

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В. И. ШУМАКОВА»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор
Сергей Владимирович Готье

Москва 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ МАШИННАЯ ПЕРФУЗИЯ ДОНОРСКИХ ЛЕГКИХ <i>EX VIVO</i> (обзор литературы)	11
1.1 Технология и перспективы развития нормотермической <i>ex vivo</i> перфузии	11
1.2 Применение нормотермической перфузии легких <i>ex vivo</i> в клинической практике.....	18
1.3 Методы защиты трансплантата легких.....	26
1.4 Ишемическое консервационно-реперфузионное повреждение донорских легких.....	36
1.5 Методы борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением донорских легких.....	42
1.5.1 Пероксиредоксины.....	44
1.6 Заключение	45
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1 Дизайн исследования	46
2.2 Эксплантация донорских легких	47
2.3 Нормотермическая перфузия трансплантата легких с применением раствора Steen Solution и опытного раствора на основе декстрана-40.....	51
2.4 Газовый анализ перфузионного раствора и образцов крови	57
2.5 Морфологическое исследование	57
2.6 Изготовление раствора на основе декстрана-40	58
2.7 Синтез пероксиредоксина-6	58
2.8 Выделение РНК и синтез кДНК	59
2.9 Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	60
2.10 Иммуноблоттинг	61
2.11 Методы статистической обработки данных.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.1 Стенд для проведения нормотермической машинной перфузии <i>ex vivo</i> донорских легких крыс	63
3.2 Доказательство эффективности опытного раствора на основе декстрана-40 в сравнении с аналогами без антиоксидантной защиты и с применением пероксиредоксина-6	68

3.2.1	Динамика изменения газового состава во время <i>ex vivo</i> перфузии	68
3.2.2	Анализ параметров вентиляции во время нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии.....	71
3.2.3	Динамика показателей лактата во время процедуры нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии	75
3.2.4	Темп утилизации глюкозы во время нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии.....	79
3.2.5	Темп утилизации буферных оснований во время нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии	83
3.2.6	Анализ гемодинамических параметров во время нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии	87
3.2.6.1	Анализ показателей давления в легочной артерии.....	87
3.2.6.2	Анализ показателей периферического сосудистого сопротивления	91
3.2.7	Корреляционный анализ зависимости индекса PaO_2/FiO_2 от показателей лактата во время нормотермической машинной <i>ex vivo</i> перфузии.....	95
3.3	Методика ортотопической трансплантации левого легкого на крысах	99
3.3.1	Оценка функционального статуса донорских легких при трансплантации после процедуры нормотермической перфузии <i>ex vivo</i>	104
3.3.1.1	Показатели газового состава после трансплантации легкого	104
3.3.1.2	Анализ параметров вентиляции после трансплантации легкого	107
3.3.1.3	Изменение показателей лактата после трансплантации легкого	110
3.4	Морфологические исследования	113
3.5	Результаты исследования экспрессии генов и иммуноблота	117
	ОБСУЖДЕНИЕ	120
	ВЫВОДЫ	130
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	131
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	132
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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) [12]. 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 [50, 35]. Способ нормотермической перфузии 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 [3]. 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 [16]. 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 (ИКРП), индуцируемое фармако-холодовой консервацией и усугубляемое длительностью хранения и транспортировки органа, совокупность негативных факторов тепловой и холодовой ишемии [17, 22]. 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 [24]. Одним из способов решения является применение биологического антиоксиданта пероксиредоксина – 6 (Prx6), наличие которого доказано во всех животных клетках [23]. Особого внимания заслуживает высокая антиоксидантная активность Prx6, отмеченная в респираторной системе, в частности в эпителиоцитах бронхоол и альвеолоцитах легких [8].

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 рецептур 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 страницах 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.

ГЛАВА 1. НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ МАШИННАЯ ПЕРФУЗИЯ ДОНОРСКИХ ЛЕГКИХ *EX VIVO* (обзор литературы)

1.1 Технология и перспективы развития нормотермической *ex vivo* перфузии

Трансплантация легких является радикальным методом лечения пациентов с различными формами терминальной стадии дыхательной недостаточности [15]. Повсеместно существующий дефицит донорских органов значительно отражается на количестве выполняемых трансплантаций легких в сравнении с трансплантацией других солидных органов [15]. Критериям эффективности по разным данным и пригодности к трансплантации соответствует около 20–25% донорских легких [3]. Зачастую от донорских легких отказываются из-за неприемлемого функционального статуса трансплантата. Существующий дефицит оптимальных донорских легких приводит к увеличению уровня смертности среди реципиентов из листа ожидания, который, в мировой клинической практике, достигает 30%. Поиск путей увеличения количества доступных донорских легких включает использование доноров с расширенными критериями (субоптимальные доноры), в частности работу с гемодинамически «нестабильными» донорами и донорами после остановки эффективного кровообращения.

Нормотермическая аппаратная *ex vivo* перфузия (EVLP) — метод перфузии донорских легких в условиях экстракорпорального контура, имитирующего работу малого круга кровообращения, предоставляет возможность этапной оценки и реабилитации изолированных легких с целью достижения приемлемых показателей их функционального статуса [4]. В случае достижения целевых показателей газообмена и соответствия критериям качества эти легкие могут быть использованы для трансплантации. Впервые успешную процедуру EVLP на

основе оригинального альбуминового раствора провела команда из Швеции под руководством Stig Steen в конце 1990-х, а уже в 2001 году было доложено об успешной трансплантации одного легкого с применением методики нормотермической перфузии легких у пациента возрастом 54 года после инфаркта миокарда и сердечно-легочной реанимации. В последующем было выполнено 6 успешных билатеральных трансплантаций легких. В настоящее время в мире используются три протокола EVLP (*Ex vivo lung perfusion*, нормотермическая машинная перфузия донорских легких *ex vivo*): Протокол Лунда, модернизированные протоколы пролонгированной перфузии легких – Торонто [84] и Organ Care System Lung [42]. Протокол Лунда – это исходный протокол, предложенный профессором Stig Steen, Швеция, Лунд, адаптированный к краткосрочной (до 2 часов) перфузии донорских легких, позволяющий провести экспресс-оценку функционального статуса, который в настоящее время используется наиболее часто. Суть метода состоит в том, что трансплантат легких подключается к полуоткрытому контуру с роликовым насосом – канюляция только легочной артерии и свободное устье легочных вен, а перфузия проводится официальным альбуминсодержащим раствором Steen Solution с добавлением эритроцитов с объемной скоростью перфузии до 100% от сердечного выброса (СВ) (рисунок 1).

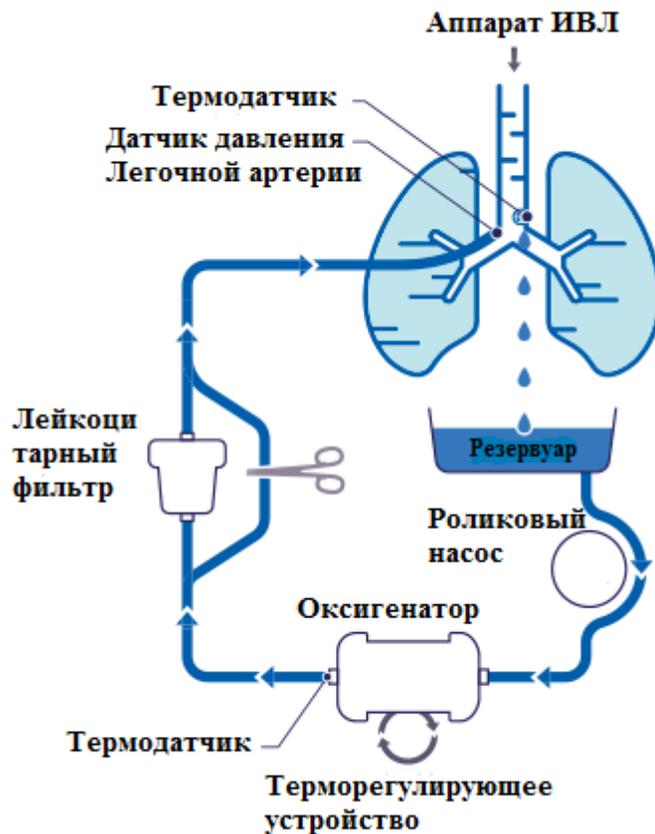


Рисунок 1 – Схематическое изображение компонентов незамкнутого экстракорпорального контура для проведения процедуры нормотермической аппаратной ex vivo перфузии (ИВЛ – искусственная вентиляция легких)

На рисунке 1 представлена схема перфузионного контура, состоящая из резервуара, в который поступает перфузат, роликового насоса, оксигенатора, совмещенного с теплообменной колбой, подключенного к гидроциркуляторному термостату, лейкоцитарный фильтр и аппарат искусственной вентиляции легких.

Протокол Торонто – модификация, предложенная доктором Marcelo Cypel, Канада, Торонто, заключающаяся в применении замкнутого контура, позволяющего продолжительное время (более двух часов) проводить машинную перфузию с использованием центрифужной головки, обеспечивая пролонгированную и наиболее прецизионную качественную оценку и функциональную реабилитацию донорских легких (рисунок 2). В данной концепции используется замкнутый контур на базе центробежного насоса с канюляцией легочной артерии и манжеты левого

предсердия, а перфузия проводится только альбумин содержащим раствором Steep Solution без добавления клеток крови, расчетная скорость потока не превышает 40% СВ.

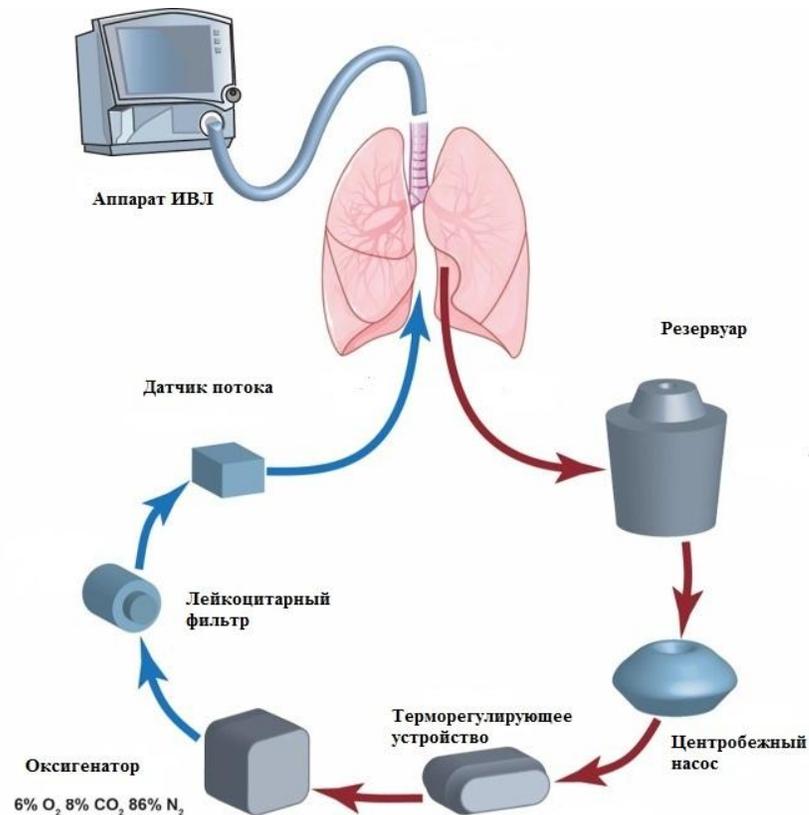


Рисунок 2 – Схематическое изображение замкнутого перфузионного контура по методике Торонто

В состав экстракорпорального контура входят: аппарат ИВЛ, резервуар, центробежный насос, оксигенатор, лейкоцитарный фильтр, гидроциркуляторный термостат. Замкнутый контур обеспечивается за счет канюляции левого предсердия.

Третий протокол включает использование транспортного устройства, которое однозначно устраняет необходимость хранить легкие в условиях стандартной статической холодовой ишемии перед трансплантацией и эффективно сокращает время аноксии. Протокол OCS (Organ Care System, TransMedics, США) подразумевает проведение машинной перфузии в портативном варианте (рисунок 3). Трансплантат подключают к полуоткрытому контуру на базе помпового насоса,

выполняют канюляцию легочной артерии, а в качестве перфузата используют официальный декстрановый раствор OCS (Organ Care System, TransMedics, США), при этом максимальная скорость перфузии не превышает 2000–2500 мл независимо от сердечного выброса и остается статичной на протяжении всей процедуры.

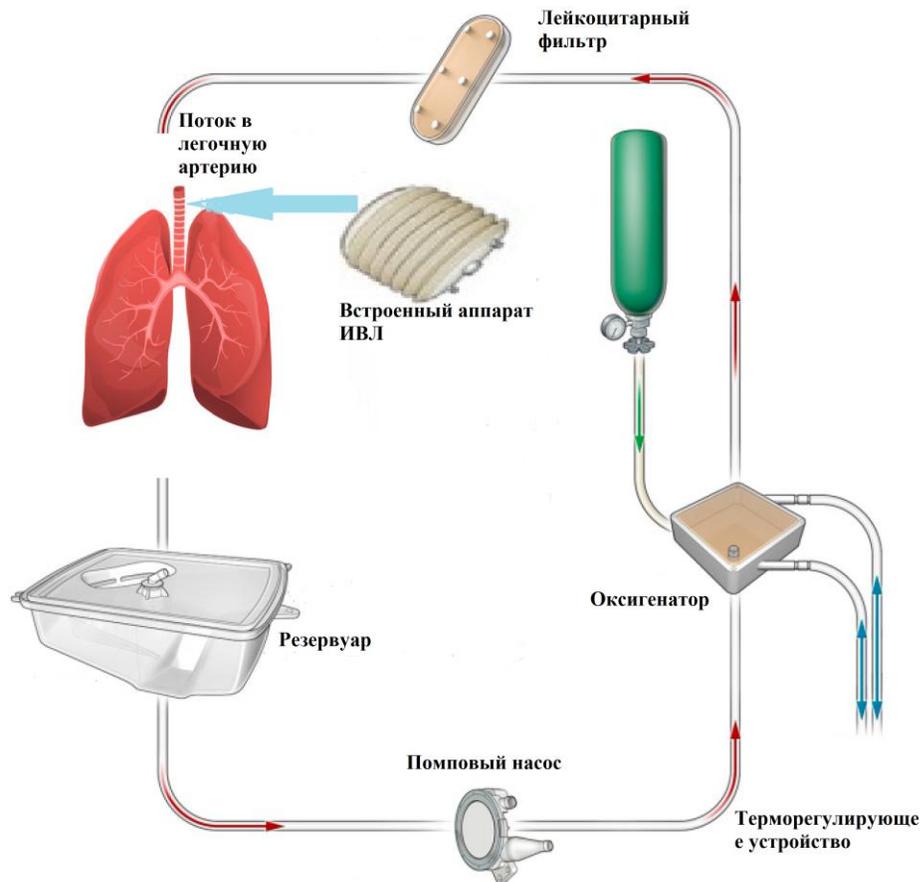


Рисунок 3 – Схематическое изображение контура для нормотермической машинной ex vivo перфузии донорских легких в транспортной системе OCS Lung (TransMedics, США)

Система представлена транспортной платформой с интегрированным аппаратом ИВЛ, встроенным модулем, включающим в себя кардиотомный резервуар, систему мониторинга и проточный газоанализатор. В данном устройстве используется перфузионный насос помпового типа. Характеристика методик перфузии донорских легких представлена в таблице №1.

Таблица 1 – Характеристика протоколов перфузии донорских легких [4]

Параметры EVLP	Lund	Toronto	OCS
Составные элементы перфузии			
Объем перфузии	100% от сердечного выброса (70 мл/кг/мин)	40% от сердечного выброса	2-2,5 л/мин
Давление в легочной артерии	20	15	20
Тип системы	открытая	замкнутая	открытая
Давление в левом предсердии (мм рт. ст)	-	3 – 5	-
Насос	роликовый	центрифужный	помповый
Перфузионный раствор	Steen Solution с добавлением эритроцитов (гематокрит 10- 15%)	Steen Solution без эритроцитов	OCS Lung solution с добавлением эритроцитов (гематокрит 15-25%)
Параметры вентиляции			
Режим	Контроль по объему	Контроль по объему	Контроль по объему
Давление на вдохе (мл/кг)	6 – 8	7	6
ЧДД	10 - 15	7	10
ПДКВ (см вод.ст.)	5	5	5
FiO ₂ (%)	50	21	21
Показатели температуры			
Начало вентиляции	32	32	32
Начало перфузии	15	25	32
Начало оценки	37	37	37

В настоящее время имеется пять коммерчески доступных устройств для процедуры EVLP, использующих один или гибрид стандартных протоколов: Vivoline LS1™ от Vivoline Medical® (наст. XVIVO®), Lung Assist™ от Organ Assist® (наст. XVIVO®), XVIVO Perfusion System (XPS)™ от XVIVO®, OCS™ от

TransMedics®, YY-LuPS™ от YouYeaMedical®, Ex-Stream™ от Биософт-М® (наст. ООО «ТрансБиоТек») (рисунок 4).



Рисунок 4 – Перфузионные системы для донорских легких

A – Vivoline LSI™ (Vivoline Medical®, Швеция), Б – Lung Assist™ (XVIVO®, Швеция), В – XVIVO Perfusion System (XPS)™ (XVIVO®, Швеция), Г – OCST™ (TransMedics®, США), Д – YY-LuPS™ (YouYeaMedical®, Китай), Е – Ex-Stream™ (ООО «ТрансБиоТек», Россия)

На фоне сохраняющегося острого дефицита эффективных доноров легких врачи-трансплантологи вынуждены рассматривать субоптимальных доноров и формировать протоколы работы с ними. Таким образом, основным назначением машинной нормотермической перфузии является реабилитация с возможностью оценки скомпрометированных донорских легких. Объективная оценка и реабилитация трансплантатов из субоптимальной группы позволят значительно увеличить количество трансплантаций, повысив общедоступность данного вида

медицинской помощи [4]. По данным Международного сообщества за 2021 год, в Европе ежегодно выполняется более 1231 трансплантации легких и сердца, в США – более 3000, 489 трансплантаций легких выполнено в Китае [37]. В настоящее время EVLP в основном используется в качестве платформы для оценки субоптимальных трансплантатов легких. Однако, имея возможность создавать физиологическую и контролируруемую среду, EVLP можно использовать не только как инструмент оценки донорских органов. В мировой литературе все больше работ посвящается не только оценке функционального статуса легких, но и применению машинной перфузии в качестве терапевтической платформы для различных областей медицины: были получены многообещающие результаты в области лекарственной, генной, клеточной и газовой терапии.

1.2 Применение нормотермической перфузии легких *ex vivo* в клинической практике

Система EVLP представляет контур, в который можно добавлять лекарственные препараты в сверхтерапевтических дозировках для направленной терапии трансплантата легких, избегая системного воздействия и токсичности. Несмотря на успешную реализацию данной концепции в многочисленных исследованиях, например при тромбоэмболии легочной артерии (ТЭЛА) трансплантата, в мировом сообществе присутствует сомнение в эффективности подобного метода. Однако Machuca et al. впервые описали терапевтический тромболизис *ex vivo* с последующей трансплантацией. В данном клиническом наблюдении ТЭЛА вызвала нарушение легочной микроциркуляции у донора, что угрожало развитием дисфункции трансплантата, было принято решение о проведении нормотермической машинной перфузии [75]. В условиях экстракорпорального контура проводили тромболизис альтеплазой с последующим

многократным ретроградным промыванием для удаления остаточных тромбозов. Чуть позднее Inci et al. также добились определенного успеха в терапевтическом тромболизе с использованием урокиназы на трансплантате легких с массивной легочной эмболией [119].

Вентилятор-ассоциированные и аспирационные пневмонии также являются основной причиной отказа от изъятия донорских легких, вследствие высокого риска развития септических осложнений в раннем послеоперационном периоде. Nakajima et al. продемонстрировали, что высокие дозы антимикробных агентов, добавленные к перфузату легких при EVLP, могут значительно снизить микробную нагрузку [80]. В пилотном исследовании, проведенном Zinn et al., была смоделирована тяжелая пневмония, вызванная *Pseudomonas aeruginosa* на животной модели свиней. Затем легкие подвергались процедуре EVLP, к перфузату добавляли колистин в сверхтерапевтических дозах. Через 2 часа машинной перфузии *ex vivo* проводили аутооттрансплантацию. Результаты показали, что в группе EVLP общая смертность экспериментальных животных была ниже по сравнению с классической антимикробной схемой системного внутривенного введения антибиотиков (колистин) для лечения пневмонии. Более того, клинические симптомы инфекции были менее выраженными в группе EVLP, что проявлялось более низким содержанием маркеров воспаления в сыворотке крови реципиента [115]. В клиническом исследовании Anderson et al. проводили антибактериальную терапию изолированных легких в условиях экстракорпоральной нормотермической *ex vivo* перфузии с положительными культуральными посевами и снижением бактериальной нагрузки после процедуры EVLP. Удалось выполнить трансплантацию 6 из 18 легких после проведения подобной процедуры, и все реципиенты были выписаны из стационара [58, 107].

Применение технологии EVLP открывает возможности развития новых направлений терапии, таких как таргетная генная терапия изолированных органов, позволяющая придавать трансплантату новые свойства. Например, работа научного

коллектива из Торонто в отношении интерлейкина (IL)-10, противовоспалительного цитокина, который инактивирует антигенпрезентирующие клетки и ингибирует каскад провоспалительных цитокинов, была крайне многообещающей и предоставила впечатляющие результаты [51]. Machuca et al. на модели свиньи показали, что генная терапия аденовирусом (который, трансфицируя клетки, вызывает гиперпродукцию IL-10) во время EVLP улучшает функцию легких после трансплантации и результаты послеоперационной реабилитации по сравнению со стандартной процедурой EVLP. После успешной экспериментальной части коллектив авторов также показал аналогичные результаты в работе на трансплантатах легких в клинике. Легкие от 10 субоптимальных доноров, считавшиеся исходно непригодными для трансплантации, подвергались процедуре EVLP с генной терапией IL-10, контрольная группа – трансплантаты после EVLP, без применения генной терапии. Трансплантаты легких, получавшие генную терапию, показали улучшенное насыщение тканей кислородом и снижение сопротивления легочных сосудов, по сравнению с контрольной группой. Также наблюдался благоприятный переход от провоспалительной к противовоспалительной экспрессии цитокинов и восстановление целостности альвеолярно-капиллярного барьера [101].

Ряд зарубежных исследований, посвященных мезенхимальным и стромальным клеткам, показали, что терапия мезенхимальными стромальными клетками (МСК) или мультипотентными клетками-предшественниками может ослаблять ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) за счет паракринного воздействия на про-/противовоспалительный баланс. Система EVLP предоставляет возможность для введения этих клеток в донорские трансплантаты перед имплантацией реципиенту. Nakajima et al. доставили мезенхимальные стромальные клетки в трансплантат легких в процессе нормотермической машинной перфузии и показали, что количество активированной каспазы-3 и TUNEL-тест-положительных клеток было снижено в группе с МСК в конце EVLP, по сравнению с контрольной группой,

где подобная терапия стволовыми клетками не проводилась [85]. Отмечалось, что пиковое давление в дыхательных путях было значительно снижено во время EVLP в группе МСК, а также уровень фактора некроза опухоли- α (TNF α) и степень первичной дисфункции легких были значительно снижены в группе МСК по сравнению с контрольной группой [74].

Кроме того, было высказано предположение, что мультипатентные взрослые клетки-предшественники человека могут уменьшить ишемически-реперфузионное повреждение, именно поэтому коллектив ученых La Francesca et al. использовал трансплантаты легких, которые консервировали и хранили при температуре +4 – +8 °С в течение 8 часов. После согревания и инициации процесса реперфузии на контуре EVLP бронхоскопически вводили мультипотентные клетки-предшественники в левые нижние доли, для контроля вводили физиологический раствор в правые нижние доли. Процедура машинной нормотермической перфузии проводилась в течение 4 часов, после чего трансплантат оценивали на предмет гистологического повреждения и воспалительных маркеров в жидкости бронхоальвеолярного лаважа и легочной ткани. Исследования показали, что левые нижние доли, обработанные мультипотентными взрослыми клетками-предшественниками, значительно снизили признаки воспаления на гистологических образцах и уменьшили маркеры воспаления в жидкости бронхоальвеолярного лаважа по сравнению с правыми нижними долями [71].

Система EVLP также позволяет проводить изолированную газовую терапию дыхательных путей для улучшения функционального статуса легочных трансплантатов. В условиях эксперимента на модели крыс Noda et al. проводили *ex vivo* перфузию комплекса сердце-легкие с использованием бесклеточного альбуминового перфузата на 4 часа, а ИВЛ проводилась 2% водородом. Исследование показало, что использование водорода ослабляло провоспалительные изменения, стимулировало митохондриальный биогенез и снижало выработку лактата в сравнении с классической методикой EVLP и стандартной ИВЛ. Во время

машинной перфузии с применением ингаляции 2% водорода в трансплантате наблюдалась активация гемоксигеназы-1, а экспрессия фактора-1, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α), была значительно ослаблена. В результате наблюдалось снижение ишемически-реперфузионного повреждения трансплантата и, следовательно, улучшение функционального статуса донорских легких в посттрансплантационном периоде у реципиентов [60].

Ингаляции оксида азота (NO) – распространенная методика лечения в послеоперационном периоде после трансплантации легких – также имеет потенциал применения в нормотермической машинной *ex vivo* перфузии донорских легких. На данный момент существует ряд исследований, доказывающих, что ингаляции оксида азота на этапе прекондиционирования благоприятно влияют на функциональный статус трансплантата после имплантации. К примеру, Dong et al. на крысиной модели с контуром *ex vivo* показали, что вентиляция с NO значимо влияла на снижение соотношения влажного и сухого веса, улучшала индекс оксигенации, а также улучшала показатели легочного сосудистого сопротивления. Кроме того, снижалась концентрация фактора некроза опухоли- α , который является медиатором воспаления и инициирует синтез эндотелиальной NO-синтазы, которая влияет на сосудистое сопротивление легочного микроциркуляторного русла [64].

Методика EVLP активно применяется не только в трансплантологической практике, но и в других областях клинической медицины. Благодаря использованию платформы EVLP появляется возможность исследования эффектов и фармакокинетики терапевтических онкологических препаратов. В 1958 году Creech et al. предложили вводить препараты для лечения злокачественных новообразований органа с помощью экстракорпорального контура, очень похожего на стандартную методику EVLP [43]. Цель данной работы состояла в том, чтобы предотвратить системное введение токсичных химиотерапевтических агентов в сверхтерапевтической дозировке и таргетно их доставить в орган-мишень. Одной из многообещающих работ, где происходит внедрение нормотермической машинной

перфузии в лечение распространенного опухолевого поражение легких, является труд коллектива из Торонто. Reck d. Santos et al. проводили нормотермическую машинную перфузию легких по методу Торонто в эксперименте на свиньях *in vivo*. Левое легкое перфузировали в течение 4 часов доксорубицином. Исследователи продемонстрировали возможность проведения данной методики с однородным распределением доксорубина, отсутствием системной утечки и сохранением адекватного функционального статуса легких [62]. Были проведены исследования первого этапа внедрения в клиническую практику подобного метода лечения на людях, которые показали эффективность этой терапевтической технологии с низкой частотой рецидива онкологической патологии при сохранении легочной функции пациента [52]. Несмотря на впечатляющие результаты, необходимы дальнейшие исследования для определения долгосрочной эффективности в отношении прогрессирования заболевания, токсичности, функции легких и общей выживаемости.

Не менее актуальным направлением для применения нормотермической машинной перфузии является регенеративная медицина и биоинженерия. Потребность в развитии данного направления высока и продолжит расти, так как, несмотря на достижения трансплантологии и уверенное расширение донорского пула, дефицит донорских органов по-прежнему сохраняется. Генная биоинженерия – перспективное решение проблемы недостатка трансплантатов. Группа ученых под руководством Harald Ott из Массачусетса в ряде исследований продемонстрировали эффективную децеллюляризацию легких на различных экспериментальных моделях – мышью, свиней и человеческой. Децеллюляризованная ткань легочной паренхимы сохранила состав и архитектуру внеклеточного матрикса для создания биоискусственного органа [45, 86].

Научному коллективу удалось воссоздать функциональную микрососудистую сеть легких путем повторной имплантации эндотелиальных и периваскулярных клеток в сосудистые каркасы с применением изолированной нормотермической

машинной перфузии легких, обеспечившей адекватную доставку клеточного материала, а также позволяло создать физиологичную среду для клеточной пролиферации [57].

Несмотря на то, что метод изолированной нормотермической перфузии легких уверенно демонстрирует свою эффективность в мировых трансплантационных центрах, а распространение данной технологии только увеличивается, вплоть до настоящего момента остаются открытыми вопросы развития и модернизации технологии EVLP. Как было описано ранее, система перфузии легких *ex vivo* результативно и успешно применяется в различных областях научного профиля и прикладной клинической медицины. Однако существуют материально-технические ограничения, которые затрудняют повсеместное практическое внедрение нормотермической машинной перфузии легких, такие как низкая доступность перфузионных растворов. В настоящее время основной задачей перед исследователями и клиницистами является создание простого, эффективного и дешевого перфузионного раствора, что позволит существенно упростить концепцию EVLP и увеличить ее доступность в трансплантационных центрах. Не менее значимой проблемой остается изучение ишемии и реперфузии – крайне значимого патофизиологического процесса, влияющего на морфофункциональный статус трансплантатов легких, как во время трансплантации, так и при проведении процедуры перфузии легких *ex vivo*, что в клинической практике снижает показатели выживаемости реципиентов за счет повышения частоты возникновения первичной дисфункции трансплантата. Именно глубокое понимание механизмов ишемически-реперфузионного повреждения, а также поиск эффективных решений для предотвращения или борьбы с ишемически-реперфузионными поражениями (ИРП) будут являться колоссальным достижением и обеспечат прогресс огромного пласта научно-практической медицины – трансплантации легких и изолированной нормотермической перфузии.

Одним из важнейших патологических состояний в современной трансплантологии является ишемически-реперфузионное повреждение, которое характеризуется нарушением оптимальной перфузии тканей трансплантата, а также степенью его первичной дисфункции. На данный момент эта проблема является одной из ведущих в направлениях научных исследований, сопряженных с трансплантологией. Инициация ишемически-реперфузионного повреждения берет начало от момента изъятия трансплантата и его гипотермического хранения вплоть до имплантации и восстановления кровотока в органе. Это запускает каскад патобиологических процессов, связанных с активацией провоспалительных клеток и медиаторов, а также выделением активных форм кислорода (АФК), приводящих к усугублению разрушительного воздействия на стадии реперфузии. Данный процесс приводит к апоптозу клеток паренхимы легких, воспалительным реакциям на поверхности сосудистого эпителия, что проявляется тяжелой первичной дисфункцией трансплантата – отеком легочной ткани вследствие повышения проницаемости сосудистой стенки, увеличением сосудистого сопротивления и как следствие – снижением показателей респираторной механики. После тяжелого ишемически-реперфузионного повреждения пациенты нуждаются в пролонгированной ИВЛ, а также в увеличении сроков экстракорпоральной поддержки кровообращения и мембранной оксигенации. Все это приводит к увеличению сроков нахождения пациента в отделении интенсивной терапии, а сам факт развития в раннем посттрансплантационном периоде ишемически-реперфузионного повреждения является предиктором хронической дисфункции трансплантата [29].

1.3 Методы защиты трансплантата легких

Общепринятым методом сохранения донорских легких, получившим развитие в середине XX века во время начала роста процедур искусственного кровообращения и трансплантации органов, является гипотермическое хранение с применением внеклеточных растворов. На клеточном уровне преимущество данного метода перед альтернативными методами объясняется уравнением Аррениуса, которое описывает следующую зависимость: снижение температуры на 10 градусов приводит к замедлению метаболизма в клетке на 50%. Однако вследствие того, что метаболизм полностью не прекращается во время гипотермического хранения, во время восстановления кровотока и согревания трансплантата возникает ишемически-реперфузионное повреждение, усугубляемое энергетической задолженностью в клетках органа из-за истощения эндогенных энергетических субстратов – аденозинтрифосфат (АТФ) и креатинфосфата, что сопровождается деполяризацией клеточной мембраны и инициацией апоптоза. Применения статической холодной консервации как единственного метода защиты трансплантата, очевидно, недостаточно для эффективного сохранения органа, несмотря на совмещение с внутрисосудистым введением холодных внеклеточных растворов, поскольку данный метод не редуцирует энергетическую задолженность, связанную с гипоксией, так как диссоциация кислорода в клетке и работа дыхательной цепи митохондрий прекращается при + 12°C, а повреждающее действие на интиму сосудистой стенки приводит к возникновению диссеминированной гипоперфузии в раннем реперфузионном периоде. Также снижается активность регуляторного агента – Na-K-аденозинтрифосфатазы, вследствие чего Na^+ и Cl^- поступают из внеклеточного пространства во внутриклеточное, являясь причиной гипергидратации клеток трансплантата. В свою очередь, нарушение регуляции транспорта кальция вызывает внутриклеточную

перегрузку кальцием, что приводит к усугублению гипоксического повреждения, а также, затрудняя реперфузию, становится причиной серьезного повреждения клеток и апоптоза. Тем не менее статическая холододовая консервация является первым и главенствующим методом защиты трансплантата от гипоксического повреждения путем снижения клеточного метаболизма и минимализации потребления кислорода для предотвращения повреждения тканей [38, 109].

Следующим шагом в оптимизации статической холододовой консервации и повышении эффективности протективных свойств является применение энергетических субстратов, таких как сахараиды. В ряде работ было объективно доказано огромное значение сахараидов в энергетическом обеспечении ишемизированного органа, а также продемонстрировано их уникальное свойство как противоотечного агента, что обуславливается высокой осмолярностью и снижением проницаемости сосудистой стенки. Были исследованы несколько типов сахараидов, таких как моносахараиды (глюкоза), дисахараиды (трегалоза) и трисахараиды (рафиноза), которые использовались или как адьювант к консервирующим растворам, или в качестве монопрепарата, однако универсального и наиболее эффективного криопротектора и источника энергии для применения в фармако-холододовой консервации выделено не было. Общая роль промежуточного метаболизма глюкозы в клеточном гомеостазе заключается, прежде всего, в выработке необходимой энергии для выполнения клеточных функций и обеспечения молекулярных субстратов для биосинтетических процессов. В клетках легких, как и в большинстве тканей, разнообразные субстраты, получаемые из белковых, липидных и углеводных предшественников, могут вступать в клеточный цикл промежуточных метаболитов. Таким образом, легочная ткань может окислять в различной степени глюкозу, жирные кислоты, аминокислоты, лактат и глицерин. Однако скорость окисления глюкозы является наибольшей, что позволяет предположить, что глюкоза служит основным окисляемым субстратом в нормальных физиологических условиях. В легких существует два вида транспорта глюкозы –

транцеллюлярный транспорт путем опосредованной переносчиками облегченной диффузии и активный транспорт. Транцеллюлярное пассивное поглощение глюкозы происходит за счет элементарного градиента концентрации, что было продемонстрировано в фундаментальном исследовании Fricke и Longmore на легких в экспериментальной модели на крысах. Активный же транспорт является инсулин-опосредованной реакцией, которая строго зависит от температуры, кислотности среды, а также активности натриевого насоса [56]. Данный механизм транспорта глюкозы доказан не только в исследовании на изолированной модели легких Kerr, Fisher и Kleinzeller, но и в других солидных органах [54]. Метаболизм же глюкозы в легких проходит за счет гликолиза, в результате которого образуется АТФ, углекислый газ и лактат, а регулируется в зависимости от внеклеточной концентрации глюкозы. Расчетная утилизация глюкозы при бесконечной концентрации субстрата составляет 72 мкмоль/час/г сухого веса или приблизительно 15 ммоль/час/г сухого веса. При физиологической внеклеточной концентрации глюкозы – около 5,6 ммоль/л, темп утилизации глюкозы составляет 40–50 ммоль/час/г сухого веса, что было продемонстрировано в фундаментальных исследованиях Bassett и Fisher [55]. Данная скорость метаболизма глюкозы относительно сухого веса сравнима с другими метаболически гиперактивными органами человека, такими как мозг и сердце, что было описано в исследовании Tierney [61].

