58-64.
13. De Franchis R, Baveno VI Faculty. Expanding consensus in portal hypertension: Report of the Baveno VI Consensus Workshop: Stratifying risk and individualizing care for portal hypertension. *J Hepatol*. 2015; 63: 743–752. doi: 10.1016/j.jhep.2015.05.022.
 14. Варикозное расширение вен пищевода. Практические рекомендации Всемирной гастроэнтерологической организации. Esophageal Varices. Practice Guideline of World Gastroenterology Organisation. Available at: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/esophageal-varices-russian-2014.pdf>.
 15. Moore KP, Wong F, Gines P, Bernardi M, Ochs A, Salerno F et al. The management of ascites in cirrhosis: report on the consensus conference of the International Ascites Club. *Hepatology*. 2003; 38 (1): 258–266. doi: 10.1053/jhep.2003.50315.
 16. Gantzel RH, Aagaard NK, Vilstrup H, Watson H, Grønbaek H, Jepsen P. Development and validation of the Cirrhotic Ascites Severity model-A patient-reported outcome-based model to predict 1-year mortality. *Hepatol Commun*. 2022 Nov; 6 (11): 3175–3185. doi: 10.1002/hep4.2065.
 17. Zhang M, Wang G, Zhao L, Wu Z, Zhang W, Zhang C. Second prophylaxis of variceal bleeding in cirrhotic patients with a high HVPG. *Scand J Gastroenterol*. 2016 Dec; 51 (12): 1502–1506. doi: 10.1080/00365521.2016.1193218.
 18. Liu J, Shi Q, Xiao S, Zhou C, Zhou B, Yuan F et al. Using transjugular intrahepatic portosystemic shunt as the first-line therapy in secondary prophylaxis of variceal hemorrhage. *J Gastroenterol Hepatol*. 2020 Feb; 35 (2): 278–283. doi: 10.1111/jgh.14761.
 19. Abrales JG, Villanueva C, Bañares R, Aracil C, Catalina MV, Garcí A-Pagán JC, Bosch J; Spanish Cooperative Group for Portal Hypertension and Variceal Bleeding. Hepatic venous pressure gradient and prognosis in patients with acute variceal bleeding treated with pharmacologic and endoscopic therapy. *J Hepatol*. 2008 Feb; 48 (2): 229–236. doi: 10.1016/j.jhep.2007.10.008.
 20. Sinagra E, Perricone G, D'Amico M, Tinè F, D'Amico G. Systematic review with meta-analysis: the haemodynamic effects of carvedilol compared with propranolol for portal hypertension in cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014 Mar; 39 (6): 557–568. doi: 10.1111/apt.12634.
 21. Hofer BS, Simbrunner B, Bauer DJM, Paternostro R, Schwabl P, Scheiner B et al. Acute hemodynamic response to propranolol predicts bleeding and nonbleeding decompensation in patients with cirrhosis. *Hepatol Commun*. 2022 Sep; 6 (9): 2569–2580. doi: 10.1002/hep4.2021.
 22. La Mura V, Abrales JG, Raffa S, Retto O, Berzigotti A, García-Pagán JC, Bosch J. Prognostic value of acute hemodynamic response to i.v. propranolol in patients with cirrhosis and portal hypertension. *J Hepatol*. 2009 Aug; 51 (2): 279–287. Epub 2009 May 24. PMID: 19501930. doi: 10.1016/j.jhep.2009.04.015/.
 23. Шаповалов АМ, Коробка ВЛ, Черкасов МФ. Способ хирургического лечения и профилактики кровотечений из варикозных вен пищевода и желудка. *Медицинский вестник Юга России*. 2015; (3): 112–115. Shapovalov AM., Korobka VL., Cherkasov MF. The method of surgical treatment and prophylaxis of bleeding from variceal of the esophagus and stomach. *Medical Herald of the South of Russia*. 2015; (3): 112–115. [In Russ, English abstract]. doi: 10.21886/2219-8075-2015-3-112-115.

Статья поступила в редакцию 11.04.2024 г.
The article was submitted to the journal on 11.04.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-42-47

ВАСКУЛОПАТИЯ ТРАНСПЛАНТАТА СЕРДЦА – СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Б.Л. МIRONKOV, Д.Д. УВАРОВА, Н.Н. КОЛОСКОВА, Ю.В. САПРОНОВА, И.И. МУМИНОВ, А.А. ЮСОВА, С.А. САХОВСКИЙ

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

Коронарная патология пересаженного сердца является одной из основных причин дисфункции трансплантата и его потери. Своевременная диагностика и лечение васкулопатии пересаженного сердца позволяют увеличить выживаемость трансплантата и улучшить прогноз для реципиентов сердца. В данном обзоре представлены актуальные данные по проблеме васкулопатии трансплантата сердца, его патогенезу и основным факторам, влияющим на течение данного заболевания.

Ключевые слова: васкулопатия трансплантата сердца, трансплантация сердца.

CARDIAC ALLOGRAFT VASCULOPATHY: CURRENT REVIEW

B.L. Mironkov, D.D. Uvarova, N.N. Koloskova, Yu.V. Sapronova, I.I. Muminov, A.A. Yusova, S.A. Sakhovsky

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

Transplant coronary artery disease (TCAD) is one of the main causes of graft dysfunction and graft loss. Early diagnosis and treatment of cardiac allograft vasculopathy (CAV) can increase graft survival and improve the prognosis for heart transplant recipients. This review presents current data on the problem of CAV, its pathogenesis and the main factors influencing the course of this disease.

Keywords: cardiac allograft vasculopathy, heart transplantation.

Ежегодно в мире выполняется около 6000 трансплантаций сердца. В России в 2022 г. выполнено 308 трансплантаций сердца, в том числе 10 трансплантаций детям [1]. Ожидаемая продолжительность жизни после трансплантации составляет около 12,5 года [2]. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца (БКАПС) представляет собой комплексное иммунно-воспалительное заболевание, при котором возникает ускоренное фибропролиферативное поражение коронарного русла трансплантата, характеризующееся на начальных этапах диффузной гиперплазией интимы, с последующим негативным ремоделированием сосудов. БКАПС – ведущая причина смерти у реципиентов сердца, на которую приходится примерно 10% смертей в течение 3 лет после трансплантации [3]. Для реципиентов, у которых быстро прогрессирующая БКАПС была выявлена в течение первого года после трансплантации, значимо

выше частота смерти и/или повторной трансплантации в течение 5 лет.

Исходя из современных представлений о патогенезе БКАПС, для ее профилактики используют статины и иммуносупрессивные препараты. Профилактика инфекций у пациентов с трансплантированным сердцем также является важным фактором предотвращения БКАПС [4].

ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ БКАПС

Иммунологические факторы развития БКАПС являются начальным звеном патологического процесса. Взаимодействие «чужих» человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA) эндотелиальных клеток аллотрансплантата с Т-лимфоцитами реципиента инициирует активацию эндотелиальных клеток и накопление воспалительных клеток. Это приводит к секреции цитокинов (интерлейкины 2, 4, 5 и 6;

Для корреспонденции: Саховский Степан Анатольевич. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (926) 636-00-31. E-mail: milifolium@gmail.com.

Corresponding author: Stepan Sakhovsky. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (926) 636-00-31. E-mail: milifolium@gmail.com

интерферон-гамма; фактор некроза опухоли альфа), пролиферации и активации молекул эндотелиальной адгезии. Активированные макрофаги накапливаются в интиму и секретируют цитокины (интерлейкины 1 и 6, ФНО-альфа) и факторы роста. В результате это вызывает миграцию гладкомышечных клеток в интиму, пролиферацию и отложение внеклеточного матрикса. HLA-антитела класса I способствуют пролиферации эндотелиальных и гладкомышечных клеток посредством активации пути mTOR и индукции экспрессии внутриклеточного рецептора фактора роста фибробластов [5]. Различные внутриклеточные частицы: цитоплазма, митохондрии и ядра клеток, которые также обнаруживаются во внеклеточном матриксе в пересаженных органах, приводят к воспалительным процессам даже при отсутствии патогенов [6]. Лин и др. показали важность этого явления, продемонстрировав, что внеклеточные митохондрии многочисленны в крови мертвых донорских органов и что их избыток соответствует быстрому отторжению трансплантата [7]. Повреждение и активация эндотелия вызывают высвобождение провоспалительных цитокинов, хемокинов и экспрессию молекул адгезии, что способствует рекрутированию иммунных клеток и трансмиграции иммунных клеток в интиму [8, 9].

Как врожденный, так и приобретенный иммунитет играют важную роль как при атеросклерозе, так и при БКАПС. И хотя пусковые механизмы эндотелиального повреждения и эндотелиальной дисфункции могут различаться при БКАПС и атеросклерозе, после активации эндотелия происходящие патологические процессы сходны при этих двух заболеваниях.

Неиммунные факторы, ассоциированные с риском БКАПС, включают пожилой возраст (доноров и реципиентов), мужской пол, инфекции, дислипидемию, ожирение, диабет, ишемическую болезнь сердца (ИБС), причину смерти мозга донора, условия консервации и транспортировки органов, хирургическую травму и ишемически-реперфузионное повреждение. Гиперлипидемия и инсулин-резистентность являются наиболее значимыми неиммунными факторами, встречающимися у 50–80% пациентов, перенесших трансплантацию сердца [10, 11].

ЦМВ-инфекция была связана с повышенным риском БКАПС [12]. Увеличивая синтез ингибитора синтеза оксида азота, асимметричного диметиларгинина, ЦМВ приводит к эндотелиальной дисрегуляции и влияет на синтез оксида азота. Химическое сходство между ЦМВ и поверхностью эндотелиальных клеток может приводить к перекрестной реактивности [7, 8]. Однако недавние исследования не выявили связи между максимальным утолщением интимы в течение первого года, оцененным с помощью внутрисосудистого ультразвукового исследования (ВСУЗИ), и наличием ЦМВ-инфекции [13]. Причина смерти мозга

донора имеет значение для успеха трансплантации. Смерть мозга вызывает тяжелое поражение сердца вследствие повышенной продукции катехоламинов, эндокринных и гемодинамических нарушений, что приводит к гипоперфузии органов и последующему ишемически-реперфузионному повреждению после трансплантации. Кроме того, механизм смерти донорского мозга оказывает существенное влияние на результаты трансплантации сердца, при этом травматическая смерть мозга связана со снижением смертности, отторжения, васкулопатии аллотрансплантата и трансмиссивного атеросклероза [14]. По результатам наблюдений НМИЦ ТИО установлена ассоциация вероятности трансмиссии коронарного атеросклероза от возрастных доноров и доноров с острым нарушением мозгового кровообращения [15]. Ишемически-реперфузионное повреждение, вызванное хирургической травмой, приводит к образованию большого количества активных форм кислорода (АФК), которые непосредственно вызывают повреждение сосудов и активацию эндотелия [16].

Следует отметить, что с точки зрения патологической анатомии БКАПС имеет разнообразные морфологические проявления. Wei-hui Lu et al. опубликовали исследование [17], в котором оценивали патологоанатомические находки в эксплантированном сердце у пациентов, перенесших ретрансплантацию по поводу дисфункции трансплантата.

В исследовании оценивались архивные документы и микроскопические срезы сердец 64 пациентов: 54 взрослых (от 18 до 70 лет) и 10 детей (от 3 до 15 лет). Поражения сосудов были классифицированы как проявления фибромускулярной гиперплазии интимы, атеросклероза или воспаления.

В общей сложности в 75% сердец имелись признаки острого клеточного отторжения, преимущественно легкой степени. Поражения интрамиокардиальных артерий проявлялись преимущественно фибромускулярной гиперплазией и воспалением интимы без атером. Поражения эпикардиальных коронарных артерий представляли собой фиброзно-мышечную гиперплазию интимы, атеросклероз и воспаление, затрагивающее один или несколько сосудистых слоев (интима, медиа и адвентиция). Тяжелая БКАПС с сужением просвета >75% наблюдалась хотя бы в одном сосуде во всех сердцах. В двух сердцах наблюдалось тяжелое стенозирование ствола левой коронарной артерии. Девятнадцать артерий имели внутрисосудистые тромбы. Во всех сердцах наблюдалось сужение более мелких эпикардиальных ветвей коронарных артерий, часто выраженное. Атеромы присутствовали в артериях взрослых и детей; таким образом, не все атеромы можно считать существовавшими ранее до трансплантации. И в артериях, и в венах наблюдалась гиперплазия и воспаление интимы.

Таким образом, БКАПС является патологически многофакторным заболеванием, поражающим крупные и мелкие эпикардальные коронарные артерии взрослых и детей, с различными типами поражения: интимальной фибромускулярной гиперплазией; атеросклерозом; воспалением (васкулитом).

По данным патанатомических исследований, проводившихся в НМИЦ ТИО, васкулопатия трансплантированного сердца в проксимальных отделах коронарного русла представляла собой сочетание ускоренного атеросклероза и хронического отторжения [18–23].

Но несмотря на множество проявлений БКАПС, в настоящее время используется классификация, разработанная Международным обществом трансплантации сердца и легких (ISHLT), которая основана преимущественно на ангиографических критериях (табл. 1) [24].

БКАПС и коронарный атеросклероз нативных артерий имеют как общие, так и различные черты. При этом присутствие различных факторов риска приводит к различным типам повреждения сосудов сердечных аллотрансплантатов. Например, гиперлипидемия, диабет и курение являются факторами риска, общими для атеросклеротических заболеваний и БКАПС. При наличии этих факторов риска в сосудах трансплантата развиваются поражения, сходные с атеросклеротическими. С другой стороны, аллоантиген-зависимые факторы риска (количество анти-HLA антител, количество эпизодов отторжения) и ЦМВ-инфекция с большей вероятностью связаны с такими изменениями, как эндотелиит и артериит [17].

Хотя некоторые из факторов риска уникальны для БКАПС (ишемически-реперфузионное повреждение донорского органа, возраст донора, качество органов, возраст реципиента, смерть мозга донора, основное несоответствие гистосовместимости), многие из них являются дополнением к остальным (гиперли-

пидемия, диабет, окислительный стресс, гипертензия, модуляция цитокинов, воспаление, С-реактивный белок [СРБ], инфекции, курение) [8, 25, 26]. Сравнительные характеристики этих заболеваний представлены в табл. 2.

Другие факторы, влияющие на течение васкулопатии. Повышенная агрегация тромбоцитов является общепризнанным фактором риска внезапной сердечной смерти и инфаркта миокарда у пациентов с пересаженным сердцем [1]. Раннее лечение аспирином было связано со значительным, до 68%, снижением риска развития сердечно-сосудистых заболеваний в исследовании более 200 реципиентов трансплантата сердца [27].

Статины являются хорошо известными гиполипидемическими и противовоспалительными препаратами [28]. Недавний метаанализ подтвердил положительное влияние статинов на снижение случаев отторжения и увеличение выживаемости у пациентов с трансплантированным сердцем [28]. Фанг и др. изучали антиоксидантную терапию витаминами С и Е для предотвращения эндотелиальной дисфункции при БКАПС. Авторы обнаружили, что антиоксидантная терапия замедляет развитие БКАПС [29]. Ингибиторы кальциневрина (циклоспорин, такролимус) исторически были предпочтительной терапией для поддерживающей иммуносупрессии [30]. Разработка таких соединений, как эверолимус и сиролимус, расширила возможности терапии БКАПС. Было показано, что эверолимус значительно снижает прогрессирование БКАПС при использовании в сочетании с иммуносупрессивной схемой (циклоспорин, такролимус) в течение первого года после трансплантации по сравнению с комбинированным лечением микофенолатом и азатиоприном. С другой стороны, более позднее начало терапии эверолимусом не увеличивает частоту развития васкулопатии. Терапия сиролимусом привела к уменьшению частоты острого отторжения трансплантата и развития васкулопатий

Таблица 1

Система классификации для ангиографических признаков БКАПС

Comparative characteristics of TCAD and atherosclerosis

Степень	Ангиографические критерии
ISHLT CAV 0 (васкулопатия незначимая)	Ангиографических изменений не выявлено
ISHLT CAV 1 (легкая)	Стеноз ствола ЛКА <50%, основных ветвей <70% или любой ветви <70% (включая диффузное сужение) без дисфункции трансплантата
ISHLT CAV 2 (умеренная)	Стеноз ствола ЛКА >50%, основных ветвей >70% или любой ветви второго порядка >70% без дисфункции трансплантата
ISHLT CAV 3 (выраженная)	Стеноз ствола ЛКА >50%, двух и более основных ветвей >70% или любой ветви второго порядка >70% во всех трех основных бассейнах; или ISHLT CAV 1, или ISHLT CAV 2 в сочетании с дисфункцией трансплантата (определяемая как ФИЛЖ <45%, обычно в сочетании с нарушением локальной сократимости ЛЖ), или признаки значимой рестриктивной диастолической дисфункции

Таблица 2

**Сравнительная характеристика болезни коронарных артерий пересаженного сердца
и атеросклероза коронарных артерий**

Comparative characteristics of TCAD and atherosclerosis

Признак	БКАПС	Атеросклероз
Вовлечение сосудов	Поражаются эпикардимальные и интрамуральные артерии	Поражаются крупные эпикардимальные артерии
	Диффузное и очень обширное поражение сосудов в комбинации с эпикардимальной локализацией	В значительной степени поражаются проксимальные эпикардимальные коронарные артерии. Интрамиокардимальные сосуды и артерии под мышечными мостиками обычно не повреждены
	Также могут быть вовлечены вены	Вены никогда не вовлекаются
	Медия может быть как не затронута, так и почти полностью заменена фиброзной тканью. По мере прогрессирования поражения интимы увеличивается и фиброз меди и адвентиции	Вовлечены все слои сосудистой стенки
Характер поражения	Диффузное, концентрическое утолщение интимы	Очаговые, эксцентрические пролиферативные и дегенеративные поражения интимы проксимальных коронарных сосудов
	Варьируется от концентрических, диффузных поражений интимы до распространенных фибро-жировых бляшек с дегенерацией	Преимущественно фибро-жировые бляшки с некротическими углублениями и прогрессивно истонченной фиброзной покрывкой
Начало и прогрессирование заболевания	Первоначально проявляется пролиферацией ГМК в интимае и накоплением внеклеточных липидов	Первоначально проявляется жировыми полосами
	Ускоренное прогрессирование пролиферации интимы и стенозирование просвета на ранней стадии заболевания с развитием пенистых клеток	Характерно медленное прогрессирование поражения (десятилетия)
	Поверхностная эрозия эндотелия не характерна, но может быть редкой находкой	Характерна эрозия эндотелия
	Истончение фиброзной капсулы и разрыв бляшки встречаются редко	Тонкая фиброзная капсула и разрыв бляшки часто наблюдаются при поражениях средней и высокой степени тяжести

по сравнению с ингибиторами кальциневрина. Существуют данные, свидетельствующие о том, что сиролимус способен ингибировать развитие БКАПС, даже если прием препарата начат после дебюта заболевания [31]. Эти препараты, однако, нуждаются в дальнейшей оценке при приеме в сочетании с более современными иммунодепрессантами, такими как такролимус [4, 17]. Следует отметить, что их использование может быть ограничено у некоторых пациентов из-за высокой частоты побочных эффектов, которые включают инфекции, перикардимальный выпот и замедленное заживление ран [31].

К сожалению, эти меры не оказали большого влияния на 5- и 10-летнюю заболеваемость БКАПС за последние 20 лет наблюдений (32–30 и 52–49% соответственно) [16]. Кроме того, для реципиентов, у которых БКАПС выявлена в течение 3 лет после трансплантации, 5-летняя выживаемость остается практически такой же, как и 20 лет назад (28–22%) [16]. Эти данные подчеркивают, что лечение реципиента трансплантированного сердца на данном этапе сильно ограничено потребностью в более чувствительных инструментах для раннего вы-

явления БКАПС, чтобы эффективное лечение для предотвращения или замедления ее прогрессирования могло быть начато в наиболее ранние сроки.

Недавно были проведены исследования, направленные на выявление потенциальных мишеней для иммунологического лечения, в основном с использованием моноклональных антител, чтобы в итоге заменить существующие терапевтические иммунодепрессанты [32]. Основной целью иммуномодуляции в контексте БКАПС было ингибирование или подавление преимущественно Т-клеточной активности в отношении аллотрансплантата [4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца является одной из основных причин, ограничивающих функциональную выживаемость трансплантата. Имея сложный генез, многофакторность, данная проблема требует дальнейшего изучения, не только иммунного вклада в патогенез васкулопатии, но и классических факторов атерогенеза. Особое внимание заслуживают инфекционные агенты (ЦМГ), своевременное выявление и влияние на которых мо-

жет улучшить прогноз для данной категории пациентов. Несмотря на то что васкулопатия трансплантата сердца манифестирует в среднем на 3–5-й год после операции трансплантации сердца, первые признаки могут появляться и в течение первого года, что в свою очередь является неблагоприятным предиктором. Данное обстоятельство требует своевременной коррекции иммуносупрессивной терапии и более тщательного контроля течения данного заболевания. Несмотря на невозможность использования у всех пациентов современных иммуносупрессивных препаратов (эверолимус), их более широкое внедрение в терапевтические схемы лечения может улучшить прогноз для реципиентов сердца. Коррекция классических факторов атеросклероза также является важной частью лечения реципиентов сердца.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2022 году. XV сообщение регистра Российского трансплантологического общества. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (3): 8–30. Gautier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2022. 15th Report from the Registry of the Russian Transplant Society. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2023; 25 (3): 8–30. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-8-30>.
2. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, Harhay MO, Hayes D Jr, Hsich E et al. The international thoracic organ transplant registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-sixth adult heart transplantation report – 2019. *J Heart Lung Transplant*. 2019; 38 (10): 1056–1066. doi: 10.1016/j.healun.2019.08.004.
3. Shah KS, Kittleson MM, Kobashigawa JA. Updates on Heart Transplantation. *Curr Heart Fail Rep*. 2019 Oct; 16 (5): 150–156. doi: 10.1007/s11897-019-00432-3.
4. Shetty M, Chowdhury YS. Heart Transplantation Allograft Vasculopathy. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
5. Lee F, Nair V, Chih S. Cardiac allograft vasculopathy: Insights on pathogenesis and therapy. *Clin Transplant*. 2020 Mar; 34 (3): e13794. doi: 10.1111/ctr.13794.
6. Spitaleri G, Farrero Torres M, Sabatino M, Potena L. The pharmaceutical management of cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2020; 21 (11): 1367–1376.
7. Spartalis M, Spartalis E, Siasos G. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: Pathophysiology, detection approaches, prevention, and treatment management. *Trends Cardiovasc Med*. 2022 Aug; 32 (6): 333–338. doi: 10.1016/j.tcm.2021.07.002.
8. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*. 2006 Oct 13; 99 (8): 801–815. doi: 10.1161/01.RES.0000246086.93555.f3.
9. Hu D, Yin C, Luo S, Habenicht AJR, Mohanta SK. Vascular Smooth Muscle Cells Contribute to Atherosclerosis Immunity. *Front Immunol*. 2019 May 17; 10: 1101. doi: 10.3389/fimmu.2019.01101.
10. Doulamis IP. Editorial commentary: Cardiac allograft vasculopathy: Caveats and perspectives. *Trends Cardiovasc Med*. 2022; 32 (6): 339–340. doi: 10.1016/j.tcm.2021.07.007.
11. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца. Под ред. В.И. Шумакова. М.: МИА, 2008; 160. *Bolezn' koronarnykh arteriy peresazhennogo serdtsa*. Pod red. V.I. Shumakova. M.: MIA, 2008; 160. [Electronic resource]. <https://www.centrmag.ru/catalog/product/bolezn-koronarnykh-arterij-peresazhennogo-serdca/> (accessed: 17.10.2023).
12. Alyaydin E, Welp H, Reinecke H, Tuleta I. Predisposing factors for late mortality in heart transplant patients. *Cardiol J*. 2021; 28 (5): 746–757. doi: 10.5603/CJ.a2020.0011.
13. Guzik B, Szczepanek E, Niewiara Ł, Nosal M, Wierzbicki K, Krzanowski M et al. Coronary revascularization after heart transplant – the search for prognostic factors. *Arch Med Sci*. 2020 Apr 18; 16 (4): 789–795. doi: 10.5114/aoms.2017.71847.
14. Foroutan F, Alba AC, Guyatt G, Duero Posada J, Ng Fat Hing N, Arseneau E et al. Predictors of 1-year mortality in heart transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2018 Jan; 104 (2): 151–160. doi: 10.1136/heartjnl-2017-311435.
15. Саховский СА, Изотов ДА, Гончарова АЮ, Колоскова НН, Миронков БЛ. Коронарный атеросклероз донорского сердца. Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний». 2021; S2: 166. *Sakhovskiy SA, Izotov DA, Goncharova AY, Koloskova NN, Mironkov BL. Koronarnyy ateroskleroz donorskogo serdtsa. Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem «Kompleksnyye problemy serdechno-sosudistykh zabolevaniy»*. 2021; S2: 166. <https://cyberleninka.ru/article/n/koronarnyy-ateroskleroz-donorskogo-serdtsa> (дата обращения: 12.01.2024).
16. Stehlik J, Kobashigawa J, Hunt SA, Reichenspurner H, Kirklin JK. Honoring 50 Years of Clinical Heart Transplantation in Circulation: In-Depth State-of-the-Art Review. *Circulation*. 2018 Jan 2; 137 (1): 71–87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029753.
17. Lu WH, Palatnik K, Fishbein GA, Lai C, Levi DS, Perrens G et al. Diverse morphologic manifestations of cardiac allograft vasculopathy: a pathologic study of 64 allograft hearts. *J Heart Lung Transplant*. 2011 Sep; 30 (9): 1044–1050. doi: 10.1016/j.healun.2011.04.008.
18. Можейко НП. Патоморфология трансплантированного сердца: дис. ... докт. мед. наук. М., 2020; 171. *Mozheyko NP. Patomorfologiya transplantirovannogo serdtsa: dis. ... dokt. med. nauk. M., 2020; 171*. [Elec-

- tronic resource]. https://freereferats.ru/product_info.php?products_id=691983 (accessed: 17.10.2023).
19. Муминов ИИ, Колоскова НН, Попцов ВН, Захаре-вич ВМ, Можейко НП, Саховский СА, Шевченко АО. Опыт амбулаторного наблюдения реципиентов после трансплантации сердца в НМИЦ ТИО имени академика В.И. Шумакова. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (3): 68–75. Muminov II, Koloskova NN, Poptsov VN, Zakharevich VM, Mozheiko NP, Sakhovsky SA, Shevchenko AO. Experience of outpatient follow-up of heart transplant recipients at Shumakov center. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (3): 68–75. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-3-68-75>.
20. Саховский СА, Уварова ДД, МIRONKOV БЛ. Течение коронарной патологии у реципиентов сердца с гемодинамически не значимым трансмиссивным атеросклерозом. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (S): 46. Sakhovskiy SA, Uvarova DD, Mironkov BL. Tечenie koronarnoy patologii u retsipientov serdtsa s gemodinamicheski ne znachimym transmissivnym aterosklerozom. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (S): 46.
21. Саховский СА, Колоскова НН, Изотов ДА, Спирина ЕА, Гончарова АЮ, Лучкин ВМ, МIRONKOV БЛ. Оценка продолжительности жизни реципиентов сердца с трансмиссивным атеросклерозом коронарных артерий. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (4): 14–19. Sakhovsky SA, Koloskova NN, Izotov DA, Spirina EA, Goncharova AYU, Luchkin VM, Mironkov BL. Life expectancy of heart recipients with donor-transmitted coronary atherosclerosis. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (4): 14–19. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2019-4-14-19>.
22. Честухин ВВ, Остроумов ЕН, Тюняева ИЮ, Захаре-вич ВМ и др. Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца. Возможности диагностики и лечения. *Очерки клинической трансплантологии*. Под ред. С.В. Готье. М., 2009: 88–93. Chestukhin VV, Ostroumov EN, Tyunyaeva IYu, Zakharevich VM i dr. Bolezn' koronarnykh arteriy peresazhennogo serdtsa. Vozmozhnosti diagnostiki i lecheniya. *Ocherki klinicheskoy transplantologii*. Pod red S.V. Gautier. M., 2009: 88–93.
23. Готье СВ, Шевченко АО, Попцов ВН. Пациент с трансплантированным сердцем: руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.–Тверь: Триада, 2014; 144. Gautier SV, Shevchenko AO, Poptsov VN. Patsient s transplantirovannym serdtsem: rukovodstvo dlya vrachey po vedeniyu patsientov, perenessikh transplanciacию сердца. М.–Tver': Triada, 2014; 144.
24. Velleca A, Shullo MA, Dhital K, Azeka E, Colvin M, De-Pasquale E et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2023 May; 42 (5): e1–e141. doi: 10.1016/j.healun.2022.10.015.
25. Raichlin E, Bae JH, Kushwaha SS, Lennon RJ, Prasad A, Rihal CS, Lerman A. Inflammatory burden of cardiac allograft coronary atherosclerotic plaque is associated with early recurrent cellular rejection and predicts a higher risk of vasculopathy progression. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Apr 14; 53 (15): 1279–1286. doi: 10.1016/j.jacc.2008.12.041.
26. Pighi M, Gratta A, Marin F, Bellamoli M, Lunardi M, Fezzi S et al. Cardiac allograft vasculopathy: Pathogenesis, diagnosis and therapy. *Transplant Rev (Orlando)*. 2020 Oct; 34 (4): 100569. doi: 10.1016/j.ttre.2020.100569.
27. Peled Y, Lavee J, Raichlin E, Katz M, Arad M, Kassif Y et al. Early aspirin initiation following heart transplantation is associated with reduced risk of allograft vasculopathy during long-term follow-up. *Clin Transplant*. 2017 Dec; 31 (12). doi: 10.1111/ctr.13133.
28. Vallakati A, Reddy S, Dunlap ME, Taylor DO. Impact of Statin Use After Heart Transplantation: A Meta-Analysis. *Circ Heart Fail*. 2016 Oct; 9 (10): e003265. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.116.003265.
29. Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, Hikiti H, Wainstein M, Behrendt D et al. Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet*. 2002 Mar 30; 359 (9312): 1108–1113. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08154-0.
30. Mallah SI, Atallah B, Moustafa F, Naguib M, El Hajj S, Bader F, Mehra MR. Evidence-based pharmacotherapy for prevention and management of cardiac allograft vasculopathy. *Prog Cardiovasc Dis*. 2020 May-Jun; 63 (3): 194–209. doi: 10.1016/j.pcad.2020.03.007.
31. Masetti M, Potena L, Nardoza M, Prestinenzi P, Taglieri N, Saia F et al. Differential effect of everolimus on progression of early and late cardiac allograft vasculopathy in current clinical practice. *Am J Transplant*. 2013 May; 13 (5): 1217–1226. doi: 10.1111/ajt.12208.
32. Bellumkonda L, Patel J. Recent advances in the role of mammalian target of rapamycin inhibitors on cardiac allograft vasculopathy. *Clin Transplant*. 2020 Jan; 34 (1): e13769. doi: 10.1111/ctr.13769.

Статья поступила в редакцию 07.02.2024 г.
The article was submitted to the journal on 07.02.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-48-50

МОСТ К ЛЕЧЕНИЮ РАКА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ: ИМПЛАНТАЦИЯ УСТРОЙСТВА ПОДДЕРЖКИ ФУНКЦИИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПЕРЕД ХИРУРГИЧЕСКИМ ЛЕЧЕНИЕМ РАКА ЖЕЛУДКА

К.Г. Ганаев¹, С.К. Курбанов¹, Э.Е. Власова¹, Е.В. Дзыбинская¹, Р.С. Латыпов¹,
К.В. Мершин¹, И.С. Стилиди², А.А. Ширяев¹, Р.С. Акчурин¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии

имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Одновременное наличие хронической сердечной недостаточности и злокачественного новообразования становится все более распространенным по мере увеличения продолжительности жизни населения. Отсутствие структурированного подхода к лечению онкологических пациентов, имеющих тяжелую сердечно-сосудистую патологию, является актуальной проблемой. До 25% онкологических больных не могут быть прооперированы по основному профилю болезни по причине наличия у них сердечно-сосудистого заболевания. В данной статье описан клинический случай успешного лечения пациента с двумя конкурирующими (прогноз определяющими) заболеваниями: терминальной сердечной недостаточностью и раком желудка в рамках стратегии «мост к лечению рака».

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, механическая поддержка кровообращения, мост к лечению рака.

BRIDGE TO CANCER THERAPY IN PATIENTS WITH CHRONIC HEART FAILURE: IMPLANTATION OF A LEFT VENTRICULAR ASSIST DEVICE BEFORE SURGICAL TREATMENT OF GASTRIC CANCER

K.G. Ganaev¹, S.K. Kurbanov¹, E.E. Vlasova¹, E.V. Dzybinskaya¹, R.S. Latypov¹,
K.V. Mershin¹, I.S. Stilidi², A.A. Shiryaev¹, R.S. Akchurin¹

¹ National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russian Federation

² Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow, Russian Federation

The co-occurrence of chronic heart failure (CHF) and cancer is becoming more and more common as people live longer. The lack of a structured approach to the treatment of cancer patients with severe cardiovascular conditions is an essential issue. Up to 25% of cancer patients cannot be operated on for their main disease profile due to the presence of cardiovascular disease. This article describes a clinical case of successful treatment of a patient with two competing (prognosis-determining) diseases: end-stage heart failure and stomach cancer within the framework of a bridge-to-cancer strategy.

Keywords: chronic heart failure, mechanical circulatory support, bridge to cancer therapy.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые и онкологические заболевания являются ведущими причинами смерти в Рос-

сийской Федерации. Внедрение новых методов диагностики и лечения, увеличение продолжительности жизни населения закономерно приводит к росту

Для корреспонденции: Ганаев Камил Гаджимурадович. Адрес: 121552, Москва, ул. Академика Чазова, д. 15а. Тел. (999) 979-50-70. E-mail: dr_ganaev@mail.ru

Corresponding author: Kamil Ganaev. Address: 15a, Akademika Chazova str., Moscow, 121552, Russian Federation. Phone: (999) 979-50-70. E-mail: dr_ganaev@mail.ru

количества пациентов с одновременным развитием сердечной недостаточности (СН) и злокачественных новообразований. До 25% онкологических больных не могут быть прооперированы по основному профилю болезни по причине наличия сердечно-сосудистой патологии, при этом пациенты с терминальной сердечной недостаточностью подвержены крайне высокому риску неблагоприятных исходов во время лечения онкологического заболевания из-за сниженной сократительной функции миокарда и ограниченных резервов сердца.

«Золотым стандартом» лечения терминальной СН остается трансплантация сердца (ТС). В то же время онкологическое заболевание с неблагоприятным прогнозом жизни является одним из противопоказаний к пересадке сердца. Современные устройства длительной механической поддержки левого желудочка (LVAD) показали улучшение выживаемости и качества жизни по сравнению с оптимальной медикаментозной терапией и сопоставимую с ТС выживаемость. LVAD-терапия может стать ценным вариантом поэтапного лечения больных с операбельным раком в рамках стратегии bridge-to-cancer treatment (с англ. – «мост к лечению рака»).

Цель – продемонстрировать случай успешного лечения пациента с двумя конкурирующими (прогноз определяющими) заболеваниями: терминальной сердечной недостаточностью и раком желудка в рамках стратегии bridge-to-cancer treatment.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Пациент П., 45 лет, с жалобами на пароксизмальную одышку. Из семейного анамнеза: смерть матери в возрасте 46 лет (ДКМП), смерть отца в возрасте 52 лет (инфаркт миокарда). Из анамнеза болезни известно, что в 17 лет обнаружена лимфома Ходжкина; в 1996–1997 году проведены лучевая терапия, химиотерапия. По данным серии ПЭТ КТ – стойкая ремиссия. Дебют одышки в 2018 году с постепенным прогрессированием, в том же году обследован, проводилась КАГ: гемодинамически значимых стенозов нет, выставлен диагноз «ДКМП с развитием бивентрикулярной сердечной недостаточности». Поступил в НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова в сентябре 2022 года. Выполнено обследование, по данным ЭхоКГ: КДР – 9,0 см, ФВ – 20%, МР – 3-я ст., ФВ ПЖ – 53%, TAPSE – 2,4 см; КАГ: субтотальный стеноз ПНА в проксимальном сегменте; КПОС: ДЛА (сист./диаст./средн.) – 22/6/12 мм рт. ст., СИ – 1,9 л/мин·м², УО – 63 мл, ЛСС (PVR) – 78 дин/см·с⁻⁵.

На основании данных жалоб, анамнеза и лабораторно-инструментального обследования выставлен диагноз: «Дилатационная кардиомиопатия. Приобретенный порок сердца: относительная недостаточность митрального клапана умеренной степени тяжести. Хроническая сердечная недостаточность

со сниженной фракцией выброса, I ФК по НУНА. Ишемическая болезнь сердца: стенокардия III ФК. Атеросклероз аорты и коронарных артерий (субтотальный стеноз проксимального сегмента ПНА), мышечный мостик среднего сегмента ПНА. Нарушение ритма и проводимости сердца: частая желудочковая экстрасистолия, короткие пароксизмы желудочковой тахикардии; блокада передней ветви левой ножки пучка Гиса. Сопутствующий: лимфома Ходжкина с поражением шейно-подчелюстных лимфоузлов, 2-я стадия, ЛТ (5 курсов) от 1996 г., ХТ (6 курсов) от 1997 г.».

В рамках дообследования выполнена ФГДС: по передней стенке с/3 и н/3 тела желудка выявлен участок измененной слизистой по типу инфильтрации. По данным биопсии участка слизистой желудка – high grade дисплазия слизистой оболочки желудка. Консультирован онкологом, по результатам обследования выставлен диагноз «рак тела желудка T3N2M0, IIIA ст.», пациенту показано радикальное хирургическое вмешательство, однако выполнение операции на фоне терминальной сердечной недостаточности сопряжено с крайне высокими рисками летального исхода. Проведена консультация в центре трансплантологии: трансплантация сердца противопоказана по причине наличия онкологического заболевания с неблагоприятным прогнозом. Принято решение о проведении хирургического лечения в два этапа. Первым этапом (в рамках стратегии bridge to cancer treatment – «мост к лечению рака») запланирована имплантация устройства механической поддержки кровообращения (устройство HeartMate 3™) с одномоментным коронарным шунтированием (маммаро-коронарное шунтирование передней нисходящей артерии). Вторым этапом запланировано радикальное лечение рака желудка.

В октябре 2022 г. выполнена имплантация левожелудочковой центрифугальной системы вспомогательного кровообращения HeartMate 3™. Послеоперационные показатели ЭхоКГ: КДР – 8,0 см, МР – 2-я ст., СДЛА – 22 мм рт. ст., СИ – 2,7 л/мин·м². Параметры работы системы: Pump flow – 4,4, Pump speed – 5200 об./мин, PI – 4,0, Pump power – 3,8. На 4-е сутки после имплантации отмечалась компенсация явлений СН. Больной выписан и отправлен на второй этап – радикальное лечение рака желудка – на 21-е сутки после имплантации HeartMate 3™. В декабре 2022 г. госпитализирован в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, где была проведена операция: гастрэктомия, лимфодиссекция D2, спленэктомия, резекция хвоста поджелудочной железы. Операция прошла успешно. Экстубация и активизация в стандартные сроки. Явлений сердечной недостаточности на фоне имплантированного прибора HeartMate 3™ не отмечалось. Пациент выписан из стационара на 23-е сутки после

операции в удовлетворительном состоянии. Период наблюдения после операции составляет 12 месяцев. Пациент трудоспособен, достаточно активен, полностью соблюдает все рекомендации. Дистанция ТШХ составляет 402 метра. Параметры EQ-5D-5L: мобильность – 2, самообслуживание – 2, обычная активность – 2, боль/дискомфорт – 1, тревога/депрессия – 2, VAS Health Perception – 75.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование современных устройств механической поддержки кровообращения демонстрирует высокую эффективность и безопасность у больных с терминальной ХСН, сопоставимую с результатами трансплантации сердца в течение 2 лет после операции [1]. Имплантация HeartMate 3™ рассматривается в качестве окончательной терапии (destination therapy) и в качестве альтернативы трансплантации сердца. Учитывая ограничения в трансплантации сердца у операбельных больных со злокачественными образованиями, этапное хирургическое лечение с имплантацией устройства механической поддержки кровообращения, в частности HeartMate 3™, с последующим радикальным лечением онкологического заболевания представляется оптимальным.

Мировой опыт такого способа лечения ограничен, в литературе представлены единичные публикации. Важно выделить техническую сложность хирургического лечения злокачественных образований брюшной полости, что связано с расположением кабеля питания в передней брюшной стенке. В 2017 году Y. Nakamura et al. впервые продемонстрировали возможность успешного оперативного вмешательства по поводу рака желудка с хирургическим доступом через лапаротомию у больного с LVAD [2]. В следующем году E. Zarbaliyev et al. опубликовали схожую работу с описанием успешного клинического случая гастрэктомии по поводу рака желудка на 20-е сутки после имплантации LVAD [3].

В обоих случаях, описанных в литературе, рак был диагностирован после имплантации LVAD. Наш случай отличается верификацией диагноза злокачественного образования в предоперационном периоде. По нашему мнению, наличие операбельного злокачественного образования может быть дополнитель-

ным аргументом в пользу имплантации устройства механической поддержки кровообращения. Мы ожидаем, что в будущем подход этапного хирургического вмешательства у больных с терминальной ХСН и операбельным злокачественным образованием будет использоваться чаще, а также может быть закреплён в клинических рекомендациях для определенной категории больных.

ВЫВОДЫ

Наш случай показывает возможность оказания поэтапной хирургической помощи онкологическим пациентам с крайне высокими рисками летального исхода ввиду терминальной сердечной недостаточности. Имплантируемая система левожелудочкового обхода HeartMate3™ демонстрирует высокую непосредственную эффективность в поддержке системной гемодинамики на фоне приемлемого профиля безопасности. Хирургическое лечение злокачественной онкологии может быть безопасно выполнено на фоне LVAD-поддержки в рамках стратегии bridge-to-cancer treatment; необходимо дальнейшее изучение этого перспективного направления.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lim S, Shaw S, Venkateswaran R, Abu-Omar Y, Pettit S, Chue D. HeartMate 3 Compared to Heart Transplant Outcomes in England. *J Heart Lung Transplant*. 2020; 39 (4), P. S15–S16. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.01.1138>.
2. Nakamura Y, Toda K, Nakamura T, Miyagawa S, Yoshikawa Y, Fukushima S et al. Curative surgery for gastric cancer in a patient with an implantable left ventricular assist device. *J Artif Organs*. 2017 Jun; 20 (2): 170–173. doi: 10.1007/s10047-016-0944-3.
3. Zarbaliyev E, Balkanay M, Sarsenov D. Embracing the Future of Surgery: Gastric Cancer Resection Within One Month of Left Ventricular Assist Device Implantation. *Cureus*. 2018 Jun 23; 10 (6): e2868. doi: 10.7759/cureus.2868.

*Статья поступила в редакцию 04.03.2024 г.
The article was submitted to the journal on 04.03.2024*

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-51-57

ОПТИМАЛЬНЫЕ СТРАТЕГИИ ПРОФИЛАКТИКИ ИШЕМИЧЕСКОГО РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СЕРДЦА С ДЛИТЕЛЬНОЙ ХОЛОДОВОЙ ИШЕМИЕЙ ТРАНСПЛАНТАТА (ОБЗОР)

*А.В. Фомичев¹, Г.Б. Гармаев¹, М.О. Жульков¹, И.С. Зыков¹, А.Г. Макаев¹,
А.В. Протопопов¹, А.Р. Таркова¹, М.Н. Муртазалиев¹, Я.М. Смирнов¹, А.Д. Лиманский¹,
А.В. Гусева¹, К.Н. Калдар¹, Д.А. Сирота^{1, 2}*

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

На сегодняшний день проблема недостатка донорских органов остается одной из главных в трансплантологии. Транспортировка донорских органов на значительные расстояния ведет к увеличению времени холодовой ишемии, что повышает риск ишемически-реперфузионных повреждений. Метод и время консервации играют ключевую роль для увеличения пула доноров в условиях критического дефицита. В данной работе проанализирован международный опыт подхода к способам консервации донорских органов, их преимущества и недостатки.

Ключевые слова: кардиоплегия, ишемически-реперфузионное повреждение, трансплантация сердца, аллотрафт.

OPTIMAL STRATEGIES FOR PREVENTION OF ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN HEART TRANSPLANTATION WITH PROLONGED COLD ISCHEMIA TIME (REVIEW)

*A.V. Fomichev¹, G.B. Garmaev¹, M.O. Zhulkov¹, I.S. Zykov¹, A.G. Makaev¹,
A.V. Protopopov¹, A.R. Tarkova¹, M.N. Murtazaliev¹, Ya.M. Smirnov¹, A.D. Limanskiy¹,
A.V. Guseva¹, K.N. Kaldar¹, D.A. Sirota^{1, 2}*

¹ Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russian Federation

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

The shortage of organs for transplant remains a major challenge in transplantology. Transporting donor organs over long distances increases cold ischemia time, which is a risk factor for ischemia-reperfusion injury (IRI). In the face of critical shortages, the method and timing of organ preservation are crucial in increasing the donor pool. This paper examines the approaches, benefits, and drawbacks of organ preservation techniques used around the world.

Keywords: cardioplegia, ischemia-reperfusion injury, heart transplantation, allograft.

ВВЕДЕНИЕ

Пробелы в организации органного донорства в настоящее время остаются основной проблемой

трансплантологии. В условиях критического дефицита донорских органов одним из путей решения является использование не востребуемых органов

Для корреспонденции: Протопопов Андрей Владимирович. Адрес: 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, д. 15. Тел. (914) 708-39-79. E-mail: andrew-uss@yandex.ru

Corresponding author: Andrey Protopopov. Address: 15, Rechkunovskaya str., 630055, Novosibirsk, Russian Federation. Phone: (914) 708-39-79. E-mail: andrew-uss@yandex.ru

из отдаленных регионов. Особенности организации системы органного донорства в России являются большие расстояния между донорскими базами и центрами трансплантации при межрегиональном взаимодействии, преимущественное использование служебного автотранспорта либо гражданской авиации при транспортировке органов, отсутствие «зеленых коридоров». Как следствие – длительная транспортировка и логистические проблемы приводят к увеличению времени холодовой ишемии [1].

Качество сердечного трансплантата обратно пропорционально времени холодной ишемии, а рекомендуемое максимальное время холодовой ишемии донорского сердца составляет 240 минут [2, 3]. Превышение этого безопасного порога увеличивает риск развития послеоперационной дисфункции аллогraftа и смерти. Это становится особенно актуальным при трансплантации сердца от доноров с расширенными критериями, так как такое сердце наиболее чувствительно к воздействию ишемии. При этом количество субоптимальных доноров в России постепенно растет. Трансплантация сердца с длительной холодовой ишемией наиболее характерна для стран Европы, где доля трансплантаций сердца с ишемией более 4 часов составляет более 40% [4].

Во время ишемии снижение доступности кислорода вызывает переход от метаболизма жирных кислот к анаэробному гликолизу. Возникающий в результате лактоацидоз приводит к падению внеклеточного pH до 6,0–6,5. Продолжающийся ацидоз приводит к активации нескольких трансмембранных ионных каналов и рецепторов, каждый из которых способствует перегрузке кальцием, метаболической дисфункции и в конечном счете гибели клеток [5].

Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) донорского органа является основным механизмом нарушения функции трансплантата после длительной транспортировки. При запредельном риске ИРП и первичной дисфункции трансплантата при холодовой ишемии более 4 часов очевидна необходимость усиления защиты миокарда, однако не существует единого мнения об эффективности того или иного метода консервации при продленной ишемии донорского сердца.

В настоящее время в России стандартным методом консервации сердца является перфузия раствором «Кустодиол» с последующим статическим хранением в термоконтейнере со льдом и хладагентами, однако это не в состоянии полностью защитить орган в условиях длительной ишемии [6]. Метаболизм при фармакохолодовой консервации не прекращается в условиях ишемии, энергообеспечение метаболических процессов происходит в анаэробных условиях, что приводит к накоплению лактата и к закислению кардиомиоцитов, возникает метаболический ацидоз. К тому же гистидин – один из основных компонентов

Кустодиола – продемонстрировал цитотоксический эффект [7]. С другой стороны, неконтролируемое снижение температуры трансплантата до критических значений, неравномерное охлаждение сердца приводит к нарушению трансмембранного транспорта электролитов, образованию свободных радикалов, которые повреждают кардиомиоциты, а также процессу кристаллизации ткани. Смерть мозга вызывает каскад гормональных изменений, изменение уровня катехоламинов, высвобождение воспалительных медиаторов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), что приводит к гипотонии и органной гипоперфузии. Гипоперфузия и воспалительная реакция оказывают дополнительное повреждающее действие на трансплантат еще до развития ИРП, поэтому грамотное ведение донора со смертью мозга (кондиционирование) до этапа изъятия не менее важно [2].

Все более широкое использование доноров с расширенными критериями [1], а именно высокой инотропной поддержкой, возрастом более 55 лет, гипертрофией миокарда, трансмиссивным коронарным атеросклерозом, также требует пересмотра стандартного подхода к консервации трансплантата сердца.

Таким образом, актуальность разработки новых стратегий транспортировки и консервации трансплантата очевидна. В настоящее время описаны различные стратегии для дальнейшего улучшения результатов консервации донорского сердца, включая фармакологические, организационные и другие методы, которые могут значительно снизить степень ИРП.

Анализ известных стратегий снижения повреждающего действия ИРП при длительной транспортировке донорского сердца позволяет выделить несколько ключевых аспектов.

Общеизвестно, что при предполагаемой длительной холодовой ишемии целесообразно использовать сердца от доноров молодого возраста. Интересное наблюдение опубликовали Kim et al. [8]. При анализе 43 304 трансплантаций сердца ученые выявили, что при трансплантации сердца с холодовой ишемией более 4 часов лучшие непосредственные и отдаленные результаты показали трансплантации от доноров с ожирением.

ПОВТОРНАЯ ИНFUЗИЯ КОНСЕРВИРУЮЩЕГО РАСТВОРА

В нескольких исследованиях было показано, что применение повторной инфузии консервирующего раствора (кристаллоидная, кровяная кардиоплегия), которая выполняется непрерывно ретроградно или в виде терминальных hot shot, приводит к уменьшению ишемического повреждения органов и сокращению срока пребывания в отделении интенсивной терапии, а также повышению ранней выживаемости после трансплантации [9]. Авторы заключают, что мето-

дика особенно актуальна при использовании сердец от маргинальных доноров и с длительной холодовой ишемией трансплантата. История исследования эффективности повторной кардиopleгии начинается еще с 1990-х гг., когда были проведены первые проспективные исследования в этой области.

В 2 исследованиях использовалась нормотермическая кровяная кардиopleгия, вводимая непосредственно перед завершением окклюзии аорты (терминальный hot shot) [10, 11]. Результаты данных исследований показали, что использование кровяной кардиopleгии было связано с меньшей распространенностью правожелудочковой недостаточности, нарушений сердечного ритма и лабораторных признаков ишемии (снижение уровня КФК, КФК-МВ) в раннем послеоперационном периоде. 12-летние результаты ТС продемонстрировали [12], что использование кровяной кардиopleгии безопасно и приводит к сопоставимой выживаемости и распространенности нежелательных явлений на поздних сроках после ортотопической трансплантации сердца. Также были получены обнадеживающие результаты в отношении снижения частоты хронического отторжения трансплантата и меньшей степени развития болезни коронарных артерий пересаженного сердца у пациентов после кровяной кардиopleгии, однако необходимы более масштабные проспективные исследования в этой области для подтверждения данной гипотезы.

В двух других исследованиях применялась антеградная холодовая кардиopleгия кровью и дополнительный терминальный hot shot теплым кровяным кардиopleгическим раствором. Сначала вводили холодную кристаллоидную кардиopleгию, а как только трансплантат поступал в операционную, вводили холодную кровяную кардиopleгию (Бакберг) каждые 30 мин [13]. Поверхностное охлаждение не применялось. Перед снятием аортального зажима была проведена кардиopleгическая реперфузия теплой кровью. Среднее время ишемии составило 158 минут. Потребность в катехоламинах после трансплантации была в десять раз ниже у пациентов с повторной кровяной кардиopleгией. Также цитологическое исследование трансплантата (через 7 дней) показало более низкую степень ишемического поражения в данной группе пациентов.

Ряд исследований был посвящен использованию непрерывной ретроградной нормотермической кровяной кардиopleгии во время имплантации донорского сердца [14–16]. Было выявлено, что непрерывная нормотермическая кровяная кардиopleгия может приводить к меньшему ишемическому повреждению, по данным патогистологического исследования миокарда, а также в группах с использованием методики непрерывной кровяной кардиopleгии наблюдались более низкие уровни КФК, КФК-МВ, более частое

восстановление спонтанного синусового ритма и более низкая длительность инотропной поддержки.

В одноцентровом ретроспективном исследовании в Швейцарии сравнили результаты ортотопической трансплантации сердца с дополнительной (37 человек) и без дополнительной кардиopleгии (41 человек) [17]. Протокол консервации миокарда был стандартизирован и включал инфузию под низким давлением 2000 мл холодного (4–8 °C) раствора Celsior. В исследуемой группе непосредственно перед имплантацией трансплантата была проведена дополнительная однократная антеградная коронарная инфузия 100 мл кардиopleгического раствора (Cardioplexol™, лаборатория Dr G. Bichsel AG, Унтерзен, Швейцария). Кардиopleксол™ представляет собой готовый раствор на основе калия, магния, прокаина и ксилита. Более частое спонтанное восстановление синусового ритма после снятия зажима с аорты и реперфузии миокарда, более низкое соотношение КФК-МВ/КФК, а также меньшие длительности пребывания в палате интенсивной терапии и госпитализации были выявлены в исследуемой группе.

Анализ доступных публикаций позволяет сделать вывод в пользу назначения повторной или дополнительной инфузии консервирующего раствора в отношении непосредственных результатов трансплантации, особенно если время консервации превышает 240 минут.

ИШЕМИЧЕСКОЕ ПРЕ- И ПОСКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ

Ишемическое и фармакологическое преко́ндиционирование могут быть эффективными способами кардиопротекции вследствие активации митохондриальных АТФ-чувствительных калиевых каналов [18]. M.S. Mozaffari et al. утверждают, что защитный эффект ишемического преко́ндиционирования и постко́ндиционирования связан с уменьшением ИРП посредством регуляции пути фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K)/Akt, которая, в свою очередь, приводит к фосфорилированию и инактивации гликогенсинтазной киназы-3β (GSK-3β), что приводит к уменьшению митохондриальной проницаемости. Также описаны митохондриальные каналы КАТР, активация которых также обеспечивает защиту миокарда.

Эффект преко́ндиционирования был продемонстрирован в исследовании на моделях ортотопической трансплантации сердца у овец. Преко́ндиционирование достигалось кратковременной (5 секунд) окклюзией аорты с последующей 10-минутной реперфузией. После антеградной фармакохолодовой кристаллоидной кардиopleгии (1 литр) выполнялась эксплантация сердца, консервация в течение 2 часов с последующей имплантацией овце-реципиенту. Об-

щее время ишемии составляло 2 часа. Исследование показало, что однократный эпизод прекондиционирования значительно уменьшал оглушение миокарда и повышал уровень АТФ в тканях [19].

В другом исследовании технология дистанционного ишемического кондиционирования применялась сразу после индукции анестезии (прекондиционирование) и через 20 минут после снятия зажима с аорты (посткондиционирование) [20]. Сама технология заключается в создании четырех 5-минутных циклов ишемии правой верхней конечности, индуцированной манжетой, накачанной до 200 мм рт. ст., далее манжета сдувалась. В данном исследовании пациентам контрольной группы было выполнено ложное наложение манжеты на правое плечо без надувания. Образцы крови были собраны для измерения уровня сердечного тропонина I в сыворотке до операции и через 3, 6, 12 и 24 часа после снятия поперечного зажима аорты.

В итоге дистанционное ишемическое пре- и посткондиционирование уменьшали повреждение миокарда через 6 ч после пережатия аорты, однако не было обнаружено доказательств того, что этот способ может улучшить клинические исходы. Технологии пре- и посткондиционирования при трансплантации сердца демонстрируют снижение выраженности повреждения миокарда по лабораторным показателям, однако не было выявлено достоверного влияния на клинические исходы трансплантации. Доступные публикации основаны на небольшом количестве пациентов, ретроспективном анализе. Необходимо детальное исследование механизма технологии и дальнейшие испытания.

КОНСЕРВИРУЮЩИЕ РАСТВОРЫ

Как уже было сказано выше, стандартным методом консервации сердца является перфузия сердца консервирующим раствором с последующим статическим хранением в холодильнике со льдом и хладоагентами. Несмотря на заметные недостатки раствора НТК (Кустодиол), он остается основным консервирующим раствором, используемым в России как при трансплантации сердца, так и при кардиохирургических операциях, предполагающих длительную ишемию миокарда.

В настоящее время для кардиоплегии и консервации донорского сердца разработаны и используются более 167 различных консервирующих растворов. Чаще всего используются раствор гистидин–триптофан–кетоглутарата (НТК), раствор Висконсинского университета (UW) и раствор Celsior [21]. Из-за небольшого количества проведенных трансплантаций сердца не хватает высококачественных рандомизированных клинических исследований для определения влияния консервирующих жидкостей на функцию трансплантата и выживаемость. Таким исследова-

ниям часто не хватает мощностей для определения оптимальных режимов применения этих консервирующих растворов.

Экспериментальные исследования дают противоречивые результаты в отношении эффективности различных консервирующих растворов в сохранении функции сердца при обычной транспортировке со льдом и хладоагентами. По данным некоторых исследований, которые сравнивали UW с раствором Celsior [22], UW продемонстрировал лучшую выживаемость через 30 и 90 дней после трансплантации. У реципиентов, получавших неоптимальные аллотрансплантаты, определяемые как возраст донора >50 лет или длительность ишемии >4 ч, было достоверно продемонстрировано увеличение смертности через 30 дней и через 1 год. Раствор UW был также связан с лучшей выживаемостью по сравнению с раствором гистидин–триптофан–кетоглутарата (НТК). При сравнении НТК с раствором Celsior статистической разницы в показателях дисфункции донорского сердца и госпитальной смертности выявлено не было, при среднем времени ишемии $187,9 \pm 52,6$ мин [23]. Однако при многофакторном анализе предикторами смерти в стационаре были сочетание возраста реципиента и донора ≥ 60 лет, интраоперационная бивентрикулярная недостаточность и предшествующая операция на сердце.

За последнее десятилетие было разработано и доклинически протестировано несколько новых рецептур консервирующих растворов [6]. Новый внеклеточный раствор Somah включает энергетические субстраты, модуляторы метаболизма, антиоксиданты, L-аргинин, а также фосфатный и бикарбонатный буферы. Четырехчасовое сохранение свиных сердечных трансплантатов, полученных от животных-доноров с бьющимся и небьющимся сердцем, в Somah привело к лучшей жизнеспособности кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток, а также к более высокому уровню экспрессии миокардиальных и эндотелиальных белков по сравнению с контролем. Лучшая кардиопротекция наблюдалась после 5-часовой консервации свиного сердца при температуре около 21 °C по сравнению с Celsior и UW.

Новый раствор Кустодиол-N представляет собой внутриклеточный консервирующий раствор, который отличается от НТК более низкой концентрацией гистидина, добавлением аминокислот глицин, аланин и аргинин, N-ацетил-гистидин частично заменил гистидин, а аспартат и лактобионат заменили хлорид. Превосходство Кустодиола-N над НТК было продемонстрировано на крысиной модели гетеротопической трансплантации сердца [24, 25]. Также Кустодиол-N продемонстрировал значительное преимущество на модели трансплантации сердца у собак после длительной консервации в течение 8 и 12 часов. После трансплантации сердца животным

группы контроля с использованием обычного НТК ни в одном случае не удалось отключиться от искусственного кровообращения, в группе с использованием Кустодиола-N во всех случаях удалось отойти от искусственного кровообращения со стабильной гемодинамикой [26]. По данным авторов, хелатор железа LK614 сыграл ключевую роль, уменьшив содержание в миокарде хелатируемого железа. Таким образом, Кустодиол-N, UW, Somah выглядят предпочтительнее обычного НТК в отношении длительной консервации.

Подробный анализ выполнен С.М. Минасян и соавторами. По их мнению, возможными методами совершенствования методов консервации при длительной ишемии являются оптимизация состава КР, добавление в КР различных активных компонентов (усиление буферной емкости и коллоидных компонентов), использование поляризующих КР, постоянная перфузия донорского сердца и низкотемпературная консервация [27]. Интересной выглядит теория низкотемпературной консервации (менее 0 градусов Цельсия) с использованием белка-криопротектора, учитывая некоторое противоречие с концепцией, используемой в системе Paragonix [28]. Однако стандартная холодовая транспортировка донорского сердца в контейнере со льдом имеет ряд недостатков, в частности отсутствие контроля температуры органа. Исследование на 186 органах показало, что средняя температура органов при транспортировке опускалась ниже +2 °C; через 6 часов транспортировки – ниже 0 °C [29]. Консервация при такой температуре может вызвать повреждение донорского сердца, особенно при длительной. Известно, что при температуре <2 °C происходит повреждение структур кардиомиоцитов, при <1 °C – развитие необратимой диастолической дисфункции, а при температуре <0 °C – денатурация белка.

Разработана система SherpaPak Cardiac Transport System (CTS) (Paragonix Technologies, MA, USA), предполагающая равномерное охлаждение с поддержкой постоянной температуры от 4 до 8 °C, исключая любое влияние окружающей среды, что предотвращает риск холодового повреждения органа и дальнейших необратимых изменений миокардиальных клеток. Продemonстрировано снижение госпитальной летальности после трансплантации сердца в исследуемой группе (консервация в Paragonix) по сравнению со стандартной «ледяной» консервацией [30]. Система Paragonix SherpaPak™ Cardiac Transport System демонстрирует отличные результаты по сравнению со стандартной холодовой консервацией. Необходимы исследования системы для консервации сердца длительностью более 4 часов.

НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕРФУЗИЯ ДОНОРСКОГО СЕРДЦА

Наиболее перспективной технологией для длительной транспортировки донорских органов является машинная перфузия. В настоящее время наибольший клинический опыт имеет устройство для нормотермической машинной перфузии сердца производства TransMedics Inc. (Андовер, Массачусетс, США) [31]. В проспективном многоцентровом рандомизированном исследовании PROCEED II сравнили систему нормотермической машинной перфузии со стандартным хранением сердца на льду. 30-дневная выживаемость пациентов составила 94% в группе машинной перфузии со средним временем ишемии органа 5,4 часа и 97% в контрольной группе. Краткосрочные клинические результаты показали, что система ухода за органами производства TransMedics Inc. не уступает хранению трансплантата в холодильнике. Дальнейшие исследования не продемонстрировали различий в двухлетней выживаемости или серьезных неблагоприятных сердечных событиях между двумя группами [32].

У доноров с расширенными критериями использование систем нормотермической перфузии TransMedics Inc. продемонстрировало значительное преимущество перед аллотрансплантатами, хранящимися в холодильнике. Исследование EXPAND-Heart продемонстрировало, что сердца с расширенными критериями, использующие нормотермическую машинную перфузию, имели 30-дневную выживаемость 94% и 6-месячную выживаемость 88%. Частота тяжелой первичной дисфункции трансплантата составила 11% [33]. Также есть данные о проведении успешной трансплантации сердца с временем ишемии 611 минут, которая была проведена благодаря системе нормотермической перфузии миокарда [34]. По данным исследования, проведенного в США, данная система машинной перфузии была более экономически выгодной, чем стандартное хранение трансплантата в холодильнике [35]. Использование системы нормотермической перфузии выглядит наиболее предпочтительным и физиологичным способом сохранения донорского сердца. Система TransMedics демонстрирует хорошие результаты при короткой и длительной транспортировке. Недостатки системы определяются ее массогабаритными характеристиками, особенностями эксплуатации, но основной ограничивающий фактор – высокая стоимость. В настоящее время в России технология нормотермической перфузии сердца не используется.

