

На правах рукописи

БОГДАНОВ ВЛАДИМИР КОНСТАНТИНОВИЧ

**СОХРАНЕНИЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ
ХАРАКТЕРИСТИК ДОНОРСКИХ ЛЕГКИХ
ПРИ НОРМОТЕРМИЧЕСКОЙ *EX VIVO* ПЕРФУЗИИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН

Готье Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Кирпатовский Владимир Игоревич - доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Зулькарнаев Алексей Батыргараевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник хирургического отделения трансплантологии и диализа, профессор кафедры трансплантологии, нефрологии и искусственных органов Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «21» ноября 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте www.transpl.ru.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСТИО 001.21
кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Международный опыт трансплантации легких ежегодно увеличивается, несмотря на вызовы окружающего мира, такие как Covid 19. Ежегодно в мире выполняется более 7000 операций. Опыт федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России) в области трансплантации легких превышает 10 лет (выполнено более 100 операций) [Готье, С. В., 2022]. Однако, вопреки достижениям в области донорства органов, около 80% легочных трансплантатов отвергаются во время оценки функционального статуса ввиду обилия негативных факторов, влияющих на донора прижизненно и, соответственно, на трансплантат. Единственным эффективным методом увеличения количества трансплантаций легких является нормотермическая машинная перфузия легких (*Ex vivo lung perfusion – EVLP*), позволяющая использовать трансплантаты легких от доноров из субоптимальной группы [Makdisi G., 2017; Capuzzimati M., 2022]. Способ нормотермической машинной перфузии донорских легких – инновационная методика, активно внедряемая в клиническую практику с 2020 года, и в настоящее время EVLP проведена на более чем 40 трансплантатах легких в условиях эксперимента [Готье, С. В., 2022]. На сегодняшний день около 30% трансплантатов легких от субоптимальных доноров подвергаются процедуре EVLP (по данным отчетов международных центров), однако продолжает сохраняться дефицит вследствие увеличения количества реципиентов, что, безусловно, требует интенсивной разработки и широкого внедрения методики в рутинную практику работы трансплантологических центров [Готье, С. В., 2021]. Несмотря на эффективность методики EVLP, ее использование не гарантирует достижения целевых результатов и качества донорского органа. Значительное влияние на непосредственные результаты трансплантации оказывают ишемическое консервационно-реперфузионное повреждение, индуцируемое фармако-холодовой консервацией и усугубляемое длительностью хранения и транспортировки органа, совокупность

негативных факторов тепловой и холодовой ишемии [Цирульникова О.М., 2004; Грудинин Н.В., 2020]. Поиск оптимального решения данной проблемы ведется в разных направлениях, однако наиболее перспективным методом является применение синтезируемых антиоксидантов. На сегодняшний день универсального препарата с доказанной эффективностью разработано не было, а существующие способы лечения ишемически-реперфузионного повреждения не могут гарантировать удовлетворительную функцию трансплантата [Шарапов М.П., 2018]. Одним из способов решения является применение биологического антиоксиданта пероксиредоксина – 6 (Ргх6), наличие которого доказано во всех животных клетках [Шарапов М.П., 2014]. Особого внимания заслуживает высокая антиоксидантная активность Ргх6, отмеченная в респираторной системе, в частности в эпителиоцитах бронхоол и альвеолоцитах легких [Карадулева Е.В., 2015].

Концепция применения нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России подразумевает использование уникального разработанного альбуминового раствора (состоящего из подобранных компонентов), одноразового стерильного комплекта расходных материалов для процедуры EVLP собственной разработки, совмещенного с отечественным перфузионным устройством. Настоящее исследование позволит расширить методики изучения влияния фармакологических препаратов, патофизиологических механизмов на паренхиму легких, что позволит усовершенствовать процедуру EVLP.

Цель исследования

Улучшение результатов нормотермической *ex vivo* перфузии донорских легких.

Задачи исследования

1. Разработать и апробировать малогабаритный стенд для проведения процедуры нормотермической *ex vivo* перфузии легких мелких лабораторных животных.

2. Разработать экспериментальную модель ортотопической трансплантации легких для оценки эффективности предложенного перфузионного раствора.

3. Изучить возможность применения антиоксидантного фермента – пероксиредоксина 6 (Prx6) человека и исследовать его эффективность.

4. Оценить эффективность разработанной методики при использовании опытного раствора для консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии изолированных легких.

Научная новизна

Впервые разработана методика консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии легких с использованием комбинированного раствора и доказана ее эффективность.

Изучен вклад применения антиоксидантного фермента (пероксиредоксин – 6 человека) при проведении *ex vivo* перфузии легких.

Обоснована эффективность разработанного комбинированного раствора при консервации и нормотермической *ex vivo* перфузии легких.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в исследовании патофизиологических аспектов фармако-холодового воздействия и нормотермической перфузии *ex vivo* на донорские легкие.

Практическая значимость исследования:

- апробирован разработанный малогабаритный стенд для проведения процедуры нормотермической *ex vivo* перфузии легких на мелких лабораторных животных с целью оценки эффективности разработанного раствора;

- показано увеличение эффективности процедуры нормотермической *ex vivo* перфузии донорских легких;

- разработана экспериментальная модель ортотопической трансплантации для оценки эффективности оригинального перфузионного раствора;

- повышение доступности технологии *ex vivo* перфузии.

Методология и методы исследования

В исследовании проведен статистический анализ данных лабораторных исследований, полученных во время процедуры нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* с применением двух различных рецептов растворов, выполнен анализ данных, отражающих зависимость исходов процедуры от добавления антиоксиданта, а также степень влияния препаратов крови, антиоксиданта и состава перфузионного раствора на функциональный статус трансплантата легких во время процедуры EVLP и после ортотопической трансплантации.

Объектами исследования в качестве экспериментальной модели нормотермической *ex vivo* перфузии донорских легких с последующей ортотопической трансплантацией левого легкого явились 131 самец крыс линии Wistar массой 300–350 г. От животных-доноров (n=60) заготавливалась цельная кровь в объеме 12 мл. Легкие животных-доноров подвергались 12 часовой фармакохолодовой консервации опытным раствором на основе декстрана-40, с последующей нормотермической *ex vivo* перфузии и ортотопической трансплантацией. Перфузия легких проводилась в 4 группах: группа №1 (Steen Solution) (n=15), группа №2 (опытный раствор на основе декстрана-40) (n=15), группа №3 (Steen Solution + Prx6) (n=15), группа №4 (опытный раствор на основе декстрана-40 + Prx6) (n=15). Выполнена 71 процедура EVLP с последующей ортотопической трансплантацией левого легкого. Для оценки донорских легких на протяжении всей перфузии и после трансплантации легкого использовались лабораторные, морфологические, гистохимические, молекулярно-генетические, биохимические и инструментальные методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный модифицированный стенд с минимальным объемом заполнения контура, дополненный малообъемным оксигенатором, позволяет выполнять процедуру *ex vivo* перфузии легких на мелких лабораторных животных.

