

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ СКОРОЙ ПОМОЩИ ИМ. И.И. ДЖАНЕЛИДЗЕ»

На правах рукописи

КУЗЬМИН ДЕНИС ОЛЕГОВИЧ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ
У ПОСМЕРТНЫХ ДОНОРОВ ПОЧЕК**

3.1.14. Трансплантология и искусственные органы

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

профессор, доктор медицинских наук

Резник Олег Николаевич

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Актуальность проблемы дефицита донорских органов	13
1.2 Патолофизиологические аспекты смерти мозга, влияющие на исход трансплантации	16
1.2.1 Гемодинамические нарушения	16
1.2.2 Системная воспалительная реакция	17
1.2.3 Каскад лейкоцитарной адгезии	19
1.2.4 Нейтрофилы – ключевой компонент ишемически-реперфузионного повреждения	23
1.3 Современные способы медикаментозной защиты трансплантатов	27
на доэксплантационном этапе	27
1.4 Механизм действия поликлональных антител	33
1.4.1 Элиминация Т-лимфоцитов из крови при применении Тимоглобулина	34
1.4.2 Редукция экспрессии молекул адгезии при применении Тимоглобулина.....	37
1.5 Биобанки – основа персонализированной трансплантационной медицинской помощи	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1 Характеристики донорских групп	45
2.1.1 Сравнительные характеристики доноров группы сравнения и доноров исследуемой группы	47
2.2 Характеристики групп реципиентов.....	53
2.3 Характеристики созданного в ходе исследования трансплантационного биобанка	58
2.4 Протокол и процедура выполнения биопсии трансплантатов почек. Протокол морфологического исследование биоптатов	59
2.5 Статистическая обработка данных	61

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПРИМЕНЕНИЯ	
ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ДОНОРОВ СО СМЕРТЬЮ МОЗГА	
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК	62
3.1 Эмпирический подбор дозировки поликлональных антител у доноров со смертью мозга.....	62
3.2 Оценка влияния истощающих поликлональных антител на лабораторные показатели у доноров со смертью мозга при кондиционировании в доэксплантационном периоде.....	64
3.3 Сравнение результатов лабораторных исследований у доноров исследуемой и контрольной групп.....	70
3.4 Анализ влияния протокола применения Тимоглобулина у доноров со смертью мозга на уровень нейтрофилов в системе кровообращения донора	73
ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО БИОБАНКА.....	75
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ	
ИССЛЕДОВАНИЙ.....	83
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК	89
6.1 Сравнение ранних результатов трансплантации почек.....	89
6.2 Сравнение отдалённых результатов трансплантации почек.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	101
ВЫВОДЫ	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	111
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	114

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Трансплантация является радикальным хирургическим методом лечения пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности. Пересадка почки представляет собой преимущественный метод лечения и обеспечивает лучшую выживаемость по сравнению с долгосрочным диализным лечением, а также предпочтительнее с точки зрения качества жизни реципиента [142]. По мнению некоторых авторов, трансплантация почки – единственный шанс больного с терминальной стадией поражения почек вернуться к полноценной жизни [17].

Традиционно основным источником донорских органов являются доноры с установленным диагнозом смерти головного мозга, органы которых считаются идеальными [111]. Однако растущий дефицит донорских органов послужил причиной использования для пересадки трансплантатов, полученных от доноров с расширенными критериями [11, 78]. Данную категорию доноров раньше можно было расценивать как дополнительный ресурс трансплантации, однако на сегодняшний день он становится основным [55]. Согласно мнению большинства авторов для пересадки почек от доноров с расширенными критериями характерно развитие более выраженного ишемически-реперфузионного повреждения [101]. Оно вызвано нестабильностью гемодинамики у доноров с расширенными критериями и, как следствие, в таких почках развивается сложный комплекс событий, который характеризуется более тяжёлым течением острой почечной недостаточности трансплантата, обусловленной острым канальцевым некрозом и более выраженной частотой кризов отторжения [100].

Учитывая эти обстоятельства, отсроченная функция трансплантата является самым распространенным клиническим феноменом после трансплантации почек от доноров со смертью мозга [79]. Отсроченная функция относится к острому повреждению почек, которое требует проведения сеансов гемодиализа реципиенту в первые 7 суток и более после трансплантации. По данным

литературы отсроченная функция трансплантата ассоциируется с более высокой частотой отторжений и худшими краткосрочными и долгосрочными результатами, в связи с чем актуальность данной проблемы чрезвычайно высока [41].

Необходимо отметить, что фактором риска развития отсроченной функции и главной её причиной является ишемически-реперфузионное повреждение почек ещё на доэксплантационном этапе в организме посмертного донора. Механизм развития последствий данного повреждения включает в себя участие лейкоцитов и высвобождение медиаторов воспаления через эндотелиальные клетки, повышающие уровень молекул клеточной адгезии [147]. Таким образом, ишемически-реперфузионное повреждение трансплантата почки способствует увеличению продолжительности пребывания пациента в стационаре и уменьшению выживаемости трансплантата [86].

При существующем дефиците донорских органов и всё более широком использовании субоптимальных трансплантатов, особое значение получают попытки выработки стратегий, направленных на минимизацию ишемически-реперфузионного повреждения.

В связи с вышеизложенным создание новых методов лечения и инструментов для эффективной борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением и предотвращения отсроченной функции трансплантата остается нерешённой проблемой. В этом отношении разработка и внедрение способа терапевтической коррекции лейкоцитарной агрессии у посмертного донора с применением средств элиминации лейкоцитов до проведения эксплантации может являться многообещающей перспективой.

Предупреждение последствий ишемически-реперфузионного повреждения почек у доноров со смертью мозга – наиболее обсуждаемая проблема в современной трансплантологии [84, 88, 113]. Процессы восстановления происходят одновременно с клеточным апоптозом и некрозом в ткани почек, а судьба пересаженного органа зависит от того, что в этом случае преобладает – гибель клеток или регенерация [124]. Современными авторами этот сложный

процесс и был описан как ишемия-реперфузия [86]. В своём исследовании Peters-Sengers H. et al. (2019) подчёркивают, что ишемия-реперфузия оказывает глубокое влияние не только на раннюю, но и на позднюю функцию пересаженной почки [75]. В соответствии с этим, профилактика последствий ишемически-реперфузионного повреждения почек должна происходить до трансплантации путем предварительного воздействия ещё в организме донора со смертью мозга [84].

В национальных клинических рекомендациях «Посмертное донорство органов» введён термин «кондиционирование донора», обозначающий процесс коррекции показателей гомеостаза донора со смертью мозга с целью сохранения органов для трансплантации [7]. Основным подходом в улучшении результатов трансплантации является гемодинамическая коррекция, коррекция гиповолемии, контроль гликемии и температуры тела, применение глюкокортикостероидных гормонов, использование определённых параметров искусственной вентиляции у посмертного донора [7].

В целом же, важнейший донорский этап, от которого напрямую зависит результат пересадки органов, представлен арсеналом терапевтических опций, направленных на поддержание перфузии и оксигенации органов и тканей, которые, однако, все ещё остаются компромиссом между желательным эффектом и клинической реальностью. Поиск путей решения клинических проблем, вызванных лейкоцитарной агрессией в организме донора со смертью мозга на доэксплантационном этапе, предупреждение последствий ишемически-реперфузионного повреждения, как основной причины отсроченной функции трансплантатов почек, определили дизайн настоящего исследования.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Улучшение результатов трансплантаций почек за счёт применения поликлональных антител у посмертных доноров.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработать протокол применения поликлональных антител для элиминации лейкоцитов из системы кровообращения у доноров органов с установленной смертью мозга.
2. Обосновать целесообразность создания в структуре подразделений пересадки органов трансплантационных биобанков для ретроспективной верификации результатов применения разработанного протокола.
3. Провести сравнительный анализ результатов иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантатов почек, полученных от посмертных доноров с применением поликлональных антител и без таковых, используя клинические и морфологические данные коллекции биобанка.
4. Провести сравнительный анализ течения послеоперационного периода у реципиентов почек, полученных от посмертных доноров с применением поликлональных антител и без таковых.
5. Оценить пятилетние результаты пересадки почек, полученных от посмертных доноров с применением поликлональных антител и без таковых.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Предложен новый протокол медикаментозной коррекции ишемически-реперфузионного повреждения почек, полученных от доноров со смертью мозга.

Впервые показано, что в результате применения поликлональных антител происходит элиминация лейкоцитов из системы кровообращения у доноров со смертью мозга и снижение уровня экспрессии молекул клеточной адгезии эпителия на эндотелии сосудов трансплантатов почек.

Обоснована целесообразность создания биобанков в отделениях трансплантации, как средства накопления, хранения и предоставления материала и данных для ретро- и проспективной оценки результатов пересадок почек.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Доказана эффективность применения иммуносупрессивных препаратов у доноров со смертью мозга после прохождения апноэтического теста на предэксплантационном этапе для улучшения ранних и отдаленных результатов пересадки почки.

Впервые созданный в процессе исследования трансплантационный биобанк демонстрирует целесообразность формирования криобиотических коллекций в отделениях трансплантации на региональном и федеральном уровнях для возможности ретро- и проспективной оценки трансплантированных органов и результатов лечения реципиентов.

Результаты исследования показывают необходимость продолжения научного поиска в области применения антител у посмертных доноров со смертью мозга и сотрудничества с фармкомпаниями в области создания отечественных поликлональных антител на основании коллекций трансплантационных биобанков.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включены клинические данные доноров со смертью мозга и реципиентов почек, полученных от этих доноров, данные общих клинических анализов крови, биохимических анализов крови, данных определения уровня NGAL в моче у доноров, морфологических исследований нефробиоптатов.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. Применение поликлональных антител на предэксплантационном этапе является эффективным способом элиминации лейкоцитов из системы кровообращения у доноров с установленной смертью мозга.

2. Создание трансплантационного биобанка в учреждении, выполняющем пересадки органов, является целесообразным для ретро- и проспективной оценки результатов лечения и оценки патофизиологических механизмов и процессов у посмертных доноров.
3. Использование предложенного протокола применения поликлональных антител у доноров со смертью мозга приводит к лучшим результатам пересадок почек, чем при трансплантации от посмертных доноров без такового, что подтверждается увеличением числа случаев немедленной функции трансплантатов почек, более низкой концентрацией креатинина сыворотки крови и лучшей пятилетней выживаемостью трансплантатов.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Достоверные статистические результаты получены с помощью сбора и анализа данных проведённых исследований (в исследование включён анализ медицинских карт 20 доноров с установленным диагнозом смерть головного мозга и анализ лечения 40 реципиентов почек, полученных от этих доноров).

Тема диссертационного исследования одобрена локальным этическим комитетом (протокол №2 от 15.03.2017 г.), утверждена на Учёном совете Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» (протокол №6 от 29.09.2022 г.), проблемной комиссией (заседание №2 от 18.10.2022 г.).

Апробация диссертации состоялась 27.06.2023 года на заседании научного отдела трансплантологии и органного донорства и межпроблемной комиссии Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» (протокол №3).

Обсуждение материалов и результатов диссертационного исследования состоялось на:

- конкурсе научно-технических проектов молодых исследователей. «У.М.Н.И.К.» ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям) – 2015 год, Санкт-Петербург;
- конкурсе лучших инновационных проектов в сфере науки и высшего образования Санкт-Петербурга Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга – 2018 год, Санкт-Петербург;
- VII Научно-практической международной конференции: «Современные биотехнологии для науки и практики» – 2020 год, Санкт-Петербург;
- конкурсе научно-исследовательских проектов «Молодые, дерзкие, перспективные» Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга – 2021 год, Санкт-Петербург;
- XXXVII Международной конференции «Горизонты современной ангиологии, сосудистой хирургии и флебологии» – 2022 год, Кисловодск;
- XX Северо-Западной нефрологической школе Российского диализного общества – 2022 год, Санкт-Петербург;
- XI Всероссийском съезде трансплантологов, 11-ой Всероссийской конференции «Научные школы и новые имена» – 2022 год, Москва.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ В ПРАКТИЧЕСКУЮ РАБОТУ

Основные положения и выводы диссертации внедрены в клиническую практику Отдела трансплантологии и органного донорства Государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» и Отдела трансплантологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Автор принимал участие в формировании цели и задач исследования, проведении анализа литературы, сборе клинических и инструментальных параметров, внесенных в базу данных. Лично автором выполнена статистическая обработка полученных результатов и осуществлен медико-статистический анализ полученных результатов.

Автор лично участвовал в оперативных вмешательствах по эксплантации почек от доноров со смертью мозга и пересадках почек реципиентам.

Автор принимал участие в разработке концепции и организации материально-технической базы трансплантационного биобанка. Автором разработан алгоритм сбора биоматериала от посмертных доноров и реципиентов почек и изготовление из него биообразцов. Автор обеспечивал накопление уникальной коллекции биообразцов, произведённых по стандартизированной методике с соответствующей маркировкой и сопутствующими клиническими данными. Автором осуществлялся контроль надлежащего хранения и использования для лабораторных и морфологических исследований биообразцов из трансплантационного биобанка.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

На основании изученных и полученных диссертантом данных опубликовано 8 научных работ, среди них 3 статьи в изданиях, индексируемых в международных базах данных, в том числе 2 статьи в изданиях включённых в Перечень рецензируемых научных изданий ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учебной степени кандидата наук.

СТРУКТУРА И ОБЪЁМ РАБОТЫ

Диссертационное исследование написано на 129 страницах машинописного текста и содержит введение, шесть глав, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений и список использованной литературы, включающий в себя 165 библиографических источников, из которых 17 отечественных и 148 зарубежных. Работа содержит 8 таблиц, 57 рисунков и 4 формулы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Актуальность проблемы дефицита донорских органов

Согласно данным современных литературных источников 10% населения мира страдает от хронической болезни почек (ХБП) [62]. Отмечается неуклонный рост распространённости ХБП в связи с увеличением численности пожилого населения, а также в связи с увеличением заболеваемости диабетом и гипертонической болезнью [151]. В 2015 году ХБП заняла 12-е место в глобальном списке причин смерти [67]. Тогда как общее количество пациентов, нуждающихся в заместительной почечной терапии во всем мире, оценивалась примерно в 4,902 млн человек [163].

По устоявшемуся мнению, пересадка почки представляет собой преимущественный метод лечения для пациентов с терминальной почечной недостаточностью и обеспечивает лучшую выживаемость по сравнению с долгосрочным диализным лечением, а также предпочтительнее с точки зрения качества и продолжительности жизни реципиента [103]. Однако, поскольку во всем мире наблюдается дефицит подходящих донорских органов, то такой метод лечения остаётся недостаточно доступным. Вместе с тем количество пересаженных почек в мире в 2021 г. составило 75664 [GODT. Global Observatory on Donation and Transplantation. 2021. <http://www.transplant-observatory.org/> Доступ 1 августа 2022]. Как отмечают в своём исследовании Kim K. D. et al. (2021) долгое время основным источником донорских органов считались доноры с установленным диагнозом смерти головного мозга, органы которых считались идеальными [128]. В связи с сохраняющимся дефицитом донорских органов во многих центрах трансплантации были созданы программы трансплантации от живых родственных доноров, кроме того, всё чаще используются для трансплантации почки от доноров с расширенными критериями (ДРК) [58]. Использование ресурса ДРК, к которым относятся все доноры старше 60 лет, или в возрасте 50 лет и более, при наличии таких сопутствующих состояний, как

артериальная гипертензия в анамнезе, уровень креатинина плазмы выше 132 мкмоль/л непосредственно перед процедурой эксплантации, сахарный диабет, избыточная масса тела (индекс массы тела > 30) [55] ведёт к высокому риску отсроченной функции трансплантата (ОФТ) [101]. На сегодняшний день данная категория доноров считается приемлемым ресурсом для трансплантации почек [130]. McMahon В. А. et al. (2018) оценивают существующие изменения в демографической картине в качестве основного фактора риска ОФТ почки. Некоторые авторы рассматривают ОФТ как основное препятствие для расширения донорского пула и улучшения результатов трансплантации [143]. По имеющимся данным, у 23–38% взрослых реципиентов почки от посмертного донора, получающих лечение гемодиализом в течение первой недели после пересадки, риск потери трансплантата увеличивается до 40% [132]. Значительная часть почек, полученных от доноров старше 50 лет или от доноров с высоким уровнем сывороточного креатинина не используется [58]. Известно, что результаты пересадок органов от ДРК уступают результатам трансплантаций органов от оптимальных доноров, тем не менее, следует отметить, что продолжительность жизни реципиентов трансплантатов от ДРК в среднем на 5 лет дольше, чем пациентов, продолжающих получать заместительную почечную терапию [32].

По мнению большинства авторов, вопрос о том, как избежать ОФТ в ходе изменения организации органного донорства путём расширения пула за счёт возрастных доноров, становится все более актуальным [55, 100, 58]. Однако снижение вероятности ОФТ является проблематичным вследствие сложной этиологии этого явления [89]. ОФТ возникает из-за сложного комплекса событий, связанных с гипоксическим и ишемическим повреждением и реперфузией после гипотермической консервации с длительным периодом восстановления, который характеризуется острой почечной недостаточностью и острым канальцевым некрозом трансплантата [123]. Современные мероприятия трансплантационной помощи сфокусированы на новых способах консервации, таких как аппаратная перфузия и применение таких схем иммуносупрессивной терапии, которые ведут

к снижению риска повреждения почек [97]. Последствия ишемически-реперфузионного повреждения почек (ИРП) наиболее значительны в трансплантатах, полученных от ДРК, поскольку все механизмы ИРП у таких доноров серьёзно усугубляют снижение функционального резерва на фоне существующих патологических изменений (возрастных и клинических), что подтверждается в работе Fernandez A. et al. (2020) и обзоре Vishwakarma V. K. et al. (2017) [85, 113]. Таким образом, ряд исследований показал, что ИРП увеличивает риск дисфункции трансплантата, способствуя уменьшению выживаемости трансплантата и росту продолжительности пребывания пациентов в стационаре [122, 147, 101].

По мнению McKeown D. W. et al. (2012) при растущем дефиците донорских органов, особое значение приобрело влияние на патофизиологические процессы, развивающиеся в организме посмертного донора, а принятие в расчёт патологических изменений в трансплантатах позволит рассматривать новые возможности воздействия на них ещё на доэксплантационном этапе [104].

Общеизвестно, что ИРП почек неизбежно в трансплантации и является одним из наиболее важных механизмов для развития отсроченной функции после трансплантации [78]. Wu W. K. et al. (2015) в своей работе отмечают, что ИРП сопровождается провоспалительным ответом и одним из долговременных эффектов является высокий риск острого отторжения трансплантата [117 40]. Кроме того, ИРП способствует к прогрессирующему интерстициальному фиброзу, что вместе с канальцевой атрофией приводит к хронической дисфункции трансплантата [33].

По данным литературы современная проблема трансплантации заключается в снижении вероятности ОФТ и улучшении долгосрочной выживаемости трансплантатов [122, 147, 101, 130]. Jahn L. et al. (2021) в своём исследовании предполагают, что крайне важно оптимизировать состояние каждого трансплантата ещё до пересадки, а также свести к минимуму возможные повреждения для достижения наилучшей функции и избежать ОФТ и острого отторжения [122].

В последнее десятилетие появилось больше информации о сложной патофизиологии ИРП, что диктует необходимость поиска новых методов медикаментозного воздействия, направленных на снижение последствий ИРП. Целью данного обзора является систематическое выделение механизмов ИРП и обсуждение потенциальных терапевтических стратегий, направленных на их редукцию.

1.2 Патофизиологические аспекты смерти мозга, влияющие на исход трансплантации

1.2.1 Гемодинамические нарушения

Согласно мнению большинства авторов, патофизиологические процессы при смерти мозга – один из важных факторов риска для успешной трансплантации органов [25, 53, 161]. Почки, полученные от донора со смертью мозга, имеют более низкие показатели выживаемости и функции, чем почки, полученные от живых доноров [107]. Главным образом смерть мозга вызывает целую картину неблагоприятных последствий, связанных с гемодинамической и гормональной неустойчивостью [72]. Вместе с тем смерть мозга является необратимым повреждением головного мозга, мозжечка и ствола мозга, непосредственно связанным с тяжёлыми гемодинамическими изменениями, коагулопатией, гипотермией и дисэлектролитемией. Гемодинамическая нестабильность потенциального донора вызвана такими факторами, как гиповолемия, сердечная недостаточность, высвобождение активных воспалительных молекул, вторичная недостаточность надпочечников, что в последующем приводит к реперфузионному повреждению, ведущему к нарушению и потере функции органом [49]. В связи с вышеизложенным, эти события приводят к структурным и функциональным изменениям в органах до их трансплантации [38].

Смерть мозга определяется как безвозвратное состояние атонической комы в сочетании с потерей рефлексов и необратимым апноэ. Наиболее часто это состояние вторично по отношению к черепно-мозговой травме или мозговому кровоизлиянию [161]. Вслед за ним происходит постепенное повышение внутричерепного давления, приводящее к ишемическим изменениям моста головного мозга, что ускоряет как вагусный, так и ответ симпатической нервной системы, приводящий к вегетативной дисрегуляции как внутри мозга, так и на периферии [131]. Повышение среднего артериального давления является частью мер поддержания перфузионного давления в головном мозге и сочетается с массивным высвобождением катехоламинов, приводящим к повышению сосудистой резистентности, которая впоследствии прекращается по мере распространения ишемии в спинной мозг, приводящей к потере симпатического сигнала и последующему сосудистому коллапсу. Сверхсильная циркуляторная реакция также ассоциируется с гипоталамической и гипофизарной дисфункцией, приводящей к дальнейшему снижению контроля гомеостаза [111]. Эти гемодинамические изменения связаны с ишемией и последующими воспалительными изменениями в почках [81], которые, как полагают, объясняются некоторыми из побочных реакций, возникающих в периферическом кровотоке, несмотря на неповрежденный гематоэнцефалический барьер [25].

Каковы же ключевые патологические механизмы, кумулятивное действие которых приводит к резкому снижению функционального резерва органов или, при наиболее неблагоприятном сценарии, необратимым изменениям, приводящим к непригодности для трансплантации?

1.2.2 Системная воспалительная реакция

Read M. A. et al. (1995) отмечают, что изменения в организме донора со смертью мозга (ДСМ) вызывают системную и трансплантат-специфическую активацию иммунитета, выражающуюся соответствующей активацией лимфоцитов, пролиферацией и экспрессией воспалительных цитокинов [144].

Провоспалительный ответ при смерти мозга носит системный характер, сопровождается мобилизацией лейкоцитов, их скоплением в жизненно важных органах, высвобождением провоспалительных медиаторов (цито- и хемокины, интерлейкины-1, -2, -6, -8, фактор некроза опухолей альфа), генерацией активных форм кислорода (АФК) и повышением проницаемости сосудистой стенки [116].

Альтернативный путь для реактивного ответа – диффузия через более проницаемый после повреждения центральной нервной системы гематоэнцефалический барьер [113]. Это периферическое воспаление характеризуется повышенной экспрессией цитокинов: интерлейкинов (IL)-2, 6 и 10, компонента С3 и С5а [141], а также отмечается инфильтрация почек как Т-клетками, так и макрофагами [162]. Кроме того, эти воспалительные факторы способны усиливать друг друга, увеличивая уровень С3, и повышая IL-6 через митоген-активируемую протеинкиназу (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) и фактор некроза опухоли (Tumour necrosis factor, TNF- α) [156, 37]. Активация механизма MAPK также приводит к экспрессии E-селектина, молекул внутриклеточной адгезии (Intracellular adhesion molecule, ICAM)-1) и молекул сосудистой адгезии (Vascular adhesion molecule, VCAM-1), что предполагает увеличение проницаемости эндотелия, обеспечивающее возможный механизм поступления лейкоцитов в паренхиму почек [159]. Следовательно, увеличение провоспалительных факторов связано с усилением иммунной реакции после трансплантации и последующим снижением почечной функции посредством как врожденного, так и клеточного иммунитета [35]. Этот воспалительный ответ также стимулирует синтез оксида азота в миоцитах, который оказывает отрицательный инотропный эффект, что в конечном счете усугубляет гемодинамические нарушения в органах и тканях. Эти провоспалительные факторы способны оказывать своё влияние во время реперфузии после трансплантации за счет активации у донора толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) [155].

Описанные изменения создают благоприятные условия для возникновения одного из основных повреждающих механизмов ИРП – каскада клеточной адгезии.

1.2.3 Каскад лейкоцитарной адгезии

В работе коллектива авторов под руководством Резника О.Н. (2013) каскад лейкоцитарной адгезии описывается следующим образом: «Феномен адгезии лейкоцитов к эндотелиальной выстилке органов имеет важное значение в физиологических компенсаторных механизмах организма. Этот механизм направлен на ограничение кровоснабжения в «неперспективных» тканях с целью сохранения жизни организма. Однако при ИРП проявляется патологический характер адгезии, что приводит к повреждению почек, которое может быть необратимым. В связи с этим, стоит обратить особое внимание на каскад адгезии лейкоцитов и возможные способы предотвращения таких патологических изменений» [11, 138].

Багненко и др. (2009) в своей статье, посвящённой реабилитации донорских органов подробно излагают своё видение механизма клеточной адгезии: «Адгезия представляет собой первый этап процесса миграции лейкоцитов из сосуда в окружающие ткани (Рисунок 1). Низкое давление крови при гипотонии, замедленный кровоток, – уменьшают так называемое «напряжение сдвига» - силу трения крови о стенки сосуда, что способствует процессу адгезии. Первая стадия адгезии заключается в выходе лейкоцита в пристеночный слой плазмы микрососуда, где происходит своеобразное «перекатывание» лейкоцита по внутренней стенке сосуда в направлении движения крови. Далее движение лейкоцитов все более замедляется. Затем лейкоциты фиксируются к стенке сосуда, после чего содержимое клетки «переливается» с помощью интегринов, разновидности молекул рецепторов CD11b/CD18b, через поры в сосудистой стенке в окружающие сосуд ткани и инфильтрируют весь орган, его паренхиму и интерстиций в целом» [13, 5, 116].

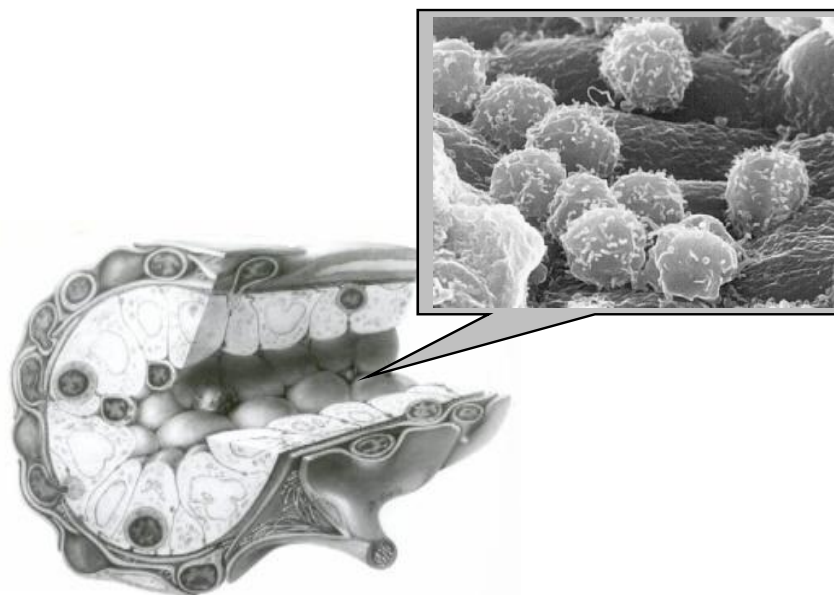


Рисунок 1 – Процесс адгезии как первого этапа процесса миграции лейкоцитов из сосуда в окружающие ткани (Read M. A., 1995)

В своей статье Иванов К.П. и Мельникова Н. Н. (2014), рассуждая о роли лейкоцитов замечают следующее: «Массовая адгезия лейкоцитов к стенкам сосудов и друг к другу, приводит, в конечном счете, к образованию крупных лейкоцитарных конгломератов, которые «закупоривают» просвет сосудов и резко ухудшают венозный отток. В поперечнике конгломераты достигают порой 20–50 мкм. Лейкоцитарные конгломераты не являются тромбами в их классическом понимании. В них отдельные лейкоциты довольно сильно фиксированы друг к другу, но сами лейкоцитарные конгломераты разных размеров иногда слабо фиксированы к стенке сосуда и поэтому через несколько минут после образования они смываются кровью и уносятся в более крупные сосуды [29]. Однако в терминальные периоды кислородного голодания тканей конгломераты сохраняются, и по выражению Иванова К. П. (2004), они останавливают «поезда эритроцитов», возникают лейкоцитарно-тромбоцитарные взаимодействия. Лейкоцитарные конгломераты достигают «огромных» размеров (до 80 мкм), что приводит к окклюзии сосудов все большего диаметра и к их деформации. Этим впоследствии объясняется трудность или невозможность восстановления микроциркуляции при глубокой гипоксии [36]. Наибольшее значение при этом

имеет нестабильность гемодинамики, время тепловой ишемии, и происходящая при этом «мобилизация» лейкоцитов, имеющая мишенью микроциркуляторное русло и эндотелий органа. После запуска кровотока активированные нейтрофилы становятся главным источником продукции свободных радикалов и ферментов лизиса» [5, 148].

Общеизвестно, что трансплантат подвергается множественным патофизиологическим воздействиям во время ишемии при его эксплантации и хранении. Если сердечная функция нарушена и скорость кровотока падает, то уровень кислорода в крови становится ниже, и возникает ишемия и гипоксия. В результате происходит «активация» эндотелия, которая выражается в появлении на поверхности его клеток молекул адгезии разных классов [16, 141]. Эти хорошо изученные процессы инициируют каскад молекулярных и клеточных событий, которые в свою очередь вызывают высвобождение провоспалительных медиаторов и привлекают различные типы клеток, проникающих в ткани [19]. Лейкоциты отвечают за множество патофизиологических изменения во время ИРП. Они усугубляют тканевую гипоксию путем закупоривания капилляров и способствуют усилению цитотоксичности путем образования кислородных радикалов и протеолитических ферментов [68]. Заметное увеличение деградации гликокаликса впоследствии связано с усилением взаимодействия лейкоцитов и эндотелия с последующей адгезией лейкоцитов реципиента к эндотелию трансплантата [137]. Повышенная адгезия лейкоцитов также, вероятно, будет связана с ранее существовавшим увеличением экспрессии E-селектина [133] в сочетании с дополнительной экспрессией P-селектина [71] и VCAM-1, вторичной по отношению к холодовому хранению [75].

На уровне сосудистого русла ишемия-реперфузия приводит к опуханию эндотелиальных клеток, утрате гликокаликса и деградации клеточного скелета. Вследствие этого утрачивается межклеточное взаимодействие эндотелиальных клеток, что увеличивает проницаемость сосудов и потерю жидкости в межтканевом пространстве [54].

Важной особенностью ИРП является хемотаксис лейкоцитов, эндотелиальная адгезия и трансмиграция клеток в интерстициальное пространство [125]. Этот процесс инициируется повышенной экспрессией Р-селектина на клетках эндотелия и взаимодействием Р-селектина с Р-селектикопротеином 1, экспрессированным на лейкоцитах. Такое взаимодействие приводит к роллингу лейкоцитов на поверхности эндотелия. В последующем адгезия лейкоцитов к эндотелию достигается за счет взаимодействия связанных с лимфоцитами $\beta 2$ -интегринов, функционально связанных с антигенами 1 (LFA-1) и антигенами макрофагов-1 (MAC-1 или рецептор комплемента 3, CR3) на лейкоцитах и внутриклеточных молекулах адгезии 1 (ICAM-1) в клетках эндотелия. После активации эти лейкоциты высвобождают токсичные продукты, такие как АФК, протеазы, эластазы и различные цитокины в интерстициальном пространстве [87], что приводит к дальнейшим повреждениям, таким как повышенная проницаемость сосудов, отек, тромбоз и гибель паренхимальных клеток (Рисунок 2) [27].

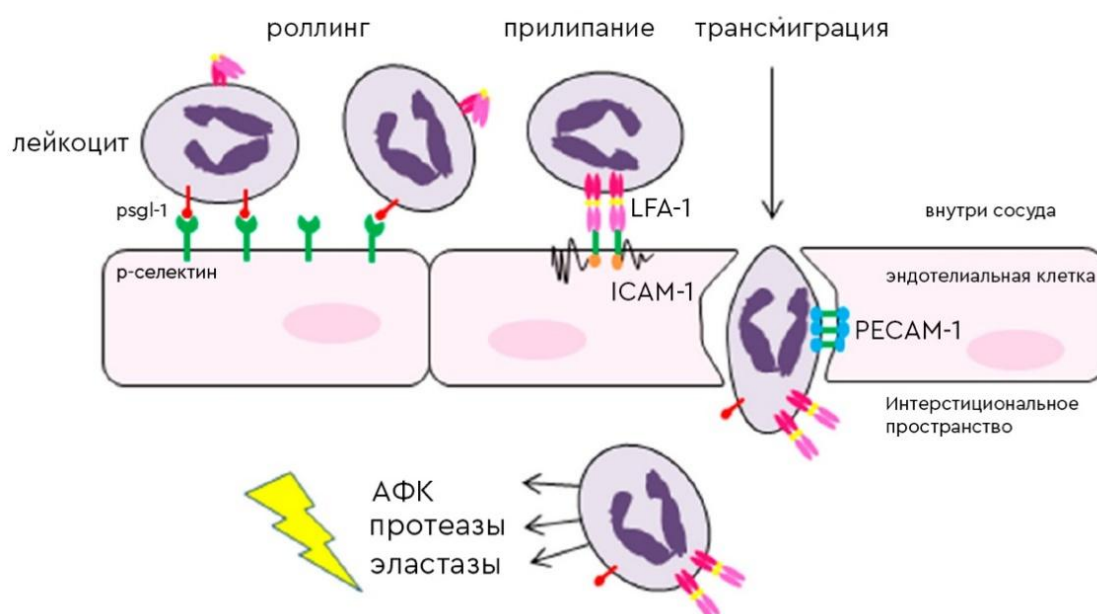


Рисунок 2 – Взаимодействие лейкоцитов и эндотелиальных клеток в процессе трансмиграции лейкоцитов (по Carden D.L., 2000).

Таким образом, активация компонентов воспалительной реакции усугубляет повреждение уже вызванное окислительными радикалами [1]. Поэтому существующее повреждение, вызванное ишемией, усиливается цитотоксическими клетками и воздействует на молекулы адгезии [74].

Кутепов Д. Е. (2018) говорит об открытии феномена ИРП около полувека назад в качестве причины множества клинических осложнений [6]. По сей день ИРП остается ведущим патологическим процессом в трансплантологии, неврологии и кардиологии [8]. Ишемия-реперфузия (ИР) – это сложный каскад событий, включающий взаимодействие между сосудистым эндотелием, интерстициальным пространством, циркулирующими клетками и множественными биохимическими соединениями [10].

В исследовании Багненко С.Ф. и др. (2014) говорится о том, что «массовая адгезия лейкоцитов к стенкам сосудов и друг к другу, приводит к образованию крупных лейкоцитарных скоплений, которые вызывают окклюзию и деформацию венозного русла» [13]. Отдельные лейкоциты в таких конгломератах фиксированы, но сами скопления иногда мигрируют в эндотелий органа [150]. По мнению Schofield Z. V. et al. (2013) после восстановления кровотока главным действующим фактором ИРП становятся активированные нейтрофилы, продуцирующие свободные радикалы и ферменты лизиса [110].

1.2.4 Нейтрофилы – ключевой компонент ишемически-реперфузионного повреждения

Установлено, что в то время, когда начинается процесс ишемии-реперфузии, отмечается активация нейтрофилов и дальнейшее повреждение ткани путем высвобождения АФК, протеиназ и катионных пептидов [150]. Под воздействием провоспалительных цитокинов и адгезивного каскада активируется никотинамидадениндинуклеотидфосфат- (НАДФ) -оксидаза, что вызывает продукцию большого количества АФК нейтрофилами [127]. Нейтрофилы блокируют капиллярное русло, предотвращая реперфузию, что приводит к

некрозу тканей и усилению иммунного ответа. Нейтрофилы секретируют провоспалительные цитокины и хемокины, создавая положительную обратную связь [98]. Кроме того, миграция нейтрофилов вызывает потерю целостности эпителиального барьера и снижает регуляцию молекул адгезии [126].

ИРП инициируется эпизодом ишемии, когда в части или целом органе ограничивается кровоснабжение, вызывая гибель клеток, которая дополнительно усугубляется при возобновлении кровотока. Ишемия приводит к гипоксии тканей, которая вызывает накопление метаболитов и АФК, а именно, супероксида, пероксида водорода и гидроксильных радикалов. АФК увеличивают количество внутриклеточного кальция, вызывая изменения рН и одновременно истощая запасы аденазинтрифосфорной кислоты, что приводит к повреждению клеточных органелл и некрозу клеток [38]. Длительные периоды ишемии, продолжающиеся от нескольких минут до получаса, вызывают необратимые эффекты, которые усиливаются при реперфузии [99]. Во время реперфузии ишемизированная ткань наполняется кислородом. Это активирует метаболиты и АФК, что приводит к воспалительной реакции, вызывающей ишемически-реперфузионное повреждение. Повышение содержания АФК подавляет выработку оксида азота, повреждает эндотелиальные клетки, что приводит к потере целостности барьера и высвобождению АФК во внеклеточный матрикс. Это увеличивает экспрессию молекул адгезии, действует как хемоаттрактант для нейтрофилов, инициируя их рекрутинг [94], а также активирует каскад системы комплемента [165] и способствует клеточному апоптозу [59]. Оседлые макрофаги и поврежденные эндотелиальные клетки высвобождают провоспалительные цитокины, которые вызывают активацию и способствуют миграции нейтрофилов. Это вызывает воспалительный ответ, который может привести к синдрому системного воспалительного ответа (SIRS) у ДСМ, которые являются ключевыми в патогенезе полиорганной недостаточности [38].

По мнению Francis et al. (2017) ИРП – это сложный физиологический процесс, но неоспоримую ведущую роль в нём играют нейтрофилы, которые могут проникать в поврежденную ткань в уже через нескольких минут после

активации [60]. Цитокины, АФК, система комплемента и TLR также имеют важное значение в патогенезе ИПП, поскольку они поддерживают, активируют и усиливают деструктивную функцию нейтрофилов. Тем не менее, недавние исследования снова обратили внимание на роль нейтрофилов как ключевого игрока в патофизиологии ИПП [110].

Фактор некроза опухолей (Tumor necrosis factor; TNF- α) является воспалительным медиатором, связанным с апоптозом канальцевого эпителия и апоптотическим внешним путем [56]. Апоптоз вызван взаимодействием TNF- α и его рецепторов (TNFR1 или Fas), что приводит к активации эндонуклеазы, которая фрагментирует дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и вызывает гибель клеток посредством апоптоза. TNF- α способствует миграции нейтрофилов и моноцитов в почки, увеличивает количество молекул адгезии, таких как ICAM-1 и L-селектин [140].