ТЕХНОЛОГИИ БУДУЩЕГО

Известно, что протон-активируемые кислото-чувствительные ионные каналы (ASIC1a) играют ключевую роль в реализации ИРП. Meredith A. Redd

et al. продемонстрировали на экспериментальной модели крыс, что использование фармакологических ингибиторов ASIC1a, полученных из яда австралийского паука *Hadronyche infensa* (Hila), улучшает функциональное восстановление изолированных сердец грызунов после длительной гипотермической ишемии. Для оценки кардиопротекторного эффекта ингибирования ASIC1a в модели консервации донорского сердца ученые добавили в раствор Celsior фармакологический ингибитор Hila, время ишемии составило 8 часов. Затем восстанавливали коронарный кровоток и выполняли оценку функции сердца. Сердца, сохраненные с добавлением Hila, имели заметно улучшенное восстановление аортального потока и сердечного выброса по сравнению с группой контроля. Эти данные демонстрируют, что Hila обладает высокой кардиопротекторной активностью против ИРП в клинически значимой модели сохранения донорского сердца при длительной холодовой консервации [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При поиске оптимального метода консервации донорского сердца с длительной холодовой ишемией необходимо детальное понимание патофизиологии ишемически-реперфузионного повреждения и фундаментальный подход. Результаты доступных исследований по данной проблеме при предполагаемой продленной холодовой ишемии сердца диктуют необходимость использовать доноров без сопутствующих факторов риска, исключить любую потерю времени при транспортировке, а также выполнять повторную инфузию консервирующего раствора либо кровяной кардиоплегии. Очевидна острая необходимость разработки новых консервирующих растворов, доступных в России, перфузионных технологий в донорстве.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект 24-25-00352).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Фомичев АВ, Попцов ВН, Сирота ДА, Жульков МО, Едемский АГ, Протопопов АВ и др. Среднесрочные и отдаленные результаты трансплантации сердца с длительной холодовой ишемией. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (1): 99–105. Fomichev AV, Poptsov VN, Sirota DA, Zhul'kov MO, Edemskiy AG, Protopopov AV et al. Mid-term and long-term outcomes following heart transplantation with prolonged cold ischemia. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs*. 2023; 25 (1): 99–105. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-1-99-105>.
2. Erasmus M, Neyrink A, Sabatino M, Potena L. Heart allograft preservation: an arduous journey from the donor to the recipient. *Curr Opin Cardiol*. 2017; 32 (3): 292–300. <https://doi.org/10.1097/hco.0000000000000395>.
3. Segovia J, Cosío MD, Barceló JM, Bueno MG, Pavia PG, Burgos R et al. RADIAL: a novel primary graft failure risk score in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2011; 30 (6): 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.01.721>.
4. Lund LH, Khush KK, Cherikh WS, Goldfarb S, Kucheryavaya AY, Levvey BJ et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Heart Transplantation Report – 2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. *J Heart Lung Transplant*. 2017; 36 (10): 1037–1046. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.07.019>.
5. Redd MA, Scheuer SE, Saez NJ, Yoshikawa Y, Chiu HS, Gao L et al. Therapeutic Inhibition of Acid-Sensing Ion Channel 1a Recovers Heart Function After Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation*. 2021; 144 (12): 947–960. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000001020>.
6. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev YV, Karpov AA, Vlasov TD. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2015; 20 (4): 510–519. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivu432>.
7. Rauen U, Klempt S, De Groot H. Histidine-induced injury to cultured liver cells, effects of histidine derivatives and of iron chelators. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64 (2): 192–205. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6456-1>.
8. Kim ST, Helmers MR, Iyengar A, Han JJ, Patrick WL, Weingarten N D et al. Interaction between donor obesity and prolonged donor ischemic time in heart transplantation. *J Cardiol*. 2022; 80 (4): 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2022.06.013>.
9. Ribeiro RVP, Friedrich JO, Ouzounian M, Yau T, Lee J, Yanagawa B. Supplemental Cardioplegia During Donor Heart Implantation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Thorac Surg*. 2020; 110 (2): 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2019.10.094>.
10. Luciani GB, Faggian G, Montalbano G, Casali G, Forni A, Chiominto B, Mazzucco A. Blood versus crystalloid cardioplegia for myocardial protection of donor hearts during transplantation: A prospective, randomized clinical trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 118 (5): 787–795. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(99\)70047-4](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(99)70047-4).
11. Luciani GB, Faggian G, Forni A, Montalbano G, Chiominto B, Mazzucco A. Myocardial protection during heart transplantation using blood cardioplegia. *Transplant Proc*. 1997; 29 (8): 3386–3388. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(97\)00950-0](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(97)00950-0).
12. Luciani GB, Forni A, Rigatelli G, Chiominto B, Cardaioli P, Mazzucco A, Faggian G. Myocardial protection in heart transplantation using blood cardioplegia: 12-year outcome of a prospective randomized trial. *J Heart Lung Transplant*. 2011; 30 (1): 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2010.08.014>.
13. Soots G, Crepin F, Prat A, Gosselin B, Pol A, Moreau D, Devulder JP. Cold blood cardioplegia and warm cardioplegic reperfusion in heart transplantation. *Eur J*

- Cardiothorac Surg.* 1991; 5 (8): 400–404. [https://doi.org/10.1016/1010-7940\(91\)90183-k](https://doi.org/10.1016/1010-7940(91)90183-k).
14. Carrier M, Leung TK, Solymoss BC, Cartier R, Leclerc Y, Pelletier LC. Clinical trial of retrograde warm blood reperfusion versus standard cold topical irrigation of transplanted hearts. *Ann Thorac Surg.* 1996; 61 (5): 1310–1315. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(96\)00075-6](https://doi.org/10.1016/0003-4975(96)00075-6).
15. Fiocchi R, Vernocchi A, Mammanna C, Iamele L, Gamma A. Continuous retrograde warm blood reperfusion reduces cardiac troponin I release after heart transplantation: a prospective randomized study. *Transpl Int.* 2000; 13 Suppl 1: S240–S244. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2000.tb02027.x>.
16. Pradas G, Cuenca J, Juffe A. Continuous warm reperfusion during heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996; 111 (4): 784–790. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(96\)70338-0](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(96)70338-0).
17. Tevaearai Stahel HT, Unger D, Schmidli J, Gahl B, Engberger L, Kadner A et al. Supplemental Cardioplegia Immediately before Graft Implantation may Improve Early Post-Transplantation Outcome. *Front Surg.* 2014; 1: 46. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2014.00046>.
18. Mozaffari MS, Liu JY, Abebe W, Baban B. Mechanisms of load dependency of myocardial ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis.* 2013; 3 (4): 180–196.
19. Landymore RW, Bayes AJ, Murphy JT, Fris JH. Preconditioning prevents myocardial stunning after cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1998; 66 (6): 1953–1957. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(98\)00902-3](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(98)00902-3).
20. Wang G, Zhang Y, Yang L, Chen Y, Fang Z, Zhou H et al. Cardioprotective effect of remote ischemic preconditioning with postconditioning on donor hearts in patients undergoing heart transplantation: A single-center, double-blind, randomized controlled trial. *BMC Anesthesiol.* 2019; 19 (1): 1–8. <https://doi.org/10.21203/rs.2.182/v1>.
21. Carter KT, Lirette ST, Baran DA, Creswell LL, Panos AL, Cochran RP et al. The Effect of Cardiac Preservation Solutions on Heart Transplant Survival. *J Surg Res.* 2019; 242: 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2019.04.041>.
22. George TJ, Arnaoutakis GJ, Beaty CA, Shah AS, Conte JV, Halushka MK. A novel method of measuring cardiac preservation injury demonstrates University of Wisconsin solution is associated with less ischemic necrosis than Celsior in early cardiac allograft biopsy specimens. *J Heart Lung Transplant.* 2012; 31 (4): 410–418. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.11.023>.
23. Cannata A, Botta L, Colombo T, Russo CF, Taglieri C, Bruschi G et al. Does the cardioplegic solution have an effect on early outcomes following heart transplantation? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012; 41 (4): e48–e52. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezr321>.
24. Loganathan S, Radovits T, Hirschberg K, Korkmaz S, Koch A, Karck M, Szabó G. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139 (4): 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.09.034>.
25. Mohr A, Brockmann JG, Becker F. HTK-N: Modified Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution-A Promising New Tool in Solid Organ Preservation. *Int J Mol Sci.* 2020; 21 (18): 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21186468>.
26. Szabó G, Loganathan S, Korkmaz-İcöz S, Balogh Á, Papp Z, Brlecic P et al. Improvement of Left Ventricular Graft Function Using an Iron-Chelator-Supplemented Bretschneider Solution in a Canine Model of Orthotopic Heart Transplantation. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (13): 7453. <https://doi.org/10.3390/ijms23137453>.
27. Минасян СМ, Галагудза ММ, Дмитриев ЮВ, Карпов АА, Боброва ЕА, Красичков АС и др. Консервация донорского сердца: история и современность с позиции трансляционной медицины. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2014; 13 (3): 4–16. Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev YuV, Karpov AA, Bobrova EA, Krasichkov AS et al. Donor heart preservation: history and current status in terms of translational medicine. *Regional blood circulation and microcirculation.* 2014; 13 (3): 4–16. (In Russ.). <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2014-13-3-4-16>.
28. Radakovic D, Karimli S, Penov K, Schade I, Hamouda K, Bening C et al. First clinical experience with the novel cold storage SherpaPakTM system for donor heart transportation. *J Thorac Dis.* 2020; 12 (12): 7227–7235. <https://doi.org/10.21037/jtd-20-1827>.
29. Horch DF, Mehlitz T, Laurich O, Abel A, Reuter S, Pratschke H et al. Organ transport temperature box: Multicenter study on transport temperature of organs. *Transplant Proc.* 2002; 34 (6): 2320. [https://doi.org/10.1016/s0041-1345\(02\)03253-0](https://doi.org/10.1016/s0041-1345(02)03253-0).
30. Michel SG, LaMuraglia Li GM, Madariaga ML, Anderson LM. Innovative cold storage of donor organs using the Paragonix Sherpa Pak TM devices. *Heart Lung Vessel.* 2015; 7 (3): 246–255.
31. Kothari P. Ex-Vivo Preservation of Heart Allografts – An Overview of the Current State. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2023; 10 (3): 105. <https://doi.org/10.3390/jcdd10030105>.
32. Ardehali A, Esmailian F, Deng M, Soltesz E, Hsieh E, Naka Y et al. Ex-vivo perfusion of donor hearts for human heart transplantation (PROCEED II): a prospective, open-label, multicentre, randomised non-inferiority trial. *Lancet.* 2015; 385 (9987): 2577–2584. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60261-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60261-6).
33. Ragalie WS, Ardehali A. Current status of normothermic ex-vivo perfusion of cardiac allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2020; 25 (3): 237–240. <https://doi.org/10.1097/mot.0000000000000759>.
34. Stamp NL, Shah A, Vincent V, Wright B, Wood C, Pavvey W et al. Successful Heart Transplant after Ten Hours Out-of-body Time using the TransMedics Organ Care System. *Heart Lung Circ.* 2015; 24 (6): 611–613. <https://doi.org/10.1016/j.hlc.2015.01.005>.
35. Voigt JD, Leacche M, Copeland H, Wolfe SB, Pham SM, Shudo Y et al. Multicenter Registry Using Propensity Score Analysis to Compare a Novel Transport/Preservation System to Traditional Means on Postoperative Hospital Outcomes and Costs for Heart Transplant Patients. *ASAIO J.* 2023; 69 (4): 345–349. <https://doi.org/10.1097/mat.0000000000001844>.

Статья поступила в редакцию 21.02.2024 г.
The article was submitted to the journal on 21.02.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-58-62

MANAGEMENT AND OUTCOMES OF ANEURYSMS FOUND IN DECEASED DONOR LIVERS: A REVIEW OF PUBLISHED CASES

A. González De Godos, B. Pérez Saborido, M. Bailón Cuadrado,
D. Pacheco Sánchez

Río Hortega University Hospital, Valladolid, Spain

Introduction. The organ shortage has prompted transplant surgeons to accept grafts from deceased donors, which can lead to complex reconstructions. The presence of an aneurysm can complicate the arterial anastomosis of the liver transplant, leading to postoperative vascular complications such as hepatic artery thrombosis or stenosis. **Objective:** review published cases of donor liver aneurysms and their management. **Materials and methods.** After an exhaustive literature search, only 4 published cases of liver transplants from grafts with aneurysms in their vascular territory have been found. **Results.** These vascular anomalies were corrected by vascular reconstructions and no postoperative arterial complications were observed. **Conclusion.** Although no particular arterial configuration precludes the use of a donor liver for transplant, more arterial complications can be anticipated with complex arterial reconstructions. However, properly managed arterial anomalies do not necessarily compromise graft outcome. Therefore, our review of the literature shows the possibility of using these organs for liver transplantation, which would otherwise be discarded.

Keywords: liver transplantation, hepatic aneurysm, extended criteria donor, vascular abnormalities.

INTRODUCTION

The organ shortage has prompted transplant surgeons to accept grafts from deceased donors with severe vascular anomalies that may require complex reconstructions [1]. Recognition and adequate reconstruction of such variants are essential in the evolution of liver transplantation, since alterations in arterial flow usually cause graft loss due to biliary and/or parenchymal ischemic complications. In the literature, arterial anomalies have been linked to an increased incidence of arterial complications. Most of these studies were based on a relatively small number of grafts and none have analyzed the effect of the techniques for managing these anomalies on post-transplant complications. The optimal treatment of these findings in the donor liver is also unclear [2].

The discrepancy between supply and demand and the increase in morbidity and mortality of patients on the waiting list has led to a search for alternatives to the standard pool of brain-dead organ donors. The most immediate source of organs capable of expanding the donor pool is that of donors with extended criteria, also called marginal donors. These, although not universally defined, include a wide range of donors with unfavorable characteristics, historically associated with worse graft and patient survival [advanced age, steatosis, hypernatremia, donor in asystole, etc.]. Asystole donation is associated with severe ischemia-reperfusion injury, which is responsible for delayed graft function and bili-

ary ischemia. However, if carefully selected and matched to appropriate recipients, asystole donor livers can be used safely and effectively [3].

Aneurysms of the visceral arteries are rare entities that affect the celiac trunk, splenic, superior mesenteric or inferior mesenteric artery and their branches. The prevalence of visceral artery aneurysms is 0.1% to 2%. Depending on the size and location of the aneurysm, mortality from rupture ranges from 25% to 100%. The splenic artery is the most commonly affected artery (60%), followed by the hepatic artery (20% to 50%) [4].

The presence of an aneurysm can complicate the arterial anastomosis of the liver transplant, leading to postoperative vascular complications such as thrombosis or stenosis of the hepatic artery. Careful arterial reconstruction of this vascular anomaly can reduce this risk of vascular complications and make it possible to use a graft that would have been discarded [5].

We performed a review of the literature on published cases of aneurysms found in this donor vascular territory and their management.

MATERIALS AND METHODS

The search was carried out in several databases: Pubmed, Scopus, Cochrane library, EMBASE, SciELO and LILACS; and in all of them the same search criteria were followed. The following algorithm was used: "liver donor aneurysm". The search was conducted on August 2, 2023. Studies published in Spanish and English were

Corresponding author: Andrea González De Godos. Río Hortega University Hospital, Valladolid, Spain.

ORCID code: 0000-0003-2402-5483. Address: Calle Dulzaina, 2, 47012 Valladolid (Spain).

Phone: +34 711749153. E-mail: agonzalezdeg@saludcastillayleon.es

included. All publications that did not deal with donor liver aneurysms were discarded. No filters of any kind (text availability, article type, publication date, ...) were applied. After reviewing the literature, 4 published cases were found.

RESULTS

In the first case described in 2012, a celiac trunk aneurysm (1.7 cm of transverse diameter) was found during the back-table surgery. The whole liver transplantation was performed to re-transplant a 43-year-old woman with end-stage liver disease (MELD score 30) that was caused by chronic rejection. The Model for End-Stage Liver Disease (MELD) is an objective and easily reproducible prognostic index of mortality based on three simple analytical variables: bilirubin, serum creatinine and the prothrombin time/International Normalized Ratio (INR) of prothrombin time. The implementation of MELD as an organ allocation system has reduced mortality on the waiting list without affecting post-transplantation survival. A heterologous segmental hepatic arterial graft was used to guarantee optimal arterial flow. The hepatic artery was sewn end-to-end to the common hepatic artery and subsequently during the implantation the end of the donor common hepatic artery was sewn end-to-end to the native common hepatic artery of the recipient. The recipient is alive and well 6 months later, without any vascular or biliary complications [6].

In the second case described in 2015, a Michels type V variant was verified with a left accessory hepatic artery arising from an aneurysm of the left gastric artery of 2.3×2.3 cm and a second aneurysm of the common hepatic artery of 2.7×2.5 cm. At the bench-time, it was created a main common arterial trunk using four vascular sutures: the left hepatic artery (elongation) to a tubular splenic patch; the splenic patch to the gastric stump of the spleno-gastric carrefour; the splenic side of the carrefour to the right hepatic artery; the spleno-gastric carrefour to a mesenteric patch in order to obtain a good arterial stump for the anastomosis in the recipient. The new common arterial trunk (graft) was sutured to the common hepatic artery at the gastro-duodenal origin and the left accessory hepatic artery to the homologous branch of the recipient. After 36 months of follow-up, the patient was in good conditions with normal biochemistry. Contrast-enhanced computerized tomography 3D reconstruction showed arterial patency without any stricture and/or kinking of the reconstructed arteries [1].

In the third case described in 2020, computerized tomography demonstrated a proper hepatic artery aneurysm of 64×49 mm in diameter, which extended to the origin of the right and left hepatic arteries; the common hepatic artery arose from the superior mesenteric artery. At back table it was resected the aneurysm and reconstructed the left and right hepatic arteries on a vascular graft obtained from the donor's distal tract of the supe-

rior mesenteric artery. All collaterals of the mesenteric graft were accurately ligated, apart from the ileocolic bifurcation, which was used for the anastomosis. Liver transplant was performed using the piggy-back technique without venovenous bypass. For arterialization, it was anastomosed the mesenteric graft to the recipient's hepatic artery at the origin of the gastroduodenal artery. The postoperative course was uneventful, and no complications were observed after a total follow-up of 6 months [7].

In the fourth case described in 2021, it was identified a celiac artery aneurysm (CAA) 18 mm in diameter, with the common hepatic, splenic, and left gastric arteries originating from the aneurysm. The recipient's proper hepatic artery was dissected down to the level of the hepatic artery bifurcation to create the anastomosis. The donor's hepatic artery was divided away from the aneurysmal dilatation to the level of the common hepatic artery. The hepatic artery reconstruction was performed in an end-to-end fashion using a Carrel patch from the recipient's proper hepatic artery bifurcation to donor's common hepatic artery. Since discharge, the recipient had had 2 episodes of cholestasis, which were managed by endoscopic retrograde cholangiopancreatography with sphincterectomy, dilation, and stent placement. The flow through the arterial anastomosis has demonstrated optimal post-operative flow patterns since transplant [5].

Summary of cases (Table)

Reconstruction scheme (Fig.)

DISCUSSION

Liver transplantation represents the treatment of choice for patients with end-stage liver disease and in recent years there have been improvements in immunosuppressive regimens, preservation solutions, anesthesia, surgical techniques, donor and recipient selection, and antibiotic therapy; however, the availability of liver grafts remains scarce [6].

The increasing median age of deceased donors and the increasing frequency of serious vascular anomalies today encourages transplant centers to be ready to manage such variations and vascular problems successfully [1].

Today professionals are forced to use the group of extended criteria donors (ECD) as a logical consequence of donor scarcity and significant changes in the socioeconomic and healthcare fronts and new development in the field of medicine. Consequently, the number of potentially younger organ donors has decreased and many centres in Europe report on an increasing median donor age in their population. ECD grafts are thought to be of lower than average quality, associated with poor posttransplant outcomes or an increase in disease transmission. Grafts, however, can be used safely through

careful selection of both donor and recipient risks. Although there is no precise definition for what constitutes an ECD liver, frequently cited characteristics are listed: advanced age; macrovesicular steatosis; donation after cardiac death (DCD); organ dysfunction at procurement; cause of death: anoxia, cerebrovascular accident; disease transmission: Hepatitis B virus, Hepatitis C virus, CDC high-risk donors, HIV positive, extrahepatic malignancy, cold ischemia time (CIT) greater than 12 hours [8]. In short, careful donor and recipient selection remains crucial to optimize outcome after liver transplantation from ECD [9].

Despite the success demonstrated with liver transplantation, vascular complications remain the Achilles heel of the intervention. They usually occur at the anastomotic site, with thrombosis, hepatic artery stenosis, and other vascular complications associated with high morbidity and mortality. These complications can cause endothelial necrosis, necrosis of the biliary tree, or even loss of the graft, which would require a new transplant. Vascular variations or anomalies that require complex vascular reconstructions predispose to technical mistakes and the risk of vascular complications [1].

The presence of an aneurysm in a donor liver can complicate vascular reconstruction, distorting the arterial supply of the graft [5]. Our review of the literature on liver donor aneurysms shows only 4 case reports and data on the long-term outcomes of these grafts are sparse, illustrating the apprehension of transplant surgeons about using these grafts, which have the potential to achieve good results.

Although it is true that there were no significant complications in the reported cases, it must be taken into account that the follow-up period is short. A reconstruction as complex as the one mentioned by V. Tondolo (2015) [1], has a high rate of vascular complications and it would be necessary to consider whether this risk compensates the benefit of the transplant. Furthermore, the donor-recipient combination must be taken into account, since a patient in need of retransplantation, for example, may not be the best option for this type of donor. On

the other hand, in the cases reported by F. Di Francesco (2012) [6] and O. Slivca (2021) [5], the need for arterial reconstruction would have to be considered if other options, such as the CHA-CHA anastomosis, were not possible. This option is not contemplated in the clinical case notification. Finally, we find the graft used in the case reported by De Carlis, R (2020) [7] interesting, although in our center we usually use the iliac bifurcation for this purpose.

Although there were no arterial complications in the studies analyzed, reconstruction involving multiple anastomoses significantly increases the risk. However, the incidence of chronic rejection and graft loss was similar in grafts with normal and abnormal arterial anatomy according to some studies [2].

It is essential that abnormalities in vessel wall integrity are evaluated in the operating room and infectious sources are excluded. The use of Doppler ultrasound in the immediate postoperative period allows early diagnosis of vascular complications and rapid treatment [5].

There are several strengths to this review. On the one hand, thorough literature search was conducted across multiple databases. On the other hand, discussion analyzes the risks/benefits of complex reconstructions versus discarding the grafts.

Our study was limited by a small sample size, given the few published cases of aneurysms in the liver of a deceased donor. Furthermore, this is not a comprehensive review, but rather a presentation of a problem in liver transplantation that can occur and the solutions that have been sought so far. Finally, more long-term follow-up on outcomes would be beneficial if available.

In summary, properly managed arterial anomalies do not necessarily compromise graft outcome. Although no particular arterial configuration precludes the use of a donor liver as a full or reduced graft, more arterial complications can be anticipated with complex arterial reconstructions [2]. More studies are needed to develop guidelines that advise on how to act in response to these findings in liver transplantation.

Table

Main characteristics of the cases described

Work	Location	Dimensions	Reconstruction	Anastomosis	Post-transplant complications
Di Francesco F. (2012)	Celiac trunk	1.7 cm (TD)	Heterologous segmental hepatic arterial graft	CHA-CHA	No
Tondolo V. (2015)	CHA LGA	2.7 × 2.5 cm 2.3 × 2.3 cm	Splenic patch, spleno-gastric carrefour, mesenteric patch	Graft-CHA/GDA	No
De Carlis R. (2020)	PHA	6.4 × 4.9 cm	Vascular graft from the donor's distal tract of the SMA	Graft-CHA/GDA	No
Slivca O. (2021)	Celiac trunk	1.8 cm (TD)	Carrel patch	CHA-PHA	Colestasis

Note. TD – transverse diameter; CHA – common hepatic artery; LGA – left gastric artery; SMA – superior mesenteric artery; GDA – gastroduodenal artery; PHA – proper hepatic artery.

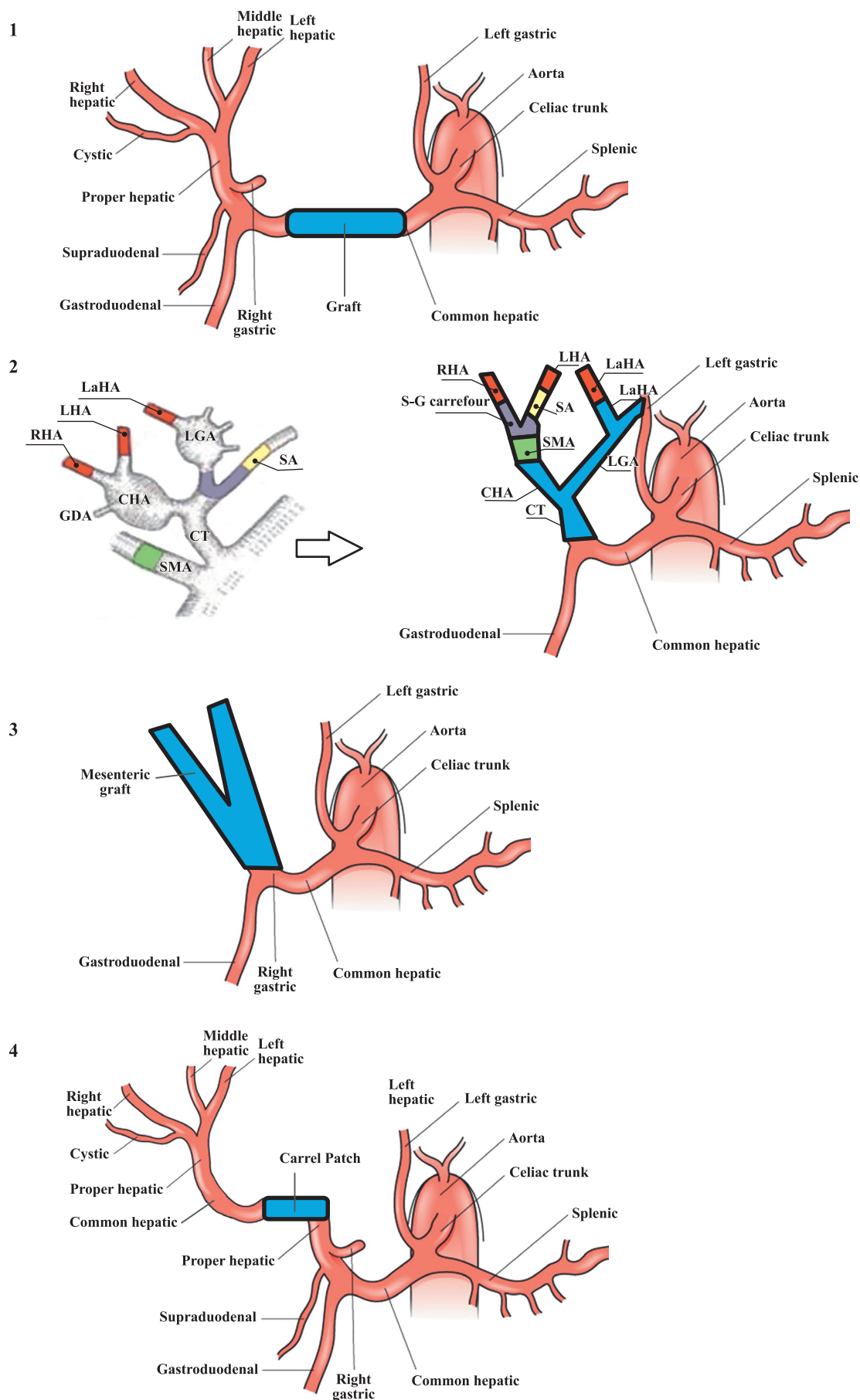


Fig. Reconstruction of the cases described. CHA – common hepatic artery; RHA – right hepatic artery; LHA – left hepatic artery; LGA – left gastric artery; GDA – gastroduodenal artery; SMA – superior mesenteric artery; LaHA – left accessory hepatic artery; SA – splenic artery; CT – celiac trunk; S-G carrefour – spleno-gastric carrefour

CONCLUSION

The presence of an aneurysm in the vascular territory of the liver donor should not be an absolute contraindication for its use as a liver graft. Although vascular anomalies and complex reconstructions may be associated with a higher risk of complications, our review of the literature shows the possibility of using these organs for liver transplantation. Anyway, further studies are necessary for more substantial conclusions.

Ethical responsibilities: *this study has no ethical considerations as it is a review.*

Funding: *this research has not received specific support from public sector agencies, the commercial sector or non-profit entities.*

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Tondolo V, Manzoni A, Zamboni F. A liver donor with double hepatic artery aneurysm: a saved graft. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* agosto de 2015; 14 (4): 443–445. doi: 10.1016/s1499-3872(14)60325-8.
2. Soin AS, Friend PJ, Rasmussen A, Saxena R, Tokat Y, Alexander GJ, et al. Donor arterial variations in liver transplantation: management and outcome of 527 consecutive grafts. *Br J Surg.* mayo de 1996; 83 (5): 637–641. doi: 10.1002/bjs.1800830515.
3. European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu. EASL Clinical Practice Guidelines: Liver transplantation. *J Hepatol.* febrero de 2016; 64 (2): 433–485. doi: 10.1016/j.jhep.2015.10.006.
4. James C. Stanley, Dawn M. Coleman y Jonathan L. Eliason. Cirugía vascular y endovascular [Internet]. 9ª. Elsevier España; 2020 [cited August 2, 2023]. 687–699 p. Available in: <https://www.clinicalkey.es#!/content/book/3-s2.0-B9780323402323001291?scrollTo=%23hl0000082>.
5. Slivca O, Olowofela AS, Serrano OK, Pruett TL. Maximizing Deceased-Donor Allograft Utilization: Management of a Celiac Artery Aneurysm in a Deceased-Donor Liver. *Exp Clin Transplant.* octubre de 2021; 19 (10): 1103–1105. doi: 10.6002/ect.2019.0023.
6. Di Francesco F, Pagano D, Echeverri G, De Martino M, Spada M, Gridelli BG, et al. Selective use of extended criteria deceased liver donors with anatomic variations. *Ann Transplant.* 31 de diciembre de 2012; 17 (4): 140–143. doi: 10.12659/aot.883705.
7. De Carlis R, Andorno E, Buscemi V, Lauterio A, Diviacco P, Di Sandro S, et al. Successful Transplant of a Liver Graft After Giant Hepatic Artery Aneurysm Resection and Reconstruction. *Exp Clin Transplant.* agosto de 2020; 18 (4): 522–525. doi: 10.6002/ect.2019.0028.
8. Vodkin I, Kuo A. Extended Criteria Donors in Liver Transplantation. *Clin Liver Dis.* mayo de 2017; 21 (2): 289–301. doi: 10.1016/j.cld.2016.12.004.
9. Dasari BVM, Schlegel A, Mergental H, Perera MTPR. The use of old donors in liver transplantation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* abril de 2017; 31 (2): 211–217. doi: 10.1016/j.bpg.2017.03.002.

The article was submitted to the journal on 27.12.2023

ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ ОКСИГЕНИРОВАННАЯ ПЕРФУЗИОННАЯ КОНСЕРВАЦИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ ОТ ДОНОРОВ С РАСШИРЕННЫМИ КРИТЕРИЯМИ

А.В. Шабунин^{1, 2}, О.Б. Лоран^{1, 2}, Д.Ю. Пушкарь¹, Е.И. Велиев¹, М.Г. Минина^{1, 3},
П.А. Дроздов^{1, 2}, С.А. Астапович¹, Э.А. Лиджиева²

¹ ГБУЗ «Городская клиническая больница имени С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Российская Федерация

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Цель: улучшить результаты трансплантации печени от доноров с расширенными критериями посредством внедрения гипотермической оксигенированной перфузионной консервации. **Материал и методы.** В исследование включены 63 наблюдения трансплантации печени, полученной от субоптимальных доноров с констатированной смертью головного мозга. Группу I (контрольную) составили 34 наблюдения, в которых консервация трансплантата печени осуществлялась только посредством статического холодового хранения, группу II (основную) – 29 наблюдений, где после статической консервации выполнялась гипотермическая оксигенированная *ex situ* перфузия. Эффективность и безопасность применения последней была оценена нами в сравнительном клиническом исследовании, а также посредством изучения ультраструктурных изменений печени на электронной микроскопии. **Результаты.** Между группами не было получено статистически значимых различий по исходным характеристикам доноров, реципиентов и ряду периоперационных параметров ($p > 0,05$). Пиковые концентрации АСТ и АЛТ в первую неделю после трансплантации в группе применения гипотермической перфузии составили 1052 (IQR: 712–1842) ЕД/л и 1213 (IQR: 613–2032) ЕД/л, в контрольной – 1943 (IQR: 1294–5214) ЕД/л и 2318 (IQR: 1032–6219) ЕД/л, что было статистически значимо ниже ($p = 0,002$ и $p < 0,001$ соответственно). Медиана комплексного индекса осложнений (CCI) в основной группе составила 0 (IQR: 0–22,6), в контрольной – 27,6 (IQR: 0–100), различия были статистически значимыми ($p = 0,001$). Аналогично, статистически значимые различия были зафиксированы по времени нахождения реципиента в ОРИТ и общей длительности госпитализации ($p = 0,042$ и $p = 0,028$) – они были меньше в группе гипотермической перфузии. Морфологическая оценка трансплантатов печени посредством электронной микроскопии выявила меньшее повреждение гепатоцитов в ходе перфузионной консервации. **Выводы.** Гипотермическая оксигенированная перфузия *ex situ* является безопасным и эффективным методом консервации трансплантата печени. Ее применение при трансплантации печени от доноров с расширенными критериями позволяет снизить тяжесть ишемически-реперфузионного повреждения органа и дать дополнительную оценку пригодности органа к пересадке.

Ключевые слова: трансплантация печени, консервация, доноры с расширенными критериями.

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

Corresponding author: Pavel Drozdov. Address: 15/8, Brusilov str., Moscow, 117148, Russian Federation. Phone: (962) 985-04-41. E-mail: dc.drozdov@gmail.com

HYPOTHERMIC OXYGENATED PERFUSION IN LIVER TRANSPLANTATION FROM EXPANDED CRITERIA DONORS

A.V. Shabunin^{1, 2}, O.B. Loran^{1, 2}, D.Yu. Pushkar¹, E.I. Veliev¹, M.G. Minina^{1, 3},
P.A. Drozdov^{1, 2}, S.A. Astapovich¹, E.A. Lidzhieva²

¹ Botkin Hospital, Moscow, Russian Federation

² Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russian Federation

³ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

Objective: to improve the outcomes of liver transplantation (LTx) from expanded criteria donors (ECDs) through hypothermic oxygenated machine perfusion (HOPE). **Material and methods.** The study included 63 cases of LTx from suboptimal brain-dead donors. Group I (control) consisted of 34 persons in which liver transplant was preserved only by static cold storage (SCS), while group II (main) comprised 29 cases where *ex situ* HOPE was used after static preservation. We evaluated the efficacy and safety of the latter in a comparative clinical study and by studying ultrastructural changes in the liver using electron microscopy. **Results.** No statistically significant differences between the groups in terms of baseline characteristics of donors, recipients and several perioperative parameters ($p > 0.05$) were obtained. Peak aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in the first week after transplantation were 1,052 (IQR: 712–1,842) U/L and 1,213 (IQR: 613–2,032) U/L in the HOPE group, and 1,943 (IQR: 1,294–5,214) U/L and 2,318 (IQR: 1,032–6,219) U/L in the SCS group (control). The levels were statistically significantly lower ($p = 0.002$ and $p < 0.001$, respectively). Median comprehensive complication index (CCI) in the main and control groups was 0 (IQR: 0–22.6) and 27.6 (IQR: 0–100) respectively. The differences were statistically significant ($p = 0.001$). Similarly, statistically significant differences were noted in terms of recipient time in the intensive care unit (ICU) and overall length of hospital stay ($p = 0.042$ and $p = 0.028$) – they were less in the HOPE group. Electron microscopy evaluation of the morphology of liver grafts revealed that hepatocytes sustained less injury during HOPE. **Conclusion.** *Ex situ* HOPE is a safe and effective way of preserving liver transplants. Its use in LTx from expanded criteria donors can lessen the severity of ischemia-reperfusion injury (IRI) in the organ and enable additional assessment of the suitability of an organ for transplantation.

Keywords: liver transplantation, preservation, expanded criteria donors.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени на сегодняшний день является единственным методом радикального лечения ее заболеваний в терминальной стадии. За короткий срок, с первой успешной серии трансплантаций, выполненных Томасом Старзлом в 1960-х годах, до настоящего времени, данный метод получил общемировое распространение и стал рутинной клинической практикой множества хирургических центров. Доступность трансплантационной помощи напрямую зависит от донорского ресурса, дефицит которого имеет место во всем мире. Это неизбежно приводит к увеличению количества кандидатов и их смертности в листах ожидания. По данным Eurotransplant, на 2022 год она составила 33,9%, что практически не отличается от результатов десятилетней давности [1].

Использование доноров с расширенными критериями (ДРК) является эффективным способом увеличения доступности трансплантации печени, однако это сопряжено с повышенным риском развития неблагоприятных последствий в послеоперационном периоде. Известно, что трансплантаты, полученные от субоптимальных доноров, в большей степени подвержены ишемическому повреждению в ходе консервации и последующему реперфузи-

онному – в организме реципиента [2]. Выраженное ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) приводит к развитию ранней дисфункции трансплантата печени (РДТП) [3]. По результатам крупного исследования, вышедшего из клиники Мейо, распространенность РДТП составила 26,5%, и ее развитие имело статистически значимое влияние как на ближайшие результаты трансплантации печени, так и на отдаленную выживаемость реципиентов [4]. В ряде случаев развитие РДТП может быть необратимым, что соответствует первичному нефункционированию трансплантата (ПНФТ), при развитии которого летальность превышает 50% [5].

Снизить тяжесть ИРП возможно, в частности, посредством улучшения условий консервации трансплантата. Перфузионные методы консервации печени от ДРК в сравнении со статическим холодовым хранением уже во многих исследованиях доказали свое преимущество [6–8]. В частности, по данным многоцентрового рандомизированного исследования, при трансплантации печени от ДРК использование гипотермической оксигенированной перфузии (НОРЕ) приводит к снижению риска развития РДТП, ранних послеоперационных осложнений и меньшей длительности госпитализации [7]. Тем не менее внед-

рение перфузионных технологий в клиническую практику трансплантационных программ все еще ограничено. Лишь в единичных центрах Российской Федерации перфузионная консервация донорских органов выполняется рутинно.

В Боткинской больнице с 2020 г. внедряются и активно используются различные перфузионные технологии, используемые для консервации солидных органов [9–11]. В данном исследовании мы проанализировали первые результаты применения гипотермической оксигенированной перфузии при трансплантации печени от субоптимальных доноров с констатированной смертью головного мозга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В основу исследования включен анализ результатов лечения 63 реципиентов печени, оперированных в ГКБ им. С.П. Боткина в период с 2018-го по 2023 г. Во всех наблюдениях выполнялась изолированная трансплантация целой печени, полученной от донора с констатированной смертью головного мозга с расширенными критериями. Принадлежность донора к категории расширенных критериев определяли согласно рекомендациям Eurotransplant при наличии как минимум одного из нижеперечисленных факторов:

- возраст >65 лет;
- длительность нахождения в ОРИТ >7 дней;
- ИМТ >30 кг/м²;
- макровезикулярный стеатоз >40%;
- натрий >155 ммоль/л;
- АЛТ >105 ЕД/л, АСТ >90 ЕД/л;
- общий билирубин >3 мг/дл.

Характеристика групп

В группу I (контрольную) включены 34 наблюдения, в которых консервация трансплантата печени осуществлялась только посредством статического холодового хранения. Медиана возраста реципиентов составила 49 (IQR: 26–54) лет, медиана ИМТ – 24 (IQR: 21,0–32,0) кг/м². Среди всех реципиентов мужчин было 21 (61,7%), женщин – 13 (38,2%). Медиана индекса MELD составила 16 (IQR: 14–19) баллов. Возраст доноров составил 54 (IQR: 31–66) года, ИМТ – 29 (IQR: 24,0–35,0) кг/м². Медиана времени нахождения в реанимации – 78 (IQR: 25,0–137,0) часов. Вазопрессорная поддержка норадреналином имела место у всех (100%) доноров, среди них у 13 (34,7%) его доза превышала 1000 нг/кг/мин, либо использовался второй вазопрессор. Медиана сывороточного уровня натрия составила 148 (IQR: 134–155) ммоль/л, АСТ и АЛТ – 44,0 (IQR: 24,0–79,0) и 59,0 (IQR: 26,0–142) ЕД/л соответственно. Минимальный стеатоз (менее 40%) имел место у 10 (29,4%), умеренный (40–60%) – у 24 (70,6%) трансплантатов печени.

В группу II (основную) вошли 29 реципиентов, при трансплантации печени которых после стати-

ческой консервации проводилась гипотермическая оксигенированная машинная перфузия. При этом в 7 наблюдениях выполнялась «классическая» HOPE только через портальную систему, в 22 – «двойная»: как через воротную, так и через печеночную артерию. Медиана возраста реципиентов составила 51 (IQR: 32–59) год, ИМТ – 25 (IQR: 23,0–32,5). Мужчин было 16 (55,2%), женщин – 13 (44,8%). Медиана индекса MELD составила 17 (IQR: 14–20) баллов. Возраст доноров составил 58 (IQR: 31–67) лет, ИМТ – 29 (IQR: 25,0–33,0) кг/м², медиана времени нахождения в реанимации – 86 (IQR: 34,0–122,0) часов. Вазопрессорная поддержка имела место у всех (100%) доноров, среди них у 13 (44,8%) доза норадреналина превышала 1000 нг/кг/мин, либо использовался второй вазопрессор. Медиана сывороточного уровня натрия составила 152 (IQR: 137–159) ммоль/л, АСТ и АЛТ – 43,0 (IQR: 32,0–77,0) и 59,0 (IQR: 22,0–82,5) ЕД/л соответственно. Минимальный стеатоз (менее 40%), определяемый по результатам экстренного либо планового гистологического исследования, имел место у 9 (31%), умеренный (40–60%) – у 20 (69%) трансплантатов печени. Подробная сравнительная характеристика групп представлена в табл. 1.

Трансплантация печени и послеоперационный период

Оперативные вмешательства по эксплантации печени у посмертного донора выполнялись по стандартной общепринятой технике. Во всех случаях консервация осуществлялась с использованием раствора Бретшнайдера (НТК «Кустодиол»). Трансплантация печени во всех наблюдениях выполнялась с сохранением нижней полой вены реципиента и кавальной реконструкцией по методике Belghiti. Ведение реципиента в послеоперационном периоде осуществлялось по стандартным протоколам, в соответствии с Национальными клиническими рекомендациями. В качестве индукционной иммуносупрессивной терапии использовался базиликсимаб 20 мг, вводимый интраоперационно и на 4-е сутки после трансплантации. Непосредственно перед реперфузией внутривенно вводился метилпреднизолон в дозе 10 мг/кг веса реципиента, с последующим снижением суточной дозы и полной отменой на 4-е сутки. Для большинства реципиентов поддерживающая иммуносупрессия представляла собой монотерапию такролимусом пролонгированного действия, целевая концентрация которого поддерживалась в пределах 7–10 нг/мл.

Интенсивность ишемически-реперфузионного повреждения определяли по наиболее высокому уровню трансаминаз в первую неделю после трансплантации. Раннюю дисфункцию трансплантата печени определяли в соответствии с критериями Olthoff et al. [3] при наличии как минимум одной из нижеперечисленных лабораторных характеристик:

- общий билирубин ≥ 10 мг/дл (171 мкмоль/л) на 7-й день после операции;
- МНО $\geq 1,6$ на 7-й день после операции;
- АЛТ или АСТ > 2000 МЕ/мл в течение первой недели после операции.

Гипотермическая оксигенированная перфузия трансплантата печени *ex situ*

Гипотермическая оксигенированная перфузия трансплантата печени проводилась в условиях операционной отделения трансплантации (по принципу back-to-base) с использованием аппарата искусственного кровообращения. Трансплантат печени в

асептических условиях извлекается из транспортного контейнера в емкость с охлажденным до 4–10 °С консервирующим раствором Бретшнайдера (НТК «Кустодиол»), производится канюляция воротной вены и артерии трансплантата (рис. 1, а). В классическом варианте канюлируется только воротная вена (рис. 1, б).

Процедура перфузии осуществлялась посредством двух роликовых насосов, двух перфузионных контуров и одного оксигенатора. Объемные скорости потоков, определяемых работой роликовых насосов, подбирались оператором с поддержанием перфузионного давления 5 мм рт. ст. для портальной системы

Таблица 1

Сравнительный анализ результатов трансплантации печени в зависимости от метода консервации Comparative analysis of liver transplant outcomes depending on preservation method

Показатель	Подгруппа I.I (SCS) n = 34	Подгруппа II.I (HOPE) n = 29	Уровень значимости (p-value)
Характеристики реципиентов			
Возраст, лет	49 (IQR: 26–54)	52 (IQR: 31–58)	0,32
Мужской пол, n (%)	21 (61,7%)	15 (51,7%)	0,422
ИМТ, кг/м ²	24 (IQR: 21,0–32,0)	22 (IQR: 21,0–34,0)	0,29
MELD	16 (IQR: 14–19)	17 (IQR: 13–19)	0,531
Характеристики доноров			
Возраст, лет	54 (IQR: 31–66)	56 (IQR: 28–64)	0,357
Время нахождения в ОРИТ, ч	78 (IQR: 25,0–137,0)	86 (IQR: 32,0–166,0)	0,092
ИМТ, кг/м ²	29 (IQR: 24,0–35,0)	32 (IQR: 25,0–38,0)	0,252
Доза норадреналина > 1000 нг/мл либо 2 вазопрессора, n (%)	13 (34,7)	7 (41,1)	0,231
Na, ммоль/л	148 (IQR: 134–155)	142 (IQR: 135–154)	0,152
АСТ, ЕД/л	44,0 (IQR: 24,0–79,0)	47,0 (IQR: 24,0–78,0)	0,82
АЛТ, ЕД/л	59,0 (IQR: 26,0–142)	61,0 (IQR: 32,0–91,5)	0,139
Макростеатоз $> 40\%$	24 (70,6%)	23 (79,3%)	0,564
Периоперационные параметры			
Время холодовой ишемии, ч	5,2 (IQR: 4,4–8,0)	5,7 (IQR: 4,3–7,8)	0,29
Время статической холодовой консервации, ч	7,2 (IQR: 4,8–8,3)	2,5 (IQR: 1,5–4,5)	0,012
Длительность операции, мин	6,8 (IQR: 5,5–7,5)	6,3 (IQR: 4,8–8,3)	0,457
Вторичная тепловая ишемия, мин	40 (IQR: 30–45)	35 (IQR: 35–45)	0,28
Билиарная ишемия, мин	40 (IQR: 35–45)	40 (IQR: 35–50)	0,93
Кровопотеря, мл	1400 (IQR: 1100–2500)	1100 (IQR: 1000–2500)	0,21
Реинфузия, мл	300 (IQR: 100–450)	250 (IQR: 50–450)	0,62
Трансфузия СЗП, доз	6 (IQR: 3–8)	4 (IQR: 2–7)	0,42
Трансфузия эр. взвеси, доз	1 (IQR: 0–3)	1 (IQR: 0–2)	0,652
Непосредственные результаты ТП			
Длительность нахождения в ОРИТ, сут	5 (IQR: 3–9)	3 (IQR: 2–5)	0,042
Длительность госпитализации, сут	21 (IQR: 17–35)	15 (IQR: 12–24)	0,028
Пиковая концентрация АСТ, ЕД/л	1052 (IQR: 712–1842)	1943 (IQR: 1294–5214)	0,002
Пиковая концентрация АЛТ, ЕД/л	1213 (IQR: 613–2032)	2318 (IQR: 1032–6219)	<0,001
РДТП, n (%)	21 (61,8)	12 (41,3)	0,106
Неспецифические хирургические осложнения, n (%)	11 (32,3)	5 (9,4)	0,01
Артериальный тромбоз, n (%)	3 (8,9)	1 (3,4)	0,383
CCI	27,6 (IQR: 0–100)	0 (IQR: 0–22,6)	<0,001
Ретрансплантация, n (%)	1 (2,9)	0	1
Летальность, n (%)	2 (5,9)	0	0,495

и 25 мм рт. ст. для артериальной системы. Эфлюент, изливающийся через нижнюю полую вену в емкость, куда помещен трансплантат, забирался в перфузион-

ную систему двумя закрепленными на дне емкости канюлями. Схематическое изображение системы «двойной» перфузии печени представлено на рис. 2.

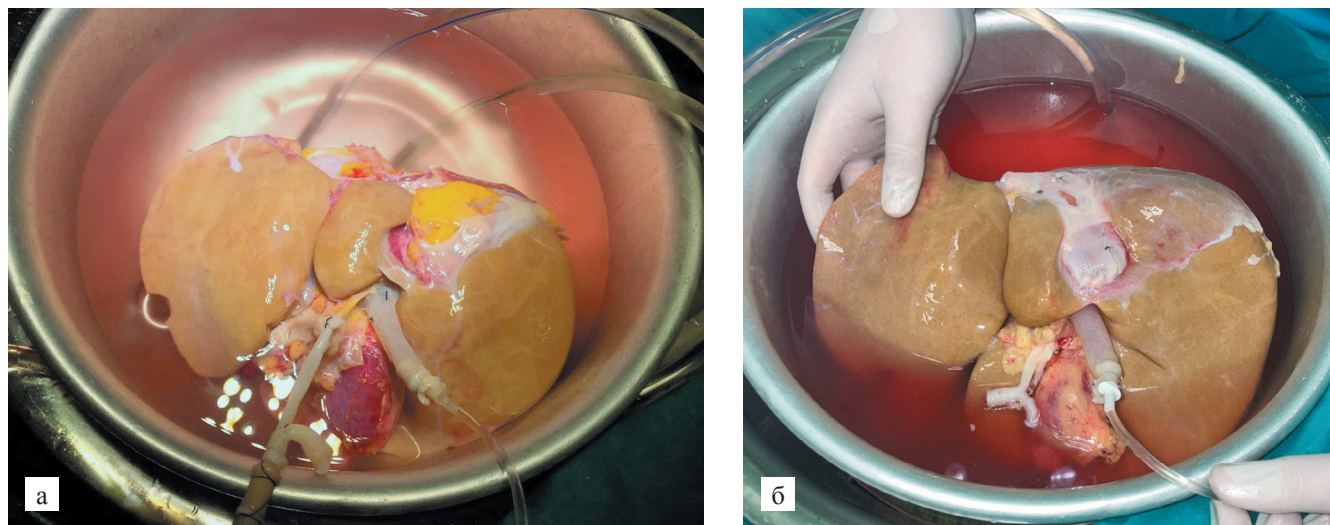


Рис. 1. Интраоперационное фото. Канюляция артерии и воротной вены трансплантата печени перед началом гипотермической оксигенированной перфузии: а – «двойная» перфузия печени через портальную и артериальную системы; б – «классическая» перфузия печени через портальную систему

Fig. 1. Intraoperative photo. Cannulation of the artery and portal vein of liver graft before the start of HOPE: а – dual perfusion of liver via the portal vein and hepatic artery; б – classic perfusion of liver via the portal vein

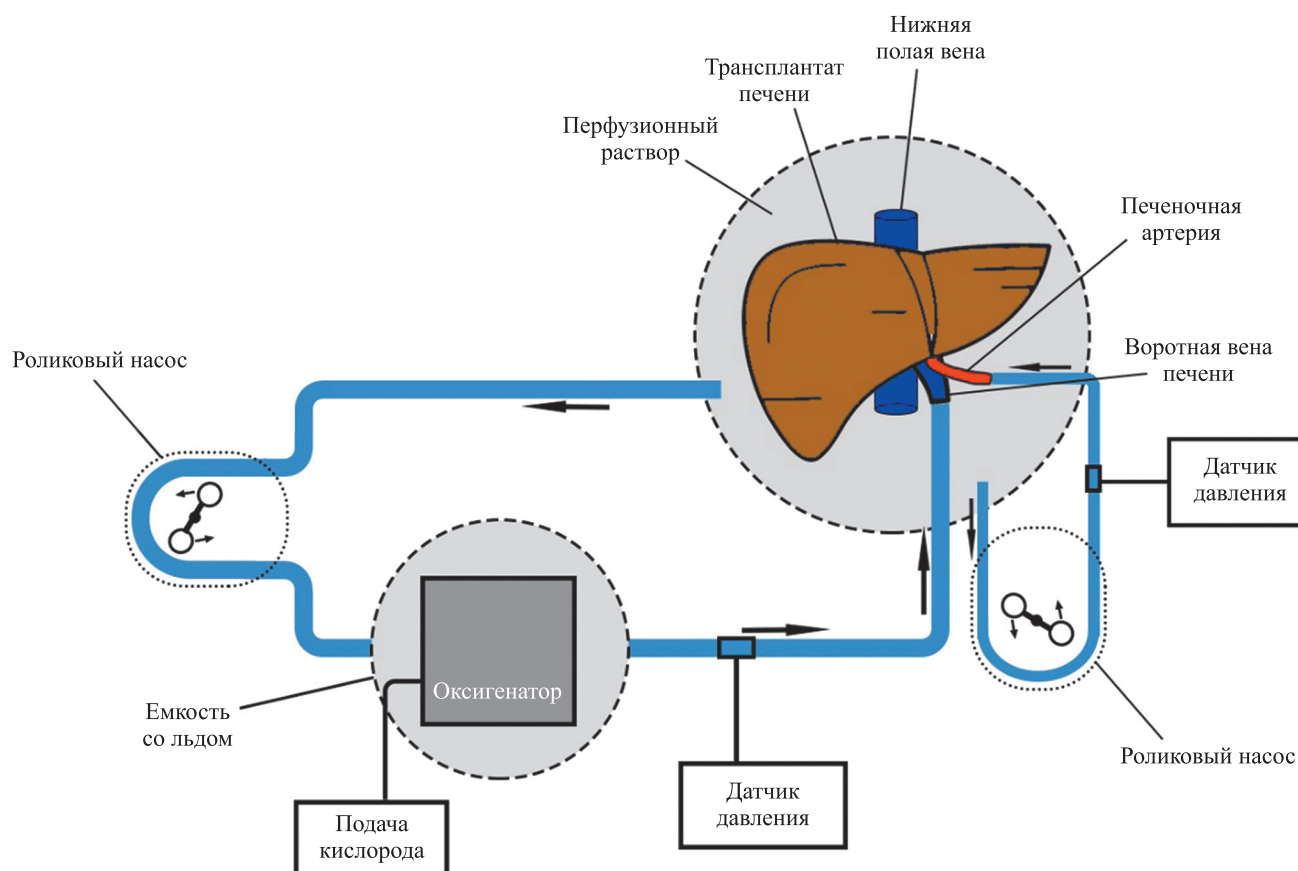


Рис. 2. Схема проведения «двойной» гипотермической оксигенированной перфузии трансплантата печени

Fig. 2. Scheme of dual hypothermic oxygenated perfusion of the liver graft

Температура перфузата поддерживалась в пределах 10 °С в течение всей процедуры. Каждые 30 минут осуществлялся контроль лабораторных показателей перфузии: КЩС (с определением парциального давления кислорода), АСТ и АЛТ. Целевое PaO_2 перфузионного раствора поддерживалось на уровне 400–600 мм рт. ст.

В ходе перфузии выполнялась предтрансплантационная обработка трансплантата и проверка его сосудов на герметичность. Машинная перфузия прекращалась по завершении этапа гепатэктомии непосредственно перед погружением трансплантата в рану.

Морфологическая оценка трансплантатов печени в ходе консервации

С целью определения интенсивности повреждения клеток печени на ультраструктурном уровне в условиях ишемии в зависимости от метода консервации мы проводили электронное микроскопическое исследование. После доставки трансплантата в операционную непосредственно перед началом машинной перфузии из края печени иссекался и фиксировался первый образец (1.1). На этом же этапе из печени иссекался фрагмент 2×2 см и отдельно погружался в охлажденный неоксигенированный консервирующий раствор. По завершении перфузионной консервации как из целой печени, так и из заранее вырезанного фрагмента, который находился в условиях статического холодового хранения, иссекались и фиксировались образцы (1.2 и 1.3). Последовательность взятия образцов для выполнения электронной микроскопии трансплантата печени представлена на рис. 3.

Непосредственные результаты трансплантации печени в зависимости от метода консервации были проанализированы нами в сравнительном клиническом исследовании.

Статистика

Статистическая обработка и анализ данных выполнялись в программе SPSS Statistics для Microsoft Windows версии 26 (США). Для сравнения двух групп количественных показателей ввиду небольшого объема выборки вне зависимости от распределения использовался U-критерий Манна–Уитни. Сравнение категориальных показателей выполнялось с использованием χ^2 -критерия Пирсона либо точного критерия Фишера. Для определения связи между количественными показателями выполнялся корреляционный анализ с определением коэффициента ранговой корреляции r Спирмена, тесноты связи по шкале Чеддока. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ результатов трансплантации печени в зависимости от метода консервации

Между группами не было получено статистически значимых различий по исходным характеристикам донора и реципиента ($p > 0,05$). Общее время холодовой консервации не различалось между группами: 5,2 (IQR: 4,4–8,0) против 5,4 (IQR: 4,2–7,3), $p = 0,32$. Не было зафиксировано статистически значимых различий по общему времени оперативного вмешательства, вторичной тепловой и билиарной ишемии ($p > 0,05$). Интраоперационная кровопотеря и потребность в трансфузии компонентов крови также не различались ($p > 0,05$).

Пиковые концентрации АСТ и АЛТ в первую неделю после трансплантации в группе II применения гипотермической перфузии составили 1052 (IQR: 712–1842) ЕД/л и 1213 (IQR: 613–2032) ЕД/л. В контрольной группе эти показатели составили 1943 (IQR: 1294–5214) ЕД/л и 2318 (IQR: 1032–6219) ЕД/л, что было статистически значимо ниже, чем в основной ($p = 0,002$ и $p < 0,001$ соответственно). При этом ста-



Рис. 3. Протокол взятия образцов для выполнения электронной микроскопии трансплантата печени

Fig. 3. Protocol for taking samples for liver graft electron microscopy

статистически значимых различий по частоте развития РДТП выявлено не было ($p = 0,106$). Тем не менее в группе перфузионной консервации она была ниже: 41,3% (12/29) против 61,8% (21/34). В группе I в 2 наблюдениях развитие РДТП оказалось необратимым, что было расценено как ПНФТ, и привело к ранней послеоперационной летальности реципиентов в обоих случаях. В 1 наблюдении была выполнена ретрансплантация по поводу тромбоза печеночной артерии. В группе II послеоперационной летальности, ПНФТ и ретрансплантаций не было.

Развитие осложнений в раннем послеоперационном периоде оценивалось с помощью расчета CCI (Comprehensive complication index) на момент выписки. В основной группе его медиана составила 0 (IQR: 0–22,6), в контрольной – 27,6 (IQR: 0–100), различия были статистически значимыми ($p = 0,001$). Аналогично статистически значимые различия были зафиксированы по времени нахождения реципиента в ОРИТ и общей длительности госпитализации ($p = 0,042$ и $p = 0,028$) – они были меньше в группе применения перфузионной консервации. Сравнительный анализ результатов трансплантации печени между группами представлен в табл. 1.

Влияние лабораторных параметров перфузии на клинические результаты трансплантации печени

В группе II применения гипотермической оксигенированной перфузионной консервации нами также было проанализировано влияние лабораторных параметров перфузата (АСТ и АЛТ), определяемых на

30-й минуте на результаты трансплантации в раннем послеоперационном периоде. Медиана уровня АСТ, определяемого в перфузате, составила 589 (IQR: 272–1712) ЕД/л, АЛТ – 482 (IQR: 214–1513). Уровни печеночных трансаминаз имели статистически значимые прямые корреляционные связи с пиковыми концентрациями таковых в крови реципиента в первую неделю после трансплантации. В частности, АСТ перфузата на 30-й минуте перфузии имела связи с пиковыми концентрациями АСТ и АЛТ в крови высокой тесноты ($p = 0,723$ и $p = 0,712$, $p < 0,001$ и $p < 0,001$). Концентрация АЛТ в перфузате также имела статистически значимые связи с трансаминазами крови, однако с меньшей теснотой связи ($p = 0,0662$ и $p = 0,389$, $p < 0,001$ и $p = 0,04$). Нами не было зафиксировано значимых связей уровня АСТ и АЛТ перфузата с концентрацией общего билирубина и значением МНО на 7-е сутки после трансплантации ($p > 0,05$). Длительность госпитализации в ОРИТ и общее время стационарного лечения также не были связаны с трансаминазами перфузата ($p > 0,05$). Результаты представлены в табл. 2.

Морфологическая оценка трансплантатов печени в зависимости от метода консервации

На рис. 4, а, представлен снимок электронной микроскопии фрагмента гепатоцита из образца 1.1 (печень перед началом перфузии). Хроматин в ядре имеет типичную организацию. Цитоплазма заполнена везикулами и митохондриями. Цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула не рас-

Таблица 2

Влияние лабораторных параметров перфузии на непосредственные результаты трансплантации печени

Influence of laboratory perfusion parameters on immediate liver transplant outcomes

Показатель	Уровень значимости (p-value)	Коэффициент корреляции ρ Спирмена
<i>АСТ перфузата на 30 мин перфузии</i>		
Пиковая концентрация АСТ в первую неделю	<0,001	0,723
Пиковая концентрация АЛТ в первую неделю	<0,001	0,712
МНО на 7-е сутки	0,63	–
Общий билирубин на 7-е сутки	0,34	–
CCI	0,212	–
Длительность нахождения в ОРИТ	0,79	–
Длительность госпитализации	0,43	–
<i>АЛТ перфузата на 30 мин перфузии</i>		
Пиковая концентрация АСТ в первую неделю	<0,001	0,662
Пиковая концентрация АЛТ в первую неделю	0,04	0,389
МНО на 7-е сутки	0,74	–
Общий билирубин на 7-е сутки	0,82	–
CCI	0,65	–
Длительность нахождения в ОРИТ	0,29	–
Длительность госпитализации	0,72	–

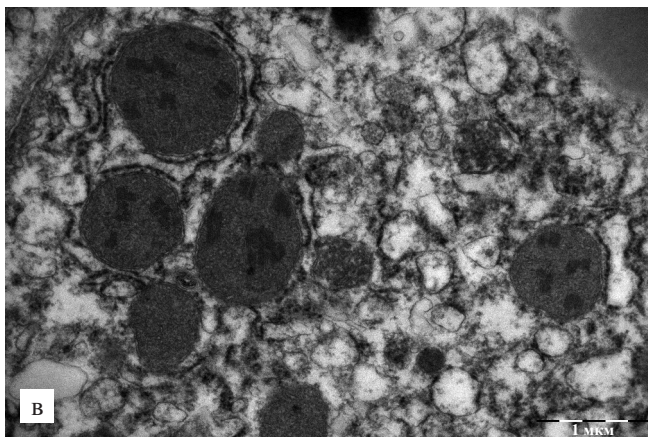
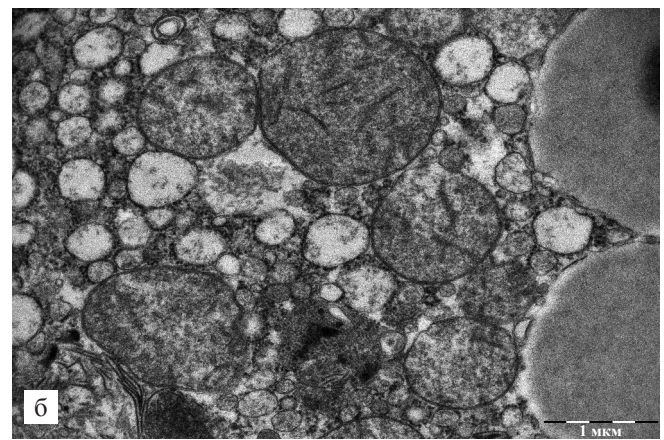
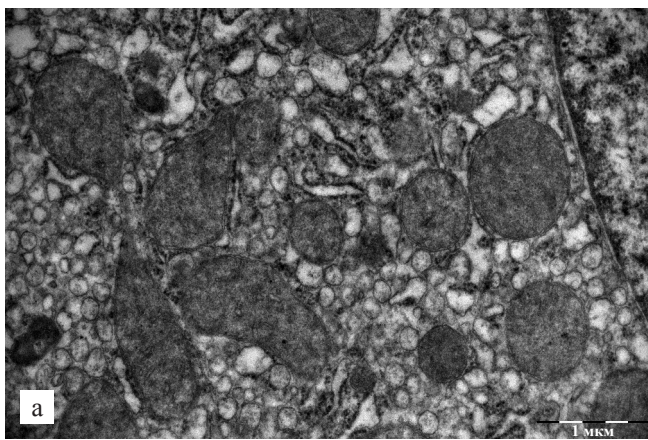


Рис. 4. Электронная микроскопия трансплантата печени: а – перед началом консервации (образец 1.1); б – после гипотермической оксигенированной перфузии (образец 1.2); в – после статической холодовой консервации (образец 1.3)

Fig. 4. Liver transplant electron microscopy: а – before preservation (sample 1.1); б – after HOPE (sample 1.2); в – after static cold storage (sample 1.3)

ширены. Матрикс митохондрий электронно плотный, кристы немногочисленные. Похожая картина наблюдалась в образце 1.2 (печень после гипотермической оксигенированной перфузии), за исключением незначительного просветления цитозоля и набухания цистерн гранулярного эндоплазматического ретикула. Ультраструктура митохондрий при этом не изменена (рис. 4, б). Напротив, при статической консервации печени (образец 1.3) в гепатоцитах были зафиксированы выраженные ультраструктурные изменения. Имела место существенная реорганизация структуры митохондрий, появление стопок мембран, набухание гранулярного эндоплазматического ретикула (рис. 4, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантация печени от доноров с расширенными критериями сопряжена с повышенным риском развития ранней дисфункции трансплантата и ассоциированных неблагоприятных последствий, что в очередной раз подтверждается представленными в данной работе результатами. В связи с этим разработка и внедрение технологий, направленных на профилактику ишемически-реперфузионного повреждения трансплантата печени, имеет безусловную актуальность.

Перфузионная консервация внедрена в клиническую практику трансплантации печени чуть более

10 лет назад, однако многими исследованиями уже доказала свое преимущество перед статическим холодным хранением. В работе Guarrera et al. (2010) использование гипотермической перфузии привело к снижению тяжести реперфузионного повреждения, меньшей частоте развития РДТП и длительности госпитализации [12]. Dutkowski et al. в 2014 году опубликовали успешный опыт трансплантации печени от контролируемых асистолических доноров, в котором гипотермическая оксигенированная перфузия имела результаты, сравнимые с таковыми после трансплантации от донора с констатированной смертью головного мозга [13]. В нашем исследовании применение гипотермической оксигенированной перфузии было также связано с лучшими результатами трансплантации печени в раннем послеоперационном периоде. По сравнению со статической консервацией степень ишемического повреждения печени после выполнения перфузии была менее значительной, что наглядно подтвердили результаты электронного микроскопического исследования. Интенсивность реперфузионного повреждения трансплантата, определяемая по пиковому уровню трансаминаз в течение первой недели, в группе перфузионной консервации была статистически значимо ниже, чем при статической консервации ($p < 0,05$). Мы не обнаружили статистически значимого снижения риска развития ранней дисфункции трансплантата ($p = 0,106$), одна-

ко связываем это с небольшим размером выборки. В то же время было отмечено достоверное снижение показателя CCI ($p = 0,001$), характеризующего распространенность послеоперационных осложнений, длительности нахождения реципиента в ОРИТ ($p = 0,042$) и стационарного лечения ($p = 0,028$).

Помимо уменьшения повреждения трансплантата печени в ходе консервации еще одним преимуществом использования гипотермической оксигенированной перфузии явилась возможность дополнительной оценки качества органа и его пригодности к трансплантации. Так, нами было выявлено, что уровни трансаминаз, определяемые в перфузате на 30-й минуте, имели прямые корреляционные связи с таковыми в крови реципиента после трансплантации ($p < 0,05$). Однако они не имели связи с непосредственными результатами трансплантации, в связи с чем прогностическая значимость данных маркеров ограничена. Тем не менее мы полагаем их определение целесообразным, поскольку при определении крайне высоких показателей АСТ и АЛТ в перфузате трансплантационная бригада может принять решение не выполнять трансплантацию ввиду неоправданного риска фатальных последствий. В своей практике мы имеем 4 подобных наблюдения, когда окончательное решение отказаться от трансплантации было принято на основании крайне высоких уровней АСТ в эффлюенте, определенных на 30-й минуте (более 6000 ЕД/л) перфузии. Полученные результаты согласуются с данными мировой литературы. В упомянутых работах Guaraga и Dutkowski уровни трансаминаз перфузата также имели статистически значимую связь с таковыми в крови реципиента после реперфузии, однако никак не влияли на прогноз реципиента [12–14]. На сегодняшний день многими авторами ведется поиск более точных маркеров, которые можно определять в ходе перфузионной консервации для оценки органа. В частности, определение в перфузирующем растворе маркеров митохондриального повреждения, к примеру FMN, в ряде работ продемонстрировало высокую эффективность в оценке пригодности органа, однако его широкое использование еще предстоит обосновать и доказать будущими исследованиями [14].