2. Оригинальный комбинированный раствор на основе декстрана-40 в качестве фармако-холодового консервирующего агента, а также как перфузионного раствора, демонстрирует сопоставимую эффективность в сравнении с известными аналогами при проведении консервации донорских легких и нормотермической перфузии *ex vivo*.

3. Добавление пероксиредоксина-6 повышает эффективность нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* и обеспечивает удовлетворительный функциональный статус трансплантата после имплантации.

4. Методика ортотопической односторонней трансплантации левого донорского легкого с применением kuff-метода на модели крысы обеспечивает высокую воспроизводимость данного эксперимента и является эффективным методом исследования новых препаратов и медицинских изделий в рамках направления трансплантации легких.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований с использованием современных методов статистической обработки.

Апробация работы состоялась 24 июля 2023 года на совместной конференции научных и клинических подразделений ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России.

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XI Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2022), VI Российском национальном конгрессе «Трансплантация и донорство органов» (с международным участием) (Москва, 2023).

Связь работы с научными программами, планами, темами

Работа выполнена в рамках государственного задания на осуществление приоритетных прикладных научных исследований и разработок «Разработка систем консервации, *ex vivo* перфузии и реабилитации донорских органов» (2023–2025 гг.) (регистрационный номер 123020600065-9).

Внедрение в практику

Результаты исследования используются в работе отдела биомедицинских технологий и тканевой инженерии ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России, в учебном процессе на кафедре трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции и постановке задач исследования; в проведении процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*; в проведении ортотопической трансплантации левого легкого на модели крысы; в сборе материала для исследования. Автором самостоятельно сформирована база данных, проведены статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, включенных 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 ученой степени кандидата наук.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа выполнена на 150 страниц машинописного текста. Структура работы содержит введение, обзор литературных источников, описание материалов и методов исследования, результаты исследования, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации и список используемой литературы, включающий в себя 121 источник, из которых 25 российских и 96 зарубежных. Работа содержит 5 таблиц, 5 формул и 49 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

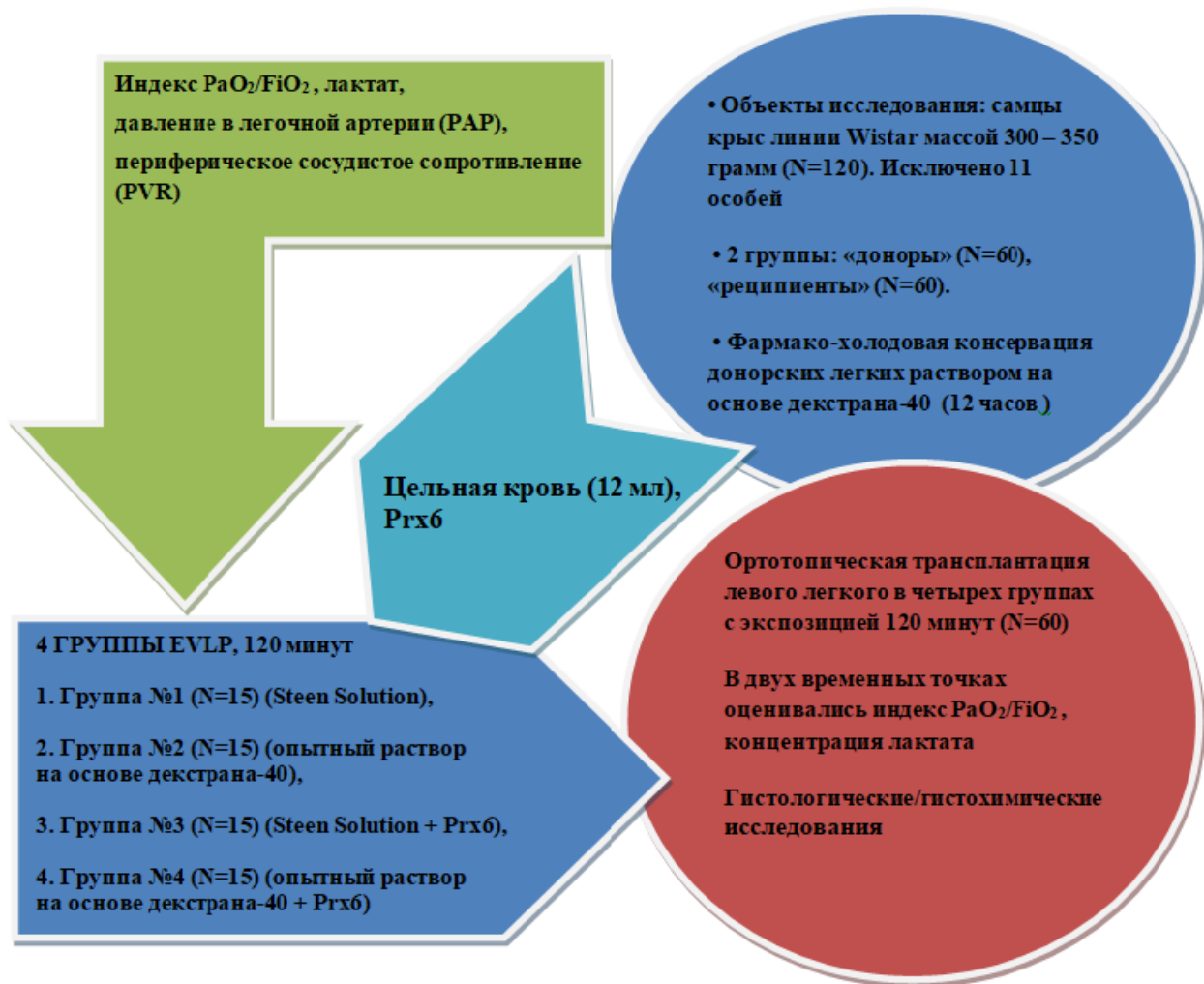


Рисунок 1 – Дизайн экспериментального исследования

Экспериментальное исследование включало в себя стадию наркотизации животного-донора, процедуру эксплантации донорских легких, фармако-холодовую консервацию со временем экспозиции 12 часов, процедуру нормотермической перфузии трансплантата легких, стадию наркотизации животного-реципиента, имплантацию левого донорского легкого в ортотопическую позицию реципиенту. По истечении двух часов животное выводилось из эксперимента с применением медикаментозной эвтаназии.