ИПП вызывает повреждение клеток эпителия почечных канальцев, эндотелиальных клеток и дендритных клеток. Дендритные клетки продуцируют TNF- α , IL-6, MCP-1, MIP-2 и хемокин, полученный из кератиноцитов, инициируя мощный хемотаксический градиент для рекрутинга нейтрофилов. IL-8 играет решающую роль в рекрутинге нейтрофилов и опосредует повреждение тканей с помощью цитокинов, промежуточных свободных радикалов и протеаз [80]. Повышенная экспрессия ICAM-1, P-селектина и IL-8 обеспечивает повышенную адгезию, которая объясняется разрушением нефронов [157]. При дегрануляции нейтрофилы высвобождают протеазы, миелопероксидазу, цитокины и увеличивают количество АФК в мозговом веществе, распространяя повреждение тканей по всей почке [90]. Кроме того, нейтрофилы в сочетании с тромбоцитами и эритроцитами вызывают закупорку капилляров, что приводит к феномену «no-reflow» [8], который усиливает воспалительный ответ и инфильтрацию тканей нейтрофилами. Активация системы комплемента, в частности C3, C5a и комплекса мембранной атаки (MAC, C5b-9), также наблюдается при ИПП почек [149].

Как указывает в своей работе Land W.G. (2018), важную роль в ИРП играют два основных механизма: системный дисбаланс в состоянии окислительного стресса и активация метаболических процессов, которые вызывают иммунные и воспалительные реакции [39]. Гипоксия во время ишемического периода и последующая реперфузия трансплантата вызывают потерю осмотического равновесия и повышение проницаемости клеточных мембран, что приводит к некрозу клеток и снижению функции органа. Гипоксия является лишь одним из факторов повреждения клеток, связанным с ишемией-реперфузией при трансплантации органов. Реперфузия также вызывает экспрессию воспалительных цитокинов и молекул адгезии, что увеличивает скорость апоптоза в реперфузированной ткани [59].

По мнению He X. (2018) одним из последствий ИРП является механизм нарушения эндотелия в трансплантате [139]. Переход из антикоагулянтного состояния в прокоагулянтное связан с быстрой экспрессией различных молекул адгезии в эпителиальных клетках. В условиях реперфузии лиганды всех типов лейкоцитов немедленно взаимодействуют с соответствующими молекулами адгезии или их лигандами на поверхности клеток эндотелия [113]. Это клеточное взаимодействие приводит к роллингу с помощью селектинов, а затем к прилипанию лейкоцитов на клетки эндотелия посредством действия интегралов. Гранулоциты, с другой стороны, высвобождают свои медиаторы, такие как пероксидазы, приводящие к повреждению клеток эндотелия, называемое реперфузионным повреждением [36].

Всё еще существует острая необходимость в терапевтическом методе, который мог бы объективно предотвратить или обратить вспять потенциальные последствия повреждений, вызванных ИР в организме донора [88].

Таким образом, в доступных нам литературных источниках мы обнаружили данные об основополагающих связях клеточных и гуморальных механизмов, участвующих в повреждении почек при трансплантации.

Необходимо отметить, что миграция нейтрофилов в трансплантат и лейкоцитарная инфильтрация тканей в целом инициируют активацию молекул

адгезии ещё на донорском этапе, что ещё более потенцирует реперфузионное повреждение трансплантата почки в организме реципиента.

Отсюда следует, что для улучшения качества трансплантатов и результатов пересадок наибольшее значение имеет широкий спектр мероприятий до эксплантации, а также вся палитра лекарственных средств, призванных решить основную проблему, которой является минимизация последствий ИРП.

1.3 Современные способы медикаментозной защиты трансплантатов на доэксплантационном этапе

Как было ранее сказано, существует множество проблем, связанных с донорством при смерти мозга – от патофизиологических изменений в системе кровообращения до развития провоспалительных изменений в трансплантате [69].

В настоящее время предпринимаются попытки минимизировать повреждение органов до эксплантации, связанное с ИРП, но до сих пор ни один способ не даёт надежных и хороших результатов [111].

В своём доклиническом испытании Frémeaux-Vacchi V. et al. (2015) демонстрируют первоначальный успех применения группы терапевтических препаратов, нацеленных на нейтрофилы, для профилактики ИРП. Моноклональное антитело, направленное против интегринов CD11/CD18, показало многообещающие результаты в моделях на животных [61], однако клинические испытания не показали значительного уменьшения размеров повреждения [136]. Рецепторы, связанные с G-белками (GPCR), оказались эффективными для лечения целого ряда заболеваний и составляют почти треть от всех препаратов, используемых в настоящее время [65]. Настоящие результаты показывают, что они также могут быть успешными для предупреждения последствий ИРП. Другой белок GPCR – Аденозиновый рецептор 2А (A2A) – также обладает защитным действием [95]. Он уменьшает объём повреждения в экспериментальной свиной модели при ишемии-реперфузии миокарда и

ингибирует молекулы адгезии на клетках эндотелия, уменьшая количество нейтрофилов при ишемии-реперфузии почек в исследовании на грызунах [18].

В качестве ещё одного важного аспекта ИРП Monk P. N. et al. (2007) в своём исследовании рассматривают механизм системы комплемента. При изучении модели ИРП кишечника, печени, почек и мозга выявили роль системы комплемента как ключевого медиатора постишемического повреждения [62]. Целый ряд исследователей дополняют эти выводы, показывая, что ингибиторы комплемента, такие как рекомбинантный sCR1, снижают влияние ИРП в различных органах [118, 146, 165]. Однако, по мнению Yoshiya K. et al. (2011) у ингибиторов комплемента выявлен эффект блокирования повреждения тканей, с сохранением функции предотвращения распространения инфекционного процесса и устранения иммунных комплексов, в противном случае пациент останется с сильно ослабленным иммунитетом и более восприимчивым к инфекции [43]. На сегодняшний день экулизумаб является единственным клинически доступным терапевтическим средством, направленным конкретно на систему комплемента, и одобрен для использования при пароксизмальной ночной гемоглобинурии и атипичном гемолитико-уремическом синдроме [47]. Он влияет на компонент C5, предотвращая его расщепление на C5a, мощный хемоаттрактант и C5b, который образует мембраноатакующий комплекс [165].

В работе Mastellos D. C. et al. (2019) коллективом авторов установлено, что C5a – это важнейший хемоаттрактант для нейтрофилов и, следовательно, блокировка C5 может уменьшить инфильтрацию нейтрофилов при ИРП. К сожалению, пекселизумаб, близкий аналог экулизумаба, который также ингибирует расщепление C5, не может уменьшить ишемическое повреждение при инфаркте миокарда человека [102]. В моделях исследования на животных ИРП истощение системы комплемента значительно снижает количество нейтрофилов и уменьшает проницаемость легких [149]. В соответствии с этим, существует большая вероятность того, что редукция последствий ИРП при ингибировании системы комплемента связана с уменьшением инфильтрации нейтрофилов, при этом терапевтическое воздействие, направленное конкретно на нейтрофилы, может

быть ключом к предотвращению ИРП. В поддержку этой гипотезы группа авторов под руководством Wu M. C. L. (2013) установлено, что введение пептида агонистов С3а мышам уменьшает мобилизацию нейтрофилов после ИРП тонкой кишки, что приводит к снижению нейтрофильной инфильтрации тканей и редукции её последствий [146].

В попытках предотвращения и лечения последствий ИРП было отмечено множество неудач. Эти неудачи связаны с рядом причин – от недостаточного понимания патофизиологии до нехватки моделей заболевания. По данным литературы основным препятствием в разработке лекарственных средств являются объективные трудности, связанные с проекцией полученного в эксперименте на животной модели успеха на человека [72]. Эффективность терапевтических средств ограничено доказана в условиях *in vivo* и отражена в ряде обзоров [89, 71, 125]. Кроме того, современные исследования как правило нацелены только на один компонент, который препятствует активации или миграции нейтрофилов. Влияние на несколько ключевых факторов одновременно может обеспечить лучшую защиту от последствий ИРП без ущерба для какой-либо одной области иммунной системы и, таким образом, привести к лучшим результатам для пациентов [66].

На сегодняшний день большинство терапевтических средств для устранения последствий ИРП нацелены на цитокины, систему комплемента, свободные радикалы и факторы агрегации тромбоцитов. Таким образом, по мнению Han S. J (2019) современные методы лекарственной терапии у ДСМ остаются недостаточными для улучшения состояния трансплантатов почек [71].

Vishwakarma et al. (2017) обсуждают коррекцию воспалительного процесса у ДСМ с применением допамина и стероидов, которые, как было показано, уменьшают экспрессию как провоспалительных цитокинов, так и высвобождение молекул внутриклеточной адгезии, таких как селектин, ICAM-1 и VCAM-1 [113]. Введение допамина также ассоциировалось с лучшими результатами – более низким числом пациентов, нуждающихся в диализе после трансплантации и в целом лучшей функцией трансплантата в краткосрочной и долгосрочной перспективе [101].

Считается, что польза от использования допамина заключается в сохранении целостности эндотелия, который сдерживает миграцию лейкоцитов, особенно в случаях продолжительной холодовой ишемии трансплантатов почек [52].

В своём ретроспективном исследовании Kim K. D. et al. (2021) делают вывод о том, что основной подход в улучшении результатов трансплантации – это прекондиционирование донора [128]. По мнению McKeown D. W. et al. (2012) оправдано использование широкого спектра анестезирующих газов в частности изофлюрана и дезфлюрана в сочетании с ремифентанилом и ксеноном, который снижает ишемически-реперфузионное повреждение посредством активации гипоксия-индуцированного фактора-1 α [104]. Ксенон особенно перспективен из-за его дополнительного эффекта в предотвращении дальнейшего повреждения почек при трансплантации после холодового хранения [124].

Важность предотвращения воспалительной реакции до трансплантации Pratschke J. et al. (2001) подчеркивают в своём исследовании на грызунах, где сказано, что подавление активации системы комплемента приводит к уменьшению выделения воспалительных цитокинов [82], а также к улучшению почечной функции [34].

Время холодовой ишемии является одним из определяющих факторов тяжести ИРП [75]. Поэтому использование растворов для консервации, содержащих антиоксидантные соединения, может оптимизировать сохранение трансплантированных органов. Попытки уменьшить степень ИРП сфокусированы на трех основных моментах: восстановление реологических свойств крови, ингибирование эффектов кислородных радикалов и блокада активации или адгезии медиаторов воспаления [114]. Использование вазодилататоров для увеличения синтеза и доступности оксида азота может снизить вероятность ИРП. Изоволемическая гемодилюция и предупреждение образования отеков за счёт использования гипертонических или гиперонкотических растворов, применение поглотителей радикалов кислорода, таких как супероксиддисмутаза имеют некоторые преимущества в профилактике последствий ИРП [73].

По мнению Sánchez-Hernández C. D. et al. (2020) несмотря на совершенствование способов хранения и предупреждение последствий ИРП, все еще сохраняются высокие риски повреждения трансплантата и последующей активации иммунной системы [88]. Одним из возможных методов терапии является предварительное введение эритропоэтина- α (EPO- α) или его одновременное введение при реперфузии. Такой способ применения EPO- α был предложен Wang Z. et al. (2012) после первых положительных результатов при лечении острого повреждения почек, а также при повреждении головного мозга [145]. Несмотря на многообещающие данные и положительные результаты на моделях исследования трансплантации почки у животных, отмечалось клинически незначимое нефропротективное действие эритропоэтина, вводимого при реперфузии [129]. Альтернативная инфузия – это использование молекул монооксида углерода, которые обладают как антиапоптотическим, так и противовоспалительным эффектом путем подавления никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) - зависимого продуцирования супероксида, следовательно, ослабления транскрипции ядерного фактора «каппа-би (NF- κ B). Это также связано с уменьшением повреждения эндотелия, что подтверждается уменьшением экспрессии e-селектина, ICAM-1 и адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам [26].

Как утверждают Zhao H. et al. (2013) альтернативным интраоперационным методом является тщательный выбор используемого анестезирующего газа. Исследованные газы включают десфлюран, изофлюран, севофлюран и ксенон [164]. Целым рядом авторов было высказано предположение, что изофлюран может индуцировать высвобождение трансформирующего фактора роста- β 1 через кавеолы и, следовательно, увеличить продукцию аденозина с помощью CD73-зависимого пути, который способствует снижению активации ядерного фактора «каппа-би» NF- κ B [77, 164]. Альтернативный способ подавления NF- κ B возможен с использованием ксенона, который снижает высвобождение молекулярного фрагмента, ассоциированного с дистресс-ассоциированными молекулярными паттернами путем индукции продуцирования цитопротекторных факторов, таких как HSP-70 и гема-оксигеназа (HO)-1. Это предотвращает высвобождение HMGB-

I во внеклеточное пространство, что приводит к снижению высвобождения проактивных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF- α . Севофлюран также может редуцировать воспалительную реакцию путем снижения уровня миелопероксидазы для уменьшения проникновения лейкоцитов в трансплантат, что объясняет снижение NF- κ B, TNF- α и IL-6. В своём исследовании Hanto D. W. et al. (2010) предполагают, что ингаляция монооксида углерода снижает вероятность ОФТ, хотя неясно, как его использование может быть применено в клинической практике [83]. Sonoda A. et al. (2009) в эксперименте на кроличьей модели установили эффективность ингаляции оксида азота для коррекции последствий ИРП. Во время ишемии продукция оксида азота прекращается. При реперфузии ишемическая ткань перегружается супероксидами, которые поглощают оставшийся оксид азота и образуют высокотоксичный пероксинитрит. Производство супероксидов в итоге приводит к истощению оксида азота в целом. Применение альтернативных антиоксидантных препаратов, таких как аллопуринол, супероксиддисмутаза, ацетилцистеин, этанол, каптоприл и верапамил не привело к достоверным положительным результатам на животных и в клинических испытаниях [48].

Таким образом, в современную эпоху, когда основная часть доноров представлена донорами с расширенными критериями, наиболее важными являются исследования, направленные на изучение минимизации последствий ИРП, гипоксии тканей вследствие блокирования микроциркуляторного русла рекрутированными лейкоцитами.

Это позволяет сделать вывод, что существующие методы коррекции последствий ИРП представлены методами экстракорпоральной фильтрации и целым арсеналом терапевтических опций, которые, однако, все ещё остаются компромиссом между желательным эффектом и клинической реальностью. Несмотря на прогресс в изучении процессов, лежащих в основе механизмов нарушения функции почечного трансплантата, методы коррекции ИРП по-прежнему недостаточны, а результаты остаются неоднозначными.

1.4 Механизм действия поликлональных антител

Почти полвека назад появились первые публикации, указывающие на потенциал антилимфоцитарных препаратов в области клинической трансплантологии [121]. Поликлональный антиtimoцитарный глобулин используется в клинической практике уже более 40 лет. Кроличий антиtimoцитарный глобулин в настоящее время используется в лечении апластической анемии, а также в профилактике и лечении кризов отторжения трансплантатов солидных органов и стволовых клеток. Препарат Тимоглобулин получают путем иммунизации здоровых кроликов клеточной суспензией из человеческих тимоцитов. После иммунизации из кроликов собирают сыворотку, а иммуноглобулины против тимоцитов человека выделяют и подвергают ряду очистительных процессов. Тимоглобулин способен индуцировать истощающие и неистощающие процессы в результате разнообразия и специфики антител [135].

Тимоглобулин представляет собой смесь различных специфических антител, взаимодействующих с антигенами системы иммунного ответа, молекулами адгезии и другими клеточными молекулами, а также различными антигенами. Тимоглобулин вызывает быстрое истощение Т-клеток, в первую очередь за счет комплемент-зависимого клеточного лизиса в сосудистом русле и апоптозной клеточной гибели в лимфатической ткани. Хотя первичным иммуносупрессивным эффектом является истощение Т-клеток, было показано, что Тимоглобулин также регулирует маркеры клеточной поверхности, в том числе ряд интегринов и межклеточных молекул таких, как молекулы адгезии, обеспечивающие прилипание лейкоцитов к эндотелию [109]. Применение Тимоглобулина вызывает как краткосрочные, так и долгосрочные изменения в популяциях Т-клеток, отмечающих за гомеостаз и обладающих регуляторными иммуносупрессивными свойствами [51,151].

1.4.1 Элиминация Т-лимфоцитов из крови при применении Тимоглобулина

Как доказывают Prévile X. et al. (2001) в своём исследовании на животной модели первичным иммуносупрессивным эффектом Тимоглобулина является Т-клеточное истощение [105]. По мнению Mehrabi A. et al. (2007) взаимодействие Тимоглобулина с клеточными поверхностными антигенами приводит к устранению целевых клеточных линий из крови, а степень истощения лимфоцитов зависит от дозы. Хотя Тимоглобулин предпочтительно связывается с Т-клетками, он может также связываться с В-клетками, дендритными клетками и другими нелимфоидными клеточными линиями, особенно при использовании больших доз [153]. Подробно описывая механизм действия поликлональных антител в своём исследовании Mueller T. F. (2007) для количественной оценки общего количества антител к Т-клеткам и нелимфоидными клеточным линиям, использовал метод проточной цитометрии. Автор продемонстрировал, что существует линейная связь между концентрацией Тимоглобулина и количеством антител, направленных против лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эритроцитов и тромбоцитов. Охарактеризован широкий спектр антигенов-мишеней Тимоглобулина. Эти антигены можно классифицировать как антигены иммунного ответа, молекулы адгезии и клеточного транспорта, а также молекулы, участвующие в гетерогенных путях (Таблица 1) [109].

Таблица 1 – Представлен широкий спектр антигенов-мишеней Тимоглобулина (по Mueller T., 2007)

Антигены иммунного ответа		Адгезия и клеточный транспорт	Гетерогенные пути
CD1a	CD28*	CD6	CD2
CD3/TCR	CD30	CD11a/CD18 (LFA-1)	CD5
CD4	CD32	CD44	CD11b
CD6	CD40	CD49/CD29 (VLA-4)	CD29
CD7	CD80*	CD50 (ICAM-3)	CD38
CD8	CD86	CD51/61	CD40
CD16	CD152	CD54 (ICAM-1)	CD45
	(CTLA-4)	CD54 (ICAM-1)	CD45
CD19	HLA class I	CD56*	CD52
CD20*	HLA class II	CD58 (LFA-3)	CD95
CD25*		LPAM-1 ($.4\alpha$, 7β)	CD126
		CD102 (ICAM-2)	CD138
		CD195 (CCR5)	
		CD197 (CCR7)	
		CD184 (CXCR4)	

Отмеченные символом « * » антигены указывают на то, что результаты различались между лабораториями из-за несоответствий в анализе моноклональной конкуренции. Антигены, которые, как было показано, участвуют в иммунных реакциях, перечислены в первых двух колонках. Эти антигены обнаруживаются на Т-клетках, В-клетках, НК-клетках, макрофагах и дендритных клетках [109].

Антигены адгезии и клеточного транспорта перечислены в третьем столбце Таблицы 1. Последние три антигена связаны с хемокиновыми рецепторами. CD195 (CCR5) и CD184 (CXCR4) играют критическую роль в клеточной адгезии, а CD197 (CCR7), как было показано, играет важную роль в хемотаксисе [63].

Антигены, участвующие в гетерогенных путях, перечислены в четвертом столбце Таблицы 1. McKeown D. W. et al. (2012) показывают, что CD2 участвует в апоптозе активированных Т-клеток, а CD5 может влиять на созревание и отбор тимоцитов. CD38 играет роль в активации и пролиферации клеток, тогда как CD40 участвует в апоптозе и воспалении. CD45 играет роль в активации Т- и В-клеток, а CD95 участвует в апоптозе. CD126 – это рецептор IL-6. Функции CD11b, CD29, CD30 и CD138 до конца еще не изучены [92].

Как было отмечено в работе Mueller T. F. (2007) при любой концентрации Тимоглобулина антител к лимфоцитам больше, чем к моноцитам и нейтрофилам, а воздействие на эритроциты и тромбоциты достигается только при относительно высоких дозах (Рисунок 3) [109]. По мнению Tsaperas D. et al. (2011) применение Тимоглобулина в высоких дозах вызывает неспецифическое связывание с нейтрофилами и тромбоцитами, что может привести к нежелательным явлениям, таким как временная нейтропения и тромбоцитопения [134].

Результаты исследования Mohty M. (2007) демонстрируют, что Тимоглобулин вызывает истощение лимфоцитов в периферической крови в первую очередь за счет комплемент-зависимого клеточного лизиса [108]. Комплемент-зависимый лизис клеток в периферической крови зависит от дозы тимоглобулина и количества антител на поверхности лимфоцитов. Высокие концентрации Тимоглобулина индуцируют лизис как покоящихся, так и преактивированных Т-клеток [63]. В своей экспериментальной работе Prévile X. et al. (2001) доказали, что истощение лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах происходит преимущественно при Т-клеточном апоптозе (Рисунок 3) [105].

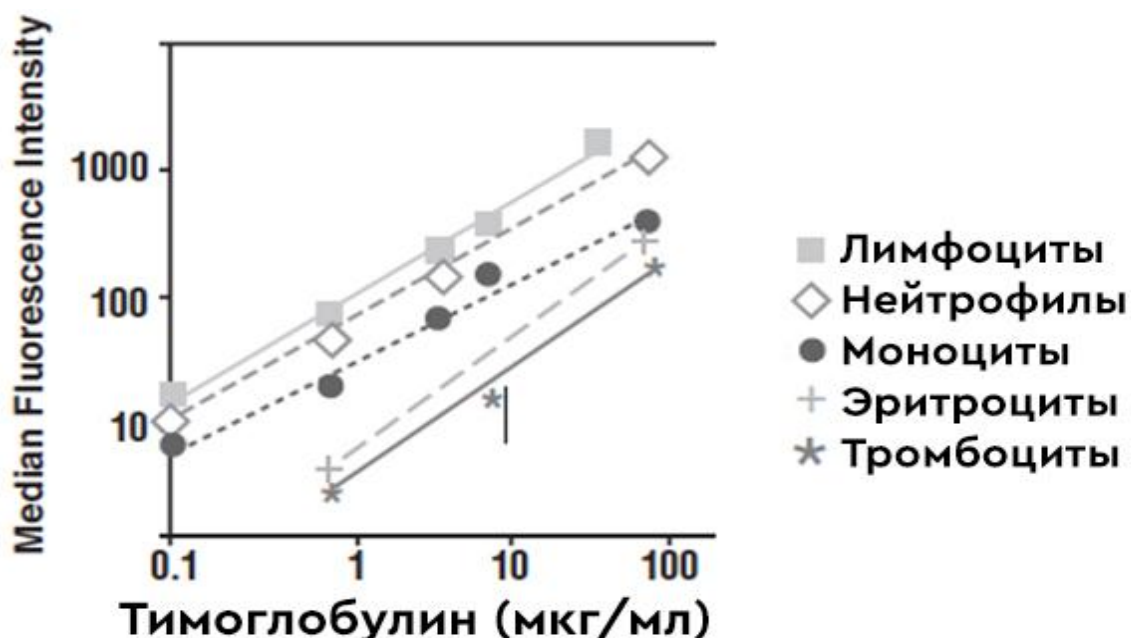


Рисунок 3 – Представлена тропность Тимоглобулина к клеткам крови (по Mueller T., 2007)

1.4.2 Редукция экспрессии молекул адгезии при применении Тимоглобулина

Анализ данных литературы позволяет сделать вывод о том, что Тимоглобулин вызывает обратимое снижение экспрессии молекул клеточной поверхности, что приводит к образованию перекрестных связей между антителами и антигенами [159]. По мнению Prévile X. et al. (2001) применение Тимоглобулина снижает экспрессию многих молекул, которые контролируют активацию Т-клеток, в том числе Т-клеточные рецепторы (CD3, CD2, CD4, CD5, CD6 и CD8) [105]. Из работы авторского коллектива под руководством Mehrabi A. et al. (2007) угнетение экспрессии этих поверхностных клеточных антигенов наблюдались как в периферической крови, так в и периферической лимфатической ткани. Это процесс связывания множества поверхностных молекул уникален для поликлональных биологических агентов, а эффект, наблюдаемый через 2 часа после введения Тимоглобулина может длиться до 4 недель. Эта быстрая и длительная модуляция, вероятно, вызывает большую часть длительного снижения активности Т-клеток после применения Тимоглобулина [153].

Поликлональные антитела снижают экспрессию на клеточной поверхности у ряда интегринов и межклеточных молекул адгезии (ICAMs), которые способствуют лейкоцитарной адгезии к эндотелию [63]. Тимоглобулин содержит антитела к молекулам адгезии LPAM-1, позднему VLA-4, лейкоцитарному антигену LFA-1, ICAM-1, ICAM -2, ICAM -3 [121]. Тимоглобулин также содержит антитела к нескольким хемокиновым рецепторам, участвующих в регуляции адгезии лейкоцитов к эндотелию и миграции лейкоцитов, в том числе CXCR4, CCR5 и CCR7 [70].

По мнению Read M. A. et al. (1995) молекулы адгезии и инфильтрация лейкоцитов играют ключевую роль в ИПП и процессах отторжения при трансплантации органов [144]. Рекрутинг лейкоцитов требует, как адгезии лейкоцитов к эндотелию, так и хемокиновой реакции. Основные этапы, связанные с рекрутингом лейкоцитов, включают прилипание и роллинг лейкоцитов, за

которыми следует активация медиаторов хемотаксиса и остановка, как показано на рисунке 4.

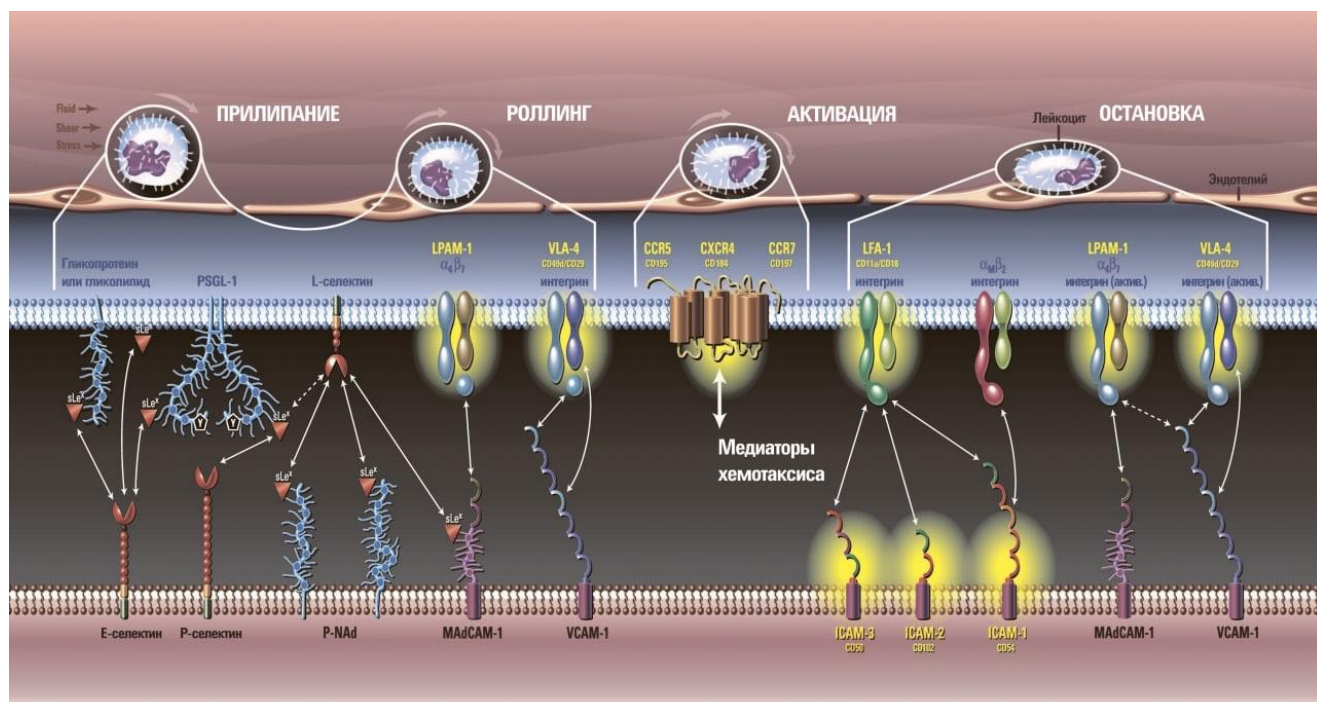


Рисунок 4 – Основные этапы, связанные с рекрутингом лейкоцитов: прилипание и роллинг, за которыми следует активация медиаторов хемотаксиса и окклюзия микрососудистого русла по von Andrian U.H. (2000)

Связывание и прокручивание лейкоцитов частично опосредовано интегринами на поверхности лейкоцитов, такими как LPAМ-1 и VLA-4. «Мягкая» фаза фиксации лейкоцитов на поверхности эндотелия опосредована активированными интегринами на поверхности лейкоцитов, включая LPAМ-1, VLA-4 и LFA-1, а также ICAM на поверхности эндотелия. Хемокины секретируются полипептидами, которые связываются с рецепторами на поверхности лейкоцитов, включая CXCR4, CCR5 и CCR7. Хемокины, привязанные к этим поверхностным рецепторам, передают сигналы через G-белки, которые важны для активации интегринов, вовлеченных в лейкоцитарную адгезию и для миграции лейкоцитов во внесосудистое пространство [160].

Тимоглобулин снижает экспрессию на поверхности клеток LPAМ-1, VLA-4, LFA-1, ICAM-1, ICAM-2, и ICAM-3, ингибируя тем самым связывание, роллинг лейкоцитов и закупорку сосудистого русла, и, таким образом, блокирует адгезию лейкоцитов к эндотелию [28].

В своём исследовании на животной модели Beiras-Fernandez A. et al. рассмотрели влияние Тимоглобулина на лейкоцитарно-эндотелиальные реакции при ИРП у приматов. Эксперимент заключался в том, что авторы забирали кровь из дистальной конечности от 3-х групп, создавали ишемию конечности и через 1 час в зависимости от принадлежности животного к той или иной группе возвращали кровь с добавлением в неё антитимоцитарного иммуноглобулина (АТГ) или без. В эксперименте без применения Тимоглобулина был обнаружен роллинг лейкоцитов в течение 5 минут, при этом большинство лейкоцитов прилипали к эндотелию в течение 30 минут. Напротив, использование Тимоглобулина заметно сократило роллинг лейкоцитов и почти полностью ингибировало адгезию лейкоцитов к эндотелию. Таким образом, обнаружена эффективность применения поликлональных антител (ПКАТ) в отношении проявлений последствий ИР. Терапевтический потенциал этого антиадгезивного эффекта особенно актуален при трансплантации. Поэтому применение поликлональных антител перед реперфузией позволит предотвратить инвазию лейкоцитов в ткани трансплантата и тем самым свести к минимуму последствия ИРП [115].

На основании анализа данных литературы следует, что Тимоглобулин является поливалентным лекарственным средством, тропным к множеству антигенов-мишеней, которые можно классифицировать как антигены иммунного ответа, молекулы адгезии и клеточного транспорта, что, по нашему мнению, может охарактеризовать препарат ПКАТ как универсальное средство в борьбе с последствиями ИРП.

В этом отношении терапевтическое применение ПКАТ у ДСМ, ранее используемого только для лечения реципиентов, представляется эффективным методом улучшения качества почечных трансплантатов, за счет «выключения»

лейкоцитарного звена ишемически-реперфузионного повреждения, что положительно скажется долгосрочных результатах трансплантации. Однако в доступной нам литературе не встретилось сообщений о применении препарата ПККАТ у ДСМ для улучшения качества трансплантатов почек.

Наша гипотеза требует не только клинической верификации, но и морфологического подтверждения, что затруднительно осуществить на этапе кондиционирования ДСМ и последующей эксплантации органов. Крайне важно сохранить биообразцы от ДСМ и реципиентов для будущих исследований, о чём ниже и пойдёт речь.

1.5 Биобанки – основа персонализированной трансплантационной медицинской помощи

Стремительное развитие биомедицинской науки в течение последних десятилетий характеризовалось множеством открытий, быстрым накоплением новых знаний и больших объемов информации [3]. Целым рядом авторов этот период называется «эра персонализированной медицины» [57]. Термин прочно вошел в употребление, он описывает не только новые знания и направления в биомедицинской науке, но также изменения существующих в медицине парадигм, характеризующиеся смещением акцента от лечения заболеваний к их предупреждению [112]. Эра персонализированной медицины характеризуется объединением различных междисциплинарных подходов, направленных на лучшее понимание состояний здоровья и патологии [93].

Одним из перспективных направлений медицины являются биобанки [Personalized Medicine Coalition, 2014]. Биобанки – относительно новая отрасль, интерес к развитию которой возрос в начале 2000-х гг. благодаря существенному прогрессу в расшифровке генома человека [16].

В 2009 г. вышел специальный номер журнала Time «10 Ideas Changing the World Right Now», посвященный 10 идеям, которые оказывают существенное влияние на мир уже сегодня. В одной из статей А. Park (2009) рассматривает

биобанки как хранилище образцов, например, различных тканей, опухолевых клеток или цельной крови, используемое в качестве источника материала для фундаментальных и клинических исследований, разработке новых биомаркеров различных патологических состояний и лекарств. В своей статье автор не останавливается подробно на определении понятия «биобанк», но говорит о впечатляющих перспективах использования большого количества различных биологических образцов для фундаментальной науки и клиники [112].

В современной терминологии приняты не вполне устоявшиеся определения коллекций биологических образцов, криохранилищ и биорепозиториев. В последние годы многими авторами, институтами, организациями и сообществами предложено множество разных определений биобанка. Крупные международные сообщества, такие как Организация по Экономической Кооперации и Развитию (OECD), Международное Сообщество по Биологическим и Экологическим Репозиториям (ISBER), Европейская Комиссия (ЕС) и Исследовательская Инфраструктура Биобанков и Биомолекулярных ресурсов (BBMRI) имеют собственные определения для понятия «биобанк» [57].

Так, например, OECD определяет биобанк как коллекцию биологического материала, связанных с ним данных и сопутствующей информации, хранящуюся в организованной системе для нужд целой популяции или ее части (OECD. *Creation and Governance of Human Genetic Research Databases. Glossary of Statistical Terms*. 2016).

Международное Сообщество по Биологическим и Экологическим Репозиториям (ISBER) рассматривает биобанк как организацию, которая получает, хранит, обрабатывает и/или распространяет биологические образцы надлежащим образом. То есть занимается физическим размещением образцов и полным объемом связанной с ними работы (ISBER. *The International Society for Biological and Environmental Repositories*).

Свое определение дает и Европейская Комиссия. В опубликованной в 2010 году статье «*Biobanking in Europe: prospects for Harmonization and Networking*» говорится, что биобанк – это организованная коллекция, состоящая из

биологических образцов и связанных с ними данных, имеющих особое значение для фундаментальной науки и нужд персонализированной медицины [23].

Наконец, свое определение дает ведущая организация в области биобанков на данный момент, Исследовательская Инфраструктура Биобанков и Биомолекулярных ресурсов (BBMRI): Биобанки хранят биологические образцы и связанную с ними информацию, являясь, по сути, источником материала для развития биотехнологий, здравоохранения, исследований в области наук о жизни [20].

Многими авторами даны собственные определения биобанков. Очень простое, но широко принятое определение дали в своей статье Kauffmann и Cambon-Thomsen в 2008 году: биобанк – это организованная коллекция человеческого биологического материала и связанная с ним информация, которые хранятся для одной или более исследовательских целей [91].

Artene et al. (2013) четко описывают биобанк как структуру, состоящую из двух частей: 1) биологический материал, который собирается, обрабатывается и длительное время хранится; 2) база данных с демографическими и клиническими данными по каждому образцу, обеспечивающая процессы сбора образцов, их обработки, хранения, инвентаризации и распространения биологического материала [22].

Как видно, понятие «биобанк» трактуется различными авторами несколько по-разному, но всегда речь идет о трех основных его составляющих: 1) человеческом биологическом материале; 2) связанной с ним напрямую информации и сопутствующих данных; 3) этико-правовых вопросах, касающихся согласия пациентов, безопасности персональных данных и их защиты [57].

Биобанки стали неотъемлемой частью персонализированной медицины, что способствует прогрессу в понимании механизмов развития неблагоприятных состояний в клинической трансплантации и поиска их высокоспецифических биомаркеров: ишемически-реперфузионного повреждения, активации врожденной и адаптивной иммунных систем, системы комплемента, острого отторжения трансплантата и хронической дисфункции, явления апоптоза [9].

Использование современных медицинских технологий позволит системно подойти к изучению ишемии-реперфузии и основ реакций отторжения трансплантата, обеспечит оригинальный подход к назначению иммуносупрессивных препаратов исходя из генетических профилей донора и реципиента. Изучения процессов некроза и апоптоза, определение точного времени наступления необратимых изменений в органах и тканях поможет пересмотреть действующие критерии определения пригодности органов для трансплантации, уйти от эмпирического подхода к обоснованному [3].

В условиях сохраняющегося дефицита донорских органов необходимой мерой является оценка пригодности органа для трансплантации, а также улучшение качества трансплантируемого органа в дотрансплантационном периоде. Во всем мире ведутся исследования, направленные на поиск высокоспецифичных биомаркеров неблагоприятных состояний в трансплантации. Создание трансплантационных биобанков, сформированных по стандартной методике, должно гарантировать получение достоверных статистических и клинических данных, в результате оценки которых должны быть введены новые способы терапевтической коррекции ИРП в организме донора [2].

Развитие новых технологий в биофармацевтической и биотехнологической отрасли, а также прогресс в области персонализированной медицины требует создания биобанков в качестве ключевого компонента их инфраструктуры. Исследования новых способов медикаментозной защиты трансплантируемых органов, проводимые с использованием ресурсов биобанка, позволят улучшить качество получаемых трансплантатов, их пригодность к дальнейшей пересадке, увеличить срок функционирования трансплантата за счёт предупреждения развития ранней трансплантационной нефропатии увеличить «донорский пул» за счет использования доноров с расширенными критериями [9, 14].

Сбор, обработка и хранение различных типов образцов на всех этапах донорского процесса, во время трансплантации органов, а также в послеоперационном периоде может служить основой создания уникальных биобанков. Такие биобанки будут представлять собой матрицу для «сквозных»

проспективных лонгитюдных исследований. Использование современных геномных технологий, в том числе секвенирования следующего поколения, позволит системно подойти к изучению ишемии-реперфузии и генетических основ реакций отторжения трансплантата, обеспечит индивидуальный подход к назначению иммуносупрессивных препаратов исходя из генетических профилей донора и реципиента. В долгосрочной перспективе можно будет решать более амбициозные задачи, такие как изучение процессов «умирания» с точным определением момента наступления необратимых изменений. Это позволит пересмотреть существующие критерии определения пригодности органов для трансплантации, отойти от эмпирического подхода к генетически обоснованному [3].