Несмотря на доказанную высокую эффективность перфузионной консервации при трансплантации печени от субоптимальных доноров, на сегодняшний день остается ряд нерешенных технических вопросов, касающихся ее применения. В частности, до конца не определено, имеет ли смысл дополнительная артериальная перфузия трансплантата («двойная» HOPE/DHOPE), или перфузии через портальную систему («классическая» HOPE) достаточно. Сторонники DHOPE предполагают, что данный вариант может позволить более эффективно осуществлять перфузию билиарного дерева, так как желчные протоки, в отличие от гепатоцитов, кровоснабжаются

только печеночной артерией. Поскольку развитие посттрансплантационной холангиопатии является одной из наиболее значимых проблем при ТП от маргинальных доноров (в частности, асистолических), профилактика ишемически-реперфузионного повреждения билиарной системы печени очень актуальна. С другой стороны, сторонники выполнения классической перфузии считают, что адекватное заполнение артериального русла перфузатом возможно за счет ретроградного тока, а дополнительные манипуляции с печеночной артерией могут привести к ее повреждению и развитию фатальных осложнений. Клинических исследований, демонстрирующих преимущество одного метода над другим, на сегодняшний день нет. Лишь в экспериментальной работе de Vries et al. (2021) в группе применения двойной перфузии были получены 2-кратное снижение пиковой концентрации аланинаминотрансферазы в перфузате ($p = 0,045$) и более низкая концентрация лактатдегидрогеназы в желчи ($p = 0,04$) по сравнению с классической HOPE [15]. При этом микроскопических признаков повреждения артерий не было ни в одной из групп. Безусловно, эти данные требуют клинического подтверждения, однако, по нашему мнению, дополнительная артериальная перфузия печени все же имеет несколько большую потенциальную эффективность по сравнению с классической. Мы полагаем, что прецизионная хирургическая техника работы с печеночной артерией и тщательный контроль потока и давления в артериальной перфузионной системе в действительности нивелируют риск ее повреждения в ходе процедуры.

Таким образом, гипотермическая оксигенированная перфузия *ex situ* является безопасным и эффективным методом консервации трансплантата печени. Ее применение при трансплантации печени от доноров с расширенными критериями позволяет снизить тяжесть ишемически-реперфузионного повреждения органа и дать дополнительную оценку пригодности органа к пересадке. Внедрение данной технологии, с одной стороны, позволяет качественно улучшить результаты трансплантации печени в послеоперационном периоде, а с другой – безопасно увеличить доступность трансплантационной помощи за счет использования субоптимальных доноров.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Eurotransplant Annual Report 2022. [Internet] Available from: <https://www.eurotransplant.org/statistics/annual-report/>.
2. Мойсюк ЯГ, Попцов ВН, Сушков АИ, Мойсюк ЛЯ, Малиновская ЮО, Бельских ЛВ. Ранняя дисфункция трансплантата печени: факторы риска, клиниче-

- ское течение и исходы. *Трансплантология*. 2016; (2): 16–28. Moysyuk YaG, Poptsov VN, Sushkov AI, Moysyuk LYa, Malinovskaya YuO, Belskikh LV. Early liver allograft dysfunction: risk factors, clinical course and outcomes. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2016; (2): 16–28. [In Russ, English abstract].
3. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl*. 2010; 16 (8): 943–949. doi: 10.1002/lt.22091.
 4. Lee DD, Croome KP, Shalev JA, Musto KR, Sharma M, Keaveny AP et al. Early allograft dysfunction after liver transplantation: an intermediate outcome measure for targeted improvements. *Ann Hepatol*. 2016; 15 (1): 53–60. doi: 10.5604/16652681.1184212.
 5. Hartog H, Hann A, Perera MTPR. Primary Nonfunction of the Liver Allograft. *Transplantation*. 2022; 106 (1): 117–128. doi: 10.1097/TP.0000000000003682.
 6. Федорук ДА, Кирковский ЛВ, Садовский ДН, Петренко КИ, Лебедь ОА, Федорук АМ и др. Влияние гипотермической оксигенированной машинной перфузии на степень ишемического повреждения трансплантатов печени. *Военная медицина*. 2020; (2): 68–75. Fedoruk DA, Kirkovsky LV, Sadovsky DN, Petrenko KI, Lebed' OA, Fedoruk AM et al. Influence of hypothermic oxygenated machine perfusion on the degree of ischemic damage of ecd liver grafts. *Military medicine*. 2020; (2): 68–75. [In Russ, English abstract].
 7. Czigany Z, Pratschke J, Froněk J, Guba M, Schöning W, Raptis DA et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Reduces Early Allograft Injury and Improves Post-transplant Outcomes in Extended Criteria Donation Liver Transplantation From Donation After Brain Death: Results From a Multicenter Randomized Controlled Trial (HOPE ECD-DBD). *Ann Surg*. 2021; 274 (5): 705–712. doi: 10.1097/SLA.0000000000005110.
 8. Mugaanyi J, Dai L, Lu C, Mao S, Huang J, Lu C. A Meta-Analysis and Systematic Review of Normothermic and Hypothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation. *J Clin Med*. 2022; 12 (1): 235. doi: 10.3390/jcm12010235.
 9. Шабунин АВ, Минина МГ, Дроздов ПА, Нестеренко ИВ, Макеев ДА, Журавель ОС и др. Первый опыт применения машинной холодовой оксигенированной перфузии почечного трансплантата от доноров с расширенными критериями. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (1): 143–150. Shabunin AV, Minina MG, Drozdov PA, Nesterenko IV, Makeev DA, Zhuravel OS et al. Early experiments with hypothermic oxygenated machine perfusion of kidney grafts from extended criteria donors. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (1): 143–150. doi: 10.15825/1995-1191-2022-1-143-150.
 10. Шабунин АВ, Минина МГ, Дроздов ПА, Севостьянов ВМ, Нестеренко ИВ, Макеев ДА и др. Асистолическое донорство почек с использованием автоматизированной системы компрессии грудной клетки и машинной оксигенированной холодовой перфузии (первый опыт в Российской Федерации). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (2): 102–107. Shabunin AV, Minina MG, Drozdov PA, Sevostianov VM, Nesterenko IV, Makeev DA et al. Asystole kidney donation using automated chest compression system and hypothermic oxygenated machine perfusion (first experience in the Russian Federation). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (2): 102–107. doi: 10.15825/1995-1191-2022-2-102-107.
 11. Шабунин АВ, Минина МГ, Дроздов ПА, Милосердов ИА, Сайдулаев ДА, Севостьянов ВМ и др. Комплексное использование перфузионных технологий при трансплантации почек от донора с внегоспитальной остановкой кровообращения (клинический случай). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (3): 113–121. Shabunin AV, Minina MG, Drozdov PA, Miloserdov IA, Saydulaev DA, Sevostyanov VM et al. Complex use of perfusion techniques in kidney transplantation from a donor with out-of-hospital cardiac arrest (clinical case). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (3): 113–121. doi: 10.15825/1995-1191-2023-3-113-121.
 12. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant*. 2010; 10 (2): 372–381. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02932.x.
 13. Dutkowski P, Schlegel A, de Oliveira M, Mullhaupt B, Neff F, Clavien PA. HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death. *J Hepatol*. 2014; 60: 765–772. doi: 10.1016/j.jhep.2013.11.023.
 14. Muller X, Schlegel A, Kron P, Eshmunov D, Würdinger M, Meierhofer D et al. Novel Real-time Prediction of Liver Graft Function During Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Before Liver Transplantation. *Ann Surg*. 2019; 270 (5): 783–790. doi: 10.1097/sla.0000000000003513.
 15. De Vries Y, Brüggewirth IMA, Karangwa SA, von Meijenfeldt FA, van Leeuwen OB, Burlage LC et al. Dual Versus Single Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion of Porcine Livers: Impact on Hepatobiliary and Endothelial Cell Injury. *Transplant Direct*. 2021; 7 (9): e741. doi: 10.1097/TXD.0000000000001184.

Статья поступила в редакцию 21.01.2024 г.

The article was submitted to the journal on 21.01.2024

ГИПОТЕРМИЧЕСКАЯ МАШИННАЯ ПЕРФУЗИЯ ДОНОРСКОЙ ПОЧКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПЫТНОГО РАСТВОРА НА ОСНОВЕ ДЕКСТРАНА-40 И ОРТОТОПИЧЕСКАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

В.Г. Шестакова¹, В.К. Богданов², Р.Д. Павлов¹, В.М. Терехов¹, А.С. Тимановский¹,
А.А. Жариков², А.Н. Шибаев^{1, 3}, Н.В. Грудинин²

¹ ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

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

Целью данного исследования являлась оценка эффективности гипотермической машинной перфузии донорской почки, полученной от асистолического донора, опытным раствором на основе декстрана-40 при последующей ортотопической трансплантации на модели кролика. **Материалы и методы.** В исследовании были использованы кролики породы серый великан массой 2500–3100 г, 20 особей, разделенных на доноров ($n = 10$) и реципиентов ($n = 10$). После изъятия донорской почки у асистолического донора проводилась процедура гипотермической машинной перфузии *ex vivo* левой донорской почки раствором на основе декстрана-40 и регистрация показателей периферического сосудистого сопротивления (ПСС), а также последующая билатеральная нефрэктомия и ортотопическая трансплантация. Срок наблюдения составлял 12 суток. В процессе наблюдения оценивали концентрацию креатинина, мочевины, скорость клубочковой фильтрации (СКФ). **Результаты.** При процедуре гипотермической перфузии донорской почки, полученной от асистолического донора, *ex vivo* было получено прогрессивное снижение ПСС с $1,90 \pm 0,27$ до $0,72 \pm 0,09$ мм рт. ст./мл/мин при $p < 0,001$. В раннем посттрансплантационном периоде, в течение первых 2 суток после имплантации, значения креатинина и мочевины имели умеренно высокие показатели по сравнению с нормальными. Значения креатинина и мочевины на 2-е сутки составили $91,07 \pm 11,49$ мкмоль/л при $p < 0,011$ и $9,09 \pm 1,06$ ммоль/л при $p < 0,009$ соответственно, но к 12-м суткам отмечалась регрессия до физиологических показателей $77,17 \pm 10,19$ мкмоль/л при $p < 0,019$ и $4,88 \pm 0,54$ ммоль/л при $p < 0,022$ соответственно. Данные результаты коррелировали с показателями СКФ: от 26,29 до 26,74 мл/мин/1,72 м² в средних значениях в течение 12 суток наблюдения. **Заключение.** Результаты демонстрируют, что гипотермическая машинная перфузия донорской почки *ex vivo* с использованием раствора на основе декстрана-40 оказывает положительное влияние на донорский орган после 30 минут тепловой ишемии после асистолии и позволяет достичь удовлетворительной функции трансплантата на протяжении 12 суток наблюдения.

Ключевые слова: трансплантология, ортотопическая трансплантация почки, гипотермическая перфузия почки *ex vivo*, декстран-40.

Для корреспонденции: Терехов Василий Максимович. Адрес: 170100, Тверская область, Тверь, ул. Советская, д. 4. Тел. (904) 015-84-76. E-mail: terekhov-200002@mail.ru

Corresponding author: Vasily Terekhov. 4, Sovetskaya str., Tver, Tver Oblast, 170100, Russian Federation. Phone: (904) 015-84-76. E-mail: terekhov-200002@mail.ru

HYPOTHERMIC MACHINE PERFUSION OF A DONOR KIDNEY USING AN EXPERIMENTAL DEXTRAN-40-BASED PRESERVATION SOLUTION AND ORTHOTOPIC TRANSPLANTATION (EXPERIMENTAL STUDY)

V.G. Shestakova¹, V.K. Bogdanov², R.D. Pavlov¹, V.M. Terekhov¹, A.S. Timanovsky¹,
A.A. Zharikov², A.N. Shibaev^{1, 3}, N.V. Grudinin²

¹ Tver State Medical University, Tver, Russian Federation

² Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russian Federation

³ Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russian Federation

Objective: to evaluate the efficacy of hypothermic machine perfusion (HMP) of a donor kidney obtained from a non-heartbeating (NHB) donor, using an experimental dextran-40-based preservation solution, in subsequent orthotopic transplantation in a rabbit model. **Materials and methods.** Twenty grey giant rabbits weighing 2,500–3,100 g, divided into donors (n = 10) and recipients (n = 10), were used in the study. After obtaining kidney from an NHB donor, *ex vivo* HMP of the left donor kidney using a dextran-40-based preservation solution was performed and peripheral vascular resistance (PVR) parameters were measured. This was followed by bilateral nephrectomy and orthotopic transplantation. The follow-up period was 12 days. Creatinine levels, urea levels, and glomerular filtration rate (GFR) were measured during follow-up. **Results.** During *ex vivo* HMP of donor kidneys from NHBs, PVR dropped progressively from 1.90 ± 0.27 mmHg/mL/min to 0.72 ± 0.09 mmHg/mL/min at $p < 0.001$. In the early post-transplant period (during the first 2 days after implantation), creatinine and urea levels were moderately elevated compared to normal. Creatinine and urea levels were 91.07 ± 11.49 μ mol/L at $p < 0.011$ and 9.09 ± 1.06 mmol/L at $p < 0.009$ on day 2, respectively, but by day 12, they reverted to physiologic values, which were 77.17 ± 10.19 μ mol/L at $p < 0.019$ and 4.88 ± 0.54 mmol/L at $p < 0.022$, respectively. These findings were correlated with GFR values, which ranged from 26.29 to 26.74 mL/min/1.72 m² in mean values over the course of a 12-day follow-up period. **Conclusion.** *Ex vivo* HMP using dextran-40-based preservation solution has a positive effect on the kidney at 30 minutes of warm ischemia following asystole and achieves satisfactory graft function over 12 days of follow-up.

Keywords: transplantology, orthotopic kidney transplantation, *ex vivo* hypothermic kidney perfusion, dextran 40.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация почки обрела наибольшее распространение среди всех выполняющихся трансплантаций органов в наше время [1]. Данная операция показана пациентам, страдающим от терминальной стадии хронической болезни почек (ХБП). Однако такие пациенты вынуждены ожидать донорскую почку, находясь на заместительной терапии (ЗПТ). Количество людей, находящихся на ЗПТ, существенно отличается в зависимости от государства. Так, в Исландии, Норвегии и Австралии на 1 млн населения приходится около 100 человек, находящихся на ЗПТ. В США и Тайване эта цифра составляет более 300 на 100 000. В России в год через эту процедуру проходят около 50 человек на 1 миллион населения [2]. Единственным радикальным способом помочь таким пациентам является трансплантация почки [3].

Несмотря на значительные достижения в области трансплантации солидных органов, в частности почки, а также совершенствование хирургических техник, открытыми остаются вопросы реабилитации донорских органов, полученных от асистолических доноров [3]. В настоящее время именно возможность

работы с трансплантатами почек от доноров из субоптимальной группы формирует новый вектор развития современной трансплантологии. Немалозначимым является экспериментальное исследование новых растворов и перфузионно-консервационных методик [4].

В мировой литературе представлено множество животных моделей для экспериментальных исследований. Каждая из описанных моделей обладает преимуществами и недостатками [5]. Для проведения экспериментального исследования была выбрана животная модель кролика с целью оценки эффективности гипотермической машинной перфузии опытным раствором на основе декстрана-40 трансплантата левой почки, полученной от асистолического донора, с последующей ортотопической трансплантацией.

Цель настоящего исследования: оценка эффективности гипотермической машинной перфузии донорской почки, полученной от асистолического донора, опытным перфузионным раствором на основе декстрана-40 при последующей ортотопической трансплантации на модели кролика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось на мужских особях кроликов породы серый великан массой 2100–3500 г ($n = 20$). Все экспериментальные животные были разделены на две равные группы – доноры ($n = 10$) и реципиенты ($n = 10$). Исследование выполнено в соответствии с правилами лабораторной практики в Российской Федерации: приказ Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.; приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.; Закон «О защите животных от жестокого обращения» от 01.12.1999 г., на проведение данного исследования было получено разрешение этического комитета Тверского ГМУ (протокол от 11.05.2018 г.).

Исследование проводилось по следующему протоколу: моделировалась остановка эффективного кровообращения у донора в течение 30 минут после предварительного введения гепарина, проводились фармако-холодовая консервация и изъятие левой донорской почки, гипотермическая перфузия донорской почки *ex vivo*, ортотопическая трансплантация левой донорской почки реципиенту после предварительной билатеральной нефрэктомии. Во время процедуры гипотермической перфузии *ex vivo* опытным раствором на основе декстрана-40 регистрировались показатели периферического сосудистого сопротивления (ПСС), с целью оценки функции трансплантата наблюдение за животными в послеоперационном периоде проводилось на протяжении 12 суток. Ежедневно в течение всего периода наблюдения проводилась иммуносупрессивная терапия метилпреднизолоном, отбирались пробы крови для исследования биохимических показателей – маркеров почечной функции. После окончания периода наблюдения отбирался гистологический материал трансплантата, животное выводилось из эксперимента.

Процедура эксплантации донорской почки

Для предоперационной подготовки животному-донору подкожно вводили Телазол 100 (Zoetis, Испания) 50 мг. В краевую вену уха устанавливали внутривенный катетер Vasofix Certo 22 G (BBraun, Германия). Для премедикации использовали атропин 0,2 мг и дексаметазон 2 мг внутривенно. Животное выбривали и позиционировали на спине. Внутривенно вводили Телазол 100 – 0,5 мл и Ксила (Interchemie, Нидерланды) – 0,5 мл (10 мг). Выполняли лапаротомию, получали возможность визуализации брюшной аорты и нижней полой вены с отходящими от них почечными артериями и венами. Задний листок париетальной брюшины вскрывали в районе ворот почки, после чего выделяли и мобилизовали левую почечную артерию (ПА) и левую почечную вену (ПВ). Помимо почечных сосудов также выделяли, мобили-

зовывали на достаточном протяжении (около 7–9 см от почки) левый мочеточник. Далее внутривенно вводили гепарин 5000 ЕД, экспозиция составляла 3 минуты. Следом устанавливали сосудистый зажим на магистральные сосуды выше почечных артерий и внутривенно вводили 10 мл 4% калия хлорида для остановки сердечной деятельности. Спустя 30 минут экспозиции после асистолии через аорту в левую почечную артерию заводили внутривенный катетер 20 G, пересекали левую почечную вену, инициировали фармако-холодовую консервацию левой почки раствором «Кустодиол» 4 °C в объеме 60 мл.

Процедура гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo*

Для процедуры гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* предварительно выполняли сборку экстракорпорального контура. Перфузионный контур состоял из шагового роликового насоса, блока инвазивного измерения давления, термодатчика, двух емкостей – для позиционирования трансплантата почки и емкости для льда, перфузионных магистралей и перфузионной канюли. Схематичное изображение экстракорпорального контура представлено на рис. 1.

Перфузионный контур заполняли 100 мл раствора на основе декстрана-40 4 °C и добавляли гепарин 1000 ЕД. После проведенной фармако-холодовой консервации в почечную артерию левой донорской почки устанавливали внутривенный катетер 20 G, выполняли деаэрацию и коннекцию перфузионной магистрали к катетеру. Процедура гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* проводилась с регуляцией по давлению. Целевым значением давления являлось 30 мм рт. ст., допустимые диапазоны 28–36 мм рт. ст. Начальная объемная скорость перфузии составляла $5 \pm 1,1$ мл/мин с постепенным

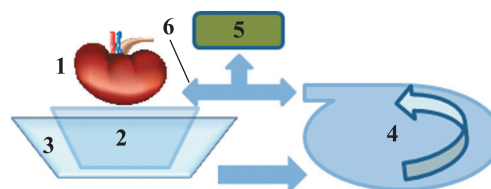


Рис. 1. Схема устройства экстракорпорального контура для гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo*. 1 – донорская почка; 2 – емкость для органа с перфузионным раствором; 3 – емкость со льдом; 4 – перистальтический насос; 5 – блок инвазивного измерения давления; 6 – термодатчик

Fig. 1. Schematic diagram of the extracorporeal hypothermic perfusion device for *ex vivo* donor kidney preservation. 1 – donor kidney; 2 – organ reservoir with perfusate; 3 – ice reservoir; 4 – peristaltic pump; 5 – invasive pressure measurement unit; 6 – temperature sensor

увеличением в течение 30 минут до 50 ± 15 мл/мин. Периферическое сосудистое сопротивление являлось расчетным показателем, вычисляемым по формуле: $R = P/V$, где R – сопротивление, P – давление в мм рт. ст., V – объемная скорость перфузии в мл/мин, и отображало податливость сосудистого русла трансплантата почки, что являлось предиктором восстановления почечной функции после имплантации. Длительность процедуры составляла 240 минут, и по окончании гипотермической перфузии выполнялась повторная фармако-холодовая консервация донорской почки раствором «Кустодиол».

Процедура ортотопической трансплантации левой донорской почки

После предварительного 4-часового режима голода животное-реципиент подготавливалось к операции. Индукция в анестезию выполнялась аналогично донорскому этапу. Витальные функции животных-реципиентов оценивали по показателям пульсоксиметрии ($SpO_2 > 90\%$, ЧСС = 180–230/мин), а также визуально проводили подсчет дыхательных движений (ЧДД > 45 /мин). При лапаротомии петли кишечника извлекали в правую сторону и оборачивали в стерильные салфетки, заранее смоченные согретым физиологическим раствором. После выделения и мобилизации сосудов почек реципиента, а также выделения мочеточников внутривенно вводили гепарин 100 ЕД, проводили билатеральную нефрэктомию. Кровоток через почечную артерию и вену останавливали путем наложения сосудистых зажимов типа «бульдог». Культы сосудистой ножки

правой почки прошивали и перевязывали шовным материалом Prolene 5.0, мочеточник перевязывался каудальнее к мочевому пузырю шовным материалом Prolene 5.0. Культы левых ПА и ПВ реципиента оставляли достаточными для наложения анастомоза, их длина составляла 3–4 см для ПА и ПВ. Вначале выполняли анастомоз «конец в конец» между почечной веной донорской почки и культей левой почечной вены реципиента. Заднюю стенку ушивали непрерывным обвивным швом шовным материалом Prolene 6.0, переднюю стенку ушивали узловыми швами. После наложения венозного анастомоза и проверки качества гемостаза венозного шва накладывали артериальный анастомоз «конец в конец» между почечной артерией донорской почки и культей левой почечной артерии реципиента шовным материалом Prolene 7.0. Анастомозирование артерий производили при помощи узловых швов. Перед наложением последнего шва выполняли дэаэрацию, артерия обрабатывалась лидокаином 2% для предотвращения вазоспазма, внутривенно вводили метилпреднизолон 20 мг, выполнялся пуск кровотока (рис. 2).

Показателем восстановления функции почки являлось появление оттекающей через культю мочеточника мочи после запуска кровотока по почечным сосудам. Спустя 60 минут после начала операции для поддержания анестезии внутривенно вводили Телазол 100 – 0,5 мл и Ксила – 0,5 мл. Окончательным этапом трансплантации почки являлось наложение анастомоза мочеточника. Наложение мочеточникового анастомоза «конец в конец» между культей мочеточника реципиента и мочеточником, идущим от донорской почки, проводили с помощью стента – в/в катетера 20 G и оставляли его внутри просвета. Накладывали 4 узловых шва шовным материалом Prolene 7.0 равномерно по всей окружности мочеточника, после чего почку фиксировали к почечному ложу отдельными узловыми швами между жировой капсулой почки и окружающими тканями. После трансплантации почки петли кишечника помещали обратно в брюшную полость и проводили послойное ушивание раны.

Забор материала на гистологическое исследование проводился на 12-е сутки с помощью плановой эксцизионной биопсии почки, фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине («Биовитрум», Россия), дегидратировали в 8 сменах изопропанола, начиная с 50% водного раствора изопропанола, заливали в парафиновую среду Гистомикс («Биовитрум», Россия) с использованием заливочного модуля ESD-2800 (МедТехникаПоинт, Россия). Тонкие парафиновые срезы толщиной 4–6 мкм, полученные на полуавтоматическом ротационном микротоме ERM 3100 (Hestion, Австралия), окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопическое изучение полученного экспериментального материала

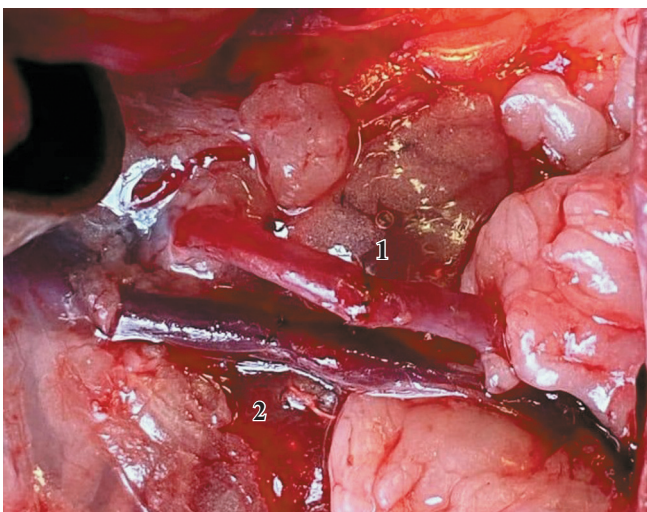


Рис. 2. Выполненные сосудистые анастомозы при имплантации донорской почки: 1 – анастомоз почечной артерии; 2 – анастомоз почечной вены

Fig. 2. Vascular anastomoses performed during donor kidney implantation: 1 – renal artery anastomosis; 2 – renal vein anastomosis

проводили с помощью микроскопа Olympus CX21 на малом ($\times 100$), большом ($\times 400$) увеличениях и масляной иммерсии ($\times 1000$). Микрофотографии получали цифровой фотокамерой MC-10 (ЛОМО, Россия), компьютерная обработка полученных снимков осуществлялась в ПО MCview.

Статистический анализ проводился с использованием программы StatTech v. 3.1.10 (разработчик ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро–Уилка (число исследуемых менее 50). Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (М) и стандартных отклонений (SD), границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). Для сравнения трех и более связанных групп по нормальному распределенному количественному признаку применялся однофакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями. Статистическая значимость изменений показателя в динамике оценивалась с помощью следа Пиллая (Pillai's Trace). Апостериорный анализ проводился с помощью парного t-критерия Стьюдента с поправкой Холма. При сравнении трех и более зависимых совокупностей, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический критерий Фридмана с апостериорными сравнениями с помощью критерия Коновера–Имана с поправкой Холма. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика изменения периферического сосудистого сопротивления при гипотермической перфузии

Во время гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* проводилась регистрация таких параметров, как давление в почечной артерии и объемная скорость потока. На основе данных этих параметров вычислялся объективный показатель – периферическое сосудистое сопротивление, измеряемое инвазивным методом непосредственно в почечной артерии в течение 240 минут, что изображено на рис. 3.

При исследовании ПСС регистрировались высокие значения в начале процедуры и спустя 30 минут, что отражалось значениями $1,90 \pm 0,27$ мм рт. ст./мл/мин и являлось последствием предшествующей изъятию асистолии в течение 30 минут. Однако к концу процедуры значения ПСС снижались и соответствовали физиологическим значениям для экспериментальных животных $0,72 \pm 0,09$ мм рт. ст./мл/мин.

Динамика изменения биохимических показателей после трансплантации

Основными регистрируемыми биохимическими показателями в посттрансплантационном периоде являлись концентрация креатинина (рис. 4), концентрация мочевины (рис. 5), а также расчетный показатель – скорость клубочковой фильтрации (СКФ), вычисленный по формуле Шварца: $СКФ = 36,5 \times$ (длина кролика от головы до хвоста в см / креатинин

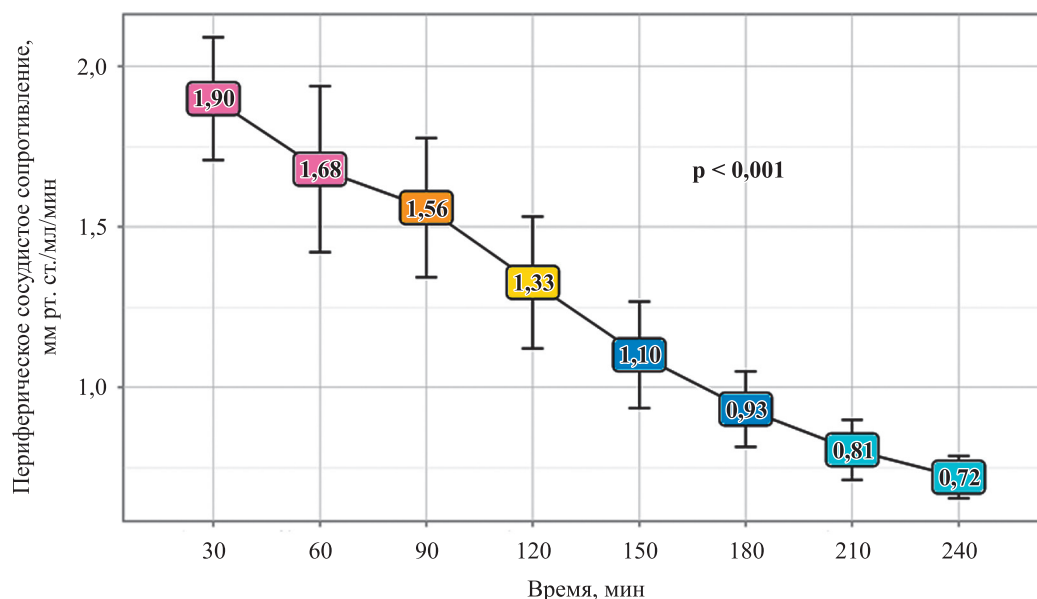


Рис. 3. Динамика изменения периферического сосудистого сопротивления во время гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo*. График представлен средними значениями, вертикальными линиями обозначены стандартные отклонения, p – статистическая значимость

Fig. 3. Changes in peripheral vascular resistance during *ex vivo* hypothermic perfusion of donor kidney. The graph is represented by mean values, vertical lines denote standard deviations, p is statistical significance

сыворотки в мкмоль/л), что графически изображено на рис. 6.

Креатинин, как основной маркер почечной функции, отражал экскреторную функцию трансплантата у животных-реципиентов. На вторые сутки после трансплантации во всех наблюдениях отме-

чался прирост концентрации креатинина до $91,07 \pm 11,49$ мкмоль/л. Однако к концу периода наблюдения концентрация креатинина не превышала предельные значения физиологической нормы и составляла в совокупности $77,17 \pm 10,19$ мкмоль/л. Нелинейность графика колебаний концентрации креатинина отра-

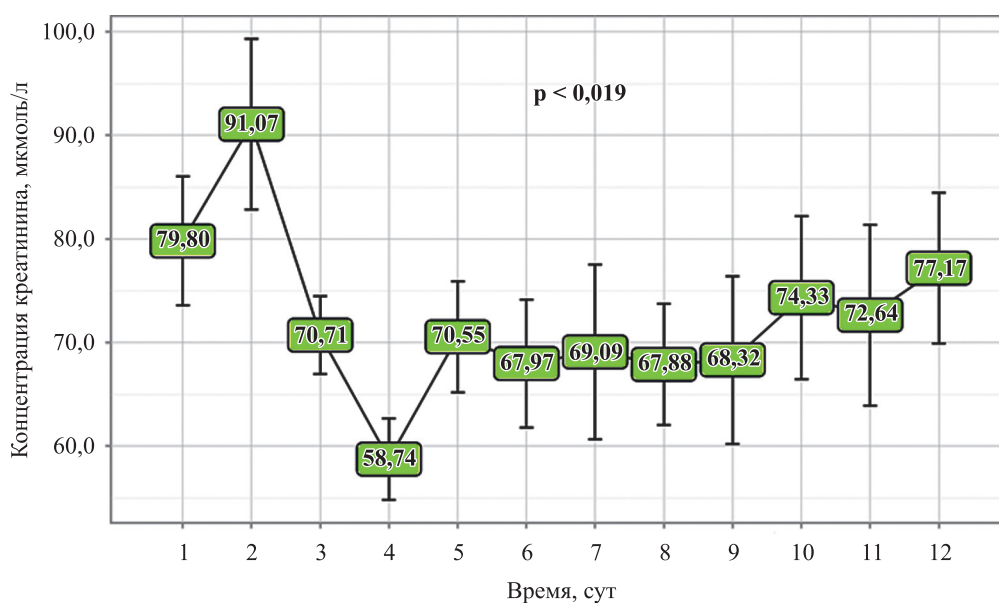


Рис. 4. Динамика изменения концентрации креатинина после трансплантации донорской почки у животных-реципиентов. График представлен средними значениями, вертикальными линиями обозначены стандартные отклонения, p – статистическая значимость

Fig. 4. Changes in creatinine levels after donor kidney transplantation in recipient animals. The graph is represented by mean values, vertical lines indicate standard deviations, p is statistical significance

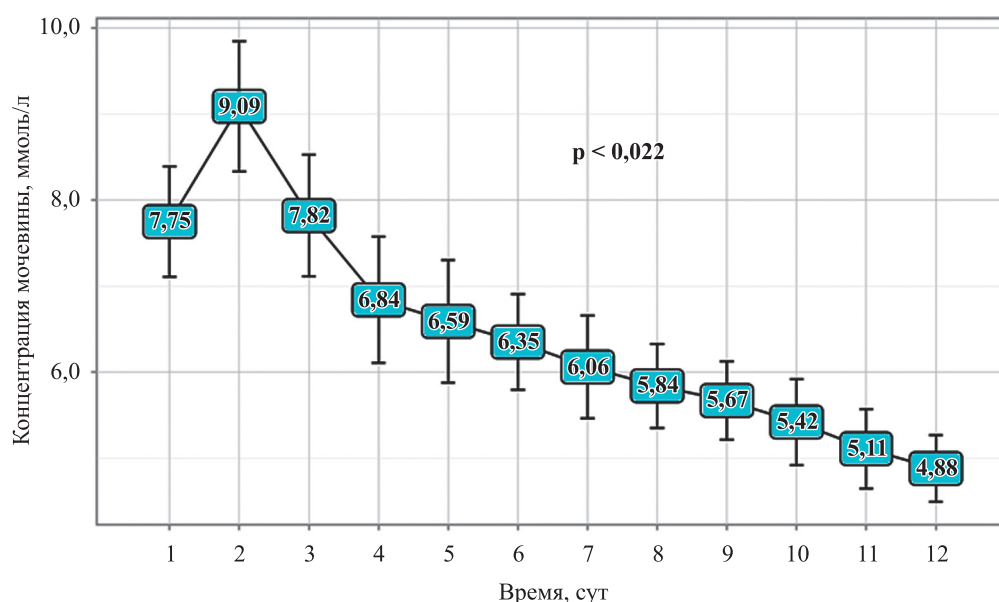


Рис. 5. Динамика изменения концентрации мочевины после трансплантации донорской почки у животных-реципиентов. График представлен средними значениями, вертикальными линиями обозначены стандартные отклонения, p – статистическая значимость

Fig. 5. Changes in urea levels after donor kidney transplantation in recipient animals. The graph is represented by mean values, vertical lines indicate standard deviations, p is statistical significance

жает физиологичную жизнедеятельность реципиентов в посттрансплантационном периоде.

Изменение концентрации мочевины также отражало состояние экскреторной функции трансплантата. На вторые сутки наблюдения отмечался пик средних показателей мочевины до $9,09 \pm 1,06$ ммоль/л, что коррелировало с показателями концентрации

креатинина. Однако в течение всего времени наблюдения кривая концентрации мочевины имела нисходящий характер, на 12-е сутки показатели приближались к физиологической норме и составляли $4,88 \pm 0,54$ ммоль/л.

Скорость клубочковой фильтрации (СКФ) являлась объективным показателем функционального

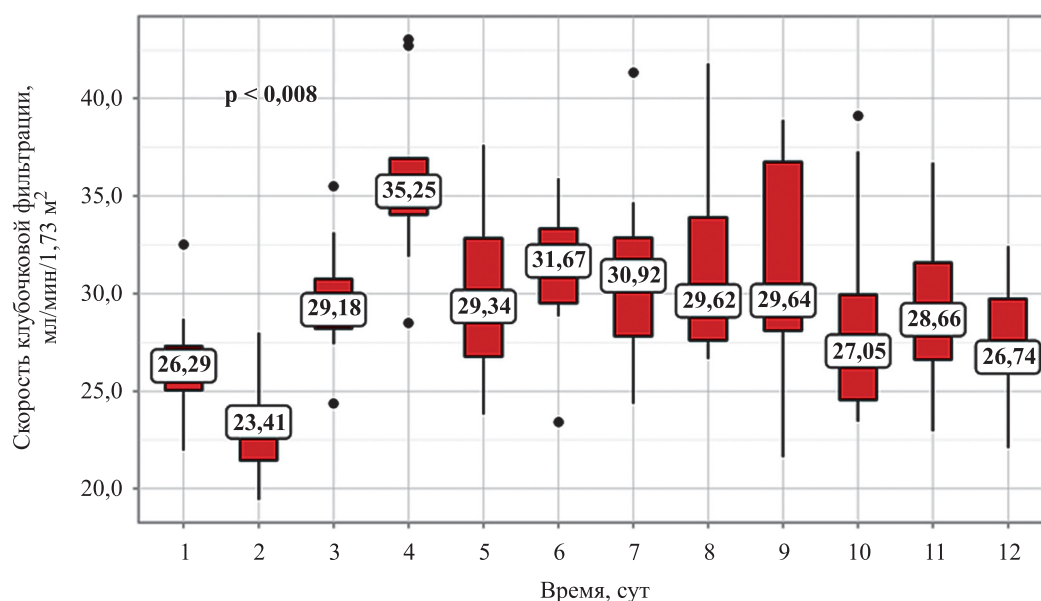


Рис. 6. Динамика изменения СКФ после трансплантации донорской почки у животных-реципиентов. График представлен средними значениями, вертикальными линиями обозначены стандартные отклонения, p – статистическая значимость

Fig. 6. GFR changes after donor kidney transplantation in recipient animals. The graph is represented by mean values, vertical lines denote standard deviations, p is statistical significance

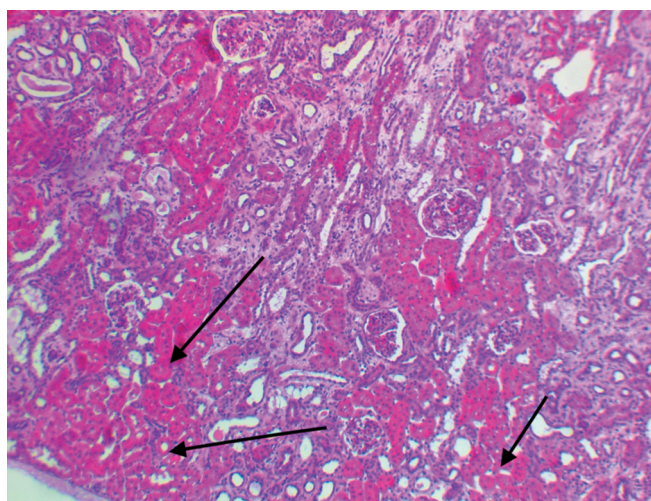


Рис. 7. Гистологический препарат ткани почки на 12-е сутки после трансплантации. Окраска H&E, $\times 100$. Стрелками отмечены очаги некроза эпителия почечных канальцев

Fig. 7. Histological kidney tissue slide at 12 days after transplantation. H&E, $\times 100$. Arrows indicate foci of renal tubule epithelium necrosis

статуса трансплантата с поправкой на малую площадь поверхности тела экспериментальных животных. В раннем посттрансплантационном периоде отмечалась вариабельность СКФ от 26,29 до 29,18 мл/мин/1,72 м² в средних значениях, а к концу периода наблюдения средние значения СКФ составили 26,74 мл/мин/1,72 м². Изменения показателей СКФ в течение 12 суток не выходили за границы физиологических норм экспериментальных животных.

Результаты оценки биохимических показателей наглядно демонстрируют сохранность экскреторной функции трансплантата на протяжении 12 суток, а физиологические значения СКФ позволяют сделать вывод об удовлетворительном функциональном статусе донорской почки.

Гистологические исследования после трансплантации

По данным гистологического исследования (рис. 7) 10 биоптатов, полученных от кроликов-реципиентов, морфологические изменения представлены

наличием признаков дистрофических изменений в виде внутриклеточных включений и диффузных очагов некроза эпителия (на рисунке отмечены черными стрелками) как проксимальных, так и дистальных канальцев. Также присутствует полиморфноклеточная инфильтрация, занимающая от 10 до 25% паренхимы. Наличие признаков атрофии канальцев не более чем на 25% коркового вещества указывает на начало развития трансплантационной гломерулопатии [7].

ОБСУЖДЕНИЕ

Реализация возможности работы с донорскими органами после остановки кровообращения является перспективным направлением развития современной трансплантологии [8]. На сегодняшний день перфузия *ex vivo* донорских органов позволяет расширить пул доноров более чем на 25%, и с каждым годом цифра только растет. Таким образом, экспериментальное изучение гипотермической перфузии, влияния методики перфузии *ex vivo*, а также последующее клиническое внедрение в перспективе обеспечат рост количества трансплантаций [9].

Исследование новых перфузионных растворов чрезвычайно актуально. В настоящее время открытым дискуссионным вопросом остается выбор перфузионного агента для гипо- или нормотермической перфузии *ex vivo* [10]. Несмотря на существующие и внедренные клинические протоколы, идеального перфузионного агента так и не было найдено [11]. В данном исследовании описано применение раствора на основе декстрана-40. За счет высоких коллоидных и реологических свойств декстрана-40, а также умеренной величины молекулы именно этот компонент обладает преимуществом для применения в процедуре гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo*. Так, в исследовании S. Lindell et al. изучалось влияние общепринятых перфузионных ГЭК-содержащих растворов с высоким содержанием калия для гипотермической перфузии донорской почки – Belzer MPS и UW Viaspan. Несмотря на успешно проведенные процедуры, в результатах описывались умеренный интерстициальный отек трансплантатов и средней степени тяжести посттрансплантационные изменения [12]. В свою очередь, использование декстрана-40 препятствует интерстициальному отеку ткани донорской почки на протяжении длительной перфузии за счет уникального свойства связывать молекулы воды, а молекулы декстрана препятствуют деструкции структурной единицы почки, не вызывая разрыва и окклюзии нефрона, в отличие от альбуминовых растворов и ГЭК-содержащих агентов [13].

В процессе гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* отмечались высокие значения ПСС, что являлось следствием предварительной 30-минутной асистолии у донора. На протяжении всей процедуры перфузии отмечалось снижение показателей ПСС во

всех случаях, а значения приходили к нормальным к окончанию перфузии, что являлось доказательством эффективности гипотермической перфузии *ex vivo* для реабилитации донорских почек с расширенными критериями. После трансплантации таких почек наблюдались физиологические показатели биохимических маркеров почечной функции, не превышающие пограничных значений предельно допустимых границ [14]. Функция трансплантата была сохранена во всех случаях, что является свидетельством эффективности гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* и коррелирует с данными, полученными во время перфузии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное исследование показало допустимость использования раствора на основе декстрана-40 в качестве перфузионного агента для процедуры гипотермической перфузии донорской почки *ex vivo* и продемонстрировало сохранность функциональных характеристик трансплантата после трансплантации в эксперименте на кроликах. Результаты данной работы, безусловно, диктуют необходимость проведения более глубокого изучения патофизиологических аспектов влияния гипотермической перфузии с использованием декстрана-40 на трансплантат почки как в раннем постреперфузионном периоде, так и в отдаленном.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Кабанова СА, Богопольский ПМ. Пересадка почки: история, итоги и перспективы (к 50-летию первой успешной пересадки почки в России). *Трансплантология*. 2015; 2: 55–56. Kabanova SA, Bogopol'skiy PM. Kidney transplant: history, results and perspectives (The 50th anniversary of the first successful kidney transplant in Russia). *Journal of Transplantology*. 2015; 2: 55–56.
2. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0158765. doi: 10.1371/journal.pone.0158765.
3. Tsai WC, Wu HY, Peng YS, Ko MJ, Wu MS, Hung KY et al. Risk Factors for Development and Progression of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Exploratory Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95 (11): e3013. doi: 10.1097/MD.0000000000003013.
4. Готье СВ, Цирульникова ОМ, Пашков ИВ, Олешкевич ДО, Филатов ИА, Богданов ВК и др. Нормотермическая *ex vivo* перфузия изолированных легких в эксперименте с использованием отечественного перфузионного аппаратного комплекса. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (2):

- 94–101. Gautier SV, Tsurulnikova OM, Pashkov IV, Oleshkevich DO, Filatov IA, Bogdanov VK et al. Normothermic *ex vivo* perfusion of isolated lungs in an experiment using a russian-made perfusion system. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (2): 94–101. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2022-2-94-101>.
5. Готье СВ, Пашиков ИВ, Богданов ВК, Олешкевич ДО, Бондаренко ДМ, Можейко НП и др. *Ex vivo* перфузия донорских легких с использованием разработанного раствора с последующей ортотопической левосторонней трансплантацией легкого (экспериментальное исследование). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (2): 158–166. Gautier SV, Pashkov IV, Bogdanov VK, Oleshkevich DO, Bondarenko DM, Mozheiko NP et al. Normothermic *ex vivo* lung perfusion using a developed solution followed by orthotopic left lung transplantation (experimental study). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (2): 158–166. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2023-2-158-166>.
6. Грудинин НВ, Богданов ВК, Шаранов МГ, Буненков НС, Можейко НП, Гончаров РГ и др. Применение пероксиредоксина для preconditionирования трансплантата сердца крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (2): 158–164. Grudinin NV, Bogdanov VK, Sharapov MG, Bunenkov NS, Mozheiko NP, Goncharov RG et al. Use of peroxiredoxin for preconditioning of heterotopic heart transplantation in a rat. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (2): 158–164. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-158-164>.
7. Суханов АВ. Banff-классификация патологии аллотрансплантата почки. *Нефрология и диализ*. 2000; 2 (1–2): 58–62. Suhanov AV. Banff's Classification Of Renal Allograft Pathology. *Nephrology and Dialysis*. 2000; 2 (1–2): 58–62.
8. Brat A, de Vries KM, van Heurn EWE, Huurman VAL, de Jongh W, Leuvenink HGD et al. Hypothermic Machine Perfusion as a National Standard Preservation Method for Deceased Donor Kidneys. *Transplantation*. 2022 May; 106 (5): 1043–1050. doi: 10.1097/TP.00000000000003845.
9. Peng P, Ding Z, He Y, Zhang J, Wang X, Yang Z. Hypothermic Machine Perfusion Versus Static Cold Storage in Deceased Donor Kidney Transplantation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Artif Organs*. 2019 May; 43 (5): 478–489. doi: 10.1111/aor.13364. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30282122.
10. Simona MS, Alessandra V, Emanuela C, Elena T, Michela M, Fulvia G et al. Evaluation of Oxidative Stress and Metabolic Profile in a Preclinical Kidney Transplantation Model According to Different Preservation Modalities. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 5; 24 (2): 1029. doi: 10.3390/ijms24021029. PMID: 36674540; PMCID: PMC9861050.
11. Zulpait R, Miknevičius P, Leber B, Strupas K, Stiegler P, Schemmer P. Ex-vivo Kidney Machine Perfusion: Therapeutic Potential. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 24; 8: 808719. doi: 10.3389/fmed.2021.808719. PMID: 35004787; PMCID: PMC8741203.
12. Lindell SL, Compagnon P, Mangino MJ, Southard JH. UW Solution for Hypothermic Machine Perfusion of Warm Ischemic Kidneys. *Transplantation*. 2005 May 27; 79 (10): 1358–1361. doi: 10.1097/01.TP.0000159143.45022.F6.
13. Elliott TR, Nicholson ML, Hosgood SA. Normothermic kidney perfusion: An overview of protocols and strategies. *Am J Transplant*. 2021 Apr; 21 (4): 1382–1390. doi: 10.1111/ajt.16307. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32897651.
14. Campos Pamplona C, Moers C, Leuvenink HGD, van Leeuwen LL. Expanding the Horizons of Pre-Transplant Renal Vascular Assessment Using *Ex Vivo* Perfusion. *Curr Issues Mol Biol*. 2023 Jun 29; 45 (7): 5437–5459. doi: 10.3390/cimb45070345. PMID: 37504261; PMCID: PMC10378498.

Статья поступила в редакцию 05.02.2024 г.
The article was submitted to the journal on 05.02.2024

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-82-93

ГИПЕРПАРАТИРЕОЗ У КАНДИДАТОВ НА ТРАНСПЛАНТАЦИЮ ПОЧКИ И ФУНКЦИЯ ОКОЛОЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ У РЕЦИПИЕНТОВ В РАННИЕ СРОКИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА

О.Н. Ветчинникова

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

Цель: оценить влияние вторичного гиперпаратиреоза (ГПТ) у пациентов-кандидатов, ожидающих трансплантацию почки, на функцию околощитовидных желез реципиентов в течение первого послеоперационного года. **Материалы и методы.** В ретроспективное когортное исследование включены 210 пациентов (103 женщины, 107 мужчин, возраст 45 ± 9 лет) с хронической болезнью почек 5–5 (Д) ст., перенесших трансплантацию трупной почки. Биохимическое исследование до трансплантации почки и в послеоперационном периоде через 3 и 12 мес. включало определение сывороточных концентраций паратиреоидного гормона (ПТГ), кальция, фосфора, активности щелочной фосфатазы, альбумина и креатинина стандартными методиками. Концентрации ПТГ крови 130–595 пг/мл и ≤ 130 пг/мл были приняты за целевой уровень соответственно в пред- и посттрансплантационном периоде. **Результаты.** ГПТ имели 56 (1-я группа), целевой уровень ПТГ крови – 154 (2-я группа) кандидата на трансплантацию почки. ПТГ крови составил соответственно 897 (722; 1136) и 301 (229; 411) пг/мл, $p < 0,001$. Через 3 мес. после трансплантации почки ПТГ крови снизился у всех реципиентов: в 1-й группе на 595 (420; 812), во 2-й – на 148 (77; 230) пг/мл, $p < 0,001$, и составил соответственно 254 (180; 455) и 150 (118; 212) пг/мл, $p < 0,001$; целевой уровень определялся соответственно у 10,7 и 42,2% реципиентов, $p < 0,001$. Через 12 мес. ПТГ крови составил в 1-й группе 171 (94; 239) пг/мл, во 2-й – 112 (90; 135) пг/мл, $p = 0,004$, целевой уровень определялся соответственно у 48,2 и 73,4% реципиентов, $p < 0,001$. Функция почечного трансплантата была идентичной в обеих группах реципиентов: острый канальцевый некроз у 41,1 и 54,5%, через 3 мес. медиана скорости клубочковой фильтрации 60 и 65 мл/мин (н. д.), через 12 мес. – 56 и 54 мл/мин (н. д.). Посттрансплантационный ПТГ крови находился в прямой корреляционной зависимости от предоперационного в обеих группах и в обратной – с функцией почечного трансплантата у реципиентов 2-й группы. **Заключение.** ГПТ у кандидатов на трансплантацию почки является главным, не зависящим от функции трансплантата предиктором избыточной секреции ПТГ у реципиентов, увеличивая риск персистенции ГПТ в 1,9 раза через год после трансплантации почки.

Ключевые слова: трансплантация почки, околощитовидные железы, вторичный гиперпаратиреоз, хроническая болезнь почек.

Для корреспонденции: Ветчинникова Ольга Николаевна. Адрес: 129110, Москва, ул. Щепкина, 61/2. Тел. (916) 532-49-00. E-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

Corresponding author: Olga Vetchinnikova. Address: 61/2, Shchepkina str., Moscow, 129110, Russian Federation. Phone: (916) 532-49-00. E-mail: olg-vetchinnikova@yandex.ru

HYPERPARATHYROIDISM IN KIDNEY TRANSPLANT CANDIDATES AND POSTOPERATIVE PARATHYROID GLAND FUNCTION IN RECIPIENTS

O.N. Vetchinnikova

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

Objective: to evaluate the effects of secondary hyperparathyroidism (HPT) in kidney transplantation (KT) candidates on recipients' parathyroid gland function in the first postoperative year. **Materials and methods.** The retrospective cohort study included 210 patients (103 women, 107 men, age 45 ± 9 years) with stage 5 chronic kidney disease (stage 5 CKD, including dialysis-dependent patients), who had undergone cadaveric KT. Biochemical screening before kidney transplantation and in the postoperative period at 3 and 12 months determined serum levels of parathyroid hormone (PTH), calcium, phosphorus, alkaline phosphatase activity, albumin and creatinine using standard methods. PTH levels of 130–595 pg/mL and ≤ 130 pg/mL were taken as the target level in the pre- and post-transplant periods, respectively. **Results.** Fifty-six KT candidates (group 1) had HPT and 154 (group 2) had the target PTH levels. PTH level was 897 (722; 1136) and 301 (229; 411) pg/mL, respectively, $p < 0.001$. PTH decreased in all recipients at 3 months after KT: by 595 (420; 812) in group 1 and 148 (77; 230) pg/mL in group 2, $p < 0.001$, to 254 (180; 455) and 150 (118; 212) pg/mL, respectively, $p < 0.001$; the target level was detected in 10.7% and 42.2% of recipients, respectively, $p < 0.001$. At 12 months, blood PTH was 171 (94; 239) pg/mL in group 1 and 112 (90; 135) pg/mL in group 2, $p = 0.004$; target level was found in 48.2% and 73.4% of recipients, respectively, $p < 0.001$. Kidney graft function was identical in both recipient groups: acute tubular necrosis in 41.1% and 54.5%; at 3 months, median glomerular filtration rates (GFR) of 60 and 65 mL/min (n.d.); at 12 months, 56 and 54 mL/min (n.d.). Post-transplant PTH levels correlated directly with preoperative levels in both groups and inversely with renal graft function in group 2 recipients. **Conclusion.** HPT in kidney transplant candidates is a major, graft function-independent predictor of excess PTH secretion in recipients, increasing the risk of persistent HPT 1.9-fold, one year after KT.

Keywords: kidney transplantation, parathyroid glands, secondary hyperparathyroidism, chronic kidney disease.

ВВЕДЕНИЕ

Вторичный гиперпаратиреоз (ГПТ) – универсальное осложнение, ассоциированное с хронической болезнью почек (ХБП). Его развитие инициируется снижением почечной функции, которое запускает каскад физиологических и патофизиологических процессов, приводящих к избыточной секреции паратиреоидного гормона (ПТГ) околотитовидными железами (ОЦЖ). ГПТ у пациентов с ХБП относится к распространенной патологии, особенно на этапе диализной терапии. Заболевание сопровождается поражением многих органов и систем, существенно ухудшает качество жизни пациентов и увеличивает летальность. Несмотря на персонализированный подход, появление новых лекарственных средств, трудности в коррекции вторичного ГПТ сохраняются [1–5].

Трансплантация почки представляет собой наилучший метод лечения пациентов с ХБП 5-й ст., и количество таких операций ежегодно увеличивается [6]. Сложившаяся в последнее время ситуация – рост числа пациентов с ХБП, в том числе диализной популяции с высокой распространенностью вторичного ГПТ, а также увеличивающееся количество

во трансплантаций почки – неизбежно приводит к тому, что среди кандидатов на трансплантацию почки встречаются пациенты, страдающие различной степени тяжести вторичным ГПТ. Успешная трансплантация почки изменяет течение ГПТ – приводит либо к полному регрессу, либо к персистенции процесса. Последний оказывает негативное влияние на клинические исходы реципиентов почечного трансплантата. В публикациях последних лет обсуждаются различные аспекты посттрансплантационного ГПТ: факторы риска развития, влияние на функцию почечного трансплантата, качество жизни и выживаемость пациентов [7–11].

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния вторичного ГПТ у кандидатов, ожидающих трансплантацию почки, на функцию ОЦЖ реципиентов в течение первого послеоперационного года.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ретроспективное когортное одноцентровое исследование включены 210 пациентов с ХБП 5–5(Д) ст., которым была выполнена трансплантация трупной почки. Критерии включения пациентов: 1) наличие ХБП 5–5(Д) ст.; 2) ПТГ крови перед

трансплантацией почки ≥ 130 пг/мл; 3) успешная первичная трансплантация почки не ранее 12 мес. назад; 4) функционирующий почечный трансплантат на протяжении первого послеоперационного года. Критерии не включения/исключения: 1) трансплантация почки в анамнезе; 2) удаление почечного трансплантата в первый послеоперационный год; 3) паратиреоидэктомия до трансплантации почки или в первый послеоперационный год.

Численность мужчин и женщин, включенных в исследование, была практически одинаковой. Возраст пациентов колебался от 19 до 70 лет. Подавляющее большинство пациентов страдали различными вариантами недиабетической нефропатии (91%). Преобладающей модальностью диализа был гемодиализ. Длительность диализной терапии варьировала от 1 до 158 мес., у нескольких пациентов она отсутствовала. Всем пациентам была выполнена трансплантация трупной почки. Почти у половины пациентов регистрировалась отсроченная функция почечного трансплантата, потребовавшая продолжения диализной терапии (проведение острого гемодиализа у 4 пациентов с додиализной ХБП). Длительность острого канальцевого некроза составляла от 2 до 30 сут (табл. 1).

Биохимическое исследование до трансплантации почки и в послеоперационном периоде через 3 и 12 мес. включало определение сывороточных концентраций ПТГ, кальция, фосфора, активности общей щелочной фосфатазы (ЩФ), альбумина и креатинина стандартными методиками. Концентрации ПТГ крови 130–585 пг/мл и ≤ 130 пг/мл были приняты за целевой уровень в пред- и посттрансплантационном периоде [12–15]. Скорость клубочковой фильтрации (pСКФ) рассчитывалась по формуле CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration), стратификация стадий ХБП проводилась по уровню pСКФ [16].

Статистический анализ материала выполнен с использованием программы GraphPad v.8.0.1. Форма распределения признаков оценена по тесту Колмогорова–Смирнова. Описание количественных признаков при нормальном распределении представлено в виде среднеарифметического значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$), при асимметричном – в виде медианы, 25 и 75% квартилей [Me (Q25–Q75)]. Качественные признаки представлены в виде абсолютных чисел (n) и долей (%). Для сравнения количественных данных использованы критерий Манна–Уитни и критерий Стьюдента, для качественных признаков – критерий χ -квадрат. Оценка силы связи

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование**Clinical characteristics of patients included in the study**

Параметр	Все пациенты (n = 210)
Мужчины/женщины, n (%)	103/107 (49/51)
Возраст, лет ($M \pm m$)	45 $\pm$ 9
Индекс массы тела	24,5 $\pm$ 3,5
Заболевания почек	
Хронический гломерулонефрит, n (%)	94 (44,8)
Врожденная наследственная нефропатия, n (%)	46 (21,9)
Хронический тубулоинтерстициальный нефрит, n (%)	24 (11,4)
Диабетическая нефропатия, n (%)	19 (9,0)
Поражение почек при системных заболеваниях, n (%)	10 (4,8)
Прочие (гипертонический нефросклероз, типичный/атипичный гемолитико-уремический синдром, рак почки, нефролитиаз), n (%)	17 (8,1)
Модальность диализа	
Гемодиализ, n (%)	145 (69,0)
Перитонеальный диализ, n (%)	34 (16,2)
Гемодиализ + перитонеальный диализ, n (%)	22 (10,5)
Без диализа, n (%)	9 (4,3)
Длительность диализной терапии, мес., [Me (Q1–Q3)]	19 (9; 35)
Функция почечного трансплантата	
Немедленная, n (%)	107 (51,0)
Отсроченная, n (%)	103 (49,0)
Длительность острого канальцевого некроза, сут, [Me (Q1–Q3)]	6 (3; 12)
День регистрации минимального креатинина крови после трансплантации почки, [Me (Q1–Q3)]	7 (4; 13)

между количественными признаками проведена с помощью рангового коэффициента корреляции Спирмена. В качестве количественной меры эффекта при сравнении относительных показателей использован параметр относительного риска (ОР) с расчетом границ 95% доверительного интервала (95% ДИ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика традиционных биохимических маркеров вторичного ГПТ у пациентов с ХБП 5–5(Д) ст. в предоперационном периоде представлена в табл. 2.

Уровень ПТГ в крови колебался в широком диапазоне (110–2500 пг/мл), почти у трети пациентов он находился за верхней границей целевого интервала. Сывороточное содержание фосфора у большинства пациентов превышало референсные показатели, в то время как сывороточный кальций соответствовал целевому уровню. Повышенная активность фермента щелочной фосфатазы крови (от полутора до пяти верхней границы референсного интервала) определялась у нескольких пациентов.

В зависимости от сывороточной концентрации ПТГ кандидаты на трансплантацию почки были разделены на две группы. В первую группу включены 56 пациентов, страдающих вторичным ГПТ, во вторую – 154 пациента с целевым уровнем ПТГ. Клинико-лабораторная характеристика групп пациентов в предтрансплантационном периоде представлена в табл. 3. Пациенты первой группы имели почти в полтора раза большую продолжительность диализ-

ной терапии. При анализе рутинных биохимических маркеров вторичного ГПТ у них значительно чаще выявлялись гиперфосфатемия, гиперкальциемия и повышение сывороточной активности фермента щелочной фосфатазы.

Через три месяца после трансплантации почки снижение ПТГ крови регистрировалось у всех пациентов; в первой группе оно колебалось в диапазоне 80–1977 пг/мл, во второй – 10–535 пг/мл (табл. 4, рис. 1). В первой группе доля пациентов, достигших ПТГ крови ≤ 130 пг/мл, была вчетверо меньше, чем во второй группе, соответственно 10,7 и 42,2%. Выраженные изменения обнаруживались со стороны сывороточного фосфора, который достигал нормальных или даже низких значений у всех реципиентов. По абсолютному содержанию сывороточного фосфора группы не различались, но пациенты с гипофосфатемией несколько чаще встречались в первой группе. Сывороточная концентрация кальция оставалась стабильной, частота гиперкальциемии преобладала у пациентов первой группы. Доля пациентов с повышенной активностью ЩФ крови в первой группе уменьшилась в 4 раза, во второй – в 3 раза, межгрупповое различие по этому показателю отсутствовало.

В последующие 9 мес. наблюдалось дальнейшее снижение ПТГ крови от нескольких до 670 пг/мл у 49 пациентов 1-й группы и от нескольких до 221 пг/мл у 96 пациентов 2-й группы, соответственно медиана составила 81 (30; 145) и 25 (0; 61), $p < 0,001$, у остальных пациентов (7 в 1-й группе и 58 во 2-й группе) регистрировалось либо его повышение, либо отсутствие его динамики. В целом на протяжении первого послеоперационного года у всех

Таблица 2

Традиционные биохимические маркеры ГПТ перед трансплантацией почки Traditional biochemical markers of HPT before kidney transplantation

Параметр крови	Все пациенты (n = 210)
ПТГ, пг/мл [Ме (Q1–Q3)]	400 (261; 620)
ПТГ 130–585 пг/мл, n (%)	154 (73,3)
ПТГ >585 пг/мл, n (%)	56 (26,7)
Фосфор, ммоль/л [Ме (Q1–Q3)]	1,74 (1,44; 2,04)
Целевой уровень (0,87–1,49 ммоль/л), n (%)	70 (33,3)
Гиперфосфатемия (>1,49 ммоль/л), n (%)	140 (66,7)
Гипофосфатемия (<0,87 ммоль/л), n (%)	0
Кальций, ммоль/л, [Ме (Q1–Q3)]	2,2 (2,3; 2,4)
Целевой уровень (2,1–2,6 ммоль/л), n (%)	193 (91,9)
Гиперкальциемия (>2,6 ммоль/л), n (%)	9 (4,3)
Гипокальциемия, (<2,1 ммоль/л), n (%)	8 (3,8)
Повышенная активность ЩФ крови, n (%)	19 (9,0)

Примечание. ПТГ – паратиреоидный гормон; ЩФ – щелочная фосфатаза.

Note. ПТГ – parathyroid hormone; ЩФ – alkaline phosphatase.

Таблица 3

Клинико-лабораторная характеристика групп пациентов
Clinical and laboratory characteristics of patient groups

Параметр	Пациенты		p
	1-я группа (n = 56)	2-я группа (n = 154)	
Мужчины/женщины, n (%)	32/24 (57,1/42,9)	71/83 (46,1/53,9)	Н. д.
Возраст, лет (M ± m)	44 ± 10	45 ± 9	Н. д.
Индекс массы тела, кг ² /см (M ± m)	24,6 ± 4,1	25,7 ± 4,7	Н. д.
Хронический гломерулонефрит, n (%)	18 (32,1)	75 (48,7)	Н. д.
Врожденная наследственная нефропатия, n (%)	13 (23,2)	33 (21,4)	Н. д.
Хронический тубулоинтерстициальный нефрит, n (%)	8 (14,3)	16 (10,4)	Н. д.
Диабетическая нефропатия, n (%)	4 (7,1)	15 (9,7)	Н. д.
Поражение почек при системных заболеваниях, n (%)	3 (5,4)	8 (5,2)	Н. д.
Прочие (гипертонический нефросклероз, типичный/атипичный гемолитико-уремический синдром, рак почки, нефролитиаз), n (%)	10 (17,9)	7 (4,6)	0,004
Гемодиализ, n (%)	45 (80,4)	100 (64,9)	0,049
Перитонеальный диализ, n (%)	5 (8,9)	29 (18,8)	Н. д.
Гемодиализ + перитонеальный диализ, n (%)	4 (7,1)	18 (11,7)	Н. д.
Без диализа, n (%)	2 (3,6)	7 (4,6)	Н. д.
Длительность диализной терапии, мес. [Me (Q1–Q3)]	26 (12; 44)	16 (8; 34)	0,009
ПТГ крови, пг/мл [Me (Q1–Q3)]	897 (722; 1136)	301 (229; 411)	<0,001
Фосфор крови, ммоль/л [Me (Q1–Q3)]	1,92 (1,62; 2,31)	1,72 (1,42; 1,97)	<0,001
Целевой уровень (0,87–1,49 ммоль/л), n (%)	6 (10,7)	65 (42,2)	<0,001
Гиперфосфатемия (>1,49 ммоль/л), n (%)	50 (89,3)	89 (57,8)	<0,001
Гипофосфатемия (<0,87 ммоль/л), n (%)	0	0	Н. д.
Кальций (общий) крови, ммоль/л [Me (Q1–Q3)]	2,3 (2,2; 2,5)	2,3 (2,2; 2,4)	Н. д.
Целевой уровень (2,1–2,6 ммоль/л), n (%)	46 (82,1)	147 (95,5)	0,004
Гиперкальциемия (>2,6 ммоль/л), n (%)	6 (10,8)	3 (1,9)	0,017
Гипокальциемия (<2,1 ммоль/л), n (%)	4 (7,1)	4 (2,6)	Н. д.
Повышенная активность ЩФ крови, n (%)	12 (21,4)	7 (4,5)	<0,001

Примечание. ПТГ – паратиреоидный гормон; ЩФ – щелочная фосфатаза; p – статистическая значимость различий между параметрами 1-й и 2-й групп пациентов; Н. д. – различия статистически не значимы.

Note. ПТГ – parathyroid hormone; ЩФ – alkaline phosphatase; p – statistical significance of differences between groups 1 and 2 parameters; Н. д. – not significant.