Рекомбинантный Prx6 получен в лаборатории механизмов редокс-регуляции клеточных процессов Института биофизики клетки Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный

исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (Шарапов М.Г., Гончаров Р.Г.), предоставлен в лиофильно-высушенном состоянии, выполнение гистогинетических исследований было проведено на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Для проведения консервации и выполнения экспериментальной нормотермической перфузии трансплантата легких использовали патентованный опытный оригинальный раствор на основе декстрана-40, произведенный на фармацевтическом заводе компании ООО «Амедарт» согласно действующей лицензии GMP.

По достижении 12 часов гипотермического хранения легких с применением опытного раствора на основе декстрана-40, трансплантат извлекали из емкости для хранения, проводили ревизию всех канюль, орган позиционировали в органном контейнере (куполе) для проведения нормотермической машинной перфузии легких. Предварительно, экстракорпоральный контур заполняли перфузионным раствором (20 мл Steen Solution) и нагревали до 25°C. Вводили вазопростан 10 мкг, инсулин Р 2 Ед, метилпреднизолон 20 мг, цефазолин 0,5 мг/мл. Заполнение перфузионного контура проводили 10 мл оригинального опытного раствора на основе декстрана-40, 12 мл цельной донорской крови, добавляли MgSO₄ 25% – 1 Ед, CaCl₂ 10% – 3 Ед, глюкоза 40% – 4 Ед, NaHCO₃ 4,8% – 2 Ед, вазопростан – 10 мкг, инсулин Р – 3 Ед, метилпреднизолон – 20 мг, цефазолин – 0,5 мг/мл, гепарин – 300 Ед. В зависимости от поставленных задач и выбора экспериментальной группы, использовали как адьювант лиофилизат Prx6 – 5 мг. Начальную объемную скорость перфузии устанавливали на 15% от должного объема 7,6 мл/мин, что составляло 1,2 мл/мин, или 15% от целевой скорости перфузии. Анализ газового и электролитного состава перфузата проводили до инициации перфузии трансплантата, далее через каждые 15 минут. Эксперимент условно разделяли на две части: стадия реперфузии и стадия статического гомеостаза в условиях нормотермической машинной перфузии. Активную искусственную вентиляцию трансплантата легких иницировали спустя 15 минут после начала нормотермической машинной перфузии и при

достижении температуры органа 33°C. С учетом времени регистрации параметров перфузии, рассчитывали сосудистое сопротивление в легких. При достижении 120 минут подавали опытный раствор на основе декстрана-40 температурой 4°C и объемом 20 мл со скоростью 200 мл/час. После процедуры консервации проводили диссекцию ворот трансплантата легких.

Имплантация легкого осуществлялась при помощи kuff-метода. После времени экспозиции трансплантата выполняли анализ показателей газового состава крови селективно из трансплантата левого легкого. Отбирали пробы крови животного-реципиента с целью оценки концентрации антиоксиданта Prx6 в системном кровотоке и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, образцы плазмы помещали в морозильную камеру для хранения при -25 °С. После процедуры консервации проводили изъятие биоматериала трансплантата для выполнения гистологических и молекулярно-генетических исследований – одни участки ткани левого легкого фиксировали в растворе формальдегида и хранили при 4-8°C, другие не обрабатывали консервантом и хранили при -25°C.

Обработка данных выполнялась с использованием лицензионной программы SAS Enterprise Guide 9.4. Все показатели проверялись на соответствие нормальному распределению (критерии Колмогорова, Шапиро-Уилка). В случае нормального распределения применялись методы параметрической статистики. В случае распределения, отличающегося от нормального, – методы непараметрической статистики. Сравнение групп по показателям (индекс оксигенации, легочное сосудистое сопротивление, давление в легочной артерии, уровень лактата, уровень глюкозы, буферные основания, пиковое давление на вдохе) выполнялось с использованием теста Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Стенд для проведения нормотермической машинной перфузии ex vivo донорских легких крыс

Разработан комплексный малогабаритный стенд для проведения нормотермической машинной перфузии трансплантата легких крыс (рисунок 2).

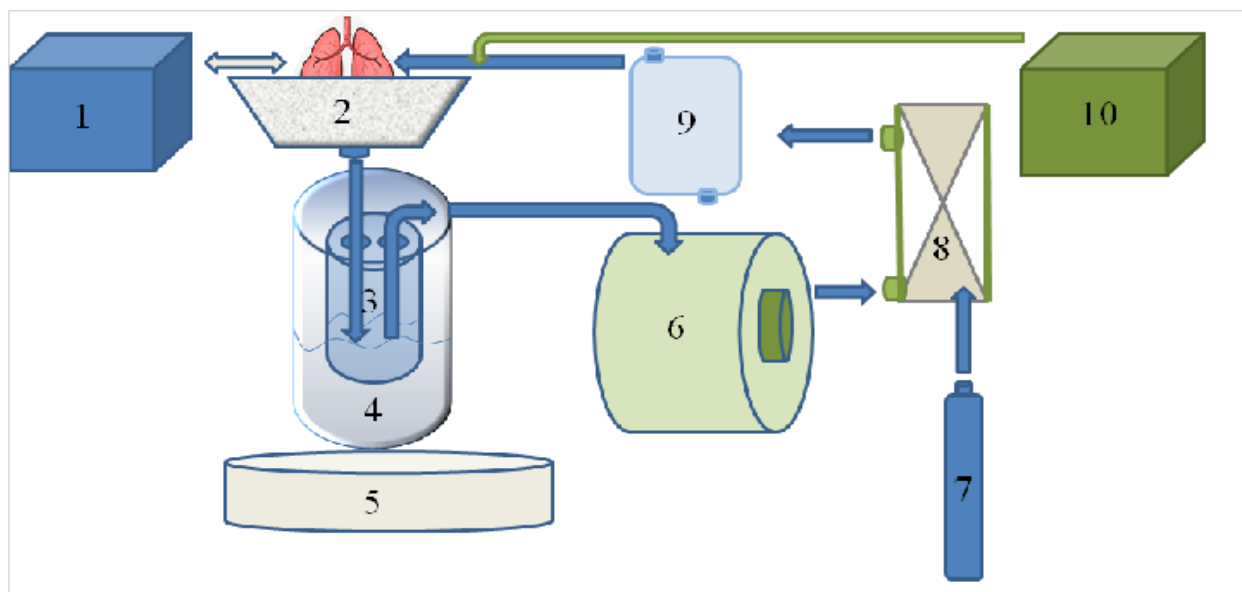


Рисунок 2 - Стенд для нормотермической перфузии легких у крыс ex vivo:
 1 – аппарат искусственной вентиляции легких; 2 – контейнер для позиционирования трансплантата легких с имплантированным термодатчиком; 3 – резервуар; 4 – теплообменная колба; 5 – нагревательное устройство; 6 – шаговый роликовый насос; 7 – баллон с деоксигенирующей смесью (CO_2 – 8%, O_2 – 6%, N_2 – 86%); 8 – мембранный оксигенатор; 9 – воздушная ловушка; 10 – блок инвазивного измерения давления

С целью объективизации проведения экспериментальной работы и создания лабораторных условий, идентичных гомеостазу крыс, был разработан малообъемный высокопоточный оксигенатор, состоящий из оригинальных газотранспортных волокон и двух люэр-портов диаметром 1/4".