Таким образом из анализа данных литературы следует, что в условиях сохраняющегося дефицита донорских органов необходимой мерой является оценка пригодности органа для трансплантации, а также улучшение качества трансплантируемого органа в дотрансплантационном периоде. Во всем мире ведутся исследования, направленные на поиск высокоспецифичных биомаркеров неблагоприятных состояний в трансплантации. Решение перечисленных проблем во многом зависит от эффективного использования принципов персонализированной медицины, в частности, перспективным направлением представляется создание трансплантационных биобанков и проведение различных исследований на их основе, как способ альтернативный формированию когорт реципиентов [3]. Представленные литературные данные указывают на актуальность настоящего научного исследования, результаты которого представлены в следующих главах.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристики донорских групп

Диссертационное исследование выполнено на основе материала, полученного в процессе ретроспективного и проспективного анализа клинических наблюдений 20 доноров с установленным диагнозом «Смерть головного мозга» (ДСМ). Вся группа ДСМ была разделена на 2 подгруппы в зависимости от применения поликлональных антител: 10 ДСМ – в исследуемой группе, 10 ДСМ – в группе сравнения.

Диагностика смерти мозга у доноров выполнялась в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 25 декабря 2014 года N 908н «О Порядке установления диагноза смерти мозга человека». Эксплантации почек у таких доноров выполнялись в соответствии с действующим Федеральным законом от 21.11.2011 N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (Статья 47. Донорство органов и тканей человека и их трансплантация (пересадка) и Законом Российской Федерации от 22.12.1992 года №4180-1 «О трансплантации органов и тканей человека».

Эксплантация почек выполнялась у ДСМ обеих групп в следующих стационарах: Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Мариинская больница, Александровская больница, Елизаветинская больница, Городская больница №26, Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А. Л. Поленова (Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова) в 2017–2018 годах.

Кондиционирование ДСМ осуществлялось под руководством трансплантационного координатора стационара и при участии бригады Координационного Центра органного донорства (КЦОД). Все операции эксплантации выполнены хирургами КЦОД Санкт-Петербургского Научно-исследовательского Института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе.

Оценивались следующие характеристики доноров:

- Возраст
- Пол
- Индекс массы тела (ИМТ)
- Характер основного заболевания или травмы, приведшие к смерти мозга пациента
- Доза вазопрессорной поддержки (дофамин, норадреналин)
- Лабораторные показатели: креатинин и мочевины сыворотки крови, лейкоциты крови, ретроспективное исследование NGAL в моче
- Дозировка антитимоцитарного иммуноглобулина (АТГ) (Тимоглобулин)

Эксплантация у доноров не выполнялись, если были выявлены следующие обстоятельства, считающиеся общепринятыми противопоказаниями:

- Возраст менее 18 и более 60 лет
- Сведения о заболеваниях почек, злокачественных новообразованиях, системных заболеваниях, инфекционных процессах в брюшной полости, забрюшинном пространстве, генерализованных инфекциях
- Повреждение органов брюшной полости, забрюшинного пространства
- Протеинурия, макрогематурия, бактериурия
- Анурия
- Уровень креатинина сыворотки крови более 0,2 ммоль/л
- Нестабильная гемодинамика, требующая вазопрессорной поддержки высокими дозами катехоламинов (допамин более 15 мкг/кг/мин)
- Наличие маркеров инфекционных заболеваний: anti-HIV, anti-HCV, Hbs Ag, RW.

Характеристики группы сравнения и исследуемой группы ДСМ приведены в таблице 2 и на рисунках 5–12, глава 2.1.1.

2.1.1 Сравнительные характеристики доноров группы сравнения и доноров исследуемой группы

У 10 доноров группы сравнения применялся обычный протокол эксплантации и последующей заготовки почек. Эксплантация осуществлялась по стандартной методике, перфузия проводилась раствором «Кустодиол» объёмом 12 литров, скорость потока составляла 100 мл/мин. Для высокопоточной перфузии использовались специальные системы «НТК-Perfusionset double line», производства фирмы Medos.

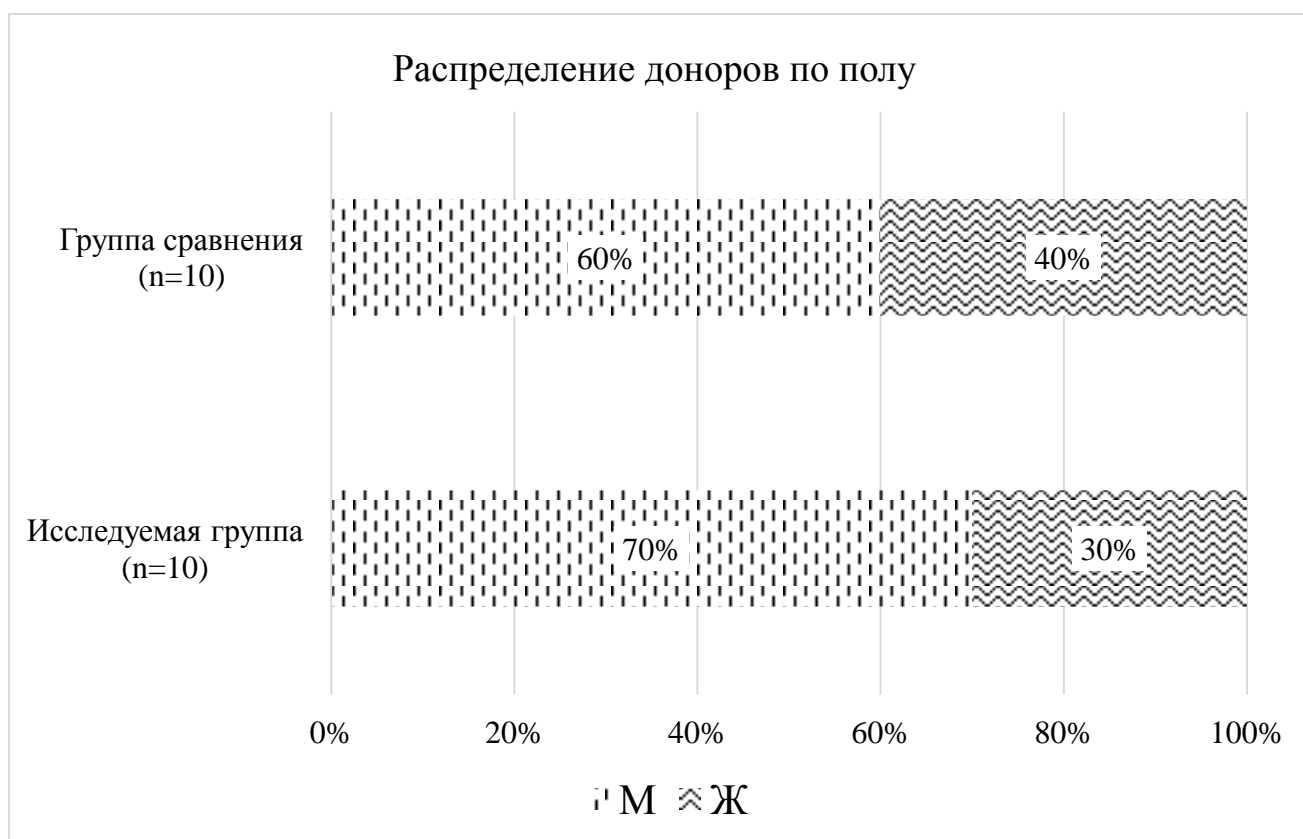


Рисунок 5 – Соотношение мужчин и женщин в донорских группах, % ($p > 0,05$)

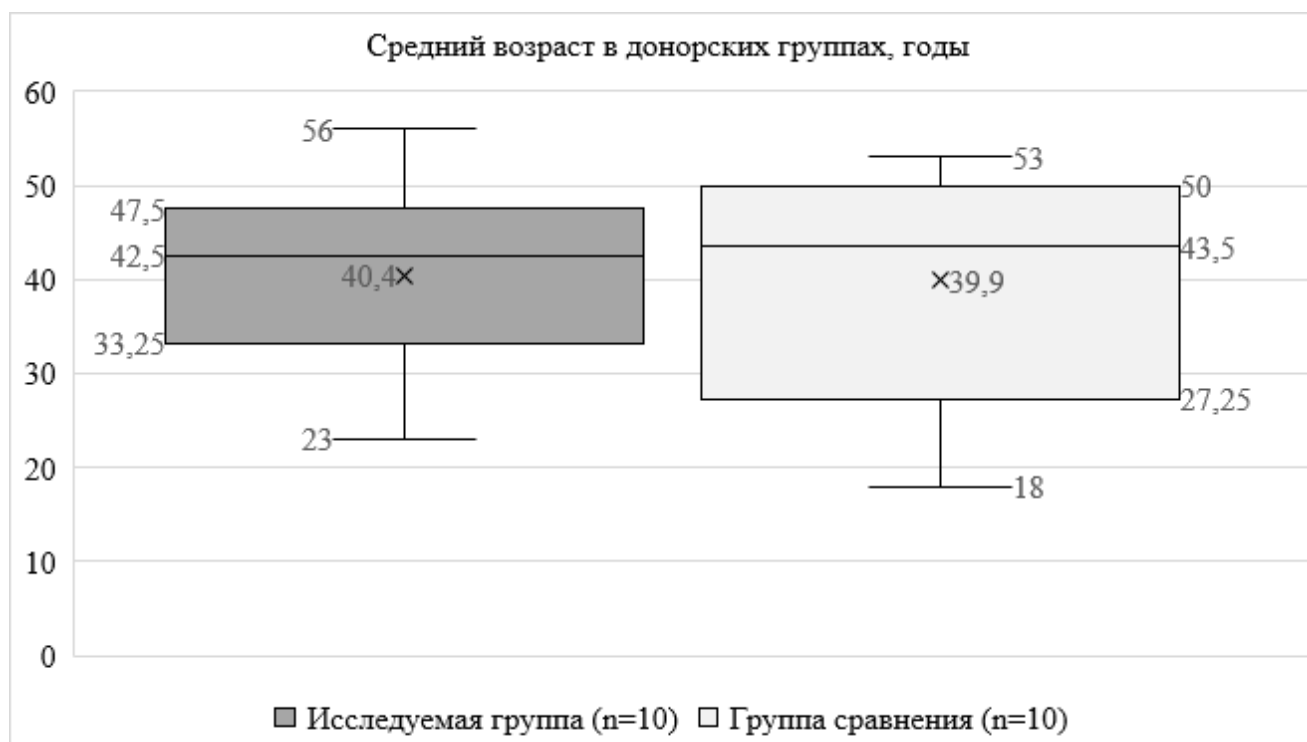


Рисунок 6 – Средний возраст в донорских группах, годы, ($p > 0,05$)

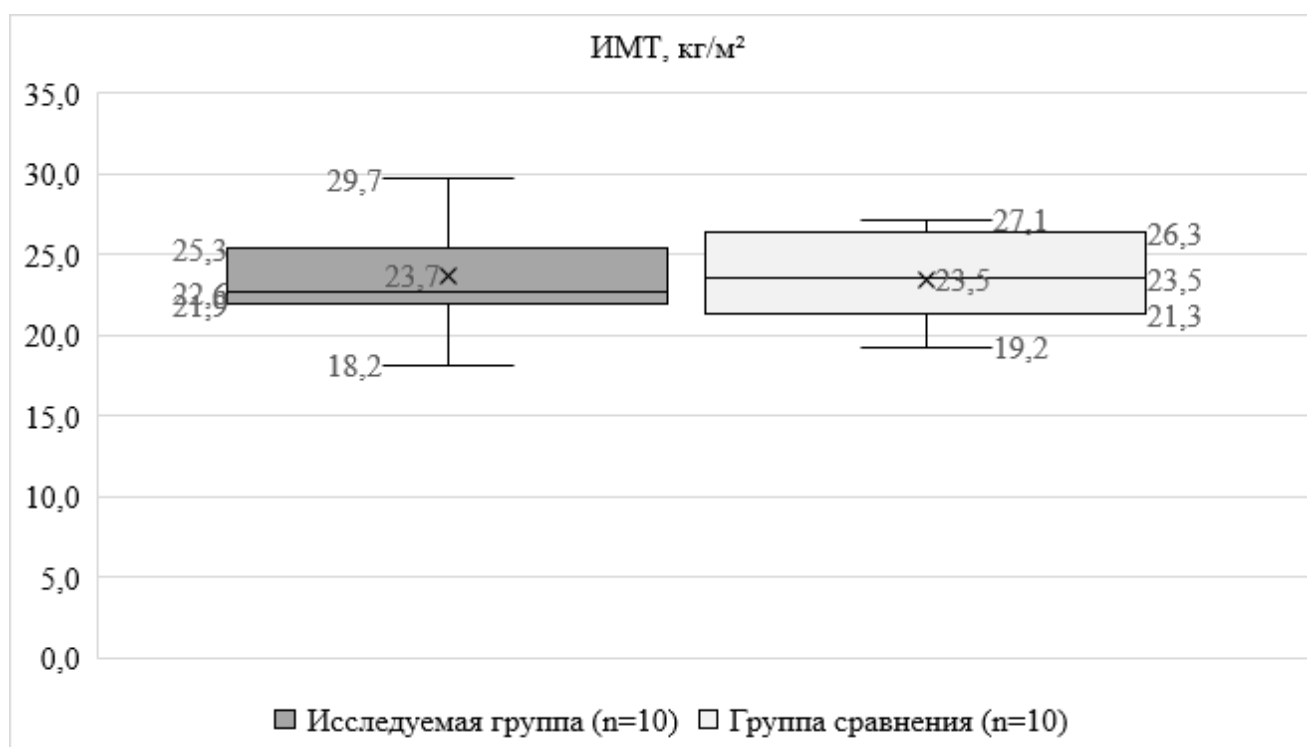


Рисунок 7 – Индекс массы тела у доноров исследуемой группы и группы сравнения, кг/м², ($p > 0,05$).

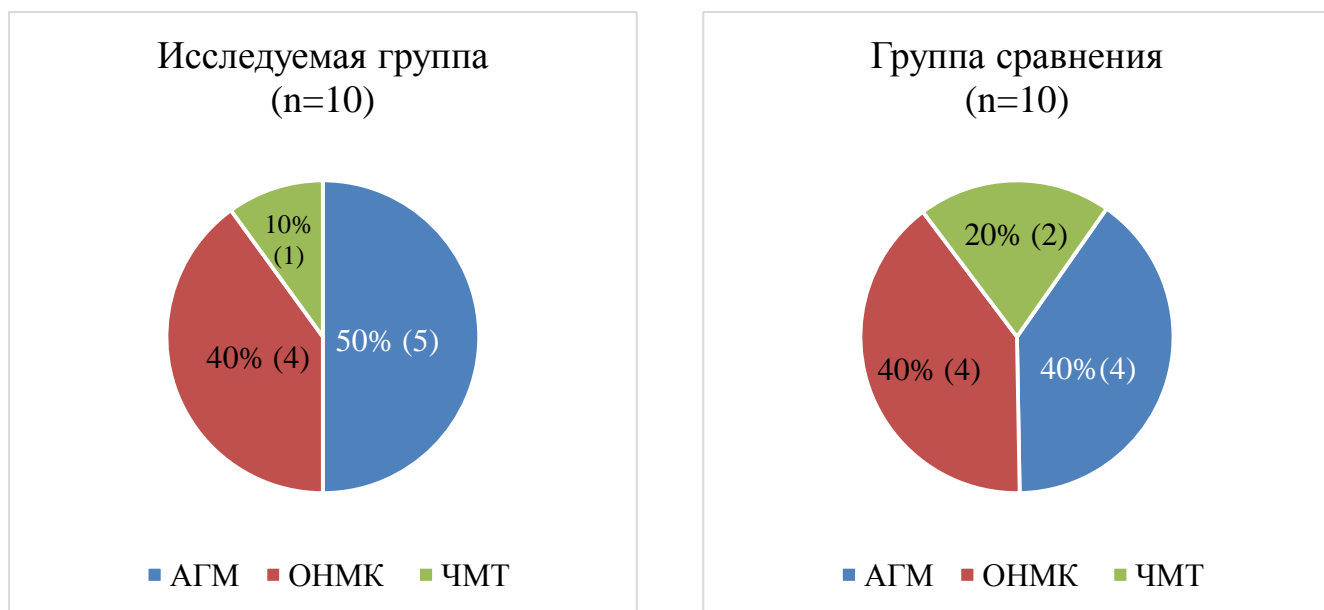


Рисунок 8 – Распределение диагнозов заболеваний, приведших к смерти мозга доноров в группе сравнения и исследуемой группе ($p > 0,05$)

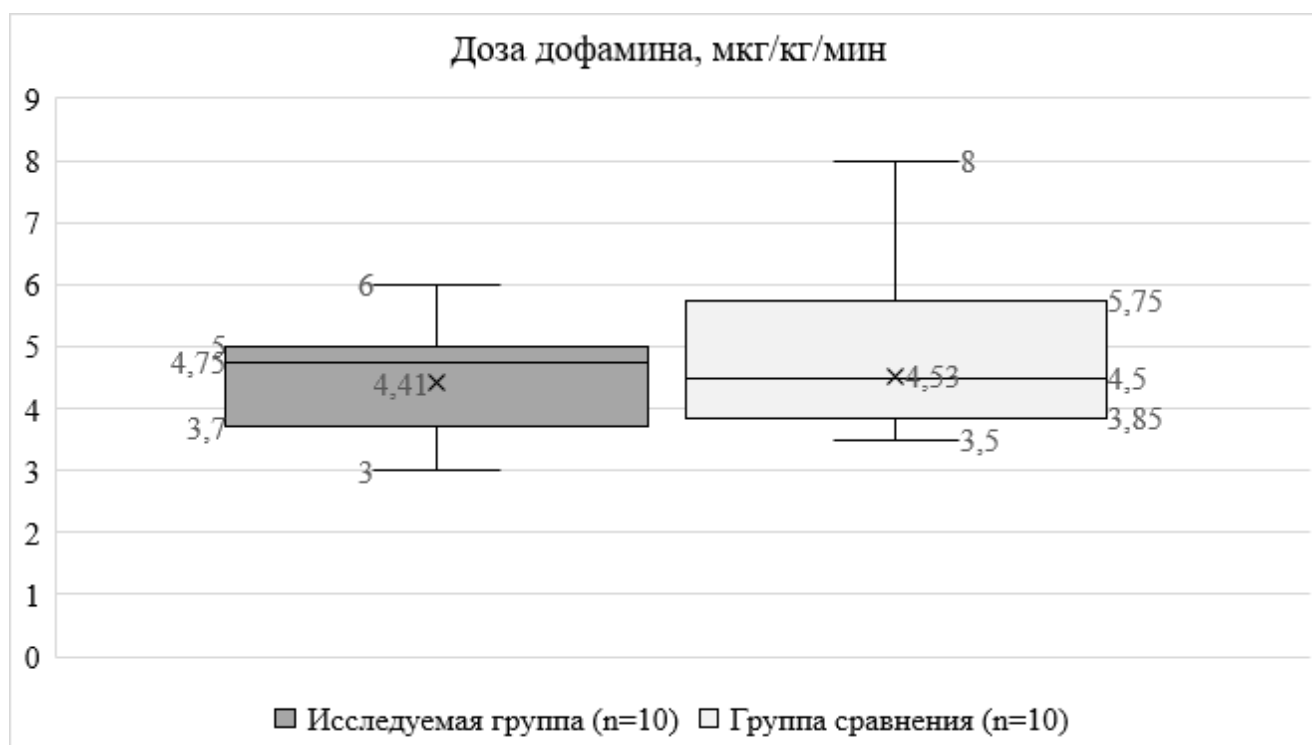


Рисунок 9 – Доза дофамина у доноров исследуемой группы и группы сравнения, мкг/кг/мин ($p > 0,05$)

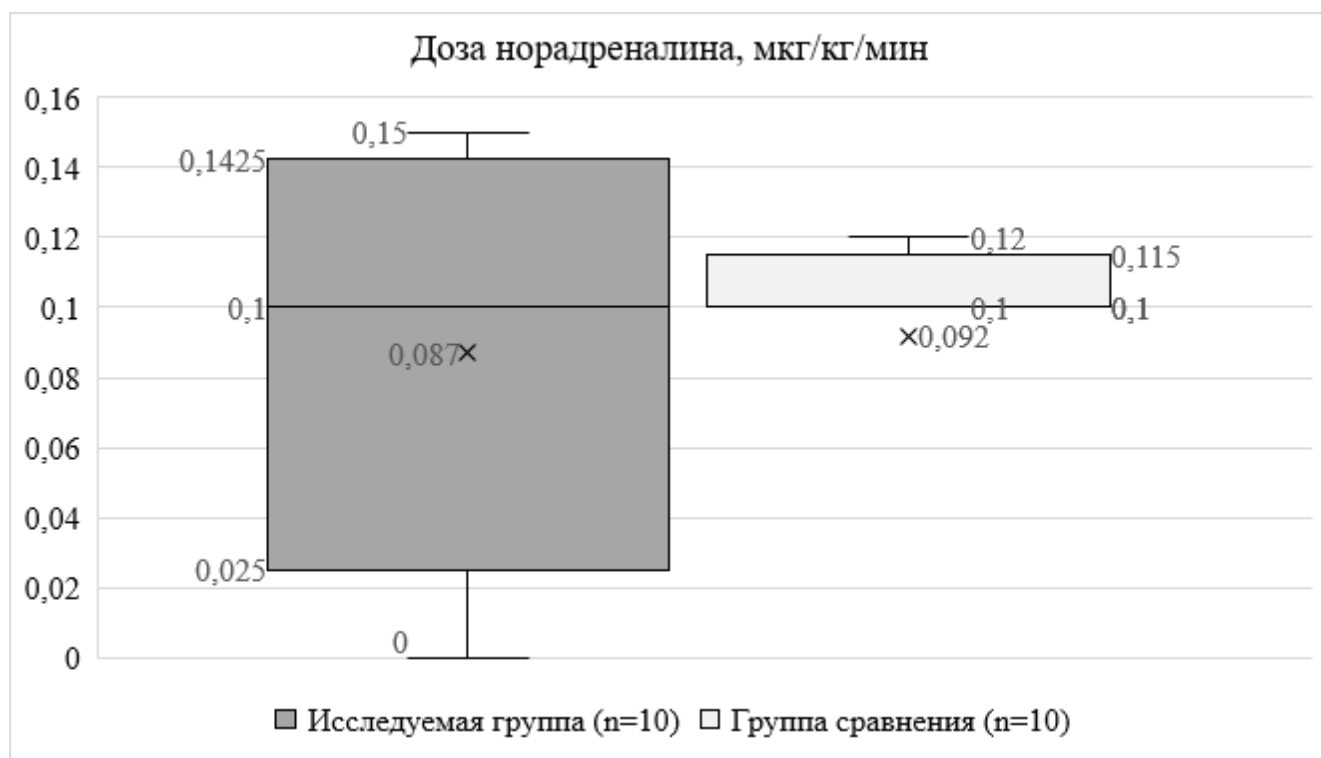


Рисунок 10 – Доза норадреналина у доноров исследуемой группы и группы сравнения, мкг/кг/мин ($p > 0,05$)

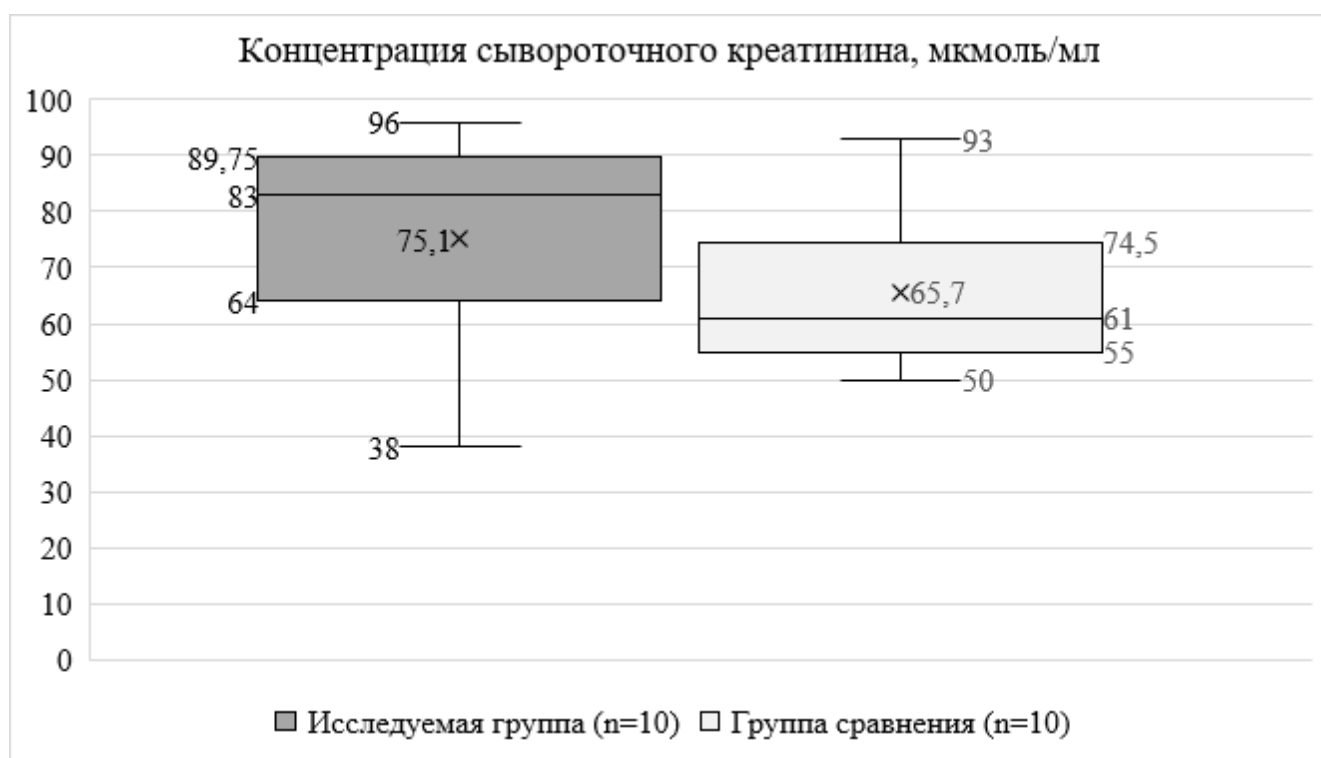


Рисунок 11 – Концентрация сывороточного креатинина у доноров исследуемой группы и группы сравнения, ммоль/л ($p > 0,05$)

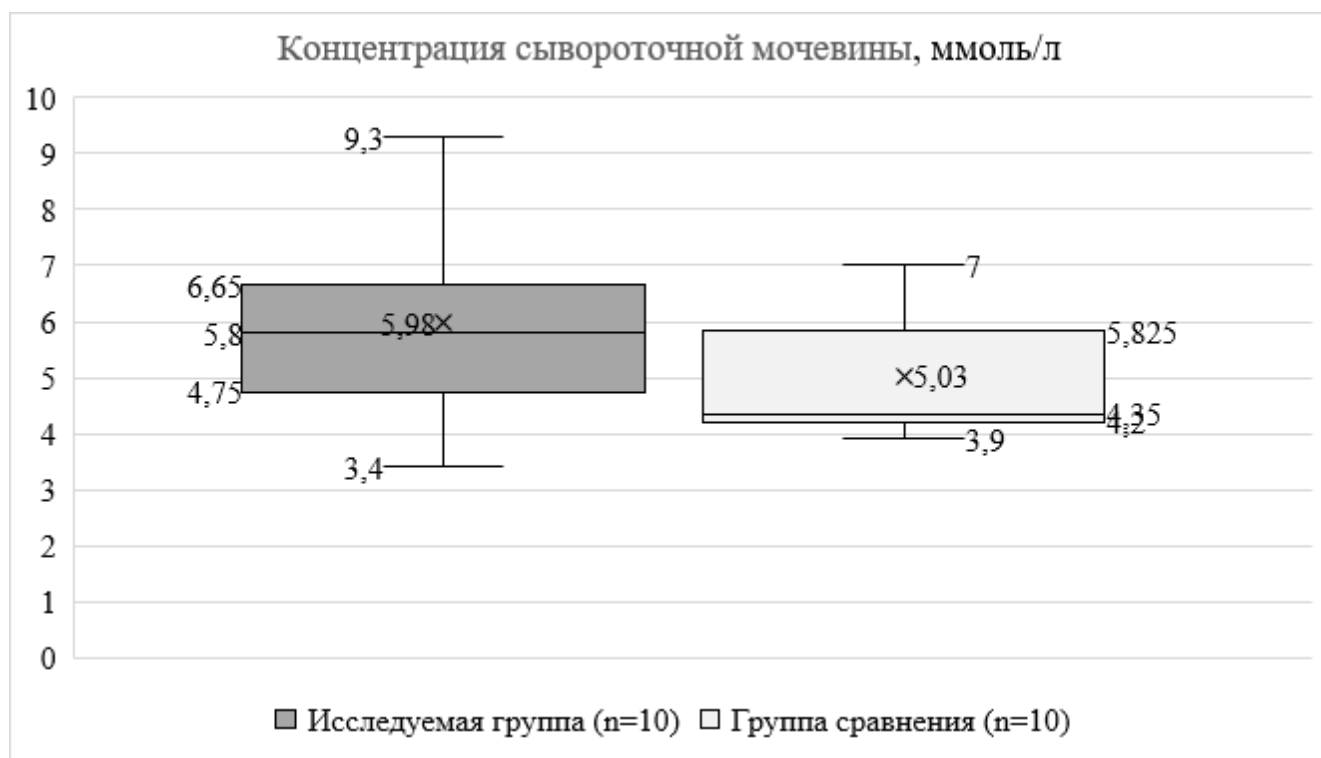


Рисунок 12 – Концентрация сывороточной мочевины у доноров исследуемой группы и группы сравнения, ммоль/л ($p > 0,05$)

Таблица 2 - Характеристика донорских групп

Показатель		Исследуемая группа (n=10)	Группа сравнения (n=10)	p
Мужской пол, n (%)		7 (70%)	6 (60%)	0,999
Возраст, лет		42,5 [31,5; 49]	43,5 [27,25; 50]	0,796
ИМТ, кг/м ²		22,6 [21,5; 26,4]	23,5 [20,8; 26,8]	0,971
Диагнозы:	ЧМТ*	1 (10%)	2 (20%)	-
	ОНМК**	4 (40%)	4 (40%)	-
	АГМ***	5 (50%)	4 (40%)	-
Дофамин, мкг/кг/мин		4,75[3,45;5,25]	4,5 [3,725; 6]	0,971
Норадреналин, мкг/кг/мин		0,1 [0; 0,15]	0,1 [0,75; 0,13]	0,971
Креатинин, мкмоль/мл		83 [55; 91,5]	61 [54; 78,25]	0,218
Мочевина, ммоль/л		5,8 [4,5; 7,1]	4,35 [4,175; 6,1]	0,247
Доза Тимоглобулина, мг		567 [540; 662,5]	0 [0; 0]	0,000

* ЧМТ – черепно-мозговая травма; ** ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения; *** АГМ – разрыв аневризмы сосудов головного мозга.

Представленные в таблице 2 характеристики донорских групп и проверка достоверности вероятности выполнены с применением непараметрического метода χ^2 с поправкой Йетса.

В исследуемую группу вошли 10 доноров, операциям эксплантации у которых предшествовало введение препарата поликлональных антител Тимоглобулин. После первичного осмотра ДСМ из исследуемой группы и принятия решения о планируемой эксплантации почек, выполнялось введение Тимоглобулина. Протокол введения поликлональных антител является авторской разработкой и подробно представлен ниже в результатах исследования. Перед введением Тимоглобулина выполнялся забор крови у ДСМ из центрального венозного катетера в вакуумную пробирку BD Vacutainer® Plus (Becton Dickinson and Company, США) объёмом 3 мл с этилендиаминтетраацетатом с фиолетовой крышкой. Сразу же после взятия образца пробирку переворачивали 5–7 раз для лучшего перемешивания крови и антикоагулянта. С целью отделения плазмы выполнялось центрифугирование на аппарате Hermle Z206A производства LaborTechnik (Швейцария) со скоростью 3000 об/мин в течение 15 минут. Клинический анализ крови выполнялся в лаборатории стационара – донорской «базы». Процедура взятия крови и выполнение клинического анализа крови повторялась у ДСМ исследуемой группы спустя 6 часов после введения Тимоглобулина до начала холодовой перфузии почек во время эксплантации.

Исследуемая группа ДСМ, трансплантаты, полученные от этих ДСМ, результаты операций пересадок этих почек, сравнивались с контрольной группой. Также сравнивался уровень лейкоцитов крови по данным клинических анализов ДСМ, выполненных до и спустя 6 часов после начала введения Тимоглобулина.

Эксплантация и холодовая пассивная проточная перфузия почек осуществлялась по стандартной методике, аналогичной ДСМ из группы сравнения.

Сравнение статистического распределения нозологических форм заболеваний исследуемой и группы сравнения показывает, что статистически значимых различий по этому признаку в сравниваемых группах нет (Рисунок 7).

Также не было статистически значимых различий по возрастному и половому признакам в составе донорских групп (Рисунки 5 и 6).

Основные характеристики донорских групп, не зависящие от применения поликлональных антител, представлены в сводной таблице 2. Таким образом, обе группы доноров были однородны и не имели статистически достоверных различий, которые могли бы повлиять на оценку результатов трансплантаций почек.

2.2 Характеристики групп реципиентов

Реципиенты почек в зависимости от вида полученного трансплантата от вышеуказанных ДСМ были разделены на 2 подгруппы: 20 реципиентов вошли в исследуемую группу и 20 – в группу сравнения.

Пациентам выполнялись трансплантации почек одной бригадой хирургов в НИИ СП им. И.И. Джанелидзе и ПСПбГМУ им. И. П. Павлова в 2017–2018 годах.

Реципиентами почек стали пациенты с хронической болезнью почек V стадии, получающие заместительную почечную терапию методом программного гемодиализа.

Оценивались следующие характеристики реципиентов:

- Возраст
- Пол
- ИМТ
- Основное заболевание, приведшее к терминальной почечной недостаточности
- Стаж программного гемодиализа
- Время холодовой ишемии (ВХИ) трансплантата почки

Характеристики реципиентов почек представлены в таблице 3 и на рисунках 13–18.

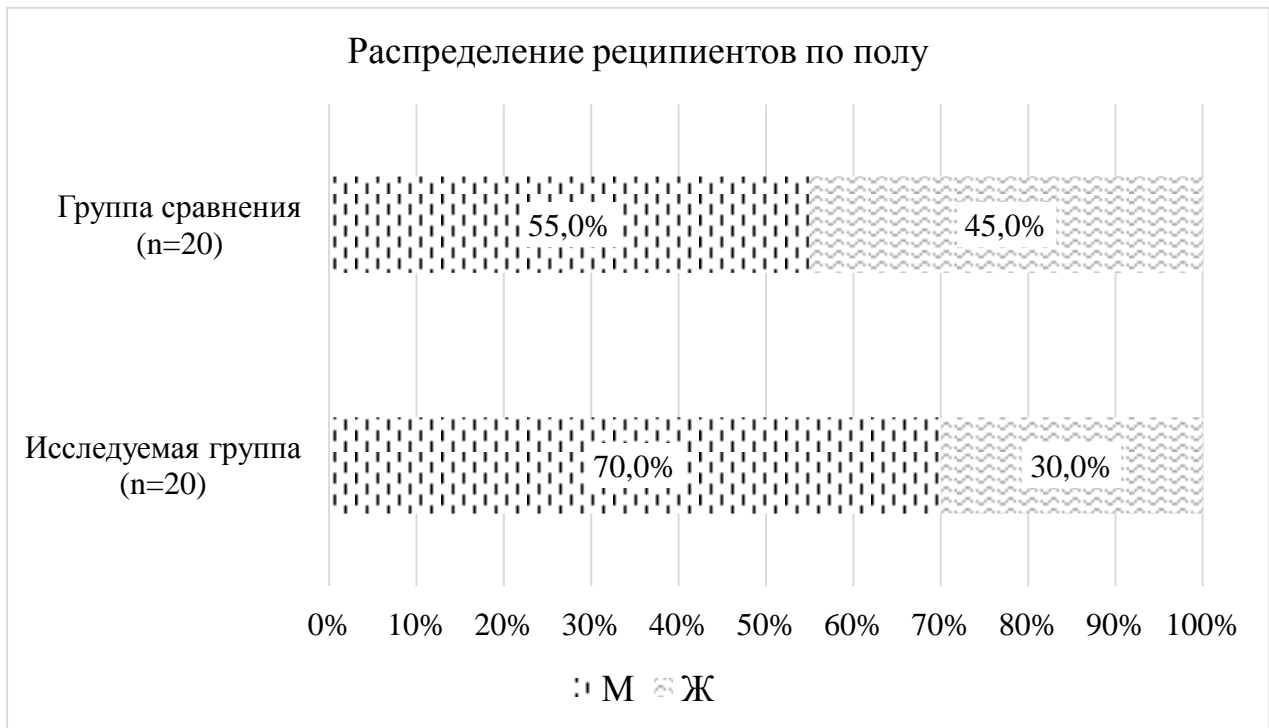


Рисунок 13 – Распределение реципиентов в группе сравнения и исследуемой группе по полу ($p > 0,05$). М – мужской, Ж – женский

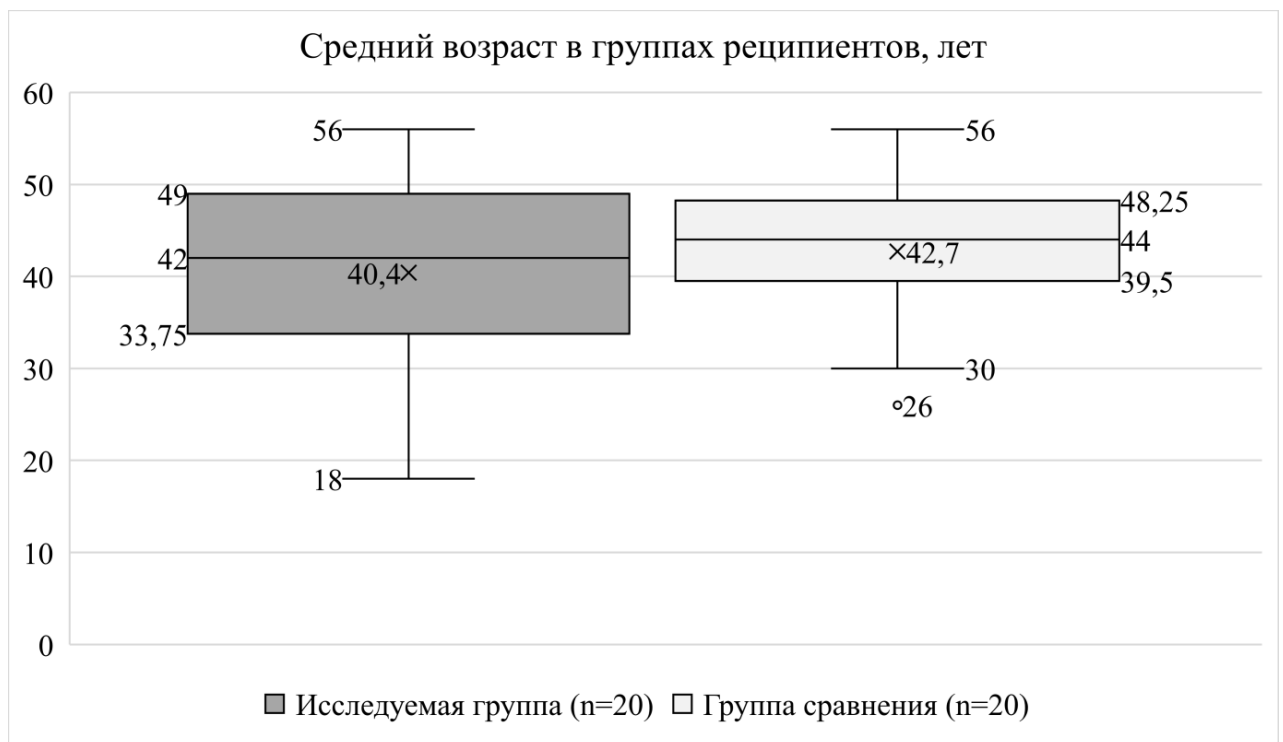


Рисунок 14 – Средний возраст в группах реципиентов, лет ($p > 0,05$)

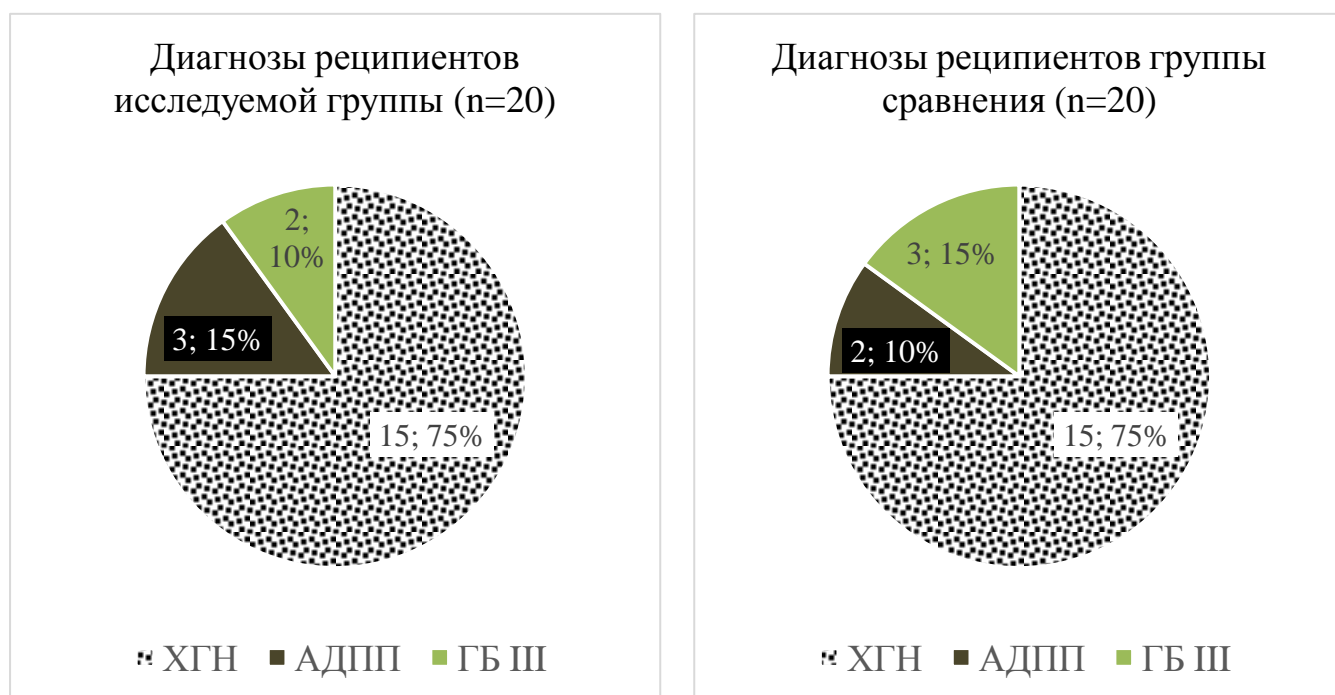


Рисунок 15 – Распределение реципиентов исследуемой группы и группы сравнения по диагнозу заболевания, приведшего к терминальной почечной недостаточности. ХГН – хронический гломерулонефрит, АДПП – аутосомно-доминантный поликистоз почек, ГБ – Гипертоническая болезнь III ст.