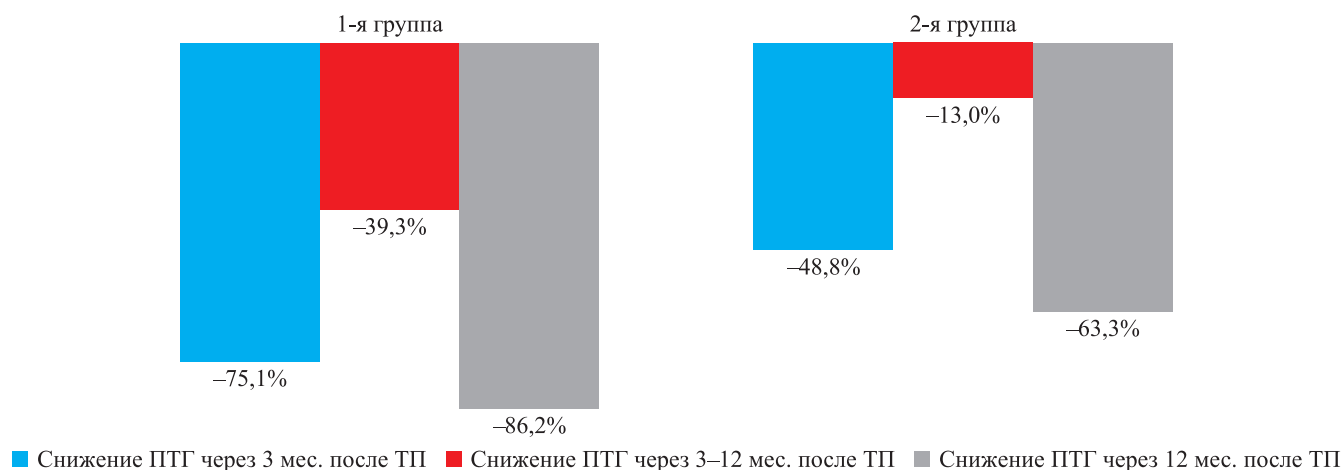


Рис. 1. Уровень снижения ПТГ крови у реципиентов почечного трансплантата на протяжении первого послеоперационного года. Различия между группами статистически значимы для каждого отрезка времени. ТП – трансплантация почки

Fig 1. Level of decrease in blood PTH levels in kidney transplant recipients during the first postoperative year. Differences between groups are statistically significant for each time interval. ТП – kidney transplantation

пациентов 1-й группы и у 151 пациента 2-й группы отмечено различной выраженности снижение ПТГ крови. В наибольшей степени это снижение имело место у пациентов 1-й группы, при этом через год после операции доля пациентов с целевым уровнем ПТГ крови в ней была в 1,5 раза меньше, чем во 2-й группе. Установлена значимо низкая вероятность нормализации функции ОЦЖ на протяжении первого послеоперационного года у кандидатов на трансплантацию почки, имеющих ГПТ, по сравнению с

пациентами с целевым диапазоном предтрансплантационного сывороточного ПТГ (табл. 5).

Изменения со стороны фосфора и кальция крови были минимальными. Сывороточный фосфор у большинства пациентов находился в референсном диапазоне, гиперфосфатемия регистрировалась у единичных пациентов во 2-й группе, гипофосфатемия преобладала у пациентов 1-й группы. Сывороточный кальций сохранялся относительно стабильным на протяжении всего времени наблюдения, гиперкаль-

Таблица 4

Традиционные биохимические маркеры ГПТ у пациентов перед трансплантацией почки, через 3 и 12 месяцев после трансплантации

Traditional biochemical markers of HPT in patients before KT, 3 and 12 months after KT

	1-я группа (n = 56)			2-я группа (n = 154)			P ₁	P ₂
	До ТП	Через 3 мес. после ТП	Через 12 мес. после ТП	До ТП	Через 3 мес. после ТП	Через 12 мес. после ТП		
ПТГ крови, пг/мл [Ме (Q1–Q3)]	897 (722; 1036)	254 (180; 455)*	171 (94; 239)**#	301 (229; 411)	150 (118; 212)*	112 (90; 135)**#	<0,001	0,004
ΔПТГ, пг/мл	0	595 (420; 812)	853 (705; 1178)	0	148 (77; 230)	196 (117; 340)	<0,001	0,001
ПТГ крови ≤130 пг/мл, n (%)	0	6 (10,7)*	27 (48,2)**	0	65 (42,2)*	113 (73,4)**#	<0,001	<0,001
Фосфор крови, ммоль/л [Ме (Q1–Q3)]	1,92 (1,62; 2,31)	0,97 (0,78; 1,21)*	0,94 (0,79; 1,05)#	1,72 (1,42; 1,97)	1,04 (0,91; 1,21)*	1,09 (0,99; 1,35)	Н. д.	0,002
Гиперфосфатемия (>1,49 ммоль/л), n (%)	50 (89,3)	0*	0#	89 (57,8)	0*	6 (3,9)#	Н. д.	Н. д.
Гипофосфатемия (<0,87 ммоль/л), n (%)	0	18 (32,1)*	20 (35,7)#	0	29 (18,8)*	22 (14,3)#	0,051	0,001
Кальций (общий) крови, ммоль/л [Ме (Q1–Q3)]	2,3 (2,2; 2,5)	2,5 (2,3; 2,6)	2,5 (2,4; 2,7)	2,3 (2,2; 2,4)	2,4 (2,3; 2,5)	2,4 (2,3; 2,5)	Н. д.	Н. д.
Гиперкальциемия (>2,6 ммоль/л), n (%)	6 (10,8)	8 (12,7)	11 (19,6)	3 (1,9)	1 (0,7)	2 (1,3)	<0,001	<0,001
Гипокальциемия (<2,1 ммоль/л), n (%)	4 (7,1)	0	0	4 (2,6)	0	0	Н. д.	Н. д.
Повышенная активность ЩФ крови, n (%)	12 (21,4)	3 (4,8)*	5 (8,9)	7 (4,5)	2 (1,4)	1 (0,6)	Н. д.	0,007

Примечание. ПТГ – паратиреоидный гормон; ТП – трансплантация почки; ЩФ – щелочная фосфатаза; * – различия статистически значимы между параметрами до и через 3 мес. после трансплантации почки; ** – различия статистически значимы между параметрами через 3 и 12 мес. после трансплантации почки; # – различия статистически значимы между параметрами до и через 12 мес. после трансплантации почки; p₁ – статистическая значимость различий между группами через 3 мес. после трансплантации почки; p₂ – статистическая значимость различий между группами через 12 мес. после трансплантации почки; Н. д. – различия статистически не значимы.

Note. ПТГ – parathyroid hormone; ТП – kidney transplantation; ЩФ – alkaline phosphatase; * – differences are statistically significant between parameters before and 3 months after KT; ** – differences statistically significant between parameters 3 and 12 months after KT; # – differences are statistically significant between parameters before and 12 months after KT; p₁ – statistical significance of differences between groups 3 months after KT; p₂ – statistical significance of differences between groups 12 months after KT; NS – not significant.

Таблица 5

Влияние ГПТ у кандидатов, ожидающих трансплантацию почки, на нормализацию функции ОЩЖ в первый год после операции

Effect of HPT in KT candidates on normalization of parathyroid gland function in the first year after surgery

Фактор	Нормальная функция ОЩЖ в группе с ГПТ (n = 56)	Нормальная функция ОЩЖ в группе без ГПТ (n = 154)	Относительный риск [95% ДИ]	p
Через три месяца после трансплантации почки	6 (10,7%)	65 (42,2%)	0,254 [0,116; 0,522]	<0,0001
Через год после трансплантации почки	27 (48,2%)	113 (73,4%)	0,657 [0,480; 0,851]	0,0009

Таблица 6

Функция почечного трансплантата в первый год после операции

Kidney graft function in the first year after surgery

Параметр	Пациенты		P ₂
	1-я группа (n = 56)	2-я группа (n = 154)	
Начальная функция почечного трансплантата			
Немедленная, n (%)	23 (41,1)	84 (54,5)	Н. д.
Отсроченная, n (%)	33 (58,9)	70 (45,5)	Н. д.
Длительность острого канальцевого некроза, сут [Me (Q1–Q3)]	7 (4; 15)	6 (3; 9)	0,034
День регистрации минимального креатинина крови после трансплантации почки [Me (Q1–Q3)]	7 (4; 18)	7 (4; 13)	Н. д.
Креатинин крови через 3 мес., мкмоль/л [Me (Q1–Q3)]	117 (88; 146)	110 (78; 124)	Н. д.
Креатинин крови через 12 мес., мкмоль/л [Me (Q1–Q3)]	123 (110; 146)	120 (96; 140)	Н. д.
	p ₁ = 0,311	p ₂ = 0,019	
рСКФ через 3 мес., мл/мин	60 (46; 77)	65 (51; 88)	Н. д.
рСКФ через 12 мес., мл/мин	56 (47; 63)	54 (46; 70)	Н. д.
	p ₁ = 0,228	p ₁ = 0,02	
рСКФ <60 мл/мин через 3 мес., n (%)	27 (48,2)	74 (48,1)	Н. д.
рСКФ <60 мл/мин через 12 мес., n (%)	36 (64,3)	94 (61,0%)	Н. д.
	p ₁ = 0,128	p ₁ = 0,03	

Примечание. рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации; p₁ – статистическая значимость различий между параметрами через 3 и 12 мес.; p₂ – статистическая значимость различий между параметрами 1-й и 2-й групп пациентов; Н. д. – различия статистически не значимы.

Note. рСКФ – estimated glomerular filtration rate; p₁ – statistical significance of differences between parameters at 3 and 12 months; p₂ – statistical significance of differences between group 1 and 2 parameters; NS – not significant.

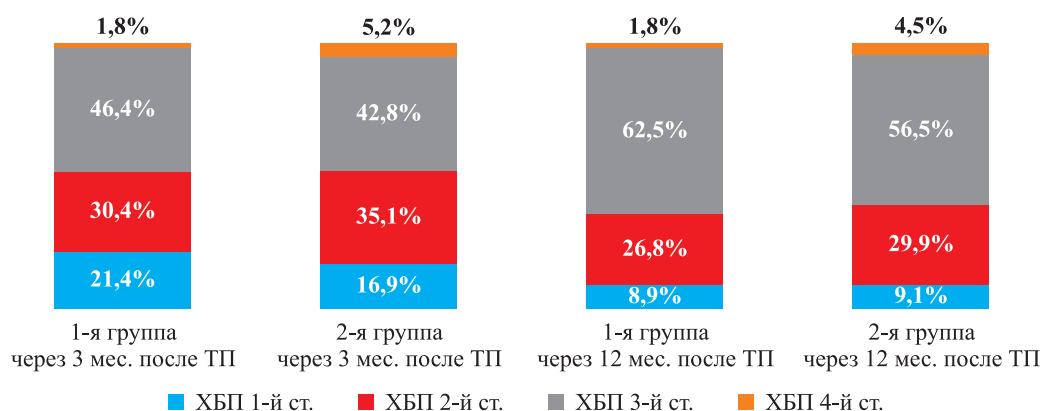


Рис. 2. Распределение реципиентов почечного трансплантата по тяжести ХБП. Различия между группами статистически не значимы для каждого отрезка времени. ТП – трансплантация почки

Fig 2. Distribution of kidney transplant recipients by CKD severity. Differences between groups are not statistically significant for each time interval. ТП – kidney transplantation

Таблица 7

Корреляция ПТГ крови у реципиентов почечного трансплантата
Correlation of PTH levels in KT recipients

Параметр	1-я группа (n = 56)		2-я группа (n = 154)	
	ПТГ крови после трансплантации почки, пг/мл			
	Через 3 мес.	Через 12 мес.	Через 3 мес.	Через 12 мес.
ПТГ крови до трансплантации почки, пг/мл	r = 0,347 p = 0,009	r = 0,379 p = 0,005	r = 0,508 p < 0,001	r = 0,216 p = 0,007
ПТГ крови через 3 мес. после трансплантации почки, пг/мл	–	r = 0,542 p < 0,001	–	r = 0,581 p < 0,001
ΔПТГ (0–3 мес.), пг/мл	r = –0,107 p = 0,433	r = 0,206 p = 0,134	r = –0,071 p = 0,386	r = 0,003 p = 0,971
ΔПТГ (0–3 мес.), %	r = –0,780 p < 0,001	r = –0,293 p = 0,031	r = –0,516 p < 0,001	r = –0,019 p = 0,815
ΔПТГ (0–12 мес.), пг/мл	–	r = –0,105 p = 0,449	–	r = –0,410 p < 0,001
ΔПТГ (0–12 мес.), %	–	r = –0,399 p = 0,003	–	r = –0,509 p < 0,001
ΔПТГ (3–12 мес.), пг/мл	–	r = 0,189 p = 0,162	–	r = –0,324 p < 0,001
ΔПТГ (3–12 мес.), %	–	r = 0,114 p = 0,402	–	r = –0,699 p < 0,001
Длительность диализной терапии, мес.	r = –0,097 p = 0,478	r = 0,219 p = 0,104	r = 0,052 p = 0,523	r = –0,083 p = 0,306
Длительность острого канальцевого некроза, сут	r = 0,318 p = 0,017	r = 0,440 p < 0,001	r = 0,134 p = 0,099	r = 0,047 p = 0,583
Минимальный креатинин крови, день	r = 0,210 p = 0,124	r = –0,008 p = 0,952	r = 0,251 p = 0,002	r = 0,157 p = 0,062
Креатинин крови через 3 мес., мкмоль/л	r = 0,201 p = 0,144	r = 0,163 p = 0,24	r = 0,186 p = 0,021	r = 0,246 p = 0,002
Креатинин крови через 12 мес., мкмоль/л	–	r = –0,044 p = 0,749	–	r = 0,474 p < 0,001
рСКФ через 3 мес., мл/мин	r = –0,205 p = 0,129	r = –0,139 p = 0,308	r = –0,118 p = 0,146	r = –0,172 p = 0,033
рСКФ через 12 мес., мл/мин	–	r = 0,036 p = 0,799	–	r = –0,292 p < 0,001

Примечание. ПТГ – паратиреоидный гормон; ΔПТГ – величина снижения паратиреоидного гормона; рСКФ – расчетная скорость клубочковой фильтрации.

Note. ПТГ – parathyroid hormone; ΔПТГ – magnitude of parathyroid hormone reduction; рСКФ – estimated glomerular filtration rate.

циемия, как и в ранние сроки после операции, определялась чаще у пациентов 1-й группы. Пациентов с повышенной активностью ЩФ стало больше в 1-й группе.

При анализе начальной функции почечного трансплантата различия между группами касались только длительности острого канальцевого некроза, которая была больше у пациентов 1-й группы. Остальные параметры – начало функционирования почки и день регистрации минимальной сывороточной концентрации креатинина – были идентичными. Через 3 и 12 мес. также отсутствовали межгрупповые различия для сывороточной концентрации креатинина и рСКФ (табл. 6). При распределении пациентов по стадиям

ХБП внутригрупповое и межгрупповое различие отсутствовало (рис. 2).

Корреляционный анализ для посттрансплантационного ПТГ крови через 3 и 12 мес. выявил следующее (табл. 7).

У пациентов 1-й группы в послеоперационном периоде сывороточный ПТГ имел умеренно тесную прямую связь с ПТГ крови до трансплантации почки и отсутствие таковой с функцией почечного трансплантата через 3 мес. и к концу первого послеоперационного года. У пациентов 2-й группы также определялась прямая взаимосвязь между ПТГ крови после трансплантации почки и дотрансплантационного ПТГ крови, более тесная через 3 мес. после

операции. В отличие от пациентов 1-й группы у этих пациентов установлена связь посттрансплантационного ПТГ крови с функцией почечного трансплантата, в большей степени выраженная через 12 мес. после операции. У пациентов обеих групп отсутствовала ассоциация посттрансплантационного ПТГ крови с длительностью диализной терапии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Избыточные синтез и секреция ПТГ – закономерная реакция ОЩЖ на разнообразные метаболические сдвиги, развивающиеся у пациентов с ХБП – гипокальциемию, гиперфосфатемию, дефицит витамина D, накопление в крови фактора роста фибробластов-23 и др. Стойкая гиперсекреция ПТГ с формированием гиперплазии ОЩЖ приводит к развитию вторичного ГПТ. В силу своей распространенности тяжелый ГПТ нередко встречается у пациентов, которым выполняется трансплантация почки. В нашем наблюдении доля таких пациентов, у которых дотрансплантационный ПТГ крови был устойчиво более 600 пг/мл, составила 26,7%.

Успешная трансплантация почки нивелирует патофизиологические процессы, приводящие к развитию вторичного ГПТ, и вызывает в течение полугода-года, иногда и более длительного времени, спонтанную нормализацию функционирования ОЩЖ. Однако этот процесс наблюдается не у всех пациентов, у некоторых он может отсутствовать в силу сформировавшихся структурных изменений в ОЩЖ [9, 17]. В целом среди всех наблюдаемых нами пациентов частота посттрансплантационного ГПТ через три месяца после операции составила 66,2% (89,3% у пациентов с предшествующим ГПТ и 57,8% у пациентов без ГПТ), к концу первого года она сократилась в два раза – 33,3% (51,8% у пациентов с предшествующим ГПТ и 26,6% у пациентов без ГПТ). О высокой встречаемости ГПТ у реципиентов почечного трансплантата как в ранние, так и отдаленные сроки после операции, в том числе и у пациентов без диализной терапии, сообщается во многих публикациях [7, 17–19]. Согласно нашему исследованию, на протяжении первого года после трансплантации почки у пациентов с вторичным ГПТ в предоперационном периоде по сравнению с пациентами без ГПТ среднее значение ПТГ крови было выше и доля пациентов с его целевым уровнем была меньше, при том что степень снижения ПТГ крови у пациентов 1-й группы значительно превышала таковую у пациентов 2-й группы. Подобная закономерность о зависимости персистенции ГПТ после трансплантации почки от уровня ПТГ крови перед операцией установлена и другими коллективами авторов [8, 18–20]. Следует

отметить, что в нашем исследовании использованы предложенный международными рекомендациями (KDIGO) предтрансплантационный диапазон целевого уровня сывороточного ПТГ в 130–585 пг/мл (2–9 верхних границ референсного интервала) и ранее предложенный некоторыми авторами посттрансплантационный уровень – менее 130 пг/мл (2 верхние границы референсного интервала) [12–15]. В то же время в ряде последних зарубежных публикаций в качестве диагностического критерия пред- и посттрансплантационного ГПТ использованы меньшие значения сывороточного ПТГ [18, 19]. Это изменяет информацию о распространенности ГПТ у кандидатов на трансплантацию почки и реципиентов почечного трансплантата и затрудняет сравнение результатов исследований.

В совокупности представленные данные подчеркивают важность ранней диагностики, профилактики и адекватного лечения вторичного ГПТ у кандидатов на трансплантацию почки для предотвращения у них стойкого посттрансплантационного ГПТ. Своевременная диагностика вторичного ГПТ у пациентов с ХБП, включенных в лист ожидания трансплантации почки, обеспечивается динамическим исследованием функции ОЩЖ и связанных с ней параметров минерального и костного обменов, тем более что ранние клинические проявления заболевания отсутствуют. В международных рекомендациях (KDIGO) указывается на необходимость агрессивного лечения тяжелого ГПТ перед трансплантацией почки и в случае неэффективности медикаментозной терапии выполнять паратиреоидэктомию (ПТЭ), в рекомендациях Национального почечного фонда США (KDOQI) и Российских национальных рекомендациях информация по этому поводу отсутствует [21–23]. Ряд исследований подтверждает преимущества выполнения ПТЭ пациентам с ХБП и тяжелым ГПТ перед трансплантацией почки. В частности, у этих пациентов по сравнению с пациентами, получавшими цинакальцет, улучшается контролируемость ГПТ, снижается риск развития третичного ГПТ, регистрируется более низкий уровень посттрансплантационного ПТГ крови и меньший объем медицинской помощи [24]. Наоборот, в случае выполнения ПТЭ в послеоперационном периоде наблюдалось ухудшение функции почечного трансплантата [25, 26].

Другой фактор риска посттрансплантационного ГПТ, установленный в ряде исследований, – функция почечного трансплантата – не получил полного подтверждения в данном наблюдении [27, 28]. На протяжении всего первого послеоперационного года сывороточный креатинин и рСКФ в обеих группах пациентов были идентичными. Корреляционный

анализ у пациентов с ГПТ до трансплантации почки не выявил наличия связи посттрансплантационного ПТГ с функцией почечного трансплантата на протяжении первого послеоперационного года, в то время как пациенты с целевым уровнем ПТГ крови до операции такую связь продемонстрировали. Такой результат может быть связан с коротким сроком наблюдения. Очень вероятно, что более длительное наблюдение могло бы выявить корреляционную зависимость посттрансплантационного ПТГ от функции почечного трансплантата и у пациентов с дооперационным ГПТ. В ряде случаев установлены и другие факторы риска ГПТ после трансплантации почки [7, 9, 18]. В нашем исследовании, так же, как и в исследовании W. Sutton et al. [18], не получено доказательства связи посттрансплантационного сывороточного ПТГ с длительностью предшествующего операции диализного лечения, хотя некоторые авторы указывают на ее существование [8, 20].

Таким образом, вторичный ГПТ у пациентов с ХБП до трансплантации почки является превалирующим фактором избыточной секреции ПТГ и персистенции посттрансплантационного ГПТ. Влияние последнего на исходы трансплантации почки обсуждается. В ряде исследований установлены ухудшение качества жизни и увеличение риска смертности реципиентов с ГПТ. Особое место занимают исследования об ассоциации посттрансплантационного ГПТ с функцией почечного трансплантата [10, 11, 17, 29–31]. Недавно опубликованное исследование P. Molinari et al. [7] продемонстрировало тесную связь высокого уровня ПТГ крови в течение первого года после трансплантации почки с долгосрочной потерей почечного трансплантата. Точный механизм повреждающего действия ПТГ на почечный трансплантат в полной мере неизвестен. Экспериментальные исследования свидетельствуют о его влиянии на почечный кровоток – расширении приносящей и сужении выносящей артериол, что приводит к клубочковой гиперфильтрации [32]. В клиническом наблюдении у пациентов с пересаженной почкой, перенесших ПТЭ, в раннем послеоперационном периоде регистрировалось снижение эффективного почечного кровотока и СКФ, отражающее тесную связь гемодинамического эффекта ПТГ и почечной функции [33]. Скорее всего, именно связь гемодинамического эффекта ПТГ и почечной функции обусловили наблюдаемую у наших реципиентов с предшествующим операции ГПТ большую продолжительность острого канальцевого некроза при одинаковой частоте его развития в обеих группах. Другой возможный механизм прогрессирующей дисфункции почечного трансплантата на фоне послеоперационного ГПТ – это почечная вазокон-

стрикция, нарушение процесса концентрирования мочи, резистентность почек к действию вазопрессина, вызванные гиперкальциемией, в нашем исследовании таких пациентов было на порядок больше среди имеющих предтрансплантационный ГПТ [34]. Кроме того, высокие сывороточные уровни ПТГ принимают участие в развитии почечного фиброза, сосудистой кальцификации, иммунодефицита и анемии, что также может негативно сказаться на функции почечного трансплантата [35]. Помимо ухудшения функции почечного трансплантата ГПТ у реципиентов сопровождается высоким риском костных переломов и смертностью от всех причин [10, 13]. Полученные результаты о неблагоприятном влиянии персистирующего ГПТ на течение посттрансплантационного периода обосновывают целесообразность мониторинга ПТГ крови у реципиентов почечного трансплантата с целью разработки алгоритма профилактики и лечения данного заболевания.

К ограничениям данного исследования относятся: 1) ретроспективный дизайн; 2) обобщение результатов одного центра; 3) анализ только рутинных маркеров синдрома минерально-костных нарушений, ассоциированных с ХБП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ГПТ – закономерное осложнение у пациентов с ХБП, встречающееся у кандидатов на трансплантацию почки. Заболевание является главным, не зависящим от функции почечного трансплантата предиктором, препятствующим нормализации функционирования ОЩЖ у реципиентов на протяжении первого послеоперационного года. В процессе подготовки кандидатов на трансплантацию почки важное место следует уделять ранней диагностике, профилактике и адекватному лечению вторичного ГПТ. В диспансерном наблюдении реципиентов почечного трансплантата целесообразен мониторинг ПТГ крови для проведения профилактики и лечения посттрансплантационного ГПТ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Messa P, Alfieri CM. Secondary and tertiary hyperparathyroidism. Brandi ML (ed): Parathyroid Disorders. Focusing on Unmet Needs. *Front Horm Res.* 2019; 51: 91–108. doi: 10.1159/000491041.
2. Ветчинникова ОН. Гиперпаратиреоз и хроническая болезнь почек. Часть 1. Особенности патогенеза, клинические проявления, диагностическая стратегия. Лекция. *Нефрология и диализ.* 2023; 25 (1): 36–

56. Vetchinnikova ON. Hyperparathyroidism and chronic kidney disease. Part 1. Features of pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic strategy. Lecture. *Nephrology and Dialysis*. 2023; 25 (1): 36–56. doi: 10.28996/2618-9801-2023-1-36-56.
3. Ермоленко ВМ, Волгина ГВ, Михайлова НА, Земченков АЮ, Ряснянский ВЮ, Ветчинникова ОН и др. Лечение минеральных и костных нарушений при хронической болезни почек. *Нефрология. Клинические рекомендации*. Под ред. Е.М. Шиловой, А.В. Смирнова, Н.Л. Козловской. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016: 687–709. Ermolenko VM, Volgina GV, Mikhaylova NA, Zemchenkov AYU, Rysnyanskiy VYu, Vetchinnikova ON i dr. Lechenie mineral'nykh i kostnykh narusheniy pri khronicheskoy bolezni pochek. *Nefrologiya. Klinicheskie rekomendatsii*. Pod red. E.M. Shilova, A.V. Smirnova, N.L. Kozlovskoy. M.: GEOTAR-Media, 2016: 687–709. (In Russ.).
4. Alfieri C, Regalia A, Zanoni F, Vettoretti S, Cozzolino M, Messa P. The importance of adherence in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Blood Purif*. 2019; 47 (1-3): 37–44. doi: 10.1159/000492918.
5. Ketteler M, Bover J, Mazzaferro S. Treatment of secondary hyperparathyroidism in non-dialysis CKD: an appraisal 2022s. *Nephrol Dial Transplant* 2022; 0: 1–7. doi: 10.1093/ndt/gfac236.
6. Готье СВ, Хомяков СМ. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2022 году. XV сообщение регистра Российского трансплантологического общества. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; XXV (3): 8–30. Gauthier SV, Khomyakov SM. Organ donation and transplantation in the Russian Federation in 2022. 15th Report from the Registry of the Russian Transplant Society. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; XXV (3): 8–30. (In Russ., English abstract). doi: 10.15825/1995-1191-2023-3-8-30.
7. Molinari P, Regalia A, Leoni A, Campise M, Cresseri D, Cicero E et al. Impact of hyperparathyroidism and its different subtypes on long term graft outcome: a single Transplant Center cohort study. *Front Med (Lausanne)*. 2023; 10: 1221086. doi: 10.3389/fmed.2023.1221086.
8. Yamamoto T, Tominaga Y, Okada M, Hiramitsu T, Tsujita M, Goto N et al. Characteristics of persistent hyperparathyroidism after renal transplantation. *World J Surg*. 2016; 40 (3): 600–606. doi: 10.1007/s00268-015-3314-z. PMID: 26546189.
9. Lou I, Foley D, Odorico SK, Levenson G, Schneider DF, Sippel R et al. How well does renal transplantation cure hyperparathyroidism? *Ann Surg*. 2015; 262 (4): 653–659. doi: 10.1097/SLA.0000000000001431.
10. Pihlström H, Dahle DO, Mjoen G, Pilz S, Marz W, Abedini S et al. Increased risk of all-cause mortality and renal graft loss in stable renal transplant recipients with hyperparathyroidism. *Transplantation*. 2015; 99 (2): 351–359. doi: 10.1097/tp.0000000000000583.
11. Okada M, Tominaga Y, Sato T, Tomosugi T, Futamura K, Hiramitsu T et al. Elevated parathyroid hormone one year after kidney transplantation is an independent risk factor for graft loss even without hypercalcemia. *BMC Nephrol*. 2022; 23: 212. doi: 10.1186/S12882-022-02840-5.
12. KDIGO 2017. Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention and Treatment of Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int*. 2017; 7 (1): 1–59.
13. Perrin P, Caillard S, Javier RM, Braun L, Heibel F, Borni-Duval C et al. Persistent hyperparathyroidism is a major risk factor for fractures in the five years after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2013; 13: 2653–2663. doi: 10.1111/ajt.12425.
14. Bleskestad IH, Bergrem H, Leivestad T, Hartmann A, Gøransson LG. Parathyroid hormone and clinical outcome in kidney transplant patients with optimal transplant function. *Clin Transplant*. 2014; 28: 479–486. doi: 10.1111/ctr12341.
15. Evenepoel P, Claes K, Kuypers D, Maes B, Bammens B, Vanrenterghem Y. Natural history of parathyroid function and calcium metabolism after kidney transplantation: A single-centre study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 1281–1287. doi: 10.1093/ndt/gfh128.
16. National kidney foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2003; 42 (Suppl. 3): S1–S202.
17. Wang R, Price G, Disharoon M, Stidham G, McLeod M-C, McMullin JL et al. Resolution of secondary hyperparathyroidism after kidney transplantation and the effect on graft survival. *Ann Surg*. 2023; 278 (3): 366–375. doi: 10.1097/SLA.0000000000005946.
18. Sutton W, Chen X, Patel P, Karzai S, Prescott JD, Segev DL et al. Prevalence and risk factors for tertiary hyperparathyroidism in kidney transplant recipients. *Surgery*. 2022; 171 (1): 69–76. doi: 10.1016/j.surg.2021.03.067.
19. Okada M, Sato T, Hasegawa Y, Futamura K, Hiramitsu T, Ichimori T et al. Persistent hyperparathyroidism after preemptive kidney transplantation. *Clin Exp Nephrol*. 2023; Jun 23. doi: 10.1007/s10157-023-02371-9.
20. Kirnap NG, Kirnap M, Sayin B, Akdur A, Bascil Tutuncu N, Haberal M. Risk factors and treatment options for persistent hyperparathyroidism after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2020; 52 (1): 157–161. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.11.020.
21. Chadban SJ, Ahn C, Axelrod DA, Foster BJ, Kasiske BL, Kher V et al. KDIGO clinical practice guideline on the evaluation and management of candidates for kidney transplantation. *Transplantation*. 2020; 104 (4S1 Suppl. 1): S11–S103. doi: 10.1097/TP.0000000000003136. PMID: 32301874.
22. Puttarajappa CM, Schinstock CA, Wu CM, Leca N, Kumar V, Vasudev BS, Hariharan S. KDOQI US commentary on the 2020 KDIGO clinical practice guideline on

- the evaluation and management of candidates for kidney transplantation. *Am J Kidney Dis.* 2021; 77 (6): 833–856. doi: 10.1053/j.ajkd.2020.11.017.
23. Смирнов АВ, Ватазин АВ, Доброуравов ВА, Бобкова ИИ, Ветчинникова ОН, Волгина ГВ и др. Клинические рекомендации. Хроническая болезнь почек (ХБП). *Нефрология.* 2021; 25 (5): 10–84. Smirnov AV, Vatazin AV, Dobronravov VA, Bobkova IN, Vetchinnikova ON, Volgina GV et al. Clinical recommendations. Chronic kidney disease (CKD). *Nephrology (Saint-Petersburg).* 2021; 25 (5): 10–84. (In Russ.). doi: 10.36485/1561-6274-2021-25-5-10-84.
 24. Egan CE, Qazi M, Lee J, Lee-Saxton YJ, Greenberg JA, Beninato T et al. Treatment of secondary hyperparathyroidism and posttransplant tertiary hyperparathyroidism. *J Surg Res.* 2023; 291: 330–335. doi: 10.1016/j.jss.2023.06.031.
 25. Jeon HJ, Kim YJ, Kwon HY, Koo TY, Baek SH, Kim HJ et al. Impact of parathyroidectomy on allograft outcomes in kidney transplantation. *Transpl Int.* 2012; 25 (12): 1248–1256. doi: 10.1111/j.1432-2277.2012.01564.x.
 26. Littbarski SA, Kaltenborn A, Gwiasda J, Beneke J, Arelin V, Schwager Y et al. Timing of parathyroidectomy in kidney transplant candidates with secondary hyperparathyroidism: Effect of pretransplant versus early or late post-transplant parathyroidectomy. *Surgery.* 2018; 163 (2): 373–380. doi: 10.1016/j.surg.2017.10.016.
 27. Alagoz S, Trabulus S. Long-term evaluation of mineral metabolism after kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2019; 51 (7): 2330–2333. doi: 10.1016/j.transproceed.2019.01.181.
 28. Kettler B, Scheffner I, Bräsen JH, Hallensleben M, Richter N, Heiringhoff KH et al. Kidney graft survival of >25 years: a single center report including associated graft biopsy results. *Transpl Int.* 2019; 32 (12): 1277–1285. doi: 10.1111/tri.13469.
 29. Araujo MJCLN, Ramalho JAM, Elias RM, Jorgetti V, Nahas W, Custodio M et al. Persistent hyperparathyroidism as a risk factor for long-term graft failure: the need to discuss indication for parathyroidectomy. *Surgery.* 2018; 163: 1144–1150. doi: 10.1016/j.surg.2017.12.010.
 30. Isakov O, Ghinea R, Beckerman P, Mor E, Riella LV, Hod T. Early persistent hyperparathyroidism post-renal transplantation as a predictor of worse graft function and mortality after transplantation. *Clin Transpl.* 2020; 34: e14085. doi: 10.1111/ctr.14085.
 31. Tsai M-H, Chen M, Liou H-H, Lee T-S, Huang Y-C, Liu P-Y, Fang Y-W. Impact of pre-transplant parathyroidectomy on graft survival: A comparative study of renal transplant patients (2005–2015). *Med Sci Monit.* 2023; 29: e940959. doi: 10.12659/MSM.940959.
 32. Massfelder T, Parekh N, Endlich K, Saussine C, Steinhäusen M, Helwig JJ. Effect of intrarenally infused parathyroid hormone-related protein on renal blood flow and glomerular filtration rate in the anaesthetized. *Br J Pharmacol.* 1996; 118: 1995–2000. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15635.x.
 33. Schwarz A, Rustien G, Merkel S, Radermacher J, Haller H. Decreased renal transplant function after parathyroidectomy. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 584–591. doi: 10.1093/ndt/gfl583.
 34. Ruda JM, Hollenbeak CS, Stack BC Jr. A systematic review of the diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism from 1995 to 2003. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132: 359–372. doi: 10.1016/j.otohns.2004.10.005.
 35. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Parathyroid hormone: A uremic toxin. *Toxins.* 2020; 12: 189–204. doi: 10.3390/toxins12030189.

Статья поступила в редакцию 26.12.2023 г.
The article was submitted to the journal on 26.12.2023

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-94-104

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА I ТИПА

Н.В. Баранова, А.С. Пономарева, Л.А. Кирсанова, А.О. Никольская, Г.Н. Бубенцова,
Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

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

Создание клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы (КИК ПЖ), сформированной на основе островков Лангерганса и биосовместимого матрикса-носителя (каркаса/скаффолда), имитирующего нативное микроокружение панкреатической ткани, является одним из подходов к лечению пациентов с сахарным диабетом I типа (СД I). **Целью** работы был сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и изолированных островков Лангерганса крысы после их внутрибрюшинного введения крысам с экспериментальным СД I. **Материалы и методы.** СД I у крыс индуцировали введением малых доз (15 мг/кг) стрептозотоцина в течение 5 суток. Образцы КИК ПЖ формировали на основе жизнеспособных и функциональных аллогенных изолированных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда, полученного в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека. Крысам проводили внутрибрюшинное введение аллогенных островков Лангерганса (опытная группа 1, $n = 4$) и КИК ПЖ (опытная группа 2, $n = 4$). Крысам контрольной группы лечение не проводили ($n = 4$). Оценивали уровень глюкозы в крови крыс, а также проводили гистологическое исследование органов (поджелудочная железа и почки) экспериментальных животных. Наблюдение за всеми животными продолжалось в течение 10 недель. **Результаты.** В опытной группе 1 на седьмые сутки после введения островков Лангерганса отмечали заметное снижение уровня гликемии – с $28,2 \pm 4,2$ до $13,4 \pm 2,6$ ммоль/л, которое сохранялось на протяжении 7 недель, после чего происходило повышение гликемии до уровней, близких к исходным значениям (до введения островков). В опытной группе 2 на седьмые сутки после введения КИК ПЖ отмечали более выраженное по сравнению с опытной группой 1 снижение гликемии – с $25,8 \pm 5,1$ до $6,3 \pm 2,7$ ммоль/л. Уровень глюкозы к 10-й неделе эксперимента был ниже исходного в среднем в 2 раза. Установлено более выраженное снижение концентрации глюкозы в крови крыс-реципиентов после введения образцов КИК ПЖ по сравнению с уровнем гликемии крыс-реципиентов после введения суспензии островков (на 75,6 и 52,5% соответственно). **Заключение.** Введение КИК ПЖ оказывает более выраженный антидиабетический эффект у крыс с СД I по сравнению с введением островков Лангерганса. Таким образом, показана перспективность использования тканеспецифического скаффолда для создания биоискусственной ПЖ с целью повышения функциональной эффективности островков.

Ключевые слова: сахарный диабет I типа, островки Лангерганса, клеточно-инженерная конструкция, поджелудочная железа, децеллюляризация, тканеспецифический скаффолд.

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

Corresponding author: Natalia Baranova. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation.
Phone: (917) 568-98-22. E-mail: barnats@yandex

FUNCTIONAL EFFICIENCY OF PANCREATIC CELL-ENGINEERED CONSTRUCT IN AN ANIMAL EXPERIMENTAL MODEL FOR TYPE I DIABETES

N.V. Baranova, A.S. Ponomareva, L.A. Kirsanova, A.O. Nikolskaya, G.N. Bubentsova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

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

The creation of a cell-engineered pancreatic construct (CEPC) from islets of Langerhans and biocompatible matrix carrier (framework/scaffold), which imitates the native microenvironment of pancreatic tissue, is an approach to the treatment of type I diabetes mellitus (T1D). The **objective** of this work is to conduct a comparative analysis of the functional efficacy of CEPC and isolated rat islets of Langerhans after intraperitoneal administration into rats with experimental T1D. **Materials and method.** T1D was induced in rats by injecting low-dose (15 mg/kg) streptozotocin (STZ) for 5 days. CEPC samples were created using viable and functional allogeneic isolated islets of Langerhans and tissue-specific scaffold obtained by decellularization of human pancreatic fragments. The rats received intraperitoneal injection of allogeneic islets of Langerhans (experimental group 1, $n = 4$) and CEPC (experimental group 2, $n = 4$). Control group rats received no treatment ($n = 4$). Blood glucose levels in the rats were measured, and the pancreas and kidneys of the experimental animals were examined histologically. The follow-up period for all animals continued for 10 weeks. Results. In experimental group 1, on day 7 after injection of Langerhans islets, glycemia decreased significantly from 28.2 ± 4.2 mmol/L to 13.4 ± 2.6 mmol/L. This fall persisted for 7 weeks, following which blood sugar increased to nearly their initial levels (prior to islets administration). In experimental group 2, on day 7 after CEPC administration, there was a more noticeable drop in blood sugar levels from 25.8 ± 5.1 mmol/L to 6.3 ± 2.7 mmol/L compared to experimental group 1. By the 10th week of the experiment, the average glucose level was two times lower than it was at the beginning. Blood glucose levels dropped more sharply in the CEPC group than in the islet group (by 75.6% and 52.5%, respectively). **Conclusion.** In T1D rats, CEPC has a more potent antidiabetic effect than islets of Langerhans. Thus, it has been shown that a tissue-specific scaffold may be used to create bioartificial pancreas in order to increase the functional efficiency of islets.

Keywords: type I diabetes mellitus, islets of Langerhans, cell-engineered construct, pancreas, decellularization, tissue-specific scaffold.

ВВЕДЕНИЕ

Замещение поврежденных β -клеток у пациентов с тяжелым течением сахарного диабета I типа (СД I) в результате трансплантации островков Лангерганса является эффективным методом лечения, позволяющим установить долгосрочную стабильную эугликемию [1], улучшить качество жизни и снизить вторичные осложнения по сравнению с инсулинотерапией [2]. Однако во время процедуры выделения панкреатических островков происходит снижение их функциональной активности вследствие действия ряда повреждающих факторов, таких как утрата васкуляризации, иннервации и связей с внеклеточным матриксом (ВКМ). После трансплантации процесс реваскуляризации островков завершается через 10–14 суток. В этот период доставка кислорода и питательных веществ к островковым клеткам происходит только посредством диффузии, что может быть недостаточно для поддержания жизнеспособности клеток в центральной части островка [3, 4]. Таким образом, ограниченное время функционирования трансплан-

тата в определенной степени связано с гипоксией островков в посттрансплантационный период [5].

Представляется существенным обеспечить для островков Лангерганса условия, способствующие сохранению их жизнеспособности и функции *in vitro* и *in vivo*. Существует необходимость разработки новых стратегий замены β -клеток, в том числе создание биоэквивалента поджелудочной железы (ПЖ) на основе инсулинпродуцирующих клеток и матрикса-носителя (каркаса/скаффолда), имитирующего ВКМ ПЖ. Так, децеллюляризованная ПЖ с сохраненной биохимической, пространственной и сосудистой структурой нативного ВКМ может быть использована в качестве каркаса для последующей рецеллюляризации инсулинпродуцирующими клетками и дальнейшей трансплантации [6–9].

Децеллюляризованная панкреатическая ткань в наибольшей степени имитирует микроокружение нативного ВКМ ПЖ, т. е. обладает тканевой специфичностью с характерными особенностями структуры и состава. Значительное снижение иммуногенности, достигаемое за счет удаления клеточного и

ядерного материала из децеллюляризованных скаффолдов, способствует формированию идеальной системы поддержки для островковых клеток при трансплантации [10, 11]. Успешное изготовление и рецеллюляризация скаффолда из децеллюляризованной панкреатической ткани является существенной составляющей тканевой инженерии ПЖ [12].

Проведенные ранее исследования позволили нам разработать протоколы получения тканеспецифических скаффолдов из децеллюляризованной ПЖ крысы [13] и человека [14]. В экспериментальных исследованиях *in vitro* было установлено, что культивирование островков Лангерганса в присутствии таких скаффолдов способствует сохранению их структуры, пролонгирует жизнеспособность и инсулинпродуцирующую функцию по сравнению с островками, культивированными в стандартных условиях [6, 13–15]. В других работах показано, что скаффолд из децеллюляризованной ПЖ также обеспечивает островковым клеткам пролонгированное выживание и функционирование *in vivo* [5, 9, 10].

Скаффолды из децеллюляризованной панкреатической ткани, засеянные островковыми клетками, представляют собой сформированную клеточно-инженерную конструкцию эндокринной части поджелудочной железы (КИК ПЖ), часто называемой биоискусственной ПЖ. Представляется возможным применение КИК ПЖ для клинической трансплантации пациентам с СД I с целью компенсации эндокринной функции ПЖ [8].

Целью настоящей работы был сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и изолированных островков Лангерганса крысы после внутрибрюшинного введения крысам с экспериментальным СД I.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Для моделирования стрептозотоцинового СД I с последующей имплантацией КИК ПЖ (животные-реципиенты) и выделения островков Лангерганса (животные-доноры) использовали крыс-самцов породы Wistar весом 300–380 г ($n = 30$) из питомника лабораторных животных ООО «КролИнфо». Аклиматизацию и содержание лабораторных животных осуществляли в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ ISO 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий». Часть 2. «Требования к обращению с животными».

Манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 2005) и Правилами лабораторной

практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010. Получено заключение об одобрении проведения экспериментальных исследований от Локального этического комитета при ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация от 28 января 2021, протокол № 280121-1/1е.

Моделирование сахарного диабета I типа

Для индукции СД I крысам осуществляли дробное введение стрептозотоцина (СТЗ) (Biorbyt, Индия): внутрибрюшинно вводили по 15 мг/кг/сут в течение 5 суток подряд (суммарная доза – 75 мг/кг) [16]. Препарат для инъекций готовили *ex tempore* путем разведения СТЗ в 0,9% растворе хлористого натрия и вводили в полость брюшины. Динамику уровня гликемии ежедневно определяли с помощью глюкометра Accu-Check Active (Roche, Швейцария).

Проверка стабильности экспериментальной модели сахарного диабета I типа

Для исключения спонтанной реверсии диабетического статуса за животными проводили наблюдение в течение последующих 14 суток после последнего введения СТЗ. Ежедневно контролировали уровень гликемии в крови натошак и массу тела, ежедневно оценивали внешний вид, количество потребляемой животными воды.

СД I считали стабильным, если через 2 недели после введения последней дозы СТЗ уровень гликемии в крови крыс превышал 20,0 ммоль/л.

У крыс с концентрацией глюкозы менее 20,0 ммоль/л клинические признаки диабета были выражены слабо. Таких животных не использовали в эксперименте. Животных с уровнем гликемии, превышающим предельно допустимое значение глюкометра (33,0 ммоль/л), считали не пригодными для последующей имплантации КИК ПЖ.

Технология получения КИК ПЖ

Для формирования КИК ПЖ в качестве биомиметика ВКМ был выбран тканеспецифический мелкодисперсный скаффолд, полученный в результате децеллюляризации фрагментов ПЖ человека (ДПЖч-скаффолд) [13, 14]. Проведенные исследования показали, что ДПЖч-скаффолд сохраняет морфофункциональные свойства нативного ВКМ панкреатической ткани, содержит основные фибриллярные белки (коллаген I типа, эластин), обладает низкой иммуногенностью (не более 0,1% ДНК) и не является цитотоксичным относительно адгезии и пролиферации клеточных культур. В качестве инсулинпродуцирующего компонента в составе КИК ПЖ

использовали аллогенные изолированные островки Лангерганса крысы. Свежевыделенные островки идентифицировали с помощью окрашивания дитизоном (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в полной ростовой среде, содержащей DMEM (глюкоза 1,0 г/л) («ПанЭко», Россия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США), Neres (Thermo Fisher Scientific, США), 2 мМ аланил-глутамин («ПанЭко», Россия), 1% антибиотика/антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США), 24 часа в стандартных условиях при 37 °C в CO₂-инкубаторе в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

С помощью прижизненного флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/PI) («ПанЭко», Россия) определяли жизнеспособность культивированных в течение 24 часов островков.

Проводили оценку функциональной активности островков после 24 часов культивирования, используя набор Rat Insulin ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific, США) для измерения концентрации инсулина под нагрузкой стимулятора секреции гормона (глюкозы).

Концентрированную суспензию островков получали в результате центрифугирования в полной ростовой среде в течение 2 мин при скорости 1200 об/мин, затем отмывали от ростовой среды в растворе Хенкса при том же режиме.

Для каждого образца КИК ПЖ отбирали 2000 островков, полученных из 1–2 ПЖ крысы, ресуспендировали в 1,0–1,2 мл раствора Хенкса и смешивали с мелкодисперсным стерильным ДПЖч-скаффолдом ($10,0 \pm 0,1$ мг в 100 мкл раствора Хенкса) из ПЖ человека. Полученные образцы КИК ПЖ помещали в шприцы объемом 2 мл с размером иглы 23 G.

Внутрибрюшинное введение КИК ПЖ крысам с экспериментальным сахарным диабетом I типа

Исследование функциональной эффективности КИК ПЖ проводили на крысах с выраженным и стабильным СД I, индуцированным ежедневным дробным введением малых доз СТЗ.

Животные, отобранные для эксперимента, были распределены на группы:

- 1) контрольная группа (животные без лечения – без введения островков Лангерганса или КИК ПЖ) – 4 крысы;
- 2) опытная группа 1 (внутрибрюшинное введение 2000 аллогенных островков Лангерганса в виде суспензии) – 4 крысы;
- 3) опытная группа 2 (внутрибрюшинное инъекционное введение КИК ПЖ, сформированной на основе 2000 аллогенных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда (ДПЖч-скаффолда) из децеллюляризованной ПЖ человека) – 4 крысы.

фолда) из децеллюляризованной ПЖ человека) – 4 крысы.

Наблюдение за всеми животными продолжалось в течение 10 недель. Уровень гликемии в капиллярной крови животных измеряли натошак еженедельно через 12 часов после последнего приема пищи.

Гистологическое исследование

Выявление структурных нарушений в паренхиме ПЖ и почек проводили в результате морфологического исследования. Фиксацию извлеченных органов экспериментальных животных проводили в 10% забуференном формалине в течение 24 часов, затем обезживали в спиртах восходящей концентрации, выдерживали в смеси этанола и хлороформа, чистом хлороформе, после чего заливали в парафин.

С помощью микротомы RM2245 (Leica, Германия) получали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и на общий коллаген по методу Массона. Клеточный состав панкреатических островков в ПЖ крыс контрольной и опытных групп оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания основных типов островковых клеток с использованием антител к инсулину и глюкагону (Abcam, Великобритания) и системы визуализации Rabbit Specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC kit (Abcam, Великобритания).

Выявление и оценку степени структурных нарушений в почках экспериментальных животных проводили с помощью окрашивания срезов гематоксилином и эозином.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel (2016). Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный сахарный диабет I типа

Для экспериментов по исследованию функциональной эффективности КИК ПЖ использовали крыс ($n = 13$) с показателями уровня глюкозы в крови натошак от 20,4 до 32,6 ммоль/л через 2 недели после окончания введения СТЗ (табл. 1). Клинически у этих животных отмечали гиподинамию, склонность к образованию ран и гнойников, полиурию, значительную полидипсию и снижение массы тела по сравнению с интактными животными.

Для подтверждения развития СД I проводили гистологическое исследование ПЖ крысы с уровнем гликемии 25,3 ммоль/л через 2 недели после последнего введения СТЗ. Была выявлена в целом сохран-

ность экзокринной паренхимы, лишь в отдельных долях отмечали умеренную очаговую лимфоидно-клеточную инфильтрацию. В немногочисленных островках Лангерганса нерегулярной формы выявлялись вакуолизированные клетки (вероятно, β -клетки) (рис. 1, а). При окрашивании антителами к инсулину наблюдали негативную реакцию, что свидетельствовало о гибели β -клеток (рис. 1, б). При этом глюкагонпозитивные α -клетки обнаруживались не только на периферии, но и в центральной части островков и в значительно большем количестве, чем у здоровой крысы (рис. 1, в). При гистологическом исследовании почек крысы с клиническими признаками СД I выявлены выраженные изменения, в том числе наличие множественных вакуолизированных клеток канальцевого эпителия (клетки Armanni–Ebstein, являющиеся патогномоничными при сахарном диабете) (рис. 1, г). Наблюдались очаги воспалительной инфильтрации (лимфоидноклеточная с примесью плазмоцитов). Изредка в просвете канальцев обнаруживались белковые цилиндры.

При формировании экспериментальной модели СД I дробное введение СТЗ было применено в связи с тем, что такой подход позволял обеспечить стойкий диабетический статус у животных при исключении их гибели и спонтанной реверсии диабета [16]. Полученный СД I характеризовался стабильными гипер-

гликемическими показателями (от 20 до 33 ммоль/л) в крови опытных животных и другими признаками диабета: полидипсией, полиурией.

Морфофункциональный анализ изолированных островков Лангерганса крысы до формирования КИК ПЖ

Свежевыделенные островки Лангерганса преимущественно округлой формы в основном сохраняли целостность макроструктуры, не поврежденной в процессе выделения островков (рис. 2, а). Панкреатические островки при окрашивании дитизоном избирательно приобретали красно-оранжевый цвет, при этом ацинарные клетки оставались неокрашенными (рис. 2, б).

Для определения жизнеспособности панкреатических островков крысы, культивированных 24 часа, проводили окрашивание витальным красителем акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/PI). Выявлена жизнеспособность островков выше 96% (рис. 2, в).

В пробах культуральной среды, отобранных через 24 часа культивирования островков, базальная концентрация инсулина составила $178,6 \pm 13,3$ мкЕД/мл, после стимуляции «гипергликемическим» уровнем глюкозы 4,5 г/л (25 ммоль/л) увеличилась на 35,4% ($241,8 \pm 14,2$ мкЕД/мл), что стало подтверждением

Таблица 1

Динамика уровня глюкозы и массы тела у крыс с СД I
Changes in glucose levels and body weight in T1D rats

Сутки после введения последней дозы СТЗ	Уровень глюкозы, ммоль/л			Масса тела, г		
	1	7	14	1	7	14
Норма, n = 4	$5,5 \pm 0,7$	$5,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,9$	345 ± 15	350 ± 18	365 ± 24
СД I, n = 13	$17,8 \pm 3,3$	$19,1 \pm 3,5$	$26,5 \pm 6,1$	310 ± 25	295 ± 27	280 ± 23

Примечание. $p < 0,05$ по сравнению со значениями аналогичных показателей нормы (интактные крысы).

Note. $p < 0.05$ compared with the values of similar indicators of the norm (intact rats).

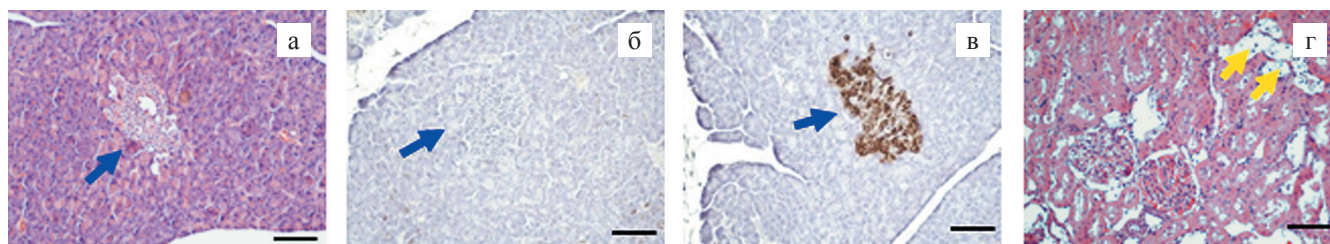


Рис. 1. Поджелудочная железа (а–в) и почка (г) крысы с экспериментальным СД I; а, г – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 1. Pancreas (a–v) and kidney (g) of a rat with experimental T1D; a, g – H&E stain; б – immunohistochemical staining for insulin; в – immunohistochemical staining for glucagon. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μ m

функциональной активности изолированных островков (рис. 2, г).

Таким образом, было установлено, что выделенные островки Лангерганса крысы по своему морфо-функциональному состоянию (уровню жизнеспособности и функциональной активности) могут быть использованы в качестве клеточного инсулинпродуцирующего компонента для формирования КИК ПЖ.

Сравнительный анализ функциональной эффективности КИК ПЖ и островков Лангерганса у крыс с экспериментальным сахарным диабетом I типа

Функциональную эффективность КИК ПЖ, сформированного на основе аллогенных островков Лангерганса и тканеспецифического скаффолда из децеллюляризованной ПЖ человека, оценивали относительно способности восстанавливать физиологический уровень глюкозы в крови крыс с экспери-

ментальным СД I, индуцированным СТЗ, в течение 10 недель.

Контрольная группа

У всех животных контрольной группы на протяжении срока наблюдения сохранялись выраженные клинические признаки СД I, общее состояние крыс ухудшалось. У животных отмечали полидипсию, полиурию, гиподинамию, незаживающие гнойные раны на хвостах, дальнейшую потерю массы тела (с 280 ± 23 до 170 ± 35 г). Уровень гипергликемии в крови животных контрольной группы ($n = 4$) в течение срока наблюдения повышался (табл. 2). Из четырех контрольных крыс две погибли на сроках 3 и 8 недель.

В гистологических образцах ПЖ крыс контрольной группы после вывода из эксперимента (10 недель) обнаруживали немногочисленные островки Лангерганса нерегулярной формы, с практически полным отсутствием в них инсулинпозитивных

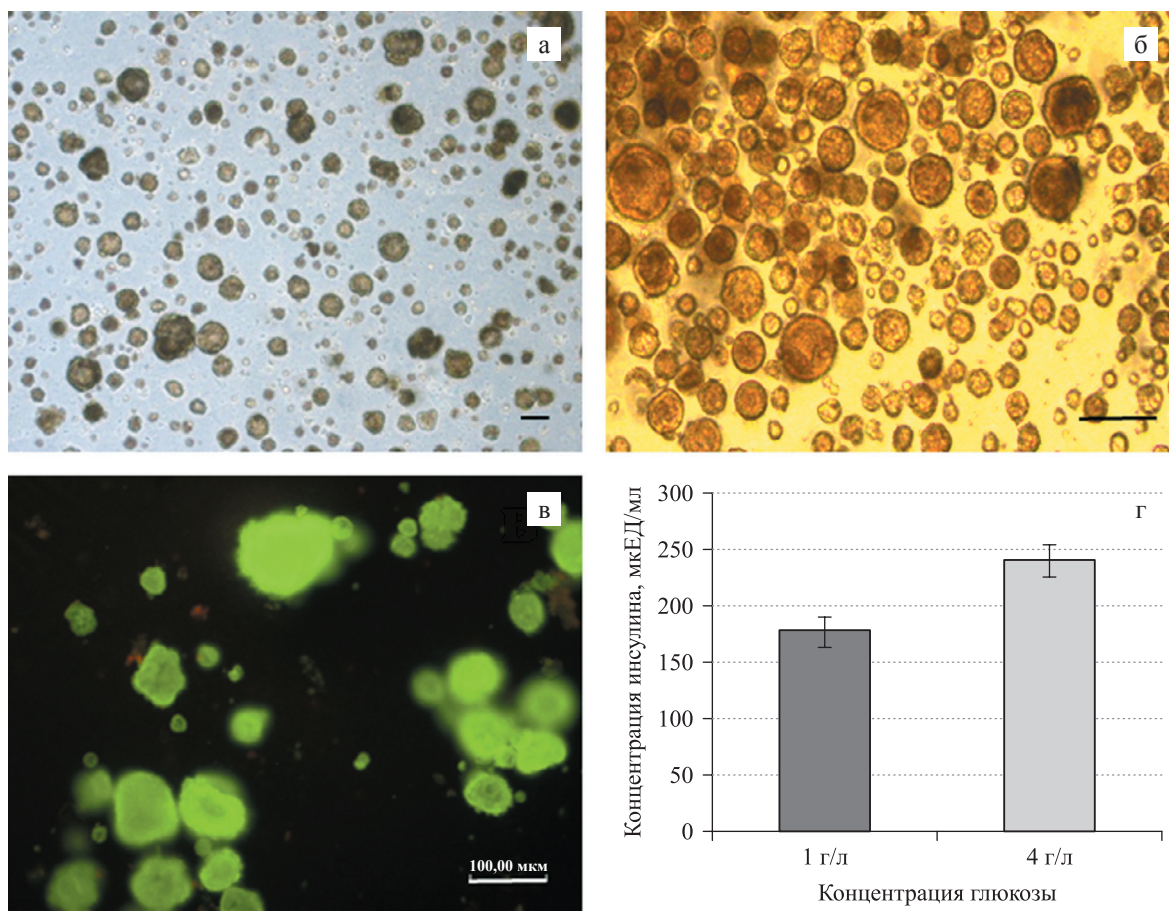


Рис. 2. Изолированные островки Лангерганса здоровой крысы: а – фазово-контрастная микроскопия; б – окрашивание дитизоном; в – островки, культивированные 24 часа, флуоресцентное окрашивание акридиновым оранжевым и йодистым пропидием (АО/ПИ); г – функциональная активность изолированных островков Лангерганса здоровой крысы, культивированных 24 часа. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 2. Isolated islets of Langerhans of a healthy rat: а – phase-contrast microscopy; б – dithizone staining; в – islets cultured for 24 hours, acridine orange and propidium iodide (AO/PI) fluorescent staining; г – functional activity of isolated islets of Langerhans of a healthy rat cultured for 24 hours. Scale bar: 100 μm

β -клеток и многочисленными глюкагонпозитивными α -клетками (рис. 3, а–в). При гистологическом исследовании почек крыс контрольной группы выявили морфологические изменения органа, наличие очагов воспалительной инфильтрации и многочисленных клеток Armanni–Ebstein, что является одним из признаков диабетической нефропатии, развивающейся на фоне СД I без лечения (рис. 3, г). Кроме того, в просвете отдельных канальцев обнаруживались отложения плотного материала – белковые цилиндры.

Опытная группа 1 (введение островков Лангерганса)

У крыс опытной группы 1 ($n = 4$) после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса уже через неделю замедлились характерные клинические признаки СД I, отмечали прибавку в весе (от 280 ± 23 до 305 ± 15 г). При этом у всех крыс-реципиентов через трое суток после введения островков было отмечено существенное снижение уровня гипергликемии – на $12,5 \pm 3,2$ ммоль/л (табл. 3). В дальнейшем у трех крыс содержание глюкозы в крови стабилизировалось на уровне, в среднем в 2,5 раза меньше по сравнению с уровнем до введения островков. Однако после 7 недель наблюдения уровень глюкозы в опытной группе 1 стал возрастать и к 10-й неделе у двух крыс достиг уровня выше исходного (до введения островков), у одной крысы – на 7,3 ммоль/л ниже исходного уровня. На 6-й неделе крыса с уровнем глюкозы в крови 27,3 ммоль/л погибла, несмотря на то что после введения островков у нее наблюдали стабильное снижение гипергликемии.

Гистологическая картина ПЖ крыс опытной группы 1 выявила хорошую сохранность эндокринной паренхимы без признаков воспаления и островки нерегулярной формы, как и в ПЖ крыс контрольной группы, с редкими вакуолизированными клетками, вероятно, β -клетками (рис. 4, а–в). У двух крыс (крыса 2 и крыса 4) при иммуногистохимическом окраши-

вании инсулинпозитивных β -клеток не обнаружили, при этом в островках присутствовали многочисленные глюкагонпозитивные α -клетки. У одной крысы (крыса 3) отмечали наличие единичных β -клеток в островках (рис. 4, г). Морфологическое исследование почек крыс опытной группы 1 не выявило выраженных дегенеративных изменений сосудисто-клубочкового аппарата, однако в эпителии канальцев обнаружено наличие многочисленных вакуолизированных клеток – клеток Armanni–Ebstein (рис. 4, д). В просвете некоторых канальцев визуализировался хлопьевидный материал.

Опытная группа 2 (введение КИК ПЖ)

У крыс опытной группы 2 ($n = 4$) через неделю после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ на основе аллогенных островков Лангерганса с ДПЖч-скаффолдом наблюдали замедление клинических проявлений СД I, как и у животных опытной группы.

Таблица 2

Динамика уровня гликемии у крыс контрольной группы без лечения

Dynamics of blood glucose level in control group rats without treatment

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	22,1	20,7	29,5	32,2
4	20,2	22,0	$\geq 33,0$	31,5
7	22,7	19,3	30,7	$\geq 33,0$
14	27,8	18,8	28,8	24,3
21	25,3	25,5	погибла	28,0
28	28,0	26,3	–	$\geq 33,0$
35	30,4	28,0	–	$\geq 33,0$
42	$\geq 33,0$	26,8	–	$\geq 33,0$
49	$\geq 33,0$	28,4	–	$\geq 33,0$
56	погибла	26,5	–	$\geq 33,0$
63	–	31,2	–	$\geq 33,0$
70	–	32,5	–	$\geq 33,0$

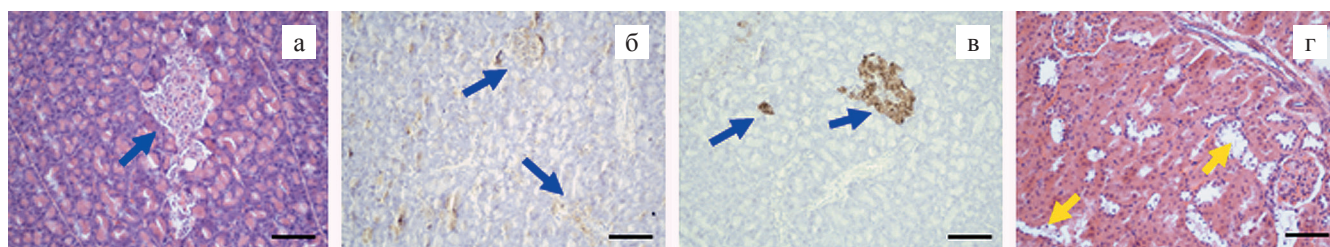


Рис. 3. Поджелудочная железа (а–в) и почка (г) крысы контрольной группы с экспериментальным СД I; а, г – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 3. Pancreas (a–v) and kidney (g) of control group rats with experimental T1D; a, g – H&E stain; б – immunohistochemical staining for insulin; в – immunohistochemical staining for glucagon. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μ m

У крысы 3 практически полностью исчезли такие признаки СД I, как полидипсия и полиурия, отмечали значительную прибавку массы тела – с 303 г в момент введения КИК ПЖ до 555 г к 10-й неделе

Таблица 3

Динамика уровня гликемии у крыс опытной группы 1 с СД I после введения островков Лангерганса

Changes in blood glucose levels in T1D rats of experimental group 1 after injection of islets of Langerhans

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	26,7	30,7	23,0	32,5
4	11,6	15,3	12,9	23,1
7	13,0	13,5	9,5	18,8
14	11,5	16,0	15,3	10,9
21	15,8	22,3	14,8	12,3
28	23,0	20,9	15,7	14,9
35	27,3	22,6	12,4	14,1
42	погибла	18,9	12,1	16,3
49	–	19,1	14,8	15,9
56	–	26,1	23,0	18,7
63	–	25,4	22,3	21,7
70	–	33,0	27,6	25,2

эксперимента. У крыс-реципиентов 3 и 4 отмечено пролонгированное снижение уровня гликемии более чем в 3 раза по сравнению с исходным значением и достижение нормогликемических показателей (до 7,5 ммоль/л) в отдельных измерениях у крысы 1 (табл. 4). К окончанию эксперимента (10 недель наблюдения) у указанных крыс регистрировали уровни глюкозы в крови 9,5 и 7,9 ммоль/л соответственно, что оказалось намного ниже исходного среднего уровня ($25,8 \pm 5,1$ ммоль/л). У крысы 1 не наблюдали стойкого снижения гипергликемии: после введения КИК ПЖ уровень глюкозы в крови колебался от 4,9 до 17,3 ммоль/л. На момент вывода из эксперимента (70 суток) концентрация глюкозы в крови крысы 1 не превышала исходного значения и составила 17,0 ммоль/л.

На четвертой неделе наблюдения крыса 2 с уровнем глюкозы 5,9 ммоль/л погибла.