Динамика изменения газового состава во время ex vivo перфузии

Проведен сравнительный анализ медиан показателей индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. В первых двух временных точках измерение данного параметра не проводилось, поскольку отсутствовала искусственная вентиляция легких. Спустя 15 минут, в четвертой временной точке 30 минут отмечалось снижение индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ во всех группах, что свидетельствовало об активном процессе реперфузии, так как при инициации

искусственной вентиляции легких (ИВЛ) происходило наполнение периферических сосудов и микроциркуляторного русла. Графическое изображение индекса PaO_2/FiO_2 представлено на рисунке 3.

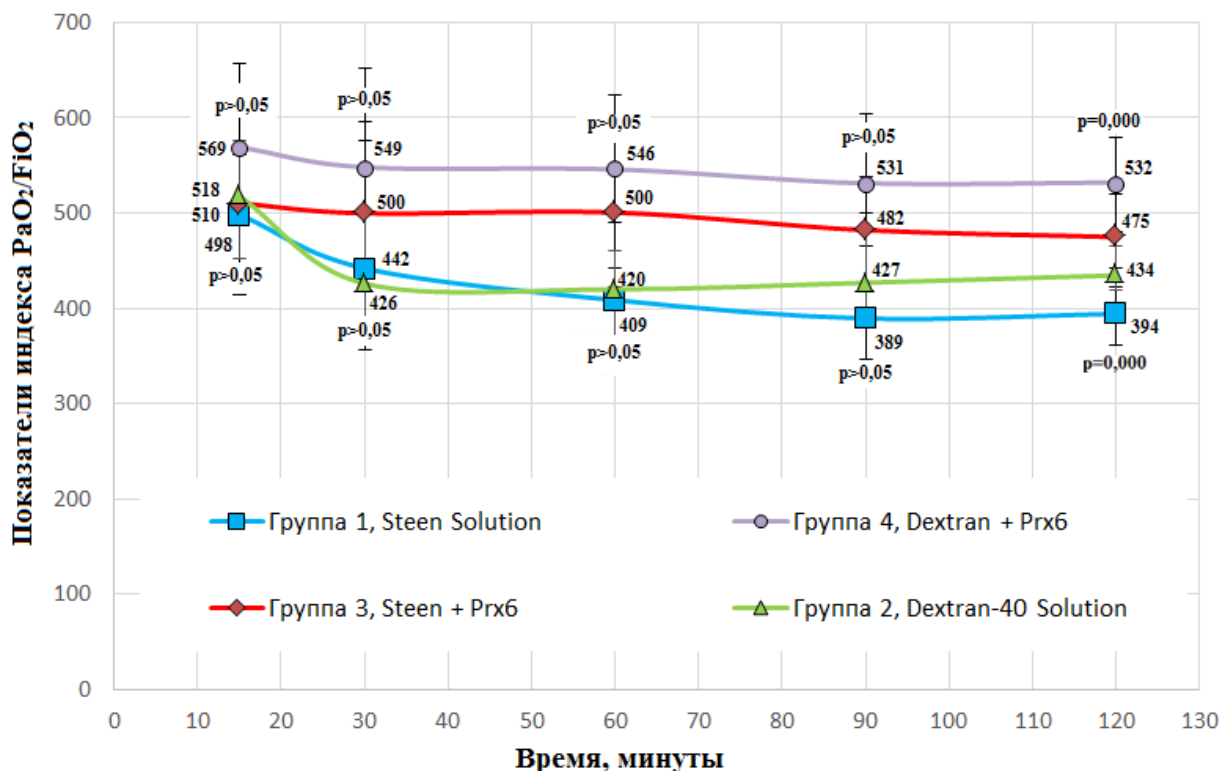


Рисунок 3 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran-40 Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran-40 Solution + Prx6: точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут – окончание процедуры EVLP

По прошествии 1,5 часов нормотермической машинной перфузии донорских легких отмечалась стабильность индекса PaO_2/FiO_2 в трех группах, однако, в первой группе демонстрировалась тенденция к снижению индекса PaO_2/FiO_2 , что являлось признаком низких буферных и гомеостатических, а также антиоксидантных свойств раствора Steen Solution. По завершении перфузии спустя 2 часа отмечалась стабилизация показателей индекса PaO_2/FiO_2 . Ни в одной из групп не наблюдались выраженных признаков дисфункции трансплантата, однако, перфузионный раствор на основе Декстрана-40 с добавлением компонентов крови демонстрировал благоприятное влияние на функциональный статус донорских легких. Значимое влияние оказывало и добавление Prx6 к контрольным растворам – выраженное антиоксидантное действие адьюванта проявлялось убедительным увеличением индекса PaO_2/FiO_2 в группах №3 и №4. Различия

показателей во всех группах в исходе нормотермической машинной перфузии были статистически значимы.

Динамика уровня лактата во время процедуры нормотермической машинной ex vivo перфузии

Проведен сравнительный анализ медиан концентрации лактата в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. Графическое изображение изменения показателей лактата в первых двух группах представлено на рисунке 4.