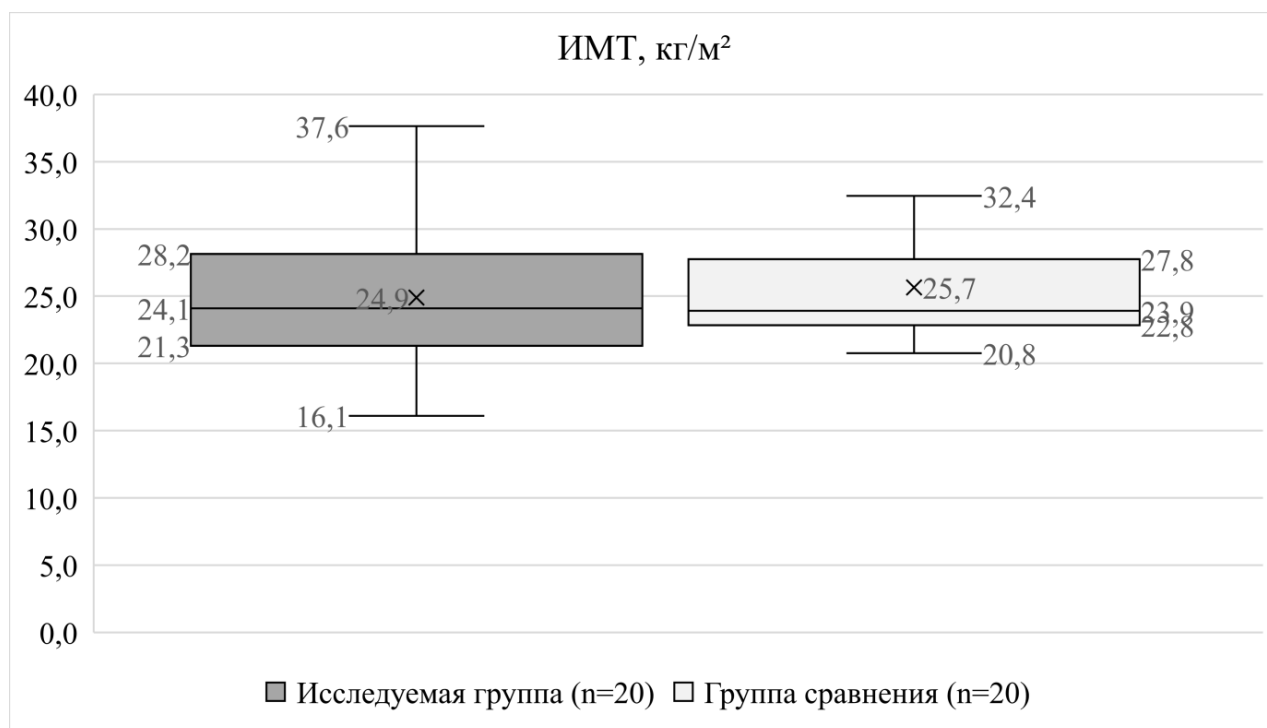


Рисунок 16 – Индекс массы тела (ИМТ) у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения, кг/м² ($p > 0,05$)

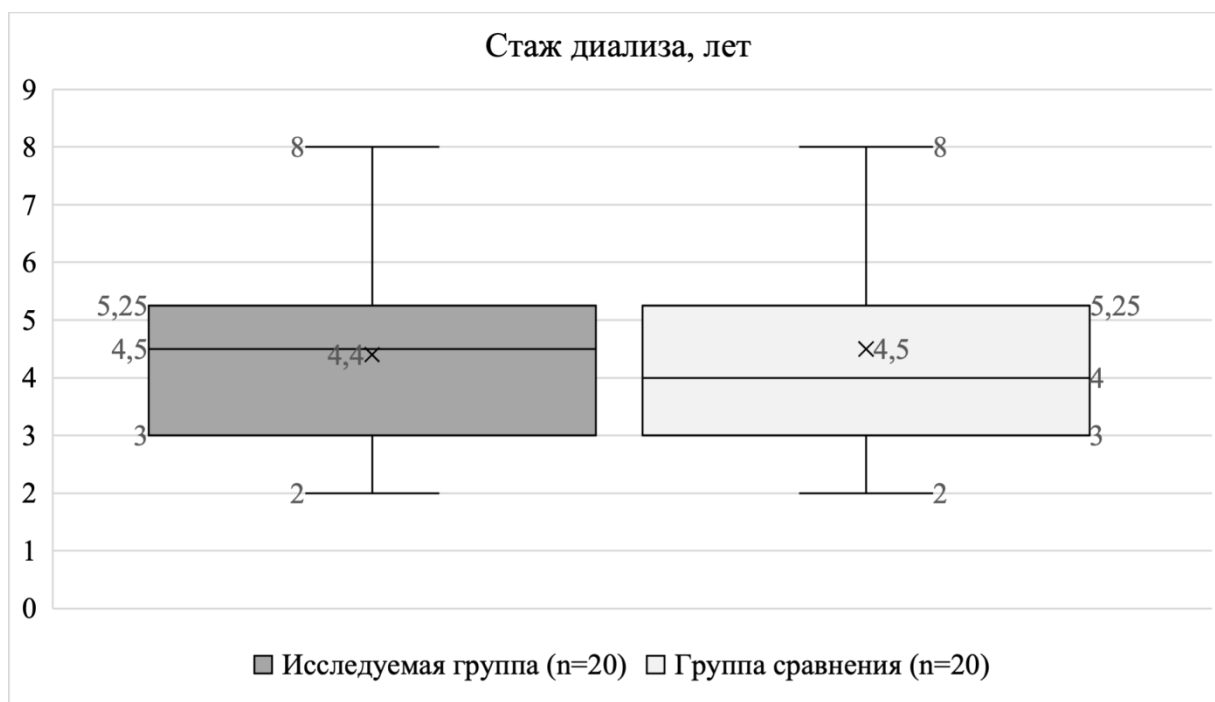


Рисунок 17 – Стаж диализа у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения, лет ($p > 0,05$)

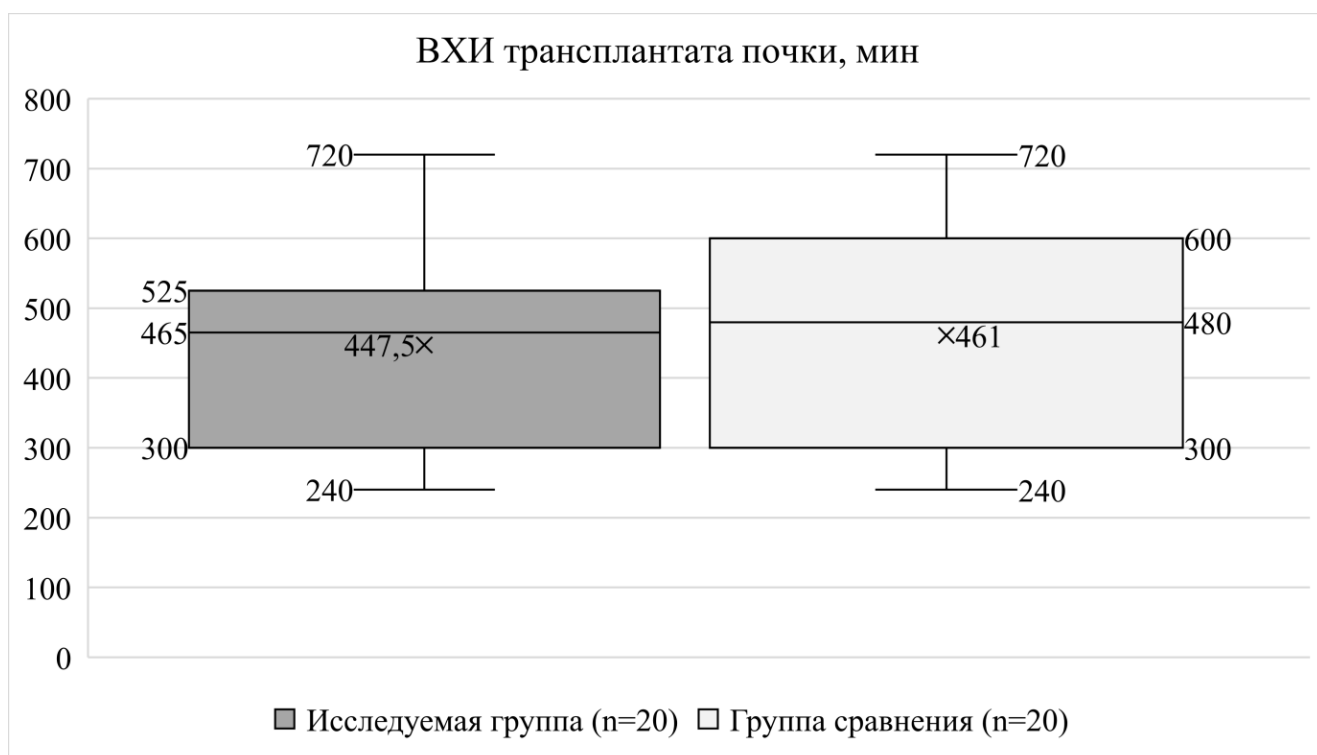


Рисунок 18 – Время холодной ишемии (ВХИ) трансплантата почки у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения, мин ($p > 0,05$)

Таблица 3 – Характеристики групп реципиентов

Показатель	Исследуемая группа (n=20)	Группа сравнения (n=20)	p
Мужской пол, n (%)	14 (70%)	11 (55%)	0,514
Возраст, лет	42 [31,2;49]	44 [36,5;48,75]	0,620
ИМТ, кг/м ²	24,09 [21,134;28,31]	23,9 [22,4;29,5]	0,461
Диагноз ХГН ¹	15(75%)	15(75%)	-
АДПП ²	2(10%)	3(15%)	-
ГБ III ст. ³	3(15%)	2(10%)	-
Стаж диализа, лет	4,5[3;5,75]	4[3;5,75]	0,741
ВХИ ⁴ трансплантата, мин	465 [300;535]	480 [260;600]	0,841

¹ХГН – Хронический гломерулонефрит; ²АДПП – Аутосомно-доминантный поликистоз почек; ³ГБ III ст. – Гипертоническая болезнь III стадии, ⁴ВХИ – время холодовой ишемии трансплантата

Представленная в таблице 3 характеристика групп реципиентов и проверка достоверности вероятности выполнены с применением непараметрического метода χ^2 с поправкой Йетса.

Подбор пар донор-реципиент осуществлялся по общепринятому протоколу – по группе крови, отрицательному лимфоцитотоксическому тесту («кросс-матч»), по HLA – A, B, Dr - антигенам. Иммунологические исследования выполнены в Городской лаборатории иммуногенетики и серодиагностики НИИ СП им. И.И. Джанелидзе.

Таким образом, различия по полу, возрасту, характеру заболевания в группах реципиентов не были статистически значимыми и не могли повлиять на оценку результатов пересадок почек.

2.3 Характеристики созданного в ходе исследования трансплантационного биобанка

С 2015 года созданный на базе Санкт-Петербургского координационного центра органного донорства (СПБКЦОД) трансплантационный биобанк постоянно пополняется биологическими образцами, получаемых от эффективных доноров, реципиентов в раннем и позднем послеоперационных периодах и на этапе амбулаторного наблюдения. Каждому образцу присваивается уникальный идентификатор, образцы вносятся в электронную базу данных и сопровождаются исчерпывающим описанием, а также сопутствующей клинической информацией. Проводится «сквозная» нумерация образцов от донора к реципиенту. Образцы подвергаются аликвотированию и хранятся в соответствии с протоколом низкотемпературного хранения.

Биобанк представляет собой коллекцию биологических образцов и связанной с ними информации в доступной для анализа форме. На данный момент постоянно пополняемая коллекция биобанка насчитывает около 2000 образцов доступных для возможных исследований, о чём ранее мы рассказали в работе «Создание исследовательского многофункционального биобанка» [14].

Для функционирования исследовательского трансплантационного биобанка требуется квалифицированный сбор, обработка, характеристика и хранение образцов. Стандартизирована работа с документацией, базами данных, разработаны алгоритмы первичной обработки и хранения биообразцов, контроля надлежащего состояния проб.

Материальная база трансплантационного биобанка СПБКЦОД представлена:

- 1) Низкотемпературным холодильником Sanyo MDF-193AT (Япония);
- 2) Двумя сосудами Дьюара Taylor-wharton (Словакия) объемом 40 литров для хранения жидкого азота;
- 3) Портативным автономным принтером Brady BMP71 (США) для печати этикеток со штрихкодами для криопробирок;
- 4) Компьютером с предустановленным оригинальным программным обеспечением Freezer PRO, содержащем информацию о каждом биообразце;

- 5) Считывателем штрихкодов Motorola (США);
- 6) Расходными материалами: криопробирки объемом 2 мл с внешней резьбой марки Greiner (Австрия), криоштативы марки SSI (США), пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл производства фирмы Sarstedt (Германия).

Разработанный оригинальный протокол сбора биообразцов, а также подробное описание созданного трансплантационного биобанка будут подробно представлены в результатах исследования.

2.4 Протокол и процедура выполнения биопсии трансплантатов почек.

Протокол морфологического исследование биоптатов

Материалом исследования послужили инцизионные биоптаты почечных трансплантатов. От каждого трансплантата в стерильных условиях во время эксплантации после холодной перфузии раствором «Кустодиол» трубчатым скальпелем получали по 5 биоптатов. «Нулевая» биопсия выполнена у 20 доноров. Каждый биоптат помещался в градуированную криопробирку объемом 2 мл с внешней резьбой марки Greiner (Австрия). Для шоковой заморозки сразу после изготовления биообразцы помещались в резервуар с жидким азотом ($t -195\text{ }^{\circ}\text{C}$), далее хранение осуществлялось в криоштативах марки SSI (США) в низкотемпературном холодильнике при ($t -85-90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для фиксации перед иммуногистохимическим исследованием биообразцы помещались в забуференный раствор формалина в пробирки Эппендорфа объемом 1,5 мл производства фирмы Sarstedt (Германия).

Гистологическое исследование ткани почек выполнялось на базе Национального центра клинической морфологической диагностики (Санкт-Петербург) следующими методами:

- 1) Светооптическое исследование выполнено на парафиновых срезах с использованием следующих окрасок: гематоксилин-эозин, PAS-реакция.
- 2) Иммуногистохимическое исследование, выполненное иммунопероксидазным методом с использованием антител к молекуле клеточной адгезии эпителия (EpCAM).

Предварительная и окончательная фиксация нефробиоптатов осуществлялась в фиксирующем растворе Millonigs Formaline. После окончательной фиксации в течение 24 часов препараты подвергались гистологической проводке в автоматическом гистологическом процессоре Tissue-Tek VIP 6 (Sakura Finetek, Япония) с использованием раствора на основе изопропилового спирта «Изопреп» производства ООО «Биовитрум» (Россия), парафина для гистологической проводки «Гистомикс» производства ООО «Биовитрум». Далее препараты подвергались ручной заливке в парафин «Гистомикс» производства ООО «Биовитрум» для осуществления микротомии. Микротомия нефробиопсий проводилась лезвиями Thermo MX35 Ultra на микротоме Thermo HM325, полуавтоматическом микротоме с системой переноса срезов Thermo HM355S (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Монтирование срезов для иммуногистохимических окрасок выполнялось на предметное стекло Thermo Superfrost, срезы для постановки иммуногистохимических реакций с использованием антител помещались на предметные стекла Thermo Superfrost Plus. Срезы делались на разной глубине биоптата, что позволило изучить взятый материал детально.

Светооптические гистологические окраски: гематоксилином-эозином и PAS-реакция – выполнялись реактивами ООО «Биовитрум» с помощью автоматического стейнера Sakura Prisma. Окрашенные срезы заключались под покровную плёнку автоматическим аппаратом Sakura Film (Sakura Finetek, Япония).

Иммуногистохимические реакции производились с помощью реактивов компании Cell Marque, DBS (США) в автоматическом иммуногистохимическом стейнере Roche Benchmark Ventana Ultra (Швейцария).

Исследование препаратов осуществлялось на следующем оборудовании:

- 1) Микроскоп Nikon Eclipse NI;
- 2) Тубус Nikon Y-TV55;
- 3) Камера Nikon DS-Fi3;
- 4) Программное обеспечение NIS-Elements BR 5.20.00.

2.5 Статистическая обработка данных

Была проведена статистическая обработка данных с применением методов параметрического и непараметрического анализа с использованием электронных таблиц Microsoft Office Excel 2016 и IBM SPSS Statistics v.26. Для оценки соответствия нормальному распределению использовался критерий Шапиро-Уилка. В случае распределения отличного от нормального - при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей [Q1-Q3]. Так как исходно данных для анализа было мало – применялся непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Сравнение качественных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, но так как при ожидаемом явлении хотя бы в одной ячейке менее 10 нами рассчитывался критерий χ^2 с поправкой Йейтса, позволяющей уменьшить вероятность ошибки первого типа, т.е. обнаружения различий там, где их нет. В случае сравнения парных выборок использовался W-критерий Уилкоксона.

С целью изучения связи между количественными данными, распределение которых отличалось от нормального, использовался непараметрический метод – расчет коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Построение регрессионной модели определенного исхода бинарной логистической регрессионной модели. Отбор независимых переменных производился с использованием критерия исключения статистики Вальда. Мерой определенности, указывающей на ту часть дисперсии, которая может быть объяснена, служил показатель Найджелкерка, а для определения диагностической значимости количественных применялся метод анализа ROC-кривых. Качество модели, полученной данным методом, оценивалось исходя из значений площади под кривой со стандартной ошибкой и 95% доверительным интервалом (ДИ). Оценка функции выживаемости пациентов проводилась по методу Каплана-Мейера. Работа с трансплантационным биобанком осуществлялась с использованием программного обеспечения Freezer Pro.

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ПРОТОКОЛА ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ДОНОРОВ СО СМЕРТЬЮ МОЗГА ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК

3.1 Эмпирический подбор дозировки поликлональных антител у доноров со смертью мозга

На заседании локального этического комитета при Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте скорой помощи им. И.И. Джанелидзе от 15 марта 2017 года одобрено исследование «Применение поликлональных антител у доноров со смертью мозга при пересадке почек» и разрешена его дальнейшая разработка на базе ГБУ «СПб НИИ Скорой помощи им. И.И. Джанелидзе», что и сделало возможным решение первой задачи исследования.

В исследовании использовался препарат поликлональных антител Тимоглобулин (Thymoglobulin) производства Джензайм Поликлоналс С.А.С. (Франция) (Genzyme Polyclonals, S.A.S.). Форма выпуска препарата – флакон с лиофилизатом для приготовления раствора для инфузий. Флакон содержит действующее вещество – иммуноглобулин антитимоцитарный (кроличий) 25 мг, вспомогательные вещества: глицин - 50 мг, натрия хлорид - 10 мг, маннитол - 50 мг. Серия партии использованного препарата С4054Н03. Регистрационный номер сертификата соответствия согласно реестру сертификатов соответствия продукции, включенной в Единый перечень продукции РФ РОСС FR.ФМ08.А04114.

Согласно официальной инструкции препарата поликлональных антител Тимоглобулин (Sanofi Genzyme, Франция) через 1 сутки после введения у пациента развивается глубокая лейкопения и лимфопения (снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов более чем на 50% по сравнению с исходным значением). Согласно стандартным рекомендациям, диапазон

режима дозирования препарата составляет от 1 до 5 мг/кг/сутки в зависимости от показаний.

В ходе настоящего исследования в первом случае было принято эмпирическое решение о введении препарата в дозировке, в три раза превышающую официальную терапевтическую. В этой пробе не наблюдалось значимого снижения уровня лейкоцитов в клиническом анализе крови через 6 часов после введения препарата по сравнению с исходной точкой до введения. Такая дозировка оценена как недостаточная и неэффективная.

Во втором случае доза препарата была увеличена в пять раз. На втором часу наблюдения у ДСМ, отмечается серьёзное нарушение гемодинамических показателей со снижением АД до 70 и 50 мм рт. ст. по данным мониторинга. Каких-либо других причин, повлекших такие изменения, кроме как введение Тимоглобулина в указанной выше дозировке, выявлено не было. Состояние ДСМ было стабилизировано путём увеличения дозы вазопрессорной поддержки, а введение Тимоглобулина прекращено. Данное событие трактовано как серьёзный побочный эффект от введения препарата вследствие пятикратного увеличения дозы. Такая дозировка была расценена как избыточная и недопустимая по причине развития выраженной сердечно-сосудистой недостаточности у ДСМ.

Учитывая данные выполненных ранее проб и полученные при этом неудовлетворительные результаты, имеющееся ограничение по времени на введение препарата ДСМ (соответствует временному отрезку, требующегося на процедуру диагностики смерти мозга у донора), было принято о четырёхкратном увеличении дозы Тимоглобулина по сравнению со стандартным режимом дозирования для достижения максимальной редукции количества мобилизованных лейкоцитов.

После первичного осмотра ДСМ бригадой в составе анестезиолога-реаниматолога и хирурга КЦОД, а также трансплантационного координатора стационара и принятия решения о начале процедуры диагностики смерти головного мозга и планировании эксплантации почек, препарат Тимоглобулин

вводился в организм донора в течение 6 часов в 4-кратной терапевтической дозе. Дозировка препарата составила 8 мг/кг массы тела. Препарат растворялся в 50,0 мл физиологического раствора, вводился в центральный венозный катетер с использованием инфузионного одношприцевого насоса Sensitec WZ-50С6Т со скоростью 0,14 мл/мин.

Ниже пойдет речь о первичных результатах лабораторных исследований при применении разработанного протокола использования Тимоглобулина для редукции лейкоцитов из системы кровообращения доноров.

3.2 Оценка влияния истощающих поликлональных антител на лабораторные показатели у доноров со смертью мозга при кондиционировании в доэксплантационном периоде

При оценке количества лейкоцитов у ДСМ исследуемой группы до и после введения Тимоглобулина обнаружена статистически значимая взаимосвязь ($p < 0,001$) в отношении эффекта от введения Тимоглобулина абсолютного значения лейкоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов ($p=0,02$), моноцитов ($p=0,002$), тромбоцитов ($p=0,023$, относительного значения моноцитов) (Таблица 4, Рисунки 19, 21, 23 – 26).

В то время как относительное значение нейтрофилов и лимфоцитов не имели статистической зависимости $p > 0,05$ (Таблица 4, Рисунки 20, 22).

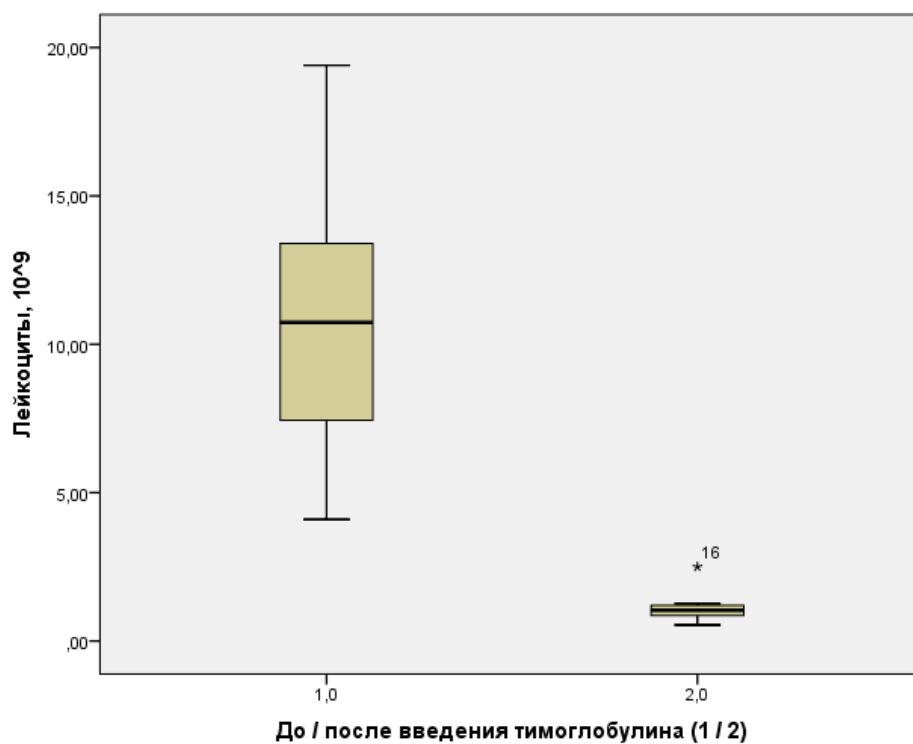


Рисунок 19 – Концентрация лейкоцитов (абсолютных) крови у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

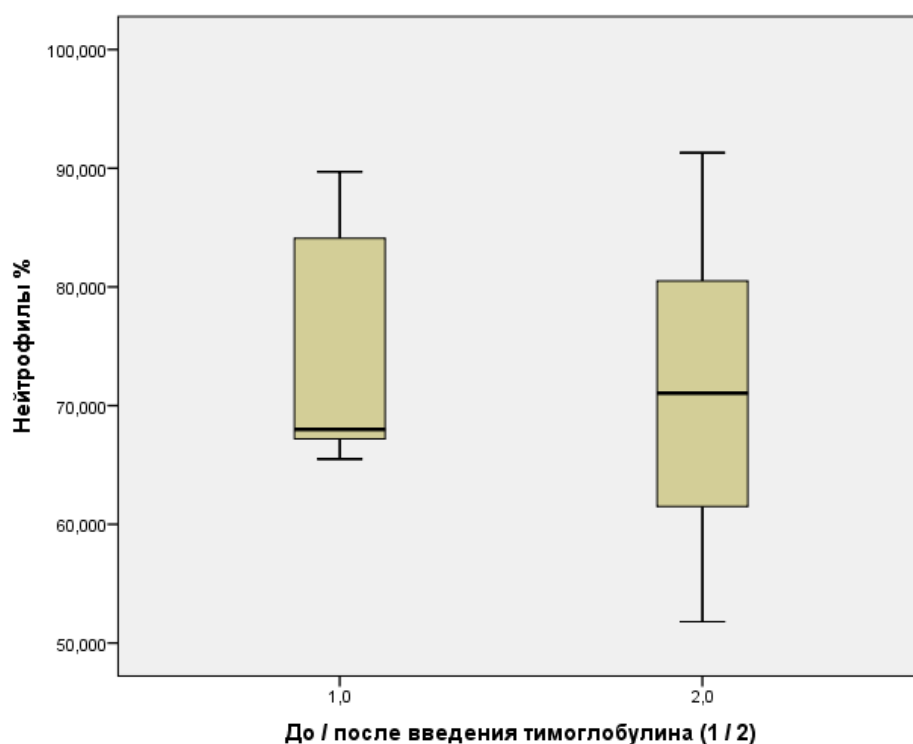


Рисунок 20 – Концентрация нейтрофилов (относительных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

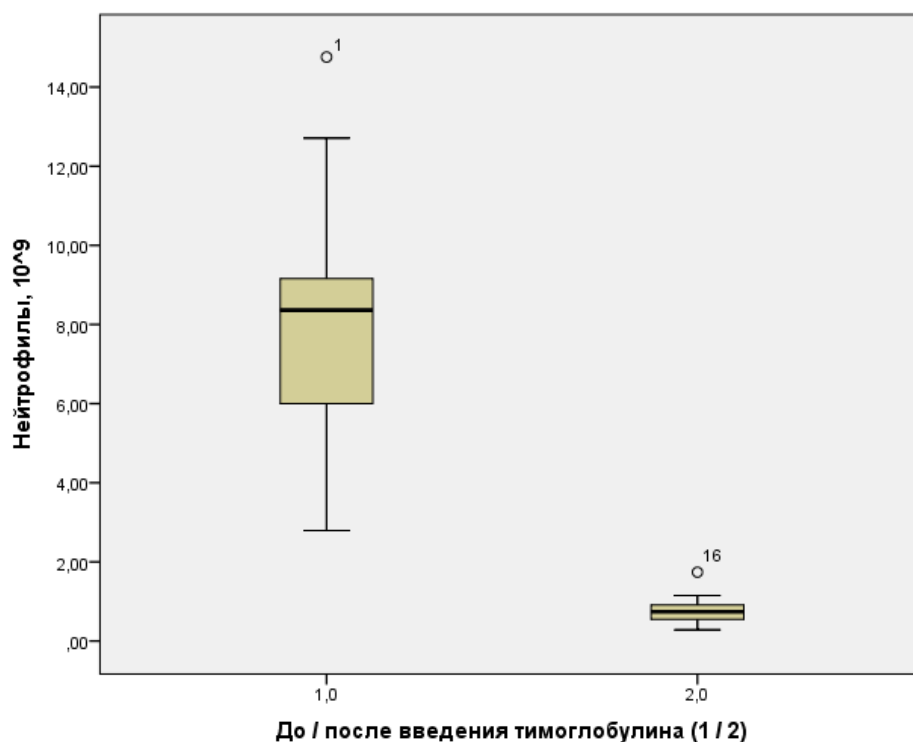


Рисунок 21 – Концентрация нейтрофилов (абсолютных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

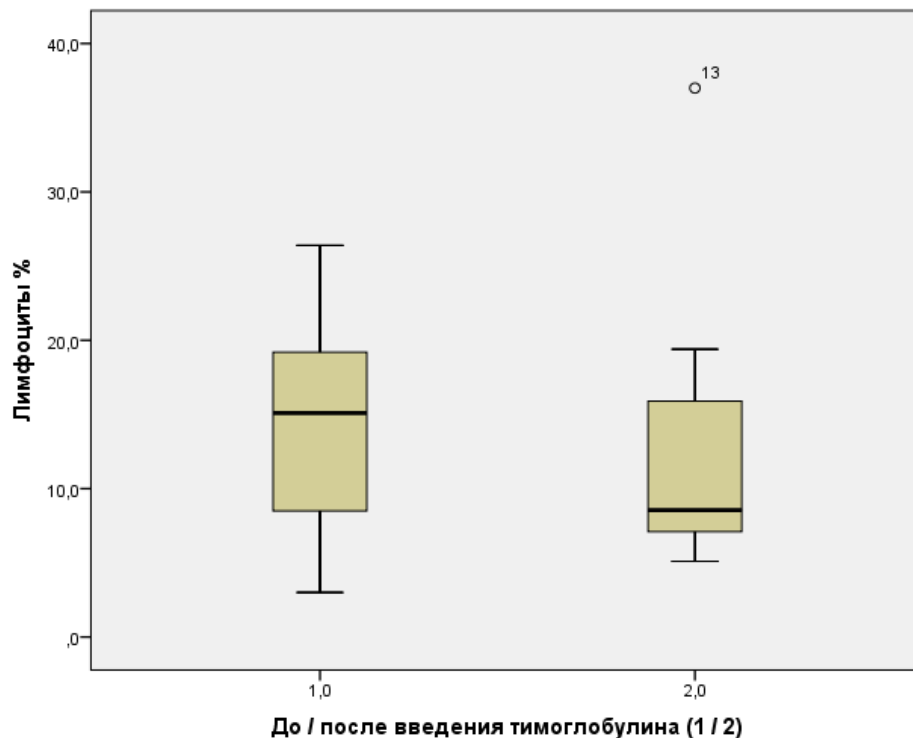


Рисунок 22 – Концентрация лимфоцитов (относительных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

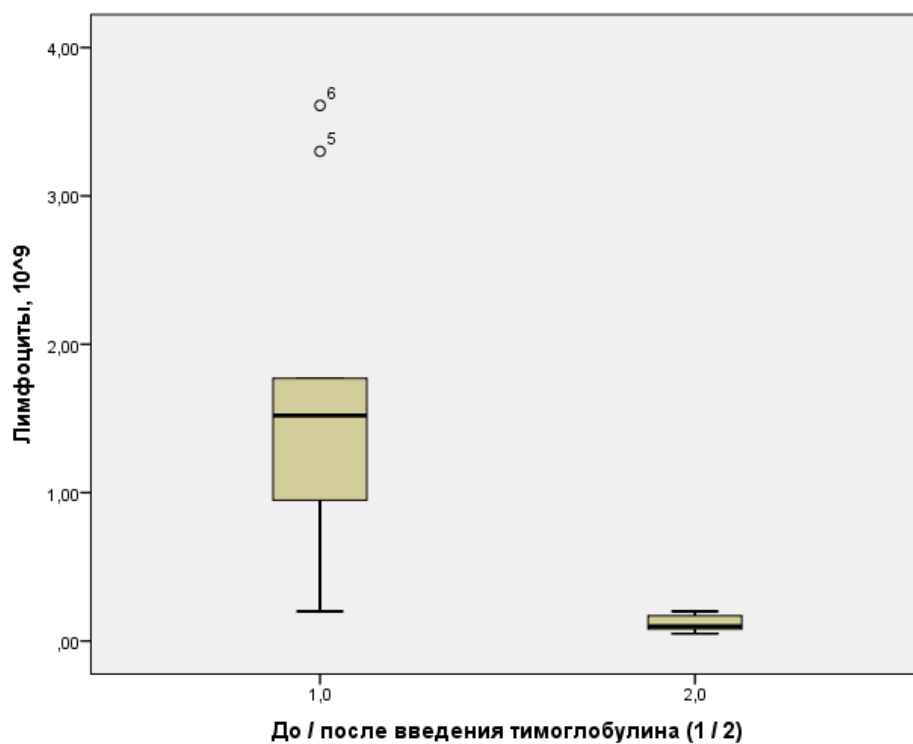


Рисунок 23 – Концентрация лимфоцитов (абсолютных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