Гистологическое исследование ПЖ крыс опытной группы 2 выявило сохранение экзокринной паренхимы без признаков воспаления и отсутствие инфильтратов (рис. 5, а, г). В островках как округлой, так и нерегулярной формы наблюдали немногочисленные вакуолизированные клетки. Иммуногистохимическое окрашивание на инсулин выявило наличие немногочисленных β -клеток в островках ПЖ крыс 1 и 4 (рис. 5, б); у крысы 3 увеличение

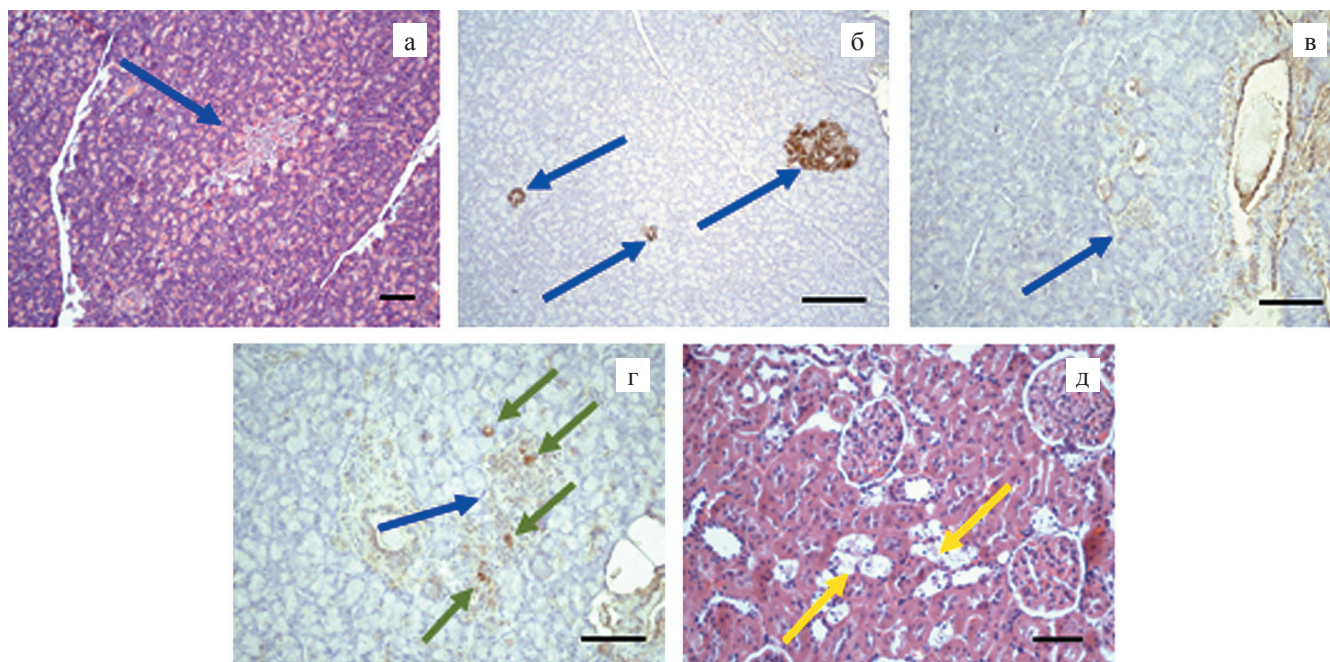


Рис. 4. Поджелудочная железа (а–г) и почка (д) крыс опытной группы 1 с экспериментальным СД I после внутрибрюшинного введения островков Лангерганса; а, д – гематоксилин и эозин; б – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон; в, г – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин. Синими стрелками отмечены островки Лангерганса, зелеными – инсулин-позитивные клетки. Желтыми стрелками отмечены клетки Armanni–Ebstein в эпителии канальцев. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 4. Pancreas (a–г) and kidney (д) of experimental group 1 rats with T1D after intraperitoneal injection of islets of Langerhans; а, д – H&E stain; б – immunohistochemical staining for glucagon; в, г – immunohistochemical staining for insulin. Blue arrows indicate islets of Langerhans. Yellow arrows indicate tubular epithelial Armanni–Ebstein cells. Scale bar: 100 μm

количества инсулинпозитивных клеток оказалось более существенным (рис. 5, д), при этом отмечалось снижение количества глюкагонпозитивных клеток в островках (рис. 5, в, е). Исходя из экспериментальных данных [16], можно предположить, что кроме непосредственного антидиабетического действия имплантация КИК ПЖ может оказывать положительное влияние на процессы восстановления пула активно функционирующих β -клеток реципиента, что подтверждалось результатами проведенного нами гистологического исследования. Морфологическая картина почек крыс опытной группы 2 в отличие от почек животных контрольной группы и опытной группы 1 демонстрировала немногочисленные клетки Argmanni–Ebstein и отсутствие белковых цилиндров в просвете канальцев (рис. 5, ж).

На рис. 6 представлена сравнительная диаграмма динамики изменения уровней глюкозы в крови животных контрольной и опытных групп. График гликемических показателей контрольной группы

Таблица 4

Динамика уровня гликемии у крыс опытной группы 2 с СД I после введения КИК ПЖ

Changes in blood glucose levels in T1D rats of group 2 after CEPC injection

Сутки	Глюкоза в крови, ммоль/л			
	Крыса 1	Крыса 2	Крыса 3	Крыса 4
0	20,4	25,6	24,7	32,6
4	17,9	23,0	5,7	19,5
7	4,9	3,9	10,0	6,5
14	9,0	7,4	3,6	7,9
21	10,8	5,9	6,9	9,2
28	13,2	погибла	10,7	10,7
35	17,3	–	13,9	7,2
42	15,6	–	9,6	8,5
49	11,8	–	12,4	10,3
56	12	–	10,6	6,8
63	11,1	–	6,5	8,9
70	17,0	–	9,5	7,9

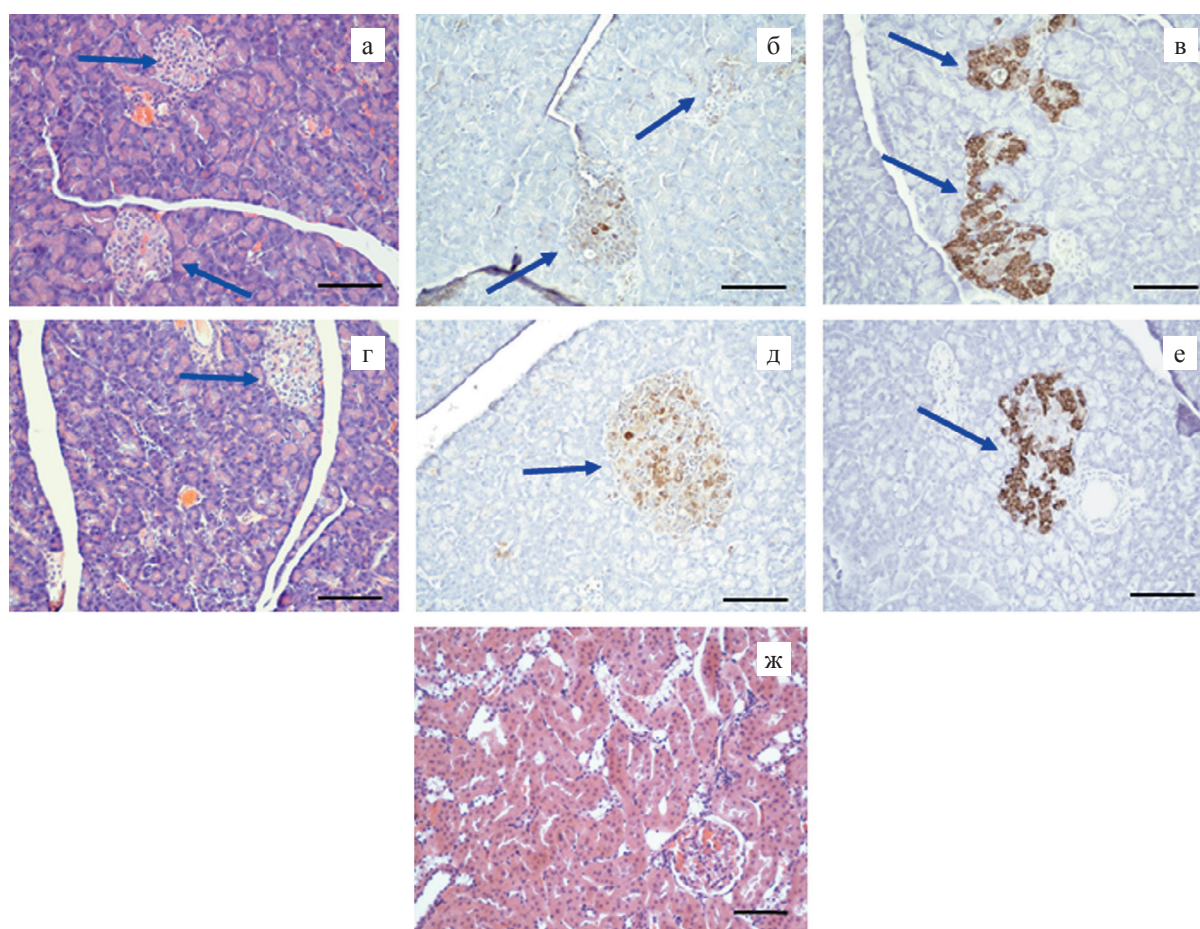


Рис. 5. Поджелудочная железа (а–е) и почка (ж) крыс опытной группы 2 с экспериментальным СД I после внутрибрюшинного введения КИК ПЖ; а, г, ж – гематоксилин и эозин; б, д – иммуногистохимическое окрашивание на инсулин; в, е – иммуногистохимическое окрашивание на глюкагон. Стрелками отмечены островки Лангерганса. Размер масштабной линейки 100 мкм

Fig. 5. Pancreas (a–e) and kidney (ж) of rats of experimental group 2 with T1D after intraperitoneal injection of CEPC; а, г, ж – H&E; б, д – immunohistochemical staining for insulin; в, е – immunohistochemical staining for glucagon. Arrows indicate islets of Langerhans. Scale bar: 100 μ m

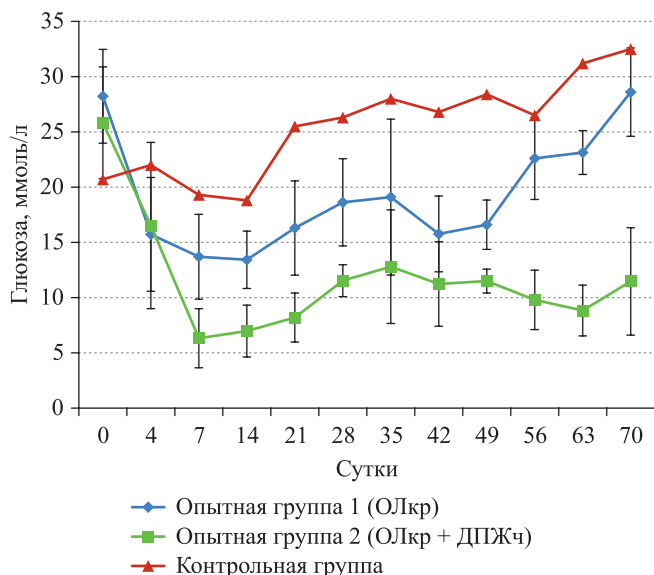


Рис. 6. Динамика уровня глюкозы в крови крыс с экспериментальным СД I контрольной (без лечения) и опытных групп после внутривентриального введения КИК ПЖ (ОЛкр + ДПЖч) или суспензии островков Лангерганса (ОЛкр). Гликемические показатели контрольной группы представлены по уровням глюкозы в крови одной крысы. Гликемические показатели опытной группы 1 представлены по уровням глюкозы в крови четырех крыс до 42 суток, далее из-за гибели одного животного учитывали показатели трех крыс. Гликемические показатели опытной группы 2 представлены по уровням глюкозы в крови четырех крыс до 28 суток, далее из-за гибели одного животного учитывали показатели трех крыс

Fig. 6. Changes in blood glucose levels in T1D rats of the control group (without treatment) and experimental groups after intraperitoneal injection of CEPK (islets of Langerhans (rIsL) + decellularized human pancreas (DHP)) or suspension of islets of Langerhans (rIsL). Glycemic indicators of the control group are presented according to blood glucose levels of one rat. Glycemic indicators of experimental group 1 are presented by blood glucose levels of four rats up to 42 days, and then due to the death of one animal, the indicators of three rats were considered. Glycemic indicators of experimental group 2 are presented by blood glucose levels of four rats up to 28 days, and then due to the death of one animal, the indicators of three rats were considered

приведен по уровням гликемии одной крысы, не превышающим предельное значение глюкометра – 33,0 ммоль/л, на протяжении всего срока наблюдения. В контрольной группе показатели гипергликемии стабильно повышались на протяжении всего эксперимента.

В опытной группе 1 происходило заметное снижение уровня гликемии после введения островков Лангерганса – с $28,2 \pm 4,2$ до $13,4 \pm 2,6$ ммоль/л, которое сохранялось на протяжении 7 недель, после чего происходило повышение гликемии до уровней, близких к исходным значениям (до введения островков).

В опытной группе 2 отмечали более выраженное по сравнению с опытной группой 1 снижение

гликемии – с $25,8 \pm 5,1$ до $6,3 \pm 2,7$ ммоль/л. Такие значения концентраций глюкозы в крови животных сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Уровень глюкозы к 10-й неделе эксперимента был ниже исходного в среднем в 2 раза.

У крыс опытной группы 2 после введения КИК ПЖ наблюдали максимальное снижение уровня гликемии относительно исходных гипергликемических показателей на 75,6%; у крыс опытной группы 1 после введения суспензии островков – на 52,5%.

Таким образом, проведенные исследования показали функциональную эффективность *in vivo* аллогенных островков Лангерганса, введенных как без скаффолда, так и в составе КИК эндокринного отдела ПЖ. При этом установлено более выраженное снижение концентрации глюкозы в крови крыс-реципиентов после введения экспериментальных образцов КИК ПЖ по сравнению с уровнем гликемии крыс-реципиентов после введения островков без скаффолда (на 75,6 и 52,5% соответственно).

Полученные результаты коррелируют с данными предварительного исследования [17], где при внутривентриальном введении КИК ПЖ тканеспецифический скаффолд обеспечивал панкреатическим островкам более длительное выживание и эффективное функционирование *in vivo*.

Таким образом, показана важная роль тканеспецифического скаффолда в создании биоискусственной ПЖ. Оптимальный скаффолд, полученный из децеллюляризованной панкреатической ткани для формирования КИК ПЖ, должен: 1) соответствовать критериям эффективной децеллюляризации, 2) максимально сохранять нативную структуру, 3) обеспечивать сайты, необходимые для клеточной адгезии и пролиферации, 4) равномерно заселяться инсулин-продуцирующими клетками [6, 14]. Синтетические искусственные каркасы могут не соответствовать некоторым из этих требований, и соответственно, позитивно влиять на выживаемость и функционирование островков *in vivo*. Присутствие в скаффолде из децеллюляризованной ПЖ нативных белков (различные типы коллагена, эластин, фибронектин и ламинин), а также факторов клеточной адгезии позволяет создавать условия для пролонгированной жизнедеятельности островковых клеток, тем самым поддерживая критическую массу островков, необходимую для трансплантации пациентам с СД I [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было установлено, что внутривентриальное введение образцов КИК ПЖ крысам с экспериментальным СД I приводило к значительному стабильному снижению уровня гликемии, который сохранялся в течение 10 недель. Таким образом, применение КИК ПЖ выявило более выраженный антидиабетический эффект у крыс с

СД I по сравнению с введением суспензии островков Лангерганса. Исходя из этого, можно сделать вывод о перспективности использования тканеспецифического скаффолда для создания биоискусственной ПЖ с целью повышения функциональной эффективности островков. Настоящая работа представляет собой основу для проведения исследований по созданию КИК эндокринного отдела ПЖ человека на основе тканеспецифического скаффолда из децеллюляризованной панкреатической ткани человека и островков Лангерганса посмертных доноров для частичной или полной замены утраченной эндокринной функции ПЖ у пациентов с тяжелым течением СД I.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Shapiro AM, Pokrywczynska AM, Ricordi C. Clinical pancreatic islet transplantation. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13 (5): 268–277. doi: 10.1038/nrendo.2016.178.
2. Cayabyab F, Nih LR, Yoshihara E. Advances in Pancreatic Islet Transplantation Sites for the Treatment of Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12: 732431. doi: 10.3389/fendo.2021.732431.
3. Reid L, Faye Baxter F, Forbes S. Effects of islet transplantation on microvascular and macrovascular complications in type 1 diabetes. *Diabet Med*. 2021; 38 (7): e14570. doi: 10.1111/dme.14570.
4. Eguchi N, Damyar K, Alexander M, Dafoe D, Lakey JRT, Ichii H. Anti-Oxidative Therapy in Islet Cell Transplantation. *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11 (6): 1038. doi: 10.3390/antiox11061038.
5. Amer LD, Mahoney MJ, Bryant SJ. Tissue engineering approaches to cell-based type 1 diabetes therapy. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014; 20 (5): 455–467. doi: 10.1089/ten.TEB.2013.0462.
6. Mirmalek-Sani S-H, Orlando G, McQuilling JP, Pareta R, Mack DL, Salvatori M et al. Porcine pancreas extracellular matrix as a platform for endocrine pancreas bioengineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (22): 5488–5495. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.054.
7. Abualhassan N, Sapozhnikov L, Pawlick RL, Kahana M, Pepper AR, Bruni A et al. Lung-derived microscaffolds facilitate diabetes reversal after mouse and human intraperitoneal islet transplantation. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0156053. doi: 10.1371/journal.pone.0156053.
8. Damodaran G, 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; doi: 10.1002/term.2655.
9. Lim LY, Ding SSL, Muthukumaran P, Teoh SH, Koh Y, Teo AKK. Tissue engineering of decellularized pancreas scaffolds for regenerative medicine in diabetes. *Acta Biomater*. 2023; 157: 49–66. doi: 10.1016/j.actbio.2022.11.032.
10. Wu D, Wan J, Huang Y, Guo Y, Xu T, Zhu M et al. 3d Culture of MIN-6 Cells on Decellularized Pancreatic Scaffold: *In Vitro* and *In Vivo* Study. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 432645. doi: 10.1155/2015/432645.
11. Goh S-K, Bertera S, Olsen P, Candiello JE, Halfter W, Uechi G et al. Perfusion-Decellularized Pancreas As A Natural 3d Scaffold For Pancreatic Tissue And Whole Organ Engineering. *Biomaterials*. 2013; 34 (28): 6760–6772. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.05.066.
12. Sabetkish S, Kajbafzadeh AM. The Most Ideal Pancreas Extracellular Matrix as a Platform for Pancreas Bioengineering: Decellularization/Recellularization Protocols. *Adv Exp Med Biol*. 2021; 1345: 61–70. doi: 10.1007/978-3-030-82735-9_6.
13. Biomimetics of Extracellular Matrices for Cell and Tissue Engineered Medical Products / Eds. Victor I. Sevastianov and Yulia B. Basok. – Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2023; 339.
14. Sevastianov VI, Ponomareva AS, Baranova NV, Kirsanova LA, Basok YuB, Nemets EA et al. Decellularization of Human Pancreatic Fragments with Pronounced Signs of Structural Changes. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (1): 119. doi: 10.3390/ijms24010119.28.
15. Napierala H, Hillebrandt K-H, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J et al. Engineering an endocrine neopancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017 Feb 2; 7: 41777. doi: 10.1038/srep41777.
16. Скалецкая ГН, Скалецкий НН, Кирсанова ЛА, Бубенцова ГН, Волкова ЕА, Севастьянов ВИ. Экспериментальная имплантация тканеинженерной конструкции поджелудочной железы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2019; 21 (2): 104–111. Skaletskaya GN, Skaletskiy NN, Kirsanova LA, Bubentsova GN, Volkova EA, Sevastyanov VI. Experimental implantation of tissue-engineering pancreatic construct. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2019; 21 (2): 104–111. (In Russ.). doi: 10.15825/1995-1191-2019-2-104-111.
17. Пономарева АС, Баранова НВ, Никольская АО, Кирсанова ЛА, Онищенко НА, Гоникова ЗЗ и др. Внутривнутрибрюшинное введение клеточно-инженерной конструкции поджелудочной железы крысам с экспериментальным сахарным диабетом (предварительные результаты). *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2023; 25 (2): 107–117. Ponomareva AS, Baranova NV, Nikolskaya AO, Kirsanova LA, Onishchenko NA, Gonikova ZZ et al. Intraperitoneal injection of cell-engineered pancreas in rats with experimental type I diabetes (preliminary results). *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2023; 25 (2): 107–117. doi: 10.15825/1995-1191-2023-2-107-117.
18. Smink AM, de Vos P. Therapeutic strategies for modulating the extracellular matrix to improve pancreatic islet function and survival after transplantation. *Curr Diab Rep*. 2018; 18 (7): 39. doi: 10.1007/s11892-018-1014-4.

*Статья поступила в редакцию 04.03.2024 г.
The article was submitted to the journal on 04.03.2024*

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-105-118

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ СОСУДИСТЫХ ПРОТЕЗОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА: РЕЗУЛЬТАТЫ ШЕСТИМЕСЯЧНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ НА МОДЕЛИ ОВЦЫ

*Е.А. Сенокосова, Е.О. Кривкина, Е.А. Великанова, А.В. Сеницкая, А.В. Миронов,
А.Р. Шабаев, М.Ю. Ханова, Е.А. Торгунакова, Л.В. Антонова*

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

Модифицирование поверхности полимерных каркасов лекарственными препаратами во избежание тромбообразования и инфицирования – перспективное направление тканевой инженерии, позволяющее также ускорить их ремоделирование и улучшить долгосрочную проходимость. **Цель:** изучить гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра с атромбогенным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированных в сонную артерию овцы. **Материалы и методы.** Методом электроспиннинга изготовлены матрицы Ø4 мм из поли(ε-капролактона) (PCL) с последующим созданием на их внешней поверхности армирующего спиралевидного каркаса из PCL посредством экструзии. Для предупреждения тромбообразования и инфицирования изготовленные протезы модифицировали илопростом и катионным амфифилом посредством комплексообразования через поливинилпирролидон (PVP). Проведены работы по оценке с помощью ИК-спектроскопии формирования покрытия на основе PVP, изучению физико-механических свойств протезов в продольном и поперечном направлениях, имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы. Для оценки и контроля проходимости имплантированных протезов проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с функцией Доплера на 1-е, 5-е сутки, затем через 1, 3 и 6 месяцев. Эксплантированные образцы изучены методами гистологического и иммунофлуоресцентного анализов, проведена оценка профиля генной экспрессии. **Результаты.** Согласно данным УЗИ-мониторинга, на 1-е и 5-е сутки после имплантации проходимость сосудистых протезов составила 100%. Через 1 месяц проходимость снизилась до 83,3%, к концу срока имплантации (6 месяцев) проходимость составила 50%, без развития аневризмообразования и отслойки армирующего каркаса. Результаты гистологического и иммунофлуоресцентного исследований проходимых протезов показали формирование на их основе новообразованной трехслойной структуры сосудистой ткани, без признаков воспаления и кальцификации. Однако, несмотря на структурное сходство новообразованной сосудистой ткани с нативной тканью сонной артерии овцы, анализ профиля генной экспрессии выявил различия по генетическому профилю: обнаружено снижение уровня экспрессии генов *CNN* и *SNA12* в неоткани и увеличение уровня *CTSB*, *TNFA*, *TGFb*. **Заключение.** Модифицированные полимерные сосудистые каркасы показали хорошее ремоделирование стенки протеза, без аневризмообразования. Выявленные генетические отличия новообразованной ткани от нативной логичны ввиду формирования ее на базе искусственного полимерного каркаса. Дальнейшие исследования усиленных полимерных каркасов будут направлены на усовершенствование внутренней поверхности с целью повышения их тромборезистентности.

Ключевые слова: сосудистые протезы, атромбогенная обработка, противомикробная обработка, илопрост, катионные амфифилы.

Для корреспонденции: Кривкина Евгения Олеговна. Адрес: 650002, Кемерово, Сосновый б-р, д. 6.
Тел. (908) 946-66-39. E-mail: leonora92@mail.ru

Corresponding author: Evgeniya Krivkina. Address: 6, Sosnovy Bul'var, Kemerovo, 650002, Russian Federation.
Phone: (908) 946-66-39. E-mail: leonora92@mail.ru

HISTOLOGIC AND GENETIC FEATURES OF REMODELING OF TISSUE-ENGINEERED SMALL-DIAMETER VASCULAR GRAFTS: OUTCOMES OF SIX-MONTH IMPLANTATION IN A SHEEP MODEL

E.A. Senokosova, E.O. Krivkina, E.A. Velikanova, A.V. Sinitskaya, A.V. Mironov, A.R. Shabaev, M.Yu. Khanova, E.A. Torgunakova, L.V. Antonova

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

Surface modification of polymeric scaffolds with drugs to avoid thrombus formation and infection is a promising area in tissue engineering, which also makes it possible to accelerate the remodeling of such scaffolds and improve long-term patency. The **objective** of this paper is to study the histologic and genetic features of remodeling of tissue-engineered small-diameter vascular grafts (SDVGs) with antithrombogenic drug-coated and reinforced external scaffolds, implanted into a sheep carotid artery. **Materials and methods.** Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) matrices, $\varnothing 4$ mm in diameter, were fabricated via electrospinning, followed by creation of a reinforcing spiral PCL scaffold on their outer surface by extrusion. To prevent thrombus formation and infection, the fabricated grafts were modified with iloprost and cationic amphiphile by complexation through polyvinylpyrrolidone (PVP). The work was carried out to evaluate, by infrared spectroscopy, the formation of PVP-based coating, to study the physical and mechanical properties of the grafts in longitudinal and transverse directions, and to implant the vascular grafts (VGs) into a sheep carotid artery. To assess and control the patency of the implanted grafts, Doppler ultrasound was performed at days 1 and 5, then at 1, 3 and 6 months. The explanted samples were studied via histological and immunofluorescent analyses; gene expression profile was evaluated. **Results.** Ultrasound on days 1 and 5 after implantation showed the patency of vascular grafts to be 100%. At 1 month, the patency decreased to 83.3%; patency was 50% by the end of the implantation period (6 months), without aneurysm formation and detachment of the reinforcing scaffold. Histological and immunofluorescence studies of patent grafts showed the formation of a newly formed three-layer vascular tissue structure on their basis, without signs of inflammation and calcification. However, despite the structural similarity between the newly formed vascular tissue and the native tissue of a sheep carotid artery, analysis of the gene expression profile revealed some differences in terms of genetic profile: *CNN* and *SNAI2* expression levels in the neotissue decreased, and those of *CTSB*, *TNFA*, and *TGFB* increased. **Conclusion.** Modified polymeric vascular scaffolds showed good remodeling of the prosthetic wall, without aneurysm formation. The identified genetic differences between newly formed tissue and native tissue are logical in view of formation on the basis of the artificial polymeric scaffold. Further research on reinforced polymeric scaffolds will be aimed at improving the inner surface in order to improve their thromboresistance.

Keywords: vascular grafts; antithrombogenic treatment; antimicrobial treatment; iloprost; cationic amphiphiles.

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающее с каждым годом число сердечно-сосудистых заболеваний – одна из основных причин смерти населения во всем мире [1, 2]. Аутологичные трансплантаты являются предпочтительным материалом для восстановления кровотока в пораженной области сосудистого бассейна. Однако доступность артерий и вен пациентов ограничена из-за качества сосудов, связанного с сопутствующими заболеваниями (повышенное кровяное давление, сахарный диабет и другие) [1].

Альтернативой аутоотрансплантатам можно считать клинически одобренные синтетические сосудистые протезы из полиэтилентерефталата (polyethylene terephthalate, PET, Dacron) и политетрафторэтилена (polytetrafluoroethylene, PTFE). Они демонстрируют высокую эффективность при протезировании круп-

ных сосудов с внутренним диаметром более 6 мм. Однако данные протезы теряют свою эффективность при замене участка сосуда диаметром менее 5 мм, проявляя склонность к тромбозам, стенозам, окклюзии сосудистого просвета и инфицированию [2, 3]. Актуальным подходом к созданию протезов сосудов малого диаметра является тканевая инженерия (ТИ), основанная на различных тактиках работы с биосовместимыми и биodeградируемыми полимерами. Различные методы ТИ позволяют спроектировать искусственные тканеподобные матрицы/ткани с необходимыми структурными и механическими свойствами [4–6]. Сосудистый протез из такого материала обладает способностью к синхронному процессу биodeградации и ремоделирования своей стенки с вектором формирования трехслойной структуры нативного кровеносного сосуда при участии клеток

организма [7–9]. Однако данный процесс достаточно длителен и сопровождается такими рисками, как тромбоз, аневризмообразование и микробное обсеменение [10–12].

Высокопористые тканеинженерные конструкции при контакте с кровью способны провоцировать тромбообразование. Поэтому при разработке изделий для нужд сердечно-сосудистой хирургии данные особенности необходимо учитывать. Поверхностное модифицирование протезов атромбогенными лекарственными препаратами может предупредить тромбоз просвета имплантированных сосудистых протезов как в раннем послеоперационном периоде, так и в процессе длительной биорезорбции основного каркаса протеза [11, 13].

Несмотря на то что за прошедшие годы разработаны различные подходы модифицирования сосудистых протезов для предотвращения их инфекционного заражения и тромбообразования, ни один из них не смог продемонстрировать каких-либо значительных преимуществ [14–16].

Помимо вышеперечисленных проблем в случае применения биодеградируемых сосудистых протезов должно быть четкое понимание уровня синхронизации ремоделирования с процессами биодеградации. Уже существуют работы, в которых проведен подробный анализ итогов долгосрочной имплантации биодеградируемых сосудистых протезов с использованием крупной животной модели [6, 8, 12, 17]. Доказано, что тканеинженерные сосудистые протезы замещаются новообразованной сосудистой тканью, превращаясь в подобие аутологических сосудов, что подтверждает способность биодеградируемых протезов к адаптивному росту. Однако при всех многообещающих разработках и успешном тестировании на мелкой животной модели основным итогом преклинических испытаний биодеградируемых сосудистых протезов малого диаметра на модели крупных лабораторных животных явилось аневризмообразование в силу ускоренной биорезорбции основного каркаса сосудистого протеза [6, 17].

Поэтому создание внешнего армирующего каркаса позволит предупредить аневризмообразование и другие деформативные изменения стенок протеза в ходе долгосрочного функционирования в сосудистом русле. А использование для поверхностного модифицирования лекарственных препаратов, способных предупредить как тромбообразование, так и инфицирование, увеличит долгосрочную эффективность разрабатываемых для нужд сердечно-сосудистой

хирургии высокопористых тканеинженерных конструкций.

Цель данного исследования – изучить гистологические и генетические особенности ремоделирования тканеинженерных сосудистых протезов малого диаметра с атромбогенным и противомикробным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированных в сонную артерию овцы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление биодеградируемых сосудистых протезов

Сосудистые протезы диаметром 4 мм изготавливали методом электроспиннинга из 12% раствора PCL (Sigma-Aldrich, США) в трихлорметане. Электроспиннинг осуществляли на приборе Nanop-01A (MECC, Япония) при следующих параметрах: напряжение на конце иглы – 22 кВ, скорость подачи раствора полимера – 0,5 мл/ч, скорость вращения коллектора 200 об/мин, расстояние от иглы до намоточного коллектора 150 мм, игла 22 G.

Создание внешнего армирующего слоя сосудистых протезов

Для предупреждения аневризмообразования на внешней поверхности сосудистых протезов был создан армирующий спиралевидный каркас, который изготавливали из поликапролактона (PCL) молекулярной массой 90 000 Да (Sigma Aldrich, США) на оригинальной установке, состоящей из каретки с экструдером и вращающегося вала, в следующем режиме: скорость вращения вала – 1 об/с, скорость движения каретки – 1 мм/с, скорость подачи пластика – 0,5 мм/с (сопло экструдера – 0,5 мм), температура подачи волокна – 160 °C [13].

Формирование лекарственного покрытия на поверхности сосудистых протезов

Для предупреждения тромбообразования и инфицирования поверхность сосудистых протезов модифицировали лекарственными препаратами. На первом этапе формировали гидрогелевое покрытие из 10% поливинилпирролидона (PVP, PanReac AppliChem, Испания) в 25% этиловом спирте. После протезы в стеклянные пробирках, заполненных аргонном, облучали ионизирующим излучением с общей поглощенной дозой 15 кГр с использованием импульсного линейного ускорителя ИЛУ-10 с энергией пучка 5 МэВ 50 кВТ (производитель – ИЯФ им. Г.И. Будкера СО РАН, Россия). Данная процедура

обеспечила прививку PVP к поверхности PCL за счет радиационно-химического сшивания полимеров. Радиальные центры возникают на поверхности PCL и в структуре нанесенного PVP-слоя в результате ионизирующего воздействия, что приводит к трехмерному сшиванию PVP и его связыванию с поверхностью полимерного графта [18]. Параллельно с прививкой PVP прошла стерилизация трубчатых каркасов протезов.

На втором этапе методом комплексообразования с PVP вводили антиагрегант – илопрост (Ило, Берлимед Са, Испания) и катионный амфифил 1,5-бис-(4-тетрадецил-1,4-диазониабисцикло[2.2.2]октан-1-ил) пентан тетрабромид (А, ООО «Нанотех-с», Новосибирск), обладающий антимикробными и противовирусными свойствами [5].

Качество прививки оценивали ранее методом ИК-спектроскопии, анализируя спектры ИК НПВО внутренней поверхности модифицированных протезов на приборе Bruker Vertex 80v (Германия) с приставкой ATR (Германия) в спектральной области 4000–5000 см^{-1} [19]. Подтверждение образования покрытия из PVP на поверхности протезов, а также оценка кинетики высвобождения лекарственных препаратов, присоединенных методом комплексообразования к слою PVP, сформированному на поверхности протезов, были проведены нами ранее [19].

Оценка физико-механических свойств биодеградируемых сосудистых протезов

Оценку физико-механических свойств протезов PCL/PVP/Ило/А с внешним армирующим каркасом проводили в условиях одноосного растяжения в соответствии с ГОСТ 270-75. В качестве группы сравнения использовали аналогичные протезы без армирующего каркаса. Испытания проведены на универсальной испытательной машине серии Z (Zwick/Roell, Германия), с использованием тензодатчика номинальной нагрузки 50 Н с пределом допустимой погрешности $\pm 1\%$, скорость подъема траверсы при испытании 50 мм/мин, при температуре окружающей среды 37 °С, поддерживаемой термокамерой. Предел прочности материала оценивали как максимальное напряжение при одноосном растяжении (МПа) до разрушения. Упруго-деформативные свойства материала оценивали с помощью модуля Юнга (МПа). Полученные данные экспортировали как отношение относительного удлинения (мм) к напряжению (МПа), претерпеваемому образцом.

Имплантация биодеградируемых сосудистых протезов в сонную артерию овец

Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ № 12 от 10.06.2020 г. Работа с животными соответствовала требованиям приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003, «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986), Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996) и международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (1996).

Сосудистые протезы PCL/PVP/Ило/А ($n = 12$) с внешним армирующим каркасом были имплантированы в сонную артерию овец эдильбаевской породы методом «конец в конец» по схеме: 1 животное – 1 протез. Диаметр протезов составил 4 мм, длина – 40 мм. Срок имплантации составил 6 месяцев. Имплантация протезов и анестезиологическое сопровождение осуществлялось по схеме, приведенной ниже.

Премедикация крупных лабораторных животных производилась ксилазином (Ксиланит) 0,05–0,25 мл с расчетом на 10 кг массы животного и внутримышечным введением 1 мг атропина. Вводный наркоз производился 5–7 мг пропофола на 1 кг массы животного, в течение 90 секунд, затем внутривенно вводился атракурия безилат (Риделат), в дозировке 0,5–0,6 мг на 1 кг массы животного. Интубация трахеи овцы – эндотрахеальной трубкой диаметром 9,0. В процессе проведения манипуляций по имплантации сосудистых протезов в сонную артерию овцы, поддержание наркоза шло на севоране 2–4 об% и риделате – путем непрерывной инфузии со скоростью 0,3–0,6 мг/кг/ч. Параллельно проводился мониторинг жизненных показателей животного: артериального давления (АД), частоты сердечных сокращений (ЧСС), уровня кислорода в крови (SpO_2). Фиксировались показатели при искусственной вентиляции легких (ИВЛ): частота дыхания (ЧД) – 12–15/мин, конечно-экспираторное давление (РЕЕР) 7–9 mbar, дыхательный объем (ДО) 6–8 мл/кг, фракция кислорода во вдыхаемой смеси (FiO_2) – 40–60%.

Для осуществления доступа к сонной артерии овцы проводилась внутривенная системная гепаринизация – 5000 ЕД, с пережатием сонной артерии. Затем производился продольный разрез сонной артерии длиной 40 мм. Непосредственно имплантация

сосудистых протезов осуществлялась отдельными узловыми швами нитью Prolene 6/0 (Ethicon, США). После снятия зажимов с сонной артерии следовали стандартному протоколу профилактики воздушной эмболии с последующим запуском кровотока и ушиванием раны нитью Vicril 2,0 (Ethicon, США). В заключение операции проводилась обработка шва клеем БФ-6, подкожное введение эноксапарина натрия в концентрации 4000 анти-Ха МЕ/0,4 мл и экстубация животного.

Для оценки проходимости имплантированных протезов проводили ультразвуковое исследование (УЗИ) с функцией Допплера на аппарате M 7 Premium (Mindray, Китай) на следующих сроках: 1-е, 5-е сутки, 1, 3 и 6 месяцев.

Гистологическое исследование

Эксплантированные образцы сосудистых протезов фиксировали в 10% забуференном формалине (BioVitrum, Россия) в течение суток, затем обезживали в 6 порциях IsoPrep (BioVitrum, Россия) и пропитывали парафином (3 порции) при 56 °С в течение 60 мин в каждой порции. Пропитанные образцы заливали в тугоплавкий парафин ГИСТОМИКС (BioVitrum, Россия). Из полученных образцов изготавливали срезы толщиной 8 мкм с помощью микротомы HM 325 (Thermo Scientific, США). Далее их подсушивали в термостате в течение ночи при 37 °С, затем депарафинизировали в 3 порциях о-ксилола в течение 1–2 мин в каждой и дегидратировали в 3 порциях 96% спирта по 1–2 мин. Далее депарафинированные срезы были окрашены гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону и ализариновым красным С, в соответствии с ранее отработанными протоколами окрашивания [19]. Полученные препараты срезов сосудистых протезов исследовали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением объектива $\times 50$.

Иммунофлуоресцентное исследование

Эксплантированные сосудистые протезы для иммунофлуоресцентного окрашивания замораживали при температуре -140 °С. Далее замороженные образцы фиксировали в криосреде Tissue-Tek (Sakura, Япония) и изготавливали срезы толщиной 8 мкм на криостате CryoStar NX50 (Thermo Scientific, США). Затем проводили не прямое флуоресцентное окрашивание срезов с использованием специфических антител к CD31, фактору фон Виллебранда (vWF), α -актину гладкомышечных клеток, коллагену III,

IV типа (Abcam, Англия). Ядра клеток контрастировали DAPI (Sigma, США). Контрольные образцы готовили аналогично опытным, но вместо первичных антител использовали 1% раствор бычьего сывороточного альбумина. Препараты заключали в монтирующую среду ProLong (Life Technologies, США) под покровное стекло и анализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 700 (Zeiss, Германия).

Определение уровня мРНК

Для получения эндотелиального лизата с эксплантированных участков нативных артерий и проходных сосудистых протезов проводили смыв внутреннего эндотелиального слоя лизирующим реагентом TRIzol (Invitrogen, США). Образцы помещали в TRIzol reagent с последующей гомогенизацией (FastPrep-24 Instrument and Lysing Matrix S, MP Biomedicals, США). Качество и количество выделенной РНК определяли на приборе Qubit 4 (Invitrogen, США) посредством измерения индекса RIQ (RNA Integrity and Quality) с использованием набора реагентов Qubit RNA IQ Assay Kit (Invitrogen, США). На основе выделенной РНК синтезировали кДНК с использованием набора для обратной транскрипции High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Экспрессию генов определяли методом кПЦР с использованием мастер-микса БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR ($2\times$) (MHR033-2040, «Биолабмикс», Россия) и праймеров, синтезированных компанией «Евроген» на амплификаторе CFX96 (BioRad, США). Характеристика генов, включенных в исследование, представлена в табл. 1. Результаты кПЦР нормировали с помощью трех референсных генов *ACTB*, *GAPDH*, *B2M* в соответствии с имеющимися рекомендациями. Экспрессию изучаемых генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и выражали в виде кратного изменения относительно нативных сонных артерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Физико-механические свойства протезов

Была проведена сравнительная оценка физико-механических свойств протезов PCL/PVP/По/А до и после формирования внешнего армирующего слоя в продольном и поперечном направлениях. Показатели, полученные в продольном направлении, также были сравнены с аналогичными показателями сонной артерии овцы. Доказано, что формирование на внешней поверхности протезов PCL/PVP/По/А арми-

рующего слоя в виде спирали из поликапролактона способствовало повышению прочности сосудистых протезов в продольном и поперечном направлениях, но при этом в 2 раза увеличивалась жесткость протезов в поперечном направлении, что является нежелательным моментом для подобных изделий (табл. 2). Тем не менее критичное отличие полимерных сосудистых протезов от показателей сонной артерии овцы имело место лишь по Модулю Юнга, который

у протезов PCL/PVP/По/А с армирующей внешней спиралью и без таковой превысил значения модуля Юнга сонной артерии овцы (в продольном направлении) в 13,3 и 17,4 раза соответственно, $p < 0,05$.

В наших предыдущих работах было доказано, что в отличие от немодифицированных сосудистых протезов на основе поликапролактона спектр модифицированных PVP-протезов содержал полосу при 1654 см^{-1} , соответствующую группе $-\text{CONH}_2$ пирро-

Таблица 1

Характеристика праймеров Characteristics of primers

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>IL1B</i>	5'-TGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	5'-ACCCAAGGCCACAGGAATCTT-3'
<i>IL6</i>	5'-TGTCATGGAGTTGCAGAGCAGT-3'	5'-CCAGCATGTCAGTGTGTGTGG-3'
<i>IL10</i>	5'-ATGCCACAGGCTGAGAACCA-3'	5'-TCGCAGGGCAGAAAACGATG-3'
<i>IL12A</i>	5'-GCAGAAGGCCAGACAAACCC-3'	5'-TGAAGCCAGGCAACTCTCA-3'
<i>IL12B</i>	5'-AGAGCCTGCCATTGAGGTC-3'	5'-GGTCTTGGGTGGGTCTGGT-3'
<i>CXCR4</i>	5'-CTGGAGAGCAAGCGGTTACCA-3'	5'-ACAGTGGGCAGGAAGATCCG-3'
<i>CXCL8</i>	5'-CTTCCAAGCTGGCTGTTGCTC-3'	5'-ATTTGGGGTGGAAAGGTGTGG-3'
<i>IFNG</i>	5'-TGAACGGCAGCTCTGAGAAAC-3'	5'-TGGCGACAGGTCATTATCA-3'
<i>TNF</i>	5'-CTTCTGCCTGCTGCACTTCG-3'	5'-TGGCTACAACGTGGGCTACC-3'
<i>ICAM1</i>	5'-GTCACGGGGAACAGATTGTAGC-3'	5'-TGAGTTCTTACCCACAGGCT-3'
<i>NOS3</i>	5'-CTTCCGTGGTTGGGCAAAGG-3'	5'-CGTTTCCAGCTCCGTTTGGG-3'
<i>FGF2</i>	5'-AGAGCGACCTCACATCAAACT-3'	5'-TCAGTGCCACATACCAACTGGA-3'
<i>VEGFA</i>	5'-GCTTCTGCCGTCCCATTTAG-3'	5'-ATGTGCTGGCTTTGGTGAGG-3'
<i>TGFB1</i>	5'-TGAGCCAGAGGCGGACTACT-3'	5'-ACACAGGTTACAGGCACTGCT-3'
<i>KDR</i>	5'-ACAGAACCAAGTTAGCCCCATC-3'	5'-TCGCTGGAGTACACAGTGGTG-3'
<i>MMP2</i>	5'-ACCCCGCTACGGTTTTCTCG-3'	5'-ATGAGCCAGGAGCCCGTCTT-3'
<i>NR2F2</i>	5'-GCAAGCGGTTTGGGACCTT-3'	5'-GGACAGGTAGGAGTGGCAGTTG-3'
<i>SNAI2</i>	5'-ACCCTGGTTACTGCAAGGACA-3'	5'-GAGCCCTCAGATTGGACCTG-3'
<i>YAP1</i>	5'-TGCTTCGGCAGGAATTAGCTCT-3'	5'-GCTCATGCTCAGTCCGCTGT-3'
<i>CXCL1</i>	5'-AACATGCAGAGCGTGAAGGTG-3'	5'-CGGGGTTGAGACACACTTCCT-3'
<i>CD14</i>	5'-AATCAAGGCTCTGCGCGTTC-3'	5'-CGTTGGGCCAGTTACCTCCA-3'
<i>CD40LD</i>	5'-ACTGAGAGCTGCAAACACCCA-3'	5'-AAACACCGAAGCACCTGTT-3'
<i>CNN</i>	5'-CCAACCACACGCAAGTGCAG-3'	5'-TCCTGCTTCTCCGCGTATTTCA-3'
<i>CTSB</i>	5'-AGTGTGGGGACGGCTGTAAC-3'	5'-AGGGAGGGATGGAGTACGGT-3'
<i>CXCL1</i>	5'-AACATGCAGAGCGTGAAGGTG-3'	5'-CGGGGTTGAGACACACTTCCT-3'
<i>CXCL10</i>	5'-AGTACCTTCAGTTGCAGACCA-3'	5'-TGGGCAGGATTGACTTGCAG-3'
<i>EDN1</i>	5'-GCGACAGTCCACAGGAAGAGA-3'	5'-GGTTGTCCCAGGCTTTCTCC-3'
<i>EDNRA</i>	5'-AGGAACGGCAGCCTGAGAAT-3'	5'-AGGGAACCAGCACAGAGCAA-3'
<i>IL1A</i>	5'-TGACCTGGAAGCCATTGCCA-3'	5'-TGAGGGCGTCGTTACAGGATG-3'
<i>IL4</i>	5'-GGCGTATCTACAGGAGCCACA-3'	5'-ACTCGTCTTGGCTTCATTACACA-3'
<i>IL18</i>	5'-AGGAAGCTATTGAGCACAGGCAT-3'	5'-CTGATTCCAGGTCTTCGCCAT-3'
<i>KLF4</i>	5'-AGGACGGCCACTCACACTTG-3'	5'-ACTTCCACCCACAGCCATCC-3'
<i>MIF</i>	5'-TGCCGATGTTCTGTGGTGAAC-3'	5'-GGTCATGAGCTGGTCTGGGA-3'
<i>SELE</i>	5'-CACTGGACCCCAGCACTTACA-3'	5'-GCTGATGGCTGCACAGGTTAC-3'
<i>SELP</i>	5'-TTCCACTGCGCTGAAGGGTA-3'	5'-TGGACTGGTGTGGAATGCT-3'
<i>PAI</i>	5'-GCAGTGGCAGCAGGAACAAA-3'	5'-TGGTGCTGGTAGGAGGCAGA-3'
<i>SMAD4</i>	5'-TCTGGAGGAGATCGTTTTGCT-3'	5'-TTCCAACCTGCACACCTTTGCC-3'
<i>B2M</i>	5'-CCTTCTGTCCACGCTGAGT-3'	5'-TGGTGCTGCTTAGAGGTCTCG-3'
<i>ACTB</i>	5'-AGCAAGAGAGGCATCCTGACC-3'	5'-GGCAGGGGTGTTGAAGGTCT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TGGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	5'-AGGGGTCATTGATGGCAACG-3'

лидонового кольца, что подтверждает прививку PVP к поверхности сосудистого протеза [19].

Косвенным доказательством устойчивости привитого к поверхности PVP при его контакте с водной фазой свидетельствовала динамика выхода лекарственных препаратов, соединенных методом комплексообразования с привитым PVP. В частности, доказано, что илопрост способен выделяться в раствор фосфатно-солевого буфера в течение 3 месяцев. Катионный амфифил в виде фосфатной соли молекулярного иона $C_{41}H_{84}Br_3N_4^+$ также сохранялся на поверхности протезов, инкубированных в течение 3 месяцев в фосфатно-солевом буфере [19]. При этом катионный амфифил определялся в неизменном виде

на поверхности протезов, хранившихся в течение 6 месяцев при температуре -20°C [19].

Результаты имплантации PCL/PVP/Ilo/A-протезов

Процедура формирования PCL-внешнего армирующего каркаса, соответствующая оригинальному протоколу метода послойного наплавления, не привела к ухудшению визуальных и хирургических свойств сосудистого протеза: прилегающее полимерное волокно не деформировало стенку изделия и в то же время не отслаивалось от него (рис. 1, а), что позволило в процессе имплантации протеза в сонную артерию овцы методом «конец в конец» захватить

Таблица 2

Механические свойства полимерных трубчатых каркасов PCL/PVP/Ilo/A до и после создания внешнего армирующего слоя (продольное и поперечное направление)

Mechanical properties of PCL/PVP/Ilo/A tubular polymeric scaffolds before and after creation of an external reinforcing layer (longitudinal and transverse direction)

	n	Напряжение, МПа	Относительное удлинение, %	Модуль Юнга, МПа
Продольное направление, Ме (25–75%)				
PCL/PVP/Ilo/A	6	0,98 (0,79–1,13)	285,0 (166,2–392,9)**	8,54 (6,04–15,87)**
PCL/PVP/Ilo/A с внешним армирующим слоем	6	1,35 (1,29–1,39)*	201,2 (128,1–232,3)*	6,5 (5,54–11,09)**
Сонная артерия овцы		1,2 (1,06–1,9)	158,5 (126,0–169,5)	0,49 (0,39–0,66)
Поперечное направление, Ме (25–75%)				
PCL/PVP/Ilo/A	6	1,24 (1,13–1,31)	28,43 (20,64–38,45)	9,62 (8,84–10,49)
PCL/PVP/Ilo/A с внешним армирующим слоем	6	2,43 (2,2–2,87)*	30,83 (28,66–34,60)	20,62 (17,58–23,04)*

Примечание. * – $p < 0,05$ относительно сосудистых протезов PCL/PVP/Ilo/A без внешнего армирующего слоя; ** – $p < 0,05$ относительно сонной артерии овцы (продольное направление).

Note. * – $p < 0.05$ relative to PCL/PVP/Ilo/A vascular grafts with no external reinforcing layer; ** – $p < 0.05$ relative to sheep carotid artery (longitudinal direction).

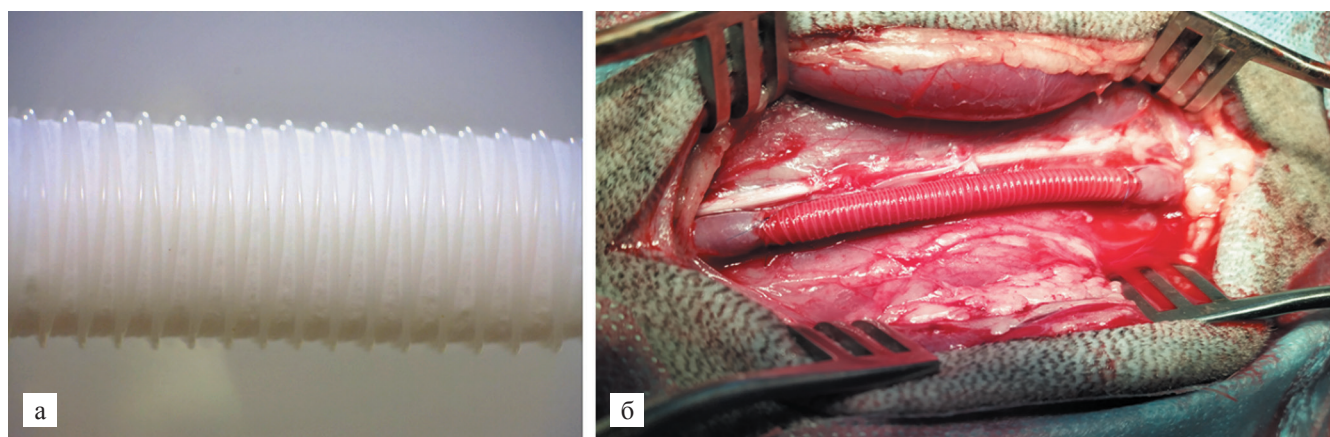


Рис. 1. PCL/PVP/Ilo/A-протез: а – стереомикроскопия протеза с антианевризматическим каркасом, $\times 10$; б – протез, имплантированный в сонную артерию овцы

Fig. 1. PCL/PVP/Ilo/A vascular graft: а – prosthesis stereomicroscopy with an anti-aneurysmal scaffold, magnification 10x; б – prosthesis implanted in a sheep carotid artery

крайние армирующие нити в непрерывный микрохирургический шов для обеспечения надежности комплекса «протез + артерия» и предупреждения отслаивания армирующего каркаса от основы изделия (рис. 1, б).

Результаты ультразвукового исследования

По результатам УЗИ на 1-е и 5-е сутки после имплантации PCL/PVP/По/А-протезов отмечена 100% проходимость. Скорость кровотока в данный период варьировала от 120,35 до 153,43 см/с. Через 1 месяц после имплантации проходимость составила 83,3%, однако к 3-му снизилась до 50,0% с сохранением данного процента проходимых протезов спустя 6 месяцев после имплантации, до крайнего срока наблюдения в 6 месяцев. УЗИ-мониторинг не выявил развития аневризмообразования и стенозов в стенках протезов, а также отслойки внешнего армирующего каркаса (рис. 2).

Результаты исследования

эксплантированных сосудистых протезов

Спустя 6 месяцев эксперимента в момент эксплантации при осуществлении доступа в зону с имплантированным протезом отмечено, что на каждом из них сформировалась умеренно васкуляризованная соединительно-тканная капсула с отчетливой визуализацией сохранного внешнего PCL-каркаса. Аневризм, стенозов либо иных значимых деформаций протезов не обнаружено. Очаги воспаления отсутствовали (рис. 3).

По результатам эксплантации и дальнейшего поперечного рассечения PCL/PVP/По/А-протезов констатировано отсутствие тромбов в просвете 50% эксплантированных протезов. Непроходимые протезы содержали в себе сероватый тромб по всей площади и протяжению изделия (рис. 3, б). Проходимые протезы были упруги, пристеночных тромбов не обнаружено, анастомозы представляли собой плавное соединение протеза с артерией с сохранением диаметра кровеносного сосуда (рис. 3, в). Визуально

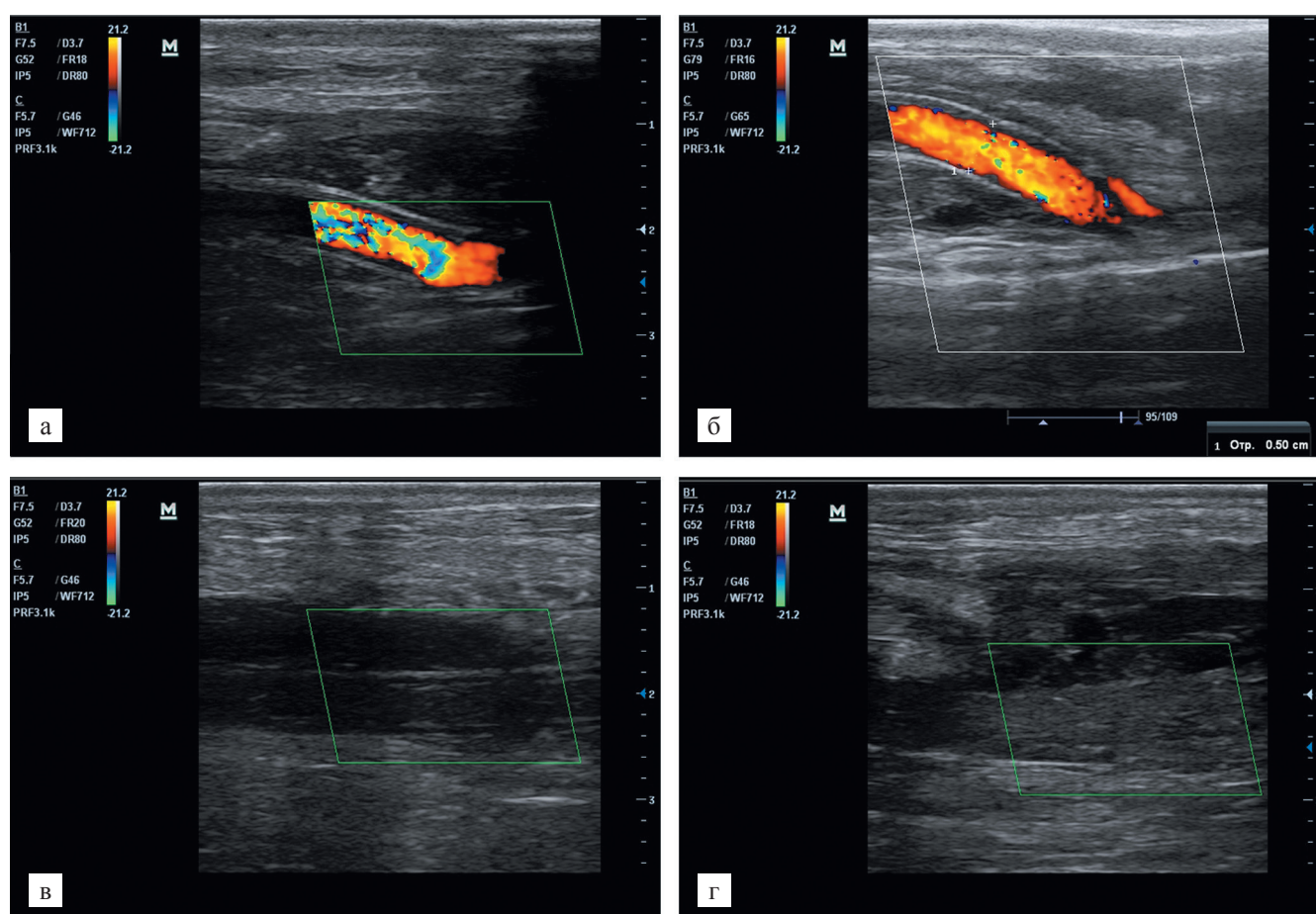


Рис. 2. Результаты УЗИ-мониторинга проходимости PCL/PVP/По/А-протезов на разных сроках имплантации в сонную артерию овцы. Проходимые протезы: а – 5 суток; б – 6 месяцев. Тромбированные протезы: в – 5 суток; г – 6 месяцев

Fig. 2. Results of ultrasound monitoring of the patency of PCL/PVP/По/А vascular grafts at different periods of implantation in a sheep carotid artery. Patent grafts: а – 5 days; б – 6 months. Thrombosed grafts: в – 5 days; г – 6 months

проходимые протезы после 6 месяцев функционирования в составе сосудистого русла соответствовали нативной артерии овцы: середина протеза и комплекс «протез + артерия» поддерживали круглый сосудистый просвет; толщина ремоделированной стенки изделия была сопоставима с толщиной стенки артерии (рис. 3, в, г).

Результаты гистологического исследования

На основании результатов гистологического исследования проходимых PCL/PVP/Ilo/A-протезов спустя 6 месяцев после имплантации в сонную артерию овцы выявлено, что трубчатая полимерная основа изделия практически полностью биодеградировала с формированием на своей базе новообразованной трехслойной сосудистой ткани (рис. 4). Вновь созданная сосудистая стенка состояла из неоинтимы толщиной от 81 до 146 мкм, неомедии толщиной от 198 до 232 мкм и неоадвентиции толщиной от 144 до 217 мкм. В совокупности измерений стенка ремоделированного сосуда составила 423–595 мкм,

что сопоставимо со значениями толщины нативной сонной артерии овцы (320–430 мкм). Со стороны сосудистого просвета неоинтимы покрыта монослоем вытянутых эндотелиоподобных клеток. Структурную основу неомедии представляли клетки, по морфологии схожие с гладкомышечными (см. рис. 4). Скопления клеток обрамляли коллагеновые волокна. Также в данном слое обнаружены разрозненные мелкие скопления бесструктурных полимерных масс, окруженные единичными гигантскими многоядерными клетками инородного тела, макрофагами и фибробластоподобными клетками. *Vasa vasorum* преимущественно выявляли вдоль границы с неоадвентицией. Последняя представляла собой внешний слой новообразованной ткани, которая напоминала структуру адвентиции артерии овцы и была сформирована коллагеновыми тяжами с частичным наполнением фибробластоподобными и гигантскими многоядерными клетками (рис. 4). Признаки воспаления и кальцификации стенки проходимых протезов отсутствовали.

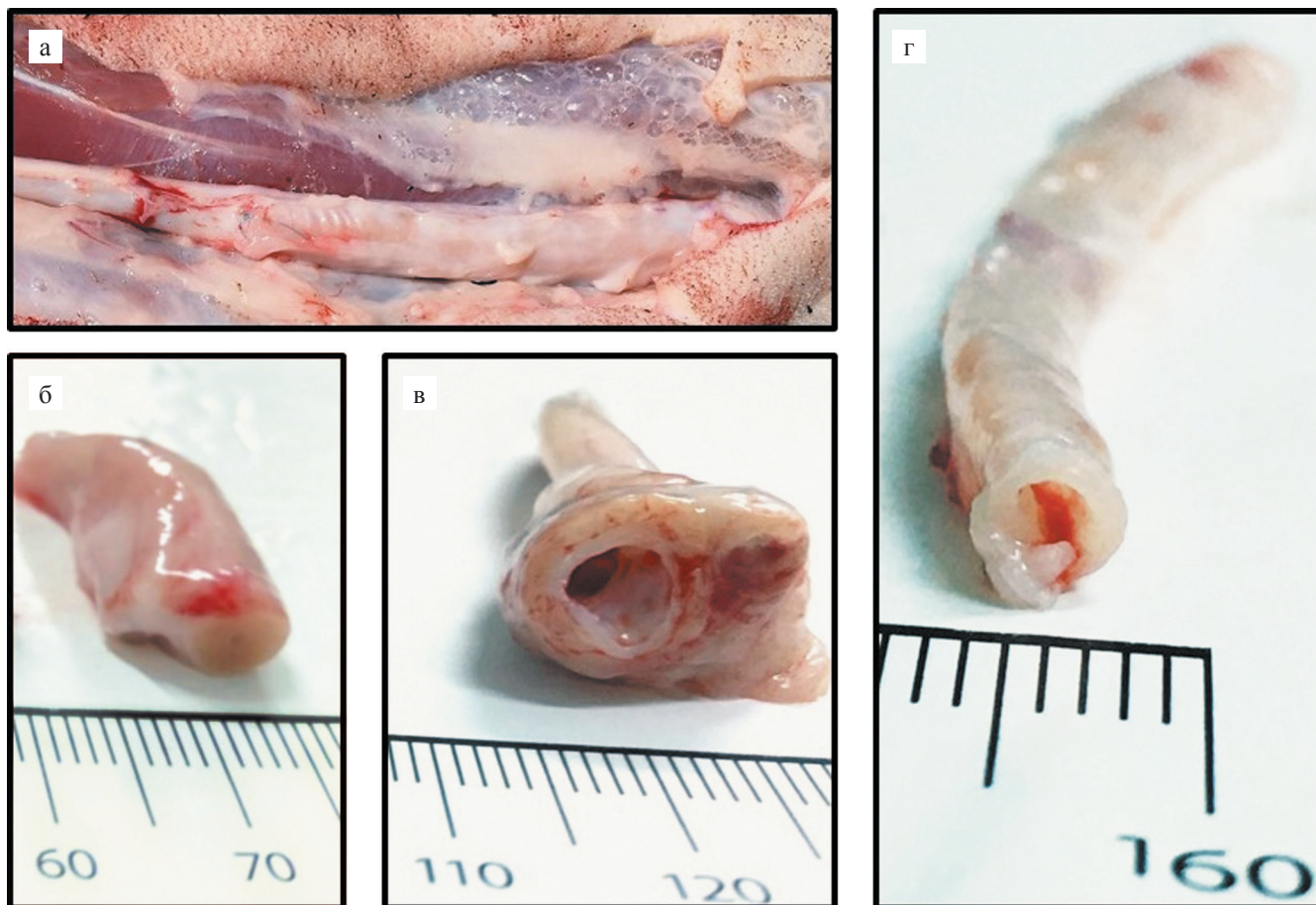


Рис. 3. Макрофотография эксплантированных PCL/PVP/Ilo/A-протезов: а – PCL/PVP/Ilo/A-протез в момент эксплантации; б – тромбированный протез; в – проходимый протез; г – интактная сонная артерия овцы

Fig. 3. Macro photograph of explanted PCL/PVP/Ilo/A vascular grafts: а – PCL/PVP/Ilo/A graft at the moment of explantation; б – thrombosed graft; в – patent graft; г – intact sheep carotid artery

Полимерная основа тромбированных PCL/PVP/По/А-протезов также практически полностью деградировала спустя 6 месяцев после имплантации без отложения кальциевых элементов и воспалительной инфильтрации. Данные протезы отличались наличием утолщенной васкуляризованной соединительнотканной капсулы.

Важно отметить высокую сохранность внешнего обмоточного каркаса как в непроходимых, так и проходимых протезах: визуализированы неразвитые PCL-нити округлой формы в поперечной проекции, окруженные коллагеновой капсулой без признаков кальцификации.