В настоящее время повсеместно используется метод статической фармако-холодовой консервации специальными растворами с добавлением энергетического субстрата. Несмотря на возможность широкого выбора, эффективность и безопасность применения в трансплантации легких доказана лишь у немногих растворов. Принципиальными различиями между консервантами являются механизм воздействия на клетку и ее мембрану, а также осмолярность за счет коллоидных компонентов, что позволяет разделить фармако-холодовую консервацию на внеклеточную и внутриклеточную как следствие калий-натриевого соотношения. В

настоящее время в клинической практике применяются растворы исключительно внеклеточного механизма воздействия на клетки: Целсиор®, Перфадекс® и OCS Lung solution®.

Целсиор® – внеклеточный кристаллоидный консервирующий раствор с высокой концентрацией гистидина в качестве аминокислотного буфера с целью предотвращения интрацеллюлярного ацидоза, содержащий глутаминовую кислоту, исполняющую роль энергетического субстрата для клеточного метаболизма в условиях гипотермии. Исходно данный раствор разрабатывался как аналог раствору Евро-Коллинз® и раствору Университета Винконсина® для обеспечения фармако-холодовой консервации сердца при трансплантологических операциях и в кардиохирургии. Основным преимуществом Целсиора является высокое содержание калия и низкая концентрация натрия для обеспечения стабилизации клеточной мембраны за счет выравнивания ионных концентраций, что в свою очередь делает невозможным возникновение потенциала действия и активность ионных транспортных каналов [1]. Однако вследствие того, что раствор не проникает в клетки, что являлось предпосылкой для предотвращения интерстициального отека, данная разработка получила альтернативное применение в качестве консервирующего агента в трансплантации легких. Были проведены масштабные исследования, где изучалась эффективность Целсиора® в сравнении с Кустодиолом®, Евроколинзом® и Перфадексом® при трансплантации легких.

В экспериментальных исследованиях на животных моделях свиней были продемонстрированы эффективность и безопасность применения раствора Целсиор® в качестве консервирующего агента при трансплантации легких. Группа с применением данного раствора показала отсутствие интерстициального отека и высокий функциональный статус трансплантата после реперфузии с предшествующим фармакохолодовым хранением в течение 8 часов, в сравнении с Кустодиолом® и Евроколинзом®. Группы внутриклеточных кристаллоидных консервирующих растворов отличались тяжелым ишемически-реперфузионным

повреждением легких, что проявлялось молниеносным отеком легочной паренхимы и тяжелой дисфункцией трансплантата [94]. В сравнительном анализе Целсиора® и раствора Университета Винконсина® отмечались сопоставимые результаты, так как в группах сравнения ишемически-реперфузионные повреждения были слабо выражены, а функция трансплантата была удовлетворительной [116]. Подобное заключение, вероятнее всего, обусловлено тем, что Висконсинский раствор, несмотря на большое содержание калия, обладает свойствами коллоида и высокоосмолярного агента, так как в составе содержится гидроксипропилкрахмал и раффиноза.

Парадоксально, но в исследовании на экспериментальной модели, суть которого заключалась в 24 часовом фармако-холодовом хранении трансплантата легких с последующей трансплантацией, группа с использованием раствора Перфадекс® достоверно отличалась менее выраженным отеком паренхимы легких, лучшей сохранностью эндотелия в сравнении с группой, где в качестве фармако-холодового агента применялся Целсиор® [28, 95].

Несмотря на удовлетворительные результаты в исходе трансплантации легких после фармако-холодового хранения с использованием раствора Целсиор, более распространенным в международной клинической практике является раствор Перфадекс Плюс®. Перфадекс® – внеклеточный высокоосмолярный коллоидный раствор на основе декстрана-40 с добавлением глюкозы в качестве энергетического субстрата, с низким содержанием калия и высокой концентрацией натрия, а основным буферным агентом является адъювант трометамол, который в модифицированной версии раствора заменяется бикарбонатом в составе изделия. Именно разработка раствора Перфадекс® являлась новой ступенью в развитии трансплантации легких и EVLP. Существуют противоречивые мнения о влиянии декстрана-40 на макроорганизм, так как опубликован ряд работ, свидетельствующих о недопустимости применения декстрановых растворов у пациентов в критических состояниях – массивная кровопотеря, политравма, септический шок и пр. Однако,

группой врачей из Торонто под руководством Shaf Keshavjee были проведены экспериментальные и клинические исследования, в которых трансплантаты легких, где для фармако-холодовой консервации применялся раствор Перфадекс®, сравнивались с трансплантатами, в которых для консервации применялись Евроколлинз® и Висконсинский раствор® [88]. В исходе проведенной работы трансплантаты с применением раствора Перфадекс продемонстрировали более высокие показатели функционального статуса трансплантата легких в постреперфузионном периоде, несмотря на увеличенное время хранения, нежели легочные трансплантаты с применением альтернативных растворов. Была отмечена низкая интенсивность ишемически-реперфузионного повреждения, что проявлялось отсутствием отека паренхимы органа, высокими показателями индекса оксигенации, а также отсутствием признаков первичной дисфункции трансплантата. Данные эффекты Перфадекса® обусловлены благоприятным влиянием декстрана-40 на изолированные легкие [120]. Во-первых, декстран выполняет роль онкотического агента, удерживающего воду во внутрисосудистом пространстве, что способствует снижению интерстициального отека и препятствует его возникновению. Размер молекул в 35000–40000 Да обеспечивает стабильность проницаемости сосудистой стенки, а осмотический градиент «тянет» интерстициальную воду на себя. Именно данный эффект крайне необходим для эффективной консервации трансплантата легких. Во-вторых, декстран-40 может выполнять функцию сорбента продуктов анаэробного метаболизма при реперфузии, таких как продукты перекисного окисления (тем самым проявляя антиоксидантную функцию). Так как проникающая способность декстрана в клетку близится к нулю, его антиоксидантная активность проявляется исключительно во внутрисосудистом русле (внеклеточном пространстве). Третье, и одно из важнейших свойств декстрана, заключается в его благоприятном воздействии на микрососудистое русло и реологию крови в целом. Препарат оказывает положительное влияние на остаточные во время консервации эритроциты, повышая их эластичность, препятствует адгезии эритроцитов и

индуцирует их дезагрегацию, способствует снижению адгезивной способности тромбоцитов, тем самым проявляя эндотелий-протективные свойства [31, 47, 81].

Аналогом раствора Перфадекс® при проведении консервации легких является коллоидный раствор OCS Lung Solution®. Данный раствор был представлен компанией Transmedic, США, и является практически копией оригинального Шведского раствора, в качестве основного буфера используется повышенная концентрация бикарбоната натрия, а возможность применения распространяется на EVLP в качестве перфузионного раствора. Его положительное влияние на трансплантат легких, как и у Перфадекса®, обуславливается высоким содержанием коллоидов – декстрана-40, что дает многочисленные преимущества, включая нивелирование сладж-синдрома, предотвращение агрегации эритроцитов, индукцию распада уже агрегированных клеток, а также сохранение эндотелиально-эпителиальной мембраны. Коллоиды также обладают антитромботическим эффектом, поскольку способны покрывать эндотелиальные поверхности и тромбоциты. Не менее важным составляющим раствора является низкое содержание калия относительно внутриклеточных растворов. Низкий уровень калия позволяет защитить легкие во время реперфузии, что приводит к снижению давления в легочной артерии и общего легочного сосудистого сопротивления (ЛСС), а также отмечается улучшение динамических показателей вентиляции легких, что обеспечивается активным трансцеллюлярным транспортом в реперфузионном периоде, способствующим регрессии интерстициального отека, возникающего во время ишемии и аноксии. Одним из ключевых моментов положительного влияния декстранового раствора на трансплантат легких в процессе фармако-холодовой консервации является наличие в его составе энергетического субстрата в виде глюкозы, который, при условии «воздушности» легочной ткани, обеспечивает регрессию энергетической задолженности и метаболические потребности трансплантата.

Не менее значимыми в клиническом применении в области легочной трансплантологии являются перфузионные растворы для изолированной нормотермической *ex vivo* перфузии легких. Поскольку в условиях изолированного контура трансплантат легких крайне уязвим, требования, предъявляемые к перфузионным растворам, очень строги: необходима корректная балансировка водно-электролитного состава, чтобы максимально приблизить состав к физиологичному для внутриклеточной среды, требуется достижение высокоонкотических свойств за счет коллоидов с целью предупреждения развития отека паренхимы, а также редуцирования уже накопленной интерстициальной жидкости. Характеристикой, остающейся главенствующей наравне с ранее описанными, является наличие энергетического субстрата, обеспечивающего не только увеличение осмолярности, но и восполнение энергетической задолженности в реперфузируемом органе. Наконец, спорным остается вопрос о необходимости применения эритроцитарной взвеси в составе раствора при проведении процедуры EVLP [4].

Наиболее распространенным и часто используемым является раствор для нормотермической перфузии органов на основе альбумина человека Steen Solution®, разработанный в университетской клинике Лунда (Швеция) профессором Stig Steen et al. Разработанный раствор Steen solution® является буферным внеклеточным раствором, оптимально сбалансированным для проведения изолированной перфузии трансплантата легких. Его уникальная характеристика – высокое коллоидно-онкотическое давление – делает его идеальным компонентом для применения на легких. Повышенная осмолярность данного раствора достигается высокой концентрацией человеческого альбумина как основного компонента плазмы крови, выполняющего множество физиологических функций. Особое внимание уделяется способности альбумина оказывать цитопротективный эффект, что было продемонстрировано в исследовании F.Pagano [44]. В данном исследовании на культурах клеток было продемонстрировано антиоксидантное и цитопротекторное

воздействие альбуминового раствора в эксперименте на легких человека [69]. Другой компонент раствора, декстран-40, как было отмечено ранее на примере Перфадекса®, обеспечивает протективное воздействие на эндотелий трансплантата, а также повышает пластичность остаточных форменных элементов и препятствует лейкоцитарной и тромбоцитарной адгезии. Считается, что именно декстран-40 выступает в качестве основного антиоксидантного компонента раствора Steen Solution®, снижая инфильтрацию эндотелия лейкоцитами, а этот процесс, в свою очередь, является одним из звеньев патофизиологического процесса ишемически-реперфузионного повреждения. Немаловажной составляющей эффективности альбуминового раствора является наличие в составе физиологического уровня электролитов, что обеспечивает нормальную поляризацию клеточной мембраны, не нарушая внутриклеточный транспорт, способствуя снижению образования АФК. Учитывая все представленные характеристики, можно сделать вывод о том, что раствор Steen Solution является уникальным синтетиком, имитирующим кровь, способным обеспечивать газотранспортную функцию за счет высокой газовой емкости альбуминового компонента [106].

Схожим по своим свойствам, но радикально отличающимся по составу от Steen Solution® является раствор для изолированной нормотермической перфузии легких OCS Lung Solution®, Transmedics, США. Как было описано ранее, данное изделие имеет зарегистрированное двойное назначение в качестве консервирующего агента и перфузионного раствора для EVLP. Универсальность данного раствора обуславливает его уникальность, а более низкая стоимость в сравнении со Steen Solution® повышает привлекательность использования изолированной перфузии донорских легких у международного сообщества. В недавних исследованиях Gabriel Loog из США была продемонстрирована эффективность концепции изолированной перфузии донорских легких в течение 24 часов с применением раствора OCS Lung Solution® в качестве метода фармако-холодовой консервации с последующей нормотермической перфузией трансплантата легких данным раствором. Результаты проведенного исследования

продемонстрировали впечатляющую эффективность OCS Lung Solution®, также подтвердили безопасность и влияние положительных эффектов декстрана-40: отмечались снижение массы трансплантата легких в исходе процедуры EVLP, умеренная концентрация маркеров воспаления и отсутствие признаков ишемически-реперфузионного повреждения [91]. Но первичным достижением данной команды исследователей являлось утверждение о том, что использование цельной крови в качестве монокомпонента (в качестве базового и единственного компонента) для проведения EVLP обеспечивает более высокую эффективность данной процедуры, сохраняя баланс патофизиологических аспектов методики без негативных последствий.

Альтернативным раствором для проведения изолированной нормотермической перфузии донорских легких является оригинальная запатентованная разработка ФГБУ «НМИЦ ТИО им. В.И. Шумакова» Минздрава России. Особенностью данного раствора является методика изготовления – состав полностью представлен доступными официальными препаратами. Базовой основой является сбалансированный физиологический кристаллоид Стерофундин изотонический в объеме 650 мл, который в единой стерильной емкости смешивается с главным осмотическим компонентом – 25% Альбумином человеческим (Уман альбумин человеческий, Лукка, Италия). Второстепенными составляющими являются 8,4% гидрокарбонат натрия, выступающий в качестве основного буферного компонента (BBraun, Германия), а также кальция хлорид 10%, магния сульфат 25%, Глюкоза 40% и инсулин человеческий рекомбинантный. Адьювантами к раствору выступают препараты противовоспалительного и антимикробного действия, Простагландин E1 и другие вазодилататоры.

Не менее эффективным является опытный перфузионный раствор на основе декстрана-40, разработанный в ФГБУ «НМИЦ ТИО им. В.И. Шумакова» Минздрава России. Особенностью данной разработки является полное отсутствие глюкозы в составе в качестве энергетического субстрата и использование ее как адьюванта. Реализация подобной концепции обеспечивает более корректный расчет концентрации

глюкозы в перфузате, ориентируясь на сухую массу трансплантата, что позволяет оптимизировать и тщательно контролировать потребность и темпы утилизации глюкозы в трансплантате. Это является одним из пунктов оценки функционального статуса трансплантата в процессе нормотермической изолированной перфузии донорских легких, а также признаком степени ишемически-реперфузионного повреждения.

1.4 Ишемическое консервационно-реперфузионное повреждение донорских легких

Несмотря на непрерывное усовершенствование составляющих процедуры трансплантации легких – хирургической техники трансплантации легких, методик послеоперационной реабилитации, а также протоколов изъятия трансплантатов – фармако-холодовая консервация остается единственной наиболее эффективной технологией сохранения донорских органов. Как было описано ранее, гипотермия обеспечивает обратимое снижение скорости клеточного метаболизма и активности ферментных систем, что не позволяет предупредить ишемию, вследствие анаэробного метаболизма, и последующие реперфузионные повреждения, проявляющие себя в составе первичной дисфункции трансплантата в первые 72 часа [98]. Клинические проявления дисфункции трансплантата, в зависимости от степени тяжести реперфузионного повреждения, могут варьировать от легкой гипоксемии, сопровождающейся незначительными инфильтрационными изменениями в паренхиме легких, до тяжелого острого респираторного дистресс-синдрома, проявляющегося жизнеугрожающей гипоксемией и тяжелой гиперкапнией, что требует применения жестких параметров искусственной вентиляции легких и экстракорпоральной оксигенации. В основе каскада патофизиологических процессов ишемически-реперфузионного повреждения лежит окислительный стресс,

характеризующийся образованием активных форм кислорода, с которыми антиоксидантная защитная система клетки не в состоянии справиться вследствие длительного времени гипобииоза на фоне фармако-холодовой консервации. Можно сделать заключение, что ишемически-реперфузионное повреждение – дисбаланс между антиоксидантной системой и продукцией АФК в клетках [66]. В настоящее время проведен ряд работ, доказывающих, что именно оксидативный стресс становится причиной ишемически-реперфузионного повреждения, первопричиной которого является отсутствие адекватной перфузии и, соответственно, усугубление сформированной энергетической задолженности. Таким образом, ишемия-реперфузия – сложный патофизиологический процесс восстановления перфузии в ишемизированной ткани, который приводит к усугублению дисфункции клеточных процессов и цитолизу [63, 92]. Необходимо также акцентировать внимание на том, что ишемически-реперфузионное повреждение обладает молниеносным течением каждого из своих звеньев, приводя к летальному исходу пациента до 30% от всех случаев в течение 3 суток [73, 110]. Основной группой риска возникновения данного осложнения являются реципиенты с первичной дисфункцией трансплантата легких 3 степени (PGD grade 3, ПДТ 3 степени), вследствие патологического воздействия ИРП. Согласно статистике регистра Международного сообщества трансплантации легких и сердца, на сегодняшний день выполнено более 70 000 трансплантаций легких, а средняя пятилетняя выживаемость реципиентов составляет 55%, смертность же в ранний послеоперационный период от первичной дисфункции трансплантата легких составляет от 2 до 6% [39]. Таким образом, именно глубокое понимание патологических процессов ишемии с последующей реперфузией позволит добиться прогресса в технологии безопасной консервации донорских органов, а также обеспечить снижение смертности после трансплантации.

В настоящее время принято разделение сложных взаимосвязанных механизмов ишемически-реперфузионного повреждения на пять подгрупп, состоящих из последовательных патофизиологических процессов: 1) отсутствие источника кислорода

и формирование энергетической задолженности, 2) отсутствие трансцеллюлярной экскреции токсичных метаболитов, 3) развитие окислительного стресса, 4) нарушение метаболического гомеостаза клетки на фоне осмотического дисбаланса и клеточная перегрузка Ca^{2+} , 5) системная воспалительная реакция на в организме в целом [90, 121]. В результате ишемии и гипоксии на клеточном уровне в процессе фармако-холодовой консервации возникает прерывание функционирования электрон-транспортной цепи, что вызывается дефицитом НАДН⁺Н и QН2 (убихинон). Следствием блока данного звена, отвечающего за восстановление кислорода, является прекращение митохондриального синтеза АТФ, а также метаболизма в митохондриях. Параллельно наблюдается дисфункция малатного челнока и снижение деградации жирных кислот, находящихся в прямой зависимости от присутствия НАД⁺ (никотинамидадениндинуклеотид). Несмотря на то, что потребление АТФ (аденозинтрифосфат) во время гипотермического хранения аэробными клетками снижается в 1,5–2 раза от нормального, возникает серьезная энергетическая задолженность, активирующая анаэробный путь гликолиза с целью компенсации дефицита АТФ. Все три реакции анаэробного гликолиза – субстратное фосфорилирование, распад фосфокреатина и аденилатциклазная реакция превращения АДФ (аденозиндифосфат) – не предоставляют АТФ в достаточном количестве и сопровождаются синтезом молочной кислоты, снижающей рН в клетке, а также гиперпродукцией АФК. Дефицит АТФ, преобладание кислотной среды при сопутствующем избытке АФК дестабилизируют лизосомную мембрану, способствуя высвобождению гидролитических ферментов, оказывающих непосредственно цитолитический эффект. Прогрессирование энергетического голодания негативно влияет на функционирование калий-натриевого насоса (АТФ-зависимой Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы), следствием чего являются избыток интрацеллюлярного натрия, накопление H_2O и острый дефицит цитоплазматического калия [33, 76]. Рост концентрации H^+ вследствие кумуляции недоокисленных продуктов липидного и углеводного обменов, а также продуктов гидролиза АТФ усугубляет необратимость

энергетической задолженности, тормозя ферментативные механизмы гликолиза. Параллельно повышается активность Na^+/H^+ и $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ – каналов, регулирующих внутриклеточный ионный баланс и кислотность. Попытка клеточных механизмов добиться гомеостаза приводит к дальнейшему усугублению патологического процесса, так как избыточное накопление ионов натрия активирует кальциевые каналы, чрезмерно увеличивая внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} . Именно данное патофизиологическое звено ишемии замыкает порочный круг: Ca^{2+} совместно с избытком АФК активируют гидролазы (фосфолипаза А2, протеазы), вызывающие деструкцию клеточной мембраны и цитолиз в раннем периоде реперфузии из-за резкой стабилизации рН [93, 96]. Помимо направленного повреждающего воздействия на клетку, накопление ионов кальция негативно влияет и на митохондрии. Активация кальциевого унипортера (mitochondrial Ca^{2+} uniporter, MCU) приводит к транспорту Ca^{2+} в митохондриальный матрикс, где при участии АФК инициируется открытие митохондриальных пор высокой проницаемости для воды и растворенных в ней веществ, вызывая митохондриальный отек и разрушение крист. В исходе этого процесса нарушается остаточный синтез АТФ, происходит деструкция наружной мембраны, и структурные компоненты органеллы попадают в цитоплазму, инициируя механизмы апоптоза и способствуя системной воспалительной реакции [72, 89]. Параллельно вышеописанному негативному воздействию внутриклеточного кальция индуцируется образование пирофосфатных кальциевых комплексов и мочевой кислоты, провоцируя каскад «стерильного воспаления», он же DAMP (Damage Associated Molecular Pattern, Молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждением), что также является частью реперфузионного повреждения [40]. Молекулы эндогенного происхождения, такие как белки шапероны, митохондриальная ДНК и другие, они же индукторы DAMP, инициируют формирование внутриклеточных провоспалительных белков-инфламаторов, распознавая индукторы стерильного воспаления с помощью рецепторов NLRs, генерируют воспалительную реакцию, продуцируя ряд

цитокинов: TNF- α , IL-18, IL-6, циркулирующий амфотерин (HMGB-1), IL-1 β , IL-8 и др [87]. Цитокины же в свою очередь провоцируют образование нейтрофильных ловушек. Данная цепь патофизиологических реакций, наряду с интрацеллюлярной энергетической недостаточностью, усугубляет реперфузионное повреждение после фармако-холодовой консервации и усиливает аутофагию как основной способ утилизации DAMP – индукторов [40, 87]. Из-за лавинообразного прироста провоспалительных молекул отмечается их выход в межклеточное пространство путем некроза клетки. Именно в этой точке реперфузионное повреждение переходит на системный уровень, проявляясь образованием нейтрофильных ловушек (neutrophils extracellular traps, NETs) (компонентами нейтрофильных ловушек являются гистоны, ферменты и пептиды гранул – миелопероксидаза, нейтрофильная эластаза, лизоцим С, кальпротектин и др.) при непосредственном участии тромбоцитов, выделяющих медиаторы воспаления, способствуя нейтрофильному высвобождению и активации системы свертывания крови. Далее нейтрофилы образуют комплиментные связи с активированными тромбоцитами и эндотелиальными сосудистыми клетками, обеспечивая транссудацию в очаг воспаления, необратимый тромбоз микроциркуляторного русла (синдром «no-reflow»), а также фагоцитоз некротизированных клеток и их органелл. Патофизиологическая цепь взаимодействия клеток крови приводит к возникновению острого респираторного дистресс-синдрома и синдрома системной воспалительной реакции, что в раннем послеоперационном периоде проявляется полиорганной недостаточностью на фоне первичной дисфункции трансплантата. Отдельное, наиважнейшее значение в патофизиологии ишемически-реперфузионного повреждения определено избыточному образованию и накоплению АФК, всплеск которых наблюдается в момент инициации реперфузии после фармако-холодового хранения трансплантата вследствие дефицита продуктов антиоксидантной активности, что является начальной стадией окислительного стресса (рисунок 5).

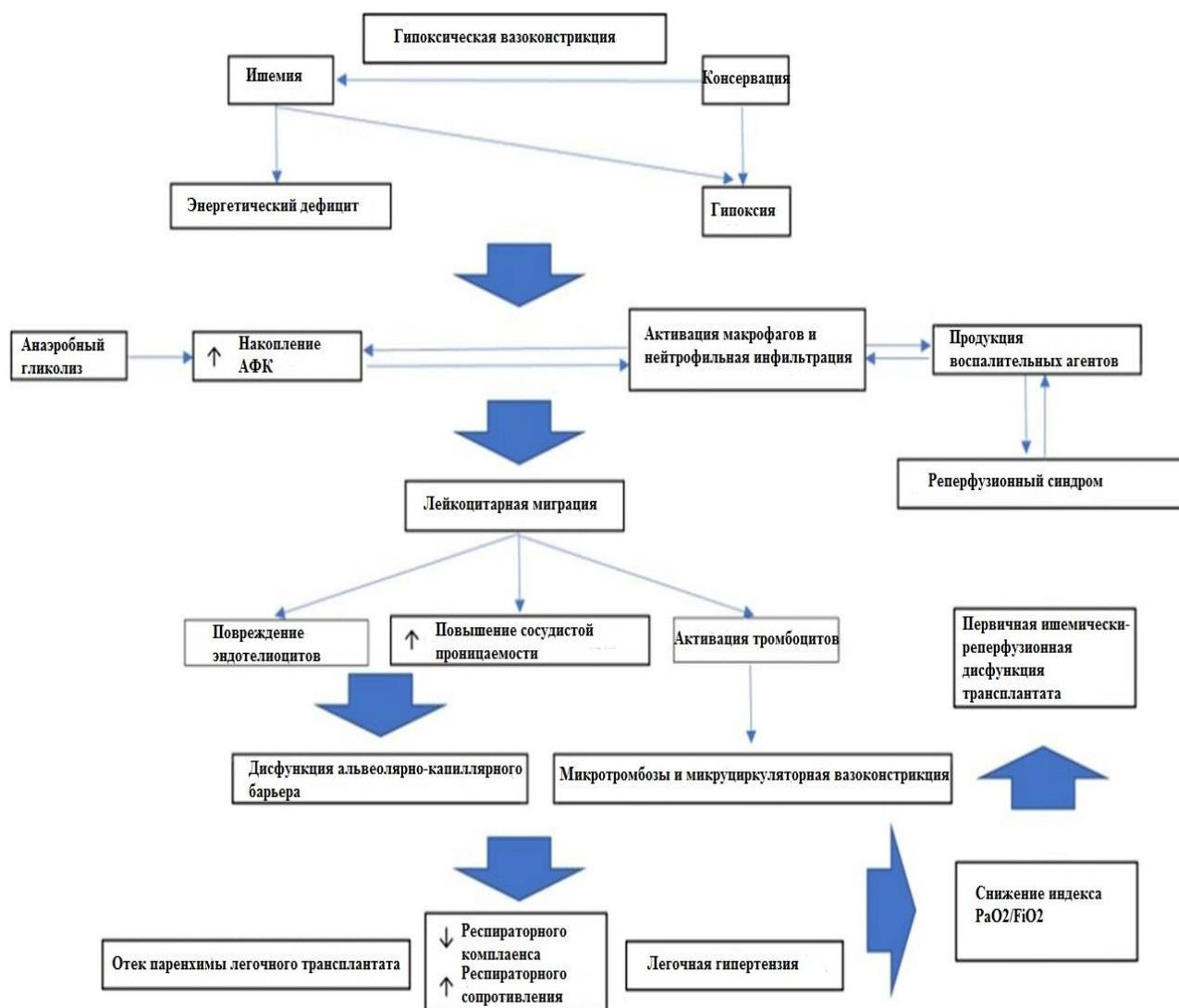


Рисунок 5 – Схема первичной реперфузионной дисфункции трансплантата

Основными источниками АФК, таких как супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot-}$, гидроксильный радикал HO^{\cdot} , перекись водорода H_2O_2 и др., являются: НАДФ-оксидазы, дыхательная цепь митохондрий, ксантиноксидазы, циклооксигеназы и NO-синтазы, а также свободные ионы железа (реакции Фентона и Хабера-Вайса) в результате метаболизации железо-содержащих белков (трансферрина, гемоглобина, цитохрома С и др.). Помимо общего цитотоксического эффекта, свободнорадикальные формы АФК оказывают таргетное воздействие на эндоплазматический ретикулум и митохондрии, что проявляется усугублением

клеточного энергетического дефицита, синдрома невосстанавливаемого кровотока, системной воспалительной реакции, приводя в итоге к прогрессированию ишемически-реперфузионного повреждения [32, 65].

1.5 Методы борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением донорских легких

В настоящее время активно ведутся поиски наиболее эффективных методов борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением и увеличения резистентной способности клетки. Несмотря на большое количество работ в данном направлении, одним из первых и основных методов защиты клеток и тканей во время фармако-холодовой консервации органов является ишемическое прекондиционирование, которое описано в литературе как «аутоиндуцированная толерантность к ишемии», «феномен метаболической адаптации», «адаптация к ишемии». Впервые подобный метод был эффективно применен и описан Murry С.Е. et al. в 1986 на экспериментальной модели миокарда собаки, где моделировалось ишемически-реперфузионное повреждение с предварительной краткосрочной индуцированной ишемией и быстрой реперфузией [79]. В последующем было установлено, что эффективность ишемического прекондиционирования реализуется за счет экстренной индукции синтеза антиоксидантных ферментов, не прекращающейся в период быстрой реперфузии, тем самым обеспечивая пролонгированную протекцию клеток в ишемизированной ткани путем нейтрализации АФК и снижая степень реперфузионного повреждения [7, 21, 78, 100]. Несмотря на убедительную эффективность применения данного метода в экспериментальных моделях, где был установлен временной интервал проведения ишемического прекондиционирования, – для 45-минутной ишемической протекции ткани миокарда требуется проведение минимум четырех циклов ишемии длительностью 8 минут с 10-минутной

реперфузией [99]. Следует отметить, что для клинического применения данный метод имеет ряд ограничений, среди которых проблемы этического характера, а также отсутствие унифицированных временных сроков прекондиционирования [19, 99]. Таким образом, наиболее перспективным является направление разработки фармакологической защиты от негативного воздействия ишемии и борьбы с реперфузионным повреждением. В зависимости от точек воздействия в клетке, условно фармакологические агенты делятся на активаторы клеточных процессов, ингибиторы клеточных реакций, регуляторы энергетических процессов, хелаторы металлов переменной валентности и антиоксиданты. Так как большинство клеточных фармагентов не имеет доказанной эффективности с сопутствующей низкой биодоступностью, наиболее перспективным является разработка и применение препаратов из группы антиоксидантов, так как именно АФК доминируют в патофизиологической цепи ишемически-реперфузионного повреждения. Первые попытки применения низкомолекулярных соединений, таких как аскорбиновая кислота, ретинол, токоферол и пр., в качестве нейтрализаторов АФК датированы началом 60-х годов XX века [82]. Необходимо отметить, что некоторые низкомолекулярные соединения (например, аскорбиновая кислота) имеют и обратный эффект, проявляя прооксидантные свойства, способствуя образованию АФК, особенно в присутствии металлов переменной валентности [5, 46] Именно комбинация вышеописанных свойств данной группы препаратов по-прежнему обеспечивает повышенный интерес к ним в ходе научных исследований, и в то же время внушает скептицизм и недоверие к подобным работам. К примеру, занимающий особое место среди препаратов с антиоксидантной активностью митохондриальный протектор MitoTEMPO (MitoQ10) неоднократно исследовался в условиях различных экспериментальных моделей [48, 77], и даже предпринимались попытки его внедрения в клиническую практику, но из-за отсутствия доказанной эффективности все клинические исследования были прекращены, а препарат был переквалифицирован в ранг биодобавок [97, 114]. Подобная участь постигла и

аналогичную отечественную разработку – митохондриальный протектор SkQR1, разрабатываемый сотрудниками В. П. Скулачева. Несмотря на демонстрацию защитного эффекта при ишемии-реперфузии на различных животных моделях [10], данное соединение также было отнесено к биодобавкам [2, 36].

1.5.1 Пероксиредоксины

Наиболее перспективным для применения в клинической практике в качестве антиоксидантов для снижения интенсивности ишемически-реперфузионного повреждения является использование ферментов, в частности пероксиредоксинов [9, 24, 104, 117]. Пероксиредоксины являются группой тиолзависимых селен-независимых пероксидаз и обладают молекулярной массой 20–30 кДа, обеспечивают восстановление гидропероксидов органической и неорганической природы до воды и спиртов. Особенностью данных белков является отсутствие окислительно-восстановительных кофакторов, а нейтрализация наиболее долгоживущих форм АФК – гидропероксидов происходит благодаря консервативному остатку цистеина в активном центре фермента [23]. Семейство пероксиредоксинов активно участвует в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза клетки, а по данным базы «The Human Protein Atlas» [111] занимает лидирующее положение (по распространенности) среди ферментов-антиоксидантов в организме человека. Наиболее биологически активным и значимым является пероксиредоксин-6 (Prx6, PRDX6), идентифицированный и синтезируемый в ИБК РАН (лабораторией механизмов редокс-регуляции клеточных процессов). Prx6 является основным антиоксидантом в органах дыхания млекопитающих, обеспечивая до 80% антиоксидантной защиты [70]. Prx6 обладает широкой субстратной специфичностью, нейтрализуя органические (алкилгидропероксиды и гидропероксиды фосфолипидов) и неорганические (H_2O_2 и пероксинитрит) пероксиды клетки [113]. Несмотря на выраженную антиоксидантную активность, терапевтическая

эффективность P_{rx6} была расширена благодаря созданию химерного фермента на основе P_{rx6} человека и Mn-супероксиддисмутазы *Escherichia coli*, который обладает большим антиоксидантным потенциалом, что было продемонстрировано в ряде научных экспериментальных работ по влиянию этого гибридного белка на респираторную и сердечно-сосудистую систему [8, 17, 25, 118].

Таким образом, общемировые проблемы, связанные с трансплантацией легких, напрямую зависят от технологий, обеспечивающих возможность работы с донорами из субоптимальной группы, исследований и поисков инновационных решений при фармако-холодовой консервации трансплантатов легких, а также изучения новых методов борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением.

1.6 Заключение

Проведенный анализ данных литературы, посвященный нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo*, распространенности методики, а также проблемам при проведении процедуры, продемонстрировал актуальность темы данной научной работы.

Безусловно, ишемия-реперфузия актуальная проблема, сопутствующая трансплантации всех солидных органов, однако при трансплантации легких, в частности, при применении процедуры EVLP, ишемически-реперфузионное повреждение оказывает выраженное влияние на клинические исходы оперативного вмешательства.

Не менее значимой является заинтересованность общемирового научного сообщества в поиске универсальной, доступной и воспроизводимой методики для испытания воздействия новых молекул и фармакологических препаратов на донорские и нативные легкие как при трансплантации, так и при терапии онкологических процессов, наследственных заболеваний и функциональной дисфункции органа.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Дизайн исследования

В данном исследовании использовались экспериментальные животные крысы линии Wistar массой 300 - 350 г. Все проводимые эксперименты получили одобрение комитета по биологической безопасности и биоэтике. Настоящее исследование проводилось с соблюдением положений Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными и директивы 2010/63/EU. Животных содержали в лабораторных клетках с соблюдением температурного, водно-пищевого и циркадного режимов. Все животные были разделены на две равные группы – «доноры» (n=60), «реципиенты» (n=60). В свою очередь, животные доноры были разделены на 4 группы: первая группа – нормотермическая машинная перфузия донорских легких с применением Steen Solution (n=15), вторая группа – нормотермическая машинная перфузия опытным раствором на основе декстрана-40 (n=15), третья группа – *ex vivo* перфузия трансплантата легких раствором Steen Solution с применением Prx6 (n=15), четвертая группа – EVLP опытным раствором на основе декстрана с применением Prx6 (n=15). Из экспериментального исследования было исключено 11 случаев в связи с техническими сложностями и дефектами чистоты проведения процедуры трансплантации. Таким образом, суммарно была выполнена 71 процедура нормотермической машинной перфузии донорских легких с последующей унилатеральной ортотопической трансплантацией левого легкого. Все животные были представлены близкородственными особями, что обеспечивало отсутствие выраженных иммунологических осложнений. Функциональный статус трансплантата легких во время EVLP оценивали по показателям легочного сосудистого сопротивления, PaO_2/FiO_2 – индексу, параметрам исследования кислотно-основных показателей. В посттрансплантационном периоде раннего ишемически-реперфузионного повреждения (в условиях острого

эксперимента длительностью не более 120 минут) функцию трансплантата оценивали по индексу P_{aO_2}/F_{iO_2} , гистологическим и гистохимическим изменениям. По истечении 2 часов животное выводилось из эксперимента с применением медикаментозной эвтаназии через введение в сердце гиперкалиевого раствора. Каждое экспериментальное исследование включало в себя стадию наркотизации животного-донора, процедуру эксплантации донорских легких, фармако-холодовую консервацию с временем экспозиции 12 часов, процедуру нормотермической перфузии трансплантата легких, стадию наркотизации животного-реципиента, имплантацию левого донорского легкого в ортотопическую позицию реципиенту.