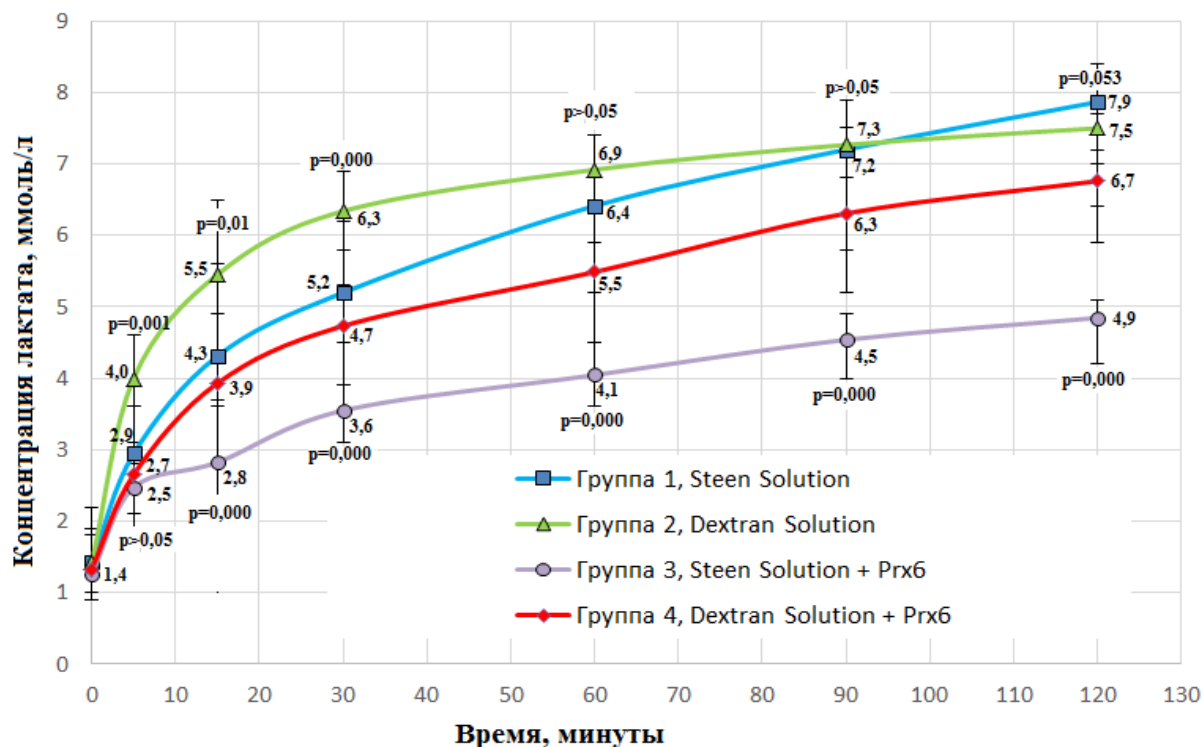


Рисунок 4 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут – окончание процедуры EVLP

Во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo* прирост лактата является неизбежным процессом, поскольку отсутствует механизм утилизации данного метаболита в замкнутой системе. В условиях данной научной работы предельным значением был установлен уровень лактата 8,5 ммоль/л, что согласовано с общемировыми клиническими протоколами. Во всех группах отмечается прирост показателей лактата после момента инициации EVLP, что соответствовало инициации процесса реперфузии. Начальное интенсивное увеличение лактата во второй группе в

сравнении с первой группой являлось отражением высоких буферных свойств, а также физиологических качеств перфузионного раствора на основе декстрана-40 с добавлением компонентов крови, что способствовало процессу реперфузии. В экспериментальных же группах отмечалось положительное влияние пероксиредоксина-6 на метаболическую активность, что сопровождалось значимым снижением пиковых показателей лактата в группах 3 и 4.

Анализ гемодинамических параметров во время нормотермической машинной ex vivo перфузии

Проведен сравнительный анализ медиан показателей давления в легочной артерии (РАР) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. Давление в легочной артерии играло значимую роль в оценке функционального статуса донорских легких во время EVLP. После выполнения процедуры и анализов перфузия прекращалась, выполнялась фармако-холодовая консервация донорских легких. Графическое изображение тенденции изменения давления в легочной артерии в двух группах представлено на рисунке 5.

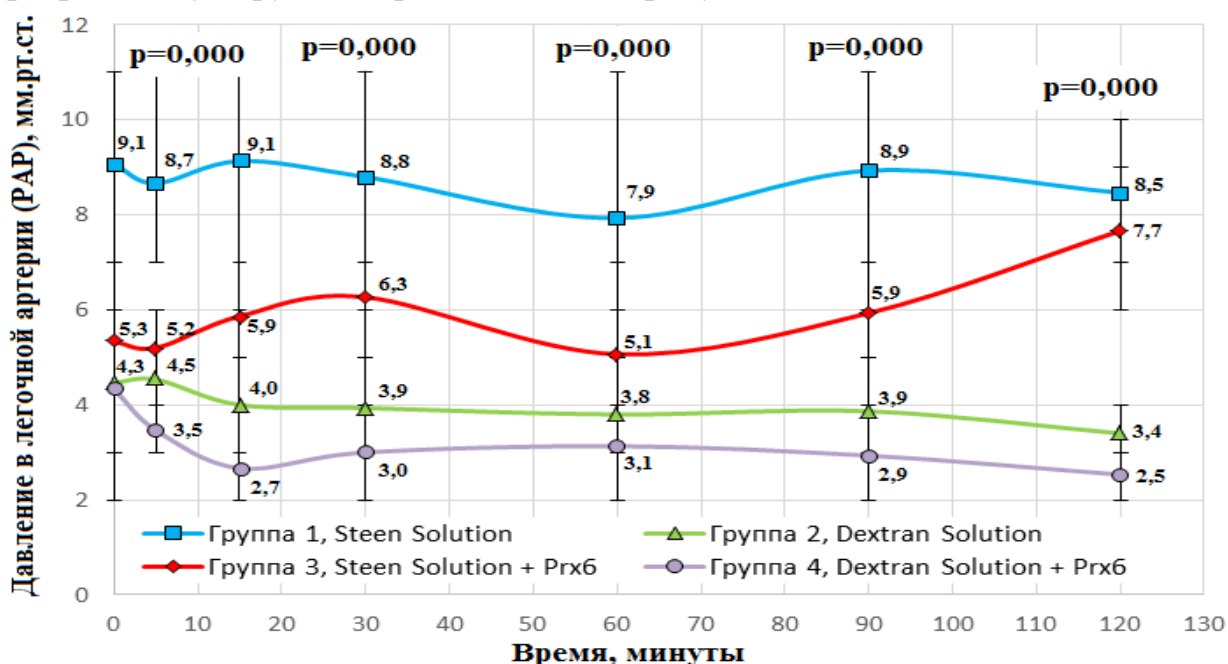


Рисунок 5 – Сравнительный анализ медиан показателей давления в легочной артерии (РАР) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут – окончание процедуры EVLP

Предельной величиной давления в легочной артерии являлось 12 мм.рт.ст., что было установлено условиями протокола проведения процедуры EVLP. Объемная скорость перфузии (PaF) изменялась по достижении временных точек независимо от гемодинамических показателей и составляла 1,2 мл/мин во временной точке 0 минут, 2,6 мл/мин во временной точке 5 минут, 3,4 мл/мин во временной точке 15 минут, 6,5 мл/мин во временной точке 30 минут, 7,6 мл/мин во временных точках 60 минут, 90 минут, 120 минут. Разница в показателях в двух контрольных группах объяснялась реологическими свойствами растворов и инициацией реперфузии, которая провоцировала вазоспазм периферических сосудов в ответ на гиперпродукцию активных форм кислорода и экстрацеллюлярный транспорт метаболитов анаэробного гликолиза, в экспериментальных же группах с добавлением Prx6 снижалась степень выраженности влияния реперфузионного каскада.