Результаты иммунофлуоресцентного исследования

Иммунофлуоресцентное исследование explantированных проходимых PCL/PVP/По/А-протезов подтвердило результаты гистологического исследования – формирование непрерывного эндотелиального слоя на внутренней поверхности протеза (рис. 5). Функциональность эндотелиальных клеток была продемонстрирована наличием фактора фон Виллебранда. На стенке протеза формировалась неоинтима типичного строения, которая состояла из клеток, положительных при окраске на α -актин гладкомышечных клеток, и содержала коллагены III и IV типов. Также большое количество коллагена

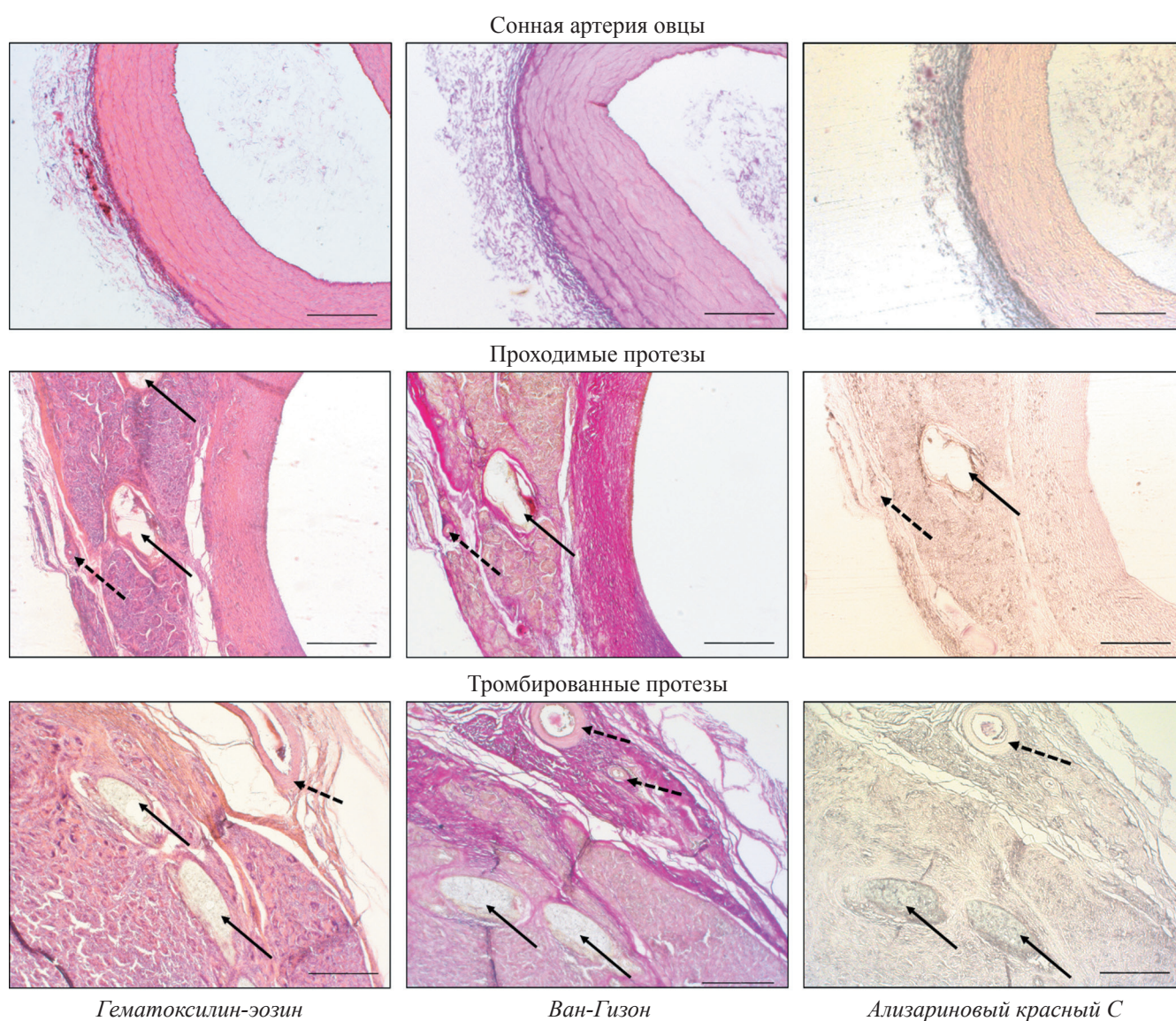


Рис. 4. Результаты гистологического исследования explantированных образцов PCL/PVP/Ilo/A-протезов спустя 6 месяцев после имплантации: сплошная стрелка – PCL-тяжи усиленного каркаса; пунктирная стрелка – *vasa vasorum*. Масштабная линейка – 500 мкм

Fig. 4. Results of histological examination of explanted samples of PCL/PVP/Ilo/A vascular grafts at 6 months of implantation: solid arrow, PCL-strands of reinforced scaffold; dotted arrow, *vasa vasorum*. Scale bar 500 μ m

III и IV типов выявлено в субэндотелиальном слое. Стенка протеза активно заселялась клетками. В толще стенки присутствовали небольшие комплексы из клеток CD31⁺, α -актин⁺ и vWF⁺, что может указывать на формирование в стенке протеза капилляров. Также в стенке протеза наблюдали большое количество коллагенов III и IV типов (рис. 5).

Результаты изучения профиля генной экспрессии

Сравнительный анализ уровня мРНК в эндотелиальном лизате и гомогенате проходимых ремоделированных PCL/PVP/По/A-протезов спустя 6 месяцев после имплантации показал, что новообразованная сосудистая ткань на месте биодеградируемого сосудистого протеза имела отличия от генетических характеристик нативных тканей сонной артерии овец. Гены, обнаруженные в эндотелиальном лизате, были разделены на три группы по уровню изменения экспрессии: повышенный уровень – *IL6* (в 4,93 раза), *TNFA* (в 5,52 раза), *CTSB* (в 2,40 раза), *SMAD4* (в 2,63 раза); пониженный уровень – *ICAM1*, *FGF2*, *TGFB*, *MIF1*, *IL18*, *CNN*, *CXCL1*, *CXCL10*, *IL4*, *SELP*, *KLF4*; неизменный уровень – *IL1B*, *IL10*, *IL8*, *IL12A*,

VEGF, *CXCR4*, *NR2F2*, *SNAI2*, *YAP1*, *KDR*, *MMP2*, *CD14*, *CD40L*, *EDN*, *PAI*, *SELE*.

Для новообразованной ткани отмечена гиперэкспрессия следующих генов в гомогенате: *IL10* (в 2,83 раза), *CXCL8* (в 4,56 раза), *TNF* (в 17,95 раза), *CXCR4* (в 13,42 раза), *TGFB* (в 6,06 раза), *CTSB* (в 2,05 раза). Снижение уровня мРНК в сравнении с тканью нативной сонной артерии овцы отмечено для генов: *IL6*, *VEGF*, *NR2F2*, *SNAI2*, *ICAM1*, *YAP1*, *FGF2*, *MIF1*, *IL18*, *CD14*, *CD40L*, *EDN*, *IL4*, *SELE*, *SELP*, *SMAD4*, *KLF4*, *EDNRA* (табл. 3).

Ремоделирование проходимых PCL/PVP/По/A-протезов за 6 месяцев после имплантации охарактеризовано экспрессией генов со значительным изменением уровня мРНК, которые являются ключевыми маркерами с позиции таких процессов биологии эндотелия, как воспаление (*IL6*, *IL4*, *CXCL8*, *IL10*, *TNFA*, *CD40L*, *CXCL1*, *CXCL10*, *MIF1*), эндотелиально-мезенхимальный переход (*SNAI2*), эндотелиальная дифференцировка (*VEGF*) и эндотелиальная механотрансдукция (*YAP1*, *KLF4*), адгезия лейкоцитов (*SELE*, *SELP*). Стоит отметить, что некоторые важные маркеры тканевого ремоделирования также были связаны с выраженным изменением уровня

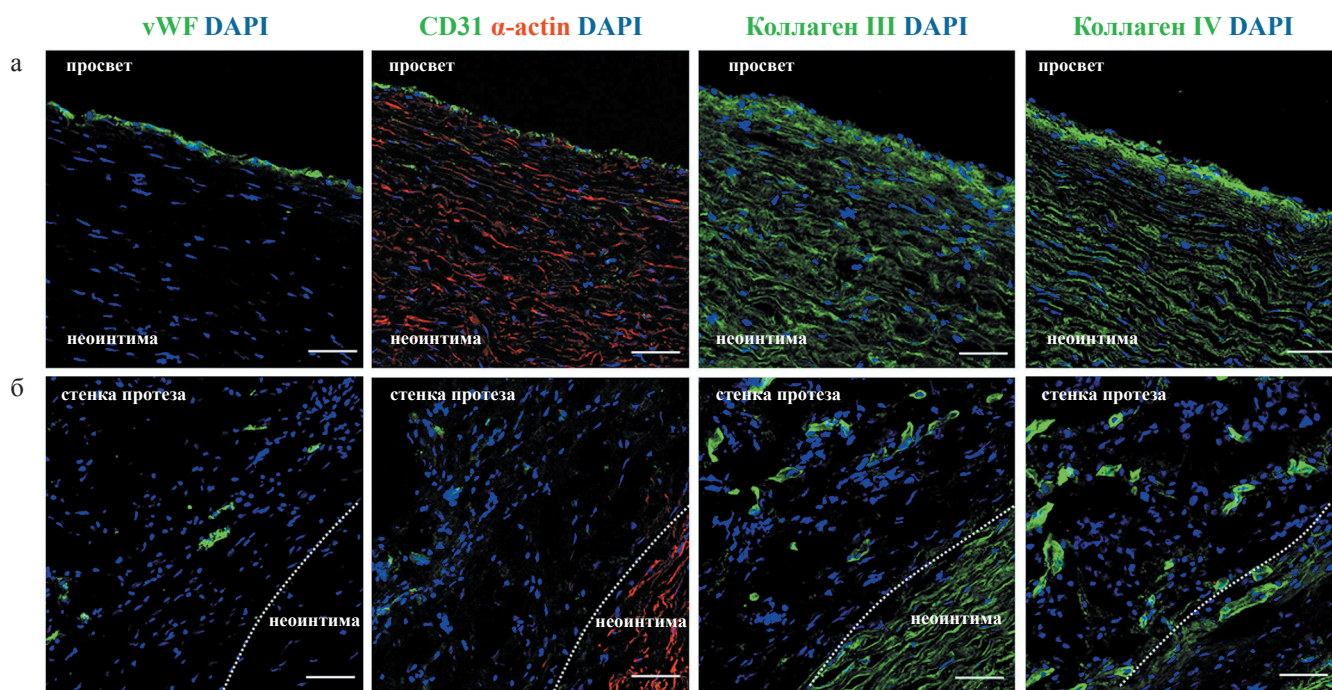


Рис. 5. Результаты конфокальной микроскопии сосудистых протезов PCL/PVP/По/A с антианевризматической обмоткой спустя 6 месяцев после имплантации: окраска специфичными флуоресцентными антителами на фактор фон Виллебранда (vWF, зеленый), CD31 (эндотелиальные клетки, зеленый), α -актин гладкомышечных клеток (α -actin, красный), коллаген III типа (зеленый), коллаген IV типа (зеленый). Ядра клеток контрастировали DAPI (синий); а – неоинтима и просвет протеза; б – стенка протеза. Масштабная линейка – 50 мкм

Fig. 5. Confocal microscopy of PCL/PVP/По/A vascular grafts with anti-aneurysmal winding at 6 months of implantation: staining with specific fluorescent antibodies for von Willebrand factor (vWF, green), CD31 (endothelial cells, green), α -actin of smooth muscle cells (α -actin, red), collagen type III (green), collagen type IV (green). Cell nuclei were contrasted with DAPI (blue); а – prosthesis neointima and lumen; б – prosthesis wall. Scale bar 50 μ m

Таблица 3

Кратность изменения экспрессии генов в эндотелиальном лизате и гомогенате проходимых сосудистых протезов относительно интактных сонных артерий овец**Multiplicity of gene expression changes in endothelial lysate and homogenate of patent vascular grafts relative to intact sheep carotid arteries**

Ген	Кодируемый белок	Гомогенат	Эндотелиальный лизат
<i>IL1B</i>	Interleukin-1 beta	0,58	0,65
<i>IL4</i>	Interleukin-4	0,11	0,37
<i>IL6</i>	Interleukin-6	0,27	4,93
<i>IL10</i>	Interleukin-10	2,83	0,71
<i>CXCL8</i>	Interleukin-8	4,56	1,99
<i>IL12A</i>	Interleukin-12A	0,97	1,57
<i>IL18</i>	Interleukin-18	0,2	0,5
<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor	17,95	5,52
<i>CXCL1</i>	Growth-regulated alpha protein	0,88	0,06
<i>CXCL10</i>	C-X-C motif chemokine	0,08	0,16
<i>VEGF</i>	Vascular endothelial growth factor A	0,27	1,17
<i>CXCR4</i>	C-X-C chemokine receptor type 4	13,42	1,41
<i>NR2F2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group F member 2	0,14	0,75
<i>SNAI2</i>	Snai2	0,22	1,71
<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1	0,36	0,35
<i>YAP1</i>	Yes-associated protein 1	0,005	0,68
<i>KDR</i>	Vascular endothelial growth factor receptor 2	0,84	1,06
<i>FGF2</i>	Fibroblast growth factor 2	0,014	0,18
<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2	1,71	1,82
<i>TGFB</i>	Transforming growth factor beta-1	6,06	0,45
<i>MIF1</i>	Macrophage migration inhibitory factor	0,43	0,27
<i>CTSB</i>	Cathepsin B	2,05	2,40
<i>CD14</i>	Monocyte differentiation antigen CD14	0,41	1,35
<i>CD40L</i>	CD40 ligand	0,21	1,24
<i>CNN</i>	Calponin-1	0,03	0,42
<i>EDNI</i>	Endothelin-1	0,24	1,12
<i>PAI1</i>	Plasminogen activator inhibitor type 1	0,56	0,64
<i>SELE</i>	Selectin E	0,33	0,55
<i>SELP</i>	P-selectin	0,45	0,29
<i>SMAD4</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 4	0,30	2,63
<i>KLF4</i>	Krueppel-like factor 4	0,40	0,09

мРНК: молекула межклеточной адгезии (*ICAM*), маркер гладкомышечных клеток (*CNN*), молекула TGFb сигнального пути (*SMAD4*, *TGFB*), фактор роста фибробластов (*FGF2*) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Высокая клиническая потребность направляет исследовательские усилия на создание альтернативных сосудистых шунтов малого калибра. При разработке таких искусственных функционально активных сосудистых протезов необходимо основываться на характеристиках целевых нативных кровеносных сосудов с точки зрения локуса имплантации. Конструкция такого изделия должна поддерживать требуемый кровоток, выдерживая давление током крови, не испытывая при этом механических повреждений. Кроме того, структура внутренней поверхности про-

теза должна предупреждать тромбообразование. Многие функции кровеносных сосудов обусловлены структурными компонентами различных сосудистых слоев на биомолекулярном уровне, поэтому необходимо обеспечить правильное ремоделирование искусственного каркаса сосудистого протеза для полного воспроизведения сосудистой ткани на его основе. Особое внимание стоит уделить решению проблемы микробного обсеменения пористой конструкции сосудистого протеза. Поэтому включение в состав эффективного антибактериального агента местного действия необходимо для предупреждения инфекции.

Формирование антианевризматической защиты на внешней поверхности сосудистых протезов из поликапролактона способствовало повышению прочности протезов в продольном и поперечном

направлениях, но повлекло двукратное увеличение жесткости протезов в поперечном направлении, что является стандартным, но нежелательным моментом для полимерных изделий.

Результаты собственного исследования PCL/PVP/По/А-протезов с антимикробным покрытием и внешней армирующей спиралью, имплантированных в сонную артерию овец, продемонстрировали 50% проходимость через 6 месяцев после имплантации. Данные протезы при эксплантации визуально соответствовали нативной артерии овцы; тромбы, аневризмы, воспаление и другие деформации отсутствовали. Стоит отметить высокую сохранность внешней PCL-спирали, что позволяет предположить успешное выполнение ее каркасной функции по предупреждению аневризмобразования при еще более длительных сроках имплантации. Аналогичные результаты по проходимости, развитию несостоятельности стенки протеза были получены М. Ahmed et al., которые имплантировали нанокompозитный сосудистый протез в сонную артерию овец на 9 месяцев [20].

Гистологические методы позволили детально установить успешность ремоделирования стенки проходимых сосудистых протезов и характеристики окружающих тканей. Внутренняя поверхность эксплантированных образцов представляла собой неоинтиму с непрерывным слоем зрелых функционально активных эндотелиальных клеток. Средний слой состоял из гладкомышечноподобных клеток, коллагеновых волокон и *vasa vasorum*. Внешний слой был представлен неоадвентицией. Признаков воспаления и кальцификации в новообразованной ткани не выявлено. Данные протезы обладали морфологической синхронизацией процессов биodeградации и ремоделирования своей стенки.

Несмотря на структурное сходство между новообразованной сосудистой и нативной тканью, выявленное в результате гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания, сравнительный анализ профиля генной экспрессии выявил некоторые отличия по их генетическому профилю. Особое внимание в полученных результатах заслуживает ген *CNN*, кодирующий белок кальпонин и являющийся маркером гладкомышечных клеток, для которого получено значительное снижение экспрессии гена в неоткани ремоделированных протезов, что согласуется с данными протеомного профилирования, полученными нами ранее [19]. Кроме того, как в эндотелиальном лизате, так и в гомогенате наблюдалось увеличение экспрессии гена *CTSB*, кодирующего лизосомальный белок катепсин В, что может указывать на хроническое воспаление [21].

Увеличение уровня воспалительных транскриптов (*TNFα*), а также трансформирующего фактора

роста (*TGFβ*) в гомогенатах ремоделированных протезов может быть связано с процессом биорезорбции полимерного каркаса клетками ретикуло-гистоцитарной системы, что является известным механизмом резорбции биodeградируемых полимеров. Наряду с этим стоит отметить значительное снижение экспрессии гена *SNAIL2*, который кодирует специфический транскрипционный фактор, обеспечивающий смену эндотелиального фенотипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тканеинженерные сосудистые протезы малого диаметра с атромбогенным лекарственным покрытием и усиленным внешним каркасом, имплантированные в сонную артерию овцы на 6 месяцев, продемонстрировали гармоничное ремоделирование стенки протеза. Выявленные генетические отличия новообразованной сосудистой ткани от нативной вполне ожидаемы ввиду ее полного формирования с нуля на базе искусственного матрикса. Гистологическое сходство говорит о том, что полученный темп ремоделирования стенки протеза удовлетворителен для успешного функционирования в составе кровеносного русла разработанного изделия. Дальнейшие исследования требуют усовершенствования внутренней поверхности сосудистого протеза с целью повышения тромборезистентности.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Stowell CET, Li X, Matsunaga MH, Cockreham CB, Kelly KM, Cheetham J et al. Resorbable vascular grafts show rapid cellularization and degradation in the ovine carotid. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020; 14 (11): 1673–1684. doi: 10.1002/term.3128. PMID: 32893492.
2. Diener H, Hellwinkler O, Carpenter S, Avellaneda AL, Debus ES. Homografts and extra-anatomical reconstructions for infected vascular grafts. *J Cardiovasc Surg*. 2014; 55: 217–223. PMID: 24796916.
3. Gordon TN, Kornmuller A, Soni Y, Flynn LE, Gillies ER. Polyesters Based on Aspartic Acid and Poly(Ethylene Glycol): Functional Polymers for Hydrogel Preparation.

- Eur Polym J.* 2021; 152: 110456. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2021.110456.
4. Guan G, Yu C, Xing M, Wu Y, Hu X, Wang H et al. Hydrogel Small-Diameter Vascular Graft Reinforced with a Braided Fiber Strut with Improved Mechanical Properties. *Polymers (Basel)*. 2019; 11 (5): 810. doi: 10.3390/polym11050810.
 5. Hasan A, Memic A, Annabi N, Hossain M, Paul A, Dokmeci M et al. Electrospun scaffolds for tissue engineering of vascular grafts. *Acta Biomater.* 2014; 10 (1): 11–25. doi: 10.1016/j.actbio.2013.08.022.
 6. Matsuzaki Y, Iwaki R, Reinhardt JW, Chang Yu-Ch, 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.
 7. Montini-Ballarina F, Calvo D, Caracciolo PC, Rojo F, Frontini PM, Abraham GA et al. Mechanical behavior of bilayered small-diameter nanofibrous structures as biomimetic vascular grafts. 2016. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016; 60: 220–233. doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.01.025.
 8. Blum KM, Zbinden JC, Ramachandra AB, Lindsey SE, Szafron JM, Reinhardt JW et al. Tissue engineered vascular grafts transform into autologous neovessels capable of native function and growth. *Commun Med (Lond)*. 2022; 2: 3. doi: 10.1038/s43856-021-00063-7.
 9. Mrówczyński W, Mugnai D, de Valence S, Tille JC, Khabiri E, Cikirkcioglu M et al. Porcine carotid artery replacement with biodegradable electrospun poly-ε-caprolactone vascular prosthesis. *J Vasc Surg.* 2014; 59 (1): 210–219. doi: 10.1016/j.jvs.2013.03.004. PMID: 23707057.
 10. Zhao L, Li X, Yang L, Sun L, Mu S, Zong H et al. Evaluation of remodeling and regeneration of electrospun PCL/fibrin vascular grafts *in vivo*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021; 118: 111441. doi: 10.1016/j.msec.2020.111441. PMID: 33255034.
 11. Matsuzaki Y, Miyamoto Sh, 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.athoracsur.2020.06.112.
 12. Matsuzaki Y, Ulziibayar A, Shoji T, Shinoka T. Heparin-Eluting Tissue-Engineered Bioabsorbable Vascular Grafts. *Appl Sci.* 2021; 11: 4563. doi: 10.3390/app11104563.
 13. Fang Z, Xiao Y, Geng X, Jia L, Xing Y, Ye L et al. Fabrication of heparinized small diameter TPU/PCL bi-layered artificial blood vessels and *in vivo* assessment in a rabbit carotid artery replacement model. *Biomater Adv.* 2022; 133: 112628. doi: 10.1016/j.msec.2021.112628. PMID: 35527159.
 14. Berard X, Puges M, Pinaquy JB, Cazanave C, Stecken L, Bordenave L et al. *In vitro* evidence of improved antimicrobial efficacy of silver and triclosan containing vascular grafts compared with rifampicin soaked grafts. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2019; 57 (3): 424–432. doi: 10.1016/j.ejvs.2018.08.053. PMID: 30301647.
 15. Clarke J, Shalhoub J, Das SK. Ceramic gentamicin beads in vascular graft infection – a cautionary note. *Vasc Endovascular Surg.* 2013; 47 (1): 76–77. doi: 10.1177/1538574412465970. PMID: 23154662.
 16. Bisdas T, Beckmann E, Marsch G, Burgwitz K, Wilhelmi M, Kuehn C et al. Prevention of vascular graft infections with antibiotic graft impregnation prior to implantation: *in vitro* comparison between daptomycin, rifampin and nebacetin. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012; 43 (4): 448–456. doi: 10.1016/j.ejvs.2011.12.029. PMID: 22264589.
 17. Кривкина ЕО, Миронов АВ, Шабает АР, Великанова ЕА, Ханова МЮ, Синицкая АВ и др. Особенности ремоделирования новообразованной сосудистой ткани на базе биodeградируемых сосудистых протезов, имплантированных в сонную артерию овец: морфогенетический анализ. *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2023; 38 (1): 152–159. Krivkina EO, Mironov AV, Shabaev AR, Velikanova EA, Khanova MYu, Sinitskaya AV et al. Features of remodeling of newly formed vascular tissue based on biodegradable vascular prostheses implanted in the carotid artery of sheep: morphogenetic analysis. *The Siberian Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2023; 38 (1): 151–159. [In Russ.] doi: 10.29001/2073-8552-2023-38-1-151-159.
 18. Burkert S, Schmidt T, Gohs U, Dorschner H, Arndt K-F. Cross-linking of poly(N-vinyl pyrrolidone) films by electron beam irradiation. *Radiation Physics and Chemistry.* 2007; 76: 1324–1328. doi: 10.1016/j.radphyschem.2007.02.024.
 19. Antonova L, Kutikhin A, Sevostianova V, Lobov A, Repkin E, Krivkina E et al. Controlled and Synchronised Vascular Regeneration upon the Implantation of Iloprost and Cationic Amphiphilic Drugs-Conjugated Tissue-Engineered Vascular Grafts into the Ovine Carotid Artery: A Proteomics-Empowered Study. *Polymers.* 2022; 14: 5149. doi: 10.3390/polym14235149. PMID: 36501545.
 20. 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.
 21. Fan Y, Pei J, Li X, Qin Y, Xu Y, Ke M et al. Construction of tissue-engineered vascular grafts with high patency by mimicking immune stealth and blocking TGF-β mediated endothelial-to-mesenchymal transition. *Composites Part B: Engineering.* 2023; (251): 110487. doi: 10.1016/j.compositesb.

Статья поступила в редакцию 09.12.2023 г.

The article was submitted to the journal on 09.12.2023

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-119-125

ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1-го ТИПА У МЫШЕЙ С ПОМОЩЬЮ СТРЕПТОЗОТОЦИНА

Г.Н. Скалецкая, Н.Н. Скалецкий, Г.Н. Бубенцова, Л.А. Кирсанова, Ю.Б. Басок, В.И. Севастьянов

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

Цель: получение стабильной модели сахарного диабета 1-го типа у лабораторных мышей с помощью стрептозотоцина (СТЦ), обладающего токсическим действием на β -клетки островков поджелудочной железы. **Материалы и методы.** Опыты провели на 30 белых недиабетических мышах-самцах линии SHK, которым вводили внутривентриально СТЦ в дозе 200 мг/кг двумя способами: 15 животным однократно (группа № 1) и 15 животным дробно – 5 дней подряд по 40 мг/кг (группа № 2). **Результаты.** В группе № 1 одна мышь погибла через 2 суток в результате гипогликемической комы, у 4 мышей развившаяся гипергликемия достигла сверхвысокого уровня ($>33,3$ ммоль/л), у 3 мышей произошла спонтанная реверсия диабетического статуса, и у 7 мышей гипергликемия стабилизировалась на уровнях, близких к 20 ммоль/л. В группе № 2 лишь у одной мыши была отмечена спонтанная реверсия диабета, в то время как у остальных 14 животных по окончании 4-недельного наблюдения отмечали стабильное течение СД со средним уровнем гипергликемии, умеренно превышающим 20 ммоль/л. Гистологическое изучение ПЖ этих животных подтвердило деструктивное действие СТЦ на островки в виде массовой гибели инсулинпродуцирующих β -клеток. **Заключение.** Дробное внутривентриальное введение СТЦ обеспечивает стабильное течение экспериментального СД1 у 93% лабораторных мышей.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоксин, гликемия.

OBTAINING A MOUSE MODEL OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED TYPE 1 DIABETES MELLITUS

G.N. Skaletskaya, N.N. Skaletskiy, G.N. Bubentsova, L.A. Kirsanova, Yu.B. Basok, V.I. Sevastianov

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

Objective: to obtain a stable mouse model of type 1 diabetes mellitus (T1DM) using streptozotocin (STZ), which has a toxic effect on pancreatic beta cells. **Materials and methods.** Experiments were performed on 30 white non-diabetic male mice of the SHK colony, which were injected intraperitoneally with STZ at a dose of 200 mg/kg by two methods: 15 animals (group 1) once and 15 animals (group 2) intermittently – 5 consecutive days at 40 mg/kg per day. **Results.** In group 1, one mouse died after 2 days due to hypoglycemic coma, 4 mice developed hyperosmolar hyperglycemia (>33.3 mmol/l), 3 mice had spontaneous remission of diabetes, and 7 mice had stabilized hyperglycemia at levels close to 20 mmol/l. In group 2, only one mouse showed spontaneous remission of diabetes, while the remaining 14 animals showed stable diabetes with average hyperglycemia levels moderately above 20 mmol/L until the end of the 4-week follow-up. A histological study of the pancreas of these animals confirmed the destructive effect of STZ on islets in the form of mass death of insulin-producing β -cells. **Conclusion.** Split-dose intraperitoneal injection of STZ provides a stable experimental T1DM in 93% of laboratory mice.

Keywords: diabetes mellitus, streptozotocin, glycemia.

Для корреспонденции: Скалецкая Галина Николаевна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

Corresponding author: Galina Skaletskaya. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (903) 771-18-13. E-mail: Skalink@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) из-за его широкой распространенности и неуклонного увеличения количества новых случаев остается одной из главных проблем современной медицины и здравоохранения. Практическое отсутствие медикаментозной профилактики и лечения специфических осложнений приводит к снижению трудоспособности и преждевременной смерти пациентов с СД. Поэтому разработка новых, более эффективных подходов к антидиабетическому лечению является крайне актуальной задачей. Как правило, клиническому воплощению новых методов лечения СД должен предшествовать необходимый цикл доклинических исследований, главными из которых являются опыты на лабораторных животных. В связи с этим чрезвычайно важным становится использование лабораторных моделей, адекватных СД у людей. При этом принципиально важно, к какому типу СД – 1-му или 2-му (СД1 или СД2) – этиопатогенетически можно отнести ту или иную экспериментальную модель [1–3]. Наиболее часто в качестве диабетических моделей используются мыши и крысы.

СД1 у мышей условно может быть разделен на два основных типа: спонтанный и индуцированный. Характерным примером спонтанного СД1 может служить экспериментальная его модель у мышей NOD (non obese diabetic) [4]. У этих животных примерно через 1 месяц после рождения появляются признаки воспаления островков поджелудочной железы (ПЖ), которое сопровождается разрушением содержащихся в них инсулинпродуцирующих β -клеток. Такой деструктивный процесс происходит наиболее интенсивно в возрасте 11–14 недель на фоне инфильтрации островков клетками иммунной системы. Массовая гибель β -клеток приводит к развитию абсолютной недостаточности инсулина и формированию характерного диабетического синдрома. Однако использование этой модели, а также других мышей со спонтанным СД1 показало ее недостаточную адекватность, так как немало лекарственных средств, успешно примененных у мышей NOD, оказались неэффективными при клинических испытаниях. Так как получение стабильного диабетического статуса у мышей со спонтанным разрушением β -клеток гарантировать зачастую не удастся, экстраполяция результатов антидиабетического лечения с использованием таких экспериментальных моделей СД при подготовке клинических испытаний проблематична [5–8].

Поскольку СД1 характеризуется абсолютной недостаточностью инсулина, его дефицит можно достичь в эксперименте с помощью введения химических веществ, разрушающих β -клетки. При этом благодаря разработке различных протоколов применения β -цитотоксических препаратов можно

получить такие модели СД1, которые будут соответствовать критериям проводимых экспериментальных исследований. Наиболее часто используемым веществом, способным вызывать деструкцию β -клеток, является стрептозотцин.

Стрептозотцин (СТЦ) был первоначально выделен из актинобактерий *Streptomyces achromogenes* в 1960 году как антибиотик с предполагаемым противоопухолевым действием. При доклинических испытаниях СТЦ на лабораторных животных было выявлено и в 1963 г. описано [9] его диабетогенное свойство. В последующие годы было показано [10], что возникновение характерного диабетического статуса после введения СТЦ обусловлено избирательным разрушением β -клеток островков ПЖ и развитием абсолютной инсулиновой недостаточности, характерной для инсулинозависимого СД (1-го типа) у людей. Эта находка была успешно использована в разработке моделей экспериментального СД с помощью СТЦ, прежде всего у крыс и мышей, которые обладают природной выносливостью и хорошей переносимостью даже тяжелого диабетического статуса. Аргументом в пользу индуцированной модели СД (помимо СТЦ иногда используют аллоксан – уреид мезоксалевой кислоты, но он менее цитоспецифичен и более токсичен) является значительно меньшая ее стоимость по сравнению с дорогостоящими линиями крыс и мышей со спонтанным СД, тем более что указанные препараты могут с успехом вводиться даже беспородным животным.

Ранее [11] нами были описаны два основных протокола, использованных для получения стрептозотциновой модели стабильного СД у лабораторных крыс. Раствор СТЦ вводился простым и безопасным способом – внутрибрюшинным, который по диабетогенной эффективности не уступает внутривенной инъекции [12]. Показано, что однократное введение СТЦ в дозе 70 мг на 1 кг массы тела крыс линии Wistar оказывало неоднозначное диабетогенное действие – от незначительного повышения и спонтанной реверсии гипергликемии до очень высокого ее уровня и гибели части крыс. В то же время дробное введение СТЦ в той же дозе (70 мг/кг), но разделенной на введение в течение 5 дней подряд (по 14 мг/кг), не приводило к гибели животных и почти исключало случаи спонтанной реверсии экспериментального СД, обеспечивая стабильное его течение.

По ряду причин (меньшая стоимость животных, включая их содержание, экономия диабетогенного препарата и испытуемого антидиабетического средства и др.) в качестве диабетической модели целесообразно использовать лабораторных мышей. В связи с этим нами было решено определить режим введения СТЦ, обеспечивающий получение стабильного

диабетического статуса у этих животных, с учетом опыта получения экспериментального СД у крыс, но с применением дозы СТЦ, более принятой при работе с мышами (200 мг/кг) [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты провели на 30 белых недиабетических мышах-самцах линии SHK с изначальной массой 25–30 г, полученных из специализированного питомника Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (Россия).

Все манипуляции с животными выполняли с соблюдением биоэтических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes, 2005) и в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России № 708 от 23.08.2010.

В качестве диabetогенного вещества использовали стрептозотозин фирмы Sigma (США). Препарат растворяли *ex tempore* в физиологическом растворе и вводили животным внутривентриально из расчета 200 мг на 1 кг массы тела двумя способами: 15 мышам в виде однократной инъекции (группа № 1) и остальным 15 мышам дробно, в течение пяти дней подряд, вводя СТЦ каждый раз в дозе 40 мг/кг (группа № 2). Гликемию у мышей определяли в 12:00–12:30 не натощак в капиллярной крови с помощью тест-полосок глюкометром Accu-Chek Performa (Roche), диапазон измерений 0,6–33,3 ммоль/л. Для оценки характера и степени морфологического повреждения островков СТЦ провели гистологическое исследование ПЖ этаназированных по окончании опыта мышей с СД, а также интактных животных (контроль). Из образцов панкреатической ткани, фиксированных формалином, готовили парафиновые блоки, срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, а также иммуногистохимически антителами к инсулину и глюкагону с целью выявления островковых β -клеток и α -клеток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel (2016). Вычисляли показатели описательной статистики: число наблюдений, среднее арифметическое, стандартное отклонение. Для определения статистической достоверности различий средних применяли t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными в том случае, если уровень значимости p не превышал порогового значения 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первые видимые признаки изменения состояния у большинства подопытных животных были отмечены уже через 3–4 суток наблюдения: появились жажда (увеличился объем потребляемой воды) и полиурия. В обеих группах формирование диабетического статуса было подтверждено определением гипергликемии (рис. 1), однако ее величина и динамика существенно различались в зависимости от того, как вводился СТЦ, однократно или дробно.

В группе № 1 (однократное введение в дозе 200 мг/кг) одна мышь погибла на 2-е сутки, по всей видимости, от гипогликемической комы (была зафиксирована гликемия 1,3 ммоль/л). Из оставшихся 14 мышей в течение 1–2 недель был зарегистрирован подъем содержания глюкозы в крови от умеренных до сверхвысоких уровней гипергликемии ($>33,3$ ммоль/л) у 4 животных. У 3 из них – умеренный подъем гликемии в первые 2 недели после введения СТЦ (до 12,8–17,9 ммоль/л, в среднем до 15,3 ммоль/л), в последующие 2 недели произошло ее спонтанное снижение до субнормальных (не натощак) уровней, и к окончанию наблюдения она составила от 8,9 до 12,8 ммоль/л (в среднем 11,0 ммоль/л). У остальных 7 мышей 1-й группы гипергликемия носила достаточно выраженный и стойкий характер, составив в конце наблюдения от 19,1 до 24,8 ммоль/л (в среднем 22,3 ммоль/л).

Таким образом, в результате однократного внутривентриального введения СТЦ в дозе 200 мг/кг у 1 из

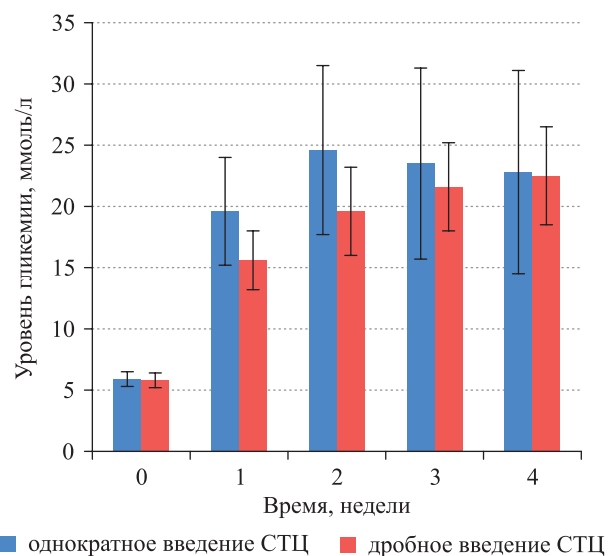


Рис. 1. Изменения гликемии после однократного и дробного введения стрептозотозина недиабетическим мышам на протяжении 4-недельного срока наблюдения

Fig. 1. Changes in glycemia after single and split-dose injection of streptozotocin in non-diabetic mice over a 4-week follow-up period

15 подопытных мышей развилась смертельная гипогликемия, обусловленная, скорее всего, выделением в кровь больших количеств инсулина, освободившегося после массовой гибели β -клеток в островках вследствие цитотоксического действия СТЦ. В то же время у остальных 14 животных была зарегистрирована гипергликемия, но ее высота и динамика изменений оказались неоднозначными, и их особенности позволили выделить три варианта развития стрептозотоцинового СД после однократного введения СТЦ. К первому из них можно отнести максимальный диабетогенный эффект, отмеченный у 4 животных, у которых гипергликемия достигла более чем высокого уровня ($>33,3$ ммоль/л), сохранившегося практически до окончания 4-недельного наблюдения. При этом общее состояние этих животных не было тяжелым, что подтверждало вполне удовлетворительную переносимость мышами индуцированного СД даже при достижении очень высокой гликемии. Однако использование животных с запредельным уровнем гипергликемии вряд ли целесообразно, так как будет невозможно определить истинную динамику изменений гликемии в течение опытов по изучению той или иной сахароснижающей терапии.

Ко второму варианту течения стрептозотоцинового СД можно отнести изменения гликемии у 3 других мышей, у которых после регистрации умеренной гипергликемии наблюдалось постепенное, но существенное ее снижение с исчезновением выраженных клинических признаков диабетического статуса, что можно было расценить как спонтанную реверсию СД1, ставшую возможной, по-видимому, из-за не-

достаточной чувствительности β -клеток ПЖ этих животных к токсическому действию СТЦ.

У остальных наблюдавшихся 7 мышей группы № 1 достаточно выраженная гипергликемия имела стабильный характер и чаще всего превышала 20 ммоль/л. Доля указанных вариантов динамики гипергликемии у мышей этой группы составила соответственно 29, 21 и 50% (рис. 2).

Значительно более благоприятные результаты были получены у мышей из группы № 2, которым СТЦ ввели в полость брюшины также из расчета 200 мг/кг, но небольшими равными дозами (по 40 мг/кг/сут) в течение 5 дней подряд.

Во-первых, ни одного случая гибели животных не было, что можно объяснить прежде всего исключением развития гипогликемической комы благодаря дробному введению менее токсичных доз СТЦ. По этой же причине не было зарегистрировано подъема гликемии до сверхвысокого уровня. Во-вторых, лишь в одном случае была отмечена тенденция к спонтанной реверсии гипергликемии, обусловленной, скорее всего, индивидуальной низкой чувствительностью панкреатических β -клеток этого животного к СТЦ. Наконец, у подавляющего числа мышей 2-й группы (14 из 15) была отмечена стойкая гипергликемия, которая чаще всего превышала 20 ммоль/л, но не достигала очень высокого уровня, составив по окончании наблюдения в среднем 23,4 ммоль/л. Такой стабильности диабетического статуса при дробном введении СТЦ способствует, вполне вероятно, развитие аутоиммунного процесса в островках ПЖ подопытных мышей, ведущего к необратимой гибели



Рис. 2. Различная степень и динамика гипергликемии у мышей после однократного внутрибрюшинного введения СТЦ в дозе 200 мг/кг

Fig. 2. Different degrees and dynamics of hyperglycemia in mice after a single intraperitoneal injection of streptozotocin at a dose of 200 mg/kg

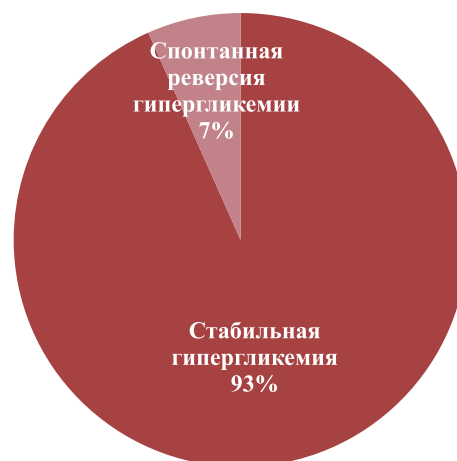


Рис. 3. Различная степень и динамика гипергликемии у лабораторных мышей после дробного внутрибрюшинного введения СТЦ в суммарной дозе 200 мг/кг

Fig. 3. Different degrees and dynamics of hyperglycemia in laboratory mice after split-dose intraperitoneal injection of streptozotocin at a total dose of 200 mg/kg

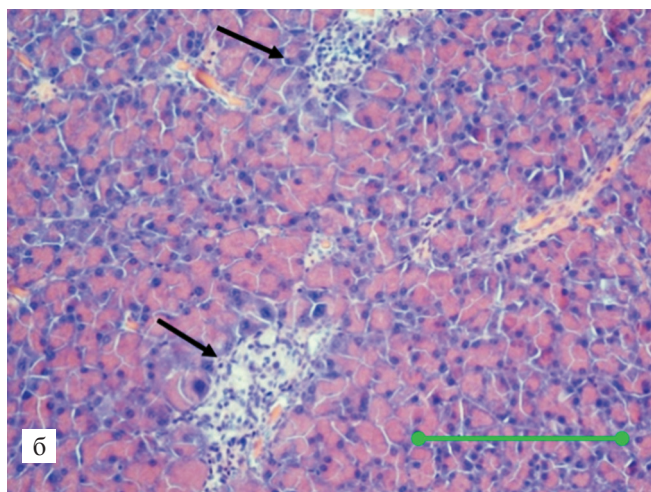
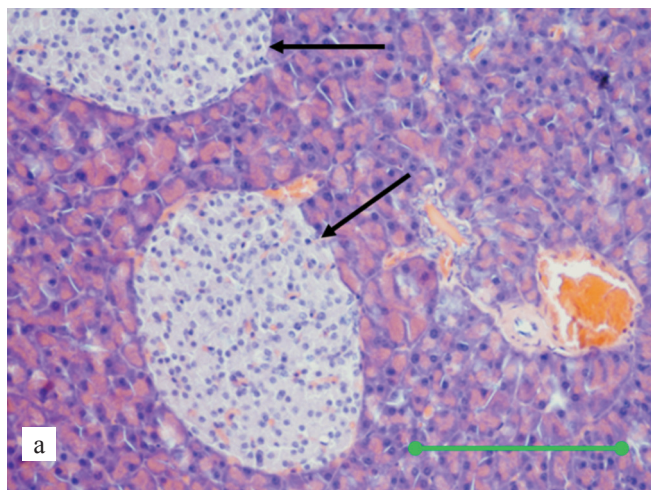


Рис. 4. Морфологические картины: а – островки в ПЖ intactной недиабетической мыши; б – выраженная деструкция островков в ПЖ мыши со стрептозотоциновым СД. Окрашивание гематоксилином и эозином. Бар 200 мкм

Fig. 4. Morphological pictures: а – islets in the pancreas of an intact non-diabetic mouse; б – pancreas of a mouse with streptozotocin-induced T1DM – severe destruction of islets. H&E stain. Scale bar – 200 μ m

β -клеток и выявленного рядом исследователей [7, 8, 10, 12, 13].

Таким образом, дробное введение СТЦ в дозе 200 мг/кг, использованной при однократном его введении, обеспечило стабильное течение экспериментального СД1 без экстремальных подъемов гипергликемии у 14 из 15 подопытных мышей, то есть в 93% случаев, и лишь у одной мыши произошла спонтанная реверсия диабетического статуса (рис. 3).

Гистологические исследования ПЖ подопытных животных, выполненные по окончании экспериментов, выявили структурные изменения, характерные для СД1, индуцированного СТЦ. Так, у крыс из группы № 2 со стабильным диабетическим

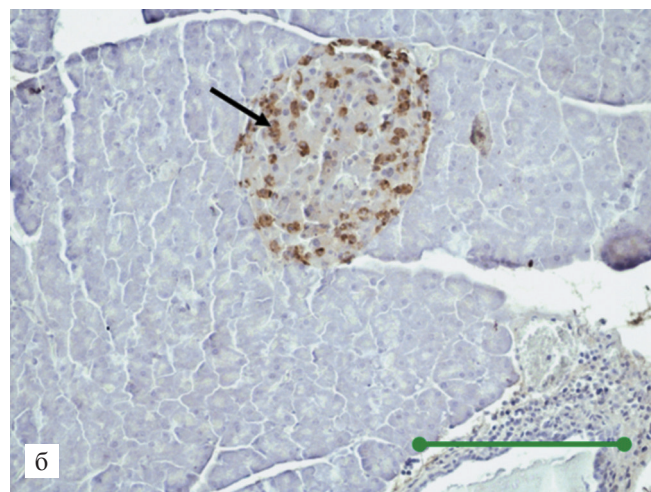
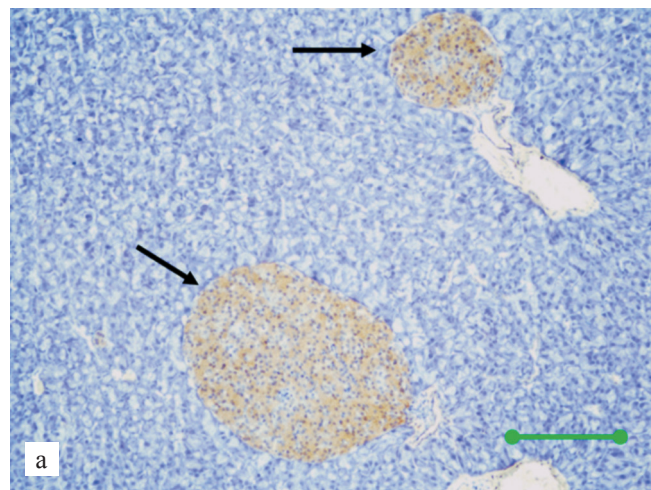


Рис. 5. ПЖ intactной недиабетической мыши: а – выявление β -клеток в островках, иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину, бар 100 мкм; б – выявление α -клеток в островке, иммуногистохимическое окрашивание антителами к глюкагону, бар 200 мкм

Fig. 5. Pancreas of an intact nondiabetic mouse: а – identification of beta cells in the islets, immunohistochemical staining for insulin, scale bar – 100 μ m; б – identification of alpha cells in the islets, immunohistochemical staining for glucagon, scale bar – 200 μ m

статусом были отмечены деструктивные изменения островков (рис. 4, б, 6), особенно выраженные по сравнению с морфологической картиной ПЖ intactных недиабетических мышей (рис. 4, а, 5). При этом была отмечена практически тотальная гибель именно инсулинпродуцирующих β -клеток островков после дробного введения СТЦ (рис. 6, а), в то время как глюкагонпродуцирующие α -клетки не подвергались токсическому воздействию и сохранялись в виде компактных групп (рис. 6, б), как бы заполняя освободившиеся пространства, занимавшиеся ранее β -клетками. Сохранность α -клеток у мышей с СД, индуцированным введением СТЦ, также отмечалась в ряде соответствующих исследований [12, 13].

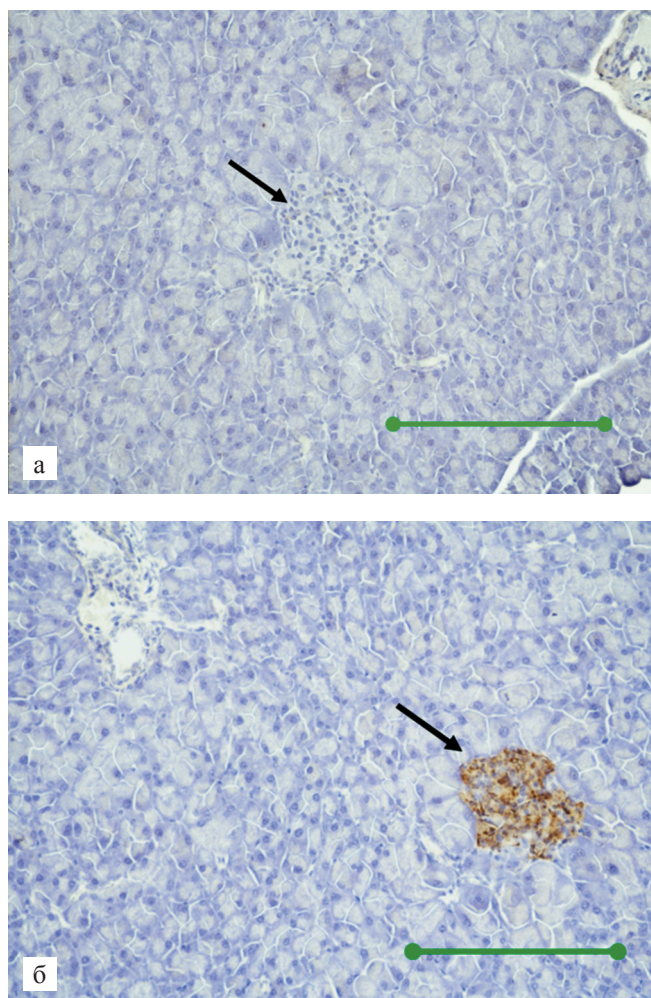


Рис. 6. ПЖ мыши со стрептозотоциновым СД: а – отсутствие β -клеток в островке, иммуногистохимическое окрашивание антителами к инсулину; б – компактно расположенные α -клетки в островке, иммуногистохимическое окрашивание антителами к глюкагону. Бар 200 мкм

Fig. 6. Pancreas of a mouse with streptozotocin-induced T1DM: а – no beta cells in the islet. immunohistochemical staining for insulin; б – compactly located alpha cells in the islet. Immunohistochemical staining for glucagon. Scale bar – 200 μ m

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как однократное, так и дробное введение стрептозоточина позволяют получить у мышей стабильную модель СД 1-го типа, однако второй вариант его индукции является в значительной мере более рациональным. Хотя после однократного внутрибрюшинного введения СТЦ в дозе 200 мг/кг доля мышей с выраженной гипергликемией была довольно высока (78,6%), но значительная их часть (28,6%) имела неприемлемый сверхпределный ($>33,3$ ммоль/л) уровень глюкозы в крови. В то же время у 21,4% животных этой группы были выявлены признаки спонтанной реверсии диабетического статуса. В ре-

зультате проведенного 4-недельного наблюдения за мышами группы № 1 только половина из них могла быть отобрана в качестве подопытных животных с экспериментальным СД.

Практически более значимым следует признать индукцию СД1, осуществляемую путем дробного введения СТЦ, ввиду отсутствия гибели подопытных животных и значительно большей их доли со стабильным течением экспериментального СД1 при отсутствии чрезмерной гипергликемии, а также незначительного числа случаев спонтанной реверсии диабетического статуса. Именно такой вариант стрептозотоцинового СД может быть рекомендован для использования при объективной оценке результатов различных вариантов трансплантации островковых клеток, а также других методов антидиабетического лечения.

Авторы заявляют об отсутствии

конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Lenzen S. Animal models of human type 1 diabetes for evaluating combination therapies and successful translation to the patient with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017; 33 (7). doi: 10.1002/dmrr.2915.
2. Athmuri DN, Shiekh PA. Experimental diabetic animal models to study diabetes and diabetic complications. *Methods X.* 2023 Nov 4; 11: 102474. doi: 10.1016/j.mex.2023.102474.
3. Pandey S, Chmelir T, Chottova Dvorakova M. Animal Models in Diabetic Research-History, Presence, and Future Perspectives. *Biomedicines.* 2023 Oct 20; 11 (10): 2852. doi: 10.3390/biomedicines11102852. PMID: 37893225.
4. Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a Non-Obese, Diabetic Strain of Mice. *Jikken Dobutsu.* 1980; 29: 1–13.
5. Rothbauer M, Rosser JM, Zirath H, Ertl P. Tomorrow today: organ-on-a-chip advances towards clinically relevant pharmaceutical and medical in vitro models. *Curr Opin Biotechnol.* 2019; 55: 81–86. doi: 10.1016/j.copbio.2018.08.009].
6. Furman BL, Candasamy M, Bhattamisra SK, Veettil SK. Reduction of blood glucose by plant extracts and their use in the treatment of diabetes mellitus; discrepancies in effectiveness between animal and human studies. *J Ethnopharmacol.* 2020; 247: 112264. doi: 10.1016/j.jep.2019.112264.
7. Pandey S, Dvorakova MC. Future Perspective of Diabetic Animal Models. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2020; 20 (1): 25–38. doi: 10.2174/1871530319666190626143832.

8. Kottaisamy CPD, Raj DS, Prasanth Kumar V, Sankaran U. Experimental animal models for diabetes and its related complications – a review. *Lab Anim Res.* 2021; 37 (1): 23. doi: 10.1186/s42826-021-00101-4.
9. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep. Part 1.* 1963; 29: 91–98.
10. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest.* 1969; 48: 2129–2139. doi: 10.1172/JCI1106180.
11. Скалецкая ГН, Скалецкий НН, Волкова ЕА, Севастьянов ВИ. Стрептозотоциновая модель стабильного сахарного диабета. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (4): 83–88. Skaletskaya GN, Skaletskiy NN, Volkova EA, Sevastyanov VI. Streptozotocin model of stable diabetes mellitus. *Russian Journal of Transplantology and Artificial organs.* 2018; 20 (4): 83–88. [In Russ, English abstract]. doi: 10.115825/1995-1191-2018-4-83-88.
12. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: New model of diabetes mellitus. *Science.* 1976; 193 (4251): 415–417. doi: 10.1126/science.180605.
13. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc.* 2021 Apr; 1 (4): e78. doi: 10.1002/cpz1.78.

Статья поступила в редакцию 05.02.2024 г.

The article was submitted to the journal on 05.02.2024

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 2024 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									

Ф. СП-1	ВЕСТНИК ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ	ПН380 (индекс издания)																								
		КОЛИЧЕСТВО КОМПЛЕКТОВ																								
	на 2024 год по месяцам																									
	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr> <tr> <td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr> </table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12												
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12															
	Куда _____ (почтовый индекс) _____ (адрес) _____																									
	Кому _____ (фамилия, инициалы) _____																									

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-126-134

ВЛИЯНИЕ ПУТЕЙ И ДОЗ ВВЕДЕНИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ (ОБЗОР)

Н.В. Пак, Е.В. Мурзина, Н.В. Аксенова, Т.Г. Крылова, В.Н. Александров

ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Терапевтический потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) признан неоспоримым: помимо способности дифференцироваться в различные типы клеток и тем самым участвовать в восстановлении поврежденных тканей и органов они обладают способностью влиять на процессы регенерации посредством секреции паракринных факторов. То есть терапия посредством ММСК представляет собой особый вид медицинского вмешательства, который обладает как системным диапазоном терапевтической эффективности, так и локальной активностью на отдельных участках органов. В течение последних десятилетий терапия ММСК постоянно находится в процессе осторожного перехода от исследовательских разработок к клинически одобренным методам лечения. Согласно данным клинических испытаний, она редко демонстрирует серьезные нежелательные явления, хорошо переносится и достаточно безопасна в краткосрочном диапазоне, однако вместе с тем она имеет ряд ограничений по применению, в основном вследствие риска злокачественной трансформации. Успешность трансплантации стволовых клеток при лечении различных заболеваний подтверждена как в доклинических исследованиях, так и в клинической практике. Главными вопросами, возникающими при оценке терапевтической эффективности клеточной терапии посредством ММСК, являются тип клеток (адипогенные, костномозговые и т. д.), способ их введения, количество вводимых клеток, оптимальное количество инъекций. Появляется все больше экспериментальных и клинических данных, свидетельствующих о том, что как адекватный путь введения, так и адекватная доза могут повысить вероятность успеха терапии с использованием ММСК. Каждый путь введения клеток сопряжен с определенными издержками и преимуществами. Однако в целом данные о сравнительной эффективности различных путей введения клеток достаточно противоречивы. Вопрос оптимальной дозы трансплантируемых клеток также дебатруется, поскольку высокие дозы ММСК могут повышать риски осложнений и не оказывать должного эффекта как при системном, так и при локальном введении. Эти аспекты требуют дополнительной систематизации имеющихся данных для достижения максимального эффекта применения клеточной терапии путем выбора наиболее безопасных и целесообразных подходов.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, клеточная терапия, трансплантация, способ введения, доза введения.

EFFECT OF THE DELIVERY ROUTE AND DOSE OF MULTIPOTENT MESENCHYMAL STEM CELLS ON THE EFFICACY OF CELL THERAPY (REVIEW)

N.V. Pak, E.V. Murzina, N.V. Aksenova, T.G. Krylova, V.N. Aleksandrov

Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

Multipotent mesenchymal stem cells (MMSCs) are known to be excellent therapeutic agents. Apart from their ability to differentiate into various cell types, and thus participate in the repair of injured tissues and organs, they can influence the regeneration process through secretion of paracrine factors. Thus, MMSC therapy represents a special type of medical intervention that has both a systemic range of therapeutic efficacy and local activity on

Для корреспонденции: Пак Наталья Викторовна. Адрес: 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6. Тел. (812) 292-32-63. E-mail: natalya_pak@mail.ru

Corresponding author: Natalya Pak. Address: 6, Akademika Lebedeva str., St. Petersburg, 194044, Russian Federation. Phone: (812) 292-32-63. E-mail: natalya_pak@mail.ru

individual sites of an organ. Over the past decades, MMSC therapy has continuously been in a cautious transition from research development to clinically approved therapies. Clinical trial data has shown that this therapy is rarely associated with severe adverse events, is well tolerated and quite safe in the short-term period. However, it has a number of limitations for use, mainly due to the risk of malignant transformation. The success of stem cell transplantation in the treatment of various diseases has been confirmed both in preclinical studies and in clinical practice. The main issues that arise when assessing the therapeutic efficacy of MMSC-associated therapy are the type of cells (adipogenic, bone marrow, etc.), delivery route, number of cells injected, and the optimal number of injections. There is a growing body of experimental and clinical evidence suggesting that both an adequate delivery route and an adequate dose can increase the likelihood of success of MMSC-associated. Each cell delivery route has costs and benefits. However, there is generally contradictory evidence on the comparative efficacy of different cell delivery routes. The optimal dose of transplanted cells is also debated, as high MMSC doses may increase the risks of complications and may not have the proper effect both when administered systemically and locally. These aspects require further systematization of available data to maximize the effect of cell therapy by selecting the safest and most appropriate approaches.

Keywords: multipotent mesenchymal stem cells, cell therapy, transplantation, delivery route, delivery dose.

ВВЕДЕНИЕ

Современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволяет рассматривать стволовую клетку как одно из средств лечения многочисленных заболеваний. Терапевтическое действие ММСК происходит по трем направлениям: дифференцирование и замещение клеток поврежденных тканей, продукция биологически активных молекул, а также осуществление межклеточного контакта и взаимодействие с иммунными клетками [1–3].

Лечение посредством ММСК в целом считается безопасной процедурой, но имеет некоторые ограничения. При этом основными рисками применения ММСК являются их возможная онкогенность (трансформация в опухоли, стимуляция роста опухолей) [4, 5], а также индукция выраженных провоспалительных процессов [4] и фиброзов (трансформация в миофибробласты) [4, 6, 7]. Во многих исследованиях предлагаются алгоритмы для улучшения приживаемости и дифференцировки трансплантированных клеток. Одни стратегии направлены на повышение устойчивости клеток к микроокружению в тканях реципиента, другие – на увеличение выживаемости клеток после трансплантации. Эти стратегии могут варьировать от простой модификации условий культивирования, известной как предварительное кондиционирование клеток, до генетической модификации клеток во избежание клеточного старения [8]. Существенным элементом повышения эффективности клеточной терапии и уменьшения риска побочных явлений является поиск оптимальных путей введения и доз вводимых ММСК. Несмотря на большое количество доклинических и клинических исследований, безопасность и эффективность терапии, связанной с ММСК, по-прежнему остается проблематичной для клинического применения [9, 10].

Цель работы – провести информационно-аналитическое исследование экспериментальных и клини-

ческих данных об эффективности различных путей и доз применения стволовых клеток как средства терапии различных заболеваний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для системного воздействия на организм введение ММСК, как правило, осуществляется внутривенно или внутриаартериально. При системном введении ММСК способны к направленной миграции (хоумингу) в места повреждения тканей в ответ на секрецию хемокинов и цитокинов [11]. Несмотря на то что точный механизм хоуминга ММСК в зону повреждения до конца не выяснен, известно, что он представляет собой многоэтапный процесс, в котором существенную роль играют хемотаксические факторы [8]. Хемотаксис ММСК в ткань-мишень, по-видимому, в основном опосредована осью стромального фактора (SDF-1)/CXCR4, но в миграции ММСК также возможно участие моноцитарного хемотаксического белка/CCR2 и гепатоцитарного белка, а также цитокинов, таких как TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α или G-CSF [12–14]. Очевидно, что внутрисосудистое введение является наименее инвазивным путем доставки, и следовательно, наиболее предпочтительным с клинической точки зрения. Однако этот путь имеет существенные недостатки, основным из которых является способность достаточно высокого процента введенных клеток задерживаться в капиллярной сети легких (эффект первого прохождения) и других органов, таких как печень, почки. Принимая во внимание, что в процессе трансмиграции ММСК должны преодолевать мембраны между эндотелиальными клетками сосудов и тканью-мишенью, очевидно, что путем системной инфузии довольно сложно целевым образом максимально эффективно доставить клетки в ткани-мишени. При этом ММСК могут образовывать микроэмболы, которые создают серьезные последствия для функционирования органов, учитывая, что предполагаемый диаметр

клеток составляет 20–30 мкм [8, 15]. При внутриартериальном пути введения ММСК в экспериментах на мышинных моделях обнаружено образование микроокклюзий, количество которых находилось в прямой зависимости от концентрации клеток, что вызывало серьезные опасения по поводу безопасности исследуемого способа доставки [16]. Присутствие ММСК или их дебриса в легочной капиллярной сети после внутривенного введения не сводится к просто временной задержке – там происходит макрофагальный фагоцитоз, а уже после этого детрит ММСК переносится далее с кровью в другие органы [17]. Одним из способов улучшения «самонаведения» клеточной диффузии является предварительное кондиционирование тканей-мишеней. Например, в ряде исследований было показано, что введение экспериментальным животным ряда гормонов, хемокинов, факторов роста, ферментов, а также воздействие на них физическими факторами (ультразвук, облучение) способствовало усилению миграции ММСК в очаг повреждения [8].

Следует отметить, что процедуру инъекции может осложнить ресуспендирование клеток в растворах с низким осмотическим давлением, поскольку механический стресс способен вызвать разрушение клеточных мембран и последующую гибель большого процента популяции клеток [18].

Установлено, что период полувыведения ММСК после системного введения составляет около 12 часов, однако при этом, как отмечалось ранее, большая часть клеток задерживается в легких, где они утилизируются или откуда мигрируют в течение 24 часов [2, 6, 8, 19]. После введения клеток непосредственно в ткани на фоне венозной блокады детрит попадает в кровеносное русло гораздо позже и в меньшем количестве. Основная часть имплантированных ММСК в течение 7 суток обнаруживается в других органах и тканях (печень, селезенка и пр.) [2, 20]. Есть данные, что после подкожной имплантации ММСК могут выживать в течение 30 суток [2, 21], однако после этого в печени, почках и селезенке не обнаруживаются [17]. После внутривенного введения клетки могут определяться в легких течение 150 суток [20]. Введение ММСК с помощью хирургической имплантации или трансэндокардиальной инъекции приводило к сохранению только 16 и 11% ММСК в миокарде соответственно [5]. Интракоронарная инфузия также вызывала задержку 11% ММСК. В целом поврежденных тканей-мишеней реально достигают примерно 0,1–2,7% введенных стволовых клеток [22]. Прочие имплантированные ММСК в основном оказывают дистанционное воздействие на регенерационные процессы посредством цитокинов, экзосом и микровезикул и проявляют преимущественно противовоспалительные, иммуномодулирующие и анти-апоптотические эффекты [23]. Следует отметить, что не

только эксперименты на животных, но и некоторые клинические испытания с использованием ММСК для лечения несовершенного остеогенеза показали, что в органе-мишени обнаруживается менее 1% клеток [15].

Опубликованы данные, свидетельствующие о том, что ММСК при локальном введении мобилизуют прогениторные клетки в очаг поражения, тем самым усиливая регенеративную активность [5, 20, 21]. При этом они улучшают заживление ран и выживаемость кожных трансплантатов. Однако, по данным экспериментальных исследований, ММСК недолго задерживаются в месте введения: в течение 1 часа большинство из них мигрирует в окружающие ткани, а через 2 суток в месте введения уже не определяются [2, 21].

При сравнительном исследовании трех различных путей доставки ММСК (внутрибрюшинного, внутривенного и анального) на модели колита у мышей было показано, что внутрибрюшинная доставка обеспечивала более высокое содержание ММСК в органах и более быстрое выздоровление экспериментальных животных [15]. Эффективность терапии оценивали по гистологическому индексу, общей массе тела животных и их выживаемости. Распределение и приживание ММСК в органах анализировали и количественно оценивали с помощью ММСК GFP+ (green fluorescent protein), а также с использованием флуоресцентной визуализации в ближней инфракрасной области. Приводятся данные, что ММСК, введенные внутрибрюшинно, образуют агрегаты с макрофагами и лимфоцитами в брюшной полости и секретируют TSG-6 (tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein), что, скорее всего, и является основным противовоспалительным механизмом ММСК. Увеличение TSG-6 выявлялось в сыворотке крови после трансплантации ММСК, при этом самый высокий уровень сывороточного TSG-6 обнаруживался после внутрибрюшинного введения. Следует отметить, что в брюшной полости содержится большое количество иммунных клеток, которые могут стать компонентами агрегатов ММСК. Такая тесная межклеточная перекрестная связь между ММСК и иммунными клетками может быть еще одним фактором, способствующим улучшению терапевтических эффектов [15]. Отмечалось также, что внутрибрюшинная инъекция обеспечивала лучшее восстановление слизистой оболочки и более высокое приживание клеток в воспаленной толстой кишке.

Внутрибрюшинное введение ММСК оказывало положительное влияние на восстановление мышей с экспериментальной компрессионной травмой спинного мозга (ТСМ) [24]. Оценочным критерием являлось влияние трансплантации ММСК на сохранение белого вещества. Было показано, что в опытных группах животных, получивших ММСК в дозе 8×10^5 клеток/мышь, регистрировали большее

количество сохранных волокон. Кроме того, для этих групп были характерны более высокие уровни трофических факторов (нейротрофический фактор головного мозга, фактор роста нервов, нейротрофин-3 и нейротрофин-4) в спинном мозге, которые улучшали двигательную активность. Таким образом, внутрибрюшинные или внутривенные инъекции ММСК способствовали благоприятным результатам в качестве средства лечения ТСМ без существенной статистической разницы между ними, подтверждая идею о том, что эти клетки не заменяют поврежденные клетки спинного мозга, а действуют через локальные паракринные эффекты.

F. Yousefi et al. (2013) было показано, что внутрибрюшинная инъекция ММСК способна снижать количество воспалительных клеток-аггессоров в головном мозге и улучшать клинические показатели у мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом [25].

Есть данные, что внутрибрюшинное введение ММСК способно подавлять воспаление брюшины за счет восстановления мезотелиального слоя и снижения активации комплемента при грибковом или дрожжевом перитоните у крыс и почти полностью предотвращать развитие экспериментального аутоиммунного увеита у мышей за счет подавления Th1/Th7 иммунных ответов, защищая сетчатку глаза от иммуно-опосредованного повреждения [24].

В исследованиях M. Wang et al. (2016) показано, что наилучшие результаты при лечении колита в эксперименте достигались посредством внутрибрюшинной трансплантации ММСК [15]. Выявлено, что ММСК GFP+ мигрировали в воспаленную толстую кишку и даже проходили через всю кишечную стенку, достигая люминальной стороны. Этот вывод согласуется с данными, в соответствии с которыми внутрибрюшинно введенные ММСК мигрируют и приживаются в воспаленной толстой кишке [26]. Точные механизмы этого явления до сих пор не известны, однако можно предположить, что в процесс вовлечены цитокины. Известно, что генетическая модификация ММСК для повышения экспрессии CXCR4 приводит к увеличению миграции клеток в кишечник при радиационном энтерите, а вследствие этого – к улучшению состояния. Экспериментальные исследования H. Yang et al. (2019) показали, что однократная внутрибрюшинная инъекция ММСК (2×10^6 клеток/мышь) значительно улучшала клинические параметры массы тела и длины толстой кишки, а также размеры язв и гистологические показатели у мышей с колитом по сравнению с таковыми в контрольной группе [27].