2.2 Эксплантация донорских легких

Все лабораторные животные для данной экспериментальной исследовательской работы были приобретены в лицензированном питомнике. После доставки животных в лабораторию ФГБУ «НМИЦ ТИО им. В.И.Шумакова» Минздрава России, крыс содержали две недели в карантине в вентилируемой клеточной системе в условиях 12 часового режима сна/бодрствования при температуре 22°C, влажности 57% и стандартной схемой питания с целью предотвращения влияния экзогенных факторов на чистоту экспериментов. После контрольного осмотра ветеринарным врачом животных в день проведения эксперимента доставляли в лабораторию для подготовки к наркотизации.

Процедура эксплантации донорских легких. Животного – донора помещали в специальную наркозную камеру, где с использованием испарителя для изофлурана RWD R5835, Китай в потоке 1 л/мин и концентрации 5 об/% выполняли седацию крысы. Контроль глубины анестезии проводили путем оценки реакции на болевой импульс и частоты дыхательных движений. После достижения удовлетворительной глубины седации, остатки изофлурана эвакуировались через абсорбер RWD R546Pro. С использованием назофарингеального зеркала с длиной губок 30 мм под

прямым искусственным глоточным освещением выполняли прямую ларингоскопию, голосовую щель обрабатывали 10% раствором Лидокаина при помощи ватного тампона. Далее проводили интубацию трахеи катетером 14G (рисунок 6). На рисунке 6 слева изображено назофарингеальное зеркало, используемое для прямой ларингоскопии, по центру изображена прямая ларингоскопия, стрелкой отмечена голосовая щель, справа – вид со стороны после интубации трахеи.



Рисунок 6 – Интубация трахеи катетером: 1 – назофарингеальное зеркало; 2 – голосовая щель при прямой ларингоскопии; 3 – вид крысы после интубации трахеи

Выполняли коннекцию интубационной трубки к контуру аппарата ИВЛ SAR-830/AP Ventilator, США, а искусственную вентиляцию легких инициировали 100% кислородом в специально подобранных параметрах: ЧД – 85/мин, $V_{\text{дых}}$ – 1,2 мл, $V_{\text{пот}}$ – 700 мл/мин, P_{peak} – 8 см.вод. ст., РЕЕР – 3 см.вод.ст., поток изофлурана 3,5 об/%. Шкуру животного выбривали в месте хирургического доступа. Выполняли срединную стернотомию. После диссекции тканей трансплантата легких и прекарневых структур, вводили гепарин 1000 ЕД путем пункции верхушки левого желудочка. Спустя 3 минуты экспозиции выполняли забор цельной донорской крови у крысы-донора в объеме 12 мл в гепаринизированный шприц, проводилась лабораторная диагностика и исследование стандартных параметров газового состава

крови. Далее, трансвентрикулярно устанавливали канюлю 2,0/2,5 мм в просвет легочной артерии, проводили вентрикулотомию левого желудочка сердца и в левом предсердии позиционировали металлическую угловую канюлю диаметром 2 мм с целью адекватного дренажа перфузата, инициировали консервацию опытным раствором на основе декстрана-40 температурой 4 °С и объемом 20 мл через перфузор со скоростью 200 мл/ч (3,3 мл/мин) и временем экспозиции 6 минут (рисунок 7).

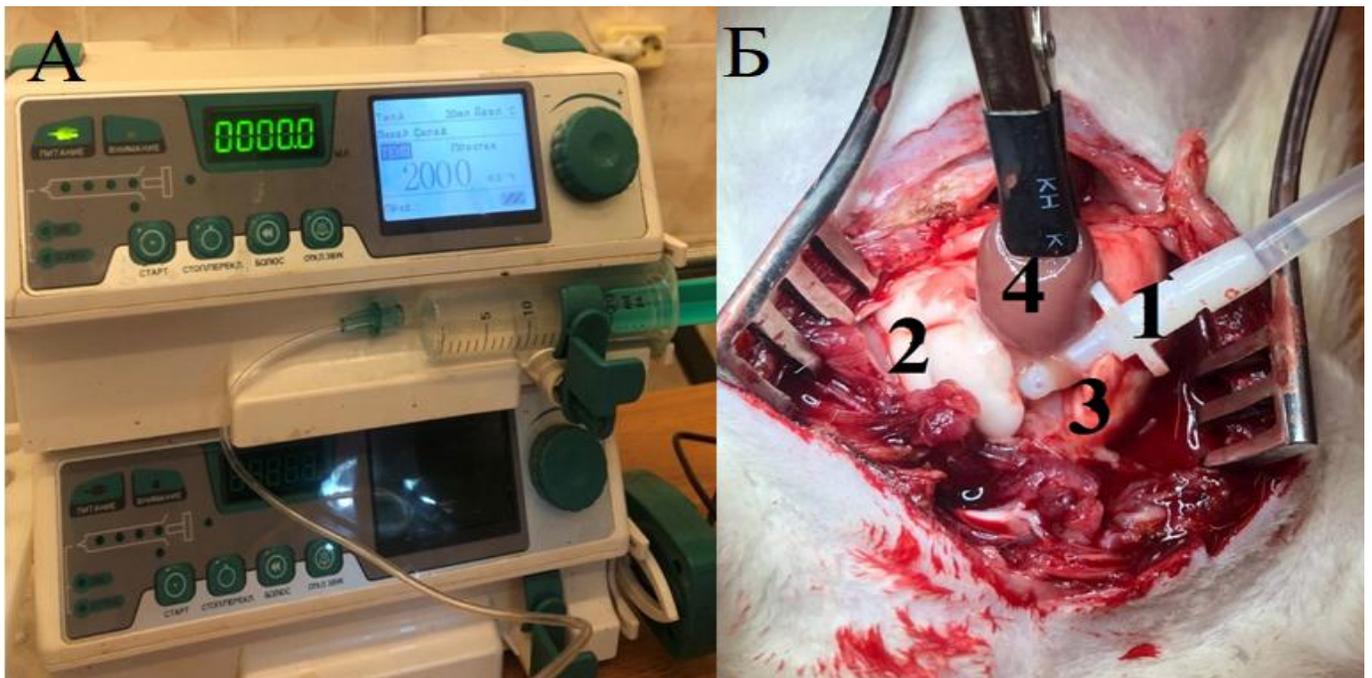


Рисунок 7 – Процесс консервации трансплантата легких: А – перфузор; Б – срединная стернотомия: 1 – канюля легочной артерии; 2 – левое легкое; 3 – правое легкое; 4 – сердце

Во время проведения консервации изменяли параметры искусственной вентиляции легких атмосферным воздухом: ЧД – 40/мин, $V_{\text{дых}}$ – 1,5 мл, $V_{\text{пот}}$ – 300 мл/мин, P_{peak} – 6 см.вод. ст., $PEEP$ – 3 см.вод.ст.. После проведения консервации трансплантата, диафрагму и верхнюю полую вену, связки легких и плевру пересекали, трансплантат переворачивали двумя ватными тампонами для выполнения задней диссекции, трахею сепарировали от пищевода и сосудов шеи

животного, трахею пережимали мягким зажимом, имплантировали и фиксировали перфузионную канюлю легочной артерии, транс вентрикулярно имплантировали канюлю левого предсердия, в трахею устанавливали вентиляционную канюлю (Рисунок 8).



Рисунок 8 – Имплантируемые канюли: 1 – канюля для легочной артерии; 2 – канюля для левого предсердия; 3 – трахеальная канюля

Трансплантат помещали в емкость с консервирующим раствором и хранили в течение 12 часов с соблюдением температурного режима 4–8°C. В момент консервации двулегочный трансплантат легких был раздут, воздушен, сосудистое русло равномерно отмыто.

2.3 Нормотермическая перфузия трансплантата легких с применением раствора Steen Solution и опытного раствора на основе декстрана-40

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 (рисунки 9, 10). Предварительно, экстракорпоральный контур заполняли перфузионным раствором (20 мл Steen Solution®) и нагревали до 25°C. С целью ликвидации вазоспазма на фоне гипотермии и в ответ на повышение температуры вводили Вазапран в дозировке 10 мкг. Для компенсации энергодефицита и адекватного транспорта глюкозы добавляли Инсулин Р 2 Ед. Чтобы снизить островоспалительную реакцию паренхимы ткани легких и сосудистой стенки в ответ на реперфузию вводили Метилпреднизолон 20 мг, с целью предупреждения бактериальной нагрузки – цефазолин 0,5 мг/мл. В зависимости от поставленных задач и выбора экспериментальной группы, в качестве адьюванта добавляли Пероксиредоксин-6 5 мг в сухом виде. По достижении температуры раствора 25°C при рециркуляции 10 мл/мин проводили контрольный анализ ионных показателей перфузата и измерение концентрации глюкозы в растворе. При получении удовлетворительных показателей, инициировали подключение трансплантата к перфузионному контуру.

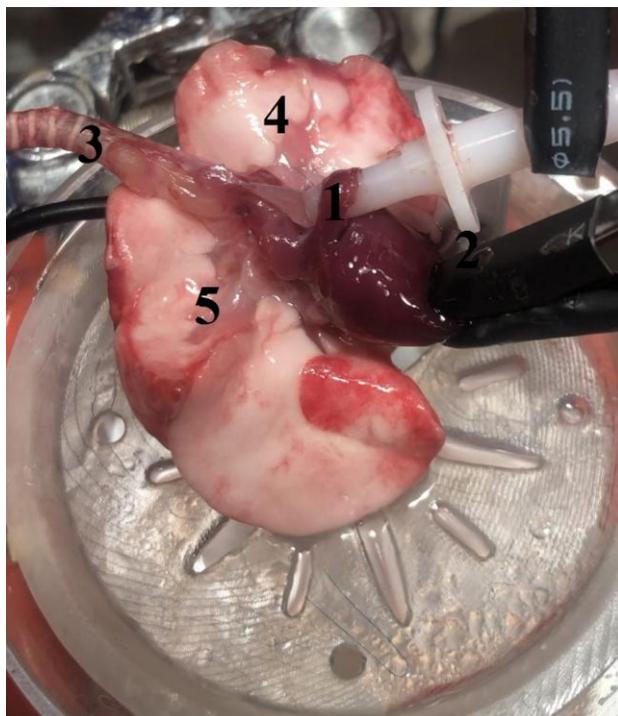


Рисунок 9 – Комплекс сердце-легкие во время ex vivo перфузии с применением Steen Solution. 1 – канюля легочной артерии; 2 – канюля левого предсердия; 3 – трахея; 4 – левое легкое; 5 – правое легкое

Заполнение перфузионного контура проводили 10 мл оригинального опытного раствора на основе декстрана-40, 12 мл цельной донорской крови. Для достижения удовлетворительного кислотно-основного и электролитного состава в качестве адьювантов использовали препараты: $MgSO_4$ 25% – 1 Ед, $CaCl_2$ 10% – 3 Ед, Глюкоза 40% – 4 Ед, $NaHCO_3$ 4,8% – 2 Ед, Вазапран – 10 мкг, Инсулин Р – 3 Ед, Метилпреднизолон – 20 мг, цефазолин – 0,5мг/мл, гепарин – 300 ЕД. В зависимости от поставленных задач и выбора экспериментальной группы, использовали как адьювант лиофилизат Prx6 – 5 мг.

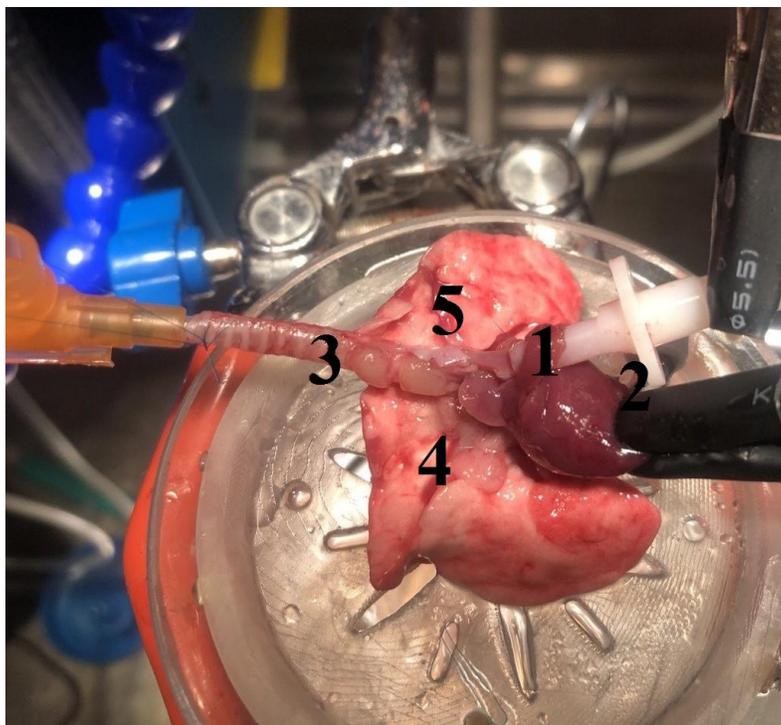


Рисунок 10 – Комплекс сердце-легкие во время ex vivo перфузии с применением опытного раствора на основе декстрана-40: 1 – канюля легочной артерии; 2 – канюля левого предсердия; 3 – трахея с интубационным катетером; 4 – правое легкое; 5 – левое легкое

По достижении температуры раствора 25 °С во время непрерывной рециркуляции проводили контрольный анализ крови с целью определения кислотно-основных, газового состава и электролитных показателей, а также концентрации глюкозы. Целевые показатели состава перфузионного раствора при соблюдении дозировок адъювантов составляли: pH – 7,55, HCO₃ – 20 ммоль/л, Glucose – 20 ммоль/л, Lactate < 2 ммоль/л, Hct < 25%, Na < 150 ммоль/л, K < 5 ммоль/л, Ca > 1,1 ммоль/л. Сравнительный состав двух перфузионных растворов представлен в таблице №2.

Таблица № 2 – Сравнительный состав перфузионных растворов для нормотермической машинной ex vivo перфузии легких

Показатель	Steen solution	Опытный раствор на основе декстрана-40
Декстран-40, г/л	5	50
Альбумин человеческий сывороточный, г/л	70	-
Хлорид натрия, ммоль/л	86	136,89
Хлорид калия, ммоль/л	4,6	10,23
Безводный сульфат магния, ммоль/л	-	0,82
Динатрийфосфат ангидрат, ммоль/л	-	0,33
Монофосфат калия, ммоль/л	-	0,46
Моногидрат глюкозы, ммоль/л	11	10,1
Бикарбонат натрия, ммоль/л	14	15
Дигидрат хлорида кальция, ммоль/л	1,5	1,5
Дигидрат дигидрогенфосфата натрия, ммоль/л	1,2	-
Гексагидрат дихлорида магния, ммоль/л	1,2	-
Коррекция pH 7,1 – 7,5	1 моль соляной кислоты	1 моль соляной кислоты
Теоретическая Осмолярность, мОсм	270 – 300	300 – 310

С целью дэаэрации, заполнение трансплантата выполняли ретроградно при скорости 1 мл/мин через канюлю в левом предсердии пассивно водным столбом до появления раствора в канюле легочной артерии и, соответственно, отсутствия пузырьков воздуха. Далее насос останавливали, перфузионную магистраль соединяли безвоздушно с канюлей в легочной артерии. 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. Расчет должной

100% скорости перфузии проводили на основе предполагаемой массы трансплантата легких, вычисляемой по уравнению $0,0053x$ (масса животного, г)-0,48, и выполняли расчет 6 мл/мин/грамм предполагаемой массы трансплантата легких.

Таблица 3 – Стандартные показатели во время проведения перфузии

Время, мин		0	5	10	15	20	25	30	35
Температура, °С		25	27	30	33	37	40	42	42
Скорость потока, %		15	20	30	50	70	85	100	100
Вентиляция	V, мл	0	0	0	0,8	1,1	1,2	1,3	1,4
	ЧДД	0	0	0	25	30	30	30	30
	PEEP	3	3	3	5	3	3	3	3

* V – дыхательный объем; ЧДД – частота дыхательных движений; PEEP – положительное давление в конце выдоха

Анализ газового и электролитного состава перфузата проводили до инициации перфузии трансплантата, далее через каждые 15 минут. Пробы отбирали одновременно из двух участков перфузионного контура – оттекающий перфузат из левого предсердия и циркулирующий перфузат из порта после оксигенатора. Сравнение двух полученных показателей концентрации кислорода и углекислого газа позволяли сделать вывод об эффективности перфузии и функциональном статусе трансплантата.

Эксперимент условно разделяли на две части: стадия реперфузии и стадия статического гомеостаза в условиях нормотермической машинной перфузии. Активную искусственную вентиляцию трансплантата легких инициировали спустя 15 минут после начала нормотермической машинной перфузии и при достижении температуры органа 33°C. В период реперфузии особое внимание уделяли постоянству показателей метаболической активности трансплантата легких, а также контролируемому приросту параметров перфузионного давления в легочной артерии, скорости потока, температуры, а за тем, и пикового давления на вдохе,

частоты дыхательных движений и дыхательного объема. С учетом времени регистрации параметров перфузии, рассчитывали сосудистое сопротивление в легких. Легочное сосудистое сопротивление рассчитывали по формуле

$$PVR = \frac{80 \times (PAP - WP)}{PAF} \quad (1),$$

где PVR – легочное сосудистое сопротивление,

PAP – давление в легочной артерии (mmHg),

WP – давление заклинивания легочных капилляров (mmHg), которое принималось как «0» из-за отсутствия сопротивления левого предсердия,

PAF – объем перфузии (мл/мин)

и выражали в единицах сосудистого сопротивления $\text{dyn} \times \text{s}/\text{cm}^{-5}$.

Длительность реперфузионной фазы составляла 30 минут, после данного временного интервала параметры перфузии достигали целевых показателей, наступала фаза плато, где требовался тщательный мониторинг постоянства температурного режима, метаболизма трансплантата и объемной скорости перфузии. При достижении 120 минут, выполняли контрольное исследование газового и ионного состава перфузионного раствора, останавливали машинную перфузию, ИВЛ продолжали, а в легочную артерию через перфузор с целью консервации подавали опытный раствор на основе декстрана-40 температурой 4°C и объемом 20 мл со скоростью 200 мл/час. Согласно протоколу научной работы, если превышались допустимые пределы мониторируемых показателей, эксперимент прекращался. При инициации процедуры консервации, отбирали пробы перфузата с целью оценки концентрации антиоксиданта Пероксиредоксина-6 и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, а далее помещали в морозильную камеру для хранения при -25°C. После процедуры консервации проводили диссекцию ворот трансплантата легких: выделяли и изолировали левый главный бронх, левую легочную артерию и левую легочную вену. Для выполнения гистологических и молекулярно-генетических исследований одни участки ткани правого легкого

фиксируют в растворе формальдегида и хранили при 4-8°C, другие не обрабатывали консервантом и хранили при -25 °C.

2.4 Газовый анализ перфузионного раствора и образцов крови

С целью анализа оксигенирующей функции легких согласно общепринятой методике отбирали две порции крови из венозной канюли (легочная артерия) и артериальной (левое предсердие). Анализ образцов проводили на газоанализаторе крови ABL 80 (версия BASIC Radiometer Medical ApS, Дания). Регистрировались основные биохимические показатели перфузионного раствора и крови животного-реципиента. Используя уравнение P_{aO_2}/F_{iO_2} (отношение парциального напряжения кислорода в крови к фракции кислорода на вдохе) для расчета индекса оксигенации. Полученные данные были перенесены на график в зависимости от временных точек, соответствующих периодам оценки трансплантата.

2.5 Морфологическое исследование

Гистологические и патоморфологические результаты проведенных исследований были предоставлены отделением патологоанатомическим ФГБУ «НМИЦ ТИО им. ак. В. И. Шумакова» Минздрава России (зав. отд. – д.м.н. Н.П. Можейко). По завершению перфузии фрагменты паренхимы правых легких фиксировали в 10% нейтральном забуференном растворе формальдегида (pH 7.4) не менее 24 часов. Спустя 2 часа после имплантации фрагменты паренхимы трансплантатов левых легких аналогично проходили процедуру фиксации в 10% формальдегиде. Для закрепления материала в парафиновые блоки использовали изопропиловый спирт и петролейный эфир. Парафиновые срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопический анализ проводили на

световом микроскопе Leica DM 750 (Leica, Германия) при окуляре 10, объективах 4, 10, 40 и 100. Фотосъемку проводили с помощью фотокамеры ICC50 (Leica, Германия).

Полученные срезы оценивал патологоанатом на предмет тромбоза сосудов, кровоизлияний, явлений развития интерстициального, альвеолярного отека, а также клеточной инфильтрации.

2.6 Изготовление раствора на основе декстрана-40

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.

2.7 Синтез пероксиредоксина-6

Рекомбинантный P_{гх6} получен сотрудниками (Шарапов М.Г., Гончаров Р.Г.) 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», 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».

2.8 Выделение РНК и синтез кДНК

Согласно инструкции производителя («Евроген», Россия), тотальную РНК из образцов легких (~100 мг) выделяли с помощью реагента ExtractRNA (раствор фенола и гуанидин-изотиоцианата). Полученную тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (DNase I) от New England Biolabs (США) для удаления возможных примесей геномной ДНК. Целостность тотальной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, в присутствии этидиум бромид (1 мкг/мл), по наличию полос рибосомальной РНК (28S и 18S). Концентрацию РНК оценивали спектрофотометрически (NanoDrop1000с, США), по поглощению на 260 нм. Соотношение поглощений 260нм/280нм для всех препаратов РНК составляло не менее 2.8, а поглощений 260нм/230нм ~ 1.8–2.2, что свидетельствует о высокой степени чистоты РНК и отсутствия белковых и низкомолекулярных контаминаций. Полученный раствор РНК обычно немедленно использовали для синтеза кДНК. Оставшуюся часть РНК хранили при – 80°C для повторных экспериментов.

Для обратной транскрипции была использована тотальная РНК (2 мкг), обратная транскриптаза M-MLV и стандартный праймер олиго-dT₁₅ («Евроген», Россия). Синтез кДНК проводили в соответствии с инструкцией производителя. Полученная в результате обратной транскрипции кДНК была использована в ПЦР в реальном времени для оценки изменения экспрессии генов.

2.9 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Согласно общепринятой методике, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили в амплификаторе DTrime3 («ДНК-Технология», Россия) с использованием ДНК-полимеразы HSTaq ДНК полимеразы («Евроген», Россия) и SYBR GreenII («BioDye», Россия) в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя, с использованием ген-специфических олигонуклеотидов в конечной концентрации 0,25 мкМ (Таблица 4).

Таблица 4 – Олигонуклеотиды, использованные для полимеразной цепной реакции в реальном времени

Ген	GenBank	Последовательность олигонуклеотида 5'→3'	Фрагмент (п.н.)
ACTB	NM_031144.3	F: CGGTCAGGTCATCACTATCGG R: CCACAGGATTCATACCCAGG	87
PRDX6	NM_053576.2	F: CGACGATAAGGACAGGGACCT R: GATGCTGTCAGCTGGAGGGAGT	207
NF-κB	NM_008689	F: CCACGCTCAGCTTGTGAGGGAT R: GGCCAAGTGCAGAGGTGTCTGAT	106
CASP-3	NM_009810	F: AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG R: GAAGAGTTTCGGCTTCCAG	145
Ki67	NM_001081117	F: ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT R: GCTCGCCTTGATGGTTCCT	104
IL-6	NM_031168	F: TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	76
MMP-9	NM_031055.1	F: TCTGCCTGCACCACTAAAGG R: TCGGCTCGAGTAGGACAGAA	104

Режим ПЦР был следующий: (1) “горячий старт” (для исключения неспецифического отжига праймеров) при 95°C, 5 мин, (2) денатурация при 95°C, 15 с, (3) отжиг праймеров при 60°C, 20 с, синтез ДНК при 72°C, 30 с + регистрация флуоресценции. Этапы 2–4 повторяли 45 раз. Для проверки специфичности ПЦР с интеркалирующим красителем SYBRGreenII, по окончанию реакции проводили плавление продукта и электрофорез в 2% агарозном геле. Нормирование проводили относительно гена цитоскелетного бета-актина (Actb). Расчет $\Delta\Delta Ct$ проводили по формуле $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Контроль}) - \Delta Ct (\text{опыт})$; каждое значение ΔCt рассчитывали по

формуле $\Delta C_t = C_t$ (исследуемый ген) – C_t (Actb). Статистическую достоверность измерений в уровне экспрессии генов определяли с помощью t-теста (с поправкой Бонферрони) и программного обеспечения Rest 2005 (v. 1.9.12).

2.10 Иммуноблоттинг

Электрофорез белков, экстрагированных из тканей легких, проводили по стандартной методике Лэммли в 10% полиакриамидном геле (ПААГ) в присутствии 0,1% додецилсульфата Na проводили. Белки из ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм Hybond-C («Amersham», США) с помощью прибора для полусухого переноса («Bio-Rad», США) в электродном буфере (25мМ Tris, 192 мМ глицин, 20% этанол) при силе тока не превышающей 2 мА/см², в течение 30-40 мин. Мембрану обратимо окрашивали 2% раствором Ponceau S (Sigma, США) на 7% уксусной кислоте и оценивали эффективность переноса белков из геля. Затем мембрану отмывали от Ponceau S и инкубировали в буфере для гибридизации – 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) на 1xPBS (1.7 мМ КН₂РО₄, 5.2 мМ Na₂НРО₄, 150мМ NaCl, pH 7.4) в течение 16 ч при 4°C, для предотвращения неспецифического связывания антител. Далее мембрану инкубировали в том же буфере для гибридизации с добавлением соответствующих первичных антител (β -Actin (#3700), «Cell Signaling Technology», США; Caspase-3 «Thermo Fisher Scientific», США) в разведении рекомендованным производителем, в течение 2 ч при 25°C. Затем мембрану трижды промывали буфером для отмывки (5% БСА на 1xPBS + 0.1% Твин-20) и инкубировали 1 час при 37°C в буфере с вторичными антителами кролика к иммуноглобулинам мыши (P-RAM Iss, «ИМТЭК», Россия), конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении рекомендованным производителем. После промывки мембраны, связавшиеся антитела детектировали с помощью диаминобензидина – DAB («Amresco», США). Денситометрический анализ мембран проводили с помощью программы ImageJ v.1.50 (National Institutes of Health, США).

2.11 Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка данных выполнялась с использованием лицензионной программы SAS Enterprise Guide 9.4. Все показатели проверялись на соответствие нормальному распределению (критерии Колмогорова, Шапиро-Уилка). Данные представлены как медиана и интерквартильный размах для непараметрических переменных (индекс оксигенации, легочное сосудистое сопротивление, давление в легочной артерии, лактат, глюкоза, буферные основания, пиковое давление на вдохе). Статистическую обработку полученных данных проводили методами непараметрической статистики: при сравнении зависимых выборок рассчитывали парный критерий Вилкоксона, для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна-Уитни или Краскал-Уоллиса. Направление и теснота корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивались с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Прогностическая модель, характеризующая зависимость количественной переменной от факторов, разрабатывалась с помощью метода линейной регрессии. Для всех критериев и тестов критический уровень значимости принимался равным 5%, т.е. нулевая гипотеза отвергалась при $p < 0,05$. Диаграммы размаха были построены в программе SAS Enterprise Guide 9.4.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все эксперименты в рамках работы были стандартизированы, а при нарушении протокола прекращалась дальнейшая регистрация параметров, биохимических данных, трансплантат исключался из наблюдения. Всего были использованы 131 самец крысы линии Wistar. В результате проведенного исследования из общего числа статистических наблюдений было исключено 11 экспериментальных случаев. В трех из них критериями исключения стали технические проблемы при реализации шовной техники имплантации левого донорского легкого, такие как сложность реализации и продолжительное время тепловой ишемии (более 90 минут), что привело к изменению тактики, отказу от шовной методики и внедрению kuff-метода. В двух случаях был отмечен хирургический дефект во время трансплантации донорских легких на этапе восстановления кровотока, что привело к неконтролируемому кровотечению и смерти лабораторного животного во время хирургического вмешательства. В одном случае развился гидростатический отек донорских легких во время нормотермической машинной перфузии *ex vivo* в следствии перегиба перфузионной магистрали.

3.1 Стенд для проведения нормотермической машинной перфузии *ex vivo* донорских легких крыс

Разработан комплексный малогабаритный стенд для проведения нормотермической машинной перфузии трансплантата легких крыс. Основная конструкция была представлена штативом, на который закреплялись компоненты экстракорпорального контура [18].

Трансплантат легких помещали в специальный функциональный контейнер – купол, состоящий из 3 частей, разработанный как 3Д-модель и напечатанный на принтере (модель) из фотополимерного материала. Конструкция купола, несмотря на малый размер (30 мм – глубина, 45 мм – высота, 65 мм – диаметр), обеспечивала полную функциональность, аналогичную полноразмерному медицинскому изделию компании XVIVO [6].

На рисунке 11 представлен контейнер – купол для позиционирования трансплантата легких у крыс для проведения нормотермической машинной перфузии *ex vivo*.

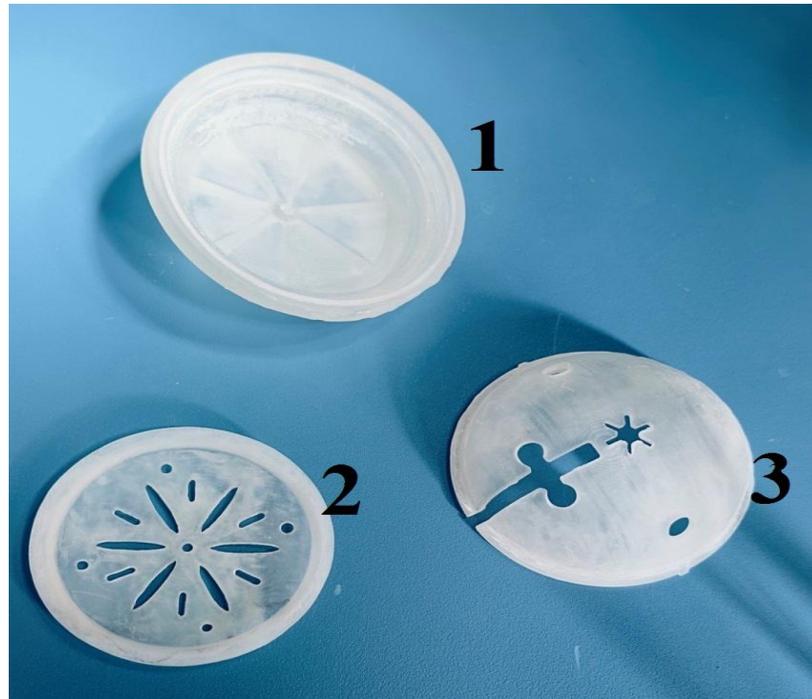


Рисунок 11 – Контейнер – купол для позиционирования трансплантата легких у крыс для проведения нормотермической машинной перфузии *ex vivo*: 1 – основание с отверстием для эвакуации раствора; 2 – планшет для позиционирования трансплантата; 3 – крышка купола

Вентиляцию трансплантата легких проводили в специально подобранных параметрах аппаратом SAR-830/AP Ventilator, США. Далее органный контейнер соединяли с нагревательной колбой. Герметичную пластиковую емкость погружали в термоустойчивый лабораторный стакан, наполненный дистиллированной водой и

помещенный на нагревательное устройство (ХМТЕ – 205, Китай) с погруженным термодатчиком для соблюдения корректного температурного режима. Теплообменную колбу системой магистралей соединяли с шаговым роликовым насосом (КСМ-S403-ODMA, Китай), который последовательно подключали к специально разработанному оксигенатору. Оксигенатор системой магистралей соединяли с колбой, выполняющей роль воздушной ловушки, а далее проводили коннекцию контура с канюлей, устанавливаемой в легочную артерию трансплантата. В магистрале перед выходом в канюлю легочной артерии имплантировали порт для измерения давления аппаратом Ангиотон (Биософт-М, Россия).



Рисунок 12 – Стенд для проведения нормотермической машинной перфузии донорских легких крыс, общий вид

На рисунке 13 представлен стенд для нормотермической перфузии легких *ex vivo* у крыс.

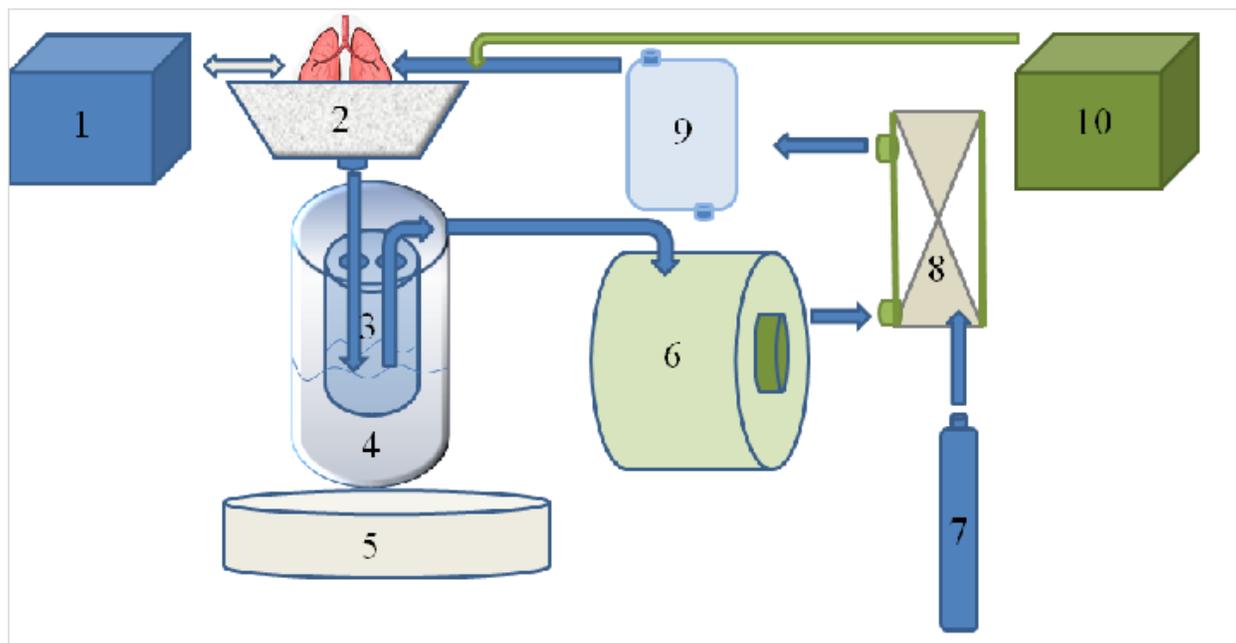


Рисунок 13 - Стенд для нормотермической перфузии легких у крыс *ex vivo*:
1 – аппарат ИВЛ; 2 – контейнер для позиционирования трансплантата легких с имплантированным термодатчиком; 3 – резервуар; 4 – теплообменная колба; 5 – нагревательное устройство; 6 – шаговый роликовый насос; 7 – баллон с деоксигенирующей 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, изображенный на рисунке 14.