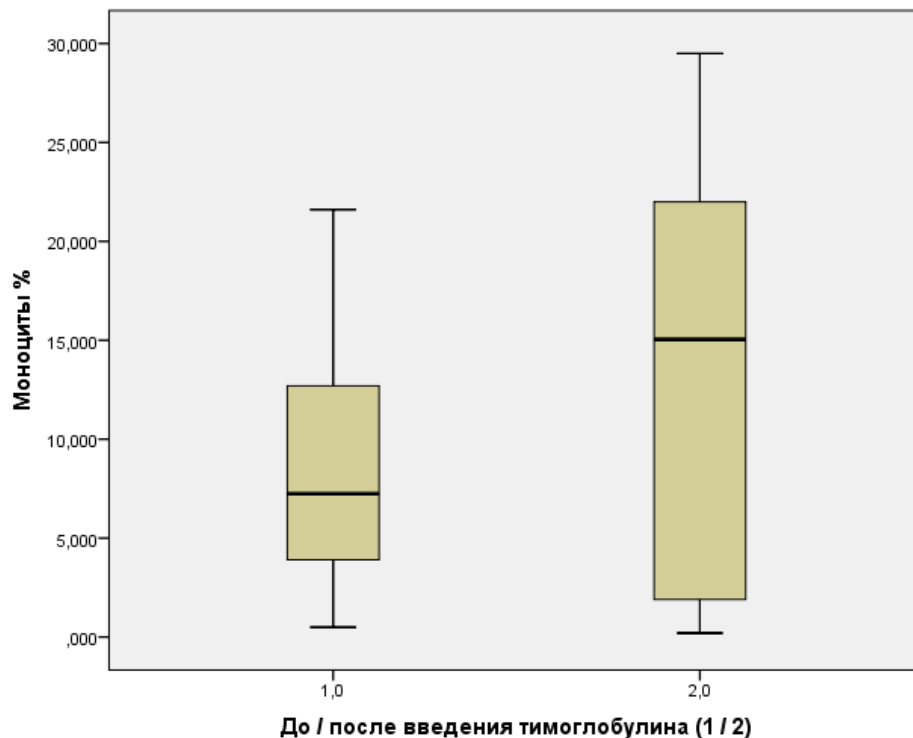


Рисунок 24 – Концентрация моноцитов (относительных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

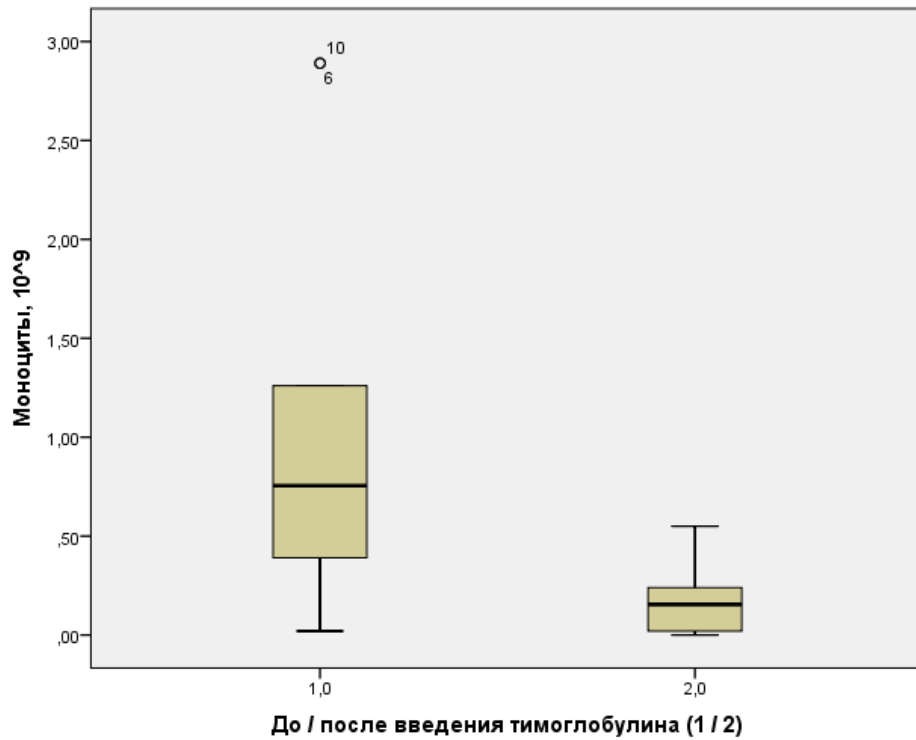


Рисунок 25 – Концентрация моноцитов (абсолютных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

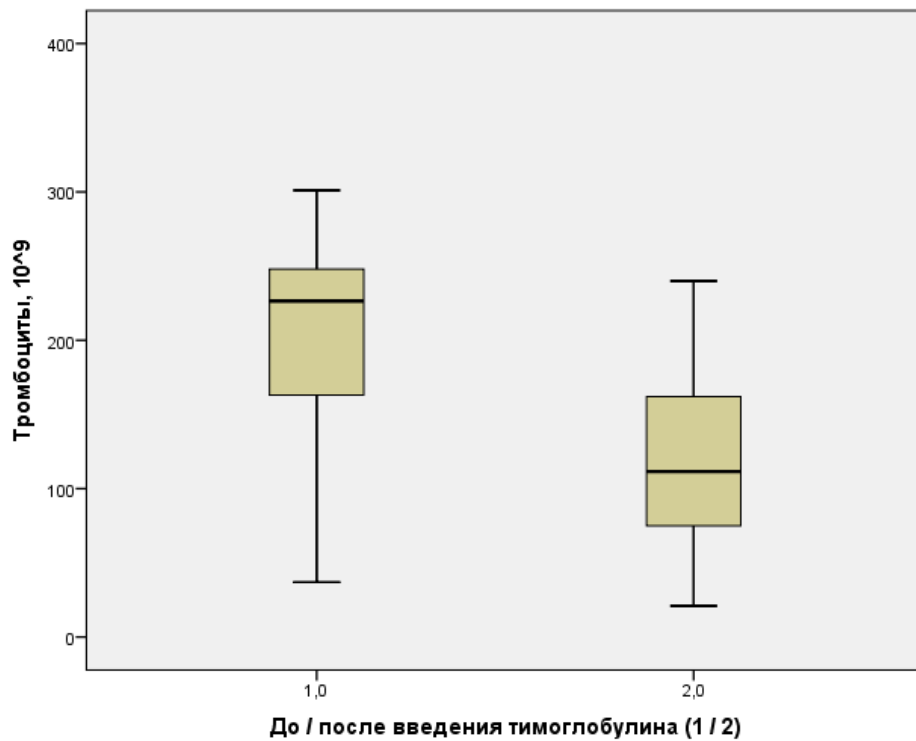


Рисунок 26 – Концентрация тромбоцитов (абсолютных) у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина ($p < 0,05$)

Таблица 4 - Оценка статистически значимых отличий в выборках до и после введения Тимоглобулина

Показатель	U Манна- Уитни	W Вилкоксона	Z	Асимпто тическая значимость (2-сторонняя)	Точная знч. [2* (1- сторон. знач.)]
Лейкоциты, 10*9	0	55	-3,78	0	,000 ^b
Нейтрофилы, %	44	99	-0,454	0,65	,684 ^b
Нейтрофилы, 10*9	0	55	-3,781	0	,000 ^b
Лимфоциты, %	35	90	-1,134	0,257	,280 ^b
Лимфоциты, 10*9	0,5	55,5	-3,747	0	,000 ^b
Моноциты, %	37	92	-0,983	0,326	,353 ^b
Моноциты, 10*9	10,5	65,5	-2,988	0,003	,002 ^b
Тромбоциты, 10*9	20	75	-2,268	0,023	,023 ^b
NGAL*	0	55	-3,78	0	,000 ^b

*NGAL – Липокалин, связанный с нейтрофильной желатиназой

3.3 Сравнение результатов лабораторных исследований у доноров исследуемой и контрольной групп

Развёрнутый клинический анализ крови у ДСМ выполнялся перед введением Тимоглобулина непосредственно перед началом холодовой перфузии.

По данным проведенного сравнения результатов клинического анализа крови групп: в исследуемой группе после введения Тимоглобулина наблюдалась устойчивая лейкопения $1,5 \pm 0,18 \times 10^9/\text{л}$ (Таблица 5, Рисунок 27), тогда как в группе сравнения отмечался лейкоцитоз $11,3 \pm 0,16 \times 10^9/\text{л}$ (Таблица 5, Рисунок 28).

Таблица 5 - Лабораторные показатели донорских групп перед эксплантацией почек

Показатель	Исследуемая группа (n=10)	Группа сравнения (n=10)	p
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	1,035 [0,82; 1,21]	11,3 [8,2; 14,1]	0,001
Нейтрофилы, $\times 10^9/\text{л}$	0,1 [0,05; 0,37]	9 [4,1; 12]	0,02
Моноциты, $\times 10^9/\text{л}$	0,05 [0,01; 0,1]	0,6 [0,4; 0,8]	0,002
Тромбоциты, $\times 10^9/\text{л}$	90 [65; 150]	210 [180; 420]	0,023
NGAL*, нг/мл	3,65 [2,13; 5,22]	22,65 [18,15; 23,8]	0,001

*NGAL – Липокалин, связанный с нейтрофильной желатиназой

Представленные в таблице 5 лабораторные показатели донорских групп и проверка достоверности вероятности выполнены с применением непараметрического метода χ^2 с поправкой Йетса.



Рисунок 27 – Концентрация лейкоцитов крови у доноров со смертью мозга в исследуемой группе до и после введения Тимоглобулина, $\times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$). АТГ – антицимитарный иммуноглобулин (Тимоглобулин)

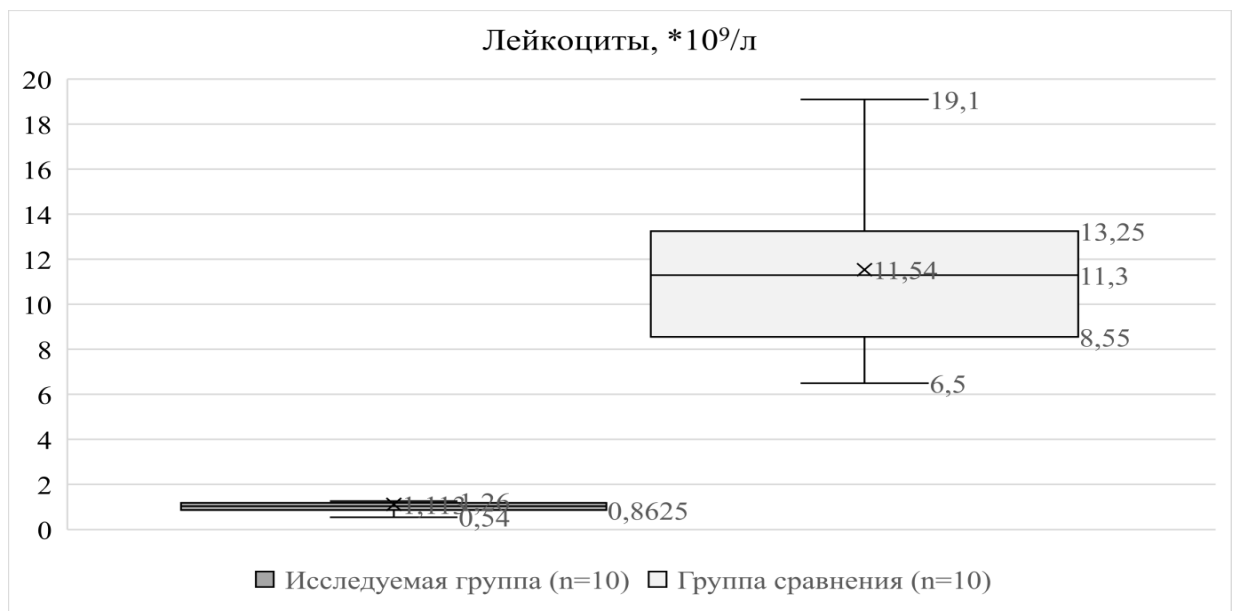


Рисунок 28 – Концентрация лейкоцитов крови у доноров со смертью мозга исследуемой группы и группы сравнения, $\times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$)

В рамках оценки эффективности применения разработанного протокола введения Тимоглобулина ДСМ выполнено ретроспективное лабораторное исследование биообразцов мочи. Согласно полученным данным в моче у ДСМ контрольной группы определяется значительно более высокий уровень Липокалина (NGAL, Липокалин, связанный с нейтрофильной желатиназой) по сравнению с ДСМ исследуемой группы (Таблица 5, Рисунок 29).

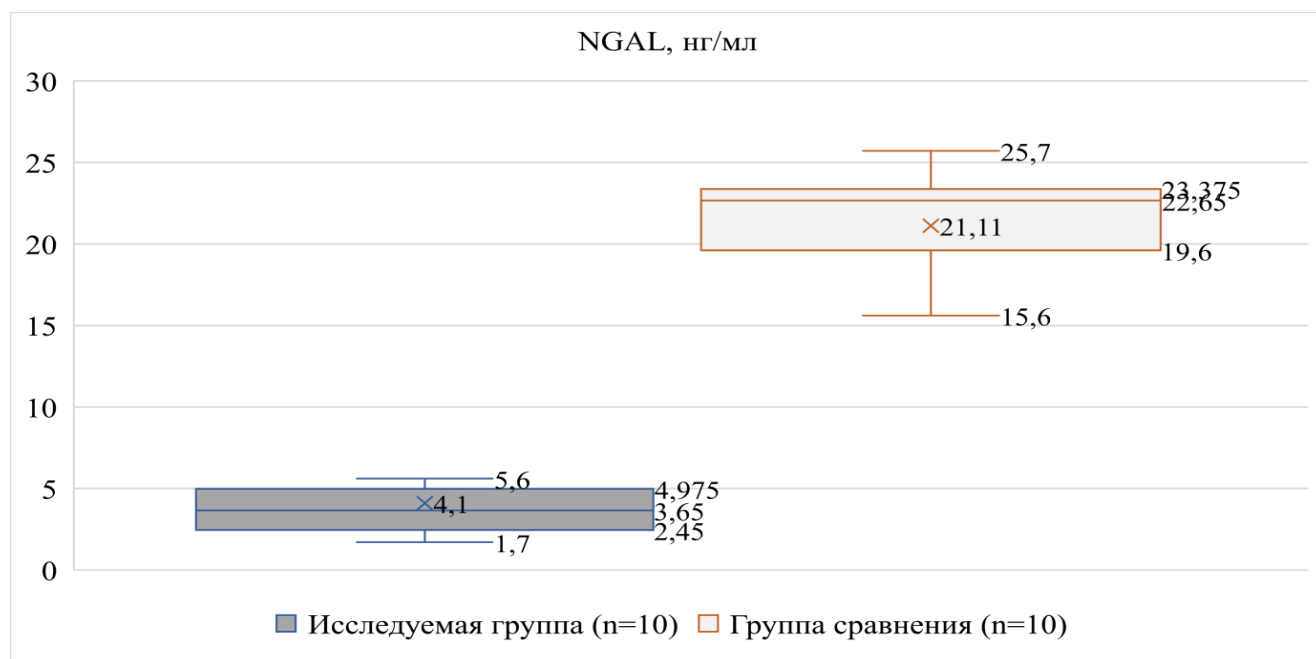


Рисунок 29 – Концентрация NGAL (Липокалина, связанный с нейтрофильной желатиназой) в моче у доноров со смертью мозга исследуемой и контрольной группы, нг/мл ($p < 0,05$)

Таким образом, достоверно установлено, что Тимоглобулин приводит к редукции нейтрофилов в крови ДСМ, клиническое значение которой предстояло изучить.

3.4 Анализ влияния протокола применения Тимоглобулина у доноров со смертью мозга на уровень нейтрофилов в системе кровообращения донора

По лабораторным данным выявлено, что в моче у ДСМ контрольной группы определяется значительно более высокий уровень NGAL по сравнению с ДСМ исследуемой группы, что демонстрирует более значимые тубулярные нарушения, которые предшествовали острому повреждению трансплантатов почек ещё до эксплантации, полученных от ДСМ группы сравнения, нежели чем от ДСМ исследуемой группы.

Для оценки влияния рутинных лабораторных показателей на уровень NGAL были использованы регрессионные модели (Таблица 6). По имеющимся данным были построены две регрессионные модели. Модель №1 имела коэффициент детерминации - 0,658, в то время как для второй – 0,753. Обе модели были статистически значимыми - $p < 0,05$.

Таким образом, первая регрессионная модель получилась однофакторной (формула 1):

$$Y = 20,258 - 1,694 \times \text{Нейтрофилы (10}^9\text{/л)} \quad (1)$$

В то время как вторая модель – двухфакторной (формула 2):

$$Y = 21,436 - 1,529 \times \text{Нейтрофилы (10}^9\text{/л)} - 2,376 \times \text{Эозинофилы (\%)} \quad (2)$$

В представленных уравнениях значение «Y» – это предсказанный результат концентрации NGAL в моче в нг/мл. Указанные в уравнениях числовые значения являются коэффициентами регрессии.

Таблица 6 - Регрессионные коэффициенты

Модель		Нестандартизованные коэффициенты		Стандартизованные коэффициенты	Т	Значимость
		В	Стандартная ошибка	Бета		
1	(Константа)	20,258	1,745		11,610	,000
	Нейтрофилы, $10^9/л$	-1,694	,276	-,822	-6,134	,000
2	(Константа)	21,436	1,541		13,909	,000
	Нейтрофилы, $10^9/л$	-1,529	,242	-,742	-6,319	,000
	Эозинофилы, %	-2,376	,845	-,330	-2,813	,012

Полученные данные позволили достоверно установить, что Тимоглобулин приводит к редукции нейтрофилов в крови ДСМ, клиническое значение которой предстояло изучить.

Предложенный нами способ терапевтического применения препарата, традиционно используемого только для лечения стероидрезистентных кризов отторжения у реципиентов, представляется эффективным методом улучшения качества почечных трансплантатов, за счет «выключения» лейкоцитарного звена ИРП, что по нашей гипотезе может привести к лучшим долгосрочным результатам трансплантаций.

Настоящий комплекс выполненных исследований было бы затруднительно провести ввиду целого ряда особенностей организации процесса эксплантации органов у ДСМ. Наиболее удачным решением данной проблемы представилось ретроспективное выполнение части исследований, для чего необходимо сохранение биообразцов в трансплантационном биобанке, о чём ниже и пойдет речь.

ГЛАВА 4. ФОРМИРОВАНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО БИОБАНКА

Для решения комплексных задач в клинической трансплантологии, возможности выполнения ретроспективных исследований и, в частности, для решения второй задачи исследования – верификации клинических данных при пересадке почек от ДСМ с применением поликлональных антител на базе СПБКЦОД НИИ СП им. И.И. Джанелидзе был создан трансплантационный биобанк. Проект «Создание исследовательского многофункционального биобанка» был поддержан Фондом содействия инновациям и является победителем конкурса «У.М.Н.И.К.» от 2015 года, номер договора 6643ГУ/2015. Распоряжением Комитета по науке и высшей школе от 11.10.2018 № 141 на основании Решения Совета конкурса лучших инновационных проектов в сфере науки и высшего образования Санкт-Петербурга от 21.09.2018 утверждён проект авторского коллектива НИИ СП им. И.И. Джанелидзе «Создание биобанка для изучения ишемии-реперфузии». Научно-исследовательский проект «Создание трансплантационного биобанка» является финалистом конкурса «Молодые, дерзкие, перспективные» Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга от 2021 года.

Созданный трансплантационный биобанк представляет собой коллекцию биологических образцов и связанной с ними информацией в доступной для анализа форме. Биобанк содержит более 2 тысяч образцов, представленных биопсиями органов (почка, печень, селезёнка), тканей (жировая клетчатка, бурый жир), сыворотками крови, лейкоцитарным центрифугатом, мочой, полученных от мультиорганных эффективных доноров и реципиентов почечных трансплантатов. Таким образом мы можем отследить состояние трансплантируемого органа по данным биопсий от «донорского» этапа и на последующих этапах после пересадки.

Описанная выше «сквозная» структура биобанка, где каждый биообразец, полученный от реципиента логистически и информационно связан с соответствующим донорским образцом, позволяет проводить ретроспективную оценку состояния трансплантируемого органа по данным гистологического исследования биоптата. Функциональное связующее звено позволяет выполнять цитологический анализ проб по запросу, отслеживать данные лабораторно-инструментальных исследований по цепочке «донор – реципиент», оценивать причину или вероятность иммунологического конфликта, что было описано в нашей работе «Биобанк для изучения вопросов ишемически-реперфузионного повреждения» [2]. Такая логистическая цепочка позволяет прогнозировать срок функционирования, оценить изначальный ресурс трансплантата, вводить новые критерии пригодности, продемонстрировать и доказать действие новых способов коррекции ИРП.

Для функционирования профессионального биобанка требуется квалифицированный сбор, обработка, характеристика и хранение образцов. Стандартизирована работа с документацией, базами данных; разработаны алгоритмы первичной обработки и хранения биообразцов, контроля надлежащего состояния проб. В преаналитическом этапе осуществляется сбор и заморозка образцов на месте для исключения потери лабильных компонентов. Алгоритм сбора образцов представлен на рисунке 30.

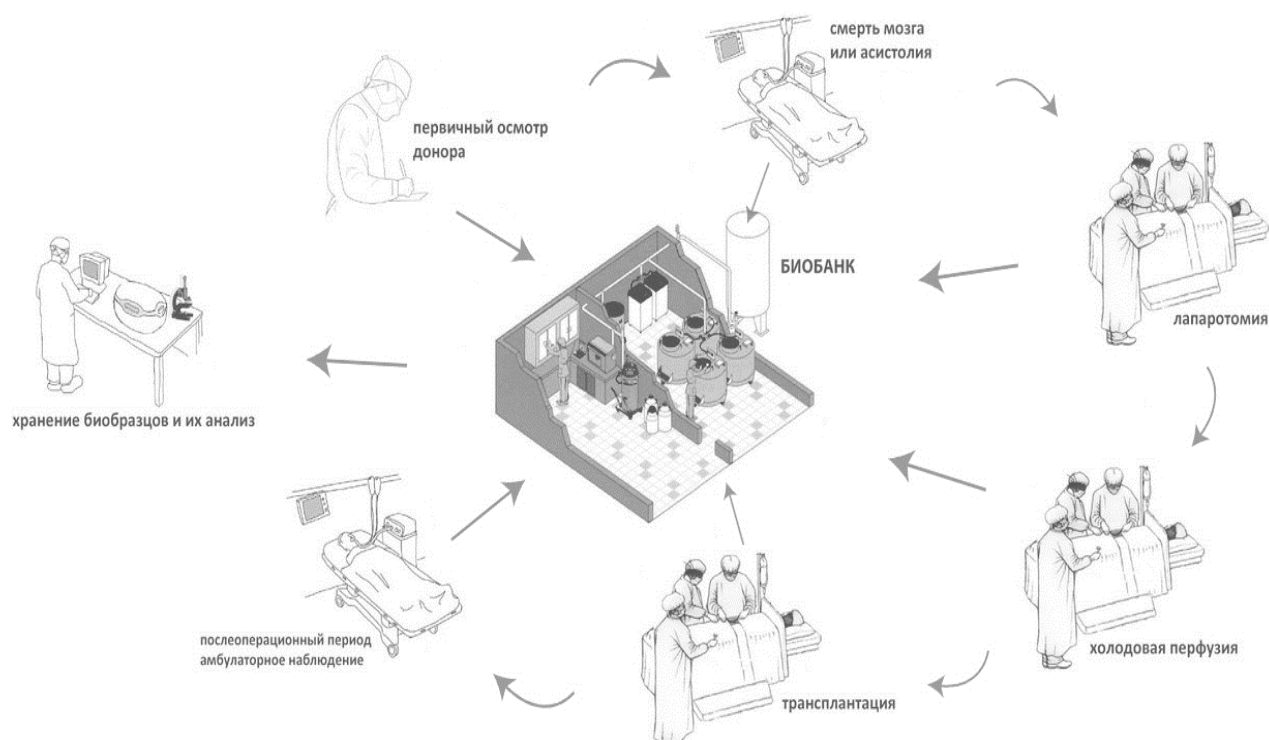


Рисунок 30 – Алгоритм сбора биобразцов

Образцы подвергаются аликвотированию. После изготовления биобразцов криопробирки помещаются для фиксации, временного хранения и транспортировки в ёмкость с жидким азотом ($-195\text{ }^{\circ}\text{C}$). Для постоянного длительного хранения используется низкотемпературный холодильник ($-85\text{--}90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Разработан алгоритм создания штрихкода биобразцов, подробное описание которого будет представлено ниже.

Протокол и общая схема сбора биобразцов (Рисунки 30-32) включают в себя:

1. Наполнение ёмкости для транспортировки биобразцов жидким азотом (40 литров) из сосуда Дьюара Taylor-wharton.
2. Внесение информации о доноре в базу данных Freezer Pro: диагноз, анамнез, данные лабораторных анализов и инструментальных исследований. Каждому донору присваивается индивидуальный номер и штрих-код.

3. Присвоение индивидуального идентификатора биообразцам с внесением в базу данных: печать этикеток со штрих-кодами на портативном принтере L-MARK и их нанесение на криопробирки (56 шт.). Упаковка криопробирок в штативы для хранения (2 шт).
4. После установления диагноза «Смерть головного мозга» начинается сбор биообразцов: моча (5 криопробирок), кровь из подключичной вены: получаемые из неё производные после центрифугирования в течение 15 минут при скорости 3 тысячи оборотов в минуту – сыворотка (10 криопробирок), лейкоцитарный центрифугат (4 криопробирки).
5. После выполнения лапаротомии осуществляется забор крови из магистральных сосудов, биообразцы получают из неё после центрифугирования в течение 15 минут при скорости 3 тысячи оборотов в минуту – лейкоцитарные центрифугаты крови аорты (3 криопробирки), нижней полой вены (4 криопробирки), воротной вены (3 криопробирки).
6. До начала холодной перфузии выполняется сбор биоптатов почек и печени (по 5 криопробирок).
7. После холодной перфузии повторяется сбор биоптатов почек и печени (по 5 криопробирок).
8. После выполнения эксплантации выполняется сбор ткани бурого жира (4 криопробирки) и селезёнки (3 криопробирки).

После изготовления криопробирки с биообразцами помещаются для временного хранения и транспортировки в ёмкость с жидким азотом (-195 °С). Для постоянного хранения используется низкотемпературный холодильник Sanyo (- 85–90 °С).











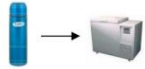








Исследуемый материал	Контейнер для биоматериала	Процессинг	Размещение образца	Обработка материала	Условия хранения
Венозная кровь (v.subclavia)	биохимические пробирки 	Клинический+Биохимический анализы штатной лаборатории при поступлении пациента в стационар	Бланки с результатами исследований вкладываются в историю болезни, сотрудник центра донорства копирует результаты и вносит их в рабочую папку		-
Венозная кровь (v.subclavia)	биохимические пробирки 	Клинический+Биохимический анализы штатной лаборатории немедленно после констатации смерти пациента	Бланки с результатами исследований вкладываются в историю болезни, сотрудник центра донорства копирует результаты и вносит их в рабочую папку		-
Моча	Контейнер для мочи 	Общий анализ мочи при поступлении пациента в стационар	Бланки с результатами исследований вкладываются в историю болезни, сотрудник центра донорства копирует результаты и вносит их в рабочую папку		
Моча	Контейнер для мочи 	Общий анализ мочи немедленно после констатации смерти	Бланки с результатами исследований вкладываются в историю болезни, сотрудник центра донорства копирует результаты и вносит их в рабочую папку		
Моча (мРНК: биомаркеры KIM-1, HMGB-1 etc)	биохимические пробирки (2 шт.) 	Немедленно после констатации смерти образцы собираются в биохимические пробирки, откуда перемещаются в эппендорфы	5 криопробирок по 2,5 мл 		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Венозная кровь (v.subclavia) лейкоцитарный центрифугат (молекулы адгезии, провоспалительные соединения)	пробирки с цитратом (4 шт.) 	Немедленно после констатации смерти образцы собираются в лабораторные пробирки с цитратом, откуда перемещаются в эппендорфы	4 криопробирки по 2,5 мл 	15 мин 3000 об/мин 	Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Венозная кровь (v.subclavia) лейкоцитарный центрифугат (молекулы адгезии, провоспалительные соединения)	биохимические пробирки (10 шт.) 	Немедленно после констатации смерти образцы собираются в биохимические пробирки, откуда перемещаются в эппендорфы	10 криопробирки по 1,0 мл 	15 мин 3000 об/мин 	Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Венозная кровь (v.cava inferior) лейкоцитарный центрифугат (молекулы адгезии, провоспалительные соединения)	пробирки с цитратом (4 шт.) 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении набирается шприц 20 мл, распределяется на 4 пробирки с цитратом, затем в эппендорфы	4 криопробирки по 2,5 мл 	15 мин 3000 об/мин 	Жидкий азот, затем заморозка на -70С 

Рисунок 31 - Схема сбора биообразцов














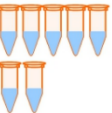


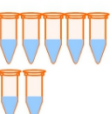

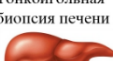




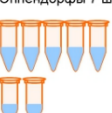


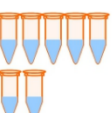






Исследуемый материал	Контейнер для биоматериала	Процессинг	Размещение образца	Обработка материала	Условия хранения
Венозная кровь (v. cava inferior) лейкоцитарный центрифугат (молекулы адгезии, провоспалительные соединения)	пробирки цитратом (3 шт.) 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении набирается шприц 20 мл, распределяется на 3 пробирки с цитратом, затем в эппендорфы	3 криопробирки по 2,5 мл 	15 мин 3000 об/мин 	Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Артериальная кровь (aorta) лейкоцитарный центрифугат (молекулы адгезии, провоспалительные соединения)	пробирки цитратом (4 шт.) 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении набирается шприц 20 мл, распределяется на 4 пробирки с цитратом, затем в эппендорфы	4 криопробирки по 2,5 мл 	15 мин 3000 об/мин 	Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Тонкоигольная биопсия печени 	Пробирка консервирующим раствором Скоблова 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении выполняется тонкоигольная биопсия			Хранение в морозильной камере при температуре -20С после экспозиции 120 мин при комнатной температуре
Тонкоигольная биопсия почки 	Пробирка консервирующим раствором Скоблова 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении выполняется тонкоигольная биопсия			Хранение в морозильной камере при температуре -20С после экспозиции 120 мин при комнатной температуре
Участок паренхимы печени 	Эппендорфы 7 шт. 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении участок паренхимы делится на 7 частей и распределяется по эппендорфам	2 пробирки ИЭМ. 2 пробирки МГЦ. 2 пробирки Библиотека. 1 пробирка Гистология		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Участок паренхимы почки 	Эппендорфы 7 шт. 	После лапаротомии при сохраненном кровообращении участок паренхимы делится на 7 частей и распределяется по эппендорфам	2 пробирки ИЭМ. 2 пробирки МГЦ. 2 пробирки Библиотека. 1 пробирка Гистология		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Тонкоигольная биопсия печени 	Пробирка консервирующим раствором Скоблова 	По окончании перфузии выполняется тонкоигольная биопсия			Хранение в морозильной камере при температуре -20С после экспозиции 120 мин при комнатной температуре
Тонкоигольная биопсия почки 	Пробирка консервирующим раствором Скоблова 	По окончании перфузии выполняется тонкоигольная биопсия			Хранение в морозильной камере при температуре -20С после экспозиции 120 мин при комнатной температуре
Участок паренхимы печени 	Эппендорфы 7 шт. 	По окончании перфузии участок паренхимы делится на части и распределяется по эппендорфам	2 пробирки ИЭМ. 2 пробирки МГЦ. 2 пробирки Библиотека. 1 пробирка Гистология		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Участок паренхимы почки 	Эппендорфы 7 шт. 	По окончании перфузии участок паренхимы делится на части и распределяется по эппендорфам	2 пробирки ИЭМ. 2 пробирки МГЦ. 2 пробирки Библиотека. 1 пробирка Гистология		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 
Тонкоигольная биопсия почки 	Пробирка консервирующим раствором Скоблова 	Через час после реперфузии выполняется тонкоигольная биопсия трансплантата	1 пробирка хранится в трансплантационном центре		Хранение в морозильной камере при температуре -20С после экспозиции 120 мин при комнатной температуре
Тонкоигольная биопсия почки 	Эппендорф 	Через час после реперфузии выполняется тонкоигольная биопсия трансплантата	1 пробирка хранится в трансплантационном центре		Жидкий азот, затем заморозка на -70С 

Рисунок 32 - Схема сбора биообразцов

Разработан алгоритм создания штрихкода биообразцов (Рисунок 33).



Рисунок 33 – Приведён пример штрихкода биообразца

В данном примере используется восьмизначный код, где первые две цифры являются двумя первыми цифрами календарного года (17), третья, четвёртая, пятая цифры – номер мультиорганного донора в текущем году (№001), шестая и седьмая цифры индивидуальный номер типа биообразца (01), восьмая цифра – контрольная (рассчитывается автоматически по алгоритму Modulo 10 для штрихкодов).

Нумерация для различных типов биообразцов:

- 01 – моча до лапаротомии
- 02 – сыворотка крови из центральной вены до лапаротомии
- 03 – лейкоцитарный центрифугат крови из подключичной вены до лапаротомии
- 04 – лейкоцитарный центрифугат крови из воротной вены после лапаротомии
- 05 – лейкоцитарный центрифугат крови из аорты после лапаротомии
- 06 – лейкоцитарный центрифугат крови из нижней полой вены после лапаротомии
- 07 – биоптат печени до холодовой перфузии

- 08 – биоптат почки до холодовой перфузии
- 09 – биоптат печени после холодовой перфузии
- 10 – биоптат почки до холодовой перфузии
- 11 – биоптат бурого жира после эксплантации
- 12 – биоптат селезёнки после эксплантации

Создание биобанка в качестве структурного подразделения каждого центра донорства должно стать стандартом в отечественной трансплантационной медицине.

Созданный нами трансплантационный биобанк позволил в полном объёме выполнить задачи настоящего исследования. Как было ранее сказано, в условиях выполнения эксплантаций у ДСМ на «донорских базах» существуют определённые особенности этого процесса, связанные как с существующими временными ограничениями, так и лимитированным материально-техническим обеспечением стационара. По названным причинам в данных условиях выполнение целого ряда научных исследований представляется затруднительным, поэтому преимущество их выполнения в ретроспективном варианте не вызывает сомнений.

Кроме того, использование ранее заготовленных и накопленных в коллекции биообразцов позволило выполнить ретроспективное гистоморфологическое исследование нефробиоптатов трансплантатов, о чем далее и пойдёт речь.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для решения третьей задачи – подтверждения эффективности применения ПКАТ у ДСМ – было выполнено гистоморфологическое исследование инцизионных биоптатов трансплантатов почек. Оценка гистоморфологических данных, свидетельствующих о полученном ишемическом повреждении, проводилась по наличию положительной экспрессии молекул клеточной адгезии эпителия (Epithelial cell adhesion molecule; ЕpСAM) на эндотелии капилляров клубочков.

Молекулы ЕpСAM экспрессируются на мембране эпителиальных почечных клеток, где они участвует в клеточных и межклеточных взаимодействиях [64]. Степень экспрессии ЕpСAM значительно увеличивается в процессе восстановления почечной ткани и коррелирует с тяжестью последствий ИРП. Регенерация ткани трансплантата требует очень высокого уровня экспрессии ЕpСAM для развития процессов клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки, что было подробно рассмотрено в работе Keller L. et al (2019). Предполагается, что длительная и массивная экспрессия ЕpСAM ассоциирована с его тропностью к процессам пролиферации и адгезии клеток, что наблюдается после ИРП. Таким образом, регуляция экспрессии ЕpСAM прямо связана с потребностью в регенерации почечной ткани [92].

В биоптатах трансплантатов почек от ДСМ группы сравнения светооптическое исследование материала продемонстрировало сохранную гистоархитектонику почечной паренхимы. Клубочки с одноконтурной капиллярной стенкой, без признаков мезангиальной и эндокапиллярной гиперклеточности, без сегментарного гломерулосклероза и полулуний. Определялась искусственная вакуолизация цитоплазмы эпителия проксимальных извитых канальцев. Признаки тубуло-интерстициального фиброза отсутствуют. Стенки артериол и артерий мелкого калибра без

патологических изменений (Рисунки 34, 35). Иммуногистохимическое исследование показало положительную экспрессию ЕpСAM на эндотелии капилляров клубочков и ее отсутствие в других структурах ткани почки (Рисунки 36, 37).

По данным исследования биоптатов трансплантатов почек от ДСМ исследуемой группы на светооптическом уровне гистологическая картина осталась прежней (Рисунки 38, 39). Иммуногистохимическое исследование, в свою очередь, продемонстрировало изменение экспрессии ЕpСAM, а именно полное отсутствие таковой во всех структурах ткани почки, в том числе, на эндотелии капилляров клубочков (Рисунки 40, 41).

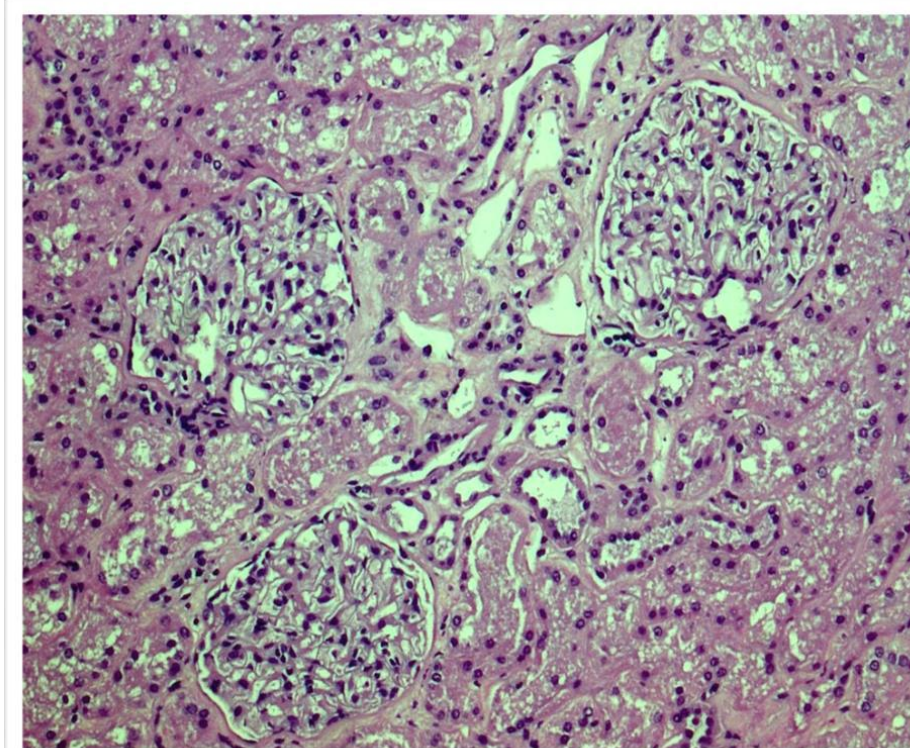


Рисунок 34 – Световая микроскопия «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора М., 37 лет группы сравнения; Сохранная гистоархитектоника ткани почки. Окраска гематоксилином-эозином; увеличение $\times 100$

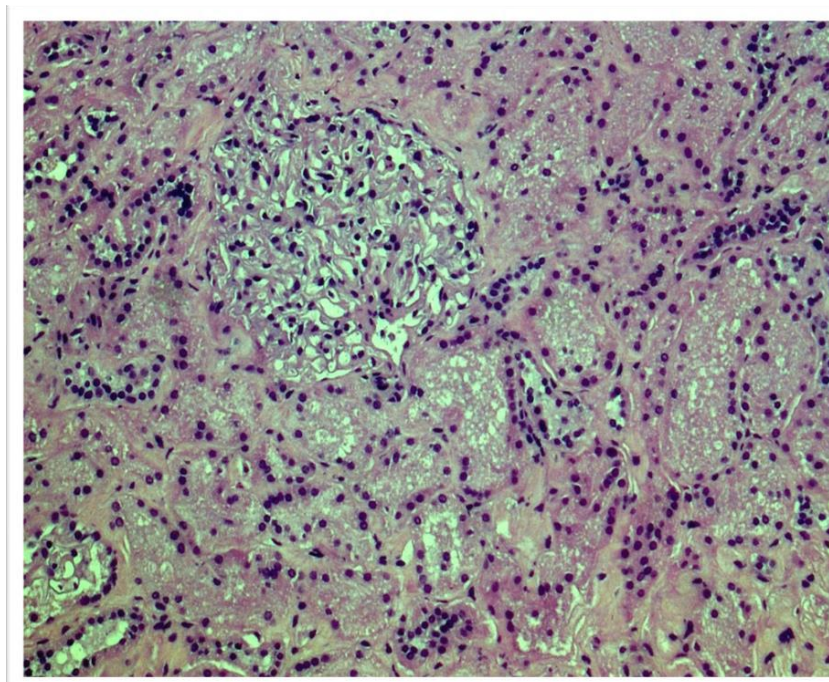


Рисунок 35 – Световая микроскопия «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора Е., 30 лет группы сравнения; Сохранная гистоархитектоника ткани почки. Окраска гематоксилином-эозином; увеличение x100

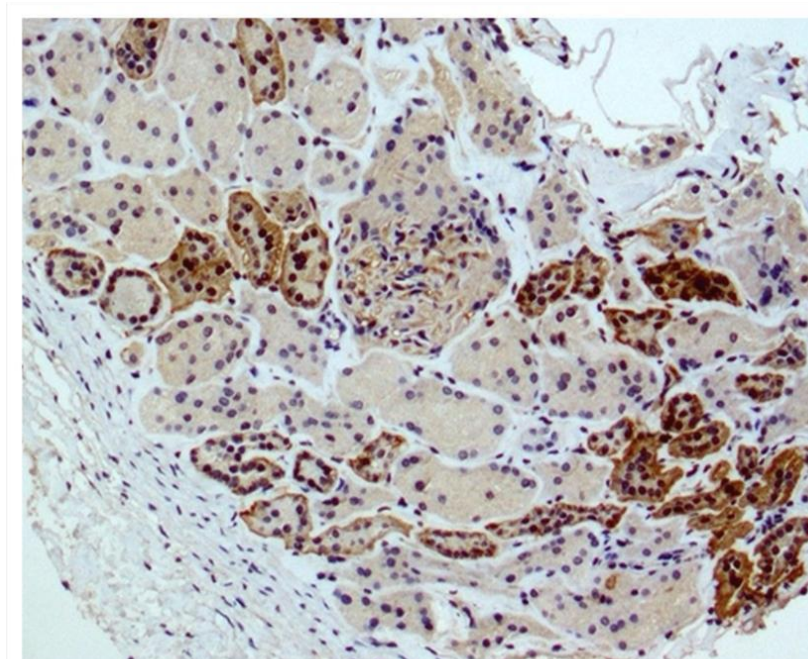


Рисунок 36 – Иммуногистохимическое исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора М., 37 лет группы сравнения. Положительная экспрессия молекул клеточной адгезии эпителия на эндотелии капилляров клубочков. Иммунопероксидазная реакция; увеличение x100

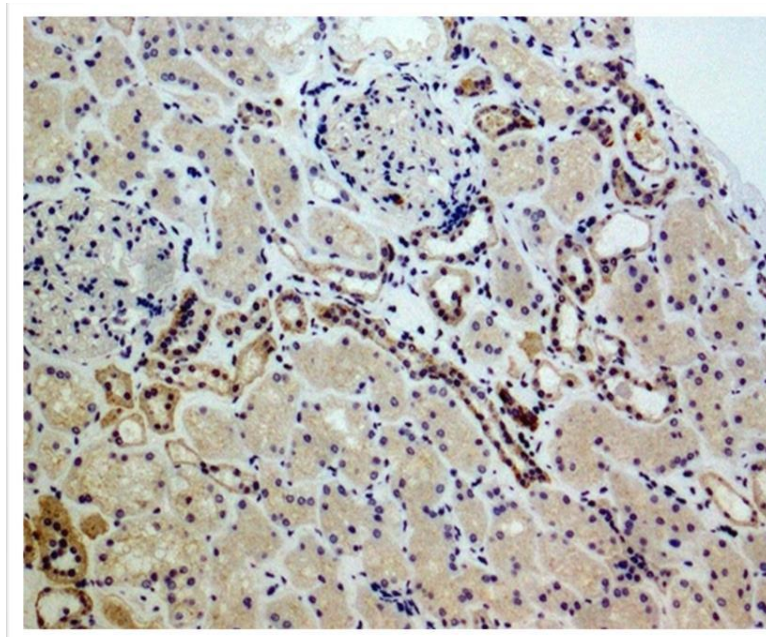


Рисунок 37 – Иммуногистохимическое исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора Е., 30 лет группы сравнения. Положительная экспрессия молекул клеточной адгезии эпителия на эндотелии капилляров клубочков. Иммунопероксидазная реакция; увеличение $\times 100$

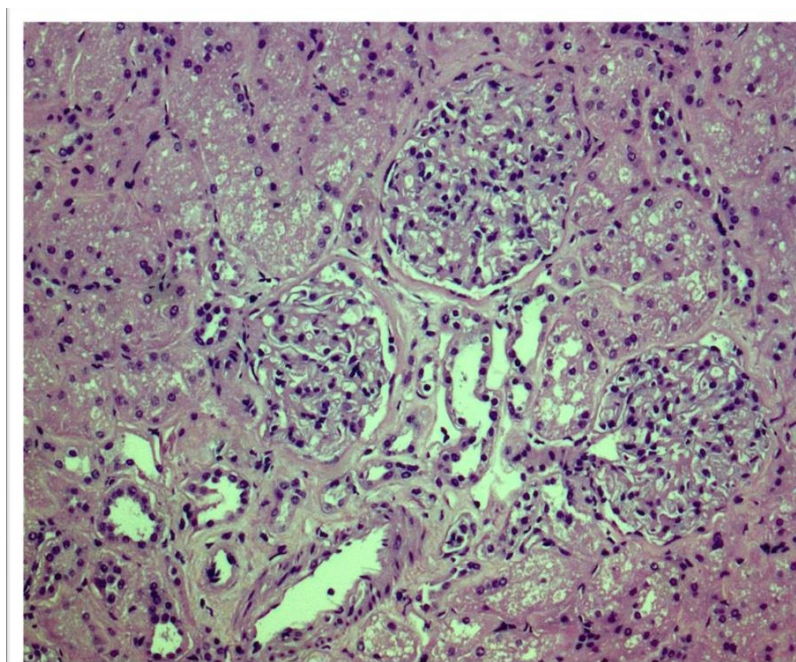


Рисунок 38 – Световая микроскопия «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора П., 33 лет исследуемой группы; Сохранная гистоархитектоника ткани почки. Окраска гематоксилином-эозином; увеличение $\times 100$

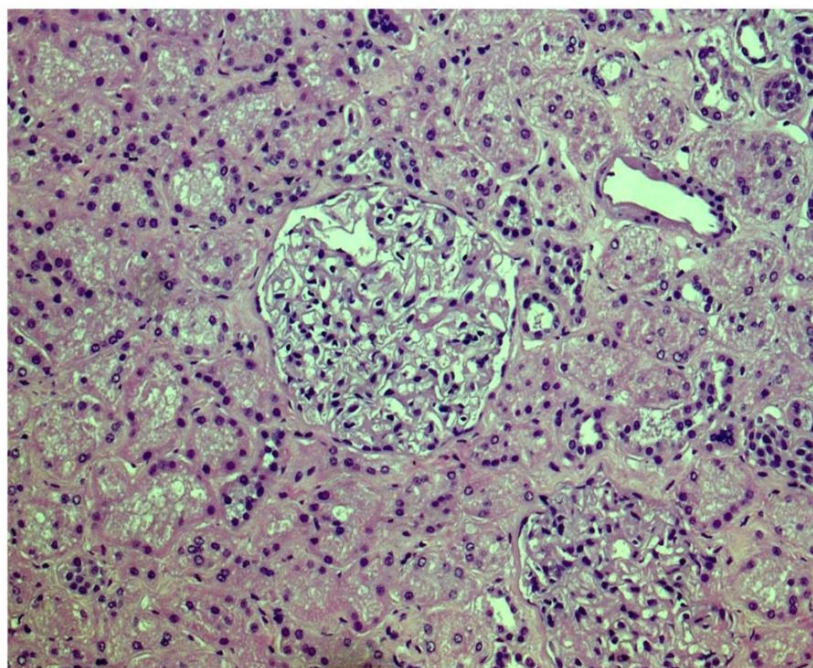


Рисунок 39 – Световая микроскопия «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора А., 36 лет исследуемой группы; Сохранная гистоархитектоника ткани почки. Окраска гематоксилином-эозином; увеличение x100

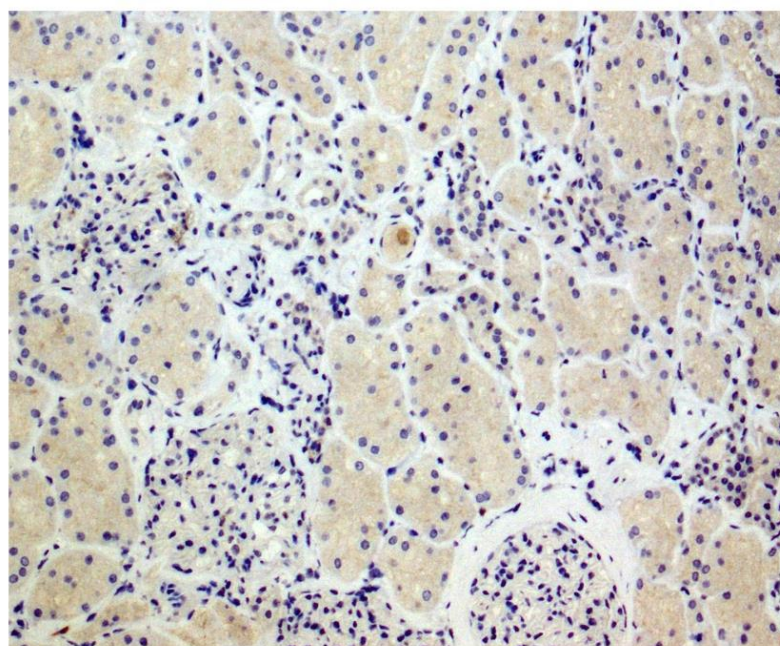


Рисунок 40 – Иммуногистохимическое исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора П., 33 лет исследуемой группы. Отсутствие экспрессии молекул клеточной адгезии эпителия во всех структурах ткани почки. Иммунопероксидазная реакция; увеличение x100

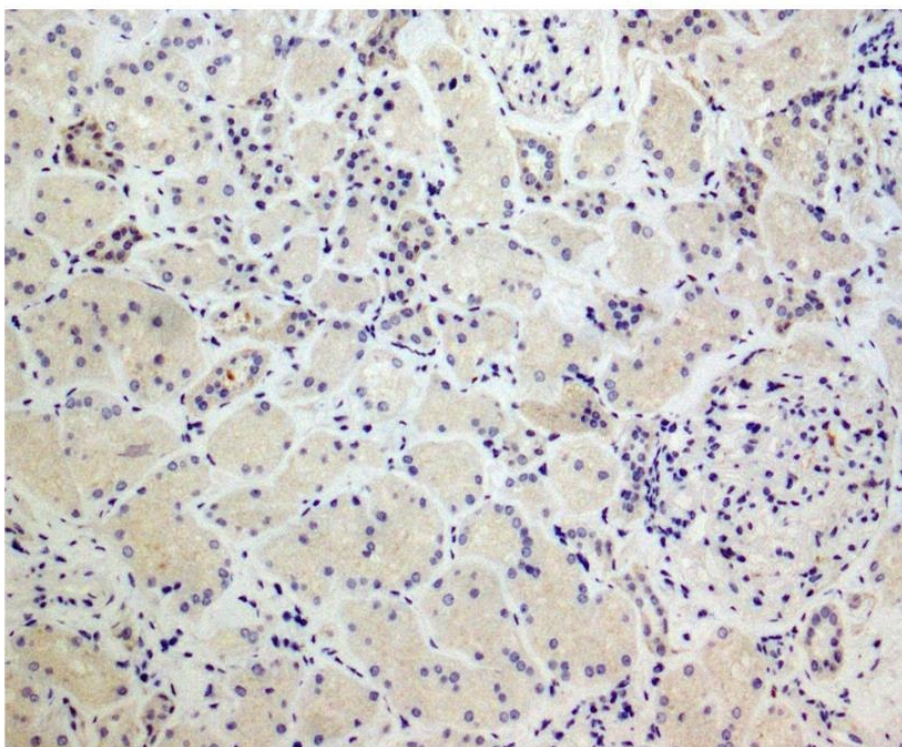


Рисунок 41 – Иммуногистохимическое исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек от донора П., 36 лет исследуемой группы. Отсутствие экспрессии молекул клеточной адгезии эпителия во всех структурах ткани почки. Иммунопероксидазная реакция; увеличение x100

Таким образом, в соответствии с указанными функциями и вышеупомянутыми способами регуляции экспрессии ЕpСAM, можно сделать вывод о том, что результаты выполненного иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантатов почек демонстрируют эффективность применения разработанного протокола введения Тимоглобулина у ДСМ.

Сравнив лабораторные и гистоморфологические результаты доноров исследуемой и группы сравнения, остановимся на результатах трансплантаций почек от этих доноров.

ГЛАВА 6. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧЕК

6.1 Сравнение ранних результатов трансплантации почек

Для решения четвертой задачи исследования нами проведён анализ течения ранней фазы после трансплантации почек у пациентов исследуемой и группы сравнения. У 15 (75%) реципиентов почек, полученных от доноров исследуемой группы, наблюдалась немедленная функция трансплантата, в группе сравнения – у 10 (50%) реципиентов (Рисунок 42). Также через 30 суток после трансплантации концентрации сывороточного креатинина и мочевины были ниже, а СКФ выше у реципиентов почек от доноров, которым вводился Тимоглобулин (Рисунки 43–45; Таблица 7-глава 6.2).

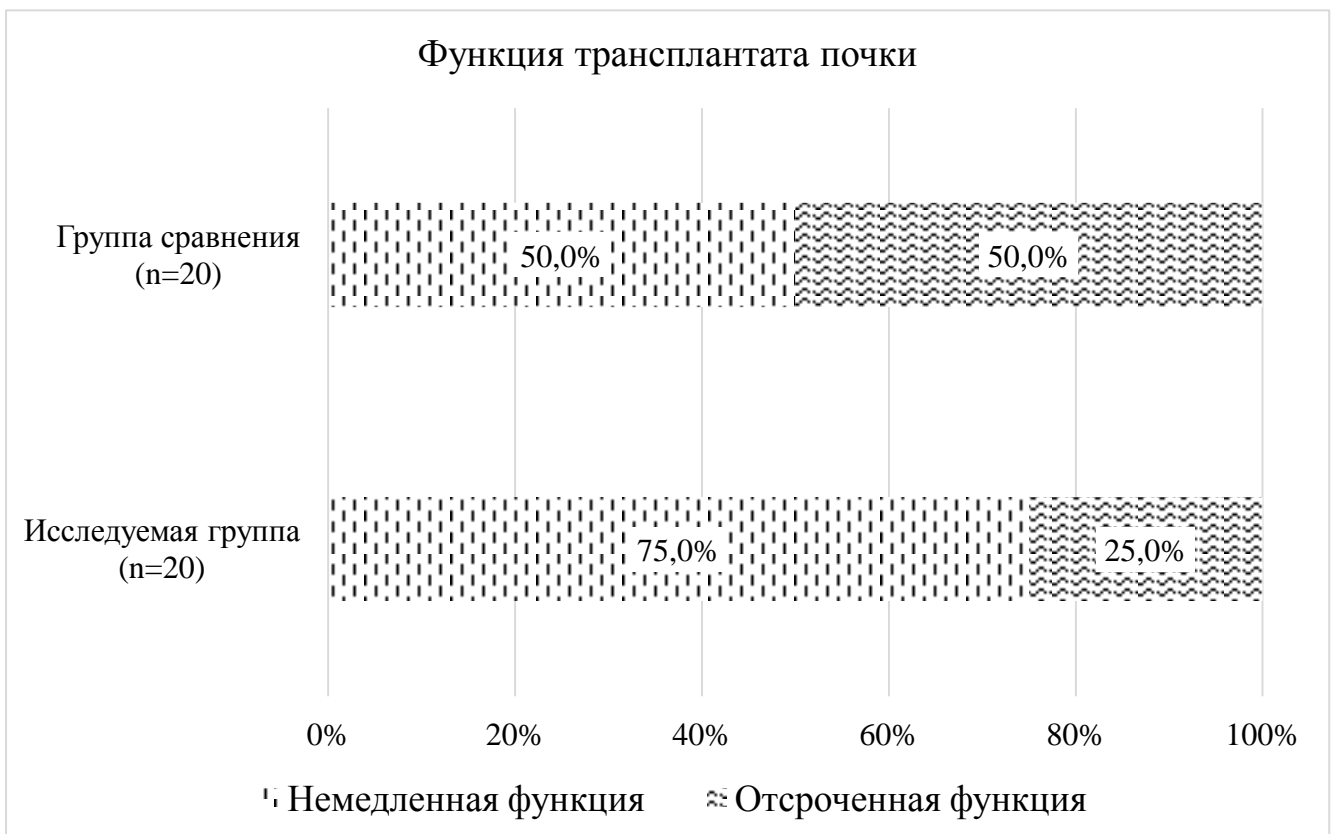


Рисунок 42 – Немедленная функция трансплантатов почки у реципиентов в исследуемой группе и группе сравнения, % ($p = 0,191$)

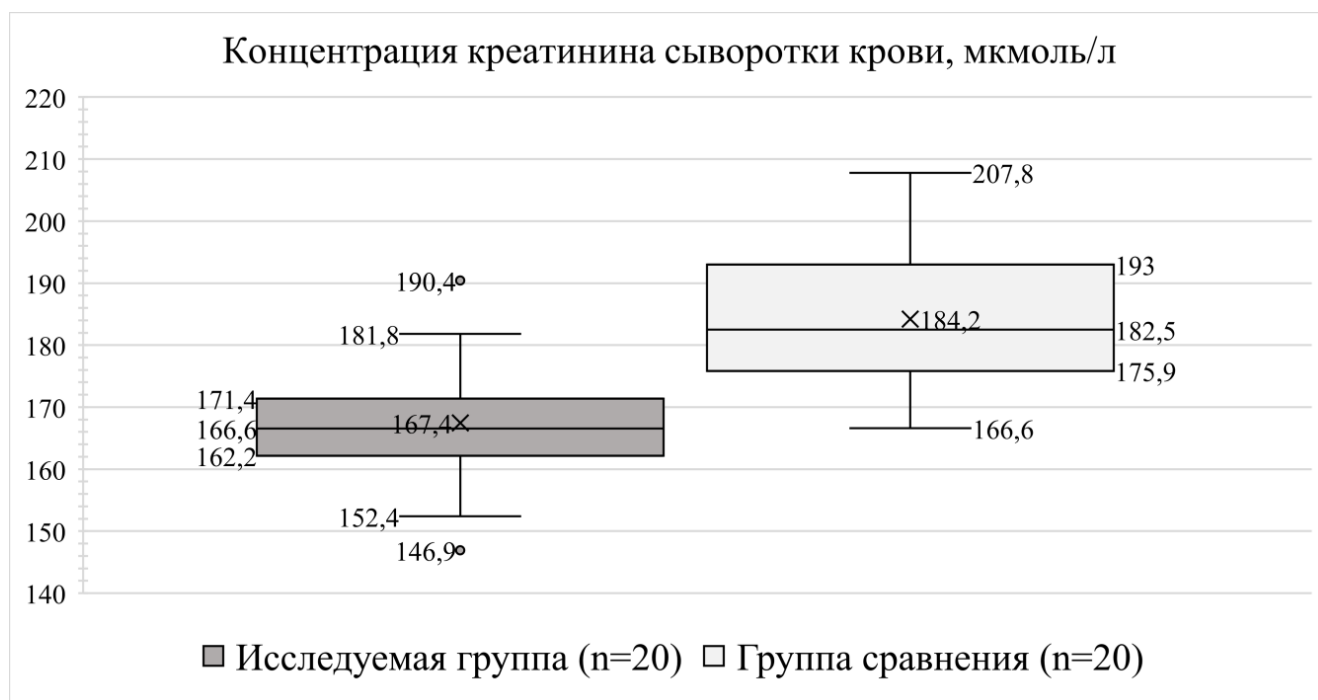


Рисунок 43 – Концентрация креатинина сыворотки крови у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 1 месяц после трансплантации, мкмоль/л ($p < 0,05$)

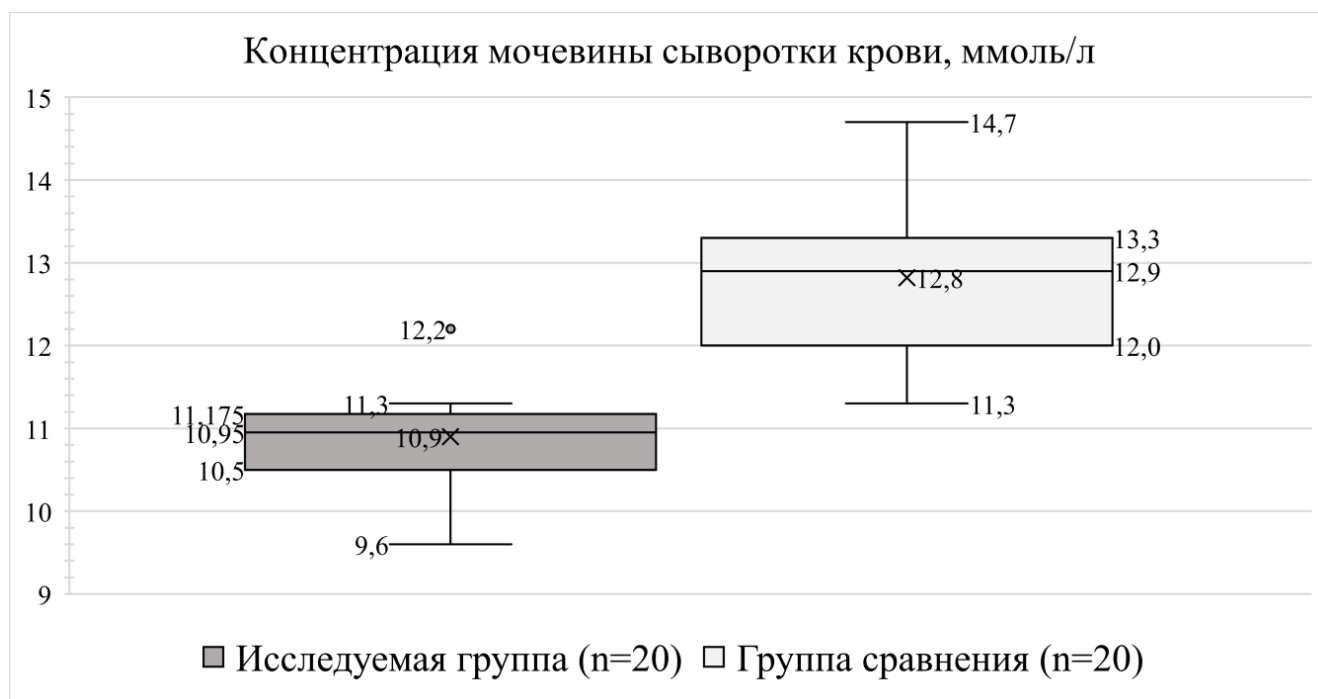


Рисунок 44 – Концентрация мочевины сыворотки крови у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 1 месяц после трансплантации, ммоль/л ($p < 0,05$)

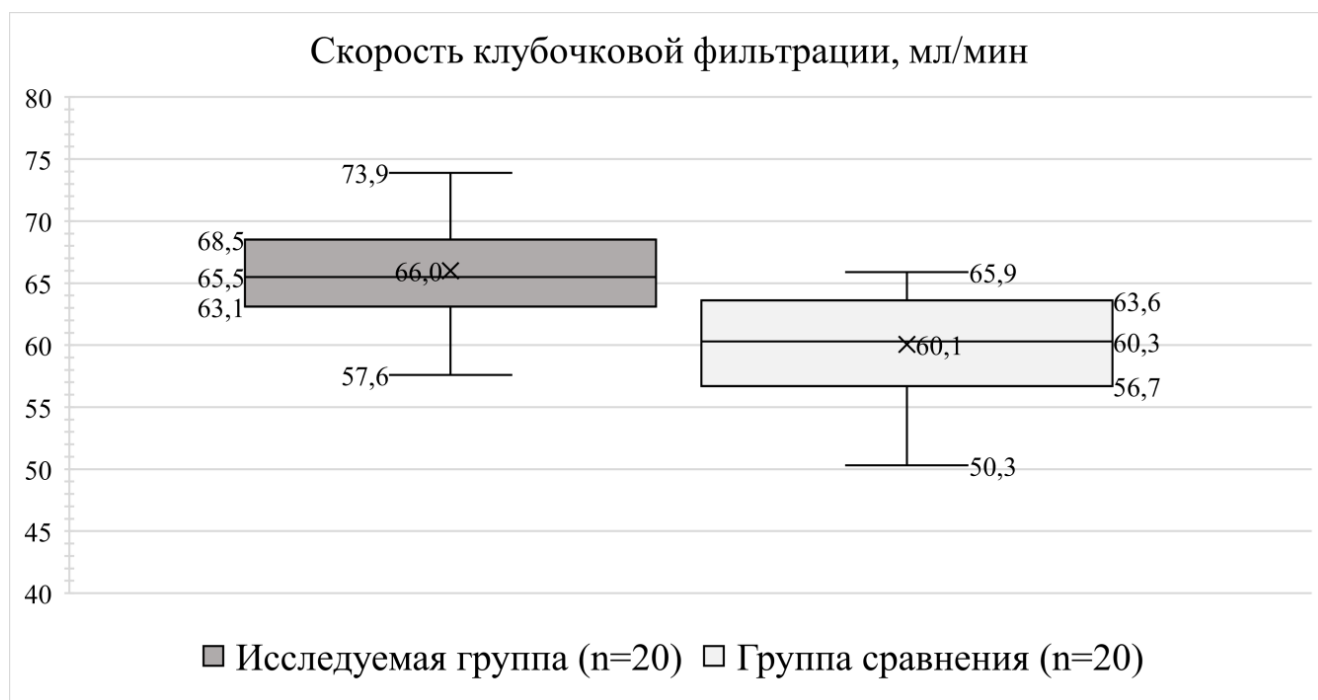


Рисунок 45 – Скорость клубочковой фильтрации у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 1 месяц после трансплантации, мл/мин ($p < 0,05$)

Таким образом, из полученных результатов следует, что очевидным преимуществом введения Тимоглобулина ДСМ до трансплантации является улучшение ранней функции трансплантата. Медиана концентрации креатинина сыворотки крови через 30 суток после трансплантации у реципиентов почек от доноров со смертью мозга с использованием поликлональных антител составила 167,4 мкмоль/л, тогда как в группе сравнения – 184,2 мкмоль/л. Также в раннем послеоперационном периоде отмечалась достоверно более низкая медианная концентрация мочевины сыворотки крови у реципиентов исследуемой группы – 10,9 ммоль/л, чем в группе сравнения (12,8 ммоль/л). Медиана СКФ в исследуемой группе составила 66,0 мл/мин, тогда как в группе сравнения 60,1 мл/мин.

Далее сравним отдалённые результаты трансплантации почек у реципиентов исследуемой и группы сравнения.

6.2 Сравнение отдалённых результатов трансплантации почек

Для решения пятой задачи исследования нами проведён ретроспективный анализ течения поздней и отдалённой фазы после трансплантации почек у пациентов исследуемой и группы сравнения. На рисунках 46–48 представлены значения медианных концентраций лабораторных показателей (креатинина и мочевины сыворотки крови), а также динамика СКФ.

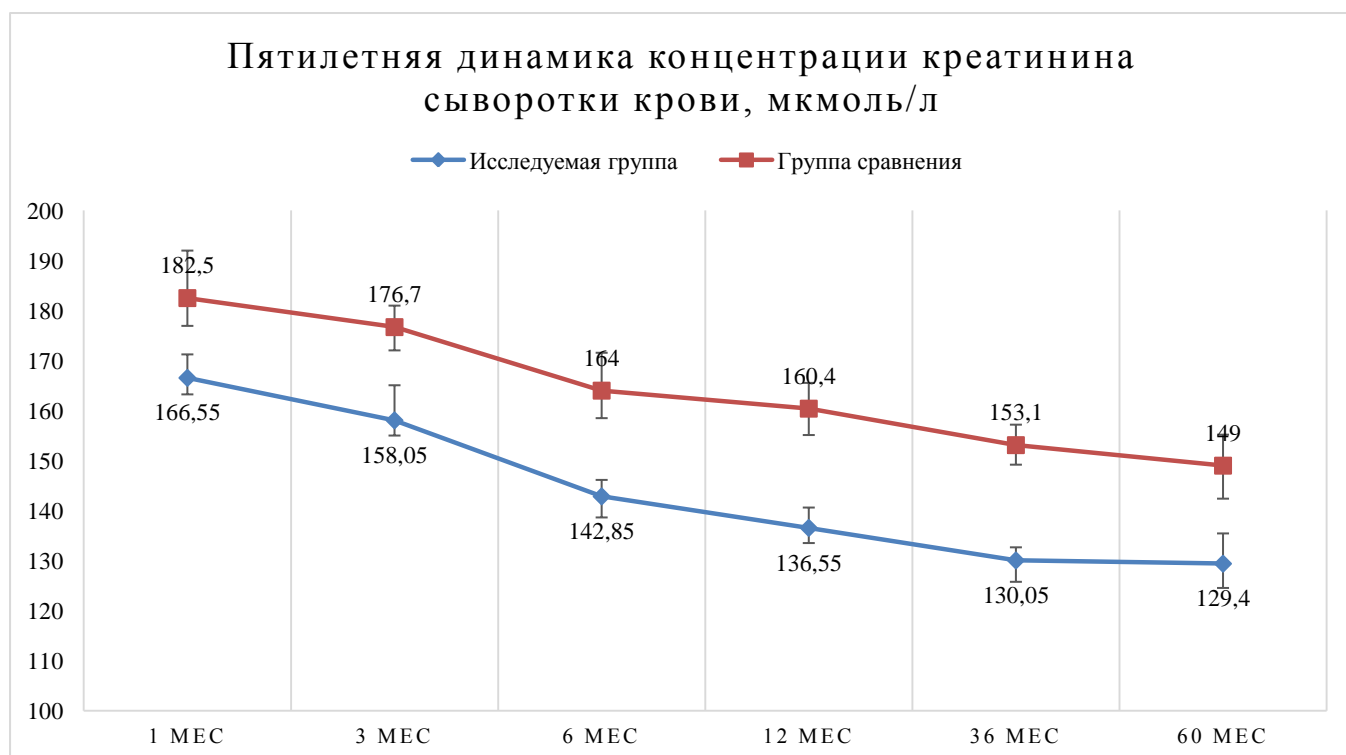


Рисунок 46 – Значения медианных концентраций креатинина сыворотки крови с отметками межквартильного интервала, измеренные в точках, соответствующих 1, 3, 6, 12, 36, 60 месяцам наблюдения за реципиентами исследуемой и контрольной групп, мкмоль/л ($p < 0,05$)

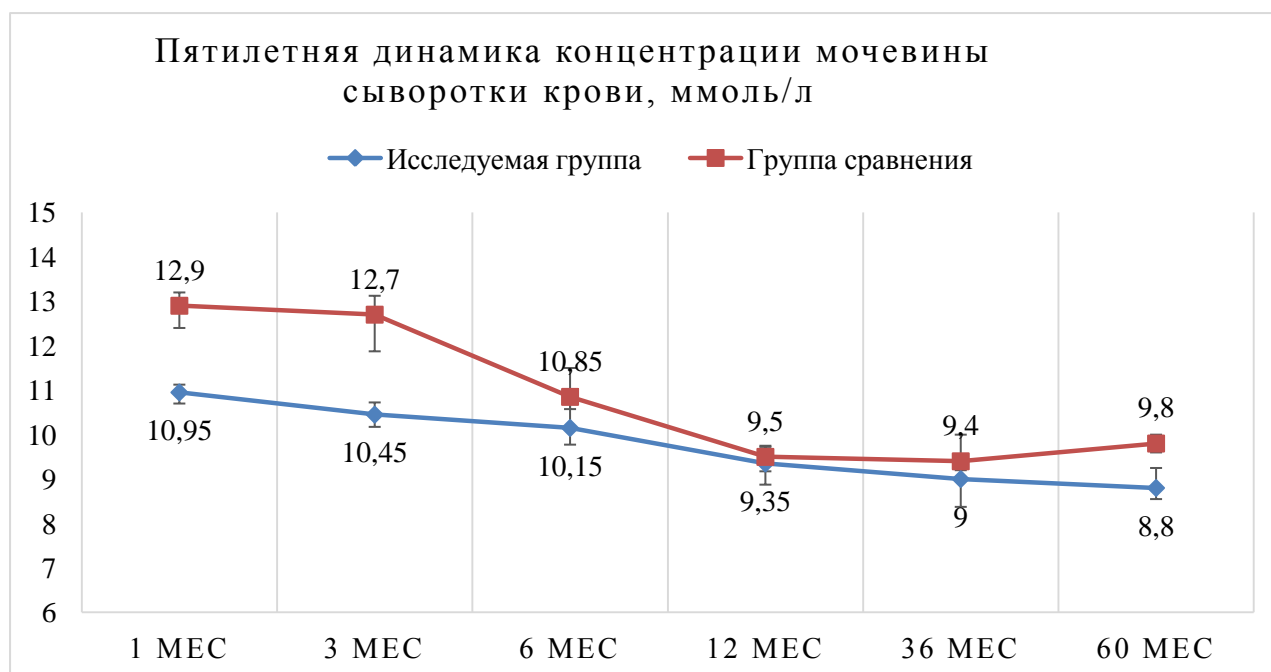


Рисунок 47 – Значения медианных концентраций мочевины сыворотки крови с отметками межквартильного интервала, измеренные в точках, соответствующих 1, 3, 6, 12, 36, 60 месяцам наблюдения за реципиентами исследуемой и контрольной групп, ммоль/л ($p > 0,05$)

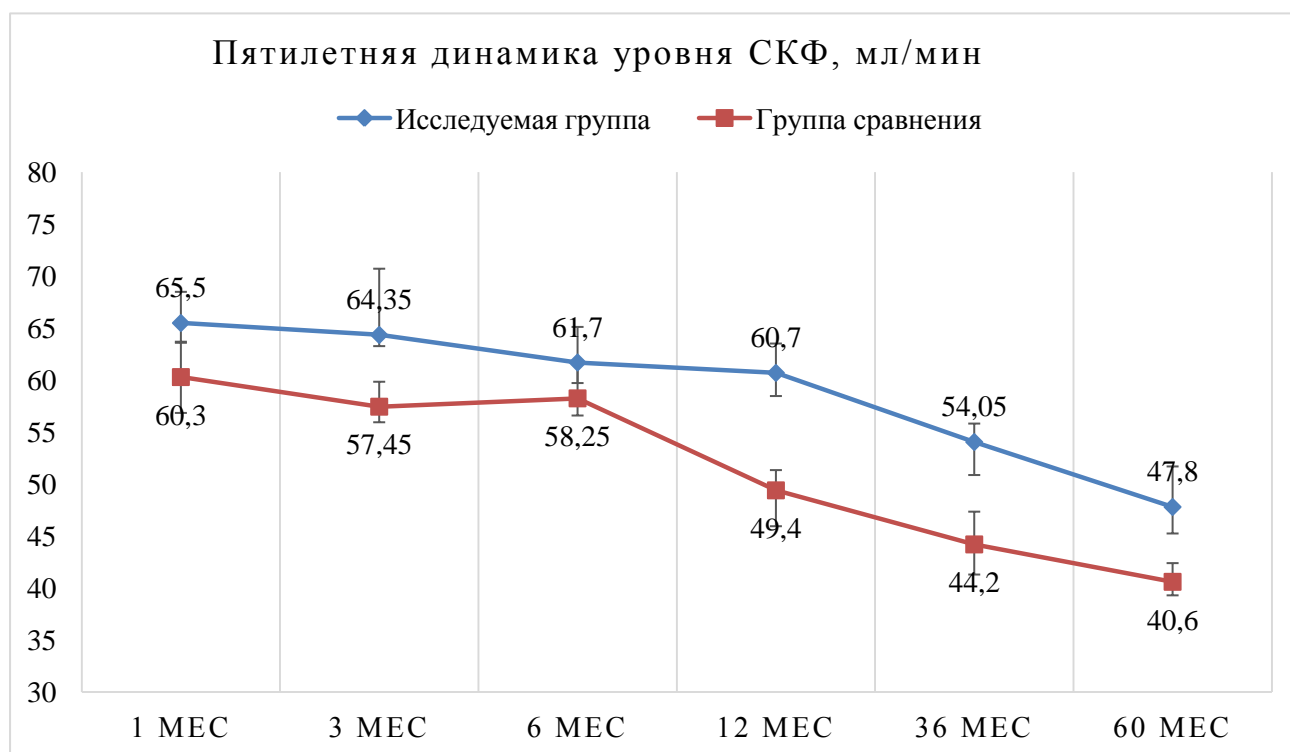


Рисунок 48 – Значения медианных значений скорости клубочковой фильтрации с отметками межквартильного интервала, измеренные в точках, соответствующих 1, 3, 6, 12, 36, 60 месяцам наблюдения за реципиентами исследуемой и контрольной групп, мл/мин ($p > 0,05$)

Анализ полученных данных показал, что через 5 лет после трансплантации уровни креатинина и мочевины сыворотки крови были ниже, а СКФ выше у реципиентов почек от доноров, которым вводился АТГ (Рисунки 49–51, Таблица 7).