Тем не менее в некоторых случаях внутривенная инъекция характеризуется как более успешная по сравнению с внутрибрюшинной [28]. Это несоответствие может быть связано с разными типами

ММСК, полученными из жировой ткани и костного мозга, различающимися по скорости пролиферации, способности к дифференцировке, по экспрессии цитокинового секретома и хемокинового рецептора, которые могут влиять на миграцию, приживание и даже локальную функцию [29, 30]. Есть данные, что при регенерации кости терапия на основе ММСК костного мозга демонстрируют самый высокий остеогенный потенциал по сравнению с ММСК, полученными из других тканей [8]. Кроме того, разные источники ММСК с разными путями доставки оказывают разное терапевтическое воздействие на повреждения легких и сердечно-сосудистой системы [31]. Следовательно, биологические различия ММСК из разных источников следует учитывать при интерпретации результатов исследований и выборе для конкретного клинического применения. Между тем существует мнение, что невозможно установить, какой из источников (костный мозг или жировая ткань) стволовых клеток обеспечивает лучшие результаты для клеточной терапии, поскольку иммунофенотипы стволовых клеток костного мозга и жировой ткани идентичны более чем на 90% [9]. Помимо этого, при оценке эффективности важно учитывать, что ММСК обладают способностью оказывать свое терапевтическое действие дистально, за счет модуляторных цитокинов [32].

Было предложено внутримышечное введение ММСК в качестве лучшей альтернативы внутривенному введению [33]. Экспериментальные данные L.R. Braid et al. (2018) свидетельствуют о том, что если клетки, введенные внутривенно, не обнаруживались уже через несколько дней после введения, а клетки, доставленные внутрибрюшинно и подкожно, обнаруживались в течение 3–4 недель, то ММСК, введенные внутримышечно, выживали *in situ* более 5 месяцев. Аллогенная однократная внутримышечная трансплантация ММСК, полученных из пупочного канатика, крысам с моделированной ишемией задних конечностей способствовала функциональному и морфологическому восстановлению ишемизированной скелетной мышечной ткани [34]. При этом клетки, вводимые подопытным животным, стимулировали ангиогенез в области повреждения. В целом довольно многочисленные экспериментальные исследования показали положительное влияние ММСК на функциональное восстановление при ишемическом инсульте, что связывают со способностью ММСК усиливать эндогенный восстановительный потенциал нервной ткани [35, 36]. Это обусловлено действием выделяемых клетками биоактивных веществ, которые активируют и стимулируют другие типы клеток [37]. Выбор оптимального пути доставки ММСК при ишемии головного мозга зависит от типа повреждения центральной нервной системы (ЦНС) (очаговое или многоочаговое). Особенности

очагового повреждения ЦНС позволяют предположить, что наиболее подходящим способом может оказаться интрацеребральная трансплантация клеток непосредственно в очаг повреждения, а при нескольких областях поражения – системная интраваскулярная или эндолумбальная [37].

Показано, что внутрипортальное и внутривенное введение ММСК при экспериментальном циррозе печени способствует более быстрому восстановлению функции печени. При этом наибольшее снижение массы печени отмечалось при внутрипортальном введении стволовых клеток [38]. Введение меченых акридиновым оранжевым ММСК внутривенно, внутрибрюшинно, в печеночную артерию или в портальную вену в дозе 4×10^6 клеток/кг массы тела показало значительное увеличение количества клеток в печени после ее субтотальной резекции вне зависимости от способа введения [39]. При этом внутрибрюшинный способ введения клеток характеризовался как наименее эффективный.

При коррекции диабета в эксперименте внутривенное введение ММСК костного мозга статистически значимо способствовало уменьшению уровня глюкозы у животных опытной группы относительно контрольной [40].

Обнаружено, что имплантация ММСК способствует неврологическому восстановлению при моделировании черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у крыс [41]. Внутривенное введение клеток крысам снижало количество микроглии и других воспалительных клеток, а также выработку провоспалительных цитокинов и стимулировало синтез противовоспалительных цитокинов, приводящих к ингибированию воспалительных реакций, вызванных ЧМТ [42].

В клинической практике мультипотентный и секреторный потенциал ММСК находит применение в сфере регенеративной медицины для восстановления поврежденных травмами или развившейся патологией тканевых структур организма (комбустиология, травматология, стоматология и пр.) При этом введение стволовых клеток пациенту, как правило, осуществляется внутривенно для обеспечения системного воздействия на организм больного [2, 23]. Прямое сравнение методов доставки здесь часто отсутствует из-за проблем с материально-технической базой [5]. Есть данные, что однократное применение ММСК в достаточной дозе сопровождается благоприятным клиническим эффектом через 3–6 месяцев (и более), а в некоторых случаях ожидаемый лечебный результат достигается повторным курсом лечения через 1–2 недели (4–6 месяцев) [2, 43–46].

Представлен опыт внутривенного введения ММСК пациентам с хронической сердечной недостаточностью (ХСН) на фоне ишемической болезни сердца. Показано, что внутривенное введение ауто-

логичных ММСК в дозе 50×10^6 клеток в сочетании со стандартной медикаментозной терапией улучшает основные параметры гемодинамики и снижает уровень биохимических маркеров ХСН [47]. Кроме того, есть данные об успешном применении интракоронарного и интрамиокардиального путей введения клеток при лечении ишемических проблем в клинической практике [48].

На сегодняшний день проведено 125 клинических испытаний с применением ММСК при неврологических заболеваниях [31], в том числе при лечении ЧМТ. Введение аутологичных ММСК костного мозга пациентам в подострую фазу ЧМТ приводило к улучшению неврологической функции у 40% больных [49, 50], способствовало восстановлению сознания, двигательной и когнитивной функций [51]. Для терапии ЧМТ применяется внутривенный путь введения, поскольку доставка ММСК через внутримозговой путь хоть и считается наиболее эффективной, однако является и наиболее инвазивной [31].

Результаты клинических исследований по терапии цирроза печени с использованием ММСК противоречивы и не всегда совпадают с результатами экспериментальных исследований [52]. Тем не менее неконтролируемые клинические исследования показали, что введение аутологичных ММСК в артериальное русло печени путем эндоваскулярной хирургии безопасно, хорошо переносится, дает положительный эффект у пациентов с циррозом печени различной этиологии [53].

Для лечения пациентов с патологией коленного сустава доставка аутологичных ММСК осуществлялась путем внутрисуставного введения культуры клеток, выделенных из разных источников [9, 54]. При этом отмечалось, что отдаленные контрольные показатели значимо превосходили аналогичные в контрольной группе, получавшей традиционное лечение [54].

Применение внутрибрюшинной трансплантации клеток в клинической практике имеет существенные ограничения, обусловленные возможными осложнениями. Эти осложнения включают катетерную инфекцию и механическое повреждение внутрибрюшных структур [15]. В то же время следует отметить, что высокая васкуляризация брюшины позволяет большому количеству трансплантированных клеток одновременно получать доступ к лимфатической и кровеносной системам, что, безусловно, способствует их приживлению в местах повреждения тканей и зонах воспалений [24]. Очевидно, что тренд к расширению применения интраперитонеальных инъекций в процессе применения клеточной терапии будет нарастать и повлияет на интенсификацию инновационных разработок, направленных на предотвращение осложнений.

Количество вводимых клеток также является важной составляющей терапевтического успеха применения ММСК. Повышение начальной дозы вводимых клеток обеспечивает увеличение количества клеток, достигающих места повреждения. В экспериментальных исследованиях применяются различные дозы ММСК, позиционирующиеся как эффективные. В протоколах экспериментальных исследований фигурируют дозы от 3×10^5 клеток/мышь до 2×10^6 клеток/мышь [15, 24, 25]. Иногда для наблюдения какого-либо эффекта применяются и большие дозы, до 5×10^6 клеток/мышь [37, 55]. Однако, по заключению исследователей, внутривенные инъекции ММСК в большой дозе (до 1×10^7 клеток/мышь) могут привести к увеличению смертности мышей из-за потенциальной эмболии легочных сосудов.

Для достижения терапевтического эффекта у крыс в эксперименте, как правило, применяются дозы ММСК в диапазоне от 5×10^5 до 5×10^6 клеток/крыса [55, 56]. При этом выживаемость клеток после трансплантации в реципиентную ткань зависит не только от дозы, но и от продолжительности и условий культивирования, таких как наличие сыворотки или кислорода, механического стресса во время процедуры имплантации или гибели клеток из-за отсутствия фиксации [56, 57]. Есть мнение, что при региональном введении (эндолумбальном, внутрибрюшинном, внутримышечном) происходит десятикратное снижение терапевтической дозы клеток [2].

Существенной проблемой является перевод экспериментальной дозировки клеточного продукта для применения в клинической практике. Как упоминалось выше, обычно используемая доза клеток составляет 1×10^6 клеток/мышь (массой тела 30 г), что эквивалентно 33×10^6 клеток/кг, или приблизительно 2,3 миллиарда клеток для взрослого человека весом 70 кг [14]. По предположению исследователей, высокие дозы ММСК могут повысить риски осложнений, в том числе аллоиммунизацию при применении аллогенных ММСК, а также не оказывать должного эффекта как при внутривенном, так и при локальном применении [2, 22, 58]. С другой стороны, понятия «оптимальная доза» вводимых системно ММСК в клинической практике пока не существует, поскольку отсутствует четкая корреляция доза–эффект [8]. На сегодняшний день стандартной считается доза 1–2 млн клеток на 1 кг массы [2, 58]. При этом в процессе клеточной терапии у новорожденных применяются в 5–10 раз более высокие дозы клеток по сравнению со стандартными, но, как правило, однократно [2, 43].

Эффективность различных путей введения клеток была исследована с помощью моделирования в эксперименте и в клинических условиях при лечении болезни Паркинсона с использованием аутологич-

ных ММСК [59]. Суммарная доза 160 тыс. клеток на 1 кг массы (малая доза), введенных внутривенно, приводила к статистически значимому снижению двигательных расстройств по сравнению с исходными данными. При этом трансназальное введение ММСК в аналогичной дозе пациентам другой группы оказывало похожий эффект. На основании полученных данных при разработке длительной поддерживающей терапии болезни Паркинсона было рекомендовано учитывать эффективность малоинвазивных способов введения ММСК в малых дозах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подавляющее большинство доклинических и клинических исследований показали, что имплантация ММСК эффективна, безопасна и хорошо переносима. Анализ данных научной литературы свидетельствует об активном исследовательском поиске оптимальных дозировок и путей доставки клеточного продукта. Следует отметить, что в целях устранения возможных побочных явлений в настоящее время предпринимаются усилия по разработке возможности использования экзосом и внеклеточных везикул в качестве «бесклеточного» способа реализации свойств ММСК. С учетом необходимости обоснования терапевтической стратегии четким и глубоким пониманием механизмов заболевания становится очевидным, что применение клеточного продукта в практическом здравоохранении требует максимальной адаптации к типу заболевания или повреждения в плане выбора имплантируемых доз ММСК и способов их доставки. В целом результаты исследований и мнения разных авторов по этому вопросу далеко неоднозначны и порой противоречивы, поэтому разностороннее изучение терапевтического потенциала ММСК по-прежнему остается актуальным.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: time to change the name! *Stem cells. Transl Med.* 2017; 6 (6): 1445–1451. doi: 10.1002/sctm.17-0051.
2. Потанин МП. Пути повышения эффективности клеточной терапии на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. *Гены и клетки.* 2021; 16 (4): 22–28. Potapnev MP. Ways to improve the efficiency of cell therapy based on multipotent mesenchymal stromal cells. *Genes and cells.* 2021; 16 (4): 22–28. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/202112003.
3. Москалев АВ, Гумилевский БЮ, Апчел АВ, Цыган ВН. Стволовые клетки и их физиологические эффекты. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2019; 68 (4): 172–180. Moskalev AV, Gumilevsky BYu, Apchel AV, Tsygan VN. Stem cells and their physiological

- effects. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2019; 68 (4): 172–180. [In Russ, English abstract].
4. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Cells*. 2019; 8 (8): 886. doi: 10.3390/cells8080886.
 5. Caplan H, Olson SD, Kumar A, George M, Prabhakara KS, Wenzel P et al. Mesenchymal stromal cell therapeutic delivery: translational challenges to clinical application. *Front Immunol*. 2019; 10: 1645. doi: 10.3389/fimmu.2019.01645.
 6. Паюшина ОВ, Цомартова Р, Черешнева ЕВ, Иванова МЮ, Кузнецов СЛ. Регуляторное влияние мезенхимных стромальных клеток на развитие фиброза печени: клеточно-молекулярные механизмы и перспективы клинического применения. *Журнал общей биологии*. 2020; 81 (2): 83–95. Payushina OV, Tsomartova R, Cheresheva EV, Ivanova MYu, Kuznetsov SL. Regulatory influence of mesenchymal stromal cells on the development of liver fibrosis: cellular and molecular mechanisms and prospects for clinical application. *Journal of General Biology*. 2020; 81 (2): 83–95. [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0044459620020062.
 7. Popova AP, Bozyk PD, Goldsmith AM, Linn MJ, Lei J, Bentley JK, Hershenon MB. Autocrine production of TGF- β 1 promotes myofibroblastic differentiation of neonatal lung mesenchymal stem cells. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol*. 2010; 298: 735–743. doi: 10.1152/ajplung.00347.2009.
 8. García-Sánchez D, Fernández D, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Enhancing survival, engraftment, and osteogenic potential of mesenchymal stem cells *World J Stem Cells*. 2019; 11 (10): 748–763. doi: 10.4252/wjsc.v11.i10.748.
 9. Di Matteo B, Vandenbulcke F, Vitale ND, Iacono F, Ashmore K, Marcacci M, Kon E. Minimally manipulated mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review of clinical evidence. *Stem Cells Int*. 2019; 2019: 1735242. doi: 10.1155/2019/1735242.
 10. Wang Z, Wang L, Su X, Pu J, Jiang M, He B. Rational transplant timing and dose of mesenchymal stromal cells in patients with acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Stem Cell Res Ther*. 2017; 8 (1): 1–10. doi: 10.1186/s13287-016-0450-9.
 11. Жидкова ОВ. Взаимодействие мезенхимальных стромальных и эндотелиальных клеток в условиях пониженного содержания кислорода и провоспалительной активации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2020; 24. Zhidkova OV. Vzaimodejstvie mezenhimal'nyh stromal'nyh i endotelial'nyh kletok v usloviyah ponizhennogo soderzhaniya kisloroda i provospalitel'noj aktivacii. [Dissertation]. Moscow, 2020; 24.
 12. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Stem Cells*. 2016; 8 (3): 73–87. doi: 10.4252/wjsc.v8.i3.73.
 13. Heirani-Tabasi A, Toosi S, Mirahmadi M, Mishan MA, Bidkhorri HR, Bahrami AR et al. Chemokine receptors expression in MSCs: Comparative analysis in different sources and passages. *Tissue Eng Regen Med*. 2017; 14 (5): 605–615. doi: 10.1007/s13770-017-0069-7.
 14. Lin W, Xu L, Zwillingenberger S. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *J Orthop Translat*. 2017; 9: 19–27. doi: 10.1016/j.jot.2017.03.002.
 15. Wang M, Liang C, Hu H, Zhou L, Xu B, Wang X et al. Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci Rep*. 2016; 6 (1): 30696. doi: 10.1038/srep30696.
 16. Cui LL, Kerkelä E, Bakreen A, Nitzsche F, Andrzejewska A, Nowakowski A et al. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res Ther*. 2015; 6 (1): 11. doi: 10.1186/srct544.
 17. Майбородин ИВ, Маслов PH, Михеева ТВ, Хоме-нюк СВ, Майбородина ВИ, Морозов ВВ и др. Распределение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток и их детрита по организму после подкожного введения. *Журнал общей биологии*. 2020; 81 (2): 96–107. Maiborodin IV, Maslov RN, Mikheeva TV, Khomenyuk SV, Maiborodina VI, Morozov VV et al. Distribution of multipotent mesenchymal stromal cells and their detritus throughout the body after subcutaneous injection. *Journal of General Biology*. 2020; 81 (2): 96–107. [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0044459620020050.
 18. Aguado BA, Mulyasmita W, Su J, Lampe KJ, Heilshorn SC. Improving viability of stem cells during syringe needle flow through the design of hydrogel cell carriers. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18 (7–8): 806–815. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0391.
 19. Weiss AR, Dahlke MN. Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Front Immunol*. 2019; 10: 1191. doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.
 20. Zhuang WZ, Lin YH, Su LJ, Wu MS, Jeng HY, Chang HC et al. Mesenchymal stem/stromal cell-based therapy: mechanism, systemic safety and biodistribution for precision clinical application. *J Biomed Sci*. 2021; 28 (1): 28. doi: 10.1186/s12929-021-00725-7.
 21. Levy O, Kuai R, Siren EM, Bhere D, Milton Y, Nissar N et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Sci Adv*. 2020; 6 (30): eaba6884. doi: 10.1126/sciadv.aba6884.
 22. Kouroupis D, Sanjurjo-Rodriguez C, Jones E, Correa D. Mesenchymal stem cell functionalization for enhanced therapeutic applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2019; 25 (1): 55–77. doi: 10.1089/ten.teb.2018.0118.
 23. Kabat M, Bobkov I, Kumar S, Grumet M. Trends in mesenchymal stem cell clinical trials 2004–2018: Is efficacy optimal in narrow dose range? *Stem cells Transl Med*. 2020; 9 (1): 17–27. doi: 10.1002/sctm.19-0202.
 24. Ramalho BS, de Almeida FM, Sales CM, de Lima S, Martinez AMB. Injection of bone marrow mesenchymal stem cells by intravenous or intraperitoneal routes is a viable alternative to spinal cord injury treatment in mice. *Neural Regen Res*. 2018; 13 (6): 1046–1053. doi: 10.4103/1673-5374.233448.
 25. Yousefi F, Ebtekar M, Soleimani M, Soudi S, Hashemi SM. Comparison of *in vivo* immunomodulatory ef-

- fects of intravenous and intraperitoneal administration of adipose-tissue mesenchymal stem cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Int Immunopharmacol.* 2013; 17 (3): 608–616. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.016.
26. Castelo-Branco MT, Soares ID, Lopes DV, Buongustito F, Martinusso CA, do Rosario A Jr et al. Intraperitoneal but not intravenous cryopreserved mesenchymal stromal cells home to the inflamed colon and ameliorate experimental colitis. *PloS One.* 2012; 7 (3): e33360. doi: 10.1371/journal.pone.0033360.
 27. Yang H, Feng F, Fu Q, Xu S, Hao X, Qiu Y et al. Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promote healing via TNF- α -stimulated gene-6 in inflammatory bowel disease models. *Cell Death Dis.* 2019; 10 (10): 718. doi: 10.1038/s41419-019-1957-7.
 28. Gonçalves FC, Schneider N, Pinto FO, Meyer FS, Visioli F, Pfaffenseller B et al. Intravenous vs intraperitoneal mesenchymal stem cells administration: what is the best route for treating experimental colitis? *World J Gastroenterol.* 2014; 20 (48): 18228–18239. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18228.
 29. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6 (1): 55. doi: 10.1186/s13287-015-0066-5.
 30. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med.* 2016; 37 (1): 115–125. doi: 10.3892/ijmm.2015.2413.
 31. Zhang K, Jiang IY, Wang B, Li T, Shang D, Zhang X. Mesenchymal stem cell therapy: a potential treatment targeting pathological manifestations of traumatic brain injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2022; 2022: 4645021. doi: 10.1155/2022/4645021.
 32. Sala E, Genua M, Petti L, Arena V. Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterol.* 2015; 149 (1): 163–176. doi: 10.1053/j.gastro.2015.03.013.
 33. Braid LR, Wood CA, Wiese DM, Ford BN. Intramuscular administration potentiates extended dwell time of mesenchymal stromal cells compared to other routes. *Cytotherapy.* 2018; 20 (2): 232–244. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.09.
 34. Арутюнян ИВ, Фатхудинов ТХ, Ельчанинов ФВ, Макаров АВ, Васюкова ОА, Усман НЮ и др. Исследование механизмов терапевтической активности аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика в модели ишемии задних конечностей крыс. *Гены и клетки.* 2018; 13 (1): 82–89. Arutyunyan IV, Fatkhudinov TK, Elchaninov FV, Makarov AV, Vasyukova OA, Usman NYu et al. Investigation of the mechanisms of therapeutic activity of allogeneic multipotent mesenchymal umbilical cord stromal cells in a rat hind limb ischemia model. *Genes and Cells.* 2018; 13 (1): 82–89. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/201805010.
 35. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2017; 23 (6): 515–528. doi: 10.1089/ten.teb.2016.0365.
 36. Калинина ЮА, Гилерович ЕГ, Коржевский ДЭ. Астроциты и их участие в механизмах терапевтического действия мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при ишемическом повреждении головного мозга. *Гены и клетки.* 2019; 14 (1): 33–40. Kalinina YuA, Gilerovich EG, Korzhevsky DE. Astrocytes and their involvement in the mechanisms of therapeutic action of multipotent mesenchymal stromal cells in ischemic brain injury. *Genes and Cells.* 2019; 14 (1): 33–40. [In Russ, English abstract]. doi: 10.23868/201903004.
 37. Александров ВН, Камилова ТА, Мартынов БВ, Калюжная ЛИ. Клеточная терапия при ишемическом инсульте. *Вестник Российской военно-медицинской академии.* 2013; 43 (3): 199–205. Aleksandrov VN, Kamilova TA, Martynov BV, Kalyuzhnaya LI. Kletochnaya terapiya pri ishemicheskom insul'te. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy.* 2013; 43 (3): 199–205. [In Russ].
 38. Коткас ИЕ, Земляной ВП. Эффективность использования стволовых клеток в лечении цирроза печени (экспериментальное исследование). *Таврический медико-биологический вестник.* 2020; 23 (1): 54–61. Kotkas IE, Zemlyanoy VP. The effectiveness of the use of stem cells in the treatment of liver cirrhosis (experimental study). *Tavrichesky medico-biological bulletin.* 2020; 23 (1): 54–61. [In Russ, English abstract]. doi: 10.37279/2070-8092-2020-23-1-54-61.
 39. Маклакова ИЮ, Гребнев ДЮ, Юсупова ВЧ, Примакоева ЕА. Изучение хоуминга ММСК после резекции печени. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2019; 63 (1): 40–45. Maklakova IYu, Grebnev DYu, Yusupova VCh, Primakova EA. Study of MMSC homing after liver resection. *Pathological Physiology and Experimental Therapy.* 2019; 63 (1): 40–45. [In Russ, English abstract]. doi: 10.25557/0031-2991.2019.01.40-45.
 40. Дорошенко ОС, Прокопова АВ, Гостюхина АА. Биохимические показатели сыворотки крови у крыс при аллоксан-индуцированном диабете и его коррекции клетками костного мозга. *Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: тезисы докл. науч. конф. Томск, 2020: 480–483. Doroshenko OS, Prokopova AV, Gostyukhina AA. Biochemical parameters of blood serum in rats with alloxan-induced diabetes and its correction by bone marrow cells. Current issues of fundamental and clinical medicine: abstracts of the report of a scientific conference. Tomsk, 2020: 480–483.*
 41. Chen Y, Li J, Ma B, Li N, Wang S, Sun Z et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat. *Aging.* 2020; 12 (18): 18274–18296. doi: 10.18632/aging.103692.
 42. Matthey MA, Pati S, Lee JW. Concise review: mesenchymal stem (stromal) cells: biology and preclinical evidence for therapeutic potential for organ dysfunction

- following trauma or sepsis. *Stem Cells*. 2017; 35 (2): 316–324. doi: 10.1002/stem.2551.
43. Nitkin CR, Rajasingh J, Pisano C, Besner GE, Thébaud B, Sampath V. Stem cell therapy for preventing neonatal diseases in the 21st century: current understanding and challenges. *Pediatr Res*. 2019; 87 (2): 265–276. doi: 10.1038/s41390-019-0425-5.
 44. Hlebokazov F, Dakukina T, Potapnev M, Kosmacheva S, Moroz L, Misiuk N et al. Clinical benefits of single vs repeated courses of mesenchymal stem cell therapy in epilepsy patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2021; 207: 106736. doi: 10.1016/j.clineuro.2021.106736.
 45. Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, Baudoux É, Baron F, Louis E, Beguin Y. Review article: mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017; 45 (2): 205–221. doi: 10.1111/apt.13864.
 46. Elgaz S, Kuçi Z, Kuçi S, Bönig H, Bader P. Clinical use of mesenchymal stromal cells in the treatment of acute graft-versus-host disease. *Transf Med Hemother*. 2019; 46 (1): 27–34. doi: 10.1159/000496809.
 47. Сергиенко НВ, Налетова ЕН. Влияние клеточной терапии на биохимические маркеры сердечной недостаточности у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2016; 1: 50–56. Sergienko NV, Naletova EN. Vliyanie kletочноj terapii na biohimicheskie markery serdechnoj nedostatochnosti u pacientov s ishemicheskoy bolezn'yu serdca. *Nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*. 2016; (1): 50–56. [In Russ].
 48. Смолянинов АБ, Иволгин ДА, Айзенштадт АА. Мезенхимальные стволовые клетки: перспективы применения в кардиологии. *Кардиологический вестник*. 2013; 8 (2): 5–11. Smolyaninov AB, Ivolgin DA, Aizenshtadt AA. Mesenchymal stem cells: perspectives of cardiologic application. *Cardiological Bulletin*. 2013; 8 (2): 5–11. [In Russ, English abstract].
 49. Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal stem cells for neurological disorders. *Adv Sci*. 2021; 8 (7): 2002944. doi: 10.1002/advs.202002944.
 50. Tian C, Wang X, Wang X, Wang L, Wang X, Wu S, Wan Z. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy in the subacute stage of traumatic brain injury by lumbar puncture. *Exp Clin Transplant*. 2013; 11 (2): 176–181. doi: 10.6002/ect.2012.0053.
 51. Viet QHN, Nguyen VQ, Le Hoang DM, Thi THP, Tran HP, Thi CHC. Ability to regulate immunity of mesenchymal stem cells in the treatment of traumatic brain injury. *Neurol Sci*. 2022; 43 (3): 2157–2164. doi: 10.1007/s10072-021-05529-z.
 52. Zhang Z, Wang FS. Stem cell therapies for liver failure and cirrhosis. *J Hepatol*. 2013; 59 (1): 183–185. doi: 10.1016/j.jhep.2013.01.018.
 53. Коткас ИЕ, Енукашвили НИ, Асадулаев ШМ, Чубарь АВ. Использование клеточных технологий в лечении цирроза печени (оценка эффективности и способ визуализации введенных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток). *Наука и инновации в медицине*. 2020; 5 (3): 197–203. Kotkas IE, Enukashvili NI, Asadulayev SM, Chubar AV. Autologous mesenchymal stem cells in treatment of liver cirrhosis: evaluation of effectiveness and visualization method. *Science & Innovations in Medicine*. 2020; 5 (3): 197–203. [In Russ, English abstract]. doi: 10.35693/2500-1388-2020-5-3-197-203.
 54. Конеv ВА, Лабутин ДВ, Божкова СА. Экспериментальное обоснование клинического применения стимуляторов остеогенеза в травматологии и ортопедии (обзор литературы). *Сибирское медицинское обозрение*. 2021; 4 (130): 5–17. Konev VA, Labutin DV, Bozhkova SA. Experimental justification for clinical application of bone growth stimulators in traumatology and orthopaedics (a review). *Siberian Medical Review*. 2021; 4 (130): 5–17. [In Russ, English abstract]. doi: 10.20333/25000136-2021-4-5-17.
 55. Чеботарева АА. Влияние интактных и апоптоз-индуцированных мезенхимальных стволовых клеток на динамику апоптоза в почечной ткани при экспериментальном остром повреждении почек. *Вестник новых медицинских технологий*. 2016; 23 (4): 88–93. Chebotareva AA. Influence of intact and apoptosis-induced mesenchymal stem cells on the dynamics of apoptosis in the renal tissue in experimental acute kidney injury. *Bulletin of new medical technologies*. 2016; 23 (4): 88–93. [In Russ, English abstract]. doi: 10.12737/23855.
 56. Демьяненко ЕВ, Глухов АИ, Грызунова ГК. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на показатели апоптоза в паренхиме почек на фоне экспериментального стресса. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4 (1): 138–142. Demyanenko EV, Glukhov AI, Gryzunova GK. Effect of mesenchymal stem cells on apoptosis rates in the renal parenchyma under experimental stress. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4 (1): 138–142. [In Russ, English abstract]. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.21.
 57. Shakouri-Motlagh A, O'Connor AJ, Brennecke SP, Kalionis B, Heath DE. Native and solubilized decellularized extracellular matrix: A critical assessment of their potential for improving the expansion of mesenchymal stem cells. *Acta Biomater*. 2017; 55: 1–12. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.014.
 58. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*. 2018; 22: 824–833. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.004.
 59. Алейникова НЕ, Чижик ВА, Бойко АВ, Нижегородова ДБ, Зафранская ММ, Пономарев ВВ. Опыт применения клеточной терапии болезни Паркинсона: эффективность малоинвазивных способов трансплантаций. *Наука и здравоохранение*. 2021; 23 (2): 81–91. Aleinikova NE, Chizhik VA, Boyko AV, Nizhegorodova DB, Zafranskaya MM, Ponomarev VV. Experience in the use of cell therapy for Parkinson's disease: the effectiveness of minimally invasive transplantation methods. *Science and Health*. 2021; 23 (2): 81–91. [In Russ, English abstract]. doi: 10.34689/SH.2021.23.2.008.

Статья поступила в редакцию 29.08.2023 г.
The article was submitted to the journal on 29.08.2023

DOI: 10.15825/1995-1191-2024-2-135-144

ПРОБЛЕМА ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЦЕЛЕЙ

Д.С. Островский¹, С.А. Борзенко^{1, 2}, Б.Э. Малюгин^{1, 2}, О.П. Антонова¹, М.Х. Хубецова¹,
Т.З. Керимов^{1, 2}

¹ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

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

Клетки заднего эпителия роговицы человека, или эндотелия, обладают ограниченной пролиферативной активностью как *in vivo* так и *in vitro*. Повреждение или дисфункция этих клеток приводит к нарушению прозрачности роговицы различной степени выраженности, вплоть до слепоты. В настоящее время единственным действенным методом лечения патологии эндотелия является трансплантация донорской роговицы, содержащей пул здоровых и функционально активных клеток. Однако существует глобальная нехватка донорских роговиц, что приводит к неудовлетворенной клинической потребности и тому, что хирургическое лечение получает лишь 1 пациент из 10 нуждающихся. В связи с этим создание клеточных конструкций и искусственных аналогов роговицы человека, содержащих здоровый эндотелий, является весьма актуальной задачей современной офтальмо-трансплантологии. В данном обзоре представлены текущее состояние вопроса, сложности и перспективы получения клеточной культуры эндотелиальных клеток роговицы *in vitro* для целей трансплантации.

Ключевые слова: роговица, эндотелий, задний эпителий, трансплантация, клетки.

CHALLENGES OF OBTAINING CULTURED CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS FOR REGENERATIVE PURPOSES

D.S. Ostrovskiy¹, S.A. Borzenok^{1, 2}, B.E. Malyugin^{1, 2}, O.P. Antonova¹, M.Kh. Khubetsova¹,
T.Z. Kerimov^{1, 2}

¹ Fyodorov Eye Microsurgery Complex, Moscow, Russian Federation

² Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Human posterior corneal epithelium (corneal endothelium) has limited proliferative activity both *in vivo* and *in vitro*. Disease or dysfunction in these cells leads to impaired corneal transparency of varying degrees of severity, up to blindness. Currently, the only effective standard treatment for corneal endothelial dysfunction is transplantation of donor cornea that contains a pool of healthy and functionally active cells. However, there is a global shortage of donor corneas, which has led to an unmet clinical need and the fact that only 1 patient out of 10 in need receives surgical treatment. Therefore, creation of cellular constructs and artificial human corneas containing healthy endothelium is a very urgent challenge facing modern ophthalmic transplantology. This review presents the current state of affairs, challenges and prospects for obtaining cultured corneal endothelial cells (CECs) *in vitro* for transplantation purposes.

Keywords: cornea, endothelium, posterior epithelium, transplantation, cells.

Для корреспонденции: Островский Дмитрий Сергеевич. Адрес: 127486, г. Москва, Бескудниковский бульвар, д. 59а. Тел. (499) 488-85-58. E-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

Corresponding author: Dmitriy Ostrovskiy. Address: 59a, Beskudnikovsky Bul'var, Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (499) 488-85-58. E-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Роговица человека представляет собой прозрачную бессосудистую структуру, питание которой осуществляется в основном через влагу передней камеры посредством клеток заднего эпителия роговицы. Клетки заднего эпителия роговицы, иначе называемые эндотелием, имеют характерную гексагональную форму и образуют монослой, расположенный на десцеметовой мембране. Основная его функция заключается в поддержании роговицы в прозрачном, относительно дегидратированном состоянии посредством работы метаболических помп, опосредованных через Na/K АТФазу [1], а также барьерной функции через белки плотных контактов ZO-1 [2].

Известно, что плотность эндотелиальных клеток роговицы у новорожденных составляет примерно 6000 клеток/мм², однако с возрастом происходит уменьшение количества клеток, ежегодная потеря которых составляет примерно 0,6% от общей популяции клеток в год [3]. У здоровых людей это естественное снижение плотности не приводит к каким-либо клинически значимым нарушениям структуры и функции роговицы. В случае более активной потери эндотелиальных клеток, например, вследствие хирургических вмешательств или травм глаза, может происходить частичное восстановление функциональной целостности эндотелиального слоя за счет миграции клеток и увеличения площади здоровых клеток [3]. При падении плотности эндотелиальных клеток роговицы ниже критического порога, который составляет приблизительно 500 клеток/мм², эндотелий утрачивает способность регулировать гидратацию стромы роговицы, что приводит к ее помутнению, и как следствие – снижению остроты зрения [3]. По данным Всемирной организации здравоохранения, в 2020 году заболевания роговицы являлись причиной снижения зрения у 7% населения земного шара и третьей по значимости причиной слепоты и слабовидения [4]. Длительное время сквозная кератопластика являлась «золотым стандартом» лечения эндотелиальной патологии роговицы, однако на сегодня на первое место выходят селективные методы послойной кератопластики, а именно задняя автоматизированная кератопластика (ЗАПК), при которой донорский трансплантат включает помимо эндотелия и десцеметовой мембраны слой стромы, и трансплантация десцеметовой мембраны (ТДМ), при которой трансплантируется только эндотелий с подлежащей десцеметовой мембраной [5–7]. Данные методики сегодня дают хорошие клинико-функциональные результаты, при этом продолжают совершенствоваться хирургические способы получения трансплантатов для послойной кератопластики [8, 9]. Однако организационные и медико-юридические проблемы, связанные с донорством, до сих пор ак-

туальны для многих стран мира, что объясняет дефицит донорского материала. С другой стороны, послеоперационная потеря эндотелиальных клеток после ЗАПК и ТДМ достигает 35% и более в год [10], что приводит к необходимости повторной кератопластики [11]. Повторная кератопластика в ряде развитых стран мира является вторым по частоте показанием к трансплантации роговицы [12].

Таким образом, существует реальная необходимость изучения альтернативных терапевтических путей, которые помогут уменьшить зависимость от донорского материала при лечении эндотелиальных патологий роговицы, а также повысить жизнеспособность трансплантированных эндотелиальных клеток как донора, так и реципиента.

ПОЛУЧЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

Одним из путей решения проблемы недостаточности эндотелия роговицы является применение культуры клеток [13]. Однако данные клетки слабо пролиферируют вследствие своего происхождения от клеток – предшественников нейронального гребня, а также контактного ингибирования и экспрессии во влаге передней камеры фактора TGF- β , эндотелиальные клетки в своем подавляющем большинстве находятся в стадии G1 клеточного цикла [14].

Несмотря на это, во всем мире идут активные работы по получению культуры клеток эндотелия роговицы. Первое сообщение об успешном получении культуры эндотелия было сделано J. Mannagh et al. (1965). Предложенная ими методика включала в себя погружение выделенных корнеосклеральных дисков в раствор 0,06% проназы, инкубирование при 37 °C в течение 2 часов, с последующим соскабливанием клеток эндотелия. Культивирование осуществлялось в культуральной среде Игла с добавлением 6 г/л глюкозы и 20% фетальной бычьей сыворотки при стандартных условиях. В эксперименте использовали роговицы доноров в возрасте 28 и 70 лет. Авторы спустя 48 часов визуализировали прикрепившиеся округлые конгломераты клеток, которые через 72 часа принимали характерную эпителиальную морфологию. Однако уже на 10-й день клетки приобретали мезенхимоподобную морфологию, что свидетельствовало об их эпителиально-мезенхимальной трансформации [15].

Стоит отметить, что с момента получения первой культуры клеток эндотелия и до сих пор дискуссионными являются критерии отбора донорского материала, нет единого протокола выделения и культивирования, а также стандартного состава питательной среды и необходимых добавок. В данном обзоре мы приводим протоколы, которые способствовали получению клеточной культуры эндотелия роговицы,

не подвергшейся эпителиально-мезенхимальному переходу хотя бы до 2-го пассажа.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОНОРОВ

Joysе и Zhu провели сравнительный анализ возможности получения клеточной культуры эндотелия роговицы и смогли представить критерий отбора доноров (табл.) [16].

Кроме того, к критериям исключения относят наличие у донора сахарного диабета, глаукомы, генерализованной инфекции (сепсиса), а также проведение химиотерапии [17]. Однако, по мнению ряда отечественных авторов, диабет и онкологические заболевания (без стадии интоксикации) являются предпочтительным выбором донора, так как могут приводить клетки эндотелия к митозу [18, 19].

M. Parekh и S. Ahmad также показали возможность получения культуры клеток эндотелия от доноров, средний возраст которых превышал 75 лет, а средняя плотность эндотелиальных клеток составляла $1943,75 \pm 222,02$ кл/мм². В ходе культивирования авторы использовали ROCK-ингибиторы и принудительное приклеивание клеточных конгломератов с использованием вискоэластика [17].

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК

Все имеющиеся на сегодня методы выделения эндотелия роговицы можно разделить на 4 группы: механические, механические с использованием ферментов, ферментативные и основанные на органном культивировании.

При первом из указанных способов выделения эндотелий отделяется от десцеметовой мембраны механически с последующим переносом на культуральную поверхность. Неоспоримым преимуществом данного метода является получение гомогенной культуры клеток эндотелия роговицы. Однако культура, полученная данным способом, обладает очень низкой клеточной активностью, и большинство полученных клеток экспрессируют маркеры раннего апоптоза [20].

Ферментативный метод выделения подразумевает инкубирование корнеосклерального диска с раствором коллагеназы, диспазы, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) или трипсина, что неизбежно приводит к получению гетерогенной клеточной культуры, содержащей примеси фибробластов стромы роговицы. Последующее применение селективных культуральных сред не дает ожидаемого получения гомогенной культуры клеток эндотелия роговицы [21–23].

Совместное применение механического и ферментативного методов обеспечивает более щадящее выделение клеток эндотелия роговицы, однако использование ферментов требует длительного вре-

Таблица

Критерии отбора доноров для получения культуры клеток эндотелия роговицы

Donor selection criteria for corneal endothelial cell culture

Возраст донора	от 2 до 79 лет
Плотность эндотелиальных клеток	1800–3891 клеток/мм ²
Среднее время от момента смерти до консервации роговицы	не более 12 часов
Среднее время от момента смерти до введения в эксперимент	не более 7 дней

мени инкубирования, что приводит к повышению клеточного повреждения [21–24].

К недостаткам метода органного культивирования десцеметовой мембраны с прилежащим слоем эндотелия относится получение гетерогенной культуры клеток вследствие присутствия нижележащих слоев стромы. Кроме того, культура, полученная данным методом, характеризуется крайне низкой митотической активностью [21].

СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Сравнительный анализ базовых питательных сред для получения культуры клеток эндотелия роговицы был проведен G. Peh et al. [25]. В рамках данной работы были исследованы такие питательные среды, как DMEM [26]; OptiMEM [27]; DMEM/F12 [28]; Ham's F12/M199 [29]. Было показано, что при использовании DMEM и DMEM/F12 клеточная культура после второго пассажа утрачивает митотическую активность, клетки увеличиваются в размерах и подвергаются апоптозу. В свою очередь использование OptiMEM и Ham's F12/M199 способствует поддержанию культуры вплоть до 3-го пассажа с сохранением митотической активности и экспрессии специфических эпителиальных маркеров ZO-1 и Na/K АТФазы. Однако, несмотря на наличие типичной иммуноцитохимической картины, клетки утрачивают свою характерную морфологическую форму. Согласно Y. Zhu et al., данные изменения обусловлены наличием в составе питательных сред основного фактора роста фибробластов, что способствует стимуляции эпителиально-мезенхимального перехода [30].

На сегодня максимально эффективная схема ведения культуры эндотелиальных клеток роговицы подразумевает поэтапное использование различных питательных сред, так называемый «метод двух сред». В качестве первой выступает среда, содержащая базовую эндотелиальную бессывороточную среду Human Endothelial SFM, необходимую для стабилизации клеточной культуры и поддержания характерного фенотипа. Для активации пролиферативной активности клеток культуру помещают во

вторую среду на основе Ham's F12/M199. Использование данного подхода позволяет получить более однородную клеточную культуру с характерной морфологией и предотвратить возникновение эпителиально-мезенхимального перехода [31]. Несмотря на преимущества указанного метода, имеющиеся на сегодня доклинические и клинические испытания проводятся на основе применения сред DMEM/F12 [32] и OptiMEM [33].

ДОБАВКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Помимо выбора базовой питательной среды, крайне актуальным является подбор факторов, поддерживающих культуру клеток эндотелия роговицы. Сообщается, что такие факторы, как bFGF [35], LIF [36], EGF [36], NGF [37], добавка для роста эндотелиальных клеток [38] и 2-фосфат L-аскорбиновая кислота [39], способствуют росту эндотелия. Предполагается, что использование LIF задерживает контактное ингибирование и совместно с bFGF в бессывороточной среде способствует пролиферации клеток эндотелия с сохранением характерного фенотипа [35].

В литературе имеются данные о получении не-трансформируемой клеточной линии эндотелиальных клеток роговицы, доведенных до 224-го пассажа [39]. В данной работе для поддержания клеток использовали питательную среду на основе DMEM/F12 с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки, антибиотиков, основного фактора роста фибробластов (bFGF), эпидермального фактора роста (EGF), N-ацетилглюкозамина гидрохлорида, глюкозамина гидрохлорида, хондроитинсульфата, продуктов окисления и деградации хондроитинсульфата, карбоксиметилхитозана, бычьего экстракта глаза и культурального супернатанта клеток стромы роговицы человека в логарифмической фазе. Представленный результат, как заявляют авторы, был достигнут вследствие использования кондиционированной среды. Zhu et al. сообщили, что использование кондиционированной среды кератоцитов в логарифмической фазе роста стимулирует пролиферацию эндотелиальных клеток роговицы лучше, чем использование костномозговых мезенхимальных стволовых клеток МСК [40]. Представленные данные, возможно, показывают потенциал использования кондиционированных сред для стимулирования пролиферации эндотелиальных клеток роговицы.

Известен фармакологический подход к восстановлению эндотелия с использованием ингибитора Rho-ассоциированной киназы (ROCK) Y-27632 [41]. Использование ROCK при культивировании помогает регулировать форму и движение клеток, воздействуя на цитоскелет [42]. Было показано, что ROCK Y-27632 способствует лучшей адгезии клеток, ингибирует апоптоз, является нетоксичным и не вызывает

изменений морфологии эндотелия роговицы человека [43, 44]. ROCK был предложен как активное вещество для восстановления потери эндотелиальных клеток *in vivo* на животных моделях [8].

Ряд авторов заявляет о том, что использование низкомолекулярных ингибиторов RhoA и ROCK Y-27632 может ингибировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию, которая, возможно, запускается вследствие разрушения межклеточных соединений во время культивирования и пассирования культуры [40].

Следовательно, необходимы дальнейшие исследования особенностей получения и долгосрочного культивирования эндотелиальных клеток с целью оптимизации и стандартизации условий их культивирования с подтверждением функциональных свойств для дальнейшей трансляции данных исследований в клиническую практику.

ПОСЕВНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Очень важным фактором является исходная посевная концентрация клеток, необходимая для сохранения их гексагональной морфологии, а также экспрессии всех маркеров. В исследованиях было показано, что таковой является концентрация 1×10^4 клеток/см² [45].

СУБСТРАТ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Помимо выбора надлежащего состава питательной среды еще одним нерешенным вопросом является выбор оптимальной культуральной поверхности [45]. Многие научные коллективы для получения 2D-клеточной культуры эндотелия роговицы используют такие покрытия, как коллаген I типа [46] и фибронектин [16], коллаген IV типа [48], хондроитинсульфат и ламинин [49], матригель [50] и смесь для покрытия FNC [27]. Стоит отметить, что использование коллагена IV типа, а также E-8 Ламинина – 511 [51] как компонентов десцеметовой мембраны роговицы представляется наилучшим решением для получения однородной клеточной культуры эндотелия роговицы [40]. Также хорошо зарекомендовал себя фиброин шелка. Так, было показано, что его использование может поддерживать рост эндотелиальных клеток роговицы с характерной морфологией и экспрессией специфических маркеров [52].

3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ РОГОВИЦЫ

Ряд авторов использует 3D-культивирование клеток эндотелия роговицы ввиду его неоспоримого преимущества с точки зрения введения культуры клеток в переднюю камеру глаза. Было показано, что

использование 3D-сфероидов позволяет сохранить экспрессию ZO-1 и Na/K АТФазы. Данный вариант культивирования способствует преодолению эпителиально-мезенхимальной трансформации [53, 54].

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Следует отметить, что клеточная культура эндотелия уникальна, а ее наработка – дорогостоящая процедура, в связи с чем важным направлением является предупреждение потери ценных культур клеток путем криоконсервации. Была показана возможность использования следующих сред для криоконсервации культуры клеток эндотелия: Opti-MEM + 10% ДМСО + 10% FBS; Cellbanker 2; Bambanker; KM Banker; Stem-Cellbanker; Bambanker hRM; ReproCryo DMSO Free RM. Среди них лишь использование Bambanker hRM, не содержащей ксенодобавок, соответствует требованиям надлежащей производственной практики GMP [55].

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОК

Характеристика клеток является одним из основных моментов культивирования, включающих в себя как определение функциональных свойств культуры, так и подтверждение ее аутентичности. Изучение морфологии – самый простой и наиболее очевидный метод идентификации клеток.

Peh et al. [45] предложили использовать индекс округлости для оценки формы эндотелиальных клеток роговицы, чтобы отличить их от удлинённых фибробластов.

$$\text{Округлость} = \frac{4\pi \cdot \text{Площадь}}{\text{Периметр}^2},$$

где значение, стремящиеся к 1,0, указывает на округлую форму клеток.

В настоящее время основными стандартными процедурами идентификации культуры клеток являются методики изучения их генотипа, а также маркеров, специфичных для исследуемых клеток.

ГЕНОТИП ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Для оценки генотипа полученных *in vitro* эндотелиальных клеток роговицы используют ПЦР с обратной транскриптазой, изучая экспрессию мРНК. Следует отметить, что на сегодня отсутствует четкий набор исследуемых генов, необходимых для подтверждения эндотелиальной видоспецифичности клеток. Наиболее часто исследуемые гены в первичной клеточной культуре эндотелия роговицы человека – Na⁺/K⁺ АТФаза (ATPA1), ZO-1 (TJP1), коллаген 8-го типа (COL8) и семейство переносчиков (SLC4). Также единично сообщается об исследовании следующих генов: виментин, N-кадгерин, CD166, нестин, OCT 3/4, Snail, p27, a-SMA, Laminin [56–58].

ФЕНОТИП ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Для изучения фенотипа полученных *in vitro* эндотелиальных клеток роговицы в основном используют иммуноцитохимический метод окрашивания на следующие маркеры, встречающиеся почти во всех научных сообщениях: Na⁺/K⁺ АТФаза, ZO-1, Ki67. Данные маркеры многие исследователи принимают за основные и характерные для эндотелиальных клеток роговиц человека [59]. Кроме того, определяют N- и E-кадгерин, Актин, CD 166, CD44, CD77, нестин, виментин, коллаген IV и VIII типа, цитокератин 3, a-SMA, GFAP.

КЛИНИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ГОМОГЕННОСТИ КУЛЬТУРЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК РОГОВИЦЫ

Первая клиническая панель CD-маркеров была предложена Kinoshita et al. [33]. В данном исследовании было показано, что эндотелиальные клетки, экспрессирующие CD166+ и не экспрессирующие CD44-, CD133-, CD105-, CD24-, CD26-, имеют неизменный генотип и фенотип и могут быть использованы для клеточной терапии. Отсутствие CD44, CD24 и CD26 свидетельствует об исключении анеуплоидных клеток, тем самым связывая фенотипический анализ с клеточным кариотипом [60, 61].

Стоит отметить ряд исследований, в которых сообщается, что функционирующие эндотелиальные клетки экспрессируют CD166, CD200, GPC4, HLA-ABC и PD-L1 [57, 62–64] и не экспрессируют a-SMA, CD9, CD24, CD26, CD44, CD73, CD90, CD105, CD133, SNAIL, ZEB1 и виментин [64–66].

ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ НАРАБОТКИ В ПОЛУЧЕНИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

На сегодня процесс заготовки и трансплантации клеток заднего эпителия роговицы в Российской Федерации ограничен Федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако применение суспензии некультивированных клеток эндотелия роговицы является легитимным методом использования данных клеток и не вступает в противоречие с вышеуказанным Законом. По мнению ряда исследователей, трансплантация эндотелиальных клеток может рассматриваться как вариант селективной эндотелиальной кератопластики [24]. На сегодня в России проведено сравнение различных способов выделения эндотелиальных клеток в эксперименте *ex vivo*. Установлено, что выделение эндотелиальных клеток модифицированным энзимным методом является более эффективным и предпочтительным по сравнению с модифицированным механическим способом выделения: в результате проведенного анализа данных проточной цитофлуориметрии была

обнаружена статистически достоверная разница по количеству выделенных клеток и размеру частиц ($p < 0,05$). При этом не было обнаружено статистически значимых отличий в жизнеспособности эндотелиальных клеток, выделенных модифицированным энзимным методом, по сравнению с модифицированным механическим способом. Авторами данного исследования показана фундаментальная и клиническая значимость разработки протоколов выделения эндотелиальных клеток [24].

ПРИМЕНЕНИЕ IPS-КЛЕТОК

В 2006 году группа ученых из Киотского университета во главе с Takahashi и Yamanaka впервые получила индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS-клетки), которые были выделены из фибробластов путем эпигенетического перепрограммирования [67].

На сегодня продолжается разработка протоколов получения эпителиальных клеток роговицы из iPS-клеток. Так, в работе R.A. Martínez et al. проводится поиск оптимального момента культивирования для инициации дифференцировки iPS-клеток в фенотипы предшественников эпителия роговицы – лимбальные эпителиальные стволовые клетки [68]. На сегодня описан ряд протоколов по созданию клеток эпителия роговицы из iPS-клеток [69].

Ведутся исследования, направленные на получение кератоцитов из iPS-клеток. Так, известные протоколы описывают поэтапную схему получения кератоцитов, в которых предлагается синтезировать кератоциты через этап получения клеток нервного гребня для избегания трансформации iPS-клеток в фибробластоподобные [70].

Известно, что эндотелиальные клетки роговицы могут быть получены с применением iPS-методики из эмбриональных стволовых клеток [21, 66, 71–73] и стволовых клеток пуповины крови [74].

МОДЕЛИ ТЕСТИРОВАНИЯ НА ЖИВОТНЫХ

При моделировании трансплантации клеточной культуры эндотелиальных клеток роговицы необходимо тщательно подходить к выбору животной модели. Использование животных, относящихся к отряду грызунов или отряду зайцевых, не представляется возможным, так как у их представителей эндотелий роговицы способен к регенерации и пролиферации в отличие от эндотелиальных клеток роговицы человека [75]. Для эффективной оценки трансплантации эндотелиальных клеток возможно использование других животных моделей, таких как кошки [76], свиньи или приматы [77], поскольку имеют схожие морфофункциональные особенности между эндотелиальными клетками этих животных и человека. Однако стоит отметить, что использование таких животных связано с определенными сложнос-

тями как в дорогостоящих содержании и уходе, так и в получении всех разрешительных документов и этического одобрения.

ПРИМЕНЕНИЕ В КЛИНИКЕ

На сегодня известны две работы по клиническому применению культивированных клеток эндотелия роговицы человека [32, 33]. Стоит отметить, что в обоих исследованиях были пролечены пациенты с буллезной кератопатией. Данные работы были подтверждены доклиническими исследованиями *in vivo*, а также на кадаверном глазу в модели *ex vivo*. В работе Kinoshita et al. клетки вводили посредством инъекции в совокупности с ингибитором ROCK в концентрации 1×10^6 кл/мл, в работе Parikumar et al. [32] использовали нанокомпозитный гель в виде листка с культивированными клетками на его поверхности в концентрации 5×10^5 кл/мл.

Однако исследователи не оценивали миграцию введенных клеток, что повлекло за собой большое количество споров об эффективности и конкретном вкладе клеточной культуры в получение положительных результатов. Также стоит отметить, что ни одна из групп не сообщила о побочных эффектах у пациентов. Kinoshita et al. заявили о теоретической возможности попадания клеточной культуры в трабекулярную сеть и развитию глаукомы, однако ни у одного из пациентов не было обнаружено данной патологии в течение двух лет наблюдения [33].

Также Kinoshita et al. опубликовали результаты пятилетнего наблюдения за 11 пациентами. Было показано восстановление прозрачности роговицы у 10 из 11 пациентов. При изучении итоговой плотности эндотелиальных клеток у 8 пациентов спустя 5 лет были получены показатели, равные 1000 клеткам/мм², а у 2 – 2000 клеток/мм². Толщина роговицы в центре у 10 из 11 пациентов в течение 5 лет вернулась к нормальным показателям (менее 630 мкм) [78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Трансплантация культуры эндотелиальных клеток роговицы имеет потенциал кардинально изменить подход к лечению эндотелиальных патологий роговицы с возможностью быстрого восстановления зрения и уменьшения потребности в донорском материале. Результаты разных исследовательских групп показывают возможность использования трансплантации эндотелиальных клеток роговицы при лечении эндотелиальной патологии роговицы. Однако для применения в клинике данной технологии необходимо решить ряд вопросов, а именно оптимизировать протоколы выделения и культивирования клеточной культуры эндотелия роговицы. Кроме того, необходимо разработать экспериментальные методы, которые позволят отслеживать и картировать трансплантированные клетки, для оценки успешности клеточной

терапии. Также есть необходимость установления объективных методов оценки прозрачности роговицы. На данный момент принята макрофотосъемка с использованием щелевой лампы, однако интерпретация полученных изображений отличается субъективизмом и существенно варьирует у разных авторов.

Единственная опубликованная к настоящему моменту работа по пересадке эндотелиальных клеток человека выполнена Kinoshita et al. (2018). Она выполнена с использованием 8% фетальной бычьей сыворотки, используемой при культивировании эндотелиальных клеток. Однако наличие ксеногенных продуктов представляет собой существенное ограничение для дальнейшего массового использования клеточных продуктов. Стоит отметить, что на сегодня нет опубликованных данных по разработке протокола получения и культивирования эндотелиальных клеток без использования ксеногенных продуктов.

С нашей точки зрения, целесообразно рассмотреть прогрессивные методы применения клеточных культур, а именно 3D-сфероидов, так как введение клеточной суспензии не позволяет четко отследить точечное прикрепление клеток, а также оценить его эффективность. Использование биосовместимых носителей-подложек может технически усложнить проведение операций в клинике вследствие увеличения травматичности вмешательства, связанного с необходимостью проведения относительно большого операционного разреза по сравнению с таковым, необходимым для инъекции клеточной культуры. Кроме того, применение различных матриц, скорее всего, потребует их последующего удаления, а это, в свою очередь, может способствовать развитию побочных эффектов и осложнений. Таким образом, в аспекте вышеизложенного комплекс вопросов, связанный с трансплантацией клеток эндотелия роговицы, является крайне актуальным, но не до конца изученным и требующим дальнейшего углубленного исследования.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00356.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Clausen MV, Hilbers F, Poulsen H. The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Front Physiol.* 2017; 8: 371.
2. Hutcheon AEK, Zieske JD, Guo X. 3D in vitro model for human corneal endothelial cell maturation. *Exp Eye Res.* 2019; 184: 183–191. doi: 10.1016/j.exer.2019.04.003.
3. Yamamoto A, Tanaka H, Toda M, Sotozono C, Hamuro J, Kinoshita S et al. A physical biomarker of the quality of cultured corneal endothelial cells and of the long-term prognosis of corneal restoration in patients. *Nat Biomed Eng.* 2019; 3 (12): 953–960. doi: 10.1038/s41551-019-0429-9.
4. Robaei D, Watson S. Corneal blindness: a global problem. *Clin Exp Ophthalmol.* 2014; Apr; 42 (3): 213–214. doi: 10.1111/ceo.12330.
5. Малиюгин БЭ, Мороз ЗИ, Борзенко СА, Дроздов ИВ, Айба ЭЭ, Пахтаев АН. Первый опыт и клинические результаты задней автоматизированной послойной кератопластики (ЗАПК) с использованием предварительно выкроенных консервированных ультратонких роговичных трансплантатов. *Офтальмохирургия.* 2013; 3: 12–16. Malyugin BE, Moroz ZI, Borzenok SA, Drozdov IV, Ayba EE, Pashtaev AN. Pervyy opyt i klinicheskie rezul'taty zadney avtomatizirovannoy posloynoy keratoplastiki (ZAPK) s ispol'zovaniem predvaritel'no vykroennykh konservirovannykh ul'tratonkikh rogovichnykh transplantatov. *Oftal'mokhirurgiya.* 2013; 3: 12–16.
6. Малиюгин БЭ, Шилова НФ, Антонова ОП, Анисимова НС, Шормаз ИН. Сравнительный анализ клинико-функциональных результатов задней послойной кератопластики с использованием фемтосекундного лазера и микрокератома. *Офтальмохирургия.* 2019; 1: 20–26. Malyugin BE, Shilova NF, Antonova OP, Anisimova NS, Shormaz IN. Sravnitel'nyy analiz kliniko-funktsional'nykh rezul'tatov zadney posloynoy keratoplastiki s ispol'zovaniem femtosekundnogo lazera i mikrokeratoma. *Oftal'mokhirurgiya.* 2019; 1: 20–26.
7. Малиюгин БЭ, Шилова НФ, Анисимова НС, Антонова ОП. Трансплантация эндотелия и десцеметовой мембраны. *Вестник офтальмологии.* 2019; 135 (1): 98–103. Maliugin BE, Shilova NF, Anisimova NS, Antonova OP. Transplantation of endothelium and Descemet's membrane. *Vestnik Oftalmologii.* 2019; 135 (1): 98–103. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma201913501198>.
8. Rajan MS. Surgical strategies to improve visual outcomes in corneal transplantation. [e-journal]. *Eye.* 2014; 28 (2): 196.
9. Калинин ЮЮ, Динь ТХА, Золотаревский АВ, Калинин СЮ. Новый хирургический подход к преддесцеметовой эндотелиальной кератопластике (PDEK). *Вестник офтальмологии.* 2023; 139 (1): 55–66. Kalinnikov YuYu, Dinh THA, Zolotarevskiy AV, Kalinnikova SYu. A new surgical approach to pre-Descemet's endothelial keratoplasty. *Vestnik Oftalmologii.* 2023; 139 (1): 55–66. (In Russ., In Engl.). doi: 10.17116/oftalma202313901155.
10. Baydoun L, Tong CM, Tse WW. Endothelial cell density after Descemet membrane endothelial keratoplasty: 1 to 5-year follow-up. *Am J Ophthalmol.* 2012; 154: 762–763.
11. Tarantino-Scherrer JN, Kaufmann C, Bochmann F, Bachmann LM, Thiel MA. Visual recovery and endothelial cell survival after Descemet stripping automated endothelial keratoplasty for failed penetrating keratoplasty grafts: A cohort study. *Cornea.* 2015; 34: 1024–1029.