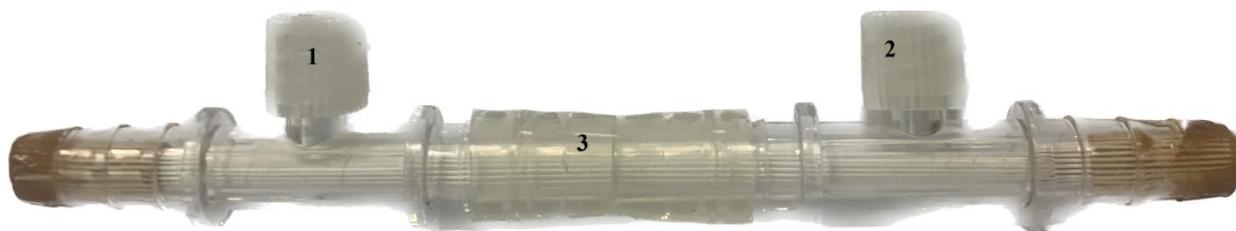


Рисунок 14 – Лабораторный малообъемный оксигенатор: 1 – входной люэр-порт; 2 – выходной люэр-порт; 3 – корпус оксигенатора

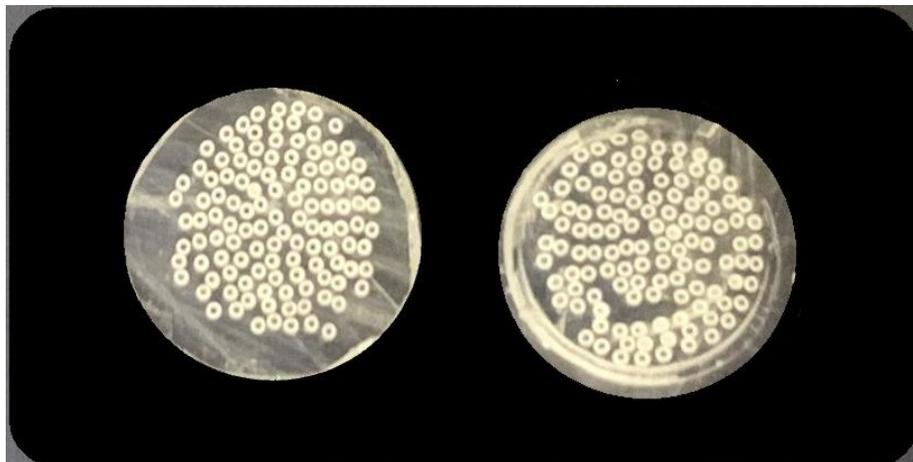


Рисунок 15 – Изображение поперечного микроскопического среза волокон лабораторного оксигенатора

Суть разработки заключалась в создании принципиально нового изделия для лабораторного использования. В качестве основы, газотранспортной мембраны, использовали полотно зарегистрированного медицинского изделия мембранного оксигенатора для процедуры ЭКМО (Hilite® 7000LT, Германия) (рисунок 15). После вскрытия основной колбы, извлекали мембрану и разматывали. Заготавливали участки полотна размером до 0,8 м². Далее полотно с двух противоположных концов обрабатывали биосовместимым медицинским клеем (Сульфакрилат, Россия) с внутренней и наружной сторон, скручивали, формировали стержень и помещали в тепловоздушный шкаф на 12 часов при температуре 37°С. Следующим этапом мембранный стержень имплантировали в соединенные между собой люэр-порты диаметром 1/4", с целью герметичности места соприкосновения мембраны и дистальных концов люэр-портов обрабатывали медицинским клеем, а готовую конструкцию помещали в термостат на 12 часов при температуре 37 °С. После истечения времени экспозиции на лабораторных оксигенаторах проводили испытания на герметичность с использованием дистиллированной стерильной воды с последующей газовой стерилизацией.

3.2 Доказательство эффективности опытного раствора на основе декстрана-40 в сравнении с аналогами без антиоксидантной защиты и с применением пероксиредоксина-6

3.2.1 Динамика изменения газового состава во время ex vivo перфузии

Сравнение групп 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. В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP индекс PaO_2/FiO_2 (индекс оксигенации) составил 498 [460; 537], в группе №2 EVLP индекс оксигенации (ИО) составил 518 [483; 553].

Спустя 15 минут, в четвертой временной точке 30 минут отмечалось снижение индекса оксигенации в обеих группах, что свидетельствовало об активном процессе реперфузии, так как при инициации ИВЛ происходило наполнение периферических сосудов и микроциркуляторного русла. В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP ИО составил 442 [386; 499], в группе №2 EVLP ИО составил 426 [382; 470].

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP ИО составил 409 [377; 441], в группе №2 EVLP ИО составил 420 [390; 450].

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP ИО составил 389 [350; 429], в группе №2 EVLP ИО составил 427 [405; 448].

В седьмой временной точке 120 минут в группе №1 EVLP индекс ИО составил 394 [373; 416], в группе №2 EVLP индекс ИО составил 434 [422; 447]. Графическое изображение индекса PaO_2/FiO_2 (ИО) представлено на рисунке 16.

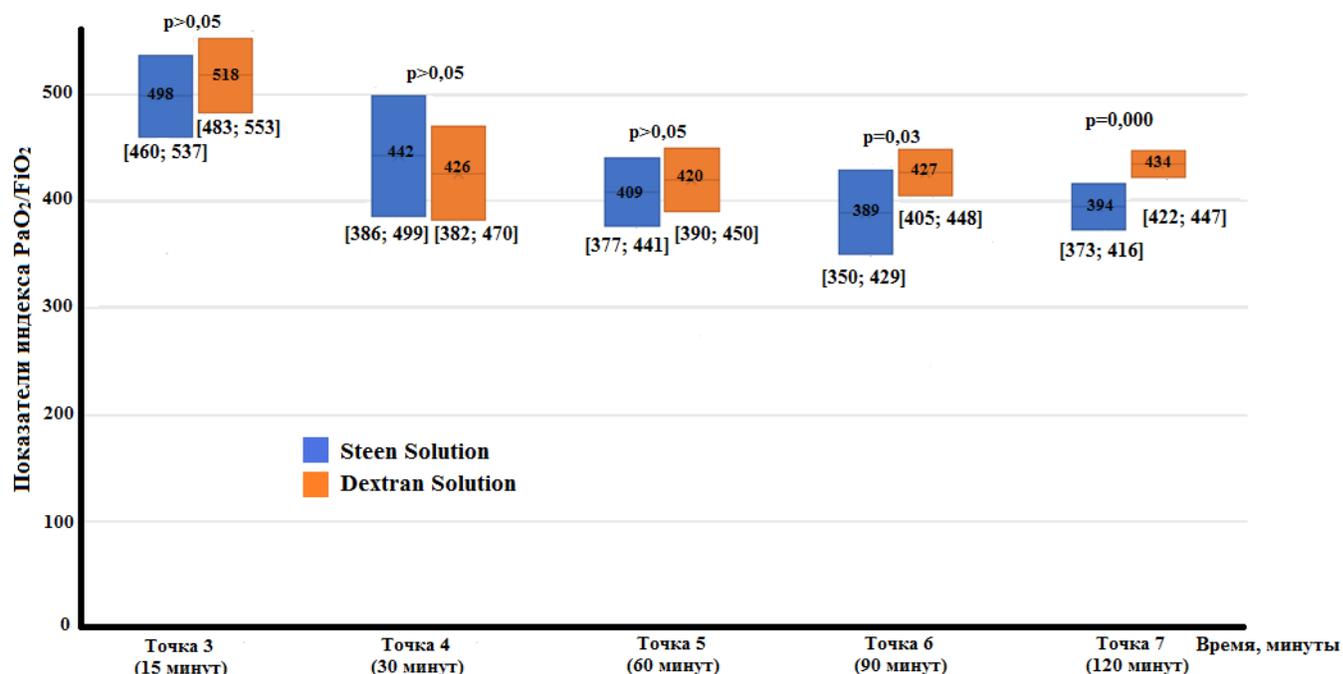


Рисунок 16 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran-40 Solution: точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p<0,05$

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP ИО составил 511 [449; 572], в группе №4 EVLP ИО составил 569 [491; 647].

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP ИО составил 500 [451; 549], в группе №4 EVLP ИО составил 548 [479; 616].

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP ИО составил 500 [457; 543], в группе №4 EVLP ИО составил 546 [496; 567].

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP ИО составил 482 [451; 513], в группе №4 EVLP ИО составил 532 [496; 567].

В седьмой временной точке 120 минут в группе №3 EVLP ИО составил 475 [446; 504], в группе №4 EVLP ИО составил 532 [503; 561]. Графическое изображение

индекса оксигенации представлено на рисунке 17.

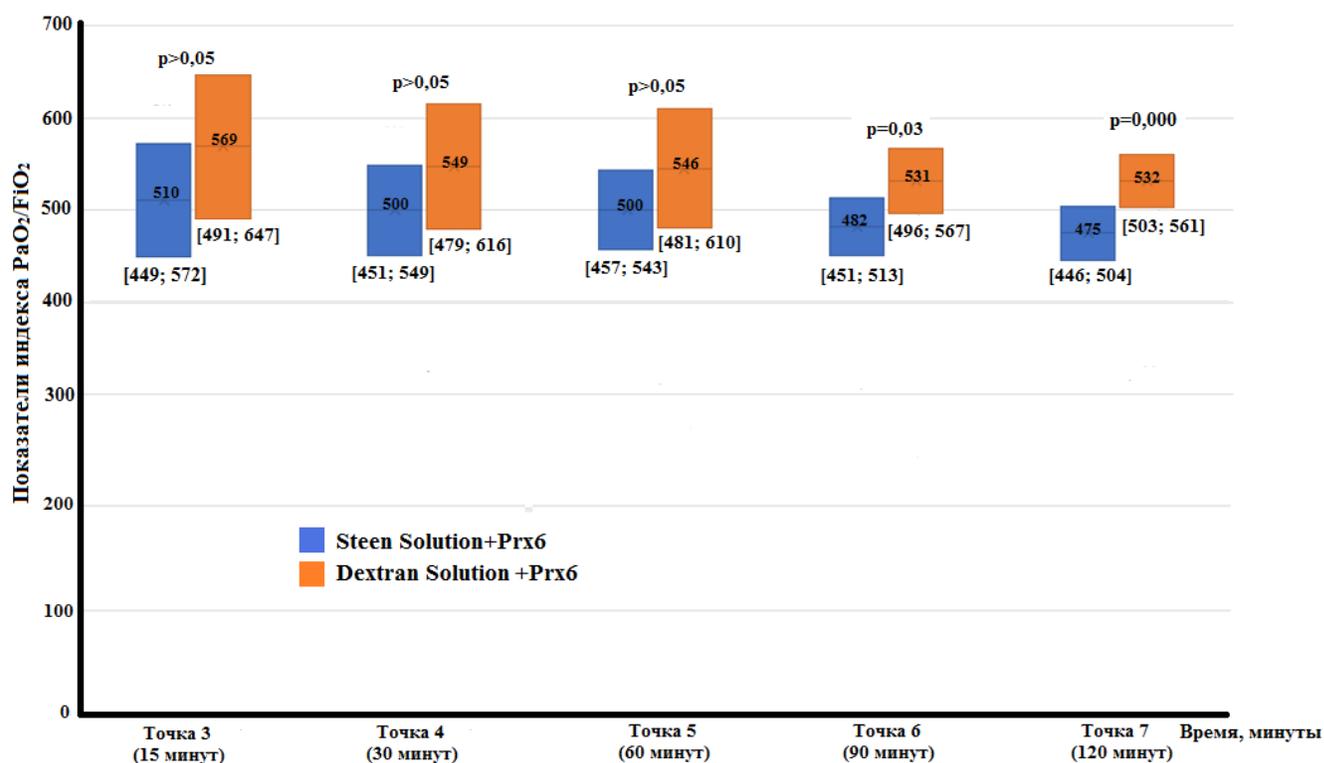


Рисунок 17 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 во время процедуры EVLP в группах Steen Solution + Prx6 и Dextran-40 Solution + Prx6: точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP
Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p<0,05$

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 ИО, 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 экспериментальных группах №3 и №4. Несмотря на отсутствие достоверной разницы при сравнении показателей в начале процедуры, различия показателей во всех группах в исходе нормотермической машинной перфузии были статистически значимы.

3.2.2 Анализ параметров вентиляции во время нормотермической машинной ex vivo перфузии

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Первоначальные показатели пикового давления на вдохе (P_{peak} , см.вод.ст.) в первой и второй временных точках во всех группах соответствовали установленному давлению конца выдоха РЕЕР, см.вод.ст. и составляли 3 см.вод.ст. Данные заданные параметры были установлены условиями проведения исследования.

В третьей временной точке 15 минут после инициации ИВЛ в группе №1 EVLP значения пикового давления на вдохе (P_{peak})(ПД) составили 12 [9,6; 14,4] см.вод.ст., в группе №2 EVLP значения ПД составили 7,7 [6,2; 9,2] см.вод.ст..

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP значения ПД составили 9,6 [7,6; 11,1] см.вод.ст., в группе №2 EVLP значения ПД составили 5,2 [3,7; 6,7] см.вод.ст..

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP показатели ПД составили 8,8 [6,4; 11,2] см.вод.ст., в группе №2 EVLP ПД составили 5,3 [3,7; 7] см.вод.ст..

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP показатели ПД составили 9,2 [7,5; 10,9] см.вод.ст., в группе №2 EVLP показатели ПД составили 5,6 [4,8; 6,4] см.вод.ст..

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №1 EVLP показатели ПД составили 9,6 [7,1; 12,1] см.вод.ст., в группе №2 EVLP показатели ПД составили 4,9 [3,9; 6,0] см.вод.ст.. Графическое изображение изменений пикового давления на входе двух групп представлено на рисунке 18.

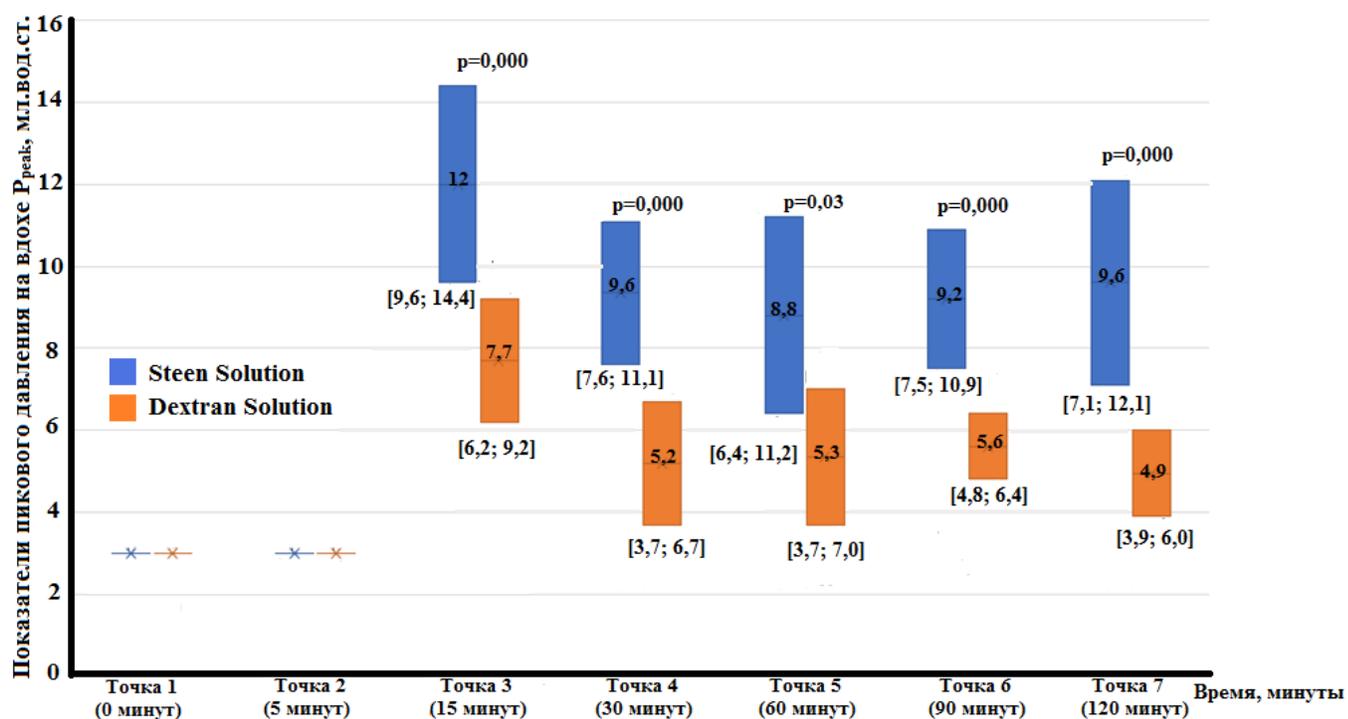


Рисунок 18 – Сравнительный анализ медиан показателей пикового давления на входе P_{peak} во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran-40 Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

Также как и в предыдущих двух группах, группы Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 в первых двух точках измерения имели статичные параметры пикового давления на вдохе во время EVLP, равные 3 см.вод.ст.

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP значения ПД составили 9,6 [8,1; 11,1] см.вод.ст., в группе №4 EVLP значения ПД составили 6,2 [5,0; 7,4] см.вод.ст.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP значения ПД составили 9 [8,0; 10,1] см.вод.ст., в группе №4 EVLP значения ПД составили 4,7 [3,5; 6,0] см.вод.ст. Прогрессивное снижение показателей пикового давления на вдохе обуславливалось рекрутированием ателектазированных участков легочной паренхимы, которые были сформированы в периоде отсутствия активной ИВЛ.

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP показатели ПД составили 9,3 [6,9; 11,8] см.вод.ст., в группе №4 EVLP показатели ПД составили 4 см.вод.ст.

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP показатели ПД составили 8,8 [7,8; 9,8] см.вод.ст., в группе №4 EVLP показатели ПД составили 4 см.вод.ст.

В седьмой, конечной временной точке 120 в группе №3 EVLP показатели ПД составили 9,5 [8,6; 10,4] см.вод.ст., в группе №4 EVLP показатели ПД составили 4 см.вод.ст.. Графическое изображение тенденции изменения пикового давления на вдохе в двух группах представлено на рисунке 19.

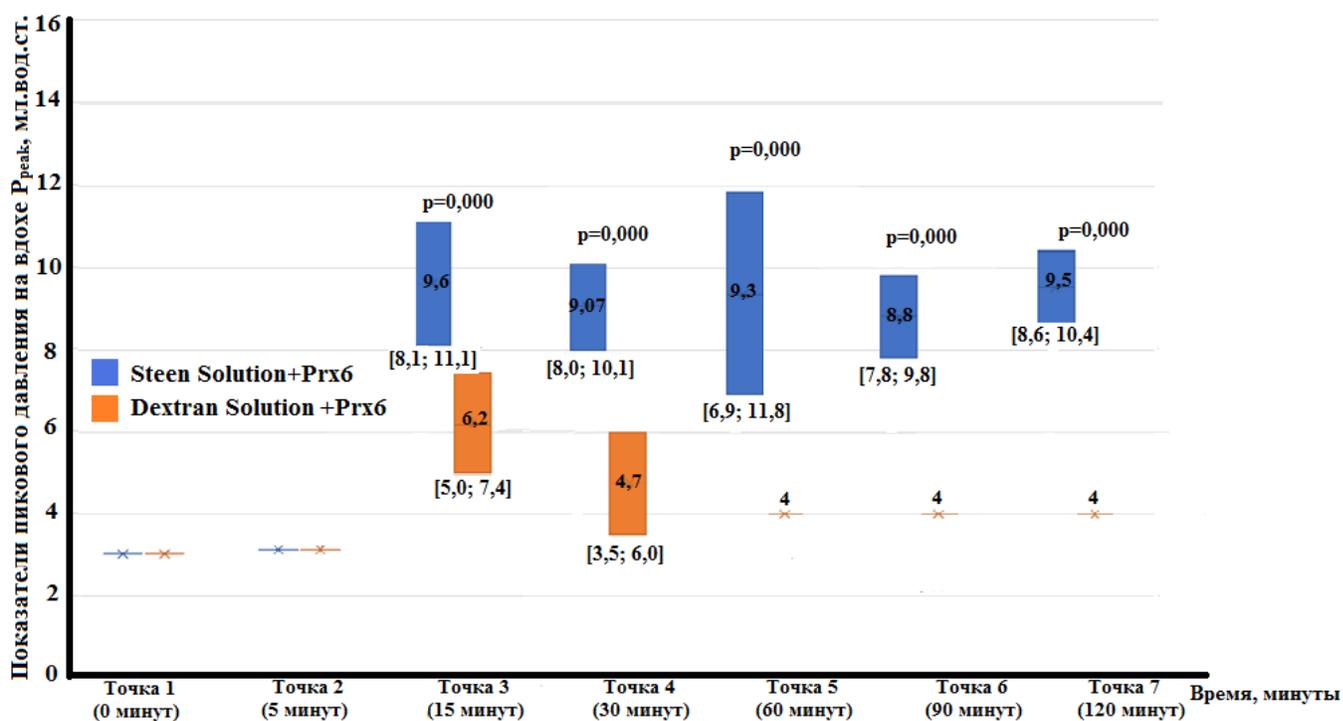


Рисунок 19 – Сравнительный анализ медиан показателей пикового давления на вдохе P_{peak} во время процедуры EVLP в группах Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP
Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

Параметры ИВЛ в каждой временной точке были статичны и устанавливались согласно условиям проведения исследования. В третьей временной точке $V_{дых}$ – 0,8 мл, РЕЕР – 5 см.вод.ст., в четвертой временной точке $V_{дых}$ – 1,3 мл, РЕЕР – 2 см.вод.ст., в пятой, шестой и седьмой временных точках $V_{дых}$ – 1,4 мл, РЕЕР – 2 см.вод.ст. Динамическое изменение значений пикового давления на вдохе во всех группах было связано с реологическими свойствами перфузионного раствора. Отмечалось, что использование раствора на основе декстрана-40 с добавлением препаратов крови положительно влияло на показатели респираторной механики трансплантата. Неизменность кривой данного показателя в группе 4 была

обусловлена не только перфузатом, но и добавлением Prx6, что повышало антиоксидантную защиту и снижало степень интенсивности реперфузионных осложнений. После выполнения измерений процедура EVLP прекращалась, выполнялась фармако-холодовая консервация донорских легких.

3.2.3 Динамика показателей лактата во время процедуры нормотермической машинной ex vivo перфузии

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

В первой временной точке 0 минут при сравнении Steen Solution и Dextran Solution в группе №1 EVLP показатели лактата составили 1,4 [1; 1,9] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 1,4 [1,1; 1,8] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 2,9 [2,2; 3,7] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 4 [3,7; 4,3] ммоль/л.

В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 4,3 [3,5; 5,1] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 5,5 [4,9; 6,0] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 5,2 [4,6; 5,8] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 6,3 [6,0; 6,6] ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 6,4 [5,4; 7,4] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 6,9 [6,6; 7,2] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 7,2 [6,5; 7,9] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 7,3 [7,1; 7,4] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №1 EVLP показатели лактата составили 7,9 [7,2; 8,5] ммоль/л, в группе №2 EVLP показатели лактата составили 7,5 [7,3; 7,7] ммоль/л. Графическое изображение изменения показателей лактата в первых двух группах представлено на рисунке 20.

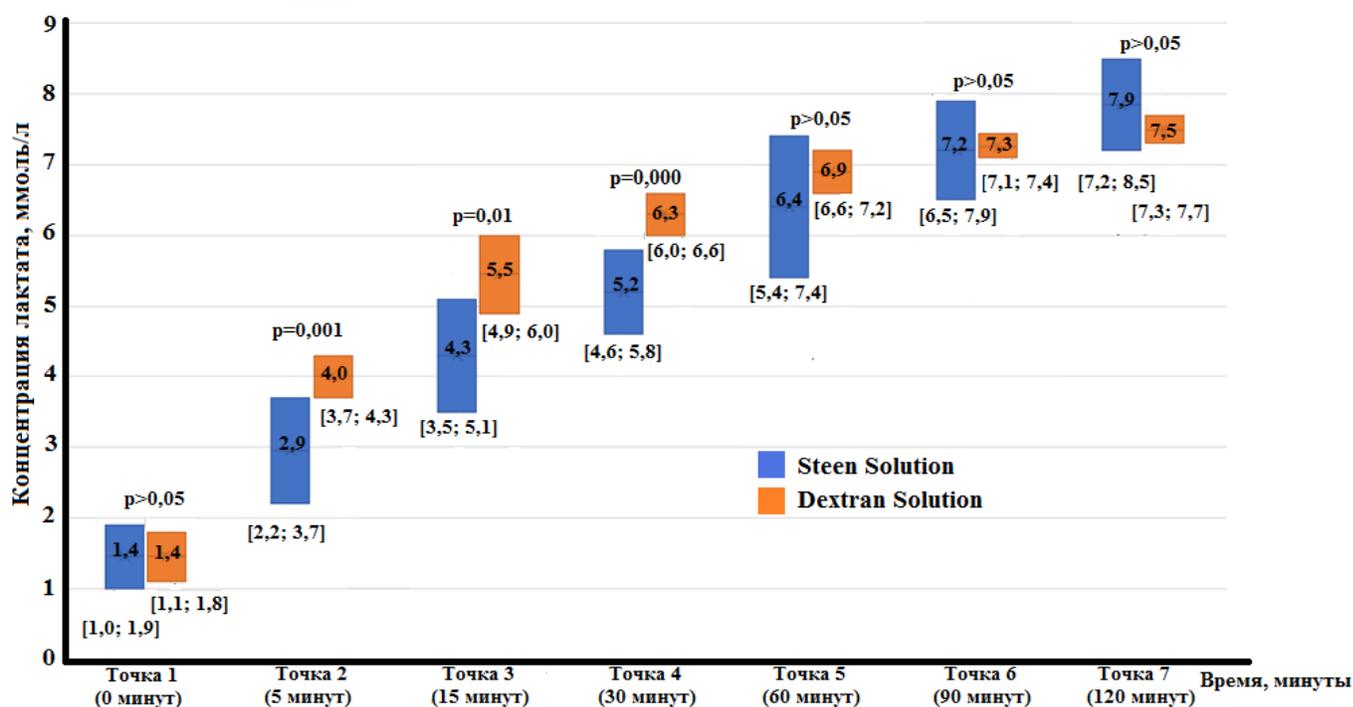


Рисунок 20 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

При сравнении Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 в первой временной точке 0 минут, в группе №3 EVLP показатели лактата составили 1,3 [1,1; 1,6] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 1,3 [1; 1,6] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 2,7 [2,4; 2,9] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 2,5 [2,3; 2,7] ммоль/л. Во всех группах наблюдается тенденция к приросту значений лактата, что соответствует активному процессу реперфузии.

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 3,9 [3,8; 4,1] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 2,8 [2,0; 3,7] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 4,7 [4,5; 4,9] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 3,6 [3,3; 3,8] ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 5,5 [5,2; 5,7] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 4,1 [3,7; 4,4] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 6,3 [6,1; 6,6] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 4,5 [4,3; 4,8] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №3 EVLP показатели лактата составили 6,7 [6,6; 7] ммоль/л, в группе №4 EVLP показатели лактата составили 4,9 [4,6; 5,1] ммоль/л. Динамика изменений показателей лактата во время процедуры EVLP в двух группах графически представлена на рисунке 21.

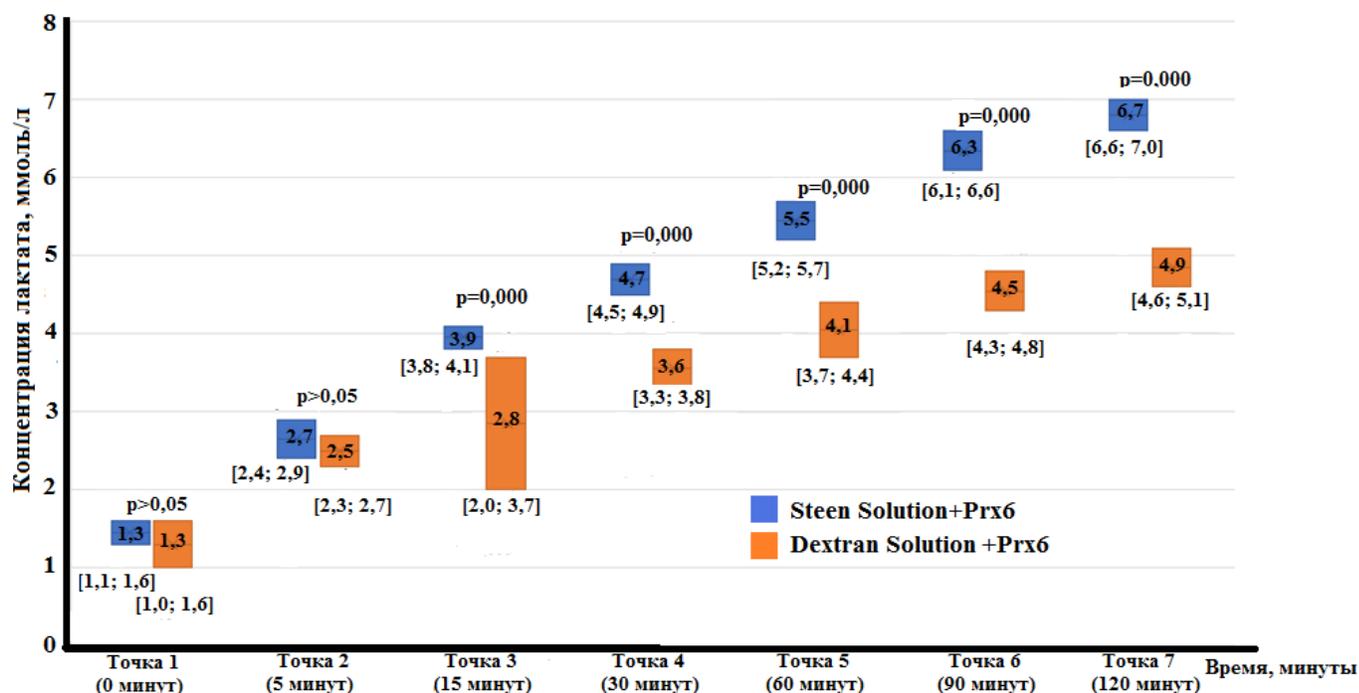


Рисунок 21 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата во время процедуры EVLP в группах Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

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.

3.2.4 Темп утилизации глюкозы во время нормотермической машинной ex vivo перфузии

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Исходные показатели глюкозы различались в группах с раствором на основе декстрана-40 и группах с раствором Steen Solution из-за различного состава данного компонента. В первой временной точке 0 минут при сравнении Steen Solution и Dextran Solution в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 12,1 [11,7; 12,5] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 19,9 [19,7; 20,0] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 11,7 [11,2; 12,1] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 19,5 [19,3; 19,7] ммоль/л.

В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 11 [10,3; 11,7], в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 18,7 [18,3; 19,2] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 10,2 [9,2; 11,1] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 18,1 [17,5; 18,6] ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 9,4 [8,2; 10,5] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 17,4 [16,8; 18,1] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 8,6 [7,2; 9,9] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 16,7 [16,2; 17,3] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №1 EVLP значения глюкозы составили 8,1 [6,6; 9,6] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения глюкозы составили 16,2 [15,6; 16,7] ммоль/л. Тенденция утилизации глюкозы в двух первых группах представлена на рисунке 22.

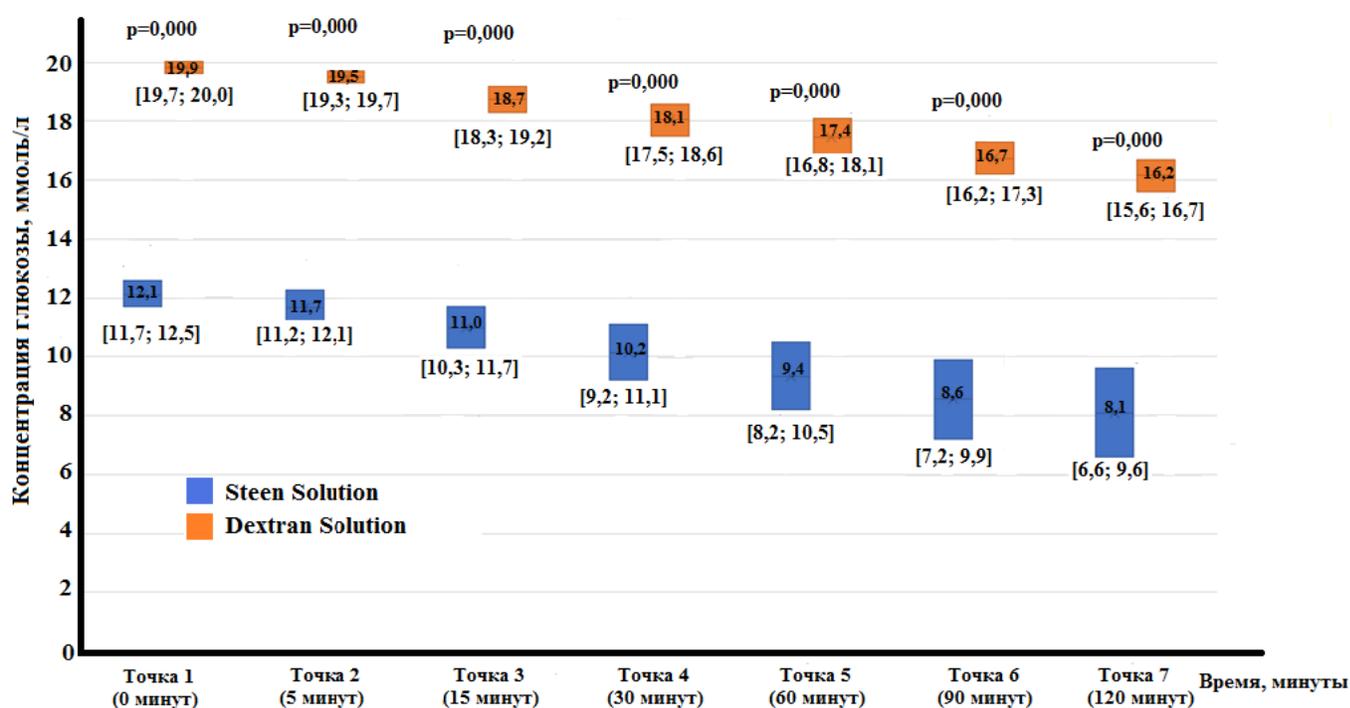


Рисунок 22 – Сравнительный анализ медиан показателей глюкозы во время процедуры EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В первой временной точке 0 минут при сравнении Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 12,1 [11,9; 12,2] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 19,9 [19,8; 20,1] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 11,8 [11,6; 11,9] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 19,1 [18,3; 19,9] ммоль/л.

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 10,8 [10,4; 11,1], в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 18,3 [17,7; 18,9] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 10,2 [9,8; 10,5] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 17,6 [17,0; 18,3] ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 9,7 [9,3; 10,0] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 17,0 [16,4; 17,6] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 9,3 [9; 9,7] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 16,4 [15,8; 16,9] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №3 EVLP значения глюкозы составили 9,1 [8,8; 9,5] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения глюкозы составили 15,9 [15,4; 16,3] ммоль/л. Графическое изображение изменения значений глюкозы в двух группах представлено на рисунке 23.