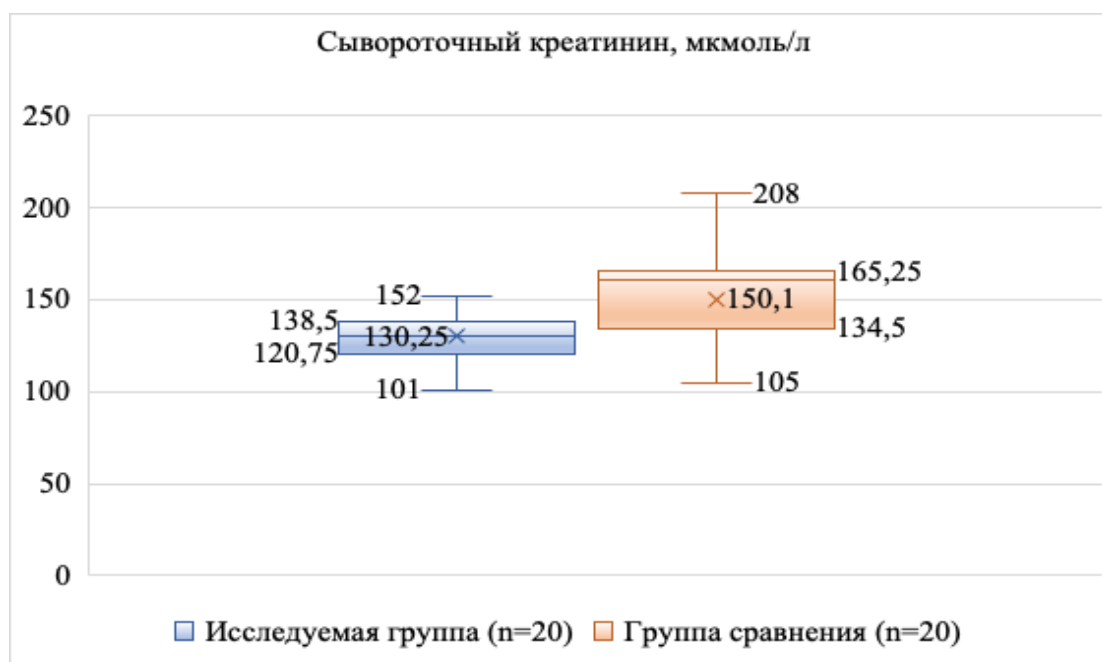


Рисунок 49 – Концентрация креатинина сыворотки крови у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 5 лет после трансплантации, мкмоль/л ($p < 0,05$)

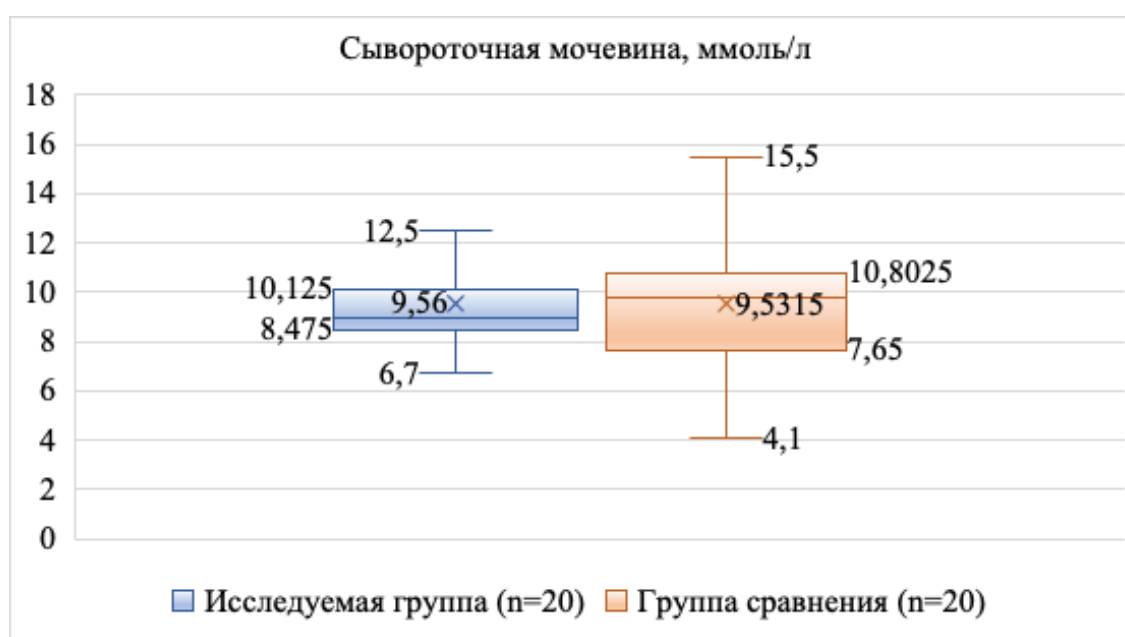


Рисунок 50 – Концентрация сывороточной мочевины у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 5 лет после трансплантации, ммоль/л ($p > 0,05$)

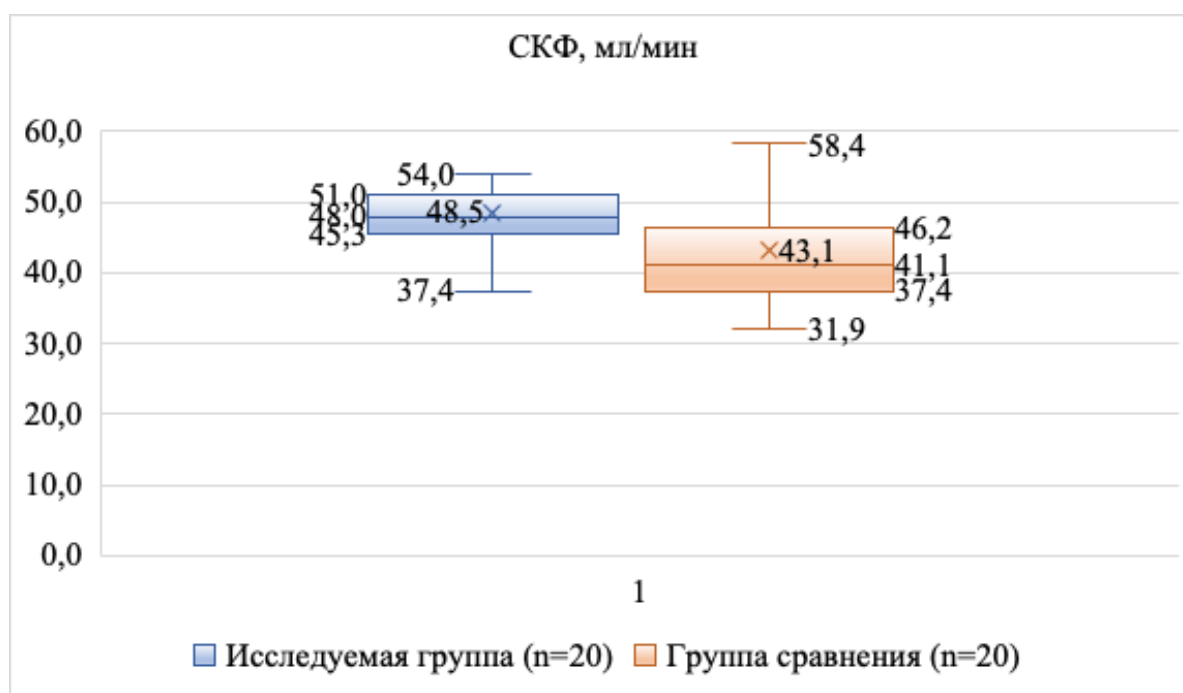


Рисунок 51 – Уровень скорости клубочковой фильтрации у реципиентов исследуемой группы и группы сравнения через 5 лет после трансплантации, мл/мин ($p < 0,05$)

Таблица 7 - Результаты трансплантаций почек (n=40)

Показатель	Исследуемая группа (n=20)	Группа сравнения (n=20)	P
Немедленная функция трансплантата почки	15 (75%)	10 (50%)	0,191
<i>Лабораторные показатели, через 5 лет после трансплантации</i>			
Креатинин, мкмоль/мл	130,5 [120,25; 139,5]	150,1 [133,5; 165,75]	0,011
Мочевина, ммоль/мл	8,95 [8,425; 10,38]	9,75 [7,55; 11,01]	0,659
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин на 1,73 м ²	47,96[45,06;51,99]	41,08[37,1;48,33]	0,007

Представленные в таблице 7 результаты трансплантации почки и проверка достоверности вероятности выполнена с применением непараметрического метода χ^2 с поправкой Йетса.

По данным исследования установлено, что у 15 (75%) реципиентов почек, полученных от доноров с введением ПКАТ, наблюдалась немедленная функция трансплантата, в группе сравнения – у 10 (50%) реципиентов (Рисунок 42, Таблица 7). С учетом минимального количества наблюдаемых случаев, во избежание ошибки второго рода, есть риск отвергнуть правильную гипотезу, поэтому данные различия ($p = 0,191$) могут быть признаны с тенденцией к статистической значимости.

Кроме того, для оценки выживаемости реципиентов исследуемой группы и группы сравнения (Рисунок 52) и трансплантатов почек исследуемой группы и группы сравнения (Рисунок 53) были построены кривые Каплана-Мейера. Пятилетняя выживаемость реципиентов исследуемой группы составила 100% ($n=20$), в отличие от 80% ($n=16$) реципиентов группы сравнения.

Также стоит отметить, что пятилетняя выживаемость трансплантатов реципиентов исследуемой группы составила 95% ($n=19$) (ПКАТ), в отличие от 35% ($n=7$) реципиентов группы сравнения. Средняя оценка дожития составила $57,95 \pm 1,103$ недель. На рисунке 54 и рисунке 55 соответственно представлены кривые оценки риска выживаемости реципиентов и трансплантатов почек реципиентов исследуемой группы и группы сравнения.

Таким образом, медианное значение сывороточного креатинина через 5 лет после трансплантации у реципиентов почек от ДСМ с использованием ПКАТ – 130,5 мкмоль/л и 160,5 мкмоль/л в группе сравнения (Рисунок 49, Таблица 7).

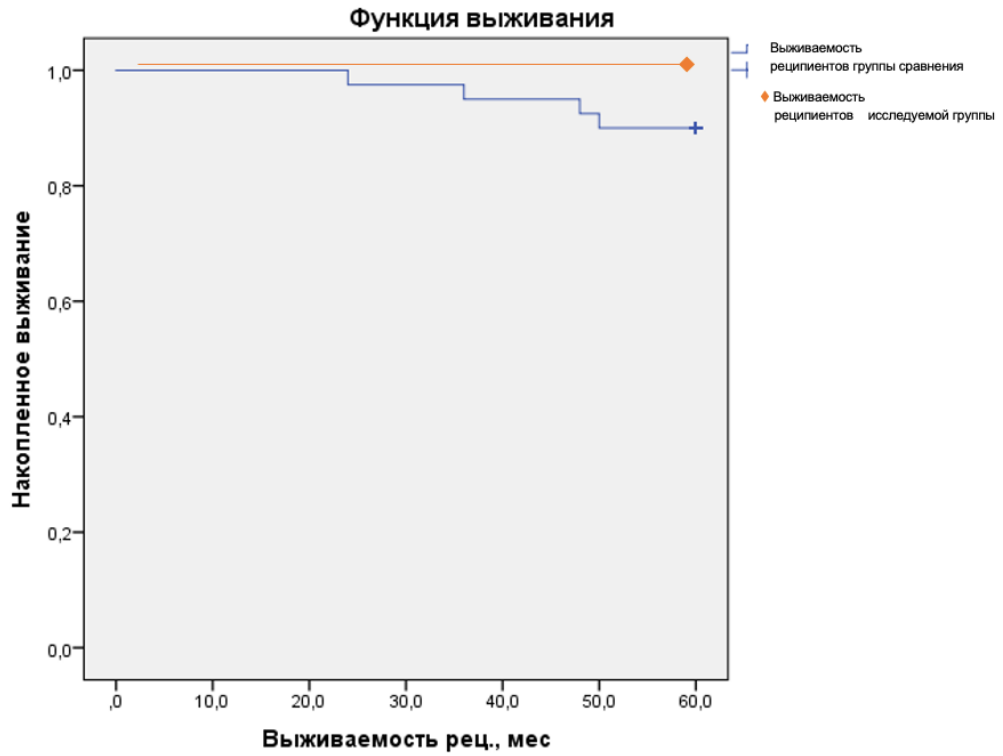


Рисунок 52 – Оценка выживаемости реципиентов. 60-месячная выживаемость реципиентов исследуемой группы составила 100%

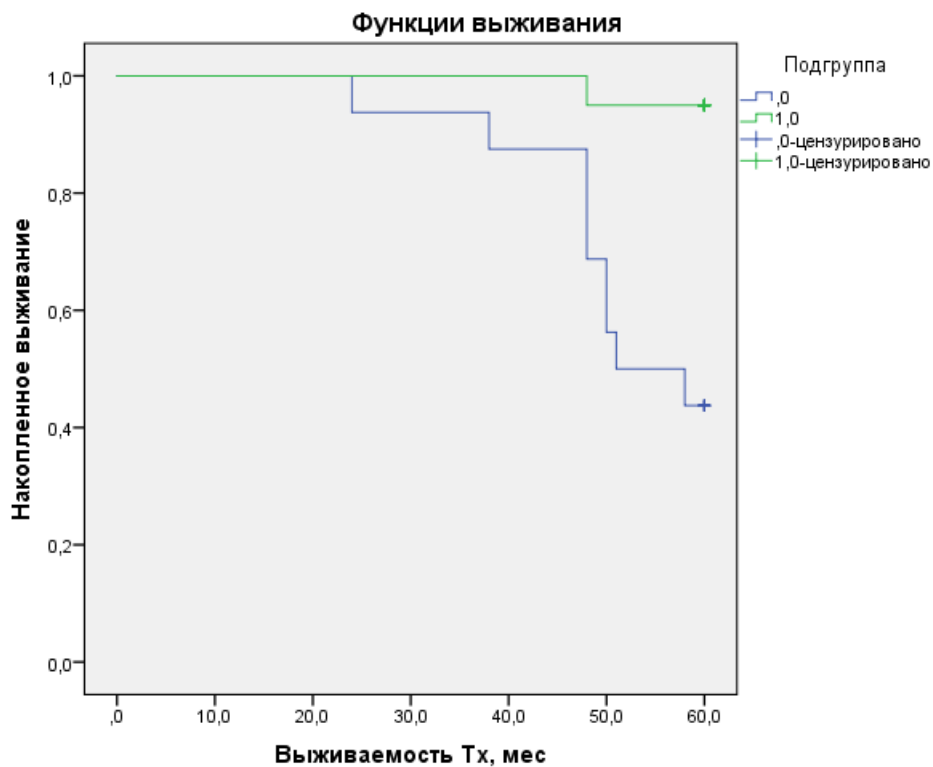


Рисунок 53 – Оценка выживаемости трансплантатов почек реципиентов исследуемой группы и группы сравнения

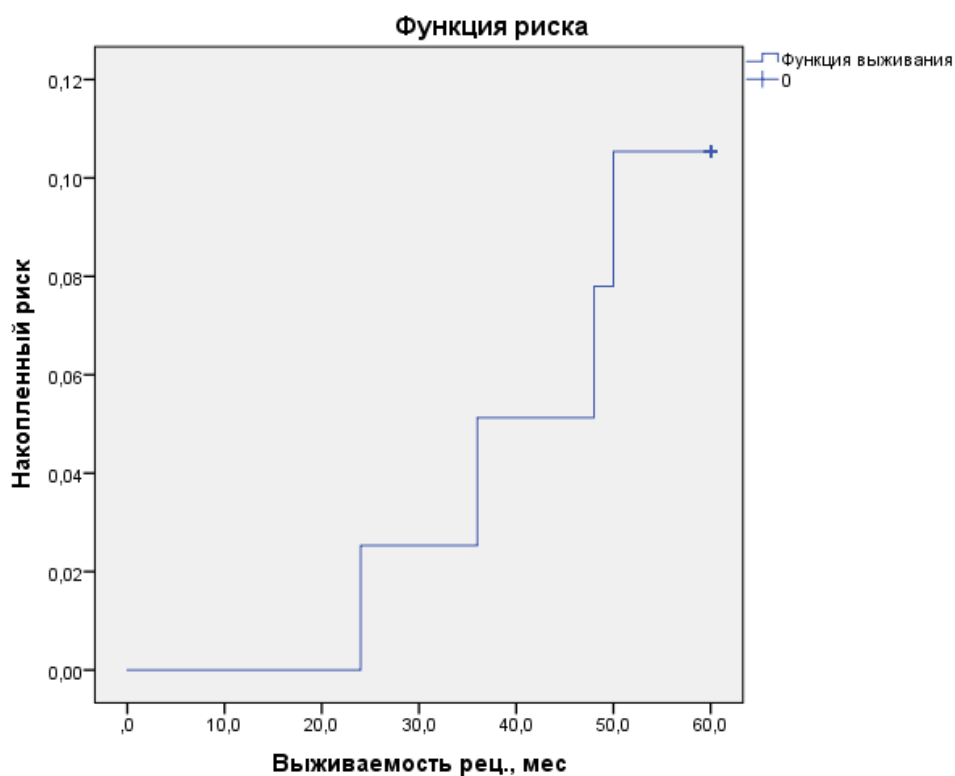


Рисунок 54 – Оценка риска выживаемости реципиентов группы сравнения

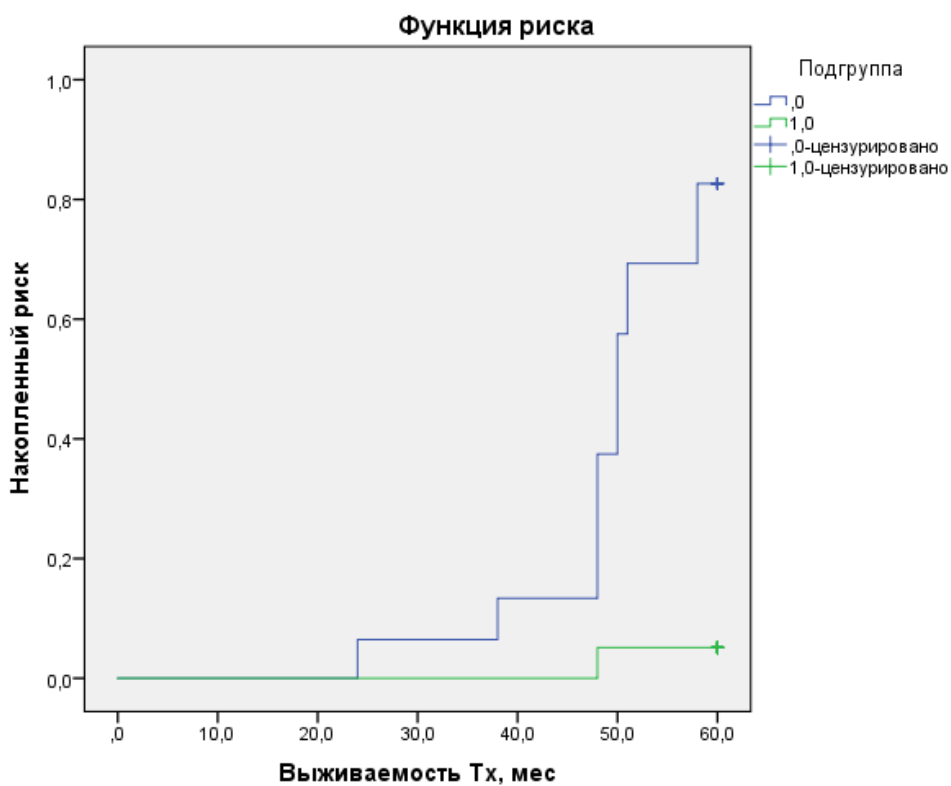


Рисунок 55 – Оценка риска выживаемости почечных трансплантатов исследуемой группы и группы сравнения

Уравнения для предсказания выживания трансплантата выглядят следующим образом (формулы 3 и 4):

$$Y=7,085 - 0,043 * \text{креатинин (мкмоль/л)} \quad (3)$$

$$Y=13,840 - 0,052 * \text{креатинин (мкмоль/л)} - 0,212 * \text{ИМТ} \quad (4)$$

В представленных уравнениях значение «Y» – это результат предсказания (выживет трансплантат почки или не выживет), а «Y x 100%» – это предсказанная вероятность выживания. Указанные в уравнениях числовые значения являются коэффициентами регрессии, ИМТ – это индекс массы тела.

Оценка прогноза выживаемости трансплантата почки (Таблица 8) и полученная регрессионная кривая (Рисунок 56) имеют достаточно хорошую предсказательную ценность: (шаг 2) чувствительность – 92,3%, специфичность – 40%; (шаг 1) чувствительность – 96,2%, специфичность – 40%. Модель имеет хороший коэффициент детерминации – 0,216% (шаг 1) и повышается ко второму шагу до 0,346%. Это говорит о том, что на шаге 1 – модель справедлива для 21,6% трансплантатов, повышаясь ко второму шагу до 34,6%. Согласно универсальным критериям коэффициентов обе модели обладают статистической значимостью – 0,016 (шаг 1) и 0,007 (шаг 2), что говорит о том, что модель имеет право на существование.

Таблица 8 - Оценка прогноза выживаемости трансплантата почки

Таблица классификации (Значение отсечения: 0,5)					
Модель	Наблюдаемые события		Предсказанные события		
			Состояние Tx		Процент правильных
			удалён	норма	
Шаг 1	состояние Tx	удалён	4	6	40,0
		норма	1	25	96,2
	Общая процентная доля				80,6
Шаг 2	состояние Tx	удалён	4	6	40,0
		норма	2	24	92,3
	Общая процентная доля				77,8

Tx – трансплантат почки

Чувствительность модели на шаге 1 составляет 80,6%, в то время как специфичность 80%. На втором шаге чувствительность остается той же – 80%, в то время как специфичность падает до 66,7%.

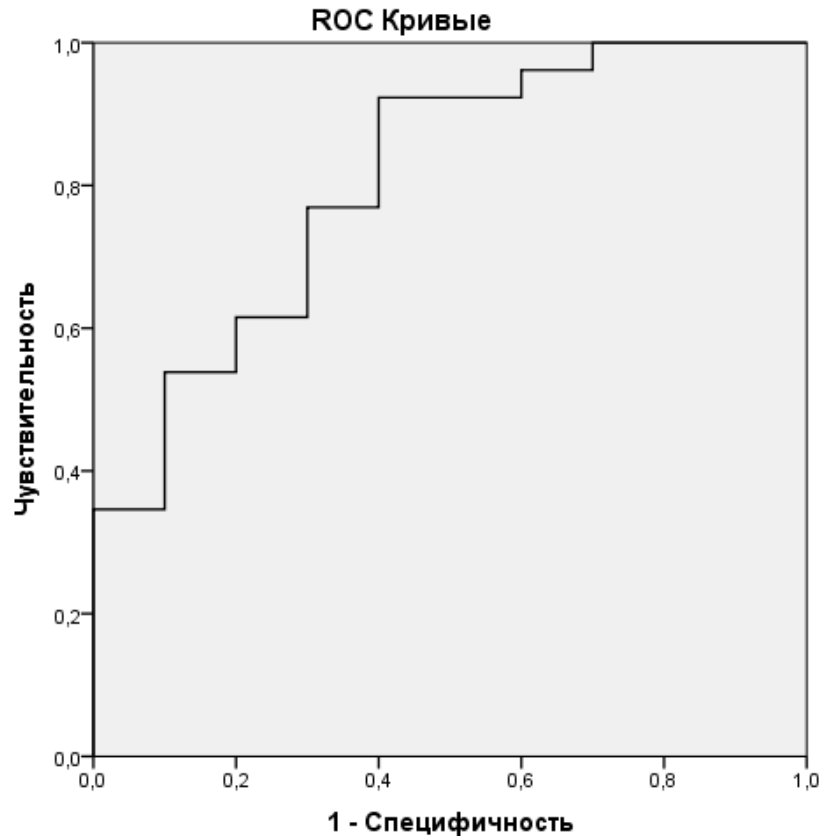


Рисунок 56 – Проверка второго шага оценки значимости модели с использованием ROC-кривой. Предсказанная вероятность – площадь под кривой 0,808, что характеризуется экспертной оценкой как «очень хорошо»

Полученные данные демонстрируют достоверно лучшие отдалённые результаты трансплантации почек у реципиентов исследуемой группы в сравнении с реципиентами контрольной группы – более низкое значение сывороточного креатинина (в среднем 130,5 мкмоль/л против 160,5 мкмоль/л). Тогда как значение СКФ через 5 лет после трансплантации было достоверно выше у реципиентов почек от доноров, которым вводился АТГ – в среднем 47,96 мл/мин на 1,73 м² против 41,08 мл/мин на 1,73 м² у группы сравнения. Также полученные результаты свидетельствуют о лучшей пятилетней выживаемости трансплантатов исследуемой группы реципиентов – 95% (n=19), в отличие от 35% (n=7) группы сравнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на все усилия, направленные на увеличение числа трансплантаций почек, сохраняется дефицит донорских органов и рост количества пациентов в листах ожидания центров трансплантации [21]. В Российской Федерации за 2021 год выполнено 1250 пересадок почки, в листе ожидания состоит 7000 пациентов. Таким образом, количество эффективных трансплантаций почки составляет 17,9% от необходимого.

В последнее десятилетие появилось больше информации о сложной патофизиологии ИРП, что делает необходимым поиск новых терапевтических средств, направленных на редукцию последствий ишемии-реперфузии, гипоксии тканей как результата блокирования микроциркуляторного русла рекрутированными лейкоцитами. Существующие методы коррекции последствий ИРП представлены методами экстракорпоральной фильтрации и целым арсеналом терапевтических опций, которые, однако, все ещё остаются компромиссом между желательным эффектом и клинической реальностью. Несмотря на значимое продвижение в изучении процесса, лежащего в основе механизмов нарушения функции почечного трансплантата, методы лечения по-прежнему недостаточны, а результаты остаются неоднозначными [44].

Существенная проблема трансплантации заключается в невозможности уверенно использовать органы от ДРК, не ставя под угрозу немедленную функцию и долгосрочную выживаемость трансплантата [41].

По мнению Темнова А.А. (2012) главной причиной ранней дисфункции трансплантата являются нарушение целостности эндотелия, развитие воспалительной реакции, клеточный апоптоз и некроз. Это лишь часть изменений, которые происходят в ткани почек вследствие ИРП. Важным становится комплексный подход в терапии этих патологических состояний, включающий рутинные мероприятия в процессе кондиционирования и медикаментозных способов целенаправленной нефропротекции донора [15]. Миграция нейтрофилов в трансплантат и лейкоцитарная инфильтрация тканей в целом инициируют

активацию молекул адгезии ещё на донорском этапе, что ещё более потенцирует реперфузионное повреждение трансплантата почки в организме реципиента [4, 46].

Применение Тимоглобулина вызвало интерес в ряде клинических исследований из-за его многочисленных иммунологических эффектов, таких как глубокая лимфопения, лейкопения и тромбоцитопения [19]. Однако в доступной нам литературе не встретилось сообщений о применении поликлональных антител у ДСМ для улучшения качества трансплантатов почек.

В экспериментальном исследовании С. Hammer и Е. Thein (2002) авторы сообщают, что ПКАТ, в отличие от моноклональных антител, содержат не только цитотоксические антилимфоцитарные антитела, но и являются антителами, имеющими лиганды к молекулам адгезии. Эксперимент заключался в том, что на животной модели (в опыте использовали приматов) авторы забирали кровь из дистальной конечности от 3-х групп, создавали ишемию конечности и через 1 час в зависимости от принадлежности животного к той или иной группе возвращали кровь с добавлением в неё АТГ или без. Результаты исследования продемонстрировали ослабление «роллинга» и прилипания лейкоцитов крови в группах с применением АТГ по сравнению с контрольной группой. Тем самым в выводах исследования указывается об эффективности применения ПКАТ в отношении проявлений последствий ИР [70].

Тимоглобулин обладает уникальным механизмом действия, что является большим преимуществом в применении этого препарата у посмертных доноров на доэксплантационном этапе. В этом отношении терапевтическое применение поликлональных антител у ДСМ, ранее используемых только для лечения реципиентов, представляется эффективным методом улучшения качества почечных трансплантатов, что положительно сказывается на долгосрочных результатах трансплантации. Предлагаемый протокол медикаментозной защиты трансплантатов служит именно этой цели [3].

Впервые в клинической практике трансплантации почек была предложена новая схема коррекции ИРП у ДСМ. Новый способ защиты трансплантатов состоит в механизме элиминации из системы кровообращения донора активированных

форм лейкоцитов и нейтрофилов, снижения уровня экспрессии молекул адгезии на эндотелии сосудов почек, что достигается введением ПКАТ в организм ДСМ до эксплантации [9].

В официальном руководстве по применению Тимоглобулина отсутствуют данные о почасовой динамике лейкопении после введения препарата, а лишь указано, что уже через 1 сутки после введения у пациента отмечается значимое снижение лейкоцитов и лимфоцитов, тогда как период полувыведения АТГ составляет 2–3 суток. Учитывая факт того, что у ДСМ констатирована необратимая гибель головного мозга, в связи с чем непосредственно лечебные мероприятия, направленные на сохранение жизни человека и восстановление его здоровья, больше не проводятся, и возможность быстрого реагирования на возможные побочные эффекты (главным образом гипотензию) после введения Тимоглобулина ДСМ в дозе, превышающей терапевтическую, представился единственно возможным эмпирический метод выбора дозировки препарата.

Таким образом, разработанный протокол включает в себя следующий алгоритм действий при планировании эксплантации почек: после первичного осмотра ДСМ бригадой в составе трансплантационного координатора стационара, анестезиолога-реаниматолога и хирурга КЦОД, получения отрицательных результатов серологического исследования на вирусные инфекционные агенты и принятия решения о начале процедуры диагностики смерти головного мозга, препарат Тимоглобулин вводился в организм донора в дозировке 8 мг/кг массы тела. Учитывая имеющееся ограничение по времени на введение препарата ДСМ (соответствует временному отрезку, требующегося на процедуру диагностики смерти мозга у донора – 6 часов), было принято эмпирическое решение о четырёхкратном увеличении дозы препарата по сравнению с официальной рекомендацией фирмы-производителя для лечения стероид-резистентных кризов отторжения для достижения максимальной редукции количества мобилизованных лейкоцитов.

Ряд результатов данного исследования согласуется с некоторыми экспериментальными работами. Однако, сравнение результатов настоящего

исследования с описанием применения ПКАТ у реципиентов не представляется возможным, ввиду различного подхода и цели применения препарата.

При сравнении показателей уровня лейкоцитов в клинических анализах крови, выполненных перед введением Тимоглобулина и непосредственно перед началом холодной перфузии ДСМ исследуемой группы выявлено достоверно более низкое количество лейкоцитов в пробах крови, взятых после введения АТГ – устойчивая лейкопения $1,5 \pm 0,18 \times 10^9$ /л, в то время как до введения АТГ у ДСМ исследуемой группы отмечался лейкоцитоз $11 \pm 2,1 \times 10^9$ /л. Деплеции подвергается практически весь росток, а именно выявлено достоверное снижение уровня нейтрофилов ($0,1 \pm 0,07 \times 10^9$ /л), моноцитов ($0,05 \pm 0,01 \times 10^9$ /л) и тромбоцитов ($90 \pm 30,5 \times 10^9$ /л). Полученные данные мониторинга изменений в клиническом анализе крови свидетельствуют о достаточной эффективности разработанного протокола применения ПКАТ – значительное снижение количества лейкоцитов в крови у ДСМ исследуемой группы свидетельствует о гематологическом и иммунологическом эффекте Тимоглобулина в краткосрочной перспективе (через 6 часов после введения).

Также по лабораторным данным выявлено, что в моче у ДСМ контрольной группы определяется значительно более высокий уровень NGAL по сравнению с ДСМ исследуемой группы – $22,65 \pm 3,1$ нг/мл. Это различие демонстрирует более тяжёлые тубулярные повреждения, которые предшествуют острому повреждению трансплантатов почек ещё до эксплантации, полученных от ДСМ группы сравнения, нежели чем от ДСМ исследуемой группы, где уровень NGAL в моче составил $3,65 \pm 0,5$ нг/мл. NGAL выделяется с мочой после ишемического повреждения почечной паренхимы и по праву считается маркером острого повреждения почек [99]. Данные о более низком значении NGAL в моче ДСМ исследуемой группы таким образом свидетельствуют об эффективном предупреждении последствий ИРП почек посредством применения препарата ПКАТ.

Оценка гистоморфологических данных, свидетельствующих о полученном ишемическом повреждении трансплантатов почек, проводилась по наличию молекул ЕpСAM на эндотелии капилляров клубочков. Иммуногистохимическое

исследование «нулевых» биоптатов трансплантатов почек, полученных от ДСМ контрольной группы, продемонстрировало положительную экспрессию ЕрСАМ на эндотелии капилляров клубочков, тогда как во всех структурах ткани почек от ДСМ исследуемой группы отмечалось полное отсутствие таковой, в том числе на эндотелии капилляров клубочков. Молекулы ЕрСАМ экспрессируются на мембране эпителиальных почечных клеток, где она участвует в клеточных и межклеточных взаимодействиях [64]. Степень экспрессии ЕрСАМ значительно увеличивается в процессе восстановления почечной ткани и коррелирует с тяжестью последствий ИРП. Регенерация ткани трансплантата требует очень высокого уровня экспрессии ЕрСАМ для развития процессов клеточной пролиферации, миграции и дифференцировки, что было подробно рассмотрено в работе Keller L. et al (2019). Предполагается, что длительная и массивная экспрессия ЕрСАМ ассоциирована с его тропностью к процессам пролиферации и адгезии клеток, что наблюдается после ИРП. Таким образом, регуляция экспрессии ЕрСАМ прямо связана с потребностью в регенерации почечной ткани [92]. В соответствие с указанными функциями и вышеупомянутыми способами регуляции экспрессии ЕрСАМ, можно сделать вывод о том, что результаты выполненного иммуногистохимического исследования биоптатов трансплантатов почек демонстрируют эффективность протокола применения ПКАТ у ДСМ.

В прогностическом отношении важным является факт более благоприятного течения послеоперационного периода у реципиентов исследуемой группы: немедленная функция трансплантата почки наблюдалась в 75% случаев, тогда как у реципиентов группы сравнения – в 50% случаев. Таким образом, подтверждается, что очевидным преимуществом применения Тимоглобулина у ДСМ является снижение последствий ишемического повреждения трансплантатов почек, а введение препарата ПКАТ ДСМ до эксплантации приводит к улучшению ранней функции трансплантата, более низким медианным концентрациям сывороточного креатинина и мочевины, а также более высокому медианному значению СКФ у реципиентов исследуемой группы, чем у реципиентов группы сравнения.

При сравнении показателей креатинина в контрольной и исследуемой группах реципиентов по данным всей выборки определяется более низкое значение уровня сывороточного креатинина в исследуемой группе через 5 лет после трансплантации почки, чем у контрольной группы (в среднем 130,5 мкмоль/л у реципиентов исследуемой группы и 160,5 мкмоль/л у реципиентов группы сравнения). Через 5 лет после трансплантации значение СКФ было достоверно выше у реципиентов почек от доноров, которым вводился АТГ – в среднем 47,96 мл/мин на 1,73 м² против 41,08 мл/мин на 1,73 м² у группы сравнения. Показатели мочевины через 5 лет после трансплантации также были ниже у реципиентов исследуемой группы 8,95 ммоль/мл по сравнению с 9,75 ммоль/мл группы сравнения, однако, различие не является статистически значимым ($p=0,6590$).

Полученные данные демонстрируют лучшую пятилетнюю выживаемость трансплантатов исследуемой группы реципиентов – 95% ($n=19$), в отличие от 35% ($n=7$) группы сравнения.

При обсуждении результатов применения разработанного протокола медикаментозной защиты трансплантатов почек, необходимо особенно выделить следующий момент, имеющий принципиальное значение.

Наша гипотеза требовала не только клинической верификации, но и морфологического и лабораторного подтверждения, что практически невозможно осуществить «здесь и сейчас» в условиях большинства стационаров, где силами хирургической бригады КЦОД осуществляется эксплантация органов у ДСМ. До внедрения настоящего протокола ранее необходимости в сборе достаточного большого количества биоматериала от ДСМ для оригинальных исследований, как правило, не существовало. В условиях развёрнутой операционной, готовых к работе операционной сестры и хирургов, выполнять многочисленные исследования биоматериала в научных целях и реальном времени не представлялось возможным. Было важно сохранить биообразцы от ДСМ и реципиентов для будущих исследований, для чего создан трансплантационный биобанк, представляющий собой коллекцию биологических образцов и связанную с ними информацию в доступной для анализа форме [14]. Выполнение сбора проб по разработанной

оригинальной методике, изготовление биообразцов из биоматериала ДСМ, их транспортировка надлежащим образом в биобанк КЦОД, универсальная маркировка, характеристика и хранение при соблюдении температурных норм является обязательным требованием, предъявляемым к функционированию биобанка.

Таким образом, даже учитывая все особенности организации операции эксплантации у ДСМ, найдено решение для проведения клинических и научных исследований используя ресурсы биобанка. Кроме использования в фундаментальных и диссертационных исследованиях трансплантационный биобанк также является инструментом оценки изначального ресурса трансплантата и прогнозирования срока его функционирования. Также с использованием возможностей биобанка видится перспективной разработка новых схем лекарственной терапии неблагоприятных состояний в трансплантации органов.

В перспективном отношении создание исследовательских трансплантационных биобанков, обеспечивающих профессиональный и эффективный сбор, обработку, характеристику, хранение и научно-клиническое использование биообразцов должно стать ключевым компонентом современной трансплантологии. Наличие высококачественных, детально описанных, полученных с соблюдением этических и правовых норм, и разрешенных к использованию биологических образцов является важным фактором прогресса исследований в области решения современных проблем отрасли. Создание высокопроизводительного, централизованного исследовательского трансплантационного биобанка при каждом центре донорства, объединяющего усилия по квалифицированному сбору, обработке и характеристике образцов в соответствии с перечисленными выше требованиями позволит решить данные проблемы.

На основании собственного опыта нами был разработан алгоритм применения ПКAT у ДСМ и формирования трансплантационного биобанка. Схема представлена на рисунке 57.

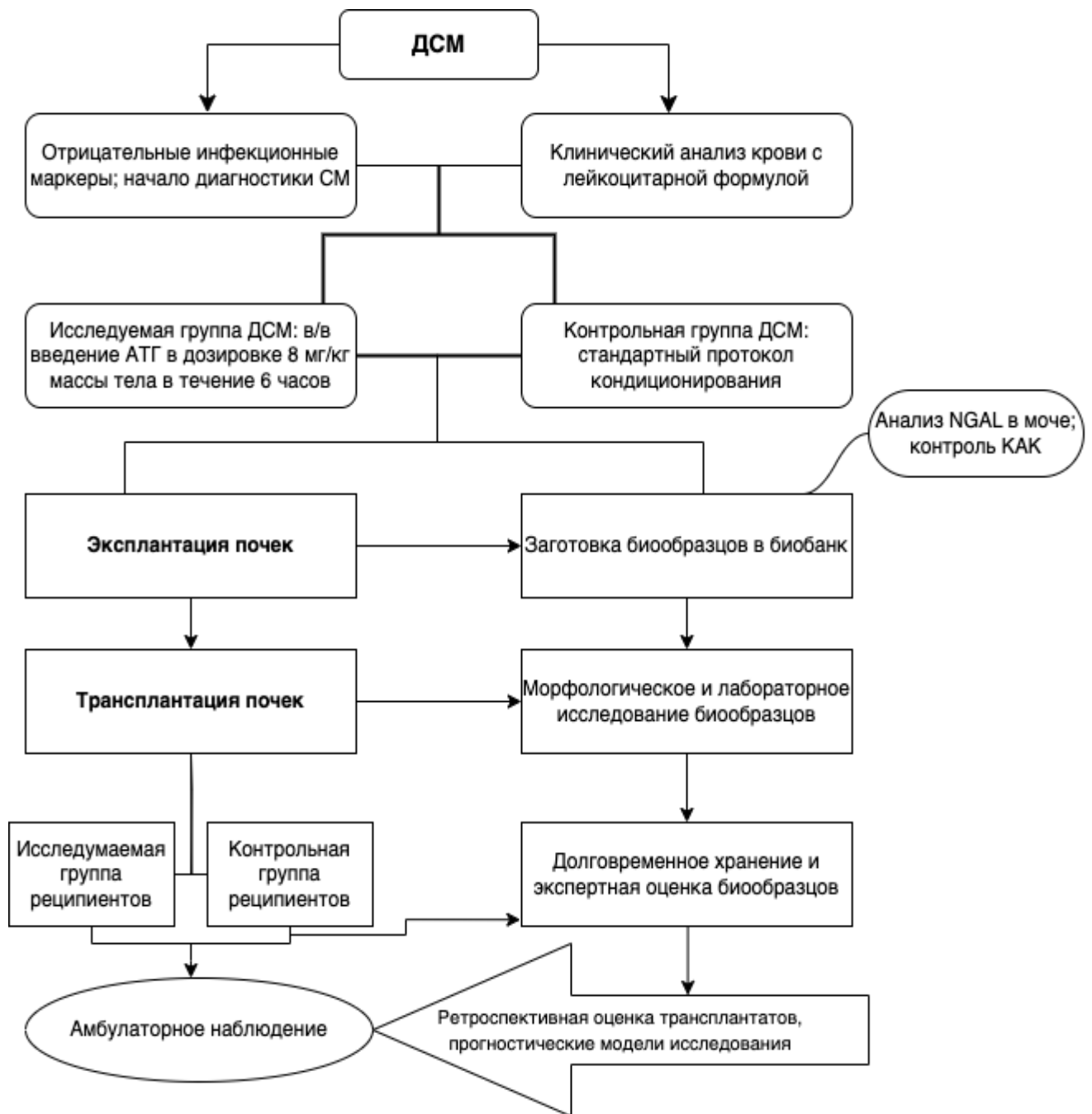


Рисунок 57 – Алгоритм применения поликлональных антител у доноров со смертью мозга и формирования трансплантационного биобанка

Биобанки, обеспечивающие профессиональный и эффективный сбор, обработку, характеристику, хранение и распространение образцов должны стать ключевым компонентом современной трансплантологии. Наличие высококачественных, детально описанных, полученных с соблюдением этических и правовых норм, и разрешенных к использованию биологических образцов является важным фактором прогресса исследований в области решения современных

проблем отрасли. Создание высокопроизводительного, централизованного трансплантационного биобанка при каждом центре донорства, объединяющего усилия по квалифицированному сбору, обработке и характеристике образцов в соответствии с перечисленными выше требованиями позволит решить данные проблемы.

Результаты исследования применения Тимоглобулина у ДСМ свидетельствуют о перспективности внедрения предложенного протокола в клинические рекомендации, что позволит улучшить качество получаемых трансплантатов, их пригодность к дальнейшей пересадке, увеличить срок функционирования трансплантата за счёт предупреждения развития ранней трансплантационной нефропатии, увеличить «донорский пул» за счёт использования ДРК, минимизировать вероятность острого отторжения у реципиентов, уменьшить продолжительность пребывания в стационаре и, следовательно, снизить экономические затраты [9].

Настоящий протокол с применением поликлональных антител демонстрирует необходимость разработки аналогичного отечественного препарата, направленного на снижение лейкоцитарной агрессии в организме ДСМ при использовании криобиотических коллекций исследовательских трансплантационных биобанков.

ВЫВОДЫ

1. Использование поликлональных антител у доноров со смертью мозга в дозировке 8 мг/кг массы тела в течение 6 часов приводит к выраженной лейкопении (снижению количества лейкоцитов в 11 раз), снижению уровня нейтрофилов в 9 раз, лимфоцитов в 16 раз, моноцитов в 3 раза и тромбоцитов в 2 раза в крови.

2. Создание в структуре отделений пересадки органов трансплантационных биобанков позволяет иметь постоянно действующую коллекцию биообразцов, связанных клиническими данными пар «донор-реципиент», обеспечивающих выполнение морфологической оценки в ретро- и проспективных исследованиях.

3. Морфологическая картина демонстрирует снижение экспрессии молекул клеточной адгезии на эндотелии капилляров клубочков трансплантатов почек от доноров со смертью мозга после применения поликлональных антител на доэксплантационном этапе.

4. При трансплантации почек от доноров со смертью мозга с применением поликлональных антител имеет место более высокая частота немедленной функции трансплантатов у реципиентов – 75% (15) случаев, по сравнению с 50% (10) реципиентов почек от доноров без применения разработанного протокола. Через 30 суток после пересадки показатели функции трансплантата лучше у реципиентов почек, полученных от доноров с использованием разработанного протокола – концентрация креатинина сыворотки крови достоверно ниже, чем у пациентов группы сравнения – 167,4 мкмоль/л, тогда как в группе сравнения – 184,2 мкмоль/л ($p < 0,05$), что указывает на более благоприятное течение послеоперационного периода.

5. Пятилетняя выживаемость трансплантатов составила 95% ($n=19$) у реципиентов почек, полученных от доноров с применением поликлональных антител, в отличие от 35% ($n=7$) трансплантатов от доноров без применения разработанного протокола. Уровни креатинина сыворотки крови ниже у реципиентов почек, полученных от доноров с применением поликлональных антител: медиана концентрации креатинина сыворотки крови через 5 лет после трансплантации – 130,5 мкмоль/л по сравнению с 160,5 мкмоль/л у реципиентов почек от доноров без применения разработанного протокола ($p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение поликлональных антител у доноров со смертью мозга в дозировке 8 мг/кг массы тела в течение 6 часов обеспечивает целенаправленную элиминацию лейкоцитов, как фактора развития ишемически-реперфузионного повреждения трансплантатов почек.

2. Необходимо сохранять биообразцы от доноров и реципиентов почек для будущих исследований, для чего целесообразно формирование трансплантационных биобанков на базе отделений трансплантации.

3. Доэксплантационное применение поликлональных антител у посмертных доноров позволяет улучшать качество получаемых трансплантатов, увеличивать срок функционирования трансплантата, и тем самым в совокупности уменьшить продолжительность пребывания реципиентов в стационаре и снизить экономические расходы.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основании данного исследования возникает необходимость разработки аналогичного Тимоглобулину отечественного препарата, направленного на снижение лейкоцитарной агрессии в организме посмертного донора.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГМ – аневризма сосудов головного мозга

АДПП – аутосомно-доминантный поликистоз почек

АТГ – антитимоцитарный глобулин

АФК – активная форма кислорода

ВХИ – время холодной ишемии

ГБ – гипертоническая болезнь

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРК – донор с расширенными критериями

ДСМ – донор со смертью мозга

ИР – ишемия-реперфузия

ИРП – ишемически-реперфузионное повреждение

КЦОД – координационный центр органного донорства

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

ОФТ – отсроченная функция трансплантата

ПКАТ – поликлональные антитела

СКФ – скорость клубочковой фильтрации

СМ – смерть мозга

СПб КЦОД – Санкт-Петербургский координационный центр органного донорства

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ХБП – хроническая болезнь почек

ХГН – хронический гломерулонефрит

ЕpCAM – молекула клеточной адгезии эпителия

ЕРО- α – эритропоэтин- α

ICAM – молекула внутриклеточной адгезии

IL – интерлейкин

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа

NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би»

NGAL – липокалин, связанный с нейтрофильной желатиназой

TLR – Толл-подобные рецепторы

TNF- α – фактор некроза опухоли-альфа

SIRS – синдром системного воспалительного ответа

VCAM – молекулы сосудистой адгезии

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрианова, Н. В. Воспаление и окислительный стресс как мишени для терапии ишемического повреждения почек / Н. В. Андрианова, Д. Б. Зоров, Е. Ю. Плотников // Биохимия. – 2020. – Т. 85. – №. 12. – С. 1873–1886.
2. Биобанк для изучения вопросов ишемически-реперфузионного повреждения / Д. О. Кузьмин [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21. – №. S. – С. 199–199.
3. Биобанки–неоценимый ресурс трансплантации. История, современное состояние, перспективы / О. Н. Резник [и др.]. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 18. – №. 4. – С. 123–132.
4. Ватазин, А. В. Профилактика и лечение синдрома ишемии-реперфузии / А.В. Ватазин, Д. В. Артемов, А. Б. Зулькарнаев // Нефрология. – 2019. – Т. 23. – №. 2. – С. 41–48.
5. Иванов, К. П. Роль лейкоцитов в динамике микроциркуляции в норме и при патологии / К. П. Иванов, Н. Н. Мельникова // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2004. – №. 4. – С. 3–13.
6. Кутепов, Д. Е. Патогенез синдрома ишемии-реперфузии/ Д.Е. Кутепов, М.С. Жигалова, И. Н. Пасечник // Казанский медицинский журнал. – 2018. – Т. 99. – №. 4. – С. 640–644.
7. Национальные клинические рекомендации. Посмертное донорство органов / ООО «Российское трансплантологическое общество». - 2013. - 38 с.
8. Неймарк, М.И. Синдром ишемии-реперфузии / М.И. Неймарк // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. – 2021. – Т.9. – С.71- 76.
9. Опыт применения нового протокола коррекции ишемически-реперфузионной травмы у доноров со смертью головного мозга / С. Ф. Багненко [и др.]. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2017. – Т. 19. – №. S. – С. 222–222.

10. Парадоксы реперфузии в практике критических состояний: возможность решения / А. В. Колядко [и др.]. // Вестник СурГУ. Медицина. – 2020. – №. 3 (45). – С. 69–75.
11. Перспективы применения антисмысловой генной терапии при трансплантации органов / О. Н. Резник [и др.]. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2013. – Т. 15. – №. 1. – С. 106–117.
12. Пинчук, А. В. Индукционная иммуносупрессия при трансплантации почки: Тимоглобулин® (обзор литературы) / А. В. Пинчук // Трансплантология. – 2014. – №. 2. – С. 31–43.
13. Реабилитация донорских органов. Направление в консервации или новая парадигма трансплантологии? / С. Ф. Багненко [и др.]. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 11. – №. 3. – С. 17–29.
14. Создание исследовательского многофункционального биобанка / О. Н. Резник [и др.]. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т. 18. – №. 5. – С. 232–232.
15. Темнов, А. А. Новые технологии в трансплантологии. Ишемически-реперфузионное повреждение трансплантата / А. А. Темнов // Трансплантология. – 2012. – №. 4. – С. 34–38.
16. Трофимов, Н. А. Отрасль биобанков в ближайшем будущем / Н. А. Трофимов // Наука за рубежом. – 2012. – Т. 13. – С. 1–13.
17. Факторы риска отсроченной функции почечного трансплантата от посмертного донора / Шабунин А. В. [и др.] // Трансплантология. – 2022. – Т. 14. – №. 3. – С. 265-277.
18. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death / M. Kusaka [et al.]. // Transplantation. – 2000. – V. 69. – №. 3. – P. 405-410.
19. Assessment of organ quality in kidney transplantation by molecular analysis and why it may not have been achieved, yet / S. Von Moos [et al.]. // Frontiers in immunology. – 2020. – V. 11. – P. 833.

20. Asslauer, M. Biobanks: transnational, European and global networks / M. Asslauer, K. Zatloukal // Briefings in functional genomics and proteomics. – 2007. – V. 6. – №. 3. – P. 193-201.
21. Bea, S. Optout policy and the organ shortage problem: Critical insights and practical considerations / S. Bea // Transplantation Reviews. – 2021. – V. 35. – №. 1. – P. 100589.
22. Biobanking in a constantly developing medical world / Artene S. A. [et al.]. // The Scientific World Journal. – 2013. – T. 2013.
23. Biobanks in Europe: prospects for harmonisation and networking/ E. Zika [et al.]. // Joint Research Centre (Seville site), 2010. – №. JRC57831.
24. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation / J. Pratschke [et al.]. // Transplantation. – 1999. – V. 67. – №. 3. – P. 343-348.
25. Brain death-induced inflammatory activity is similar to sepsis-induced cytokine release / P. Schwarz [et al.]. // Cell Transplantation. – 2018. – V. 27. – №. 10. – P. 1417-1424.
26. Carbon monoxide releasing molecules inhibit cell death resulting from renal transplantation related stress / A. Sener [et al.]. // The Journal of urology. – 2013. – V. 190. – №. 2. – P. 772-778.
27. Carden, D. L. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury / D. L. Carden, D. N. Granger // The Journal of pathology. – 2000. – V. 190. – №. 3. – P. 255-266.
28. Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion / M. C. Michallet [et al.]. // Blood. – 2003. – V. 102. – №. 10. – P. 3719-3726.
29. Cell biology of ischemia/reperfusion injury / T. Kalogeris [et al.]. // International review of cell and molecular biology. – 2012. – V. 298. – P. 229-317.
30. Chronic kidney disease / A. C. Webster [et al.]. // The lancet. – 2017. – V. 389. – №. 10075. – P. 1238-1252.
31. Chronic kidney disease / K. Kalantar-Zadeh [et al.]. // The lancet. – 2021. – V. 398. – №. 10302. – P. 786-802.

32. Clinical practice guidelines on waitlisting for kidney transplantation: consistent and equitable? / P. Batabyal [et al.]. // *Transplantation*. – 2012. – V. 94. – №. 7. – P. 703-713.
33. Coagulation and fibrinolysis in kidney graft rejection / G. Stallone [et al.]. // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – V. 11. – P. 1807.
34. Crosstalk between complement and Toll- like receptor activation in relation to donor brain death and renal ischemia- reperfusion injury / J. Damman [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2011. – V. 11. – №. 4. – P. 660-669.
35. Cucchiari, D. The critical role of innate immunity in kidney transplantation / D. Cucchiari, M. A. Podestà, C. Ponticelli // *Nephron*. – 2016. – V. 132. – №. 3. – P. 227-237.
36. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury / M. Y. Wu [et al.]. // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2018. – V. 46. – №. 4. – P. 1650-1667.
37. Cystathionine γ -lyase protects against renal ischemia/reperfusion by modulating oxidative stress / Bos E. M. [et al.]. // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2013. – V. 24. – №. 5. – P. 759-770.
38. Da Luz Scheffer, D. Exercise-induced immune system response: Anti-inflammatory status on peripheral and central organs / D. Da Luz Scheffer, A. Latini // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. – 2020. – V. 1866. – №. 10. – P. 165823.
39. Damage-associated molecular patterns in human diseases / W. G. Land [et al.]. // Springer International Publishing, 2018. Volume 1: Injury-Induced Innate Immune Responses. – Cham: Springer International Publishing, 2018. – C. 723-748.
40. Delayed graft function and the risk of acute rejection in the modern era of kidney transplantation / W. K. Wu [et al.]. // *Kidney international*. – 2015. – V. 88. – №. 4. – P. 851-858.
41. Delayed graft function in kidney transplantation / D. Bahl [et al.]. // *Current opinion in organ transplantation*. – 2019. – V. 24. – №. 1. – P. 82-86.

42. Denic, A. Structural and functional changes with the aging kidney / A. Denic, R. J. Glassock, A. D. Rule // *Advances in chronic kidney disease*. – 2016. – V. 23. – №. 1. – P. 19-28.
43. Depletion of gut commensal bacteria attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury / K. Yoshiya [et al.] // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. – 2011. – V. 301. – №. 6. – P. 1020-1030.
44. Dery, K. J. New insights into ischemia-reperfusion injury signaling pathways in organ transplantation / K. J. Dery, J. W. Kupiec-Weglinski // *Current Opinion in Organ Transplantation*. – 2022. – V. 27. – №. 5. – P. 424-433.
45. Donor pretreatment with carbamylated erythropoietin in a brain death model reduces inflammation more effectively than erythropoietin while preserving renal function / W. N. Nijboer [et al.]. // *Critical care medicine*. – 2010. – V. 38. – №. 4. – P. 1155-1161.
46. Early events in kidney donation: progression of endothelial activation, oxidative stress, and tubular injury after brain death / A. M. Morariu [et al.]. // *Transplantation*. – 2006. – V. 82. – №. 1. – P. 1041.
47. Eculizumab use for kidney transplantation in patients with a diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome / A. M. Siedlecki [et al.]. // *Kidney International Reports*. – 2019. – V. 4. – №. 3. – P. 434-446.
48. Edaravone prevents bowel infarction after acute superior mesenteric artery thromboembolism using autologous fibrin clots in a rabbit model / A. Sonoda [et al.]. // *The British journal of radiology*. – 2009. – V. 82. – №. 981. – P. 711-715.
49. Effect of delayed graft function, acute rejection and chronic allograft dysfunction on kidney allograft telomere length in patients after transplantation: a prospective cohort study / L. Domański [et al.]. // *BMC nephrology*. – 2015. – V. 16. – №. 1. – P. 1-7.
50. Effect of hyperbaric oxygen on tissue damage and expression of adhesion molecules and C3 in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury after kidney transplantation / F. Zhao [et al.]. // *Annals of Transplantation*. – 2020. – V. 25. – P. e919385-1.

51. Effect of rabbit antithymocyte globulin on acute and chronic active antibody-mediated rejection after kidney transplantation / K. Nanmoku [et al.]. // *Transplantation Proceedings*. – Elsevier, 2019. – V. 51. – №. 8. – P. 2602-2605.
52. Effects of dopamine donor pretreatment on graft survival after kidney transplantation: a randomized trial / P. Schnuelle [et al.]. // *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. – 2017. – V. 12. – №. 3. – P. 493-501.
53. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the RAT / M. Takada [et al.]. // *Transplantation*. – 1998. – V. 65. – №. 12. – P. 1533-1542.
54. Effects of ischemia-reperfusion on tubular cell membrane transporters and consequences in kidney transplantation / Q. Faucher [et al.]. // *Journal of Clinical Medicine*. – 2020. – V. 9. – №. 8. – P. 2610.
55. Efficacy and safety outcomes of extended criteria donor kidneys by subtype: Subgroup analysis of BENEFIT- EXT at 7 years after transplant / S. Florman [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2017. – V. 17. – №. 1. – P. 180-190.
56. Elevated tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts / E. J. Birks [et al.]. // *Circulation*. – 2000. – V. 102. – №. 3. – P. 352-358.
57. Ethical aspects of human biobanks: a systematic review / D Budimir [et al.]. // *Croatian medical journal*. – 2011. – V. 52. – №. 3. – P. 262-279.
58. Expanded criteria donors for kidney transplantation / R. A. Metzger [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2003. – V. 3. – P. 114-125.
59. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis / C. Rubel [et al.]. // *The Journal of Immunology*. – 2001. – V. 166. – №. 3. – P. 2002-2010.
60. Francis, A. Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms / A. Francis, R. Baynosa // *Diving and hyperbaric medicine*. – 2017. – V. 47. – №. 2. – P. 110.
61. Frémeaux-Bacchi, V. The emerging role of complement inhibitors in transplantation / V. Frémeaux-Bacchi, C. M. Legendre // *Kidney international*. – 2015. – V. 88. – №. 5. – C. 967–973.

62. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors / P. N. Monk [et al.]. // *British journal of pharmacology*. – 2007. – V. 152. – №. 4. – P. 429-448.
63. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins / M. C. Michallet [et al.]. // *Transplantation*. – 2003. – V. 75. – №. 5. – P. 657-662.
64. Functions of EpCAM in physiological processes and diseases / L. Huang [et al.]. // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2018. – V. 42. – №. 4. – P. 1771-1785.
65. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach / R. Heilker [et al.]. // *Drug discovery today*. – 2009. – V. 14. – №. 5-6. – P. 231-240.
66. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases / J. Seok [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V. 110. – №. 9. – P. 3507-3512.
67. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 / B. Bikbov [et al.]. // *The lancet*. – 2020. – V. 395. – №. 10225. – P. 709-733.
68. Granger, D. N., Kvietys P. R. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept / D.N. Granger, P. R. Kvietys // *Redox biology*. – 2015. – V. 6. – P. 524-551.
69. Greer, D. M. Determination of brain death / D. M. Greer // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – V. 385. – №. 27. – P. 2554-2561.
70. Hammer, C. Visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on adhesion of leukocytes / C. Hammer, E. Thein // *Transplantation proceedings*. – 2002. – V. 34. – №. 6. – P. 2486-2487.
71. Han, S. J., Lee H. T. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury / S. J. Han, H. T. Lee // *Kidney research and clinical practice*. – 2019. – V. 38. – №. 4. – P. 427.

72. Hormonal and hemodynamic changes in a validated animal model of brain death / Chen E. P. [et al.]. // *Critical care medicine*. – 1996. – V. 24. – №. 8. – P. 1352-1359.
73. Hosgood, S. A. 1400W reduces ischemia reperfusion injury in an ex-vivo porcine model of the donation after circulatory death kidney donor / S. A. Hosgood, P. J. Yates, M. L. Nicholson // *World journal of transplantation*. – 2014. – V. 4. – №. 4. – P. 299.
74. Immune cells in ischemic acute kidney injury / L. Zheng [et al.]. // *Current Protein and Peptide Science*. – 2019. – . 20. – №. 8. – P. 770-776.
75. Impact of cold ischemia time on outcomes of deceased donor kidney transplantation: an analysis of a national registry / H. Peters-Sengers [et al.]. // *Transplantation direct*. – 2019. – V. 5. – №. 5.
76. Impact of polyclonal antithymocyte globulins on kidney transplant outcomes in real-life: a propensity score analysis / J. Bamoulid [et al.]. – 2020.
77. Improved long- term graft survival after HO- 1 induction in brain- dead donors / K. Kotsch [et al.]. // *American journal of transplantation*. – 2006. – V. 6. – №. 3. – P. 477-486.
78. Incidence, risk factors, and outcomes of delayed graft function in deceased donor kidney transplantation in a Brazilian center / M. S. Helfer [et al.]. // *Transplantation proceeding*. – Elsevier, 2014. – V. 46. – №. 6. – C. 1727-1729.
79. Increasing the use of kidneys from unconventional and high- risk deceased donors / Heilman [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2016. – V. 16. – №. 11. – P. 3086-3092.
80. Inflammation in AKI: current understanding, key questions, and knowledge gaps / H. Rabb [et al.]. // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2016. – V. 27. – №. 2. – P. 371-379.
81. Inflammatory mechanisms contributing to endothelial dysfunction / P. Theofilis [et al.]. // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – №. 7. – P. 781.

82. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats / J. Pratschke [et al.]. // *Journal of the American Society of Nephrology*. – 2001. – V. 12. – №. 11. – P. 2474-2481.
83. Intraoperative administration of inhaled carbon monoxide reduces delayed graft function in kidney allografts in Swine / D. W. Hanto [et al.]. // *American journal of transplantation*. – 2010. – V. 10. – №. 11. – P. 2421-2430.
84. Ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation: relevant mechanisms in injury and repair / G. J. Nieuwenhuijs-Moeke [et al.]. // *Journal of clinical medicine*. – 2020. – V. 9. – №. 1. – P. 253.
85. Ischemia Reperfusion Injury—A Translational Perspective in Organ Transplantation / A. R. Fernández [et al.]. // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21. – №. 22. – P. 8549.
86. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond / H. Zhao [et al.]. // *EBioMedicine*. – 2018. – V. 28. – P. 31-42.
87. Ischemia/reperfusion / T. Kalogeris [et al.]. // *Comprehensive Physiology*. – 2016. – V. 7. – №. 1. – P. 113.
88. Ischemia/reperfusion injury: pathophysiology, current clinical management, and potential preventive approaches / C. D. Sánchez-Hernández [et al.]. // *Mediators of Inflammation*. – 2020. – V. 2020.
89. Ischemia/reperfusion-associated tubular cells injury in renal transplantation: Can metabolomics inform about mechanisms and help identify new therapeutic targets? / C. Barin-Le Guellec [et al.]. // *Pharmacological research*. – 2018. – V. 129. – P. 34-43.
90. Jang, H. R. The innate immune response in ischemic acute kidney injury / H. R. Jang, H. Rabb // *Clinical immunology*. – 2009. – V. 130. – №. 1. – P. 41-50.
91. Kauffmann, F. Tracing biological collections: between books and clinical trials / F. Kauffmann, A. Cambon-Thomsen // *Jama*. – 2008. – V. 299. – №. 19. – P. 2316-2318.
92. Keller, L., S. Werner, K. Pantel. Biology and clinical relevance of EpCAM/ L. Keller, S. Werner, K. Pantel. // *Cell stress*. – 2019. – V. 3. – №. 6. – P. 165.

93. Kinkorova, J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation / J. Kinkorova // EPMA Journal. – 2016. – V. 7. – №. 1. – P. 1-12.
94. Kolaczkowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczkowska, P. Kubes // Nature reviews immunology. – 2013. – V. 13. – №. 3. – P. 159-175.
95. Lasley, R. D. Beneficial effects of adenosine A2a agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium / R. D. Lasley, M. S. Jahania, R. M. Mentzer Jr // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2001. – V. 280. – №. 4. – P. 1660-1666.
96. Lee, C. H. Effectiveness of thymoglobulin induction therapy in kidney transplant from deceased donor with mild to moderate acute kidney injury / C. H. Lee, J. G. Gwon, C. W. Jung // Transplantation proceedings. – Elsevier, 2019. – V. 51. – №. 8. – P. 2611-2614.
97. Leighton, J. Modern immunosuppression / J. Leighton, C. Wilson // Surgery (Oxford). – 2020. – V. 38. – №. 7. – P. 368-374.
98. Liew, P. X. The neutrophil's role during health and disease / P. X. Liew, P. Kubes // Physiological reviews. – 2019. – V. 99. – №. 2. – P. 1223-1248.
99. Life and death at the mucosal-luminal interface: new perspectives on human intestinal ischemia-reperfusion / J. Grootjans [et al.]. // World journal of gastroenterology. – 2016. – V. 22. – №. 9. – P. 2760.
100. Long-term outcomes and discard rate of kidneys by decade of extended criteria donor age / M. Messina [et al.]. // Clinical Journal of the American Society of Nephrology. – 2017. – V. 12. – №. 2. – P. 323-331.
101. Mannon, R. B. Delayed graft function: the AKI of kidney transplantation / R. B. Mannon // Nephron. – 2018. – V. 140. – №. 2. – P. 94-98.
102. Mastellos, D. C. Clinical promise of next generation complement therapeutics / D. C. Mastellos, D. Ricklin, J. D. Lambris // Nature Reviews Drug Discovery. – 2019. – V. 18. – №. 9. – P. 707-729.

103. McFarlane, P. A. Should patients remain on intensive hemodialysis rather than choosing to receive a kidney transplant? / P. A. McFarlane // *Seminars in Dialysis*. – Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2010. – V. 23. – №. 5. – P. 516-519.
104. McKeown, D. W. Management of the heartbeating brain-dead organ donor / D. W. McKeown // *British journal of anaesthesia*. – 2012. – V. 108. – №.1. – P. 96-107.
105. Mechanisms Involved in Antithymocyte Globulin Immunosuppressive Activity In A Nonhuman Primate Model / X. Prévile [et al.]. // *Transplantation*. – 2001. – V. 71. – №. 3. – P. 460-468.
106. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation / R. Medzhitov // *Nature*. – 2008. – V. 454. – №. 7203. – P. 428-435.
107. Moghbeli, F. Scoring systems of kidney donation from deceased donors: A systematic review / F. Moghbeli, M. Jangi, Z. Ebnehoseini // *Journal of Education and Health Promotion*. – 2021. – V. 10.
108. Mohty, M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond / M. Mohty // *Leukemia*. – 2007. – V. 21. – №. 7. – P. 1387-1394.
109. Mueller, T. F. Mechanisms of action of thymoglobulin / T. F. Mueller // *Transplantation*. – 2007. – V. 84. – №.11S. – P. 5-10.
110. Neutrophils — a key component of ischemia-reperfusion injury / Z. V. Schofield [et al.]. // *Shock*. – 2013. – V. 40. – №. 6. – P. 463-470.
111. Optimisation of the organ donor and effects on transplanted organs: a narrative review on current practice and future directions / K. D. Bera [et al.]. // *Anaesthesia*. – 2020. – V. 75. – №. 9. – P. 1191-1204.
112. Parks, A. 10 ideas changing the world right now: biobanks / A. Parks // *Time*. – Accessed 22 August 2011, 2009.
113. Pathophysiologic role of ischemia reperfusion injury: A review / V. K. Vishwakarma [et al.]. // *Journal of Indian College of Cardiology*. – 2017. – V. 7. – №. 3. – P. 97-104.
114. Pharmacological Protection of Kidney Grafts from Cold Perfusion-Induced Injury / A. Krzywonos-Zawadzka [et al.]. // *BioMed Research International*. – 2019. – V. 2019.

115. Polyclonal anti-thymocyte globulins influence apoptosis in reperfused tissues after ischaemia in a non-human primate model / A. Beiras-Fernandez [et al.]. // *Transplant international*. – 2004. – V. 17. – №. 8. – P. 453-457.
116. Ponticelli, C. The inflammatory state is a risk factor for cardiovascular disease and graft fibrosis in kidney transplantation / C. Ponticelli, M. R. Campise // *Kidney International*. – 2021. – V. 100. – №. 3. – P. 536-545.
117. Ponticelli, C. The mechanisms of acute transplant rejection revisited / C. Ponticelli // *J Nephrol*. – 2012. – V. 25. – №. 2. – P. 150-158.
118. Pratt, J. R. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection / J. R. Pratt, S. A. Basheer, S. H. Sacks // *Nature medicine*. – 2002. – V. 8. – №. 6. – P. 582-587.
119. Rabbit anti-human thymocyte immunoglobulin for the rescue treatment of chronic antibody-mediated rejection after pediatric kidney transplantation / Y. Cihan [et al.]. // *Pediatric Nephrology*. – 2017. – V. 32. – №. 11. – P. 2133-2142.
120. Rabbit anti- thymocyte globulin for the prevention of acute rejection in kidney transplantation / Alloway R. R. [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2019. – V. 19. – №. 8. – P. 2252-2261.
121. Rabbit antithymocyte globulin (Thymoglobulin®) / A. O. Gaber [et al.]. // *Drugs*. – 2010. – V. 70. – №. 6. – P. 691–732.
122. Rate, Factors, and Outcome of Delayed Graft Function After Kidney Transplantation of Deceased Donors / L. Jahn [et al.]. // *Transplantation Proceedings*. – Elsevier, 2021. – V. 53. – №. 5. – P. 1454-1461.
123. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury / A. Pefanis [et al.]. // *Kidney International*. – 2019. – V. 96. – №. 2. – P. 291-301.
124. Remote ischemic conditioning enhanced the early recovery of renal function in recipients after kidney transplantation: a randomized controlled trial / J. Wu [et al.]. // *Journal of surgical research*. – 2014. – V. 188. – №. 1. – P. 303-308.
125. Renal ischemia/reperfusion injury: an insight on in vitro and in vivo models / Shiva N. [et al.]. // *Life sciences*. – 2020. – V. 256. – P. 117860.

126. Role of neutrophil extracellular traps and vesicles in regulating vascular endothelial permeability / Y. Ma [et al.]. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 1037.
127. Role of neutrophil extracellular traps following injury / F. C. Liu [et al.]. // *Shock*. – 2014. – V. 41. – №. 6. – P. 491-498.
128. Safety and effectiveness of kidney transplantation using a donation after brain death donor with acute kidney injury: a retrospective cohort study / K. D. Kim [et al.]. // *Scientific report*. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 1-11.
129. Schröppel, B. Acute Allograft Injury After Kidney Transplantation / B. Schröppel, C. Legendre // *Perioperative Kidney Injury*. – Springer, New York, NY, 2015. – P. 185-195.
130. Schröppel, B. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation / B. Schröppel, C. Legendre // *Kidney international*. – 2014. – V. 86. – №. 2. – P. 251-258.
131. Shah, V. R. Aggressive management of multiorgan donor / V. R. Shah // *Transplantation proceedings*. – Elsevier, 2008. – V. 40. – №. 4. – P. 1087-1090.
132. Siedlecki, A. Delayed graft function in the kidney transplant / A. Siedlecki, W. Irish, D. C. Brennan // *American journal of transplantation*. – 2011. – V. 11. – №. 11. – P. 2279-2296.
133. Singbartl, K. Protection from ischemia-reperfusion induced severe acute renal failure by blocking E-selectin / K. Singbartl, K. Ley // *Critical care medicine*. – 2000. – V. 28. – №. 7. – P. 2507-2514.
134. Small thymoglobulin dose adjustments have profound impact on early rejections in renal transplantation / D. Tsapepas [et al.]. // *American journal of transplantation*. – 2011. – V. 11. – P. 147-148.
135. Stills, H. F. Polyclonal antibody production / H. F. Stills // *The laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster, and other rodents*. – Academic Press, 2012. – P. 259-274.
136. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results

- of the HALT-MI study / D. P. Faxon [et al.]. //Journal of the American College of Cardiology. – 2002. – V. 40. – №. 7. – P. 1199-1204.
137. The Endothelial Glycocalyx and Organ Preservation — From Physiology to Possible Clinical Implications for Solid Organ Transplantation / S. Mathis [et al.]. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 8. – P. 4019.
138. The endothelial glycocalyx as a target of ischemia and reperfusion injury in kidney transplantation — Where have we gone so far? / Duni A. [et al.]. // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 4. – P. 2157.
139. The first case of ischemia-free organ transplantation in humans: a proof of concept / X. He [et al.]. //American Journal of Transplantation. – 2018. – V. 18. – №. 3. – P. 737-744.
140. The interaction between ischemia–reperfusion and immune responses in the kidney / H. R. Jang [et al.]. // Journal of molecular medicine. – 2009. – V. 87. – №. 9. – P. 859-864.
141. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury / D. N. Grigoryev [et al.]. // Journal of the American Society of Nephrology. – 2008. – V. 19. – №. 3. – P. 547-558.
142. The Magnitude of the Health and Economic Impact of Increased Organ Donation on Patients with End-Stage Renal Disease / H. F. Chen [et al.]. // MDM Policy & Practice. – 2021. – V. 6. – №. 2. – C. 23814683211063418.
143. The prognostic value of the furosemide stress test in predicting delayed graft function following deceased donor kidney transplantation / B. A. McMahon [et al.]. //Biomarkers. – 2018. – V. 23. – №. 1. – P. 61-69.
144. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression / M. A. Read [et al.]. // Immunity. – 1995. – V. 2. – №. 5. – P. 493-506.
145. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment / Z. Wang [et al.]. //Nephrology Dialysis Transplantation. – 2012. – V. 27. – №. 3. – P. 929-936.

146. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization / M. C. L. Wu [et al.]. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – V. 110. – №. 23. – P. 9439-9444.
147. The recovery status from delayed graft function can predict long-term outcome after deceased donor kidney transplantation / J. Lee [et al.]. // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1-8.
148. The role of neutrophils in transplanted organs / D. Scozzi [et al.]. // *American Journal of Transplantation*. – 2017. – V. 17. – №. 2. – P. 328-335.
149. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury / Arumugam T. V. [et al.]. // *Shock*. – 2004. – V. 21. – №. 5. – P. 401-409.
150. The sweet side of leukocytes: galectins as master regulators of neutrophil function / B. S. Robinson [et al.]. // *Frontiers in immunology*. – 2019. – V. 10. – P. 1762.
151. Thiyagarajan, U. M. Thymoglobulin and its use in renal transplantation: a review / U. M. Thiyagarajan, A. Ponnuswamy, A. Bagul // *American journal of nephrology*. – 2013. – V. 37. – №. 6. – P. 586-601.
152. Thomas, S. R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities / S. R. Thomas, P. K. Witting, G. R. Drummond // *Antioxidants & redox signaling*. – 2008. – V. 10. – №. 10. – P. 1713-1766.
153. Thymoglobulin and ischemia reperfusion injury in kidney and liver transplantation / A. Mehrabi [et al.]. // *Nephrology Dialysis Transplantation*. – 2007. – V. 22. – №. 8. – P. 54-60.
154. Time- dependent changes in donor brain death related processes / T. A. Schuurs [et al.]. // *American journal of transplantation*. – 2006. – V. 6. – №. 12. – P. 2903-2911.
155. Toll-like receptors in acute kidney injury / C. Vázquez-Carballo [et al.]. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 2. – P. 816.

156. Tumor necrosis factor- α is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation / E. J. Birks [et al.]. // *Circulation*. – 2000. – V. 102. – №. 3. – P. 326-331.
157. Van Avondt, K. Mechanisms of haemolysis-induced kidney injury / K. Van Avondt, E. Nur, S. Zeerleder // *Nature Reviews Nephrology*. – 2019. – V. 15. – №. 11. – P. 671-692.
158. Varatharaj, A. The blood-brain barrier in systemic inflammation / A. Varatharaj, I. Galea // *Brain, behavior, and immunity*. – 2017. – V. 60. – P. 1-12.
159. Vincent, C. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins / C. Vincent, J. P. Revillard // *Transplantation*. – 1991. – V. 51. – №. 3. – P. 669-673.
160. Von Andrian, U. H. T-cell function and migration — two sides of the same coin / U. H. Von Andrian, C. R. Mackay // *New England Journal of Medicine*. – 2000. – V. 343. – №. 14. – P. 1020-1034.
161. Westendorp, W. H. Brain death induced renal injury / W. H. Westendorp, H. G. Leuvenink, R. J. Ploeg // *Current opinion in organ transplantation*. – 2011. – V. 16. – №. 2. – P. 151-156.
162. Wettstein, P. J. *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects* / P. J. Wettstein // *Mayo Clinic Proceedings*. – Elsevier, 1997. – V. 72. – №. 10. – P. 999.
163. Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review / T. Liyanage [et al.]. // *The Lancet*. – 2015. – V. 385. – №. 9981. – P. 1975-1982.
164. Xenon treatment protects against cold ischemia associated delayed graft function and prolongs graft survival in rats / H. Zhao [et al.]. // *American journal of transplantation*. – 2013. – V. 13. – №. 8. – P. 2006-2018.
165. Xie, C. B. Complement membrane attack complex: new roles, mechanisms of action, and therapeutic targets / C. B. Xie, D. Jane-Wit, J. S. Pober // *The American journal of pathology*. – 2020. – V. 190. – №. 6. – P. 1138-1150.