12. Eye Bank Assotiation of America (EBAA). Eye banking statistical report. Washington, D.C., 2019. 110 p.
13. Малугин БЭ, Борзенко СА, Комах ЮА, Арбуханова ПМ, Желтоножко АА, Сабурина ИИ и др. Современные возможности клеточных технологий в конструировании биологического эквивалента искусственной роговицы. *Бюллетень СО РАМН*. 2014; 34 (5): 43–47. Malyugin BE, Borzenok SA, Komakh YuA, Arbukhanova PM, Zheltonozhko AA, Saburina IN et al. Modern possibilities of cell technologies in biological equivalent of artificial cornea constructing. *Byulleten' SO RAMN*. 2014; 34 (5): 43–47.
14. Joyce NC, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium *in situ*. [e-journal]. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37 (8): 1566.
15. Mannagh JJ, Irving A. Human corneal endothelium: Growth in tissue cultures. *Arch Ophthalmol*. 1965; 74: 847–849.
16. Joyce NC, Zhu CC. Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea*. 2004; 23: S8–S19.
17. Parekh M, Ahmad S, Ruzza A, Ferrari S. Human Corneal Endothelial Cell Cultivation From Old Donor Corneas With Forced Attachment. *Sci Rep*. 2017; 7 (1): 142. doi: 10.1038/s41598-017-00209-5.
18. Ронкина ТИ. Закономерности возрастных изменений эндотелия роговицы человека в норме и патологии, возможности активации пролиферации эндотелия и их значение в офтальмологии: дис. ... докт. мед. наук. М., 1994; 50. Ronkina TI. Zakonomernosti vozzrastnykh izmenenij endoteliya rogovicy cheloveka v norme i patologii, vozmozhnosti aktivacii proliferacii endoteliya i ih znachenie v oftal'mologii. [Dissertation]. M., 1994; 50.
19. Явишева ТМ. Морфо-функциональные особенности эндотелия роговицы человека в норме и патологии и отбор донорского материала для кератопластики: дис. ... канд. мед. наук. М., 1990; 198. Yavisheva TM. Morfo-funkcional'nye osobennosti endoteliya rogovicy cheloveka v norme i patologii i otbor donorskogo materiala dlya keratoplastiki. [Dissertation]. M., 1990; 198.
20. Bartakova A, Kuzmenko O, Alvarez-Delfin K, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. A Cell Culture Approach to Optimized Human Corneal Endothelial Cell Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018; 59 (3): 1617–1629. doi: 10.1167/iops.17-23637.
21. Parekh M, Ferrari S, Sheridan C, Kaye S, Ahmad S. Concise Review: An Update on the Culture of Human Corneal Endothelial Cells for Transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2016; 5 (2): 258–264. doi: 10.5966/sctm.2015-0181.
22. Казанцев АД, Островский ДС, Борзенко СА. Результаты разработки протокола выделения и культивирования заднего эпителия роговицы человека. *Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области*. 2017; 3 (4 (19)): 50–52. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Borzenok SA. Experience of a new method of isolation and cultivation of human corneal endothelial cells *ex vivo*. *Vestnik Soveta molodykh uchenykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*. 2017; 3 (4 (19)): 50–52.
23. Казанцев АД, Островский ДС, Герасимов МЮ, Борзенко СА. Изучение экспериментальных методов выделения и культивирования клеток эндотелия роговицы человека. *Современные технологии в офтальмологии*. 2017; 4: 105–108. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Borzenok SA. Izuchenie eksperimental'nykh metodov vydeleniya i kul'tivirovaniya kletok endoteliya rogovitsy cheloveka. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2017; 4: 105–108.
24. Малугин БЭ, Борзенко СА, Островский ДС, Антонова ОП, Хубецова МХ, Цикаришвили НР. Разработка метода получения суспензии эндотелиальных клеток роговицы человека и ее последующей трансплантации в эксперименте *ex vivo*. *Офтальмохирургия*. 2022; 4: 56–64. Malyugin BE, Borzenok SA, Ostrovskiy DS, Antonova OP, Hubetsova MH, Tsikarishvili NR. Development of a method for obtaining a suspension of human corneal endothelial cells and its subsequent transplantation in an *ex vivo* experiment. *Fyodorov Journal of Ophthalmic Surgery*. 2022; 4: 56–64. doi: 10.25276/0235-4160-2022-4-56-64.
25. Peh GS, Toh KP, Wu FY, Tan DT, Mehta JS. Cultivation of human corneal endothelial cells isolated from paired donor corneas. *PLoS One*. 2011; 6 (12): e28310. doi: 10.1371/journal.pone.0028310.
26. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Cannon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, Kinoshita S. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 800–806.
27. Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 1743–1751.
28. Li W, Sabater AL, Chen YT, Hayashida Y, Chen SY, He H, Tseng SC. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48: 614–620.
29. Engelmann K, Friedl P. Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1989; 25: 1065–1072.
30. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SC. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci*. 2012; 125 (Pt 15): 3636–3648.
31. Peh GS, Chng Z, Ang HP, Cheng TY, Adnan K, Seah XY et al. Propagation of human corneal endothelial cells: a novel dual media approach. *Cell Transplant*. 2015; 24 (2): 287–304. doi: 10.3727/096368913X675719.
32. Parikumar P, Haraguchi K, Senthilkumar R. Human corneal endothelial cell transplantation using nanocomposite gel sheet in bullous keratopathy. *Am J Stem Cells*. 2018; 7 (1): 18–24.
33. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *N Engl J Med*. 2018; 995–1003.
34. Lee JG, Kay EP. FGF-2-mediated signal transduction during endothelial mesenchymal transformation in cor-

- neal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2006; 83 (6): 1309–1316.
35. Liu X, Tseng SC, Zhang MC, Chen SY, Tighe S, Lu WJ, Zhu YT. LIF-JAK1-STAT3 signaling delays contact inhibition of human corneal endothelial cells. *Cell Cycle.* 2015; 14 (8): 1197–1206. doi: 10.1080/15384101.2015.1013667.
 36. Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SC. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci.* 2012; 125: 3636–3648.
 37. Chen KH, Azar D, Joyce NC. Transplantation of adult human corneal endothelium *ex vivo*: a morphologic study. *Cornea.* 2001; 20 (7): 731–737.
 38. Liu Y, Sun H, Hu M, Zhu M, Tighe S, Chen S et al. Human Corneal Endothelial Cells Expanded *In Vitro* Are a Powerful Resource for Tissue Engineering. *Int J Med Sci.* 2017; 14 (2): 128–135. doi: 10.7150/ijms.17624.
 39. Yokoi T, Seko Y, Yokoi T, Makino H, Hatou S, Yamada M et al. Establishment of functioning human corneal endothelial cell line with high growth potential. *PLoS One.* 2012; 7 (1): e29677. doi: 10.1371/journal.pone.0029677.
 40. Zhu YT, Tighe S, Chen SL, John T, Kao WY, Tseng SC. Engineering of Human Corneal Endothelial Grafts. *Curr Ophthalmol Rep.* 2015; 3 (3): 207–217.
 41. Koizumi N, Okumura N, Ueno M. Rho-associated kinase inhibitory eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea.* 2013; 32 (8): 1167–1170. doi: 10.1097/ico.0b013e318285475d.
 42. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. The Role of Rho Kinase Inhibitors in Corneal Endothelial Dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2017; 23 (4): 660–666. doi: 10.2174/1381612822666161205110027.
 43. Galvis V, Tello A, Fuquen JP, Rodríguez-Barrientos CA, Grice JM. ROCK Inhibitor (Ripasudil) as Co-adjuvant After Descemetorhexis Without an Endothelial Graft. *Cornea.* 2017; 36 (12): e38–e40. doi: 10.1097/ICO.0000000000001381.
 44. Bi YL, Zhou Q, Du F, Wu MF, Xu GT, Sui GQ. Regulation of functional corneal endothelial cells isolated from sphere colonies by Rho associated protein kinase inhibitor. *Exp Ther Med.* 2013; 5: 433–437.
 45. Peh GS, Toh KP, Ang HP, Seah XY, George BL, Mehta JS. Optimization of human corneal endothelial cell culture: density dependency of successful cultures *in vitro*. *BMC Research Notes.* 2013; 6: 176.
 46. Островский ДС, Герасимов МЮ, Хубецова МХ, Казанцев АД, Борзенко СА. Культивирование клеток заднего эпителия роговицы человека с использованием биопокрытия коллагена I типа. *Гены и клетки.* 2019; 14 (S): 174. Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Khubetsova MKh, Kazantsev AD, Borzenok SA. Kul'tivirovanie kletok zadnego epiteliya rogovitsy cheloveka s ispol'zovaniem biopokrytiya kollagena I tipa. *Geny i kletki.* 2019; 14 (S): 174.
 47. Малугин БЭ, Борзенко СА, Сабурова ИИ, Репин ВС, Кошелева НВ, Колокольцова ТД и др. Разработка биоинженерной конструкции искусственной роговицы на основе пленочного матрикса из спидроина и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока. *Офтальмохирургия.* 2013; 4: 89–97. Malyugin BE, Borzenok SA, Saburina IN, Repin VS, Kosheleva NV, Kolokol'tsova TD i dr. Razrabotka bioinzhenernoy konstruksii iskusstvennoy rogovitsy na osnove plenoch-nogo matriksa iz spidroina i kul'tivirovannykh kletok limbal'noy zony glaznogo yabloka. *Oftal'mokhirurgiya.* 2013; 4: 89–97.
 48. Zhu YT, Hayashida Y, Kheirikhah A, He H, Chen SY, Tseng SC. Characterization and comparison of intercellular adherent junctions expressed by human corneal endothelial cells *in vivo* and *in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49 (9): 3879–3886.
 49. Engelmann K, Böhnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988; 29 (11): 1656–1662.
 50. Miyata K, Drake J, Osakabe Y, Hosokawa Y, Hwang D, Soya K et al. Effect of donor age on morphologic variation of cultured human corneal endothelial cells. *Cornea.* 2001; 20 (1): 59–63.
 51. Okumura N, Kakutani K, Numata R, Nakahara M, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F et al. Laminin-511 and -521 enable efficient *in vitro* expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015; 56 (5): 2933–2942.
 52. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC et al. Silk Fibroin Films for Corneal Endothelial Regeneration: Transplant in a Rabbit Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017; 58 (9): 3357–3365. doi: 10.1167/iovs.17-21797.
 53. Audrey EK, Hutcheon James D, Xiaoping G. 3D *In Vitro* Model for Human Corneal Endothelial Cell Maturation. *Exp Eye Res.* 2019; 184: 183–191.
 54. Островский ДС, Казанцев АД, Комах ЮА, Малугин БЭ, Борзенко СА. Получение культуры клеток заднего эпителия роговицы человека для трансплантации. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2018; 20 (S1): 157. Ostrovskiy DS, Kazantsev AD, Komakh YuA, Malyugin BE, Borzenok SA. Poluchenie kul'tury kletok zadnego epiteliya rogovitsy cheloveka dlya transplantatsii. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2018; 20 (S1): 157.
 55. Okumura N, Kagami T, Watanabe K, Kadoya S, Sato M, Koizumi N. Feasibility of a cryopreservation of cultured human corneal endothelial cells. *PLoS One.* 2019; 14 (6): e0218431. doi: 10.1371/journal.pone.0218431.
 56. Chen Y, Huang K, Nakatsu MN, Xue Z, Deng SX, Fan G. Identification of novel molecular markers through transcriptomic analysis in human fetal and adult corneal endothelial cells. *Hum Mol Genet.* 2013; 22: 1271–1279.
 57. Dorfmueller S, Tan HC, Ngoh ZX, Toh KY, Peh G, Ang HP et al. Isolation of a recombinant antibody specific for a surface marker of the corneal endothelium by phage display. *Nat Publ Gr.* 2016; 6: 1–12.
 58. Bartakova A, Alvarez-Delfin K, Weisman AD, Salero E, Raffa GA, Merkhofer RM et al. Novel identity and functional markers for human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016; 57: 2749–2762.
 59. Казанцев АД, Островский ДС, Герасимов МЮ, Борзенко СА. Разработка протокола фенотипирования

- клеток заднего эпителия роговицы кадаверных глаз человека. *Современные технологии в офтальмологии*. 2018; 4: 158–162. Kazantsev AD, Ostrovskiy DS, Gerasimov MYu, Borzenok SA. Razrabotka protokola fenotipirovaniya kletok zadnego epiteliya rogovitsy kadavernoykh glaz cheloveka. *Sovremennye tekhnologii v oftal'mologii*. 2018; 4: 158–162.
60. Hamuro J, Ueno M, Toda M, Sotozono C, Montoya M, Kinoshita S. Cultured human corneal endothelial cell aneuploidy dependence on the presence of heterogeneous subpopulations with distinct differentiation phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 4385–4392.
61. Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C et al. Production of homogeneous cultured human corneal endothelial cells indispensable for innovative cell therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017; 58: 2011–2020.
62. Cheong YK, Ngoh ZX, Peh GS, Ang HP, Seah XY, Chng Z et al. Identification of cell surface markers glypican-4 and CD200 that differentiate human corneal endothelium from stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013; 54: 4538–4547.
63. Okumura N, Hirano H, Numata R, Nakahara M, Ueno M, Hamuro J et al. Cell surface markers of functional phenotypic corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55: 7610–7618.
64. Ueno M, Asada K, Toda M, Hiraga A, Montoya M, Sotozono C et al. Micro RNA profiles qualify phenotypic features of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 5509.
65. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N et al. Concomitant evaluation of a panel of exosome proteins and MIRS for qualification of cultured human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016; 57: 4393–4402.
66. Wei Z, Batagov AO, Carter DRF, Krichevsky AM. Fetal bovine serum RNA interferes with the cell culture derived extracellular RNA. *Sci Rep*. 2016; 6: 31175.
67. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126 (4): 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024. Epub 2006 Aug 10. PMID: 16904174.
68. Martínez García de la Torre RA, Nieto-Nicolau N, Morales-Pastor A, Casaroli-Marano RP. Determination of the Culture Time Point to Induce Corneal Epithelial Differentiation in Induced Pluripotent Stem Cells. *Transplant Proc*. 2017; 49 (10): 2292–2295.
69. Chakrabarty K, Shetty R, Ghosh A. Corneal cell therapy: with iPSCs, it is no more a far-sight. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Oct 25; 9 (1): 287.
70. Naylor RW, McGhee CN, Cowan CA, Davidson AJ, Holm TM, Sherwin T. Derivation of Corneal Keratocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One*. 2016 Oct 28; 11 (10): e0165464.
71. Lee JB, Song JM, Lee JE, Park JH, Kim SJ, Kang SM et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2004; 128 (6): 727–735.
72. Chen P, Chen JZ, Shao CY, Li CY, Zhang YD, Lu WJ et al. Treatment with retinoic acid and lens epithelial cell-conditioned medium *in vitro* directed the differentiation of pluripotent stem cells towards corneal endothelial cell-like cells. *Exp Ther Med*. 2015; 9 (2): 351–360.
73. Zhang K, Pang K, Wu X. Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from in-vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2014; 23 (12): 1340–1354.
74. Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B. Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis*. 2012; 18: 547–564.
75. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, Araie M, Amano S. Comparison of rabbit corneal endothelial cell precursors in the central and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46 (10): 3645–3648. doi: 10.1167/iovs.05-0630.
76. Van Horn DL, Sendele DD, Seideman S, Buco PJ. Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and cat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1977; 16 (7): 597–613.
77. Van Horn DL, Hyndiuk RA. Endothelial wound repair in primate cornea. *Exp Eye Res*. 1975; 21 (2): 113–124. doi: 10.1016/0014-4835(75)90076-7.
78. Numa K, Imai K, Ueno M, Kitazawa K, Tanaka H, Bush JD et al. Five-Year Follow-up of First 11 Patients Undergoing Injection of Cultured Corneal Endothelial Cells for Corneal Endothelial Failure. *Ophthalmology*. 2021; 128 (4): 504–514. doi: 10.1016/j.ophtha.2020.09.002.

Статья поступила в редакцию 24.11.2023 г.
The article was submitted to the journal on 24.11.2023

БИОМИМЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К РАЗРАБОТКЕ ПРОТЕЗОВ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МАЛОГО ДИАМЕТРА

Е.А. Немец¹, Ю.В. Белов^{1, 2}, К.С. Кирьяков¹, Н.В. Грудинин¹, В.К. Богданов¹,
К.С. Филиппов¹, А.О. Никольская¹, И.Ю. Тюняева¹, А.А. Выпрышко¹, В.М. Захаревич¹,
Ю.Б. Басок¹, 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 Автономная некоммерческая организация «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Российская Федерация

Цель: разработать многослойные пористые трубчатые каркасы (ПТК) диаметром 2 мм с характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам малого диаметра. **Материалы и методы.** ПТК из поликапролактона (ПКЛ, ММ 80000) с водозапирающим слоем из ПКЛ с добавлением желатина (ПКЛЖ) диаметром 2 мм формировали методом электроспиннинга (NANON-01A). Биоактивное покрытие наносили на поверхность ПТК последовательной инкубацией в растворах бычьего сывороточного альбумина, гепарина (Гп) и лизата тромбоцитов (ЛТ). Цитотоксичность исследовали в условиях непосредственного контакта ПТК с монослоем фибробластов мыши линии NIH/3T3. Жизнеспособность ЭКЧ линии EA.hy926 оценивали с помощью набора Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. Проподимость и параметры кровотока ПТК, имплантированных в инфраренальный отдел аорты крысы, регистрировали с применением доплерографии. **Результаты.** Разработана трехслойная конструкция ПТК с внутренним диаметром 2 мм, внутренний и внешний слои которой сформированы из 0,2 мл раствора ПКЛ, а средний водозапирающий слой – из 0,5 мл раствора ПКЛ с добавлением 30% (по массе полимера) желатина. Введение водозапирающего слоя позволило снизить хирургическую пористость (ХП) с $56,2 \pm 8,7$ мл/(см²·мин) в случае однослойного ПТК из чистого ПКЛ до $8,9 \pm 2,6$ мл/(см²·мин) для трехслойного ПТК. Полученные ПТК продемонстрировали физико-механические характеристики, сходные с естественными кровеносными сосудами, а также отсутствие цитотоксичности. Нанесение биоактивного покрытия из Гп и ЛТ позволило повысить *in vitro* адгезию и пролиферацию ЭК. Была осуществлена коррекция техники имплантации фрагментов трехслойных ПТК длиной 10 мм в инфраренальный отдел аорты крысы, позволившая минимизировать кровопотерю и сужение области анастомозов. В остром эксперименте доказано, что протезы проходимы, а параметры кровотока (систолическая и диастолическая скорость, индекс резистивности) близки к соответствующим показателям естественной аорты крысы. **Заключение.** Разработанные трехслойные конструкции ПТК имеют низкую ХП и физико-механические свойства, близкие к нативным кровеносным сосудам. Нанесение биологически активного покрытия позволяет улучшить *in vitro* матричные свойства ПТК относительно ЭКЧ. При кратковременной имплантации в аорту экспериментального животного ПТК продемонстрировали отсутствие раннего тромбоза, при этом параметры кровотока были близки к показателям естественной аорты крысы. Таким образом, трехслойный ПТК с биоактивным покрытием может быть использован в качестве каркаса для формирования *in situ* тканеинженерной конструкции кровеносного сосуда малого диаметра.

Ключевые слова: сосудистый протез, электроспиннинг, трубчатый пористый каркас, поликапролактон, желатин, гепарин, лизат тромбоцитов, эндотелиальные клетки, цитотоксичность, имплантация, аорта крысы.

Для корреспонденции: Немец Евгений Абрамович. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (968) 840-47-45. E-mail: evgnemets@yandex.ru

Corresponding author: Evgeniy Nemets. Address: 1, Shchukinskaya str., Moscow, 123182, Russian Federation. Phone: (968) 840-47-45. E-mail: evgnemets@yandex.ru

BIOMIMETIC APPROACH TO THE DESIGN OF ARTIFICIAL SMALL-DIAMETER BLOOD VESSELS

E.A. Nemets¹, Yu.V. Belov^{1, 2}, K.S. Kiryakov¹, N.V. Grudinin¹, V.K. Bogdanov¹, K.S. Filippov¹, A.O. Nikolskaya¹, I.Yu. Tyunyaeva¹, A.A. Vypryshko¹, V.M. Zaxarevich¹, Yu.B. Basok¹, 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

Objective: To create 2-mm diameter multilayer porous tubular scaffolds (PTS) with characteristics that resemble small-diameter native blood vessels in terms of characteristics. **Materials and methods.** PTS made of polycaprolactone (PCL, MM 80000) with a PCL-made sealing coat/layer with gelatin addition (PCL-gelatin) with a diameter of 2 mm were created by electrospinning (NANON-01A). Bioactive coating was applied to the PTS surface by sequential incubation in solutions of bovine serum albumin, heparin (Hp), and platelet lysate (PL). Cytotoxicity was investigated under conditions of direct contact of PTS with a monolayer of NIH/3T3 mouse fibroblasts. Viability of human umbilical vein endothelial cells (EA.hy926) was evaluated using Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. Permeability and blood flow parameters of the PTS implanted in the infrarenal section of the rat aorta were recorded using Doppler imaging. **Results.** A three-layer PTS construct with an inner diameter of 2 mm was developed. Its inner and outer layers were formed from 0.2 mL of PCL solution, and the middle sealing coat/layer was from 0.5 mL of PCL with addition of 30% (by weight of polymer) gelatin. Introduction of the sealing coat/layer reduced surgical porosity (SP) from 56.2 ± 8.7 mL/(cm²·min) for a single-layer PTS made of pure PCL to 8.9 ± 2.6 mL/(cm²·min) for a three-layer PTS. The resulting PTS demonstrated physicomaterial characteristics similar to those of native blood vessels; it also showed no cytotoxicity. Application of a bioactive coating of Hp and PL allowed for increased in vitro adhesion and proliferation of endothelial cells. The technique of implantation of 10 mm long fragments of three-layer PTS into the infrarenal section of a rat aorta was corrected, thus minimizing blood loss and narrowing the anastomosis site. In an acute experiment, it was proven that the prostheses were patent and that blood flow parameters (systolic and diastolic velocity, resistivity index) were close to the corresponding indicators of native rat aorta. **Conclusion.** The developed three-layer PTS constructs have low SP and physicomaterial properties close to those of native blood vessels. Bioactive coating improves the in vitro matrix properties of PTS relative to human endothelial cells. At short-term implantation into the aorta of experimental animals, PTS showed no early thrombosis, while blood flow parameters were close to those of native rat aorta. Thus, three-layer PTS with bioactive coating can be used as a scaffold for creation of in situ tissue-engineered construct of a small-diameter blood vessel.

Keywords: vascular prosthesis, electrospinning, tubular porous scaffold, polycaprolactone, gelatin, heparin, platelet lysate, endothelial cells, cytotoxicity, implantation, rat aorta.

ВВЕДЕНИЕ

В регенерационной медицине широко используются биомиметические материалы, представляющие собой биосовместимые композиционные материалы, имитирующие структуру и основные характеристики различных тканей и/или органов организма человека [1]. В последнее время аддитивные технологии, преимущественно электроспиннинг и биопринтирование, достаточно часто применяют для разработки протезов – биомиметиков кровеносных сосудов, в том числе диаметром менее 5 мм [2].

При разработке протезов кровеносных сосудов (ПКС) необходимо соблюдение определенного баланса между достаточно высокой биологической пористостью, обеспечиваемой наличием пор с размером достаточно большим, чтобы обеспечить прорастание тканей за счет миграции клеток в объем ПКС, и низкой хирургической пористостью (ХП),

являющейся критерием кровопотери через стенки сосудистого протеза после включения его в кровоток. Водопроницаемость ПКС более 50 мл/(см²·мин) при давлении 120 мм рт. ст. является критерием, определяющим необходимость дополнительных усилий по снижению ХП [3, 4].

Исследование текстильных ПКС из полиэтилен-рефталата показало, что независимо от размера пор (от 20 до 100 мкм) существует корреляция ($R^2 > 0,9$) между водопроницаемостью и кровопотерей, при этом за счет большей вязкости и присутствия форменных элементов потери крови примерно в 10 раз меньше, чем проницаемость по воде [5].

Для снижения ХП активно применяют гидрогелевые покрытия из коллагена или желатина [6, 7], хондроитин сульфата [8], фиброина шелка [9], альгината натрия [10], производные декстранов [11], хитозана [12] и ряда других.

Одной из существенных проблем водозапирающих покрытий для сосудистых протезов на основе гидрогелей является недостаточно длительное время функционирования в условиях контакта со средами организма, вследствие чего возникает необходимость в применении дополнительной сшивки [13–15]. Используемые при реализации данного подхода сшивающие агенты класса альдегидов, эпоксисоединений, изоцианатов и т. д. являются токсичными веществами, которые трудно полностью удалить из объема покрытия, а их попадание в кровоток нежелательно в связи с непредсказуемым поведением в организме.

Кроме того, сравнительное исследование ПКС, изготовленных с применением различных технологий, показало, что нанесение покрытия, позволяющего снизить ХП, сопровождается нежелательными изменениями физико-механических характеристик сосудистых протезов, в частности повышением модуля Юнга [16].

Альтернативу гидрогелевым покрытиям могут составить многослойные ПКС, состоящие из высокопористых внешнего и внутреннего слоев и герметизирующего слоя, расположенного между ними. Для формирования водозапирающего внутреннего слоя производили обмакивание в водные растворы желатина [17] или смеси из альбумина и альгината [18], а также формировали средний слой из плотно упакованных волокон методом электроспиннинга [19, 20].

Ранее с применением метода электроспиннинга нами был разработан биосовместимый высокопористый каркас из поликапролактона (ПКЛ) в виде трубок диаметром 3 мм, обладающий физико-механическими характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам [21], однако минимальная хирургическая пористость его, которой удалось добиться, была близка к предельно допустимой.

Целью данной работы было разработать многослойные пористые трубчатые каркасы (ПТК) диаметром 2 мм с характеристиками, близкими к естественным кровеносным сосудам малого диаметра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изготовление образцов пористых трубчатых каркасов

Пористые трубчатые каркасы были получены на установке для электроспиннинга NANON-01A («МЕСС СО», Япония) при напряжении 25 кВ. Расстояние между иглой 18 G и цилиндрическим электродом диаметром 2 мм составляло 10 см, стержень вращался со скоростью 1000 об/мин, растворы наносили со скоростью 4 мл/ч. Внешний и внутренний слой ПТК формировали из 0,2 мл 10% раствора ПКЛ (ММ 80000, Sigma-Aldrich, США) в метиленхлориде (АО «ЭКОС-1», Россия), а средний водозапирающий слой – из 0,5 мл 5% раствора ПКЛЖ. Полученные

каркасы сушили при 37 °С в течение 2 ч и вакуумировали при 20 мм рт. ст. и 37 °С в течение 24 ч.

Нанесение модифицирующего покрытия

Образец ПТК последовательно обрабатывали водными растворами бычьего сывороточного альбумина (1 мг/мл, 1,5–2 ч при 37 °С), гепарина (Гп, 1 мг/мл, 1,5–2 ч при 37 °С), глутарового альдегида (1%, 18 ч при комнатной температуре), затем повторно гепарином (1 мг/мл, 1,5–2 ч, 37 °С). Между стадиями и по окончании нанесения покрытия ПТК трижды промывали в 100 мл дистиллированной воды. Гепаринизированный каркас (ПТК–Гп) высушивали при 37 °С, вакуумировали (10–20 мм рт. ст. при комнатной температуре) и стерилизовали гамма-излучением в дозе 1,5 МРад.

Раствор лизата тромбоцитов (ЛТ) человека получали разведением лиофилизованного препарата (Ренам, Россия) раствором Хенкса, не содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} (HBSS, Gibco® by Life Technologies™, СК) в соотношении 1 : 9 с последующей стерилизацией фильтрованием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Стерильные образцы ПТК–Гп непосредственно перед экспериментом обрабатывали раствором ЛТ в асептических условиях в течение 1 ч при 37 °С (ПТК–ЛТ).

Морфология поверхности протезов кровеносных сосудов

Для анализа морфологии поверхности ПТК использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JSM-6360LA (JEOL, Япония). Ускоряющее напряжение 5 кВ. Токопроводящее покрытие на поверхности исследуемых образцов формировали напылением золота на установке JFC-1600 (JEOL, Япония) 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА.

Физико-механические характеристики протезов кровеносных сосудов

Для исследования физико-механических свойств ПТК применяли разрывную машину Shimadzu EZ Test EZ-SX (Shimadzu Corporation, Япония) при скорости растяжения 5 мм/мин. Полученные результаты обрабатывали в программе TrapeziumX, версия 1.2.6, позволяющей вычислять максимальное удлинение (%), усилие до разрыва (Н) и модуль Юнга (Мпа).

Исследование цитотоксичности

Оценку цитотоксического действия лабораторных образцов ПТК проводили согласно требованиям межгосударственного стандарта ГОСТ ISO 10993-5-2023 «Исследования на цитотоксичность» [22].

Фибробласты мыши линии NIH/3T3 (American Type Culture Collection) культивировали в CO_2 -ин-

кубаторе при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO₂ в культуральных флаконах (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) с полной ростовой средой DMEM с высоким содержанием глюкозы («ПанЭко», Россия) и 10% телячьей сыворотки (Biosera, Германия), антибиотика и антимикотика Anti-Anti (Gibco® by Life Technologies™, США) и 2 мМ глутамина («ПанЭко», Россия). Клетки суспендировали применением диссоциирующего реагента TrypLE™ Express Enzyme (Gibco® by Life Technologies™, СК). Количество клеток в суспензии определяли с применением камеры Горяева («МиниМед®», Россия). Затем фибробласты высевали в 24-луночные плоскодонные планшеты (CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия) в концентрации 7–12 × 10⁴ клеток на лунку и инкубировали 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO₂, до образования (80 ± 10) % монослоя. Исследуемые образцы ПТК размещали непосредственно на поверхности монослоя фибробластов. По завершении инкубации из лунок удаляли исследуемые образцы, промывали в фосфатно-солевом буферном (ФСБ) растворе и на 1–2 минуты добавляли 0,1% раствор трипанового синего («ПанЭко», Россия), окрашивающего лизированные клетки и клетки с поврежденными клеточными мембранами. После удаления красителя и промывки ФСБ с применением флюоресцентного микроскопа производили оценку культуры на наличие морфологических изменений и уменьшение плотности клеток.

Для анализа результатов применяли следующую шкалу степени реакции клеток на непосредственный контакт с ПТК:

- 0 – лизиса нет (реакция отсутствует);
- 1 – лизировано не более 20% клеток (реакция незначительная);
- 2 – лизировано не более 50% клеток (реакция нерезкая);
- 3 – лизировано не более 70% клеток (реакция умеренная);
- 4 – лизировано более 70% клеток (реакция резкая).

Нецитотоксичный материал должен иметь степень реакции «0».

Исследование взаимодействия ПТК с эндотелиальными клетками

Для исследования *in vitro* были выбраны immortalized эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭКч) линии EA.hy926 (The human umbilical vein cell line EA.hy926, ATCC®CRL-2922™) из коллекции ATCC (American Type Culture Collection), имеющие сходство с первичными культурами [23, 24].

Стерильные образцы немодифицированных и модифицированных ПТК помещали на дно культурального плоскодонного 24-луночного планшета

(CELLSTAR® Greiner Bio-One, Германия), в асептических условиях наносили ЭКч в концентрации 5 × 10⁴ кл/см² и культивировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях в течение выбранного интервала времени.

Оценку жизнеспособности ЭКч производили с применением Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes® by Life Technologies™, США): в лунки планшета добавляли фосфатный буфер Дюльбекко, содержащий 2 мкМ calcein AM и 4 мкМ EthD-1, через 15 мин результаты окрашивания визуализировали с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100 (Япония), оснащенного цифровой фотокамерой Digital Sight DS-Vil (Nikon, Япония).

Метаболическую активность ЭКч на поверхности ПТК оценивали с помощью реагента PrestoBlue™ HS Cell Viability Reagent (Invitrogen™ by Thermo Fisher Scientific, США): в лунки с исследуемыми образцами и контролем (среда без клеток) добавляли 10% витального реагента PrestoBlue™ и инкубировали в течение 3 ч при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей (5 ± 1) % CO₂. Изменение поглощения среды регистрировали с использованием ридера для микропланшетов, как было описано ранее, на длинах волн 570 и 600 нм. Процент восстановленного PrestoBlue™ рассчитывали по формуле:

$$\frac{117,216 \cdot A_{570 \text{ Обр.}} - 80,586 \cdot A_{600 \text{ Обр.}}}{155,677 \cdot A'_{600} - 14,652 \cdot A'_{570}} \times 100\%,$$

где 117,216 и 80,586 – молярный коэффициент экстинкции окисленной формы реагента при $\lambda = 570$ и $\lambda = 600$ нм соответственно; 155,677 и 14,652 – молярный коэффициент экстинкции восстановленной формы реагента при $\lambda = 600$ и $\lambda = 570$ нм соответственно; $A_{570 \text{ Обр.}}$ и $A_{600 \text{ Обр.}}$ – поглощение исследуемого образца при $\lambda = 570$ и $\lambda = 600$ нм соответственно; A'_{570} и A'_{600} – поглощение контрольного образца при $\lambda = 570$ и $\lambda = 600$ нм соответственно.

Для определения количества ЭКч на поверхности ПТК была построена калибровочная кривая, линейная в полулогарифмических координатах до концентрации ЭКч $0,8 \times 10^5$.

Имплантация фрагмента ПТК в инфраренальный отдел аорты крысы

Трехслойные ПТК диаметром 2 мм и длиной 10 мм имплантировали в брюшную часть аорты крысы по методике «конец в конец». Введенное в наркоз животное фиксировали на операционном столе в положении лежа на спине. С помощью бритвенного станка удаляли шерсть с передней брюшной стенки, операционное поле обрабатывали антисептическим средством. Доступ к брюшной аорте выполняли посредством срединной лапаротомии. Затем выделяли

инфраренальный отдел аорты, выполняли пережатие проксимального отдела сосуда ниже отхождения почечных артерий. Пережатие дистального отдела выполняли над трифуркацией брюшной аорты. После пережатия осуществляли резекцию инфраренального участка аорты, с помощью атрауматичной нити полипропилена 8-0 формировали проксимальный, а затем дистальный анастомозы с ПТК. После запуска кровотока осуществляли контроль гемостаза. На заключительной стадии выполняли послойное ушивание операционной раны с последующей обработкой швов антисептическим средством и раствором анестетика. После оперативного вмешательства животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде на рационе питания.

Для подтверждения проходимости имплантированных ПТК выполняли исследование на ультразвуковом аппарате Vivid E9 (General Electric, США) с программным обеспечением WindowBlinds™ (M OCSX® Stardock) с использованием секторного (1,5–5 МГц) и линейного (2,5–12 МГц) датчиков и проводникового геля Медигель («Гельтек», Россия). Для седации испытуемых животных перед проведением доплерометрии применяли Золетил (Virbac Sante Animale, Франция), после чего осуществляли бритье брюшной области ветеринарным триммером. Регистрировали измерение диаметра просвета аорты либо ПТК (d, см), пиковую систолическую скорость (Vps, м/с) и максимальную конечную диастоличе-

скую скорость (Ved, м/с), после чего рассчитывали индекс резистивности согласно формуле (2):

$$RI = (Vps - Ved)/Vps. \quad (2)$$

Статистическая обработка

Количественную и статистическую обработку полученных данных проводили с помощью приложения Microsoft Excel 2007. Все результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ при количестве образцов (n) от 3 до 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наименьшая водопроницаемость разработанного нами ранее ПТК из ПКЛ диаметром 3 мм была достаточно высока и составила $30,4 \pm 1,5$ мл/(см²·мин) [20], что все же было ниже максимально допустимого значения 50 мл/(см²·мин). При переходе к ПТК диаметром 2 мм водопроницаемость ПТК из ПКЛ не удалось уменьшить до удовлетворительных значений, что и определило необходимость дополнительных усилий по снижению ХП. Для решения этой проблемы нами было предположено формировать многослойные ПТК, включающие в свой состав внутренний водозапирающий слой из ПКЛ с добавлением желатина.

На рис. 1 суммированы результаты исследования влияния концентрации желатина в водозапирающем

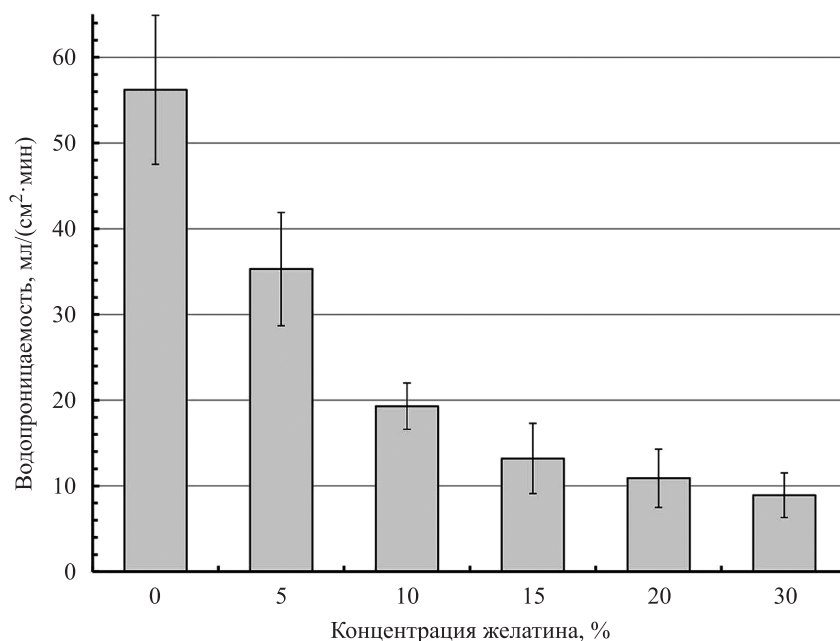


Рис. 1. Влияние концентрации желатина в водозапирающем слое на водопроницаемость трехслойного ПТК диаметром 2 мм. Внутренний и внешний слои – 0,2 мл раствора ПКЛ, средний водозапирающий слой – 0,5 мл раствора ПКЛЖ

Fig. 1. Effect of gelatin levels in the sealing coat/layer on the water permeability of a 2 mm diameter three-layer PTS. Inner and outer layers are made from 0.2 mL of PCL, the middle sealing coat/layer is made from 0.5 mL of PCL-gelatin solution

слое на водопроницаемость трехслойного ПТК диаметром 2 мм.

С ростом концентрации желатина наблюдается падение водопроницаемости, достигающее значений менее 10 мл/(см²·мин) при 30% концентрации белка. Попытки повышения концентрации желатина выше 30% привели к скачкообразному повышению риска расслаивания многослойной конструкции при контакте с водой. В результате концентрация желатина, равная 30% (по массе относительно ПКЛ), была выбрана в качестве оптимальной для формирования водозапирающего слоя.

Обе поверхности трехслойных ПТК демонстрируют высокопористую структуру, сформированную волокнами, диаметром несколько микрометров, с порами, достаточно большими, чтобы обеспечить миграцию клеток в объем матрикса (рис. 2).

В таблице приведены результаты измерения физико-механических характеристик трехслойных ПТК малого диаметра с нанесенным биоактивным покрытием.

Трехслойные ПТК обладают физико-механическими характеристиками, схожими с механическими свойствами кровеносных сосудов аналогичного диаметра.

В испытании на цитотоксичность трехслойный ПТК с нанесенным биоактивным покрытием показал уровень «0» – цитотоксичность отсутствует.

На рис. 3 приведены фотографии культуры ЭК человека линии EA.hy926 через 24 и 168 ч после посева на поверхности культурального пластика (КП) и внутренней поверхности ПТК без модифицирующего покрытия, модифицированных только гепарином (ПТК–Гп), а также биоактивным покрытием из Гп и

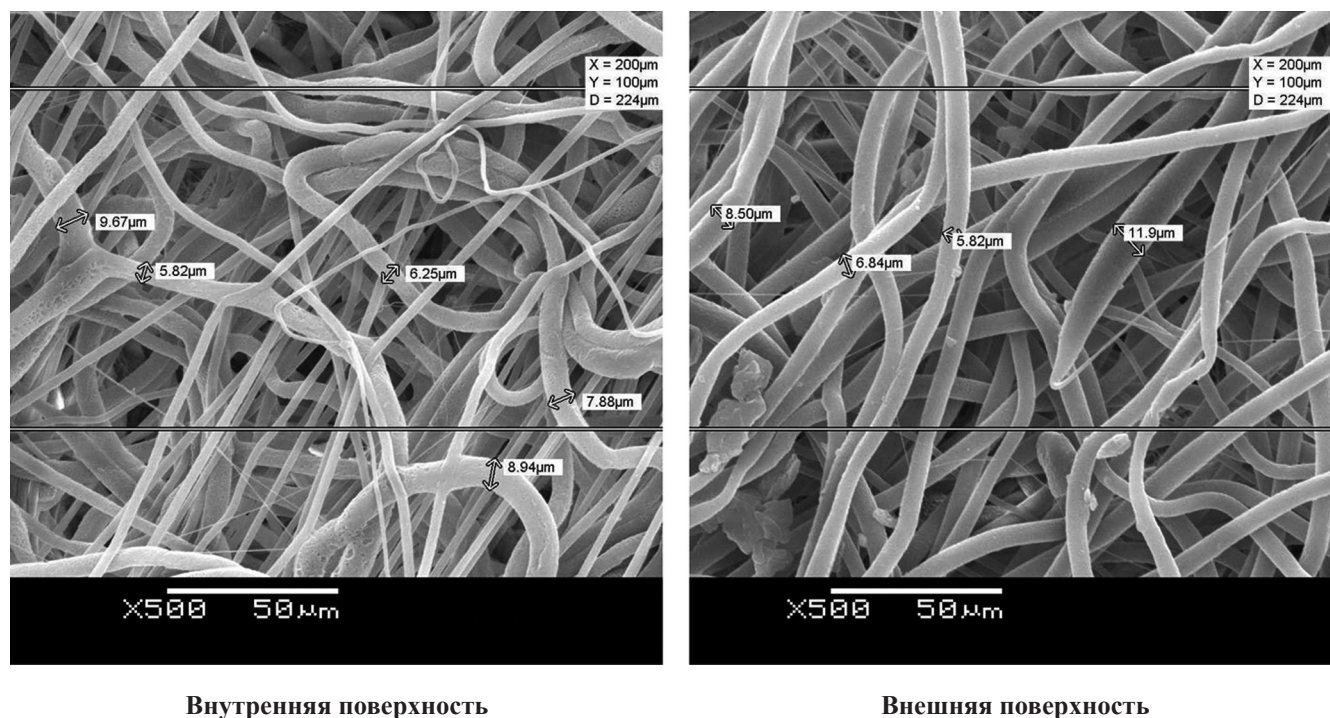


Рис. 2. Микроструктура поверхности трехслойного ПТК. Внутренний и внешний слой – 0,2 мл раствора ПКЛ, средний водозапирающий слой – 0,5 мл раствора ПКЛЖ

Fig 2. Surface microstructure of a three-layer PTS. Inner and outer layers are made from 0.2 mL of PCL, the middle sealing coat/layer is from 0.5 mL of PCL-gelatin solution

Таблица

Физико-механические характеристики трехслойных каркасов
Physicomechanical characteristics of three-layer scaffolds

	Модуль Юнга, МПа	Усилие до разрыва, Н	Удлинение до разрыва, %
ПТК, диаметр 2 мм	6,6 ± 0,3	12,6 ± 3,2	412 ± 30
Аорта крысы, диаметр 2 мм	8,5 ± 2,2	2,0 ± 0,3	93 ± 16

ЛТ (ПТК–ЛТ). Поверхность КП использовали для контроля морфологии и адекватного роста исследуемых культур клеток.

Через 24 ч после посева на внутренней поверхности образцов ПТК–ЛТ наблюдается наибольшее

количество адгезированных и распластанных ЭК по сравнению с образцами из немодифицированного ПКЛ и ПТК–Гп, где количество адгезированных эндотелиальных клеток значительно ниже. Стоит отметить, что на внутренней поверхности немодифици-

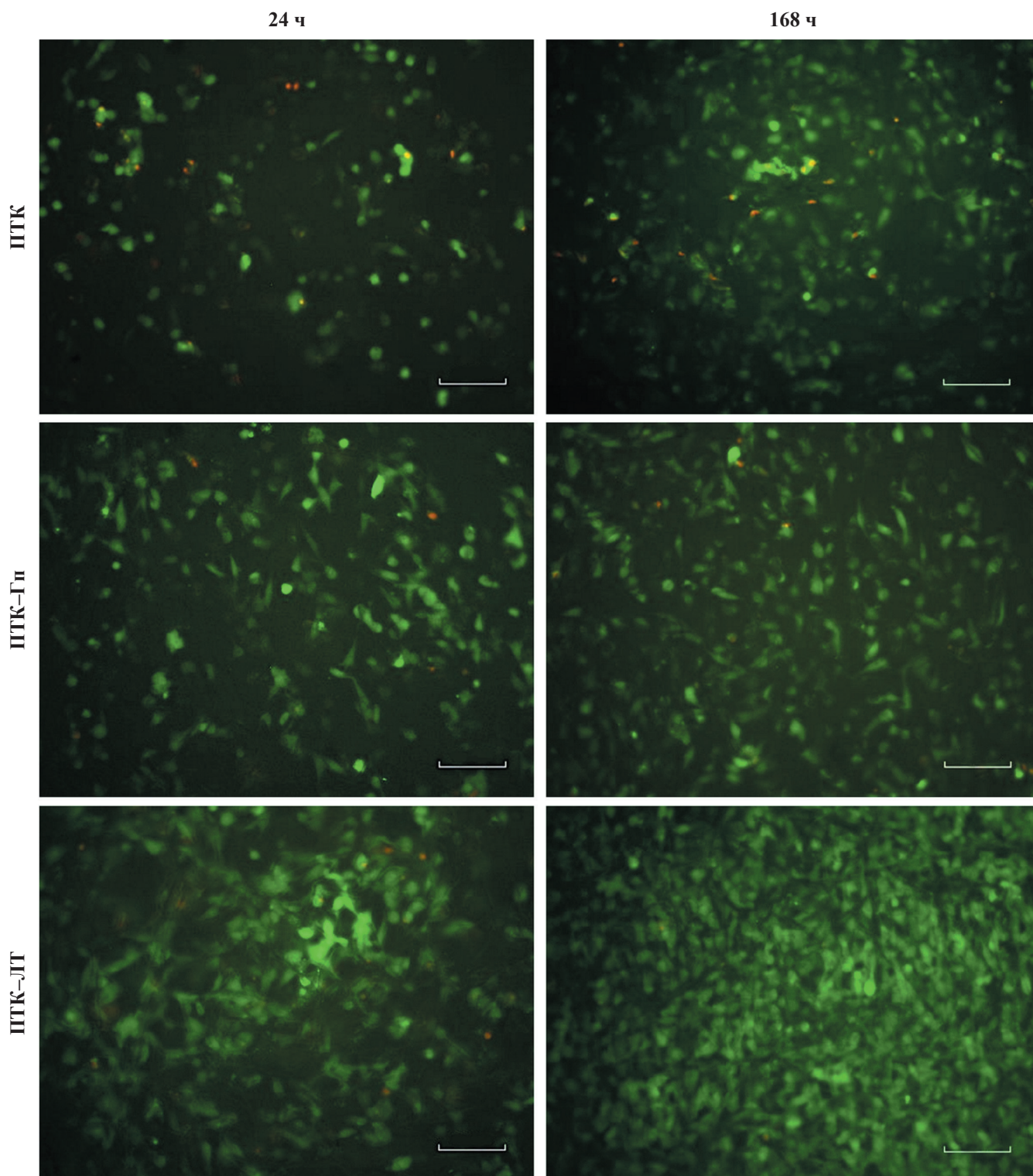


Рис. 3. Рост ЭК на внутренней поверхности ПТК. Плотность посева 5×10^4 кл/см². Окрашивание Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit. $\times 20$. Бар 100 мкм

Fig. 3. Endothelial cell growth on the inner surface of PTS. Seeding density of 5×10^4 cells/cm². Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit staining. $\times 20$. Scale bar: 100 μ m

рованного ПТК наблюдается большое количество не распластанных и мертвых клеток, что, по-видимому, связано с гидрофобной природой ПКЛ [13, 25, 26]. Через 168 ч культивирования на поверхности КП и на образце ПТК–ЛТ формируется монослой ЭК, в то время как на поверхности гепаринизированного образца и немодифицированного контроля наблюдается отсутствие пролиферации и значительное количество нежизнеспособных клеток, а образования монослоя ЭК не происходит. Заметим, что, несмотря на гидрофилизацию поверхности ПТК из ПКЛ, в условиях данного эксперимента модифицирование гепарином не способствует эндотелизации каркаса *in vitro*.

На рис. 4 представлены результаты количественного исследования пролиферации ЭК на внутренней поверхности исходного и модифицированных ПТК.

Через 24 ч количество ЭК на внутренней поверхности исходных, модифицированных каркасов отличается незначительно ($10,1 \pm 1,3 \times 10^3$; $13,2 \pm 1,4 \times 10^3$ и $16,7 \pm 1,1 \times 10^3$ кл. для ПКЛ, ПКЛ–Гп и ПКЛ–ЛТ соответственно). Через 96 ч культивирования количество клеток на каждом варианте каркаса равномерно увеличивается примерно в 2 раза. К концу срока ПКЛ–ЛТ увеличивается в 3,6 раза (до $60,4 \pm 1,8 \times 10^3$ кл.), в то время как количество ЭК на внешней поверхности исходных и ПКЛ–Гп увеличивается в 2,9 раза (до $29,1 \pm 1,9 \times 10^3$ и $32,0 \pm 1,4 \times 10^3$ кл. соответственно). Разница в количестве клеток на внутренней поверхности немодифицированного ПКЛ и ПКЛ–Гп незначительна, несмотря на гидро-

филизацию поверхности вследствие иммобилизации гепарина.

Таким образом, присутствие ЛТ в модифицирующем покрытии в условиях проведенного эксперимента *in vitro* является ключевым фактором, способствующим адгезии, распластыванию и стимулирующим пролиферацию эндотелиальных клеток линии EA.hy926 на внутренней поверхности каркасов, повышая их матриксные свойства.

Исследование *in vivo* функциональных свойств сосудистых протезов малого диаметра производили протезированием инфраренального отдела брюшной аорты крысы трехслойными ПТК с внутренним диаметром 2 мм, длиной 10 мм.

Была осуществлена коррекция методики имплантации. Первоначально после пережатия осуществляли поперечное пересечение артерии и 6–8 узловыми швами формировали прямые анастомозы с ПТК. С целью минимизации кровопотери и сужения области анастомозов было опробовано формирование косых срезов проксимального и дистального концов аорты с формированием анастомозов непрерывным обвивным швом. В результате удалось добиться оптимизации гемостаза и сохранения оптимального диаметра анастомоза.

Для подтверждения проходимости ПТК на ранних сроках после имплантации выполняли доплерографическое исследование (рис. 5).

На рис. 6 представлены результаты доплерографического исследования имплантированных ПТК.

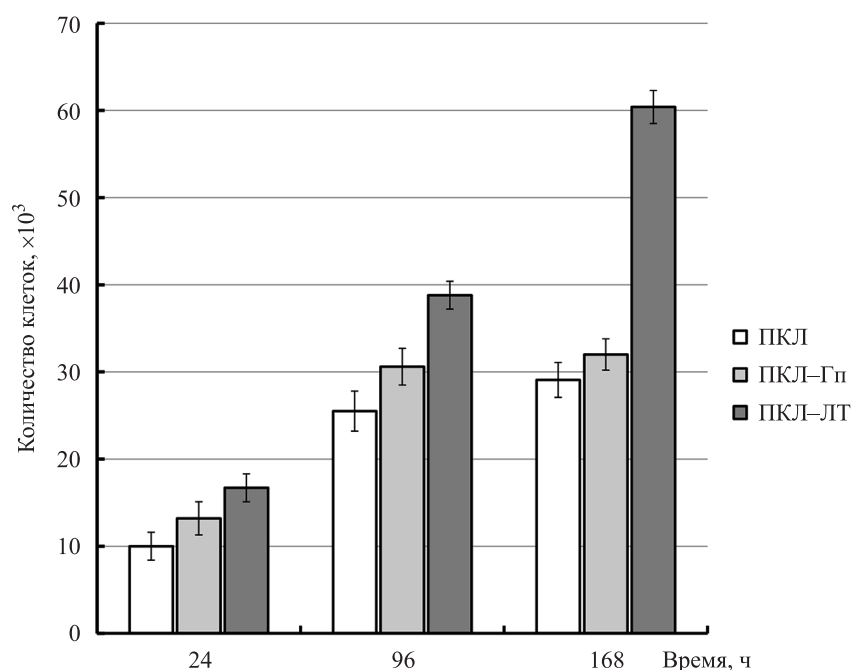
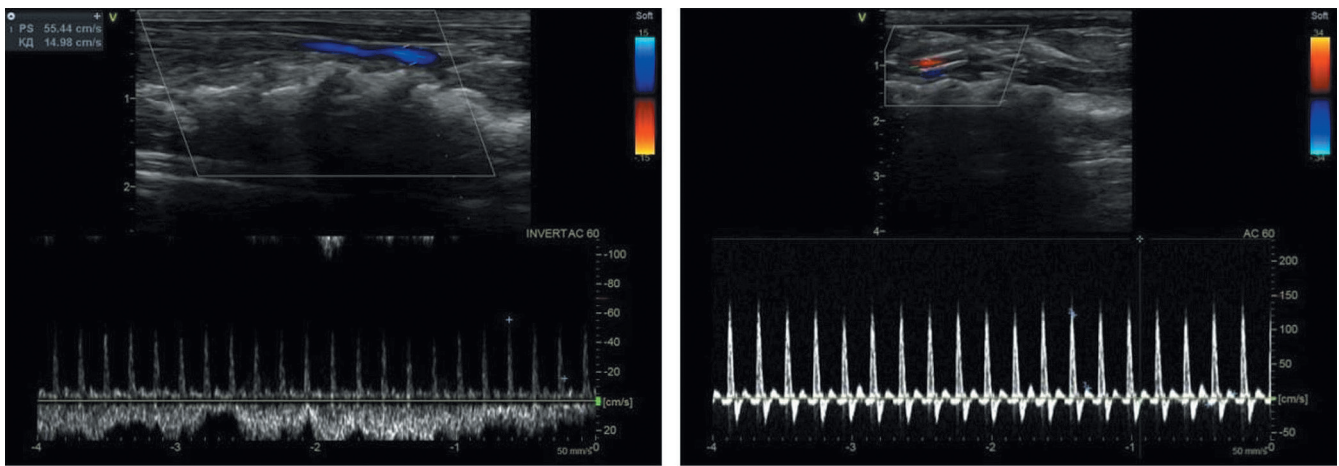


Рис. 4. Пролиферация ЭК на внутренней поверхности ПТК. Плотность посева 5×10^4 кл/см²

Fig. 4. Endothelial cell proliferation in the inner surface of PTS. Seeding density 5×10^4 cells/cm²



Неоперированная крыса (контроль)

ПТК, 4 недели после имплантации

Рис. 5. Допплерографическое исследование имплантированного ПТК с покрытием через 4 недели после имплантации (типичное измерение)

Fig. 5. Doppler ultrasound of implanted coated PTS 4 weeks after implantation (typical measurement)

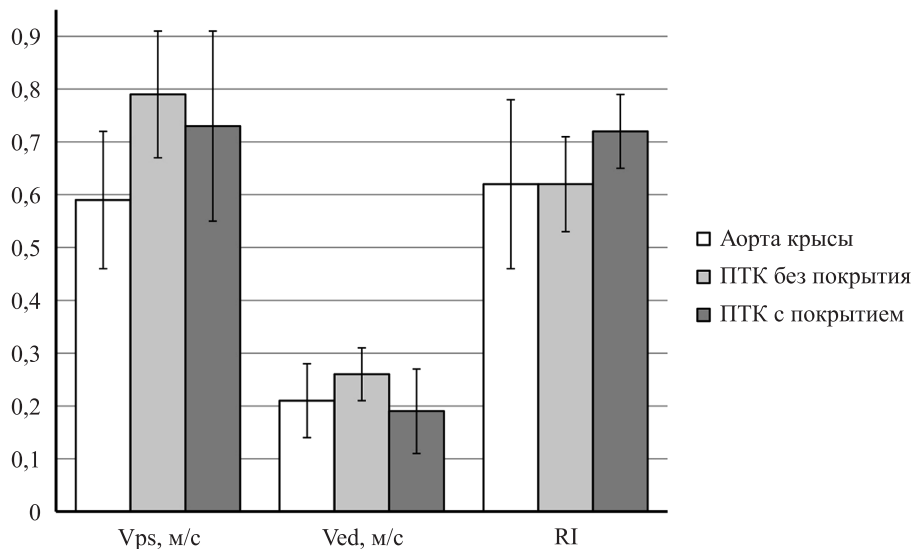


Рис. 6. Максимальная систолическая скорость (Vps), диастолическая скорость (Ved) и индекс резистивности (RI) через 4 недели после имплантации ПТК (n = 6)

Fig. 6. Peak systolic velocity (Vps), diastolic velocity (Ved) and resistive index (RI) 4 weeks after PTS implantation (n = 6)

Имплантированные модифицированные и немодифицированные ПТК продемонстрировали близкие параметры кровотока, не отличающиеся от показателей, полученных для аорты крысы.

В дальнейшем планируется продолжить исследования *in vivo* на срок до 1 года с подробным изучением процесса образования неоинтимы с привлечением гистологических методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные трехслойные конструкции ПТК из ПКЛ с водозапирающим слоем из ПКЛЖ имеют

низкую ХП и демонстрируют физико-механические свойства, близкие к нативным кровеносным сосудам.

Нанесение биологически активного покрытия на основе Гп и ЛТ позволяет улучшить *in vitro* взаимодействие ПТК с ЭК.

При имплантации в аорту экспериментального животного ПТК продемонстрировали отсутствие раннего тромбоза, при этом параметры кровотока были близки к показателям аорты крысы.

Таким образом, трехслойный ПТК с биоактивным покрытием может быть предложен для использования в качестве каркаса для формирования *in situ* тка-

неинженерных конструкций кровеносных сосудов малого диаметра.

Авторы выражают благодарность В.А. Сургученко за участие в экспериментах с клеточными культурами, а также В.А. Рыжиковой за помощь в проведении доплерографических исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Das D, Noh I. Overviews of Biomimetic Medical Materials. *Adv Exp Med Biol*. 2018; 1064: 3–24. doi: 10.1007/978-981-13-0445-3_1.
2. Weekes A, Bartnikowski N, Pinto N, Jenkins J, Meiner C, Klein TJ. Biofabrication of small diameter tissue-engineered vascular grafts. *Acta Biomater*. 2022 Jan 15; 138: 92–111. doi: 10.1016/j.actbio.2021.11.012.
3. Wesolowski SA, Fries CC, Karlson KE, De Baey M, Sawyer PN. Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. *Surgery*. 1961; 50: 91–96.
4. Лебедев ЛВ, Плотник ЛЛ, Смирнов АД. Протезы кровеносных сосудов. Л.: Медицина, 1981; 192. Lebedev LV, Plotnik LL, Smirnov AD. Protezy krovenosnykh sosudov. L.: Meditsina, 1981; 192.
5. Guan G, Yu C, Fang X, Guidoin R, King MW, Wang H, Wang L. Exploration into practical significance of integral water permeability of textile vascular grafts. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2021; 22808000211014007. doi: 10.1177/22808000211014007.
6. Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafroschi F, Mantovani D. Collagen-Based Tissue Engineering Strategies for Vascular Medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7: 166. doi: 10.3389/fbioe.2019.00166.
7. Fortin W, Bouchet M, Therasse E, Maire M, Héon H, Ajji A et al. Negative In Vivo Results Despite Promising In Vitro Data With a Coated Compliant Electrospun Polyurethane Vascular Graft. *J Surg Res*. 2022; 279: 491–504. doi: 10.1016/j.jss.2022.05.032.
8. Huang F, Sun L, Zheng J. In vitro and in vivo characterization of a silk fibroin-coated polyester vascular prosthesis. *Artif Organs*. 2008; 12: 932–941. doi: 10.1111/j.1525-1594.2008.00655.x.
9. Lee JH, Kim WG, Kim SS, Lee JH, Lee HB. Development and characterization of an alginate-impregnated polyester vascular graft. *J Biomed Mater Res*. 1997; 36: 200–208. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199708)36:2<200::aid-jbm8>3.0.co;2-o.
10. Lisan A, Butruk B, Wasiak I, Ciach T. Dextran/Albumin hydrogel sealant for Dacron(R) vascular prosthesis. *J Biomater Appl*. 2014; 28: 1386–1396. doi: 10.1177/0885328213509676.
11. Madhavan K, Elliott WH, Bonani W, Monnet E, Tan W. Mechanical and biocompatible characterizations of a readily available multilayer vascular graft. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013; 101: 506–519. doi: 10.1002/jbm.b.32851.
12. Немец ЕА, Панкина АП, Сургученко ВА, Севастьянов ВИ. Биостабильность и цитотоксичность медцинских изделий на основе сшитых биополимеров. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2018; 20 (1): 79–85. Nemets EA, Pankina AP, Surguchenko VA, Sevastianov VI. Bistability and cytotoxicity of medical devices based on cross-linked biopolymers. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2018; 20 (1): 79–85. (In Russ.). doi: 10.15825/1995-1191-2018-1-79-85.
13. Глушкова ТВ, Овчаренко ЕА, Рогулина НВ, Клышников КЮ, Кудрявцева ЮА, Барбараи ЛС. Дисфункции эпоксиобработанных биопротезов клапанов сердца. *Кардиология*. 2019; 59 (10): 49–59. Glushkova TV, Ovcharenko EA, Rogulina NV, Klyshnikov KYu, Kudryavtseva YuA, Barbarash LS. Dysfunction Patterns of Epoxy-Treated Tissue Heart Valves. *Kardiologiya*. 2019; 59 (10): 49–59. (In Russ.). doi: 10.18087/cardio.2019.10.n327.
14. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54: 13–36. doi: 10.1016/s0169-409x(01)00240-x.
15. Новикова СП, Салохеидинова РР, Лосева СВ, Николашина ЛН, Левкина АЮ. Анализ физико-механических и структурных характеристик протезов кровеносных сосудов. *Грудная и сердечно-сосудистая хирургия*. 2012; 54 (4): 27–33. Novikova SP, Salokheidinova RR, Loseva SV, Nikolashina LN, Levkina AYU. Analysis of physico-mechanical and structural characteristics of vascular prostheses. *Grudnaya i serdechno-sosudistaya khirurgiya*. 2012; 54 (4): 27–33.
16. Попова ИВ, Степанова АО, Сергеевичев ДС, Акулов АЕ, Захарова ИС, Покушалов АА и др. Сравнительное исследование трех типов протезов, изготовленных методом электроспиннинга, в эксперименте in vitro и in vivo. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2015; 19 (4): 63–71. Popova IV, Stepanova AO, Sergeevichev DS, Akulov AE, Zakharova IS, Pokushalov AA et al. Comparative study of three vascular grafts produced by electrospinning in vitro and in vivo. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya*. 2015; 19 (4): 63–71.
17. Chen X, Yao Y, Liu S, Hu Q. An integrated strategy for designing and fabricating triple-layer vascular graft with oriented microgrooves to promote endothelialization. *J Biomater Appl*. 2021; 36: 297–310. doi: 10.1177/08853282211001006.
18. Huang R, Gao X, Wang J, Chen H, Tong C, Tan Y, Tan Z. Triple-Layer Vascular Grafts Fabricated by Combined E-Jet 3D Printing and Electrospinning. *Ann Biomed Eng*. 2018; 46 (9): 1254–1266. doi: 10.1007/s10439-018-2065-z.
19. Liu K, Wang N, Wang W, Shi L, Li H, Guo F et al. A bio-inspired high strength three-layer nanofiber vascular graft with structure guided cell growth. *J Mater Chem B*. 2017; 5 (20): 3758–3764. doi: 10.1039/c7tb00465f.

20. Nemets EA, Surguchenko VA, Belov VYu, Xajrullina AI, Sevastyanov VI. Porous Tubular Scaffolds for Tissue Engineering Structures of Small Diameter Blood Vessels. *Inorganic Materials: Applied Research*. 2023; 14: 400–407. doi: 10.1134/S2075113323020338.
21. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследование на цитотоксичность: методы *in vitro*: ГОСТ ISO 10993-5-2023. М.: Российский институт стандартизации, 2023. Izdeliya meditsinskie. Otsenka biologicheskogo deystviya meditsinskikh izdeliy. Chast' 5. Issledovanie na tsitotoksichnost': metody *in vitro*: GOST ISO 10993-5-2023. М.: Rossiyskiy institut standartizatsii, 2023.
22. Blache U, Guerrero J, Güven S, Klar AS, Scherberich A. Microvascular networks and models: *in vitro* formation. W. Holnthoner, A. Banfi, J. Kirkpatrick, H. Redl eds. Vascularization for tissue engineering and regenerative medicine. Reference series in biomedical engineering. Springer, Cham. 2021: 345–383. doi: 10.1007/978-3-319-54586-8.
23. Григорьев АМ, Басок ЮБ, Кириллова АД, Сургученко ВА, Шмерко НП, Кулакова ВК и др. Криогенно-структурированный гидрогель на основе желатина как резорбируемая макропористая матрица для биомедицинских технологий. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2022; 24 (2): 83–93. Grigoriev AM, Basok YuB, Kirillova AD, Surguchenko VA, Shmerko NP, Kulakova VK et al. Cryogenically structured gelatin-based hydrogel as a resorbable macroporous matrix for biomedical technologies. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2022; 24 (2): 83–93. doi: 10.15825/1995-1191-2022-2-83-93.
24. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 2012; 12: 12347–12360. doi: 10.3390/s120912347.
25. Wang Z, Liu S, Guidoin R, Kodama M. Polyurethane vascular grafts with thorough porosity: does an internal or an external membrane wrapping improve their *in vivo* blood compatibility and biofunctionality? *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2004; 32 (3): 463–484. doi: 10.1081/bio-200027524.
26. Tara S, Kurobe H, Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Yi T et al. Well-organized neointima of large-pore poly(L-lactic acid) vascular graft coated with poly(L-lactic-co-ε-caprolactone) prevents calcific deposition compared to small-pore electrospun poly(L-lactic acid) graft in a mouse aortic implantation model. *Atherosclerosis*. 2014; 237 (2): 684–691. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.030.

Статья поступила в редакцию 29.03.2024 г.

The article was submitted to the journal on 29.03.2024



ПАМЯТИ БОРИСА ВАСИЛЬЕВИЧА ФАДИНА

23 апреля 2024 года на 72-м году ушел из жизни заведующий отделением сосудистой хирургии Свердловской областной клинической больницы № 1 Борис Васильевич Фадин.

После окончания в 1976 году Свердловского государственного медицинского института Борис Васильевич связал всю свою дальнейшую жизнь со Свердловской областной клинической больницей № 1. За годы работы Борис Васильевич внес колоссальный вклад в развитие медицины и оказание высокотехнологичной помощи пациентам. При его непосредственном участии проводились первые на Урале реконструктивные операции на аорте и магистральных артериях. В отделении, которое он возглавлял с апреля 1998 года, накоплен самый богатый в Свердловской области опыт хирургии и реконструкций брюшной аорты и ее ветвей.

В 2006 году он защитил докторскую диссертацию по малоинвазивной хирургии аорты.

Борис Васильевич – один из тех, кто стоял у истоков развития органного донорства и трансплантации солидных органов на Урале. В 1990 году он выполнил первую на Урале успешную пересадку почки. В 1995 году Борис Васильевич разработал программу развития трансплантационных технологий в Свердловской области. В 1996 году он стажировался в Питтсбургском Институте трансплантологии Томаса Старзла, одного из основоположников трансплантологии, где принял участие более чем в ста операциях по трансплантации, перенимая опыт коллектива института.

В 2004 году при непосредственном участии Бориса Васильевича была успешно выполнена первая пересадка печени на Урале, а в 2006 году – пересадка сердца.

Вклад в науку Бориса Васильевича Фадина отмечен государственными, ведомственными и общественными наградами. Отличник здравоохранения и заслуженный врач РФ, автор множества научных работ, профессионал высочайшего уровня, ответственный руководитель, мудрый наставник, он стал локомотивом развития трансплантологической помощи в Свердловской области, внедряя новейшие методы и уникальные для региона технологии и операции.

Посвятив всю свою жизнь служению пациентам, Борис Васильевич заслужил всеобщее уважение. Помимо этого, он был еще и удивительно сердечным человеком, обладал потрясающей проницаемостью и умением ладить с людьми, неиссякаемой энергией и редким чувством юмора.

Светлая память о Борисе Васильевиче Фадине навсегда сохранится в сердцах коллег, учеников, друзей и близких.

Все трансплантологическое сообщество России и редколлегия журнала «Вестник трансплантологии и искусственных органов» с главным редактором академиком С.В. Готье разделяют горечь невозможной утраты и выражают глубокие соболезнования родным и близким Бориса Васильевича Фадина.

ТРЕБОВАНИЯ К ПУБЛИКАЦИЯМ

Статьи должны содержать оригинальные данные, нигде ранее не опубликованные и не направленные на публикацию в другие редакции. Плата за публикацию рукописей не взимается.

Текстовый материал должен быть представлен в формате Microsoft Word (*.doc, *.docx), шрифт Times New Roman, 12 pt через 1,5 интервала, в электронную редакцию на сайте журнала.

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 при регистрации для получения ORCID, или Open Researcher and Contributor ID (с англ. – «Открытый идентификатор исследователя и участника») – незапатентованного буквенно-цифрового кода, который однозначно идентифицирует научных авторов, 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

Изменения показателей эластичности стенки общей сонной артерии у реципиентов солидных органов

А.О. Шевченко¹⁻³, И.Ю. Тюняева¹, М.М. Лысенко¹, Н.Н. Колоскова¹, Д.А. Сайдулаев¹, С.И. Зубенко¹, Е.А. Вакурова², С.О. Шарапченко¹

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

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

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

Для корреспонденции:

Шарапченко Софья Олеговна

Адрес:

Телефон:

E-mail:

Changes in common carotid artery elasticity in solid organ recipients

A.O. Shevchenko¹⁻³, I.Yu. Tyunyaeva¹, M.M. Lysenko¹, N.N. Koloskova¹, D.A. Saydulaev¹, S.I. Zubenko¹, E.A. Vakurova², S.O. Sharapchenko¹

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

² Sechenov University, Moscow, Russian Federation

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Corresponding author:

Sofya Sharapchenko

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 использова-

ние 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. 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.

5. Список литературы / References

Автор несет полную ответственность за точность данных, приведенных в пристатейном списке литературы. В списке литературы ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

ИНФОРМАЦИЯ

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, Цирульников ОМ. Трансплантация печени. М.: МИА (2008), 246 с. Gautier SV, Konstantinov BA, Tsi-rulnikova OM. Transplantatsiya pecheni. M.: MIA (2008), 246.
6. *Диссертация (автореферат диссертации)*
Орлова ОВ. Роль маркеров воспаления, тромбоза, неоангиогенеза и апоптоза в прогнозировании васкулопатии сердечного трансплантата: дис. ... докт. мед. наук. М., 2009, 84 с. Orlova OV. Rol' markerov vospaleniya, tromboza, neoangiogeneza i apoptoza v prognozirovanii vaskulopatii serdechnogo transplantata. [Dissertation]. M., 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 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 форматах JPEG или TIFF (*.jpg или *.tiff) с разрешением не менее 300 dpi, 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 и текст таблиц, иллюстраций и рисунков, а также объяснения к ним должны быть представлены на русском и английском языках.

Конфликт интересов

Конфликт интересов – это условия, при которых у авторов возникают вступающие в конфликт или конкурирующие интересы, способные повлиять на принятие редакторского решения. Конфликты интересов могут быть потенциальными или осознанными, а также реально существующими. На объективность могут повлиять личные, политические, финансовые, научные или религиозные факторы.

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».

Авторские права

Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются со следующим:

1. Авторы сохраняют за собой авторские права на работу и предоставляют журналу право первой публикации работы на условиях лицензии Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.
2. Авторы сохраняют право заключать отдельные контрактные договоренности, касающиеся не-эксклюзивного распространения версии работы в опубликованном здесь виде (например, размещение ее в институтском хранилище, публикацию в книге), со ссылкой на ее оригинальную публикацию в этом журнале.
3. Авторы имеют право размещать свою работу в сети Интернет (например в институтском хранилище или персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

Статьи направлять в электронную редакцию через сайт журнала
«Вестник трансплантологии и искусственных органов»
<https://journal.transpl.ru/vtio>
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.
- Author names (list the author's initials before listing his or her last name as when registering for ORCID, or Open Researcher and Contributor ID – a non-proprietary alphanumeric code that uniquely identifies scientific authors).
- 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, con-

venient 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 Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs website:
<https://journal.transpl.ru/vtio>
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

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: voselena35@mail.ru*

Консультации организованы в отделе подготовки научных и медицинских кадров (Щукинская, 1, старый корпус, 3-й этаж, к. ф. н. Мироненко Елена Станиславовна).

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 18.06.24.

Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «Триада».

ИД № 06059 от 16.10.01 г.

170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 514,

тел.: +7 (915) 730-10-37, +7 (910) 647-49-85

E-mail: triadatver@yandex.ru

<http://www.triada.tver.ru>

Заказ ____