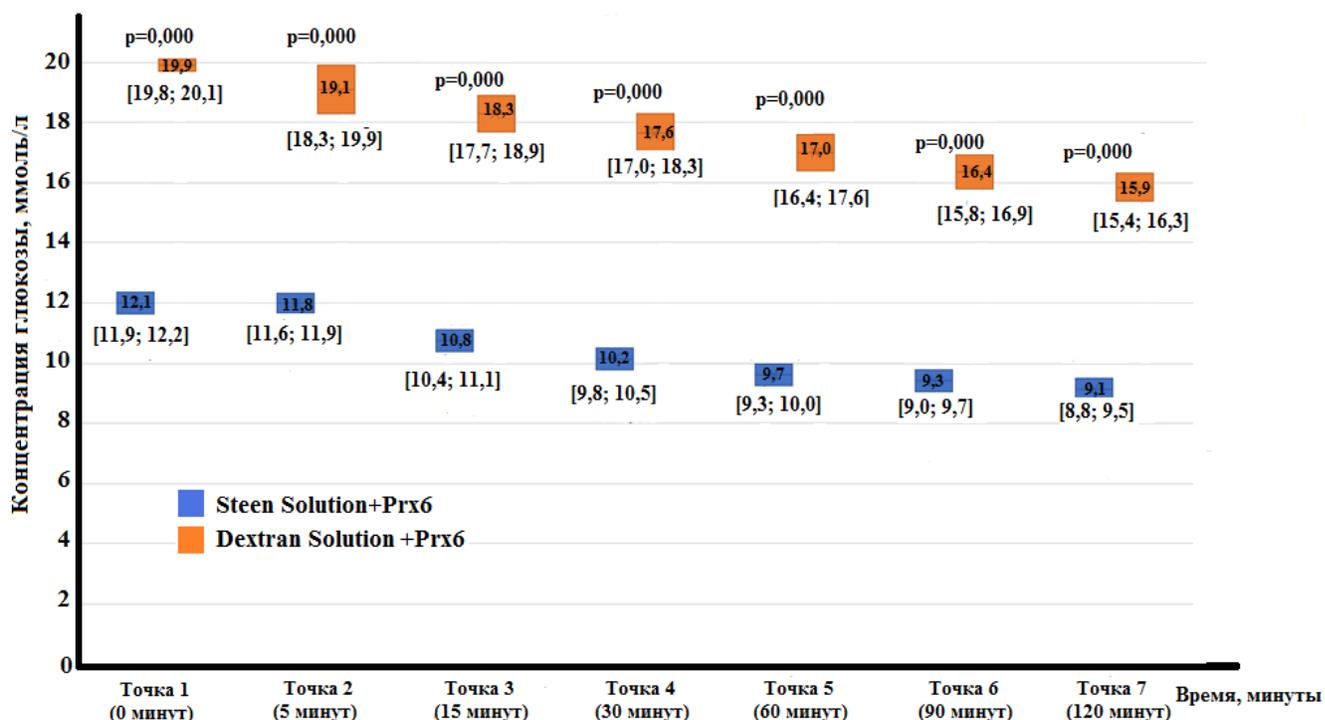


Рисунок 23 – Сравнительный анализ показателей глюкозы во время процедуры EVLP в группах Steen Solution+Prx6 и Dextran Solution+Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

Тенденция утилизации глюкозы являлась индикатором восполнения энергетической задолженности, сформированной в периоде фармако-холодовой консервации донорских легких. Потребление глюкозы во время нормотермической машинной перфузии отображало степень выраженности реперфузионного повреждения.

3.2.5 Темп утилизации буферных оснований во время нормотермической машинной *ex vivo* перфузии

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Начальные показатели гидрокарбонатных анионов в праймовом растворе различались из-за исходных различий в составе перфузионных растворов. В первой временной точке 0 минут при сравнении Steen Solution и Dextran Solution в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 10,1 [9,9; 10,4] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14,9 [14,8; 15,1] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 9,6 [9,1; 10,1] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14,7 [14,5; 14,9] ммоль/л.

В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 8,8 [8; 9,6] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14,5 [14,3; 14,7] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 8 [7,3; 8,6] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14,3 [14,3; 14,5] ммоль/л. ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 7,2 [6,3; 7,9] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14,2 [14; 14,4] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 6,5 [5,5; 7,4] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения HCO_3^- составили 14 [13,9; 14,1] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №1 EVLP значения HCO_3^- составили 6,1 [5,2; 6,9] ммоль/л, в группе №2 EVLP значения

HCO_3^- составили 13,9 [13,7; 14,0] ммоль/л. Темп утилизации бикарбонатных оснований при сравнении Steen Solution и Dextran Solution представлен на рисунке 24.

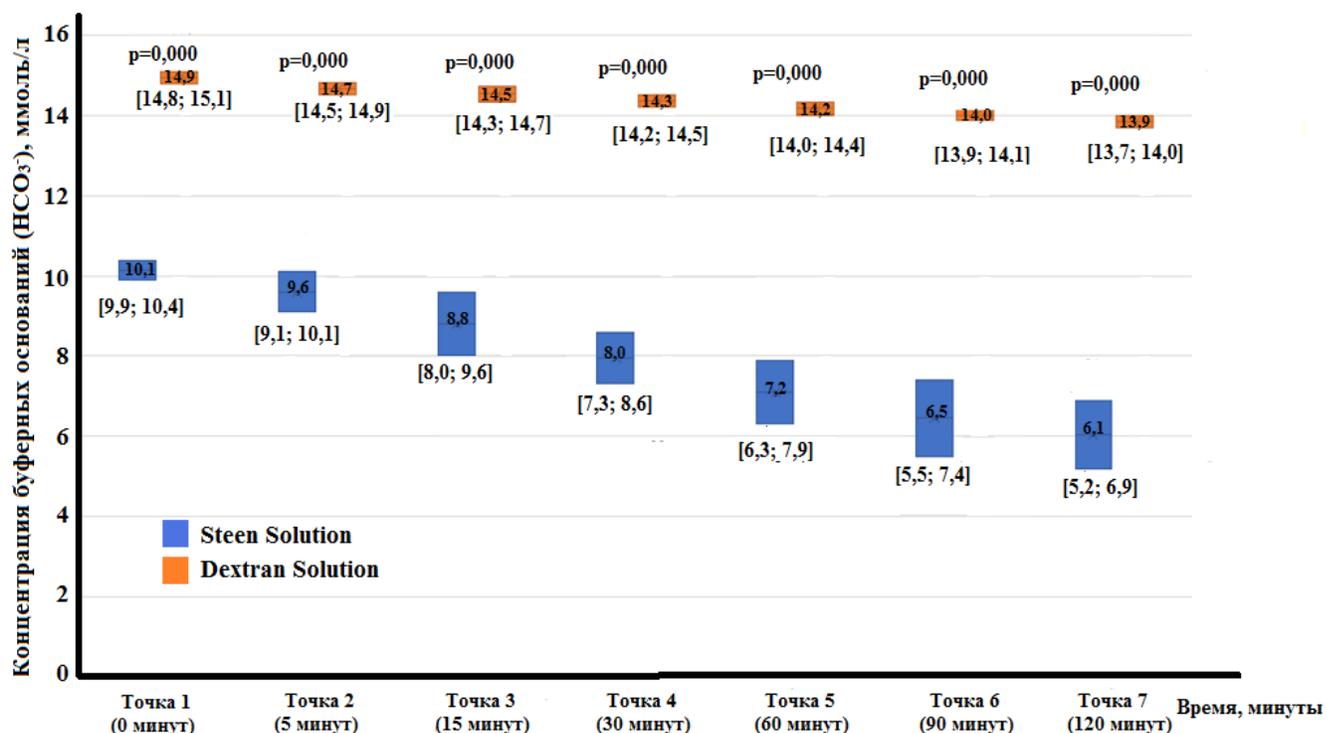


Рисунок 24 – Сравнительный анализ медиан уровней концентрации буферных оснований (HCO_3^-) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В первой временной точке 0 минут при сравнении Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 10,1 [9,9; 10,2] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 15 [14,9; 15,1] ммоль/л.

Во второй временной точке 5 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 9,7 [9,6; 9,8] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14,8 [14,7; 14,9] ммоль/л.

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 9,2 [9,1; 9,3] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14,7 [14,5; 14,8] ммоль/л.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 8,6 [8,4; 9,0] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14,5 [14,4; 14,6] ммоль/л.

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 8,2 [8; 8,4] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14,3 [14; 14,4] ммоль/л.

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 7,7 [7,4; 7,9] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14,1 [14; 14,3] ммоль/л.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №3 EVLP значения HCO_3^- составили 7,4 [7,1; 7,6] ммоль/л, в группе №4 EVLP значения HCO_3^- составили 14 [13,8; 14,1] ммоль/л. Динамика изменений значений HCO_3^- графически изображена на рисунке 25.

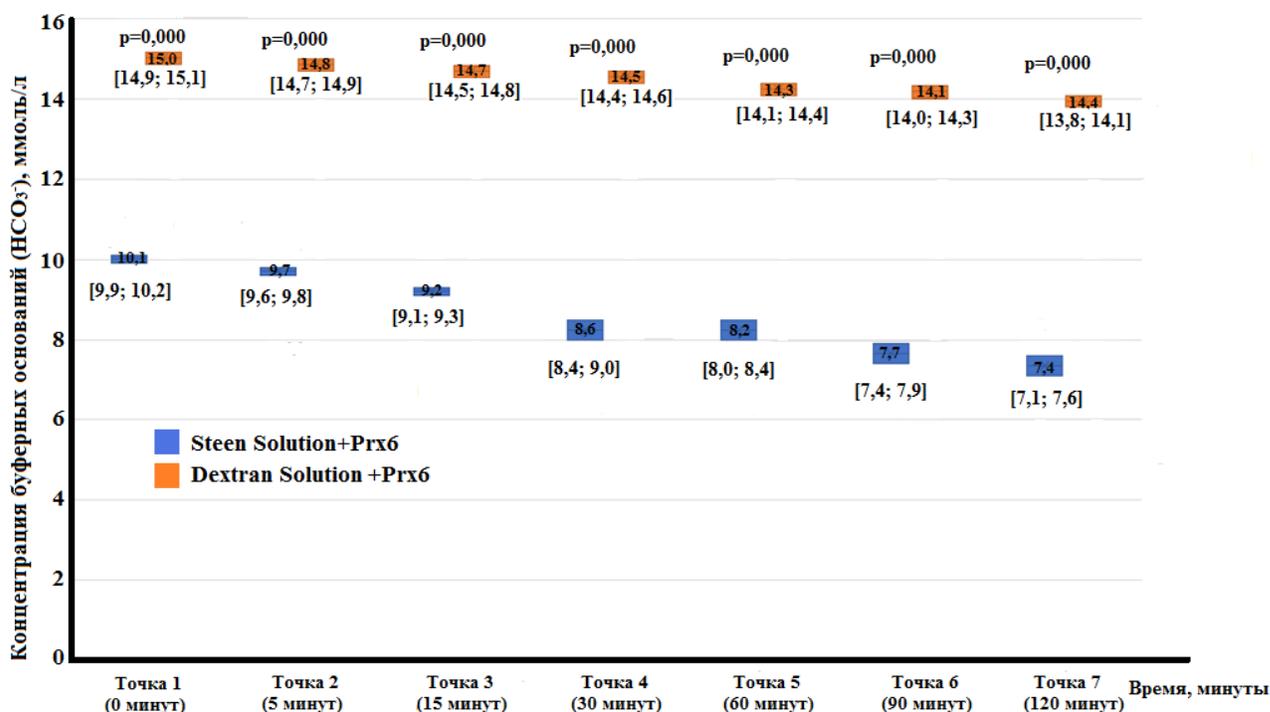


Рисунок 25 – Сравнительный анализ медиан уровней концентрации буферных оснований (HCO_3^-) во время EVLP в группах Steen Solution+Prx6 и Dextran Solution+Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

Изменения буферных оснований один из важнейших критериев, отражающих гомеостаз и физиологичность нормотермической перфузии донорских легких. Было отмечено, что темп утилизации гидрокарбонатных анионов согласовывался с функциональным статусом трансплантата и являлся косвенным признаком интенсивности реперфузионной реакции в процессе EVLP.

3.2.6 Анализ гемодинамических параметров во время нормотермической машинной *ex vivo* перфузии

3.2.6.1 Анализ показателей давления в легочной артерии

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

При инициации процедуры EVLP в первой временной точке 0 минут в группе №1 EVLP давление в легочной артерии (РАР) (ДЛА) составило 9,1 [7,7; 10,4] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 4,5 [3,3; 5,6] мм.рт.ст..

При проведении процедуры EVLP во второй временной точке 5 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 8,7 [7,4; 9,9] мм.рт.ст., в группе №2 ДЛА составило 4,5 [3,3; 5,7] мм.рт.ст..

В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 9,1 [7,8; 10,5] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 4 [3,2; 4,8] мм.рт.ст..

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 8,8 [7,4; 10,2] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 3,9 [2,9; 5] мм.рт.ст..

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 7,9 [6,6; 9,3] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 3,8 [3,1; 4,5] мм.рт.ст..

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 8,9 [7,4; 10,5] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 3,9 [3,1; 4,6] мм.рт.ст..

В заключительной, седьмой временной точке 120 минут в группе №1 EVLP ДЛА составило 8,5 [7,2; 9,8] мм.рт.ст., в группе №2 EVLP ДЛА составило 3,4 [2,9; 3,9] мм.рт.ст.. Графическое изображение тенденции изменения давления в легочной артерии в двух группах представлено на рисунке 26.

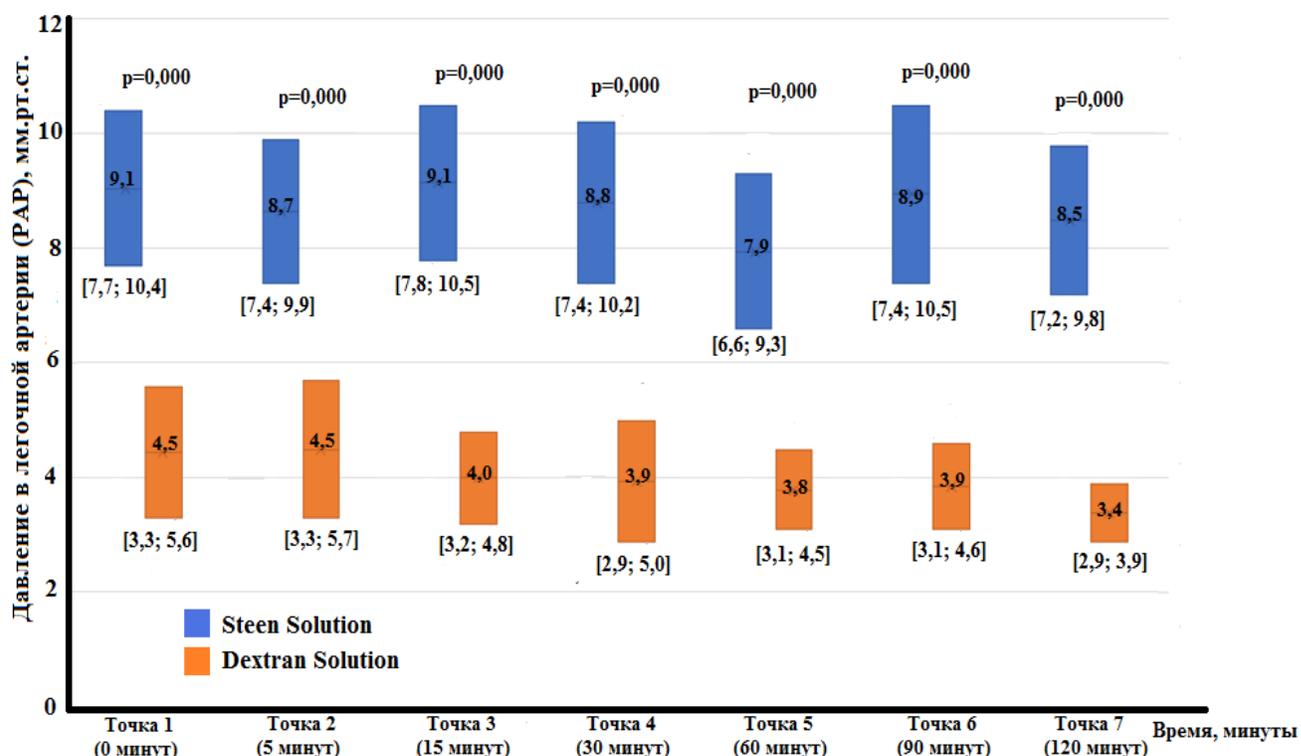


Рисунок 26 – Сравнительный анализ медиан показателей давления в легочной артерии (РАР) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В первой временной точке 0 минут в группе №3 EVLP ДЛА 5,3 [3,9; 6,8] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 4,3 [3,1; 5,6] мм.рт.ст..

При проведении процедуры EVLP во второй временной точке 5 минут в группе №3 EVLP ДЛА составило 5,2 [4,4; 6] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 3,5 [2,6; 4,3] мм.рт.ст..

В третьей временной точке 15 минут отмечалось умеренное увеличение давление в легочной артерии в группах без добавления компонентов крови, а в группах с раствором на основе декстрана-40 наблюдалась тенденция к снижению РАР. Таким образом, спустя 15 минут процедуры EVLP в группе №3 EVLP ДЛА

составило 5,9 [5; 6,7] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 2,7 [1,9; 3,4] мм.рт.ст..

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP ДЛА составило 6,3 [5,6; 7] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 3 [2,3; 3,7] мм.рт.ст..

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP ДЛА составило 5,1 [4; 6,1] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 3,1 [2,1; 4,2] мм.рт.ст..

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP ДЛА составило 5,9 [5; 6,8] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 2,9 [2,2; 3,6] мм.рт.ст..

В заключительной, седьмой временной точке 120 минут в группе №3 EVLP ДЛА составило 7,7 [6,9; 8,4] мм.рт.ст., в группе №4 EVLP ДЛА составило 2,5 [2; 3] мм.рт.ст.. После выполнения анализов перфузия прекращалась, выполнялась фармако-холодовая консервация донорских легких. Динамика изменений давления в легочной артерии во время процедуры в двух группах EVLP изображена на рисунке 27.

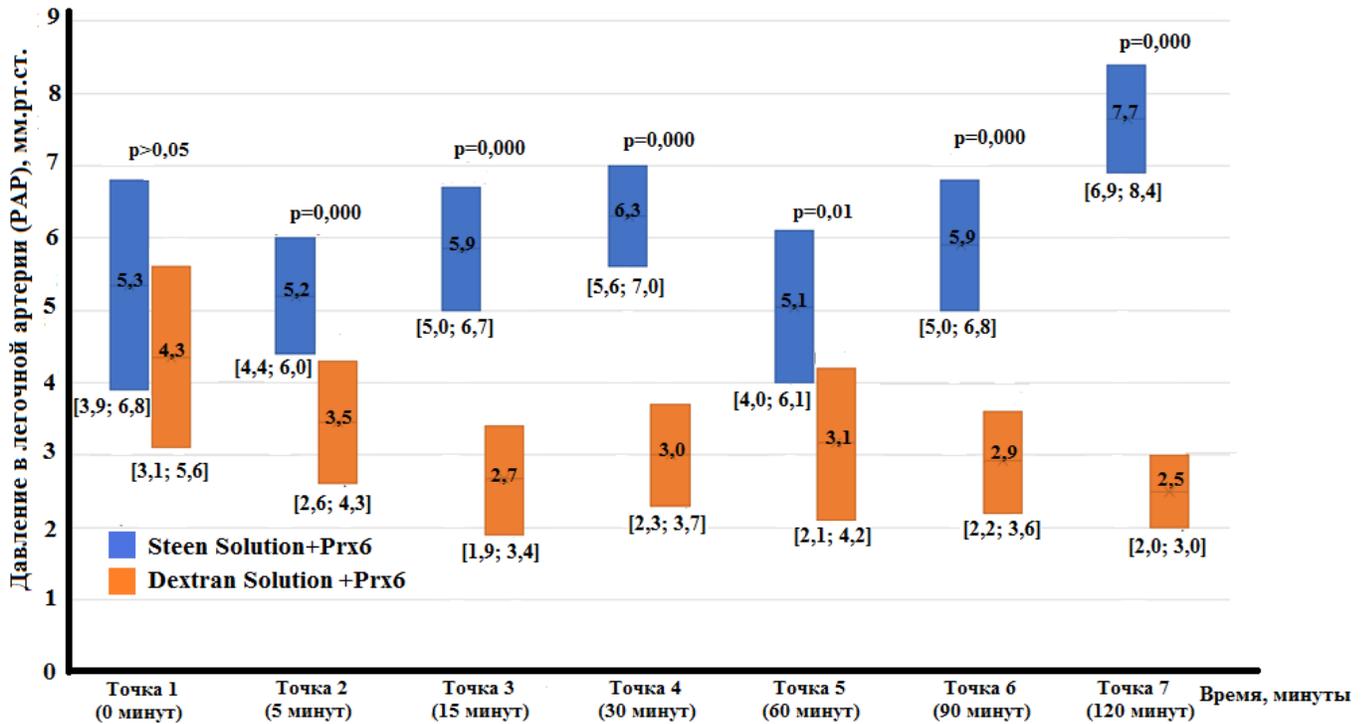


Рисунок 27 – Сравнительный анализ медиан показателей давления в легочной артерии (PAP) во время EVLP в группах Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

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.

3.2.6.2 Анализ показателей периферического сосудистого сопротивления

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Периферическое сосудистое сопротивление в легких – PVR, $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$ – ПСС – являлось расчетным показателем на основе данных давления в легочной артерии (РАР) и объемной скорости перфузии (РаF). В первой временной точке 0 минут в группе №1 EVLP ПСС (PVR) составило 604 [515; 693] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС составило 297 [223; 373] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

Во второй временной точке 5 минут в группе №1 EVLP ПСС составило 266 [228; 304] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС в легких составило 139 [103; 176] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В третьей временной точке 15 минут в группе №1 EVLP ПСС в легких составило 214 [183; 247] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС в легких составило 94 [76; 120] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №1 EVLP ПСС в легких (PVR) составило 108 [92; 125] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС в легких составило 48 [36; 61] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В пятой временной точке 60 минут в группе №1 EVLP ПСС в легких (PVR) составило 84 [70; 98] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 ПСС составило 40 [33; 47] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В шестой временной точке 90 минут в группе №1 EVLP ПСС составило 94 [77; 111] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС в легких составило 41 [33; 49] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №1 EVLP ПСС в легких (PVR) составило 89 [75; 103] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №2 EVLP ПСС в легких составило 36 [31; 41] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$. Графическое изображение показателей ПСС в первых двух группах представлено на рисунке 28.

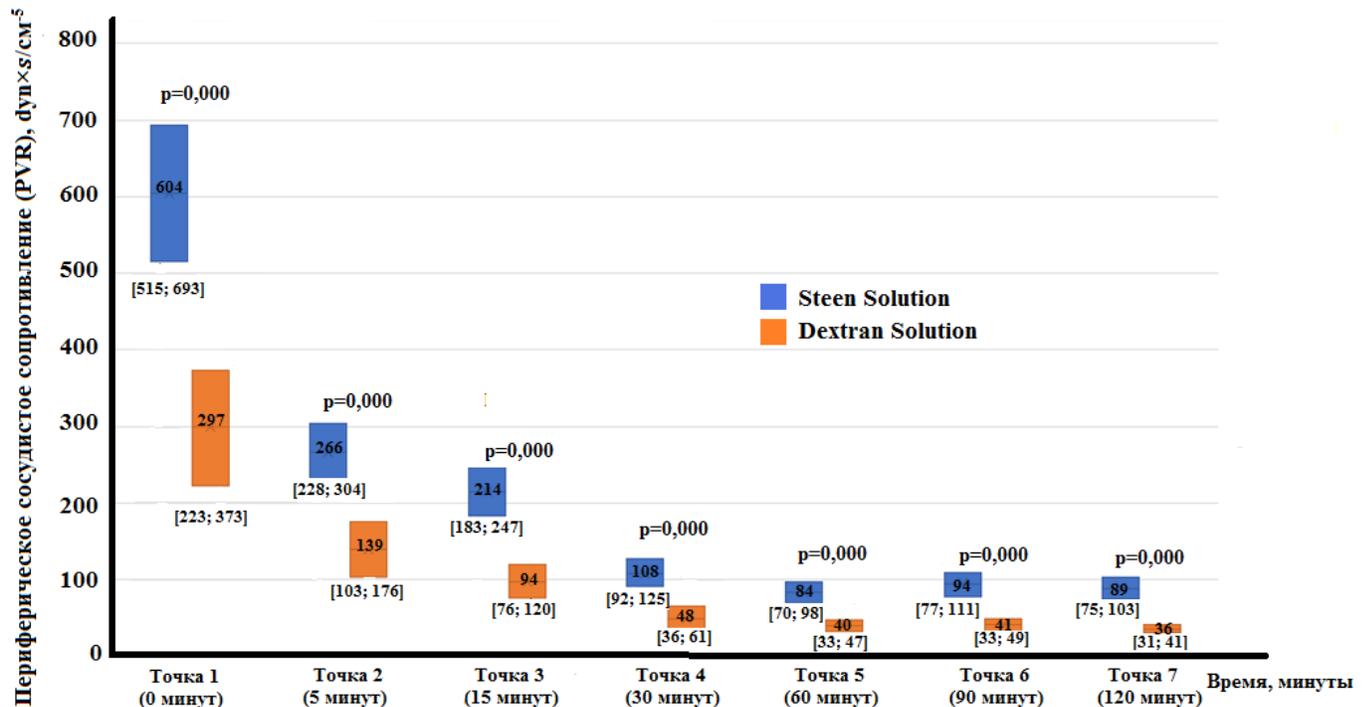


Рисунок 28 – Сравнительный анализ медиан показателей периферического сосудистого сопротивления (PVR) во время EVLP в группах Steen Solution и Dextran Solution: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В первой временной точке 0 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 355 [254; 452] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС составило 288 [206; 371] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

Во второй временной точке 5 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 161 [137; 183] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС в легких составило 107 [81; 132] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В третьей временной точке 15 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 138 [119; 158] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС в легких составило 67 [46; 80] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В четвертой временной точке 30 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 77 [69; 86] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС в легких составило 37 [29; 45] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$. Снижение показателей ПСС во всех группах объяснялось инициацией ИВЛ, что способствовало вазодилатации и увеличивало микроциркуляторную сосудистую емкость.

В пятой временной точке 60 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 53 [42; 64] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС составило 33 [22; 44] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В шестой временной точке 90 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 63 [53; 72] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС в легких составило 31 [24; 38] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$.

В седьмой, конечной временной точке 120 минут в группе №3 EVLP ПСС в легких 81 [73; 88] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$, в группе №4 EVLP ПСС в легких составило 27 [21; 32] $\text{dyn}\times\text{s}/\text{cm}^{-5}$. После проведения оценки показателей, нормотермическая машинная перфузия донорских легких прекращалась. Динамика изменения показателей ПСС в легких во время процедуры EVLP изображена на рисунке 29.

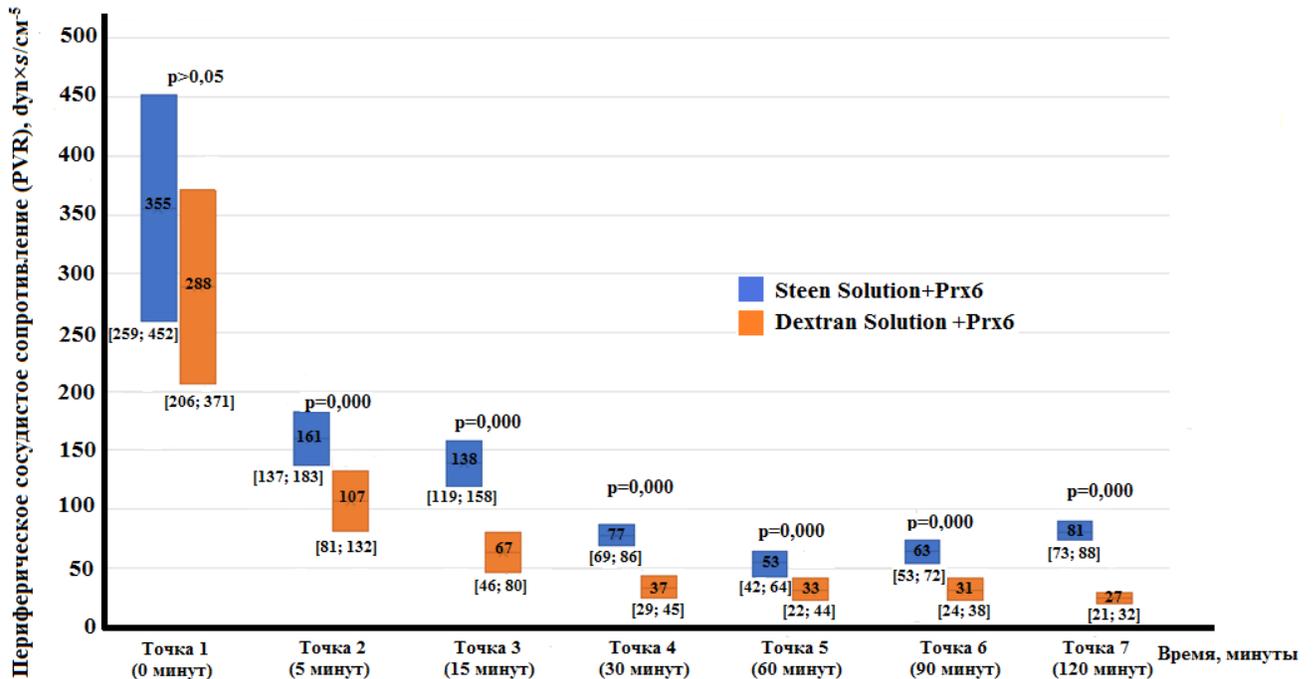


Рисунок 29 – Сравнительный анализ медиан показателей периферического сосудистого сопротивления (PVR) во время EVLP в группах Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6: точка измерения 1 – 0 минут, точка измерения 2 – 5 минут, точка измерения 3 – 15 минут, точка измерения 4 – 30 минут, точка измерения 5 – 60 минут, точка измерения 6 – 90 минут, точка измерения 7 – 120 минут, что соответствует окончанию процедуры EVLP. Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

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. 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 группах №3 и №4 продемонстрировало сравнительно низкую степень сосудистой реакции в реперфузионном периоде.

3.2.7 Корреляционный анализ зависимости индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ от показателей лактата во время нормотермической машинной *ex vivo* перфузии

Зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution описывается уравнением парной линейной регрессии (рисунок 30):

$$Y_{\text{индекс PaO}_2/\text{FiO}_2 \text{ в группе EVLP Steen Solution}} = 46,065 \times X_{\text{концентрация лактата в группе EVLP Steen Solution}} + 98,651, \% \quad (2),$$

где Y – индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ в группе EVLP Steen Solution, X – концентрация лактата в группе EVLP Steen Solution.

При увеличении показателя «концентрация лактата» на 1 следует ожидать увеличение показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Steen Solution на 46,065. Полученная модель объясняет 32,0% наблюдаемой дисперсии показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Steen Solution. Однако не было выявлено достоверной корреляции между показателями «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » и «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution.

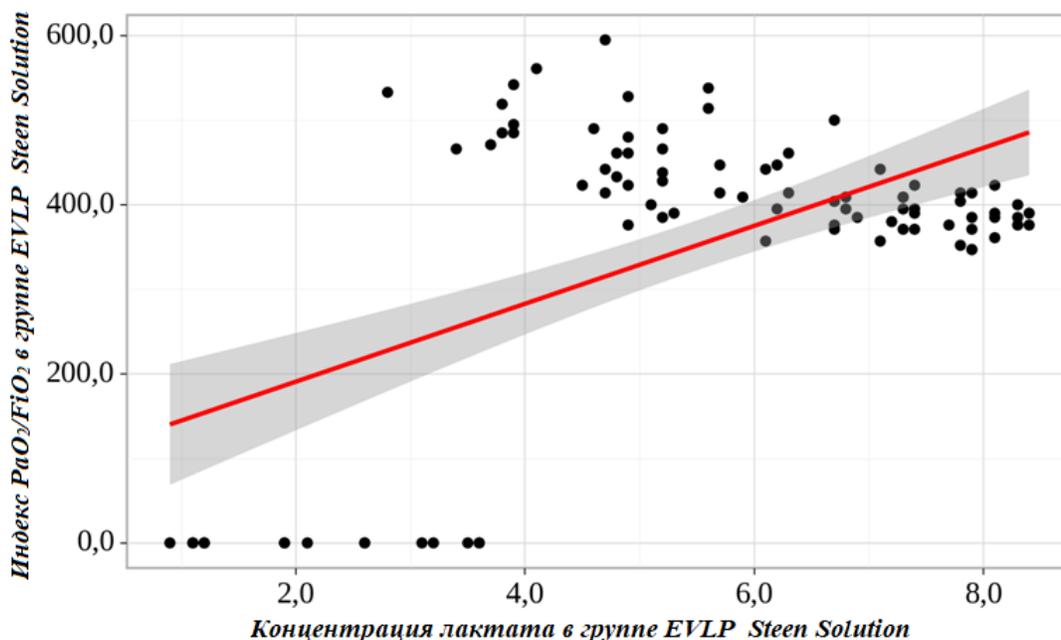


Рисунок 30 – Зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution

Наблюдаемая зависимость показателя «индекс PaO_2/FiO_2 » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran-40 Solution описывается уравнением парной линейной регрессии (рисунок 31):

$$Y_{\text{индекс } PaO_2/FiO_2 \text{ в группе EVLP Dextran-40 Solution}} = 74,604 \times X_{\text{концентрация лактата в группе EVLP Dextran-40 Solution}} - 80,15, \% (3),$$

где Y – индекс PaO_2/FiO_2 в группе EVLP Dextran-40 Solution, X – концентрация лактата в группе EVLP Dextran-40 Solution.

При увеличении показателя «концентрация лактата» на 1 следует ожидать увеличение показателя «индекс PaO_2/FiO_2 » в группе EVLP Dextran-40 Solution на 74,604. Полученная модель объясняет 57,9% наблюдаемой дисперсии показателя «индекс PaO_2/FiO_2 » в группе EVLP Dextran-40 Solution. При оценке связи показателя «индекс PaO_2/FiO_2 » и показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran-40 Solution была установлена слабой тесноты прямая корреляционная связь.

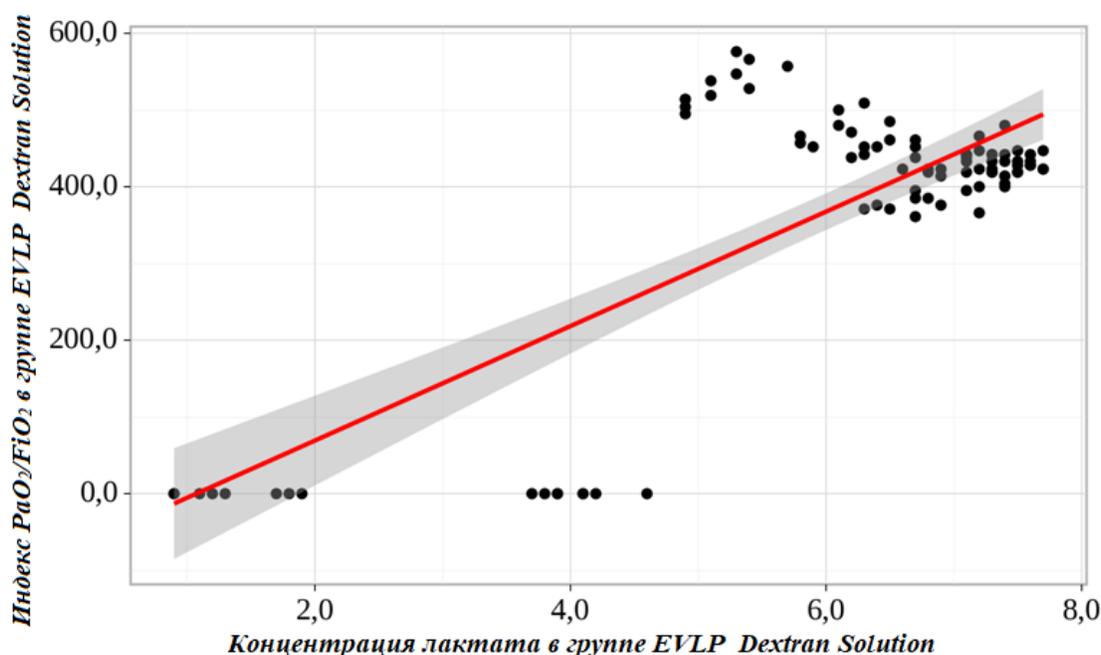


Рисунок 31 – Зависимость показателя «индекс PaO_2/FiO_2 » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran Solution

Наблюдаемая зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution+Prx6" описывается уравнением парной линейной регрессии (рисунок 32):

$$Y_{\text{индекс PaO}_2/\text{FiO}_2 \text{ в группе EVLP Steen Solution+Prx6}} = 86,604 \times X_{\text{концентрация лактата в группе EVLP Steen Solution+Prx6}} - 11,725, \% (4),$$

где, Y – индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ в группе EVLP Steen Solution+Prx6, X – концентрация лактата в группе EVLP Steen Solution+Prx6.

При увеличении показателя «концентрация лактата» на 1 следует ожидать увеличение показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Steen Solution+Prx6" на 86,604. Полученная модель объясняет 56,0% наблюдаемой дисперсии показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Steen Solution+Prx6. При оценке связи показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » и показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution+Prx6 была установлена умеренной тесноты прямая корреляционная связь.

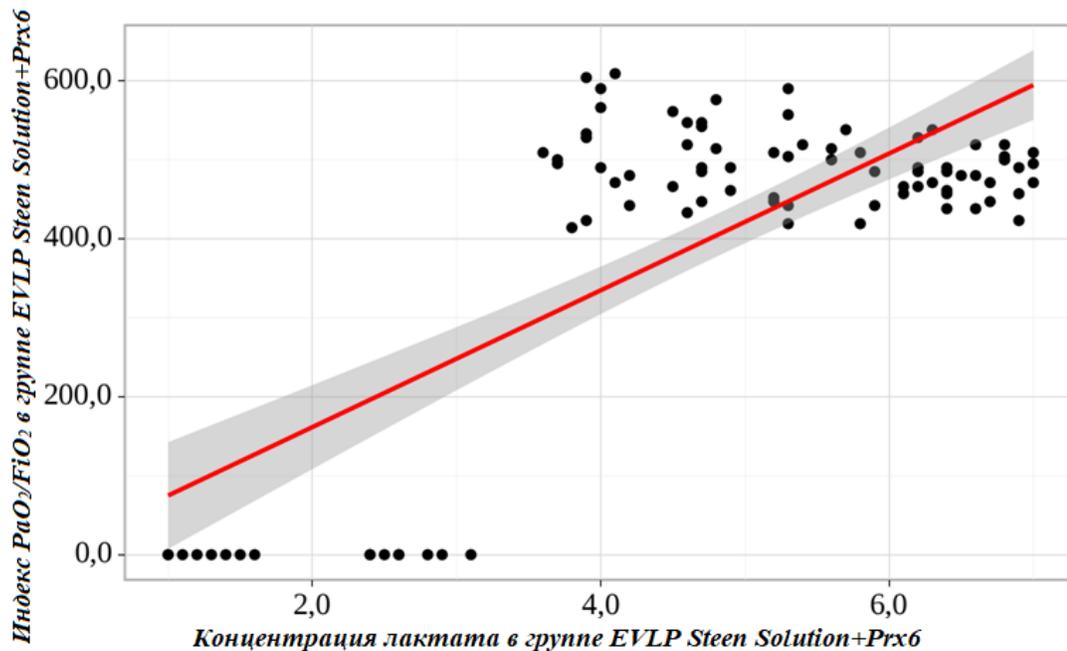


Рисунок 32 – Зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Steen Solution+Prx6

Наблюдаемая зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6 описывается уравнением парной линейной регрессии (рисунок 33):

$Y_{\text{индекс PaO}_2/\text{FiO}_2 \text{ в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6}} = 122,422 \times X_{\text{концентрация лактата в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6}} + 6,71, \%$ (5),

где, Y – индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6, X – концентрация лактата в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6.

При увеличении показателя «концентрация лактата» на 1 следует ожидать увеличение показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6 на 122,422. Полученная модель объясняет 41,9% наблюдаемой дисперсии показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6. При оценке связи показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » и показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran-40 Solution+Prx6 была установлена умеренной тесноты прямая корреляционная связь.

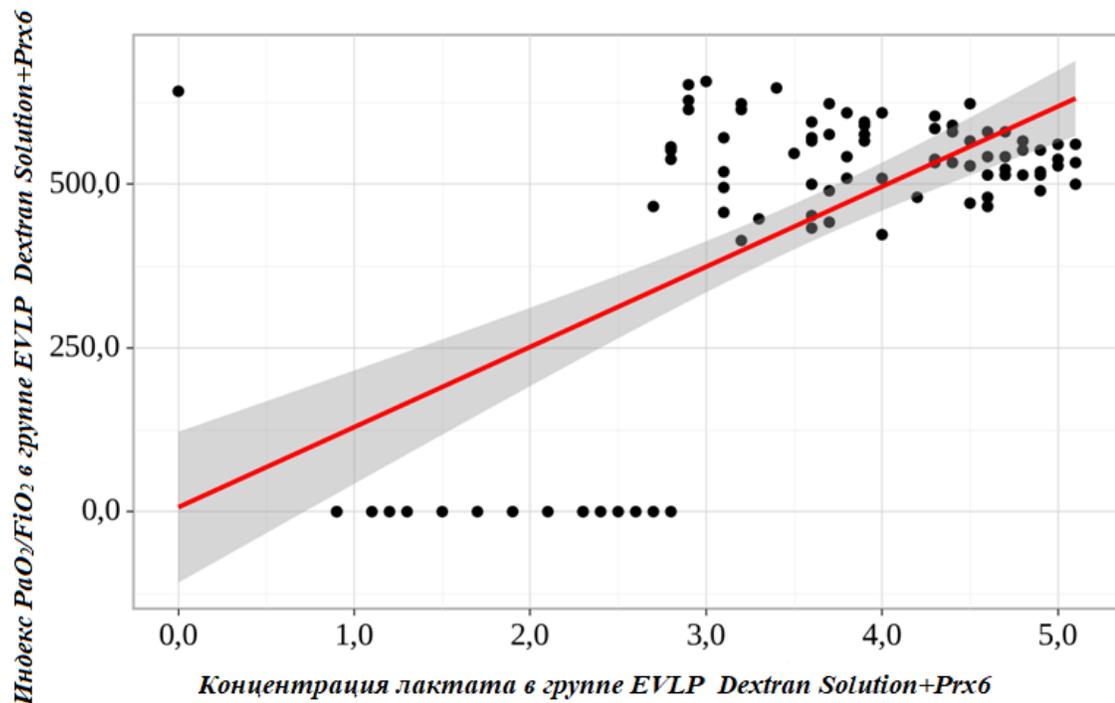


Рисунок 33 – Зависимость показателя «индекс $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ » от показателя «концентрация лактата» в группе EVLP Dextran Solution+Prx6

Таким образом, наблюдалась зависимость индекса $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ от показателей лактата практически во всех группах. Данная тенденция является подтверждением того, что при высоком уровне лактата во время EVLP является предиктором снижения ИО к концу процедуры.

3.3 Методика ортотопической трансплантации левого легкого на крысах

С целью сокращения времени тепловой ишемии трансплантата, снижения технической сложности и влияния качества хирургической техники на чистоту эксперимента имплантация легкого осуществлялась при помощи kuff-метода. Суть данной методики заключалась в создании манжет, которые специально обрабатывались шлифовальной бумагой для обеспечения высоких адгезивных свойств, их фиксации с внешней стороны сосудов трансплантата и имплантации в сосуды реципиента. Манжеты изготавливались из внутривенных катетеров. Для бронхов использовали катетеры 14G, для легочной артерии 16 G, для легочной вены 14-16 G в зависимости от диаметра сосуда. Для обеспечения гипотермии и сокращения времени тепловой ишемии трансплантат левого легкого обрабатывали покрытым влажной марлей с консервирующим раствором на основе декстрана-40 температурой 4⁰С в чашке Петри. Трансплантат подвешивали за корень легкого при помощи зажима типа Бульдог (рисунок 34), а позиционирование трансплантата обеспечивали гибким держателем.



**Рисунок 34 – Левое легкое, спозиционированное для имплантации манжет:
1 – бронх; 2 – сосудистые ворота**

Поочередно сосуды проводили через манжету, а сосудистый край загибали на тело манжеты и фиксировали шовной лигатурой Prolene 7/0. Бронхиальную манжету имплантировали аналогично сосудистой (рисунок 35).

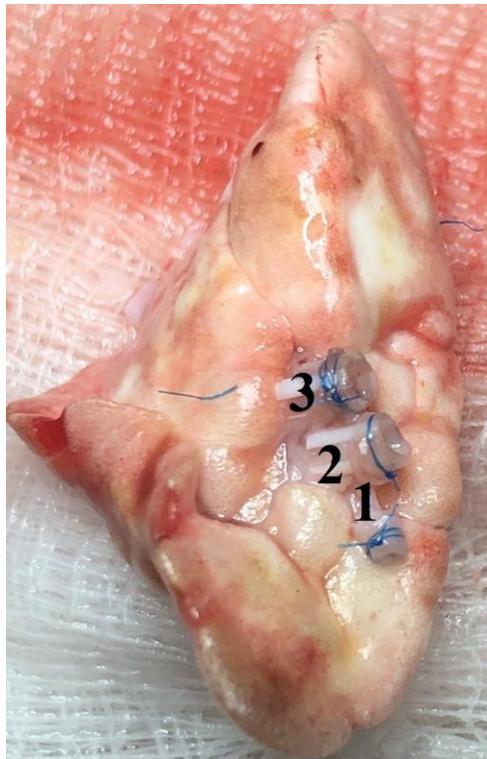


Рисунок 35 – Левое легкое с имплантированными манжетами: 1 – легочная артерия; 2 – бронх; 3 – легочная вена

Средняя продолжительность данной процедуры составляла 30 минут. Вводную анестезию у животного-реципиента проводили по протоколу, идентичному для наркотизации животного-донора, описанному в разделе «Процедура эксплантации донорских легких». После окончания вводной анестезии и начала искусственной вентиляции с потоком кислорода 1л/мин и ингаляцией изофлурана 3,5 об/%, животное позиционировали на операционном столе на правом боку, выбривали операционное поле на уровне 4-5 межреберья и концентрично до позвоночного столба, грудины, левого плеча и верхнего этажа брюшной стенки. После оценки удовлетворительного уровня седации и аналгезии выполняли кожный разрез в 5 межреберье, послойное рассечение подлежащих тканей и левосторонняя торакотомия. Гемостаз проводили с использованием биполярной коагуляции

аппаратом (Soring, Германия). Далее устанавливали реберный расширитель, левое легкое мобилизовали при помощи двух ватных тампонов, выполняли диссекцию сосудов ворот левого легкого. После проведения подготовительного этапа, дистально на легкое накладывали угловой зажим и орган позиционировали в операционном поле при помощи гибкого держателя (рисунок 36).

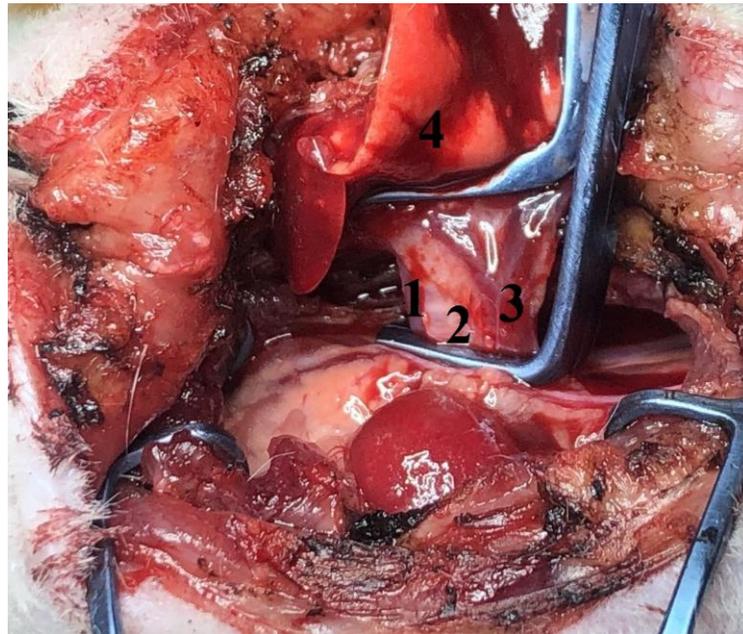


Рисунок 36 – Левое легкое реципиента: 1 – легочная артерия; 2 – бронх; 3 – легочная вена; 4 – левое легкое

Инициировали однологочную вентиляцию 100% кислородом в специально подобранных параметрах: ЧД – 105/мин, $V_{\text{дых}}$ – 0,6 мл, $V_{\text{пот}}$ – 300 мл/мин, P_{peak} – 6 см.вод. ст., РЕЕР – 4 см.вод.ст., поток изофлурана 3,5 об/%. Далее накладывали угловой зажим на ворота левого легкого максимально проксимально к сердцу реципиента. Иссекали левое легкое и позиционировали трансплантат.

Рассекали переднюю стенку легочной вены, легочной артерии, бронха. Поочередно выполняли имплантацию манжет трансплантата в устья бронха, легочной вены, легочной артерии. Перед обеспечением герметичности анастомоза выполнялась деаэрация консервирующим раствором. Временной период данного этапа составлял 30 минут (рисунок 37).



Рисунок 37 – Имплантация трансплантата левого легкого с использованием манжет: 1 – легочная артерия; 2 – бронх; 3 – легочная вена

После снятия проксимального зажима с устья легочных сосудов левого легкого реципиента, регистрировали пуск кровотока и инициировали билатеральную вентиляцию легких 100% кислородом (рисунок 38) в специально подобранных параметрах: ЧД – 90/мин, $V_{\text{дых}}$ – 0,9 мл, $V_{\text{пот}}$ – 500 мл/мин, P_{peak} – 8 см.вод. ст., РЕЕР – 4 см.вод.ст., поток изофлурана 3,0 об/%. Маневр рекруитмента выполняли через 15 минут после начала двулегочной вентиляции при помощи увеличения давления в конце выдоха до 8 см.вод.ст. Операционную рану накрывали влажной салфеткой. В процессе реабилитации ткани трансплантата легкого, параметры вентиляции устанавливали идентичные начальным. Время экспозиции трансплантата составляло 2 часа с целью оценки ишемически-реперфузионных повреждений и маркеров. Животное наблюдалось в условиях острого эксперимента. Эвтаназия проводилась путем введения гиперкалиевого раствора транскардиально после отбора материала для гистологических исследований.



Рисунок 38 – Имплантированный трансплантат левого легкого

После времени экспозиции трансплантата выполняли анализ показателей газового состава крови селективно из трансплантата левого легкого: поочередно проводили пункцию левой легочной артерии и левой легочной вены иглой 26G дистальнее сосудистых манжет срезом в направлении трансплантата. После проведенного анализа, отбирали пробы крови реципиента с целью оценки концентрации антиоксиданта Pгх6 в системном кровотоке и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут, а далее образцы плазмы помещали в морозильную камеру для хранения при -25°C . 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 $4-8^{\circ}\text{C}$, другие не обрабатывали консервантом и хранили при -25°C .

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

Трансплантация левого легкого после процедуры EVLP выполнялась в четырех группах, соответствующих группам нормотермической перфузии донорских легких: животные-реципиенты были разделены на 4 группы: первая группа – трансплантация левого легкого после EVLP с применением Steen Solution (n=15), вторая группа – трансплантация левого легкого после EVLP опытным раствором на основе декстрана-40 (n=15), третья группа – трансплантация левого легкого после EVLP раствором Steen Solution с применением Prx6 (n=15), четвертая группа – трансплантация левого легкого после EVLP опытным раствором на основе декстрана с применением Prx6 (n=15).

3.3.1.1 Показатели газового состава после трансплантации легкого

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

В момент первого измерения после трансплантации левого легкого в группе №1 показатель ИО составил 126 [117; 135] против 345 [332; 359] в группе №2 после трансплантации.

Спустя час, в период второго измерения, в группе №1 показатель индекса оксигенации составил 122 [113; 131], в то время как в группе №2 он стал равен 364 [353; 375].

Отмечалась положительная динамика индекса PaO_2/FiO_2 в группе №2, превысившая значение в 350 мм.рт.ст, что свидетельствует о хорошей оксигенирующей функции трансплантата легкого, что отображено на рисунке 39.

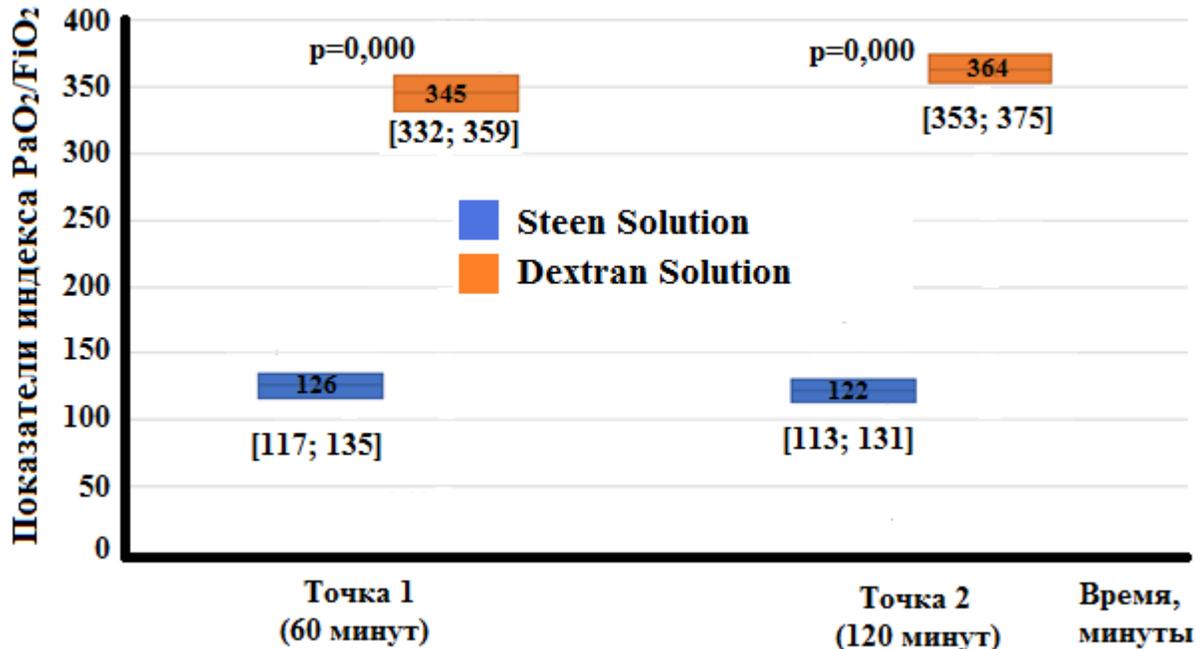


Рисунок 39 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 : в группах №1 Steen Solution и №2 Dextran Solution точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

Данные результаты демонстрируют значимое влияние состава раствора во время процедуры нормотермической перфузии донорских легких на функциональный статус трансплантата и степень проявления повторной реперфузионной реакции.

В момент первого измерения в группе №3 показатель ИО составил 286 [277; 296] против 468 [448; 488] в группе №4.

Спустя час, в период второго измерения, в группе №3 показатель индекса оксигенации составил 307 [302; 313], в то время как в группе №4 он стал равен 538 [513; 564].

В свою очередь, добавление $Pgx6$ обеспечивало антиоксидантную защиту донорских легких, что проявлялось высокими значениями индекса PaO_2/FiO_2 в группах №3 и №4. Отмечалась положительная динамика ИО в обеих группах, что изображено на рисунке 40.

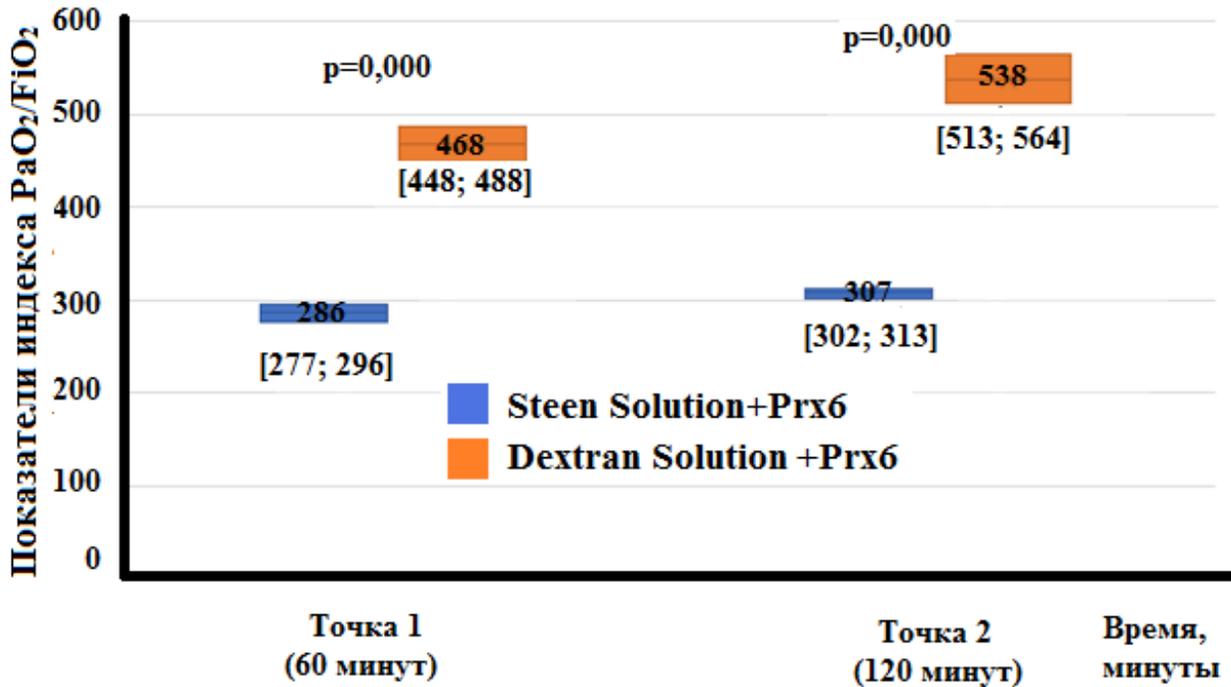


Рисунок 40 – Сравнительный анализ медиан показателей индекса PaO_2/FiO_2 : точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В результате анализа полученных данных отмечалось умеренное снижение индекса оксигенации 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 ИО в обеих экспериментальных группах при добавлении Prx6 вовремя нормотермической машинной перфузии. Спустя 120 минут наблюдения, выполнялись контрольные измерения, эксперимент прекращался, животному выполнялась эвтаназия.

3.3.1.2 Анализ параметров вентиляции после трансплантации легкого

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Показатели пикового давления на вдохе – P_{peak} – ПД – являлись дополнительным параметром оценки функционального статуса донорского легкого. С учетом строго регулируемых и неизменяемых на протяжении периода проведения исследования параметров ИВЛ, таких как положительное давление в конце выдоха (PEEP, см.вод.ст.) и дыхательный объем ($V_{\text{дых}}$, мл.), значения ПД являлись отражением степени выраженности ишемически-реперфузионного повреждения и интенсивности интерстициального отека донорского легкого.

В первой временной точке 60 минут в группе №1 после трансплантации показатели ПД (P_{peak}) составили 12 [10; 14] см.вод.ст., в группе №2 после трансплантации показатели ПД составили 7 [6; 8] см.вод.ст..

Во второй временной точке 120 минут в группе №1 после трансплантации показатели ПД составили 13 [11; 15] см.вод.ст., в группе №2 после трансплантации показатели ПД составили 5 [4; 6] см.вод.ст.. Динамика изменения пикового давления на вдохе после трансплантации в двух группах представлена на рисунке 41.

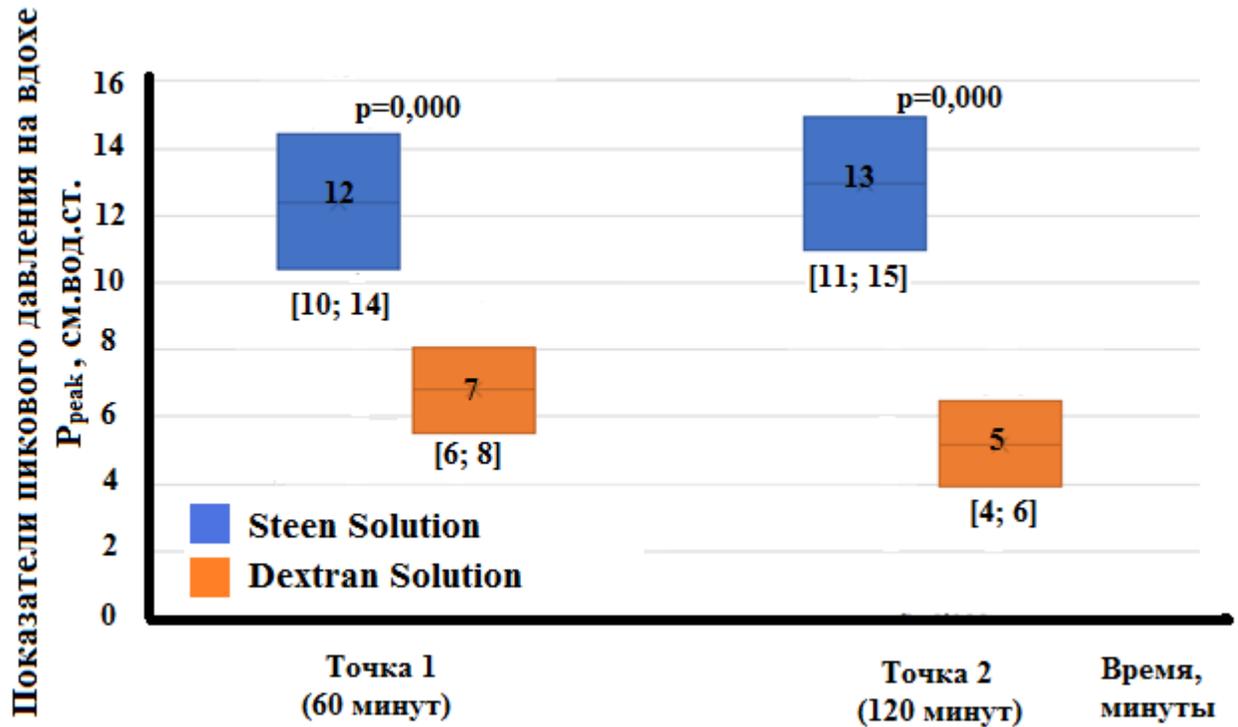


Рисунок 41 – Сравнительный анализ медиан показателей пикового давления на вдохе P_{peak} : точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В группах Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 отмечались умеренные показатели ПД. Так, в первой временной точке 60 минут в группе №3 после трансплантации показатели ПД составили 9,9 [8,5; 11,3] см.вод.ст., в группе №4 после трансплантации показатели ПД составили 6,5 [5,6; 7,4] см.вод.ст..

Во второй временной точке 120 минут в группе №3 после трансплантации показатели ПД составили 8,7 [7,2; 10,1] см.вод.ст., в группе №4 после трансплантации показатели ПД составили 6 см.вод.ст.. Динамика изменений P_{peak} в двух группах изображена на рисунке 42.

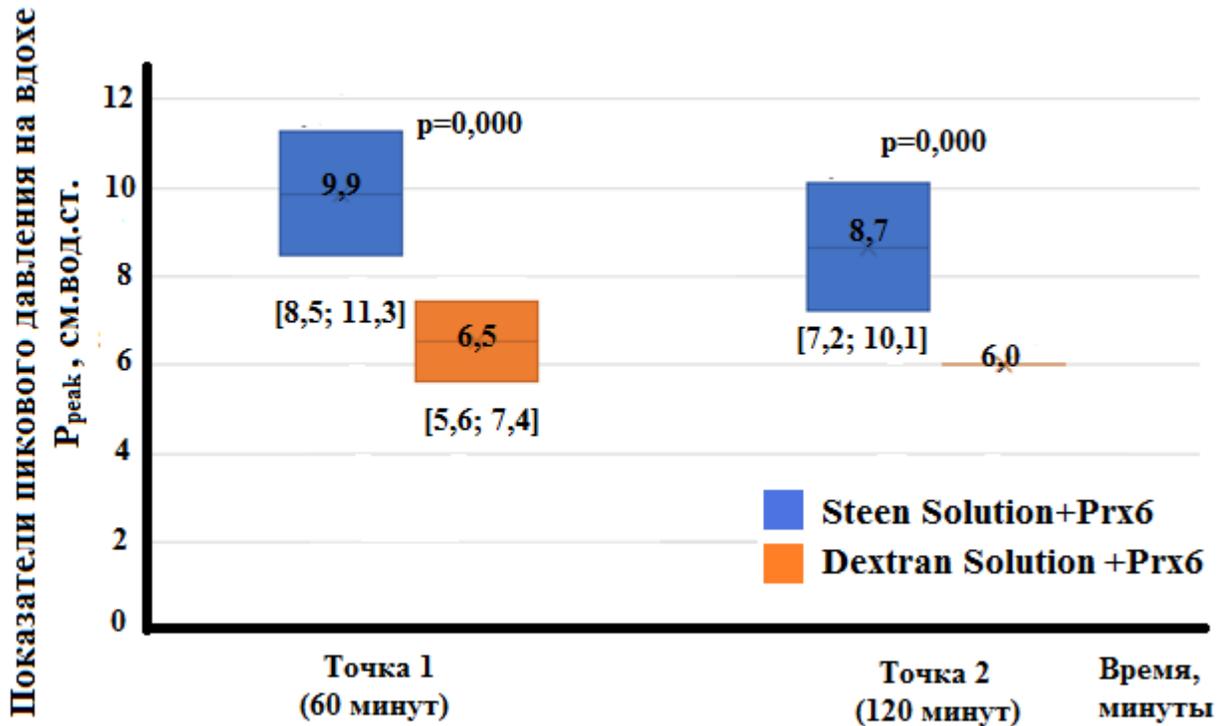


Рисунок 42 – Сравнительный анализ медиан показателей пикового давления на вдохе P_{peak} : точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

В первой временной точке во всех группах параметры ИВЛ составляли $V_{дых}$ – 1,4 мл, РЕЕР – 4 см.вод.ст. Во второй временной точке во всех группах параметры механической вентиляции устанавливались на значениях $V_{дых}$ – 1,2 мл, РЕЕР – 2 см.вод.ст. Таким образом, показатели P_{peak} отражали менее выраженное ишемически-реперфузионное повреждение в группах 2 и 4, что обусловлено положительным влиянием раствора на основе декстрана-40 и добавления компонентов крови на реперфузионный процесс во время EVLP, а использование пероксиредоксина-6 в качестве антиоксиданта достоверно снижает степень выраженности патологического реперфузионного процесса. После выполнения измерений по достижении второй временной точки в 120 минут эксперимент прекращался, животному выполнялась эвтаназия транскардиальным введением гиперкалиевого раствора.

3.3.1.3 Изменение показателей лактата после трансплантации легкого

Сравнение групп Steen Solution и Dextran Solution, Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6

Поскольку процедура EVLP в условиях данной научной работы 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. В первой временной точке 60 минут в группе №1 после трансплантации показатели лактата составили 5 [4; 6] ммоль/л, в группе №2 после трансплантации показатели лактата составили 5 [4; 5] ммоль/л.

Во второй временной точке 120 минут в группе №1 после трансплантации показатели лактата составили 8 [7; 9] ммоль/л, в группе №2 после трансплантации показатели лактата составили 6 [5; 6] ммоль/л. Изображение сравнительных динамики прироста показателей лактата графиков представлено на рисунке 43.

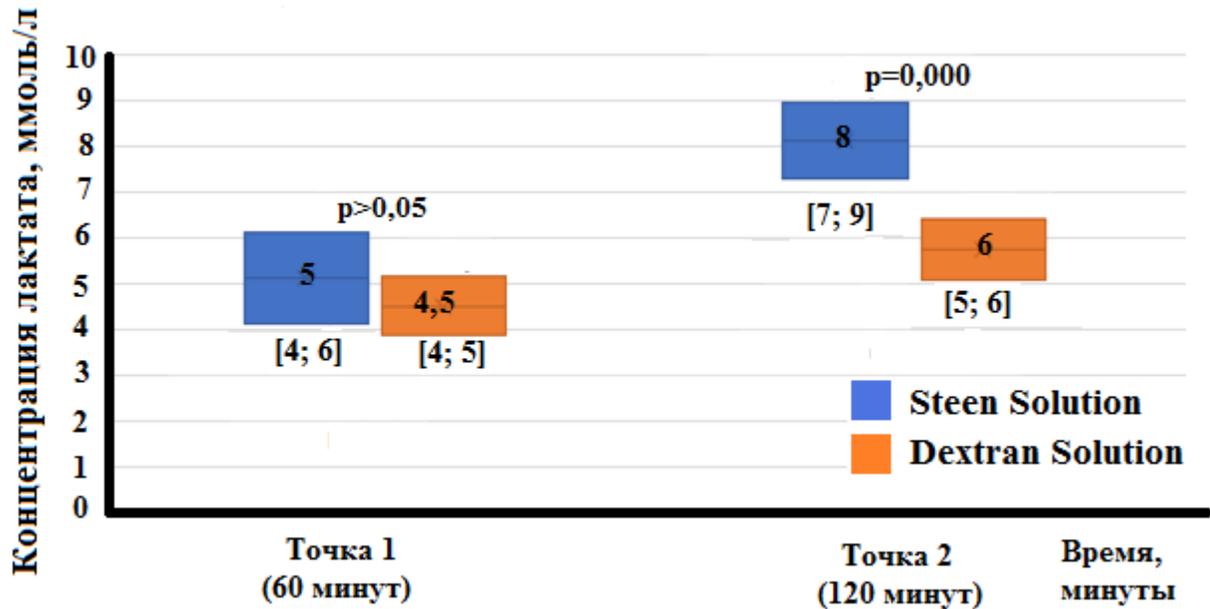


Рисунок 43 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата после трансплантации: точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

При сравнении групп Steen Solution + Prx6 и Dextran Solution + Prx6 в первой временной точке 60 минут в группе №3 после трансплантации показатели лактата составили 4,1 [3,8; 4,4] ммоль/л, в группе №4 после трансплантации показатели лактата составили 2,6 [2,2; 3,0] ммоль/л.

Во второй временной точке 120 минут в группе №3 после трансплантации показатели лактата составили 4,9 [4,7; 5,1] ммоль/л, в группе №4 после трансплантации показатели лактата составили 3,5 [3,1; 3,8] ммоль/л. Сравнительные параметры показателей лактата в обеих группах представлены на рисунке 44. После выполнения измерений по достижении второй временной точки в 120 минут во всех группах эксперимент прекращался, животному выполнялась эвтаназия гиперкалиевым раствором.

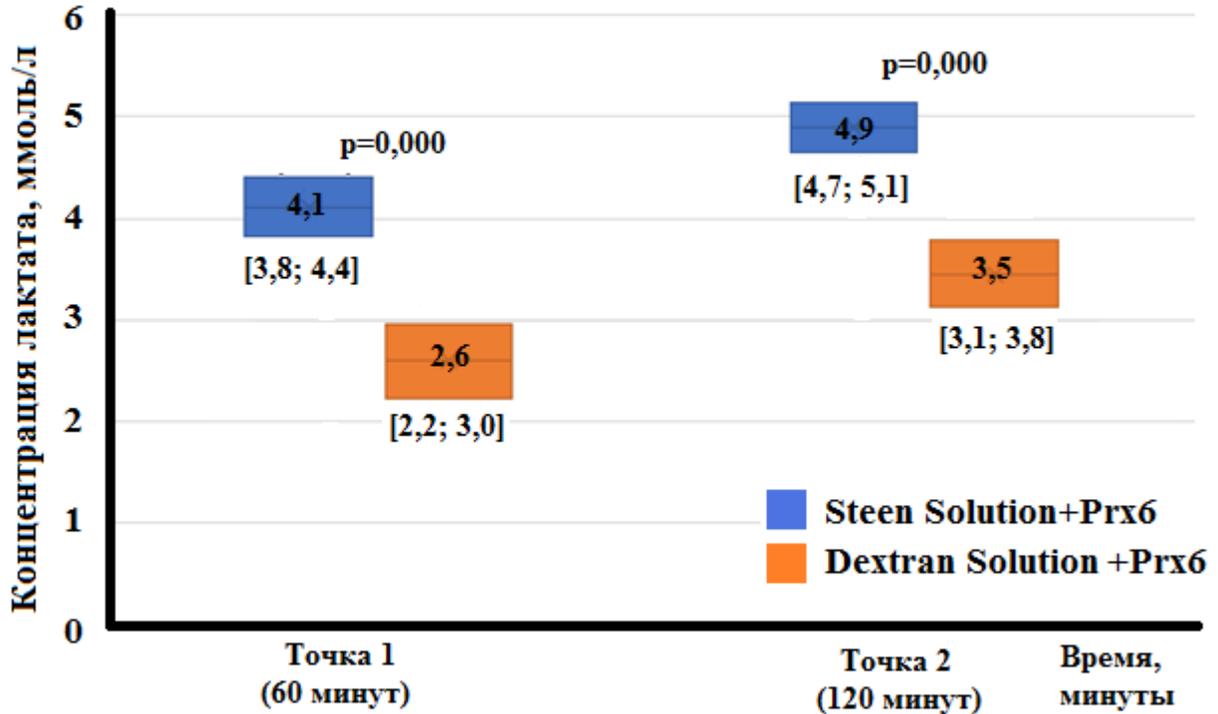


Рисунок 44 – Сравнительный анализ медиан показателей лактата после трансплантации: точка 1 – 60 минут после имплантации, точка 2 – 120 минут после имплантации

Показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Тест Краскелла-Уоллиса, различия статистически значимые при $p < 0,05$

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.

3.4 Морфологические исследования

При морфологическом исследовании выполнялась оценка полуколичественных изменений, отмеченных при стандартной световой микроскопии.

Морфологические признаки функциональной ткани со слабовыраженными патологическими изменениями отмечались в паренхиме легких всех исследуемых групп. В гистологических препаратах отмечалась удовлетворительная воздушность альвеол. Участки единичных ателектазов имели неоднородное распределение во всех группах, а в группе Steen Solution[®] выявлялись в отдельных участках. Умеренная интерстициальная инфильтрация была отмечена в нескольких образцах. В сравниваемых гистологических образцах двух групп отмечалась микроструктурная разница архитектоники легочной паренхимы. Так, в группах с применением раствора на основе декстрана-40 в качестве перфузионного агента отмечалось сохранение архитектоники легочной паренхимы и умеренные явления интерстициального отека спустя 2 часа после имплантации донорского легкого, а в группах с применением Steen Solution[®], наоборот, наблюдались явления выраженного интерстициального и перибронхиального отека с единичными разрывами альвеолярных перегородок (рисунок 45, рисунок 46).

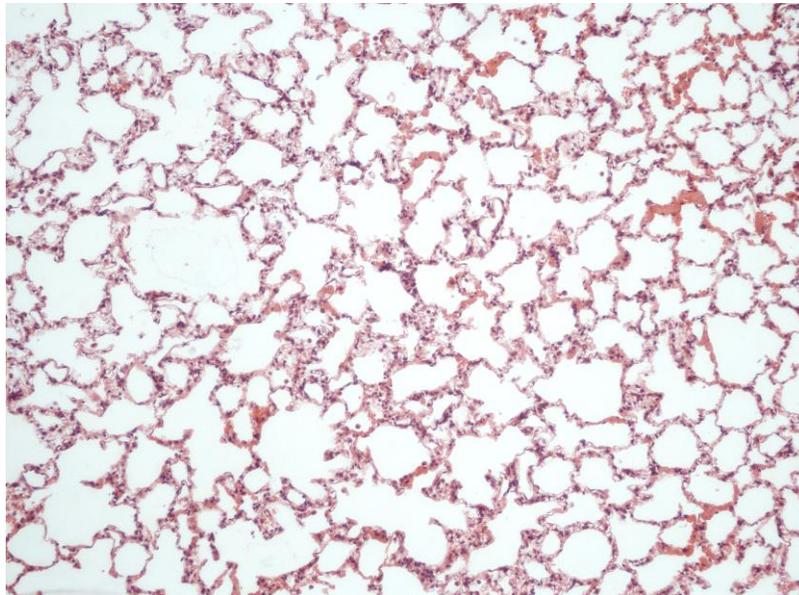


Рисунок 45 – Сохранность структур ткани легкого: слабовыраженные участки субэндотелиального отека и мелкие диссеминированные очаги кровоизлияний (группа с применением раствора на основе декстрана-40) (кратность увеличения 100, окраска гематоксилин-эозин)

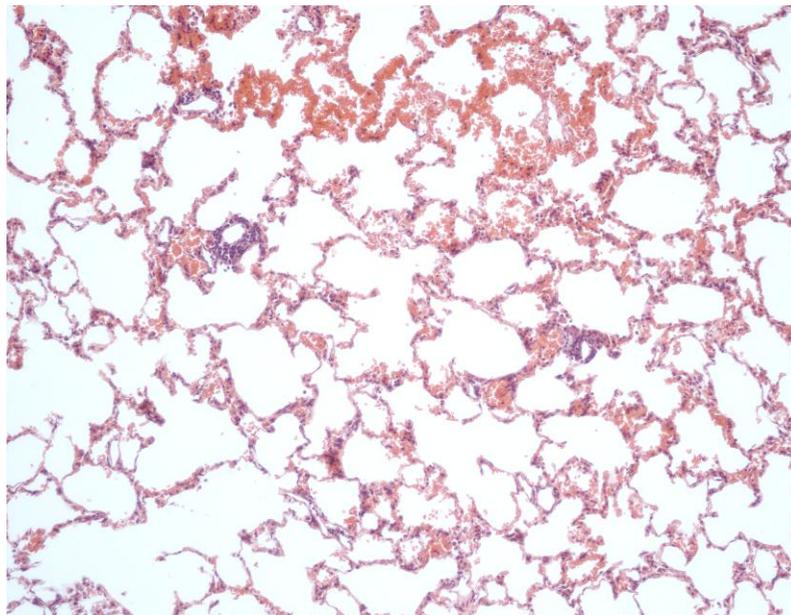


Рисунок 46 – Слабовыраженный субэндотелиальный отек с участками разрывов альвеолярных перегородок (группа с применением Steen Solution®) (кратность увеличения 100, окраска гематоксилин-эозин)

В группах сравнения отмечалась сопоставимая степень повреждения тканей после фармако-холодовой консервации, по окончании перфузии, а также после трансплантации левого легкого животному-реципиенту, что говорит об эффективности опытного раствора, сопоставимой со Steen Solution®.

При морфологическом исследовании групп с применением Prx6 спустя 120 минут после имплантации, отмечалась сохранная архитектура легочной паренхимы во всех наблюдениях, на гистологических препаратах сохранялась воздушность альвеол. Распределение зон микроателектазов было неоднородным, а участки гиповентиляции встречались в отдельных сегментах. Альвеолярные воздушные пространства, а также перибронховаскулярная соединительная ткань не имели утолщений. Обращали на себя внимание нейтрофильная инфильтрация и единичные диссеминированные очаги кровоизлияний, что обуславливалось гидродинамическим ударом в момент восстановления кровотока. На срезах отмечалась картина нормальной структурно-функциональной архитектуры легкого (рисунок 47, рисунок 48).

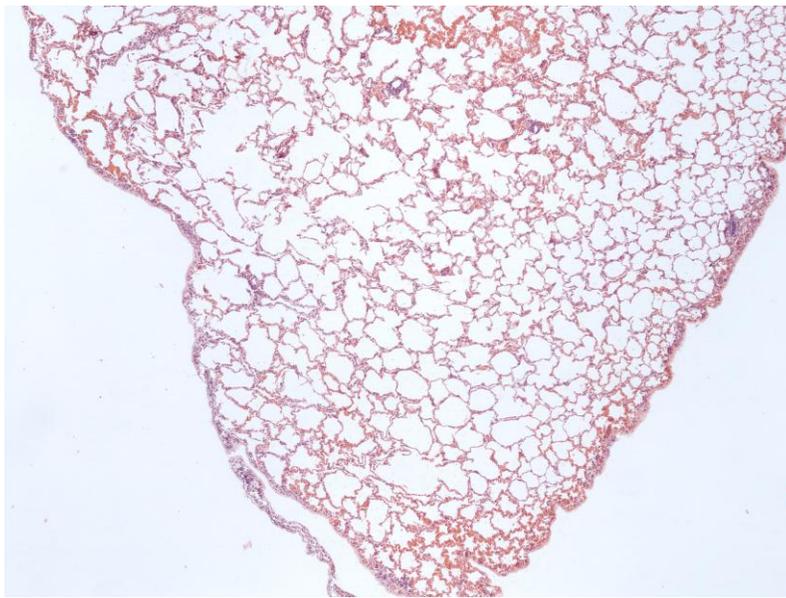


Рисунок 47 – Сохранение архитектуры трансплантированного легкого, диссеминированные участки кровоизлияний и нейтрофильной инфильтрации (группа с применением Steen Solution®+ Prx6) (кратность увеличения 40, окраска гематоксилин-эозин)

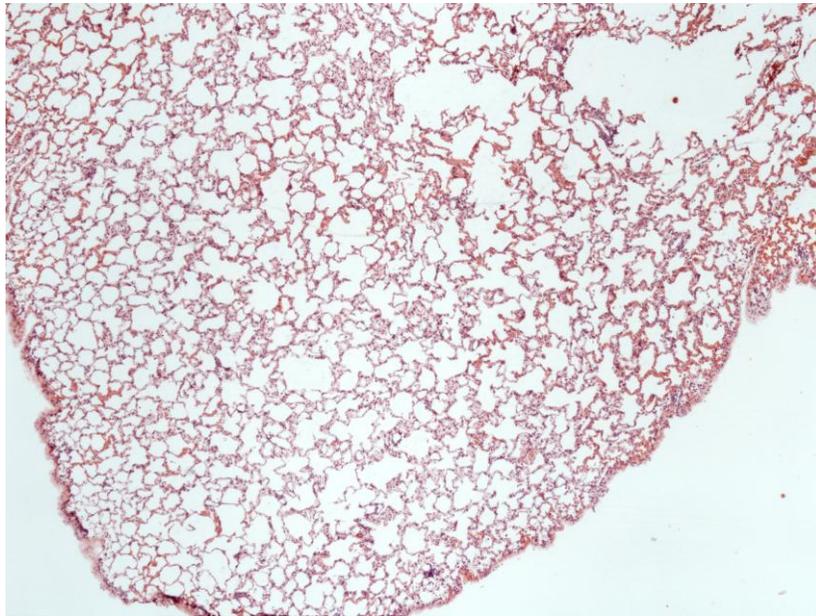


Рисунок 48 – Воздушность паренхимы легкого не нарушена, единичные участки кровоизлияний, патологических структурно-функциональных нарушений не выявляется (группа с применением раствора на основе декстрана-40+Prx6) (кратность увеличения 40, окраска гематоксилин-эозин)

В результате проведенного исследования серии микропрепаратов всех четырех групп донорских легких через 120 минут после трансплантации, отмечалась высокая эффективность опытного раствора на основе декстрана-40 сопоставимая с Steen Solution®. Применение же антиоксиданта на этапе нормотермической перфузии обеспечивало полное сохранение структурно-функциональных свойств имплантированных легких, снижая степень выраженности ишемически-реперфузионного повреждения.

3.5 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 5). 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 5 – 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)

Как видно из таблицы 5, в контрольных легких ОТТЛ спустя 12 часов ишемии (группа № 2) 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. Результаты по оценке уровня мРНК эффекторной каспазы-3 (CASP-3) очень хорошо согласуются с результатами иммуноблоттинга (рисунок 49), из которого видно, что в группе ортотопической трансплантации легкого (ОТТЛ) без пероксиредоксина достоверно возрастает уровень белка каспазы 3 в 4–5 раз, оставаясь в допустимых диапазонах.

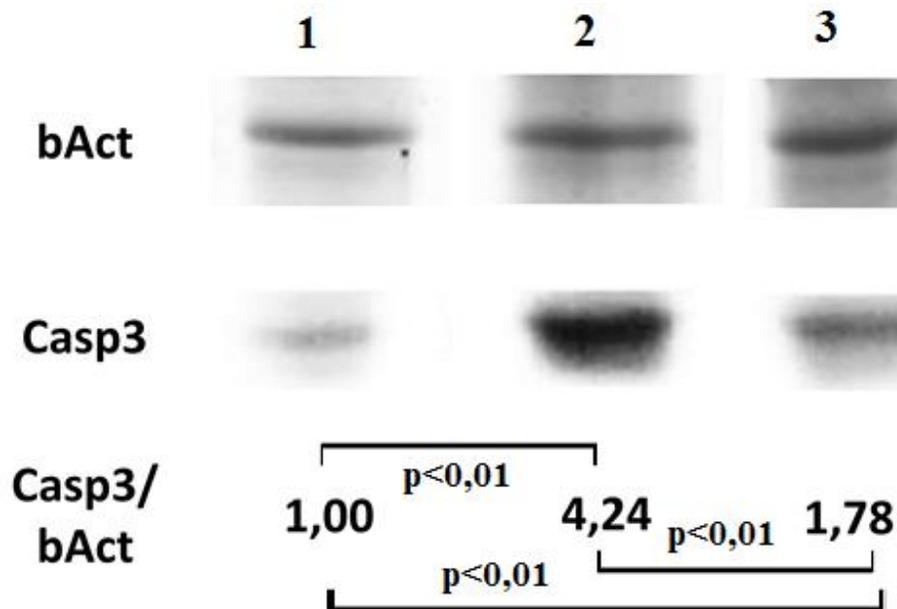


Рисунок 49 – Активация апоптотической гибели в тканях донорских легких крысы после ортотопической трансплантации при нормировании относительно бета-актина (bAct)

№1 – интактный контроль; №2 – 12 часов фармако-холодовой консервации донорских легких, EVLP – нормотермическая машинная перфузия донорских легких *ex vivo*, ОТТЛ – ортотопическая трансплантация левого легкого; №3 – 12 часов фармако-холодовой консервации донорских легких, EVLP с применением пероксиредоксина - 6, ОТТЛ. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$

Для определения безопасного предельного времени консервации донорских легких был выделен временной интервал 12 часов, а также проведено сравнение с группой нативных легких, не прошедших процедуру эксплантации и консервации. Представленные результаты свидетельствуют об эффективности опытного раствора на основе декстрана-40 в качестве фармако-холодового консервирующего агента, позволяющего сохранять донорские легкие до 12 часов, а также высокой эффективности пероксиредоксина-6, которая проявлялась в посттрансплантационном периоде, что демонстрировалось не только удовлетворительным функциональным статусом трансплантата, но и низким уровнем воспалительного процесса и апоптотической активности.

В настоящее время острый дефицит донорских легких диктует необходимости поиска решений данной проблемы. Именно процедура нормотермической машинной

перфузии *ex vivo* является методом выбора с целью увеличения количества трансплантаций легких. Не менее значимая роль в развитии данного направления отдается выбору оптимального раствора для фармако-холодовой консервации и EVLP – именно универсальный консервирующий и перфузионный агент позволит обеспечить основополагающий компонент всей программы. Разработанный раствор на основе декстрана-40 может использоваться в качестве аналога официальному перфузионному раствору Steen Solution® и фармако-холодовому агенту Perfadex Plus®. Значительной актуальностью отличается и малообъемный перфузионный стенд, позволяющий минимизировать затраты фармакологических компонентов и денежных средств для проведения глубоких доклинических исследований в области фармакологии, патофизиологии, иммунологии и проблем трансплантации легких, процедуры EVLP в целом, за счет реализации возможности работы в данных областях на модели крыс. Наконец, наибольшую ценность имеют полученные результаты, доказывающие выраженную антиоксидантную активность пероксиредоксина-6, что проявляется не только удовлетворительным функциональным статусом донорских легких в период EVLP, но и физиологическими показателями органа в раннем посттрансплантационном периоде. Поскольку основной тенденцией мирового научного сообщества является поиск эффективного метода борьбы с ишемически-реперфузионным повреждением, необходимо более подробно проводить исследования для установления пределов эффективности и биологического функционирования данного уникального антиоксиданта.

Результаты настоящей научной работы демонстрируют убедительную эффективность разработанного раствора, высокие показатели антиоксидантной активности пероксиредоксина-6 и уникальную научную ценность малообъемного перфузионного стенда, что создает предпосылки для реализации дальнейшей интеграции в программу трансплантации легких в Российской Федерации, а так же развития масштабных исследований в данной области.

ОБСУЖДЕНИЕ

Трансплантация легких имеет все большее значение в системе медицинской помощи населению, однако, несмотря на высокую актуальность данной процедуры, существуют серьезные проблемы для активного развития. Отдаленная выживаемость реципиентов после трансплантации донорских легких, согласно общемировой статистике, ниже в сравнении с трансплантациями других солидных органов. Одной из ведущих причин низких показателей является первичная дисфункция трансплантата, тяжелая форма острого повреждения легких на фоне высокоактивной ишемически-реперфузионной реакции, которая проявляется у 50% реципиентов донорских легких и увеличивает риск ранней послеоперационной летальности в 8 раз. Согласно многочисленным исследованиям, достоверно известно, что ведущую роль в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения играет звено продукции и высвобождения оксидаз. Огромный вклад в образование активных форм кислорода приносят NADPH – оксидазы, что сопровождается увеличением сосудистой проницаемости вследствие поражения преимущественно гладкомышечных и эндотелиальных клеток. Генерация супероксида во внеклеточное пространство приводит к его распаду посредством ферментативных и неферментативных путей на вторичные активные формы кислорода. Как было описано выше, пероксиредоксин и его модифицированные формы вводятся непосредственно перед восстановлением перфузии в ишемизированном органе с целью нейтрализации ряда гидроксипероксидов, влияя на концентрацию пероксидов в органе в целом, а также, косвенно, в макроорганизме. Нормотермическая машинная перфузия *ex vivo* – перспективный метод оценки и реабилитации донорских легких на дотрансплантационном этапе. Данная процедура позволяет безопасно и эффективно оценить возможность трансплантации органа, а также открывает безграничные возможности для селективной доставки высокоактивных

препаратов и веществ, таких, например, как пероксиредоксин-6. Не менее важное значение нормотермической перфузии отводится с позиции системы, обеспечивающей гладкое, контролируемое проведение реперфузии после длительного времени консервации. Основным компонентом – перфузионный раствор – является высокоосмолярным сбалансированным коллоидным агентом, обеспечивающим гомеостаз в изолированных легких, а также покрытие энергетической задолженности и стабилизацию альвеолярно-капиллярной мембраны. Корректно подобранные компоненты раствора позволяют не только проводить краткосрочную оценку трансплантата, но и на протяжении длительного времени выполнять умеренную дегидратацию паренхимы, добиться гомеостатического равновесия и восстановления функционального статуса органа. Таким образом, представленное исследование содержит все требуемые компоненты для совершенствования нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* и глубокого понимания патофизиологических процессов ишемически-реперфузионного повреждения в программе трансплантации легких. Так как основной задачей настоящего исследования являлось не только изучение проблемы ишемически-реперфузионного повреждения, но и испытание опытного раствора на основе декстрана-40, каждый из полученных результатов имеет крайне важное значение, а взаимосвязь между показателями требует отдельного анализа.

В рамках данной научной работы при проведении экспериментальных исследований обращает на себя внимание тенденция утилизации глюкозы во всех исследуемых группах. Глюкоза, являясь основным энергетическим субстратом, метаболизируется двумя биологическими путями – при помощи осмотической концентрации и инсулин-опосредованный транспорт. В исходе наблюдений отмечается тенденция умеренного метаболизма глюкозы, что обратно пропорционально интенсивности реперфузионного процесса и, следовательно, уровню лактата и бикарбонатных оснований в показателях анализов перфузата. Именно темп утилизации глюкозы является наиважнейшим косвенным индикатором

выраженности реперфузии вследствие энергетического дефицита и высвобождения метаболитов анаэробного дыхания. Несмотря на продолжительное время консервации, использование пероксиредоксина-6 в качестве адьюванта достоверно снижает темп потребления глюкозы в экспериментальных группах, влияя на патогенетическое звено реперфузионных повреждений, разрывая порочный круг усугубления метаболической дисфункции. В свою очередь, лактат – продукт анаэробного метаболизма, являющийся предиктором ранней первичной дисфункции трансплантата, достоверно демонстрирует степень ишемически-реперфузионного повреждения, а степень прироста показателей является предиктором снижения функционального статуса донорских легких даже на фоне стабилизации гомеостатических показателей. Несмотря на выраженное увеличение лактата в экспериментальных группах без применения пероксиредоксина-6, предельные значения, тем не менее, не превышают установленного максимума для стандартных протоколов нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo*. Разница между уровнями лактата, в совокупности с уровнем бикарбонатных оснований, в группах с пероксиредоксином-6 и без него наглядно представляет выраженность пероксидной активности и ее влияние на кислотно-основной гомеостаз при использовании стандартных протоколов EVLP и эффективных консервирующих агентов. Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о высокой эффективности антиоксидантов в раннем реперфузионном периоде, позволяя снизить патологическое воздействие порочного метаболического круга анаэробного гликолиза и аноксии в целом, что проявляется низкими, более физиологичными темпами утилизации глюкозы, умеренным приростом лактата и удовлетворительно низким снижением уровня бикарбонатных оснований.

Не менее значимым результатом, полученным в процессе научного исследования, является совокупность показателей индекса PaO_2/FiO_2 в экспериментальных группах и сравнение их средних значений. В настоящее время, не смотря на обилие биохимических, морфологических и функциональных

показателей для оценки статуса донорских легких в клинической программе трансплантации органов, отсутствует более объективный и статистически достоверный критерий, характеризующий функциональный статус трансплантата. Именно индекс PaO_2/FiO_2 привносит существенный вклад в принятие решений о необходимости проведения нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo*. В процессе проведения EVLP во всех группах были отмечены высокие показатели индекса PaO_2/FiO_2 , что являлось признаком исключительно корректного проведения фармако-холодовой консервации донорских легких, а также отсутствия дефекта при выполнении процедуры нормотермической перфузии *ex vivo*. Подобный вывод является следствием условий научного исследования: трансплантаты легких, полученные от донора не имели критериев субоптимального функционального статуса, а показатели контрольных исследований газового состава образцов крови донора соответствовали цифрам, указанным в фундаментальных исследованиях [14, 20, 67, 83, 108]. Следовательно, показатели индекса PaO_2/FiO_2 более 400 во всех экспериментальных группах доказывали эффективность и безопасность фармако-холодовой консервации опытным раствором на основе декстрана-40, а также подтверждали возможность проведения нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* как всемирно признанным раствором Steen Solution®, так и опытным раствором на основе декстрана-40 с добавлением препаратов крови. Совершенно противоположная значимость индекса PaO_2/FiO_2 наблюдалась непосредственно после ортотопической унилатеральной трансплантации донорского левого легкого во всех экспериментальных группах. В исходе острых экспериментов с периодом наблюдения до 120 минут было отмечено, что несмотря на удовлетворительные показатели газового состава крови реципиента, отобранные селективно из трансплантата, цифры индекса PaO_2/FiO_2 в группе проведения EVLP с применением опытного раствора на основе декстрана-40 с добавлением компонентов крови значительно выше, более чем в 2 раза, нежели в группе с использованием контрольного раствора Steen Solution®, являющегося

общемировым стандартом. Полученные результаты, наравне с удовлетворительными темпами потребления глюкозы и умеренным приростом лактата, позволяют сделать вывод о высокой эффективности опытного раствора в качестве перфузионного агента в сравнении с аналогом, что обусловлено высокими буферными и антиреперфузионными свойствами, обеспечивающими не только безопасное проведение первичной реперфузии донорских легких, но и стабильность гомеостатических показателей, протективно влияющих на функциональный статус трансплантата в процессе EVLP. В то же время, использование антиоксидантного адьюванта пероксиредоксина-6 в составе перфузионного раствора достоверно обеспечивало высокие показатели индекса PaO_2/FiO_2 в экспериментальных группах с использованием Steen Solution® и опытного раствора. Опираясь на графики изменения метаболических характеристик, допустимо отметить, что антиоксидант благоприятно влиял на функциональный статус донорских легких, снижая интенсивность патологического воздействия реперфузионного процесса и способствовал повышению протективных свойств перфузионных растворов. Подобное заключение отчетливо демонстрировалось результатами оценки индекса PaO_2/FiO_2 после проведения левосторонней трансплантации донорского легкого реципиенту, что свидетельствовало об отсутствии компрометирующих факторов на донорские легкие в период проведения EVLP и высоком функциональном статусе трансплантата.

В процессе нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo* в результате анализа данных была отмечена и исследована тенденция увеличения легочного сосудистого сопротивления. Несмотря на то, что исходно в некоторых случаях регистрировались высокие цифры давления в легочной артерии, далее происходило снижение перфузионных показателей, несмотря на повышение скорости перфузии. Данная особенность является отражением инициации стадии реперфузии и постепенной стабилизации сосудистого русла. Согласно полученным результатам, с повышением температуры и объемной скорости перфузии, а также

началом механической вентиляции донорских легких, предполагаемые реперфузионные реакции достигали пика и постепенно регрессировали, что проявлялось статистически значимым динамическим снижением показателей ЛСС после 30 минут процедуры. Однако далее, в экспериментальных группах Steep Solution® и опытного раствора наблюдалась тенденция к постепенному увеличению показателей перфузионного давления и ЛСС, что объясняется истощением протективных свойств перфузионных растворов. Несмотря на то, что предельные значения давления в легочной артерии были в обеих группах в рамках референсных значений, результаты резко отличаются от групп с применением экзогенного антиоксиданта. Именно использование пероксиредоксина-6 позволило предотвратить резкий прирост перфузионных показателей в период инициации EVLP, а в процессе перфузии стабилизировать постреперфузионную реакцию сосудистого русла, что проявлялось статичными показателями ЛСС и давления в легочной артерии на протяжении процедуры нормотермической перфузии. Подобный результат также отражен во французском исследовании, суть которого заключалась в определении факторов, влияющих на интерстициальный отек донорских легких [30]. Эндогенная лабильность сосудистого русла является косвенным отражением отсутствия признаков экстравазации жидкости, что позволяет сделать вывод о более низкой степени интерстициального отека в процессе EVLP с применением пероксиредоксина-6, нежели без использования данного антиоксиданта. Выше описанное утверждение объективно демонстрируется результатами гистологических и морфологических исследований.

Одним из косвенных критериев оценки функционального статуса донорских легких является также и совокупность параметров механической вентиляции. Искусственная вентиляция легких на экспериментальных животных-крысах ограничена в своей возможности широкого мониторинга респираторной механики, однако, данные о пиковом давлении в дыхательных путях на вдохе при заданном объеме вдоха с учетом положительного давления в конце выдоха позволяют

объективно оценить состояние легких. В представленном исследовании были продемонстрированы графики изменения пикового давления на вдохе с учетом неизменности других параметров искусственной вентиляции, а стандартные параметры респираторной системы крыс были соотнесены с данными отечественных и международных исследований на данную тему [1, 13, 27]. В результате анализа полученных данных обращают внимание увеличенные показатели пикового давления на вдохе в группе с применением Steen Solution® в качестве перфузионного раствора. Подобная особенность является подтверждением ранее описанных результатов и выступает индикатором выраженного интерстициального отека, который был индуцирован во время EVLP в связи с низкой лабильностью сосудистого русла, а на этапе пострасплантационной реперфузии лишь усугубил свое влияние на функциональный статус донорского легкого. Данная тенденция прослеживается также во всех экспериментальных группах, однако выраженность увеличения пикового давления на вдохе снижается, что позволяет сделать вывод о сниженном реперфузионном повреждении и выраженных пульмонпротективных свойствах декстрана-40 и антиоксиданта пероксиредоксина-6. Гистологические исследования, проведенные в исходе 120 минутного наблюдения после ортотопической унилатеральной трансплантации левого легкого в каждой из групп, объективно демонстрируют отсутствие вентилятор-ассоциированных повреждений, а также наличие интерстициального отека разной степени выраженности, в зависимости от исследуемой группы, что объясняет полученные статистические данные изменения респираторной механики донорских легких, в частности, показателей пикового давления на вдохе в пострасплантационном периоде.

Известно, что пероксиредоксин-6, который обильно представлен в эпителии всех отделов респираторного тракта, является важнейшим антиоксидантом верхних дыхательных путей (обонятельного эпителия, трахеи) и легких млекопитающих [11, 41, 53]. Очевидно, что рост экспрессии эндогенного (PRDX6) в 2-3,5 раза является адаптивным ответом легочной ткани на развитие окислительного стресса на

стадии реперфузии. В тоже время, предварительное введение экзогенного Prx6 перед трансплатацией подавляет индукцию экспрессии эндогенного PRDX6, что свидетельствует о снижении в тканях уровня АФК, активирующих транскрипционные факторы NRF2 и NF-κB, которые в свою очередь регулируют экспрессию гена PRDX6 [103]. Интересно отметить, что предварительное введение экзогенного Prx6 в перфузионный раствор снижает в 8 – 12 раз экспрессию одного из его регуляторов – NF-κB, что соответствует классической картине регуляции экспрессии генов по принципу негативной обратной связи. При этом, активацию транскрипционного фактора NF-κB зачастую связывают с развитием воспалительных процессов, так как он контролирует экспрессию многих провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 [105]. Как видно из Таблицы 5, экзогенный Prx6 не только подавляет индукцию NF-κB, но и существенно снижает экспрессию IL-6, особенно наглядно это проявляется спустя 12 часов ишемии. Маркер Ki67 широко используется для оценки пролиферативной активности клеток, который активируется при острых воспалительных процессах, а также при онкологических заболеваниях [102]. Наглядно демонстрируется, что Ki67 адаптивно (в ответ на острое воспаление) возрастает при ОТТЛ более чем в 25 раз после 12 часов ишемии. Экзогенный Prx6 достоверно снижает индукцию экспрессии Ki67, что может указывать на снижение воспалительных процессов в легочной ткани и их большую сохранность. Известно, что металлопротеиназа 9 (ММР-9) или желатиназа В, участвует в легочном фиброзе, а также оверэкспрессируется при различных формах рака легких [68]. Значительный рост уровня экспрессии ММР-9 связывают с воспалительными процессами, вызванными повреждением или ремоделированием тканей [68]. Примечательно, в нормальных легочных фибробластах уровень экспрессии ММР-9 крайне низкий, это делает ММР-9 удобным маркером патологических изменений в легочной ткани [59]. Как видно из таблицы 5, экзогенный Prx6 более чем в 4 раза снижает индукцию экспрессии ММР-9, что также свидетельствует о снижении воспалительных процессов в легочной ткани и

коррелирует с результатами для других провоспалительных генов (NF-κB, IL-6). Эффекторная каспаза 3 (CASP-3) является общепринятым маркером апоптотической гибели клеток [34]. В результате проведенного исследования было продемонстрировано преимущество опытного раствора на основе декстрана-40 с добавлением компонентов крови в сравнении с официальным перфузионным агентом Steen Solution® при проведении нормотермической машинной перфузии донорских легких *ex vivo*. Высокая эффективность разработки, безусловно, является перспективным направлением для дальнейших исследований на крупных животных с возможностью внедрения в клиническую практику в рамках клинической программы EVLP. Необходимо также отметить, что в настоящем исследовании была продемонстрирована высокая значимость препаратов крови при проведении процедуры нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*. Данной качество объясняется высокой буферной емкостью эритроцитов, что в исходе значительно влияет не только на возможность проведения длительной перфузии, но и на функциональный статус трансплантата. Ряд зарубежных исследований демонстрируют высокую эффективность препаратов крови в качестве компонента перфузионного раствора для EVLP [49, 112]. Не менее значимым результатом данной научной работы является возможность проведения фармако-холодовой консервации донорских легких опытным раствором на основе декстрана-40, а также подтверждение безопасности и эффективности данной разработки экспериментальным путем на крысах в статистически значимой выборке. Полученные данные открывают потенциал для расширения настоящего исследования с целью проведения доклинического изучения всесторонних аспектов влияния декстрана-40 на донорские легкие с возможностью внедрения разработки в клиническую практику трансплантологических центров в качестве консервирующего агента для донорских легких. Разработанный малообъемный экспериментальный стенд открывает новые возможности для научной деятельности, в частности, исследований патофизиологических аспектов влияния

нормотермической перфузии донорских легких *ex vivo*, решения проблем клинической трансплантации легких, изучения влияния существующих фармакологических препаратов и эффективное исследование новых молекул. Малый объем заполнения перфузионного стенда обеспечивает возможность использования препаратов крови с достижением требуемых показателей гематокрита, что позволяет в рамках научно-экспериментальной деятельности воссоздать условия, максимально приближенные к физиологичным в организме лабораторных животных.

Отдельное значение выделяется данным, полученным в исходе настоящего исследования, демонстрирующим биологическое воздействие на донорские легкие антиоксиданта пероксиредоксина-6. Уникальный белок, наличие которого отмечается у всех живых организмов, показал впечатляющую активность при экзогенном введении селективно в трансплантат легких при выполнении нормотермической машинной перфузии *ex vivo*. Его выраженное антиреперфузионное воздействие на донорский орган, безусловно, является ценным открытием, а возможность проведения своего рода «прекондиционирования», позволяет пролонгировать антиоксидантное действие после *ex vivo* в условиях *in vitro*. Необходимо продолжить исследования влияния пероксиредоксина-6 на органы и системы в различных условиях, а также приближать возможность внедрения данного антиоксиданта в клиническую практику, поскольку Prx-6 – новое оружие в борьбе с патофизиологическим влиянием процесса ишемии-реперфузии на исход не только в области трансплантации органов, но и медицины в целом.