Анализ показателей периферического сосудистого сопротивления

Проведен сравнительный анализ медиан показателей периферического сосудистого сопротивления (PVR) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. PVR, $\text{dyn} \times \text{s} / \text{cm}^5$ – являлось расчетным показателем на основе данных PAP и PaF.

Графическое изображение показателей периферического сосудистого сопротивления в первых двух группах представлено на рисунке 6. Периферическое сосудистое сопротивление, как расчетный параметр, отражает состояние микроциркуляторного русла в донорских легких в процессе нормотермической машинной перфузии *ex vivo*. Исходные высокие значения данного показателя во всех группах, являлись отражением инициации процесса реперфузии и рефлекторного вазоспазма в ответ на восстановление клеточного метаболизма.

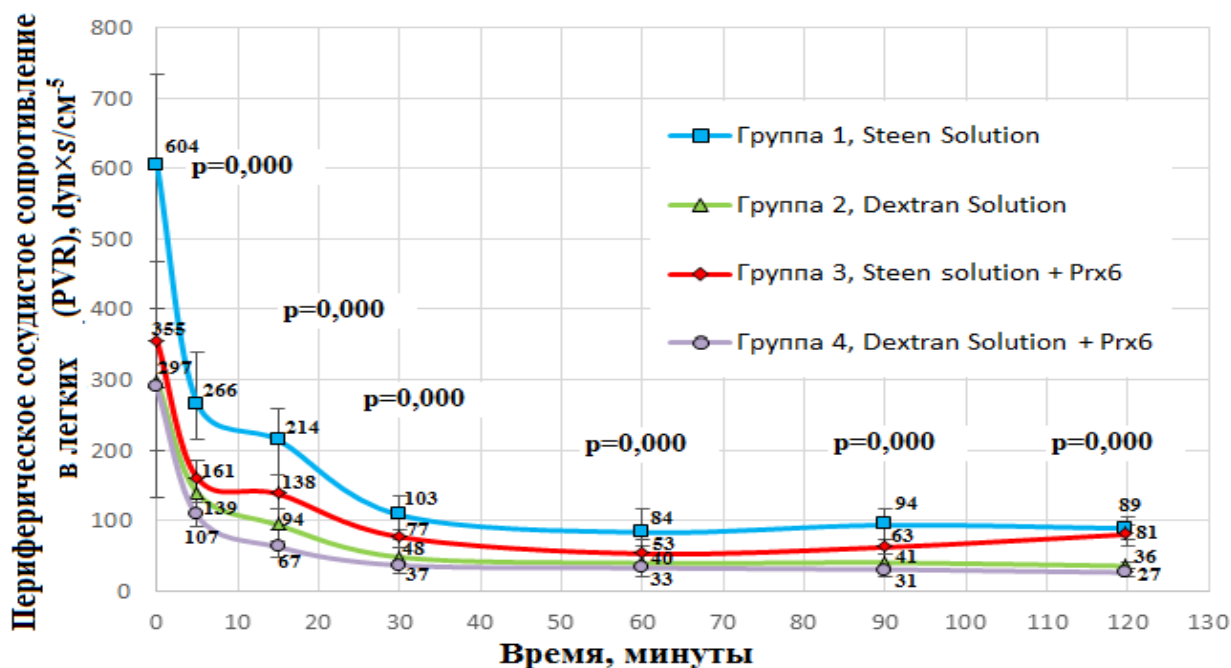


Рисунок 6 – Сравнительный анализ медиан показателей периферического сосудистого сопротивления (PVR) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут – окончание процедуры EVLP

Статистически более низкие показатели PVR в группах с применением раствора на основе декстрана-40 с добавлением компонентов крови объяснялись высокими реологическими свойствами и увеличенной буферной емкостью перфузата. Увеличение антиоксидантной активности при добавлении Prx6 в экспериментальных группах продемонстрировало сравнительно низкую степень сосудистой реакции в реперфузионном периоде.

Оценка функционального статуса донорских легких при трансплантации после процедуры нормотермической перфузии *ex vivo*

Проведен сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 после трансплантации в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. Данные результаты демонстрируют значимое влияние состава раствора во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких на функциональный статус трансплантата и степень проявления повторной реперфузионной реакции. Тенденция изменения индекса PaO_2/FiO_2 в четырех группах представлена на рисунке 7.

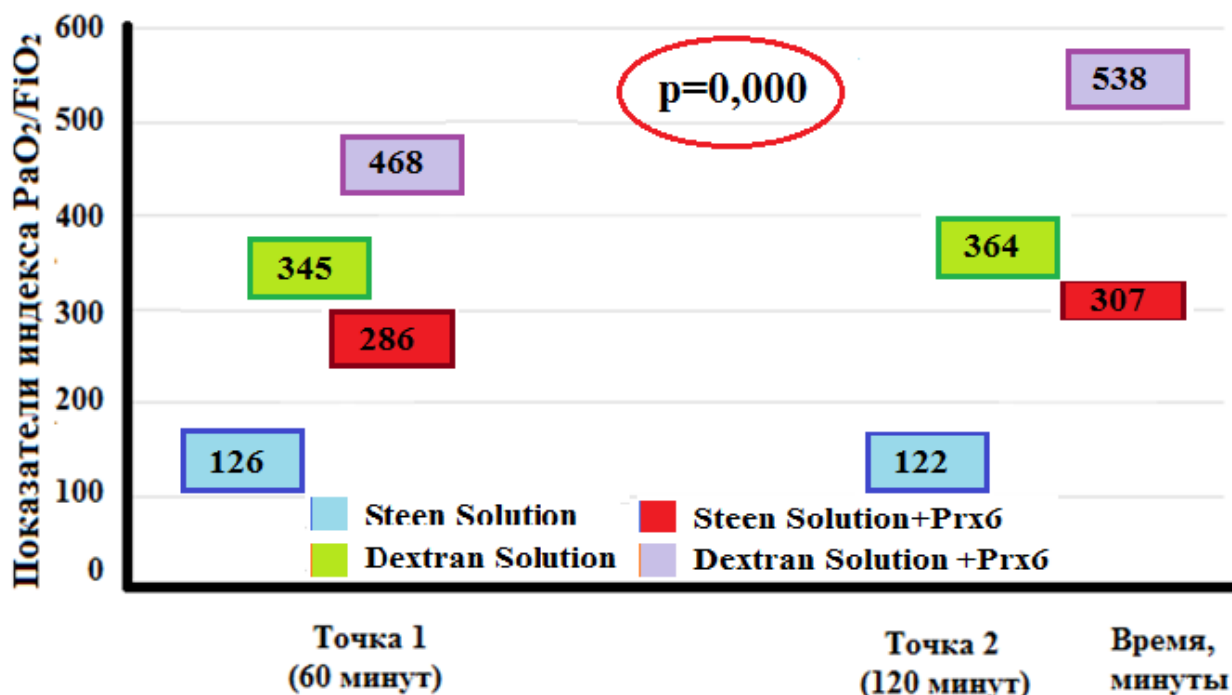


Рисунок 7 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 после трансплантации в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

В свою очередь, добавление Prx6 обеспечивало антиоксидантную защиту донорских легких, что проявлялось высокими значениями индекса PaO_2/FiO_2 в группах №3 и №4.