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 $\text{FiO}_2/\text{PaO}_2 > 350$), 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 $\text{FiO}_2/\text{PaO}_2$, 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-6 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 СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДЛА – давление в легочной артерии

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

ИКРП – ишемическое консервационно-реперфузионное повреждение

ИО – индекс оксигенации

ИРП – ишемически-реперфузионное повреждение

ЛСС – легочное сосудистое сопротивление

мОсм – осмолярность

МСК – мезенхимальные стромальные клетки

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

ОРДС – острый респираторный дистресс синдром

ПААГ – полиакриамидный гель

ПД – пиковое давление на вдохе

ПДКВ – положительное давление конца выдоха

ПСС – периферическое сосудистое сопротивление

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СВ – сердечный выброс

ТЭЛА – тромбоэмболия легочной артерии

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

ЧДД – частота дыхательных движений

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭКГ – электрокардиография

ОТТЛ – ортотопическая трансплантация легких

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

FiO_2 – фракция кислорода на входе

LAP – давление в левом предсердии

PaF – объем перфузии

PaO₂ – парциальное артериальное давление кислорода

PAP – давление в легочной артерии

pCO₂ – давление углекислого газа

pH – кислотность раствора

pO₂ – давление кислорода

P_{peak} – пиковое давление на входе

Prx6 – пероксиредоксин-6

PVR – ленточное сосудистое сопротивление

QH₂ – убихинон

SpO₂ – сатурация кислорода

V_{дых} – объем дыхания

V_{пот} – объем потока

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Визуализация дыхательной системы лабораторных животных методом МРТ на ядрах фтора [Электронный ресурс] / О. С. Павлова, В. Н. Семенова, М. В. Гуляев и др. // Журнал радиоэлектроники. – 2018. – № 11. – URL: <http://jre.cplire.ru/jre/nov18/16/text.pdf> (дата обращения: 20.03.2023). – DOI 10.30898/1684-1719.2018.11.16.
2. Влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на секрецию гистамина тучными клетками / М. А. Челомбитько, Т. В. Васильева, А. В. Федоров и др. // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2018. – № 6. – С. 282-287.
3. Готье, С. В. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2021 году. XIV сообщение регистра Российского трансплантологического общества / С. В. Готье, С. М. Хомяков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24, № 3. – Р. 8-31. – DOI 10.15825/1995-1191-2022-3-8-31.
4. Грудинин, Н. В. Нормотермическая машинная *ex vivo* перфузия донорских легких в условиях эксперимента : дис. ... кандидата медицинских наук : 3.1.14 : Трансплантология и искусственные органы / Грудинин Никита Владимирович ; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В. И. Шумакова». – Москва, 2021. – 103 с.
5. Елтышева, И. В. Влияние антибактериальных факторов на смешанную культуру *Escherichia coli* и *Staphylococcus epidermidis* в условиях повышенного осмотического давления / И. В. Елтышева, Л. Е. Затворницкий, И. Л. Масленникова // Вестник ПГУ. Биология. – 2020. – № 1. – С. 19-25. – DOI 10.17072/1994-9952-2020-1-19-25.
6. *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.

7. Зарубина, И. В. К механизму противоишемического действия полипренолов / И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов, V. S. Soultanov // Медицинский академический журнал. – 2011. – Т. 11, №2. – С. 25-32. – DOI 10.17816/MAJ11225-32. 72.

8. Кардиопротекторный эффект модифицированных пероксиредоксинов при ретроградной перфузии изолированного сердца крысы в условиях окислительного стресса / Е. В. Карадулева, Мубаракшина Э. К., Шарапов М. Г., и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Vol. 160, № 11. – P. 584-588. – DOI 10.1007/s10517-016-3237-1. 96.

9. Кочкина, А. В. Влияние пероксиредоксина 6 и паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток на цитокиновый профиль кожи крысы при химическом ожоге // Вестник новых медицинских технологий. – 2017. – № 1. – С. 65-70. – DOI 12737/25242. 87.

10. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, №4. – С. 13-21. – DOI 10.17816/RCF12413-21. 83.

11. Новоселов, В.И. Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания. // Пульмонология. – 2012. – Т.1 – С.83–87. 110.

12. Нормотермическая *ex vivo* перфузия изолированных легких в эксперименте с использованием отечественного перфузионного аппаратного комплекса / С. В. Готье, О. М. Цирульникова, И. В. Пашков и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2022. – Т. 24, № 2. – С. 94-101. – DOI 10.15825/1995-1191-2022-2-94-101. 5.

13. Особенности внешнего дыхания крыс при развитии острой гипоксии с гиперкапнией и ее коррекции новым антигипоксантом металлокомплексной

природы / Д. В. Сосин, А. В. Евсеев, В. А. Правдивцев, П. Д. Шабанов // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2014. – № 2. – С. 36-42. – DOI 10.17816/RCF12236-42. 106.

14. Особенности дыхательной системы животных, используемых в доклинических исследованиях, которые необходимо учитывать при моделировании патологий легких / Д. Р. Каргопольцева, А. Е. Кательникова, К. Л. Крышень, Я. А. Гущин // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2020. – № 4. – С. 71-85. – DOI 10.29296/2618723X-2020-04-08. 103.

15. Осложнения раннего послеоперационного периода после трансплантации легких / И. В. Пашков, В. Н. Попцов, Д. О. Олешкевич, С. В. Готье // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 125-137. – DOI 10.15825/1995-1191-2019-2-125-137.

16. Оценка эффективности разработанного перфузионного раствора для нормотермической *ex vivo* перфузии легких по сравнению со Steen Solution™ (экспериментальное исследование) / С. В. Готье, О. М. Цирульникова, И. В. Пашков и др. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2021. – Т. 23, № 3. – С. 82-89. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2021-3-82-89>.

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

18. 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.

19. Роль фармакологического прекондиционирования при ишемических и реперфузионных повреждениях почек / Д. А. Костина, Т. Г. Покровская, Ю. В.

Олефир и др. // Урология. – 2017. – № 5. – С. 139-144. – DOI 10.18565/urology.2017.5.139-144.

20. Рябинкова, И. М. Динамика гематологических показателей и газового состава крови у крыс, экспериментально инвазированных яйцами *Ascaris Suum* / И. М. Рябинкова, А. В. Притыченко, И. П. Кошенок // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2013. – № 16, № 2. – С. 294-299.

21. Сравнительная противовоспалительная и эрготропная активность метапрота, трекрезана и полиоксидония и их комбинаций при экспериментальном бронхолегочном воспалении у крыс / И. В. Зарубина, Е. В. Мокренко, А. В. Болехан и др. // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 3. – С. 48-56. – DOI 10.17816/MAJ16348-56.

22. Цирульникова, О. М. Печень в ранние сроки после ее обширных резекций и трансплантации: дис. ... доктора медицинских наук : 14.00.27 : Хирургия; 14.00.41 : Трансплантология и искусственные органы / Цирульникова Ольга Мартеновна ; ГНЦ РФ ФГБУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского». – Москва, 2004. – 283 с.

23. Шарапов, М. Г. Пероксиредоксины – многофункциональные ферменты / М. Г. Шарапов, В. К. Равин, В. И. Новоселов // Молекулярная биология. – 2014. – Т. 48, № 4. – С. 600-628. – DOI 10.7868/S0026898414040120.

24. Шарапов, М. Г. Роль пероксиредоксинов в патологиях, сопровождающихся окислительным стрессом. Перспективы применения экзогенных пероксиредоксинов / М. Г. Шарапов, Е. Е. Фесенко, В. И. Новоселов // Биофизика. – 2018. – Т. 63, № 4. – Р. 734-750. – DOI 10.1134/s0006302918040117.

25. Эффект кондиционированной сред, полученной из культивированных мезенхимальных стволовых клеток, на регенерацию эндотелия при HCL-индуцированном повреждении трахеи / А. А. Темнов, А. Г. Волкова, А. В. Мелерзанов, В. И. Новоселов // Патологическая физиология и экспериментальная

терапия. – 2017. – Т. 61, № 2. – P. 28-36. – DOI <https://doi.org/10.25557/0031-2991.2017.02.28-36>.

26. A comparative study of cardiac preservation with Celsior or University of Wisconsin solution with or without prior administration of cardioplegia / N. Boku, Y. Tanoue, N. Kajihara et al. // *Journal of heart and lung transplantation*. – 2006. – Vol. 25, № 2. – P. 219-25. – DOI 10.1016/j.healun.2005.08.009. – PMID 16446224.

27. Ahmad, K. Ex vivo lung perfusion: a review of current and future application in lung transplantation / K. Ahmad, J. L. Pluhacek, A. W. Brown // *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. – 2022. – Vol. 8. – P. 149-165. – DOI 10.1007/s41030-022-00185-w.

28. Airway complications after lung transplantation : benefit of a conservative bronchoscopy strategy / A. Patoir, A. Luchez, O. Tiffet et al. // *Journal of thoracic disease*. – 2020. – Vol. 12, № 5. – P. 2625-2634. – DOI 10.21037/jtd.2020.03.21. – PMID 32642170. – PMCID PMC7330399.

29. Analysis of sex-based differences in clinical and molecular responses to ischemia reperfusion after lung transplantation / L. Chacon-Alberty, S. Ye, D. Daoud et al. // *Respiratory research*. – 2021. – Vol. 22. – P. 318. – DOI 10.1186/s12931-021-01900-y. – PMID 34937545. – PMCID PMC8693497.

30. Assessment of lung edema during ex-vivo lung perfusion by single transpulmonary thermodilution : a preliminary study in humans / G. Trebbia, E. Sage, Le M. Guen // *Journal of heart and lung transplantation*. – 2019. – Vol. 38, № 1. – P. 83-91. – DOI 10.1016/j.healun.2018.09.019. – PMID 30391201.

31. Atik, M. Dextrans, their use in surgery and medicine / M. Atik // *Anesthesiology*. – 1966. – Vol. 27. – P. 425-438. – DOI 10.1097/00000542-196607000-00008. – PMID 5946522.

32. Baehr, A. Evaluating novel targets of ischemia reperfusion injury in pig models / A. Baehr, N. Klymiuk, C. Kupatt // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 19. – P. 4749. – DOI 10.3390/ijms20194749. – PMID 31557793. – PMCID PMC6801853.

33. Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and the cardiac necrotic program / C. P. Baines // *Pediatric cardiology*. – 2011. – Vol. 32, № 3. – P. 258-62. – DOI 10.1007/s00246-010-9880-9. – PMID 21210090.
34. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis / M. Brentnall, L. Rodriguez-Menocal, R. L. De Guevara [et al] // *BMC cell biology*. – 2013. – Vol. 9, № 14. – P. 32. doi: 10.1186/1471-2121-14-32.
35. Capuzzimati, M. Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation / M. Capuzzimati, O. Hough, M. Liu // *The journal of heart and lung transplantation*. – 2022. – Vol. 41, Is. 8. – P. 1003-1013. – ISSN 1053-2498. – DOI 10.1016/j.healun.2022.05.013. – PMID 35710485.
36. Chelombitko, M. A. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 (10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenyl-phosphonium Bromide) Inhibits Mast Cell Degranulation in vivo and in vitro / M. A. Chelombitko // *Biochemistry (Mosc)*. – 2017. – Vol. 82, № 12. – P. 1493-1503. – DOI 10.1134/S0006297917120082. – PMID 29486699.
37. Chen, J. Lung transplantation in China : a new era in perspective / J. Chen, C. Hu, X. Li // *Current challenges in thoracic surgery*. – 2022. – Vol. 4. – P. 2. – DOI 10.21037/ccts-21-10.
38. Chen-Yoshikawa, T. F. Ischemia-reperfusion injury in lung transplantation / T. F. Chen-Yoshikawa // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 1333. – DOI 10.3390/cells10061333. – PMID 34071255. – PMCID PMC8228304.
39. Chen-Yoshikawa, T. F. Ischemia-reperfusion injury in lung transplantation / T. F. Chen-Yoshikawa // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 1333. – DOI 10.3390/cells10061333. – PMID 34071255. – PMCID PMC8228304.
40. Chronic kidney disease and NLRP3 inflammasome : pathogenesis, development and targeted therapeutic strategies / G. Huang, Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Ma // *Biochemistry and biophysics reports*. – 2022. – Vol. 33. – P. 101417. – DOI 10.1016/j.bbrep.2022.101417. – PMID 36620089. – PMCID PMC9813680.
41. Chuchalin A.G., Novoselov V.I., Shifrina O.N., Soodaeva S.K., Yanin V.A.,

Barishnikova L.M. Peroxiredoxin VI in human respiratory system. // *Respir Med.* – 2003. – V.97. – P.147–151.

42. Clinical outcomes of the Lund, Toronto, and organ care system protocols for normothermic *ex vivo* lung perfusion : a systematic review and pursuit of network meta-analysis / E. S. Knijff, M. A. Hu, Z. L. Zhang, M. E. Erasmus // *The journal of heart and lung transplantation.* – 2021. – Vol. 40, Is. 4. – P. S308-S309. – ISSN 1053-2498. – DOI 10.1016/j.healun.2021.01.874.

43. Creech, O. Jr. Chemotherapy of cancer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit / O. Jr. Creech, E. T. Krementz, R. F. Ryan // *Annals of surgery.* – 1958. – Vol. 148, № 4. – P. 616-632. – DOI 10.1097/00000658-195810000-00009. – PMID 13583933. – PMCID PMC1450870.

44. Cytoprotective and antioxidant effects of steen solution on human lung spheroids and human endothelial cells / F. Pagano, C. Nocella, S. Sciarretta et al. // *American journal of transplantation.* – 2017. – Vol. 17. – P. 1885-1894. – DOI 10.1111/ajt.14278. – PMID 28322021.

45. Different decellularization methods in bovine lung tissue reveals distinct biochemical composition, stiffness, and viscoelasticity in reconstituted hydrogels / A. Kuşoğlu, K. Yangın, S.N. Özkan et al. // *ACS applied bio materials.* – 2023. – Vol. 6, № 2. – P. 793-805. – DOI 10.1021/acsabm.2c00968. – PMID 36728815. – PMCID PMC9945306.

46. DNA structure directs positioning of the mitochondrial genome packaging protein Abf2p / A. Chakraborty, S. Lyonnais, F. Battistini et al. // *Nucleic acids research.* – 2017. – Vol. 45, № 2. – P. 951-967. – DOI 10.1093/nar/gkw1147. – PMID 27899643. – PMCID PMC5314765.

47. Eisenberg, S. The effect of low molecular weight dextran on the viscosity and suspension characteristics of blood / S. Eisenberg // *American journal of the medical sciences.* – 1969. – Vol. 257. – P. 336-343. – DOI 10.1097/00000441-196905000-00006. – PMID 5795738.

48. Enhanced mitochondrial DNA repair resuscitates transplantable lungs donated after circulatory death / Y. B. Tan, V. M. Pastukh, O. M. Gorodnya et al. // Journal of surgical research. – 2020. – Vol. 245. – P. 273-280. – DOI 10.1016/j.jss.2019.07.057. – PMID 31421373. – PMCID PMC6900440.

49. *Ex vivo* enzymatic treatment converts blood type A donor lungs into universal blood type lungs / A. Wang, R. V. P. Ribeiro, A. Ali et al. // Science translational medicine. – 2022. – Vol. 14, № 632. – P. eabm7190. – DOI 10.1126/scitranslmed.abm7190. – PMID 35171649.

50. *Ex vivo* lung perfusion review of a revolutionary technology / G. Makdisi, T. Makdisi, T. Jarmi, C. C. Caldeira // Annals of translational medicine. – 2017. – Vol. 5, № 17. – P. 343. – DOI 10.21037/atm.2017.07.17. – PMID 28936437. – PMCID PMC5599284.

51. *Ex vivo* lung perfusion review of a revolutionary technology / G. Makdisi, T. Makdisi, T. Jarmi, C. C. Caldeira // Annals of translational medicine. – 2017. – Vol. 5, № 17. – P. 343. – DOI 10.21037/atm.2017.07.17. – PMID 28936437. – PMCID PMC5599284.

52. Extracorporeal Membrane Oxygenation to Facilitate Chemotherapy-Moving the Goalposts! / E. A. Chishti, T. Marsden, A. Harris et al. // Cureus. – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. e29576. – DOI 10.7759/cureus.29576. – PMID 36312653. – PMCID PMC9595260. 24.

53. Fisher A.B. Peroxiredoxin 6 in the repair of peroxidized cell membranes and cell signaling. // Arch Biochem Biophys. – 2017. – V.617. – P.68–83.

54. Fisher, A. B. Intermediary metabolism of the lung / A. B. Fisher // Environmental health perspectives. – 1984. – Vol. 55. – P. 149-158. – DOI 10.1289/ehp.8455149. – PMID 6376097. – PMCID: PMC1568362.

55. Fisher, A. B. Intermediary metabolism of the lung / A. B. Fisher // Environmental health perspectives. – 1984. – Vol. 55. – P. 149-158. – DOI 10.1289/ehp.8455149. – PMID 6376097. – PMCID PMC1568362.

56. Fricke, R. F. Effects of insulin and diabetes on 2-deoxy-D-glucose uptake by the isolated perfused rat lung / R. F. Fricke, W. J. Longmore // *Journal of biological chemistry*. – 1979. – Vol. 254, № 12. – P. 5092-5098. – DOI 10.1016/S0021-9258(18)50564-0. – PMID 221459.

57. Generation of vascular chimerism within donor organs / S. Cohen, S. Partouche, M. Gurevich et al. // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 13437. – DOI 10.1038/s41598-021-92823-7. – PMID 34183759. – PMCID PMC8238957.

58. Gu, C. Progress of clinical application for *Ex Vivo* Lung Perfusion (EVLV) in lung transplantation / C. Gu, X. Pan, J. Shi // *Methods in molecular biology*. – 2020. – Vol. 2204. – P. 217-224. – DOI 10.1007/978-1-0716-0904-0_19. – PMID 32710328.

59. Henry M. T., McMahon K., Mackarel A. J. et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF // *Eur. Resp. J.* 2002. Vol. 20. P. 1220–1227.

60. Heparanase inhibition preserves the endothelial glycocalyx in lung grafts and improves lung preservation and transplant outcomes / K. Noda, B.J. Philips, M.E. Snyder et al. // *Scientific reports*. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 12265. – DOI 10.1038/s41598-021-91777-0. – PMID 34112915. – PMCID PMC8192744.

61. Immunometabolic endothelial phenotypes : integrating inflammation and glucose metabolism / W. Xiao, W. M. Oldham, C. Priolo et al. // *Circulation research*. – 2021. – Vol. 129, № 1. – P. 9-29. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.120.318805. – PMID 33890812. – PMCID PMC8221540.

62. Implementation of an experimental isolated lung perfusion model on surgically resected human lobes / A. Slama, C. Raber, C. Hedderich et al. // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 12193. – DOI 10.1038/s41598-019-48719-8. – PMID 31434960. – PMCID PMC6704181.

63. Individualized flow-controlled versus conventional pressure-controlled ventilation in on-pump heart surgery (FLOWVENTIN HEARTSURG): study protocol for a randomized controlled trial / S. Becker, R. Schnitzler, M. Rembecki et al. // *Trials*. –

2023. – Vol. 24, № 1. – P. 195. – DOI 10.1186/s13063-023-07201-7. – PMID 36922825. – PMCID PMC10018968.

64. Inhaled nitric oxide : role in the pathophysiology of cardio-cerebrovascular and respiratory diseases / D. Signori, A. Magliocca, K. Hayashida et al. // Intensive care medicine experimental. – 2022. – Vol. 10, № 1. – P. 28. – DOI 10.1186/s40635-022-00455-6. – PMID 35754072. – PMCID PMC9234017.

65. Ischemia/Reperfusion / T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, R. J. Korthuis // Comprehensive physiology. – 2016. – Vol. 7, № 1. – P. 113-170. – DOI 10.1002/cphy.c160006. – PMID 28135002. – PMCID PMC5648017.

66. Ischemia-reperfusion-induced lung injury / M. de Perrot, M. Liu, T. K. Waddell, S. Keshavjee // American journal of respiratory and critical care medicine. – 2003. – Vol. 167, № 4. – P. 490-511. – DOI 10.1164/rccm.200207-670SO. – PMID 12588712.

67. Krynytska, I. The indices of niTrogeN (ii) oxide sysTem in experimenTal hepaTopulmonary syndrome / I. Krynytska, M. Marushchak // The Ukrainian biochemical journal. – 2018. – Vol. 90, № 11. – P. 91-97. – DOI 10.15407/ubj90.05.091.

68. Lagente V., Manoury B., Nénan S. et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling // Brazilian J. Med. Biol. Res. 2005. Vol. 38. P. 1521–1530.

69. L-alanyl-L-glutamine modified perfusate improves human lung cell functions and extend porcine *ex vivo* lung perfusion / L. Huang, O. Hough, R. N. Vellanki et al. // Journal of heart and lung transplantation. – 2023. – Vol. 42, № 2. – P. 183-195. – DOI 10.1016/j.healun.2022.10.022. – PMID 36411189.

70. Localization of 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties / S. V. Novoselov, I. V. Peshenko, V. I. Popov et al. // Cell and tissue research. – 1999. – Vol. 298, № 3. – P. 471-80. – DOI 10.1007/s004419900115. – PMID 10639737.

71. Long-term regeneration and remodeling of the pig esophagus after circumferential resection using a retrievable synthetic scaffold carrying autologous cells /

F. S. La, J. M. Aho, M. R. Barron et al. // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 4123. – DOI 10.1038/s41598-018-22401-x. – PMID 29515136. – PMCID PMC5841275.

72. Mechanistic analysis of nonoxygenated hypothermic machine perfusion's protection on warm ischemic kidney uncovers greater eNOS phosphorylation and vasodilation / N. Chatauret, R. Coudroy, P. O. Delpesch et al. // *American journal of transplantation*. – 2014. – Vol. 14. – P. 2500-2514. – DOI 10.1111/ajt.12904. – PMID 25307148.

73. Meng, Regulatory role of phosphoproteins in the development of bovine small intestine during early life / X. W. Zhao, H. L. Zhu, Y. X. Qi et al. // *Journal of dairy science*. – 2022. – Vol. 105, Is. 11. – P. 9240-9252. – DOI 10.3168/jds.2022-21983. – PMID 36175223.

74. Mesenchymal stromal cell therapy during *ex vivo* lung perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in lung transplantation / D. Nakajima, Y. Watanabe, A. Ohsumi et al. // *Journal of heart and lung transplantation*. – 2019. – Vol. 38, № 11. – P. 1214-1223. – DOI 10.1016/j.healun.2019.07.006. – PMID 31474491.

75. Milross, L. *Ex vivo* lung perfusion : a platform for donor lung assessment, treatment and recovery / L. Milross, C. Griffiths, A. J. Fisher // *Transplantation*. – 2021. – Vol. 2. – P. 387-395. – DOI 10.3390/transplantation2040037.

76. Mitochondrial ATP synthase tetramer disassembly following blood-based or Del Nido cardioplegia during neonatal cardiac surgery / B. V. Simon, G. Beutner, M. F. Swartz et al. // *Journal of extracorporeal technology*. – 2022. – Vol. 54, № 3. – P. 203-211. – DOI 10.1182/ject-203-211. – PMID 36742212. – PMCID PMC9891487.

77. MitoQ alleviates LPS-mediated acute lung injury through regulating Nrf2/Drp1 pathway / L. Hou, J. Zhang, Y. Liu et al. // *Free radical biology and medicine*. – 2021. – Vol. 165. – P. 219-228. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2021.01.045. – PMID 33539948.

78. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice / M. Scortegagna, K. Ding, Y. Oktay et al. //

Nature genetics. – 2003. – Vol. 35, № 4. – P. 331-340. – DOI 10.1038/ng1266. – PMID 14608355.

79. Murry, C. E. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium / C. E. Murry, R. B. Jennings, K. A. Reimer // Circulation. – 1986. – Vol. 74, № 5. – P. 1124-1136. – DOI 10.1161/01.cir.74.5.1124. – PMID 3769170.

80. Nakajima, D. *Ex vivo* lung perfusion in lung transplantation / D. Nakajima, H. Date // Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2021. – Vol. 69, № 4. – P. 625-630. – DOI 10.1007/s11748-021-01609-1. – PMID 33683575. – PMCID PMC7938286.

81. National heart, lung, and blood institute and American association for thoracic surgery workshop report : identifying collaborative clinical research priorities in lung transplantation / M. S. Mulligan, D. Weill, R. D. Davis et al. // Journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2018. – Vol. 156, Is. 6. – P. 2355-2365. – DOI 10.1016/j.jtcvs.2018.08.010. – PMID 30244865. – PMCID: PMC7333918.

82. Neonatal Diabetes International Collaborative Group. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations / E. P. Pearson, I. Flechtner, P. R. Njølstad et al. // New England journal of medicine. – 2006. – Vol. 355, № 5. – P. 467-77. – DOI 10.1056/NEJMoa061759. – PMID 16885550.

83. Normative data for arterial blood gas and electrolytes in anesthetized rats / R. K. Subramanian, A. Sidharthan, D. Maneksh et al. // Indian journal of pharmacology. – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 103-104. – DOI 10.4103/0253-7613.106451. – PMID 23543943. – PMCID PMC3608284.

84. Normothermic *ex vivo* lung perfusion : Toronto protocol / G. Hemant, C. Manyin, R. Rafaela [et al.]. – Toronto : CTSNet, Inc. Media, 2021. – DOI 10.25373/ctsnet.15149610.

85. Novel approaches for long-term lung transplant survival / C.L. Miller, J.M. O, J.S. Allan, J. C. Madsen // Frontiers in immunology. – 2022. – Vol. 13. – P. 931251. – DOI 10.3389/fimmu.2022.931251. – PMID 35967365. – PMCID PMC9363671.

86. Ohata, K. Human-scale lung regeneration based on decellularized matrix scaffolds as a biologic platform / K. Ohata, H.C. Ott // *Surgery today*. – 2020. – Vol. 50, № 7. – P. 633-643. – DOI 10.1007/s00595-020-02000-y. – PMID 32363425. – PMCID PMC7305261.

87. Ozaki, E. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases : current perspectives / E. Ozaki, M. Campbell, S. L. Doyle // *Journal of inflammation research*. – 2015. – Vol. 8. – P. 15-27. – DOI 10.2147/JIR.S51250. – PMID 25653548. – PMCID PMC4303395.

88. Perfusate adsorption during ex vivo lung perfusion improves early post-transplant lung function / I. Iskender, S. Arni, T. Maeyashiki et al. // *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2021. – Vol. 161, Is. 2. – P. e109-e121. – DOI 10.1016/j.jtcvs.2019.12.128. – PMID 32201002.

89. Préservation des organes à transplanter : une étape essentielle dans le parcours de la transplantation / S. Giraud, R. Thuillier, T. Kerforne et al. // *Revue sur les grandes avancées, bulletin de l'Académie Nationale de médecine*. – 2022. – Vol. 4. – P. 518-533. – DOI 10.1016/j.banm.2022.02.006.

90. Prognostic significance of non-infarcted myocardium correlated with microvascular impairment evaluated dynamically by native T1 mapping / B. H. Chen, D. A. An, C. W. Wu et al. // *Insights imaging*. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 50. – DOI 10.1186/s13244-022-01360-y. – PMID 36941401.

91. Prolonged EVLP using OCS lung : cellular and acellular perfusates / G. Loor, B.T. Howard, J.R. Spratt et al. // *Transplantation*. – 2017. – Vol. 101, № 10. – P. 2303-2311. – DOI 10.1097/TP.0000000000001616. – PMID 28009782. – PMCID PMC5481503.

92. Protective role of MG53 against ischemia/reperfusion injury on multiple organs : A narrative review / B. Xu, C. Wang, H. Chen et al. // *Frontiers in physiology*. – 2022. – Vol. 21, Is. 13. – P. 1018971. – DOI 10.3389/fphys.2022.1018971. – PMID 36479346. – PMCID PMC9720843.

93. *Pseudomonas aeruginosa* DPS (PA0962) functions in H_2O_2 mediated oxidative stress defense and exhibits in vitro dna cleaving activity / N. Rajapaksha, A. Soldano, H. Yao et al. // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 5. – P. 4669. – DOI 10.3390/ijms24054669. – PMID 36902100. – PMCID PMC10002758.

94. Pulmonary preservation with Bretschneider's HTK and Celsior solution in minipigs / G. Warnecke, M. Strüber, J. M. Hohlfeld et al. // *European journal of cardio-thoracic surgery*. – 2002. – Vol. 21, Is. 6. – P. 1073-1079. – DOI 10.1016/S1010-7940(02)00106-9. – PMID 12048088.

95. Pulmonary preservation with LPD and celsior solution in porcine lung transplantation after 24 h of cold ischemia / S. P. Sommer, G. Warnecke, J. M. Hohlfeld et al. // *European journal of cardio-thoracic surgery*. – 2004. – Vol. 26, Is. 1. – P. 151-157. – DOI 10.1016/j.ejcts.2004.02.019. – PMID 15200994.

96. Raedschelders, K. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion / K. Raedschelders, D. M. Ansley, D. D. Chen // *Pharmacology & therapeutics*. – 2012. – Vol. 133, № 2. – P. 230-255. – DOI 10.1016/j.pharmthera.2011.11.004. – PMID 22138603.

97. Reactive oxygen species induced pathways in heart failure pathogenesis and potential therapeutic strategies / A. Mongirdienė, L. Skrodenis, L. Varoneckaitė et al. // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, № 3. – P. 602. – DOI 10.3390/biomedicines10030602. – PMID 35327404. – PMCID PMC8945343.

98. Review 2 : Primary graft dysfunction after lung transplant-pathophysiology, clinical considerations and therapeutic targets / Z. Jin, K.C. Suen, Z. Wang, D. Ma // *Journal of anesthesia*. – 2020. – Vol. 34, № 5. – P. 729-740. – DOI 10.1007/s00540-020-02823-6. – PMID 32691226. – PMCID PMC7369472.

99. Role of abnormal energy metabolism in the progression of chronic kidney disease and drug intervention / X. Liu, H. Du, Y. Sun, L. Shao // *Renal failure*. – 2022. – Vol. 44, Is. 1. – P. 790-805. – DOI 10.1080/0886022X.2022.2072743. – PMID 35535500. – PMCID PMC9103584.

100. Ryan, A. K. Oxidative stress in the brain and retina after traumatic injury / A. K. Ryan, W. Rich, M. A. Reilly // *Frontiers in neuroscience*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1021152. – DOI 10.3389/fnins.2023.1021152. – PMID 36816125. – PMCID PMC9935939.
101. Safety and efficacy of *ex vivo* donor lung adenoviral il-10 gene therapy in a large animal lung transplant survival model / T. N. Machuca, M. Cypel, R. Bonato et al. // *Human gene therapy*. – 2017. – Vol. 28, № 9. – P. 757-765. – DOI 10.1089/hum.2016.070. – PMID 28052693.
102. Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. // *Journal of cellular physiology*, 182(3), 311–322.
103. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Gudkov S.V. Radioprotective role of peroxiredoxin 6. // *Antioxidants*. – 2019a. – V.8. – P.15.
104. Sharapov, M. G. Radioprotective role of peroxiredoxin 6 / M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, S. V. Gudkov // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8, № 1. – P. 110-132. – DOI 10.3390/antiox8010015. – PMID 30621289. – PMCID PMC6356814.
105. Siomek A. (2012) NF- κ B signaling pathway and free radical impact. // *Acta Biochim Pol.* 59, 323–331.
106. Steen solution protects pulmonary microvascular endothelial cells and preserves endothelial barrier after lipopolysaccharide-induced injury / H. Q. Ta, N. R. Teman, I. L. Kron et al. // *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2023. – Vol. 165, № 1. – P. e5-e20. – DOI 10.1016/j.jtcvs.2022.04.005. – PMID 35577593. – PMCID PMC9576825.
107. Study of 24 patients with colistin-resistant gram-negative isolates in a tertiary care hospital in South India / R. Arjun, R. Gopalakrishnan, P.S. Nambi et al. // *Indian journal of critical care medicine*. – 2017. – Vol. 21, № 5. – P. 317-321. – DOI 10.4103/ijccm.IJCCM_454_16. – PMID 28584435. – PMCID PMC5455025.
108. Svorc, P. Arterial pH and blood gas values in rats under three types of general anesthesia: a chronobiological study / P. Svorc, D. Petrášová, P. Jr. Svorc // *Physiological*

reviews. – 2018. – Vol. 67, № 5. – P. 721-728. – DOI 10.33549/physiolres.933692. – PMID 30044117.

109. Taylor, M. J. Benefits of Hypothermia in Organ Preservation [Electronic resource] / M. J. Taylor // Organ recovery systems : web site. – URL: <https://www.organ-recovery.com/benefits-of-hypothermia-in-organ-preservation/> (access date: 20.03.2023).

110. The low utilization rate of donor lungs in China : a single-center experience / J. Zhao, D. Liu, J. Huang // Annals of transplantation. – 2021. – Vol. 26. – P. e931409. – DOI 10.12659/AOT.931409. – PMID 34373440. – PMCID PMC8364286.

111. The open access resource for human proteins [Electronic resource] // The Human Protein Atlas : web site. – URL: <https://www.proteinatlas.org/> (access date: 20.03.2023).

112. The Rat. Animal Care and Use Committee [Electronic resource] // Johns Hopkins University : web site. – URL: <https://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html#normative> (access date: 20.03.2023).

113. The role of peroxiredoxin 6 in neutralization of X-ray mediated oxidative stress : effects of gene expression, preservation of radiosensitive tissues and postradiation survival of animals / M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko et al. // Free radical research. – 2017. – Vol. 51, № 2. – P. 148-166. – DOI 10.1080/10715762.2017.1289377. – PMID: 28142292.

114. Therapeutic strategies targeting mitochondrial calcium signaling: a new hope for neurological diseases? / L. R. Rodríguez, T. Lapeña-Luzón, N. Benetó et al. // Antioxidants (Basel). – 2022. – Vol. 11, № 1. – P. 165. – DOI 10.3390/antiox11010165. – PMID 35052668. – PMCID PMC8773297.

115. Treatment of infected lungs by *ex vivo* perfusion with high dose antibiotics and autotransplantation : a pilot study in pigs / N. Zinne, M. Krueger, D. Hoeltig et al. // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. e0193168. – DOI 10.1371/journal.pone.0193168. – PMID 29505574. – PMCID PMC5837087.

116. UW is Superior to Celsior and HTK in the Protection of human liver endothelial cells against preservation injury / H. Janssen, P.H.E. Janssen, C. E. Broelsch et al. // Liver transplantation. – 2004. – Vol 10, № 12. – P. 1514-1523. – DOI 10.1002/lt.20309. – PMID 15558836.

117. Varlamova, E. G. Participation of selenoproteins localized in the ER in the processes occurring in this organelle and in the regulation of carcinogenesis-associated processes / E. G. Varlamova // Journal of trace elements in medicine and biology. – 2018. – Vol. 48. – P.172-180. – DOI 10.1016/j.jtemb.2018.04.005. – PMID 29773177.

118. Vascular pathology in ischemia/reperfusion-induced damage of small intestine of rat / A. Gordeeva, M. Sharapov, I. Tikhonova et al. // Cells tissues organs. – 2017. – Vol. 203, № 6. – P. 353-364. – DOI 10.1159/000455830. – PMID 28273665.

119. Watanabe, T. *Ex vivo* lung perfusion / T. Watanabe, M. Cypel, S. Keshavjee // Journal of thoracic disease. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 6602-6617. – DOI 10.21037/jtd-2021-23. – PMID 34992839. – PMCID PMC8662477.

120. Watanabe, T. *Ex vivo* lung perfusion / T. Watanabe, M. Cypel, S. Keshavjee // Journal of thoracic disease. – 2021. – Vol. 13, № 11. – P. 6602-6617. – DOI 10.21037/jtd-2021-23. – PMID 34992839. – PMCID PMC8662477.

121. Yellon, D. M. Myocardial reperfusion injury / D. M. Yellon, D. J. Hausenloy // New England journal of medicine. – 2007. – Vol. 357, № 11. – P. 1121-1135. – DOI 10.1056/NEJMra071667. – PMID 17855673.