В результате анализа полученных данных отмечалось умеренное снижение индекса PaO_2/FiO_2 в группе №1 и прирост данного показателя в остальных группах. Таким образом, спустя 2 часа реперфузии в донорском легком после имплантации реципиенту отмечалась положительная динамика функционального статуса трансплантата при применении раствора на основе декстрана-40 в сравнении со Steen Solution, а также значимый прирост показателей индекса PaO_2/FiO_2 в группах при добавлении Prx6 вовремя нормотермической машинной перфузии.

Изменение показателей лактата после трансплантации легкого

Проведен сравнительный анализ медиан концентрации лактата после трансплантации в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6. Поскольку процедура EVLP в условиях исследования являлась необходимым этапом для индукции первичного патологического процесса ишемии-реперфузии и позволяла снизить деструктивное воздействие реперфузионного повреждения на

функциональный статус трансплантата, после имплантации донорского легкого была также оценена степень выраженности метаболической задолженности. Оценка проводилась в двух точках – 60 минут и 120 минут. На рисунке 8 графически изображена динамика изменения показателей лактата в течение 2 часов после трансплантации левого легкого в четырех группах после процедуры EVLP.

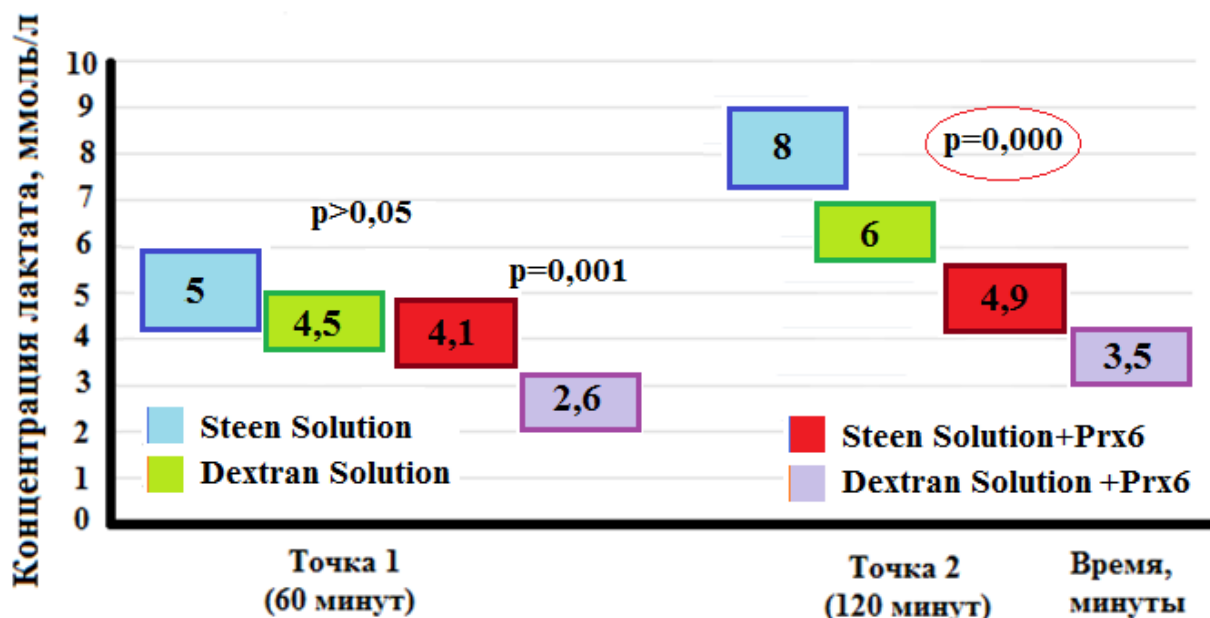


Рисунок 8 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата после трансплантации в группах Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Отмечалось, что применение Prx6 оказывало положительный антиоксидантный эффект в постреперфузионном периоде у реципиента, а прирост показателей лактата был в допустимых границах у животных в экспериментальных группах 3 и 4. Не менее значимое влияние оказывал также и перфузионный раствор. Так, в контрольной группе 2 с применением раствора на основе декстрана-40 с добавлением крови оказывало более выраженный антиоксидантный эффект во время перфузии, в сравнении с группой 1, что демонстрируется графиком динамики прироста показателей лактата.

Результаты исследования экспрессии генов и иммуноблота

Для оценки молекулярных процессов, протекающих у крысы после трансплантации левого легкого, была проведена оценка уровня экспрессии некоторых маркерных генов (таблица 1). Среди которых гены, связанные с развитием воспалительного процесса (NF-κB, IL-6), клеточной пролиферации

(Ki67), антиоксидантного ответа (PRDX6), фиброза легких (MMP-9) и апоптотической гибели клеток (CASP-3).

Таблица 1 – Изменение экспрессии генов в легких при ортотопической трансплантации легких

Гены	Группа №1	Группа №2	Группа №3
	Интактный образец	Ишемия 12 ч, EVLP, ОТТЛ	Ишемия 12 ч, EVLP+Prx6, ОТТЛ
CASP-3	1,00	4,2 ± 0,5**	1,3 ± 0,1***##
IL-6	1,00	18,4 ± 2,2***	22,8 ± 2,2***#
NF-κB	1,00	7,5 ± 0,6**	0,6 ± 0,1***###
Ki67	1,00	25,9 ± 2,1***	30,8 ± 2,3***#
PRDX6	1,00	2,0 ± 0,3**	1,1 ± 0,1***##
MMP-9	1,00	8,6 ± 0,6**	2,0 ± 0,1***##

Группа №1 – нативный (интактный) биоматериал; Группа №2 – 12 часов фармако-холодовой консервации донорских легких, EVLP – нормотермическая машинная перфузия донорских легких *ex vivo*, ОТТЛ – ортотопическая трансплантация левого легкого; Группа №3 – 12 часов фармако-холодовой консервации донорских легких, EVLP с применением пероксиредоксина-6, ОТТЛ. Представлены средние значения ± SD. Статистическая значимость относительно интактного контроля * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Статистическая значимость относительно ОТТЛ контроля # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. Цветовая заливка: минимум (зеленый), средний (желтый-оранжевый), максимум (красный)

В контрольных биоматериалах легких ОТТЛ спустя 12 часов ишемии (группы № 2 и 3) существенно возрастает уровень мРНК вышеуказанных генов. Ишемия легких в течение 12 часов приводит к росту экспрессии гена CASP-3 в 4–5 раз, что свидетельствует об активации апоптоза в клетках.

Таким образом, разработанный раствор на основе декстрана-40 является универсальным, выступая в качестве как перфузионного раствора, так и агента фармако-холодовой консервации. Уникальным является малообъемный перфузионный стенд, разработанный для проведения исследований в области фармакологии, трансплантации легких, процедуры EVLP. Особое значение имеют полученные результаты, доказывающие выраженную антиоксидантную активность пероксиредоксина-6, что проявляется не только удовлетворительным функциональным статусом донорских легких в период EVLP, но и физиологичными показателями органа в раннем посттрансплантационном периоде.

Результаты настоящей работы демонстрируют эффективность разработанного раствора, высокие показатели антиоксидантной активности пероксиредоксина-6 и оригинальность разработанного малообъемного перфузионного стенда.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный малообъемный перфузионный стенд (<25 мл) для проведения процедуры нормотермической машинной *ex vivo* перфузии с использованием крысиной модели позволяет объективизировать исследования, направленные на изучение патофизиологических механизмов нормотермической перфузии.

2. Использование экспериментальной модели ортотопической трансплантации левого легкого у крыс с использованием kuff-метода обеспечивает проведение исследований и достоверность результатов, снижая время тепловой ишемии с 90 до 30 минут ($p < 0,001$) и минимизирует ишемическое консервационно-реперфузионное повреждение.

3. Нормотермическая машинная перфузия донорских легких *ex vivo* в эксперименте с использованием разработанного раствора обеспечивает удовлетворительный функциональный статус трансплантата легких (индекс $FiO_2/PaO_2 > 350$), более физиологичные параметры ионных и биохимических показателей (K^+ , Na^+ , лактат, глюкоза) во время нормотермической машиной перфузии донорских легких *ex vivo* в сравнении со Steen Solution®.

4. Добавление лиофилизата экзогенного антиоксиданта пероксиредоксина-б во время нормотермической машинной перфузии *ex vivo* благоприятно влияет на донорские легкие в период восстановления перфузии в условиях эксперимента, снижая степень выраженности ишемически-реперфузионных повреждений ($p < 0,01$), а также повышает функциональный статус донорских легких после имплантации.

5. Разработанный раствор на основе декстрана-40 эффективно защищает донорские легкие во время фармако-холодовой консервации на протяжении 12 часов, что демонстрируется корреляционным анализом показателей лактата и индекса FiO_2/PaO_2 , где установлена прямая связь зависимости снижения индекса оксигенации при увеличении концентрации лактата.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для получения достоверных результатов научных исследований с применением процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo* с использованием крысиной модели необходимо использование малообъемного стенда.

2. Рекомендуется применение разработанного раствора на основе декстрана-40 в клинической программе трансплантации легких в Российской Федерации; в данной работе продемонстрированы и доказаны протективные свойства на трансплантат легких как во время фармако-холодовой консервации, так и во время нормотермической машинной *ex vivo* перфузии.

3. С целью оптимизации и воспроизводимости процедуры ортотопической трансплантации левого легкого в эксперименте на крысах рекомендуется использование kuff-метода; данная методика предпочтительнее в сравнении с классической шовной методикой, позволяя сократить время тепловой ишемии.

4. Использование экзогенного антиоксиданта пероксиредоксина-б снижает деструктивное воздействие ишемически реперфузионного повреждения и рекомендуется применение в рамках программы трансплантации легких и нормотермической машинной *ex vivo* перфузии при продолжительной фармако-холодовой консервации органа или при работе со скомпрометированными донорскими легкими.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение пероксиредоксина для прекондиционирования трансплантата сердца крысы / Н.В. Грудинин, В.К. Богданов, М.Г. Шарапов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22. – № 2. – С. 158-164. – DOI 10.15825/1995-1191-2020-2-158-164.

2. Нормотермическая *ex vivo* перфузия изолированных легких в эксперименте с использованием отечественного перфузионного аппаратного комплекса / С.В. Готье, О.М. Цирульников, И.В. Пашков, Д.О. Олешкевич, И.А. Филатов, В.К. Богданов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24 – № 2. – С. 94-101. – DOI 10.15825/1995-1191-2022-2-94-101.

3. Применение метода экстракорпоральной мембранной оксигенации при трансплантации легких в эксперименте / И.В. Пашков, Д.О. Олешкевич, Д.М. Бондаренко, В.К. Богданов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24 – № 5. – С. 159.

4. Разработка раствора для нормотермической машинной *ex vivo* перфузии донорских легких в условиях эксперимента / Н.В. Грудинин, Д.О. Олешкевич, И.В. Пашков, Д.М. Бондаренко, В.К. Богданов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24 – № 5. – С. 160-161.

5. *Ex vivo* перфузия донорских легких с использованием разработанного раствора с последующей ортотопической левосторонней трансплантацией легкого (экспериментальное исследование) / С.В. Готье, И.В. Пашков, В.К. Богданов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – №2 – С. 158-166. – DOI 10.15825/1995-1191-2023-2-158-166.

6. Разработка нового малообъемного оксигенатора и создание гидродинамического стенда для *ex vivo* перфузии легких на мелких животных/ О.Ю. Есипова, В.К. Богданов, А.С. Есипов и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – № 3. – С. 106-112. – DOI 10.15825/1995-1191-2023-3-106-112.

7. Оптимизация модели нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* в условиях эксперимента / В.К. Богданов, И.В. Пашков, Н.П. Можейко и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – № 5. – С. 62.

8. Разработка и оценка производительности трансфера кислорода нового разработанного малогабаритного мембранного оксигенатора / О.Ю. Есипова, В.К. Богданов, А.С. Бучнев и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – № 5. – С. 65.

9. Оптимизация модели трансплантации одного легкого у крысы (экспериментальное исследование) / Н.В. Грудинин, В.К. Богданов, И.В. Пашков и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2023. – Т. 25 – № 5. – С. 67.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

EVLP – *ex vivo* lung perfusion, нормотермическая машинная перфузия легких

F_iO_2 – фракция кислорода на вдохе

PaF – объемная скорость перфузии

PaO_2 – парциальное артериальное давление кислорода

PAP – давление в легочной артерии

$Prx6$ – пероксиредоксин-6

PVR – ленточное сосудистое сопротивление

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России – федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации