

ГРУДИНИН НИКИТА ВЛАДИМИРОВИЧ

**НОРМОТЕРМИЧЕСКАЯ МАШИННАЯ EX VIVO ПЕРФУЗИЯ
ДОНОРСКИХ ЛЕГКИХ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

3.1.14 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
академик РАН, профессор

Готье Сергей Владимирович

Официальные оппоненты:

Паршин Владимир Дмитриевич - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения торакальной хирургии Университетской клинической больницы №1 федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Яблонский Петр Казимирович - доктор медицинских наук, профессор, директор федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

Защита диссертации состоится «22» декабря 2021 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ДСТИО 001.21 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. ак. В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, г. Москва, ул. Щукинская, дом 1.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2021 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСТИО 001.21

кандидат ветеринарных наук

Елена Алексеевна Волкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Первая успешная трансплантация лёгких была проведена более 30 лет назад и по сей день является единственным методом лечения терминальных стадий легочных заболеваний, позволяющим, увеличить выживаемость и улучшить качество жизни пациентов. Достижения в области консервации донорских легких, совершенствование хирургической техники, развитие перфузиологии и появление оптимальных схем иммуносупрессивной терапии позволили сделать трансплантацию лёгких высокоэффективной и безопасной операцией. По данным Международного общества трансплантации сердца и легких, в мире выполняется более 3500 тысяч трансплантаций лёгких в год (Yusen R. D. et al.). В среднем отвергается около 70% потенциальных лёгочных трансплантатов ввиду их непригодности к трансплантации и всего лишь 20-30% пригодны к пересадке (Pan. X. et al.). Это связано с гемодинамическими нарушениями, сердечно легочной реанимацией и др. причинами смерти головного мозга у посмертного донора, что отражаются на качестве легких как донорского органа. Функциональные возможности легких от субоптимальных доноров могут быть существенно улучшены в ходе проведения аппаратной экстракорпоральной перфузии донорских легких (нормотермическая перфузия донорских легких ex vivo) до уровня оптимальных значений показателей газообмена.

Появление технологии нормотермической перфузии донорских лёгких ex vivo, открыло новые горизонты в развитии трансплантации лёгких. В 2006 году исследовательская команда Stig Steen et al. (Лунд, Швеция) доложила первые результаты успешной трансплантации одного лёгкого после процедуры нормотермической аппаратной перфузии ex vivo. В 2009 году Cypel et al. (Торонто, Канада) представили собственный протокол, позволивший проведение длительной перфузии (Pan. X. et al., Yeung J. C. et al.).

Использование процедуры экстракорпоральной перфузии легких (ex vivo lung perfusion - EVLP) - перспективное направление развития трансплантации лёгких, позволяющее расширить критерии эффективности донора и увеличить количество трансплантаций в несколько раз. Процедура EVLP позволяет поддерживать жизнеспособность лёгких в физиологических условиях, позволяя лёгочной паренхиме находиться в метаболически активном состоянии по сравнению со статическим гипотермическим хранением.

Нормотермическая перфузия лёгких позволяет справиться с проявлениями нейрогенного отёка легочной паренхимы, ателектазами большого объёма, а также даёт возможность реабилитировать лёгочный трансплантат от донора с остановкой эффективного кровообращения, считавшегося ранее абсолютно непригодными для трансплантации.

Степень разработанности темы исследования

В современной трансплантологической практике технология нормотермической машинной перфузии донорских легких, применяется далеко не везде, где практикуется пересадка легких. Отсутствует информация, отражающая в полной мере концепцию, подходы и возможности использования ex vivo перфузии как метода реабилитации и

оценки легких от субоптимальных доноров. В отечественной медицинской литературе отсутствуют методические рекомендации, регламентирующие методику и протоколы применения данной технологии с целью увеличения количества пригодных к трансплантации доноров. Учитывая ограниченный опыт использования в клинической практике данной технологии, разработка этих вопросов и адаптация их решений к клиническим условиям является актуальной научно-исследовательской задачей. Все это определяет актуальность разработки и апробации протокола перфузии, а также перфузионной среды.

Цель исследования:

Оптимизация методики и расширение возможностей изолированной нормотермической *ex vivo* перфузии донорских легких для последующей трансплантации.

Задачи исследования:

1. Разработать протокол перфузии и провести серию экспериментов по апробации методики;
2. Разработать перфузионный раствор для нормотермической *ex vivo* перфузии изолированных легких;
3. Разработать аппаратный комплекс на основе общедоступного перфузиологического и анестезиологического оборудования для проведения изолированной нормотермической аппаратной *ex vivo* перфузии легких в условиях эксперимента.
4. Провести анализ функциональной и морфологической сохранности изолированных легких после машинной перфузии разработанным перфузионным раствором;

Научная новизна

Изучена возможность нормотермической *ex vivo* перфузии изолированных легких экспериментального животного, с целью функциональной реабилитации и последующей трансплантации. Для этого разработана оригинальная перфузионная среда на основе альбумина человека, показавшая свою эффективность и безопасность. Обоснованы преимущества использования взвеси эритроцитов как компонента перфузионной среды. Изучены физиологические и морфологические маркеры отражающие функциональные параметры перфузируемых легких. Отработаны режимы перфузии, направленные на стабилизацию клеточных мембран перфузируемых легких.

Практическая значимость исследования

Практическая значимость исследования определяется созданием предпосылок для внедрения в клиническую практику нормотермической машинной *ex vivo* перфузию донорских легких с использованием оригинальной методики и перфузионной среды для оценки и реабилитации субоптимальных и маргинальных донорских органов, с целью увеличения количества выполненных операций по трансплантации легких.

Методология и методы диссертационного исследования

В исследовании использовали самцов баранов Романовской породы массой 50 кг. Программа экспериментов была одобрена комитетом по биологической безопасности и биоэтике. Выполнена серия экспериментов на 30 изолированных легких, разделенная на 2 группы: контрольная группа (собственный перфузионный раствор) и экспериментальная группа (Steen Solution™). Всего проведено 30 процедур EVLP по разработанному протоколу. В работе использовались инструментальные, лабораторные, морфологические и статистические методы исследования.

Основные положения выносимые на защиту

1. Разработанная методика и протокол перфузии с использованием нового перфузионного раствора позволяют сохранять жизнеспособность и улучшать качество легочного трансплантата.
2. Предложенный оригинальный перфузионный раствор сопоставим по эффективности с оригинальным раствором для нормотермической перфузии легких.
3. Созданная перфузионная система, позволяет оптимизировать и эффективно проводить *ex vivo* перфузию изолированных легких в условиях нормотермии с использованием перфузиологического оборудования.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечена достаточным объемом экспериментальных исследований (30 процедур нормотермической *ex vivo* перфузии) с использованием инструментальных, лабораторных и морфологических методов исследования, анализа, современных методов статистической обработки данных.

Апробация работы состоялась 7 октября 2021 года на объединенной конференции научных, клинических отделений и лаборатории федерального бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации (НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова), кафедры трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Основные результаты работы доложены и обсуждены на X международном конгрессе «Актуальные направления современной кардио-торакальной хирургии» (Санкт-Петербург 17-19 июня – 2021г.), V Российском конгрессе с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва 27-29 сентября – 2021г.).

Связь работы с научными программами

Диссертационная работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава России на осуществление научных исследований и разработок по теме: «Разработка путей повышения эффективности трансплантации легких как радикального метода лечения терминальных стадий хронических респираторных заболеваний у взрослых и детей» (2018-2020 гг.).

Внедрение в практику

Материалы и результаты экспериментального исследования внедрены в учебно-методическую работу на кафедре трансплантологии и искусственных органов Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна исследования, сборе, обработке и анализе данных. Самостоятельно выполнял эксплантацию донорских легких, проводил процедуру нормотермической *ex vivo* перфузии в условиях эксперимента, сбор материалов и необходимую статистическую обработку, анализ и интерпретацию полученных результатов.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 3 научных работ, в том числе 2 статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Центра, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 1 статья в журнале, индексируемом в международных базах данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы посвященной материалам и методам исследования, собственных результатов исследования, а также обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка используемой литературы, включающего 100 источников, в том числе 8 отечественных и 92 зарубежных. Работа изложена на 103 страницах машинописного текста, иллюстрирована 31 рисунком, содержит 9 таблиц и 2 формулы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования

В данном исследовании использовали самцов баранов Романовской породы массой 45-50 кг. Программа экспериментов была одобрена комитетом по биологической безопасности и биоэтике. Опыты проводились с соблюдением правил Европейской конвенции по обращению с лабораторными животными и директивы 2010/63/EU. Животных содержали в стандартных загонах с обеспечением воды *ad libitum* в условиях 12-часового цикла дня и ночи.

Дизайн исследования подразумевал две серии экспериментов: 1 группа (эксперимент) – легкие баранов, получавшие перфузию раствором собственной разработки ($n=15$), 2 группа – (контроль) – легкие баранов, получавшие перфузию раствором Steep SolutionTM ($n=15$). Функциональная способность легких оценивалась по следующим параметрам: индекс оксигенации, динамический комплаенс, легочное сосудистое сопротивление, гистологические изменения.

Подготовка к эксперименту заключалась в изъятии легких у донора – барана согласно общепринятому протоколу эксплантации легких, сборки экстракорпорального контура к процедуре нормотермической *ex vivo* перфузии. Эксперимент включал в себя гипотермическое хранение изолированных легких и непосредственно проведение нормотермической *ex vivo* перфузии, с оценкой показателей газообмена, гемодинамики и вентиляции в контрольных временных точках.

Приготовление перфузионного раствора

Объем перфузата на первичное заполнение и на первый час процедуры EVLP во всех наблюдениях составлял – около 2000 мл. Эритроцитарная масса заготавливалась путем центрифугирования цельной крови донора в течение 15 минут со скоростью 3500 оборотов в минуту. Полученные эритроциты добавляли к раствору до целевых значений гематокрита 10-15%. В перфузат добавляли Имипенем 500 мг, гепарин 10000 МЕ и метилпреднизолон 1 г, натрия гидрокарбонат 8,4%. Целевой уровень pH перфузата составлял 7,35 – 7,45, коррекцию осуществляли добавлением 8,4% натрия гидрокарбоната. Раствор смешивали в кардиотомном резервуаре в условиях замкнутого контура и постоянной рециркуляции со скоростью 200 мл/мин., температура перфузата составляла 15°C.

Все компоненты раствора смешивали в стерильной емкости, целевые цифры pH 7,4 – 7,5 и показатель осмолярности 285 – 310 мОсм/л. Готовый раствор заливали в кардиотомный резервуар и добавляли эритроцитарную массу до гематокрита 10-15%. Перфузионная среда считалась готовой после достижения целевых показателей pH, осмолярности и гематокрита.

Устройство перфузионного контура

Перфузионная система, включает в себя последовательно соединенные между собой органный резервуар открытого типа, кардиотомный резервуар, насос, оксигенатор с теплообменником и интегрированным фильтром, выход которого связан с портом венозной магистрали представлена на рисунке 1 (пояснение в тексте).

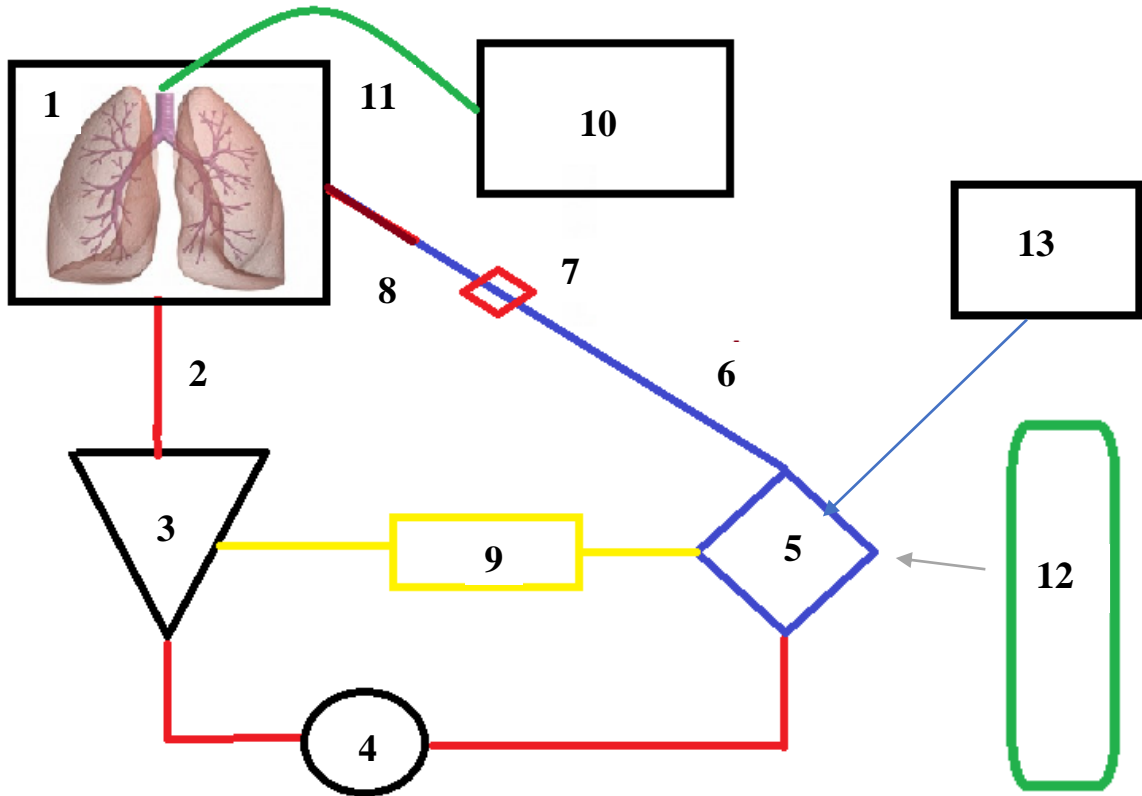


Рисунок 1 - Перфузионный контур для нормотермической перфузии легких

На схеме представлена система для нормотермической изолированной перфузии легких состоящая из следующих компонентов: (1) - органный резервуар открытого типа, (2) - артериальная магистраль, (3) - кардиотомный резервуар, (4) - насос, (5) - оксигенатор с интегрированным артериальным фильтром и теплообменником, (6) - венозная магистраль, (7) - датчик давления (венозной магистрали), (8) - канюля 24Fr с переходником 3/8-3/8 с люэр портом, (9) - гемоконцентратор, (10) – аппарат ИВЛ, (11) – контур аппарата ИВЛ, (12) - баллон с деоксигенирующей смесью, (13) – терморегулирующее устройство соединенное с теплообменником интегрированным в оксигенатор

Сборка контура осуществляется следующим образом. На дооперационном этапе в операционной с соблюдением правил асептики и антисептики проводят сборку одноразовых систем физиологического блока, обеспечивающего проведение искусственного кровообращения и контура, обеспечивающего гемоконцентрацию, который включает в себя кардиотомный резервуар, роликовый насос, оксигенатор с интегрированным фильтром и теплообменником, датчик давления, подключенный к венозной магистрали, а также гемоконцентратор.

Сборку кардиотомного резервуара и оксигенатора производят с помощью набора стерильных магистралей, поставляемых вместе с физиологическим блоком для искусственного кровообращения. Артериальная кровь из донорских легких, находящихся в органном резервуаре открытого типа (1), имеющего в нижней части порт выхода 3/8

вытекает и концентрируется в нем, затем через артериальную магистраль (2) соединенную с портом органного резервуара попадает в кардиотомный резервуар (3) и с помощью первого насоса (4) нагнетается в оксигенатор (5). К оксигенатору подается (12) деоксигенированная газовая смесь через ротаметр. После оксигенатора (5) по отводящей от него венозной магистрали (6), в которую установлен первый датчик давления (7) венозной магистрали, представленный переходником 3/8-3/8 с люэр портом и линией для измерения давления, венозная магистраль (6) соединяется с прямой армированной канюлей 24Fr через переходник 3/8-3/8 с люэр портом 8, таким образом деоксигенированная кровь поступает в легочную артерию. Предложенная система имеет возможность подключения гемоконцентратора. Температуре изолированных легких осуществляется с помощью терморегулирующего устройства (13), подключенного к теплообменнику, интегрированному в оксигенатор (5).

Датчики температуры встроены в кардиотомный резервуар (3) на входе и оксигенатор (5) на выходе общий вид перфузионного комплекса представлен на рисунке 2.



Рисунок 2 - Общий вид собранного перфузионного контура

На рисунке представлен перфузионный комплекс, собранный на основе стандартного аппарата искусственного кровообращения, задействован один роликовый насос для перфузии и циркуляции перфузата по линии для проведения гемоконцентрации.

Анализ гемодинамики и газового состава перфузата

На протяжении всего периода перфузии путем прямого измерения оценивалось давление в легочной артерии. Данные отображались на мониторе в режиме реального времени и фиксировались каждые 30 минут. Основными параметрами являлись: давление в легочной артерии (РАР мм.рт.ст) и легочное сосудистое сопротивление (PVR Wood/м²).

Легочное сосудистое сопротивление рассчитывали по формуле:

$$PVR = \frac{PAP - LAP}{PaF} (1),$$

где **PVR** – легочное сосудистое сопротивление,
РАР – давление в легочной артерии (mmHg),
LAP – давление в левом предсердии (mmHg),
PaF – объем перфузии (L/min).

PVR выражалось в единицах Wood, для расчета в единицах Dynes·s/cm⁵ результат уравнения умножали на 80. Так как во всех группах нормотермическая перфузия осуществлялась открытым способом, без канюляции левого предсердия, при расчете легочного сосудистого сопротивления, давление в левом предсердии принимали за 0.

С целью анализа оксигенирующей функции легких отбирали две порции крови из венозной канюли (легочная артерия) и артериальной (левое предсердие). Анализ образцов проводили на газоанализаторе крови Abl 800 (Radiometer Medical ApS, Дания). Используя уравнение PaO_2/FiO_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. По завершении перфузии все трансплантаты подвергались морфологическому исследованию.

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). В случае нормального распределения применялись методы параметрической статистики. В случае распределения, отличающегося от нормального – методы непараметрической статистики. Сравнение групп по показателям (индекс оксигенации, динамический комплайнс, легочное сосудистое сопротивление, давление в легочной артерии) выполнялось с использованием теста Краскела-Уоллиса. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Диаграммы размаха были построены в программе SAS Enterprise Guide 9.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Протокол нормотермической *ex vivo* перфузии

Легкие помещали в органнй контейнер открытого типа в пронированном положении для улучшения оттока от базальных сегментов легкого. Исходная температура перфузата составляла 15°C, что соответствовало пороговым значениям возникновения ишемически-реперфузионных повреждений при использовании статической холодной кристаллоидной консервации. Заполненную перфузионную линию соединяли с канюлей легочной артерии, медленно подавали раствор для заполнения и деаэрации канюли.

После соединения перфузионной линии с канюлей легочной артерии начинали перфузию со скоростью 200мл/мин, так как данные параметры скорости перфузии являются оптимальными для начала перфузии, предотвращая микроциркуляторное гидродинамическое повреждение, в этот момент обнуляли датчики давления в магистрали.

Ориентируясь на давление, в легочной артерии которое не должно было превышать 20 мм.рт.ст, постепенно увеличивали производительность насоса на 200-300 мл каждые 10 минут, параллельно согревая перфузат. С начала перфузии устанавливали поток газовой смеси, где $FiO_2 < 0,5$, соответствовал целевым минимальным значениям pO_2 100 mmHg. Оптимальная скорость газовой смеси с высоким содержанием углекислого газа равнялась значениям перфузионной скорости потока раствора в экстракорпоральном контуре и корректировалась, соответствуя показателям pCO_2 и pO_2 в газовом составе перфузата во время контрольных измерений.

По достижению температуры перфузата до 34°C начинали искусственную вентиляцию легких с применением протективных параметров вентиляции, обеспечивая минимальный минутный объем вентиляции и положительного давления на вдохе, которые коррелировались с показателями легочного сопротивления, динамического комплаенса и потока, что обеспечивало предотвращение ИВЛ-ассоциированного повреждения паренхимы легочной ткани. По мере роста производительности насоса достигался расчетный объем перфузии, 100% от сердечного выброса, который в среднем составлял 1800 – 2000 мл/мин. Параметры защитной вентиляции складывались из объема на вдохе от 6 до 8 мл/кг, положительное давление конца выдоха (ПДКВ) составляло 5 см вод. ст., частота дыхательных движений (ЧДД) – 10/мин.

Основной целью протективной ИВЛ являлась оптимизация объема и давления в дыхательных путях, избегая при этом повреждения ателектазированных участков альвеол. Маневр рекрутмента¹ проводился не чаще одного раза в 10 минут для предотвращения ИВЛ-ассоциированного и механического повреждения трансплантата. На протяжении всей перфузии с целью коррекции онкотического давления перфузата использовали дополнительную линию со встроенным гемоконцентратором. Параметры перфузии и вентиляции представлены в таблице 1.

Маневр рекрутмента¹ - преднамеренный динамический процесс временного повышения транспульмонального давления, целью которого является открытие нестабильных безвоздушных альвеол.

Таблица 1 – Параметры перфузии и вентиляции

Параметры	Экспериментальная группа (группа 1)	Контрольная группа (группа 2)
Объем перфузии	100% от сердечного выброса	100% от сердечного выброса
Время достижение 37°C	30 минут	30 минут
Время холодовой ишемии	240+-18	240+-15
Левое предсердие	открыто	открыто
Температура начала вентиляции	32°C	32°C
ПДКВ	5 см H ₂ O	5 см H ₂ O
Объем на вдохе	6-8 мл/кг	6-8 мл/кг
ЧДД	10/мин	10/мин
FiO ₂	50%	50%
Время перфузии	180 минут	180 минут

Примечание: ПДКВ – положительное давление конца выдоха (см вод. ст.), ЧДД – частота дыхательных движений, FiO₂ (%) – фракция кислорода

Анализ газов крови

В экспериментальной группе (группа №1) показатели индекса оксигенации PaO₂/FiO₂ составил 340 [310-370] мм рт. ст. против 380 [350-400] мм рт. ст., в группе контроля. Спустя тридцать минут с момента первой оценке в точке 2 в экспериментальной группе показатель PaO₂/FiO₂ составил 380 [360-410] мм.рт.ст., по сравнению с 450 [410-480] мм рт. ст в группе контрольной группе. Отмечается положительная динамика роста респираторного индекса, превысившая пороговое значение в 350 мм.рт.ст, что свидетельствует о хорошей оксигенирующей функции легочного трансплантата.

Спустя два часа перфузии в 3 контрольной точке показатель PaO₂/FiO₂ в первой группе составил 400 [370-430] против 460 [430-490] мм рт. ст. Данные значения индекса оксигенации говорят о физиологическом восстановлении легочной ткани и свидетельствовали о эффективности перфузии. В 4 контрольной точке показатель PaO₂/FiO₂ в экспериментальной группе составили 400 [380-420] мм рт. ст., в группе сравнения индекс оксигенации составил 460 [450-500] мм рт. ст.

По завершении перфузии в 5 контрольной точке показатель PaO₂/FiO₂ в экспериментальной группе составил 390 [380-410] мм. рт. ст., что говорит об оптимальном функциональном состоянии легких и их готовности к трансплантации. Контрольная группа также показала хорошее функциональное состояние трансплантата. Однако, респираторный индекс в контрольной группе был более высоким и составил 470 [430-500] мм рт. ст. Показатели индекса оксигенации после восстановления трансплантата спустя 60 минут перфузии представлены на рисунке 3.

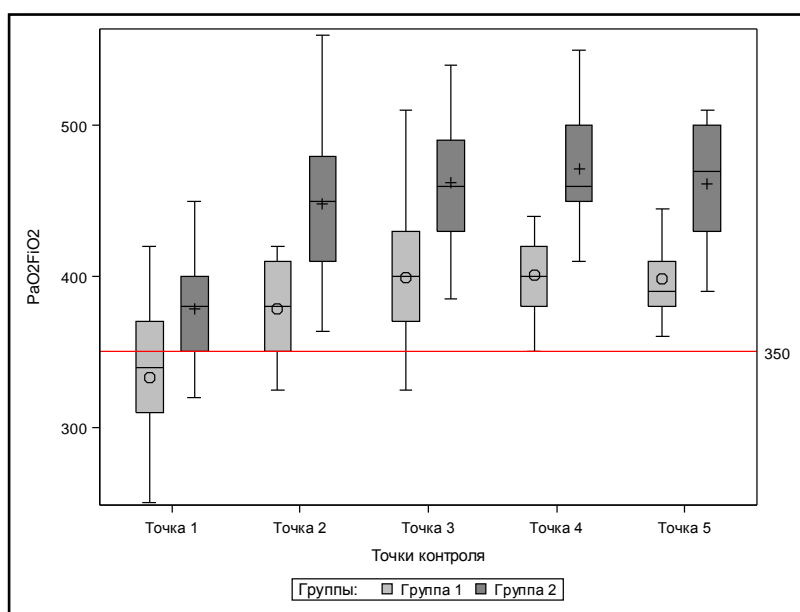


Рисунок 3 - Показатели индекса оксигенации: PaO_2FiO_2 – индекс оксигенации, точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Кругами и крестиками обозначены медианы, горизонтальными линиями в прямоугольниках обозначены средние значения. Горизонтальная линия $PaO_2FiO_2=350$ обозначает порог, превышение которого означает пригодность трансплантата к пересадке. Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа.

Показатели индекса оксигенации в контрольных точках в обеих группах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Основные показатели индекса оксигенации

Показатель	Точка контроля	Группа 1 (экспериментальная)	Группа 2 (контрольная)	p
PaO_2FiO_2	1	340 [310-370]	380 [350-400]	0,0059
	2	380 [350-410]	450 [410-480]	0,0004
	3	400 [370-430]	460 [430-490]	0,00013
	4	400 [380-420]	460 [450-500]	0,0001
	5	390 [380-410]	470 [430-500]	0,0002

Примечание: PaO_2FiO_2 – индекс оксигенации, точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Кругами и крестиками обозначены медианы, горизонтальными линиями в прямоугольниках обозначены средние значения. P - показатель статистической значимости. Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа. Показатели представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (указаны в квадратных скобках). Сравнение показателей выполнялось с помощью теста Краскелла-Уоллиса, различия считаются статистически значимыми при $p < 0,05$.

Динамический комплайнс

В экспериментальной группе после периода восстановления (точка контроля №1) показатели динамического комплайенса составили 18 [16-18] мм.рт.ст., в контрольной группе, показатель комплайенса составил 16 [16-18] мм.рт.ст. Спустя 30 минут перфузии (точка 2) в 1 группе показатель динамического комплайенса составил 27 [25-28] см вод. ст., против 27 [25-28] см вод. ст. контрольной группы. В обеих группах наблюдается положительная динамика прироста показателей динамического комплайенса.

В контрольной точке 3 соответствующей 120 минуте перфузии отмечается положительный рост показателей комплайенса в обеих группах который составил в экспериментальной группе 30 [28-32] см вод. ст., против 32 [29-32] см вод. ст. В четвертой временной точке показатель комплайенса находились без изменений и составляли в экспериментальной группе 30 [27-34] см вод. ст., против 30 [30-32] см вод. ст., в контрольной группе.

Увеличение динамического комплаенса легочного трансплантата, свидетельствует о потенциальной рекрутабельности органа и компенсации ишемически-реперфузионных повреждений, вызванных статической кристаллоидной консервацией.

В точке 5 отмечается рост показателей комплайенса в 1 группе, составившей 36 [32-40] см вод. ст., по сравнению со 2 группой 29 [28-31] см вод. ст., показатели динамического комплайенса представлены на рисунке 4.

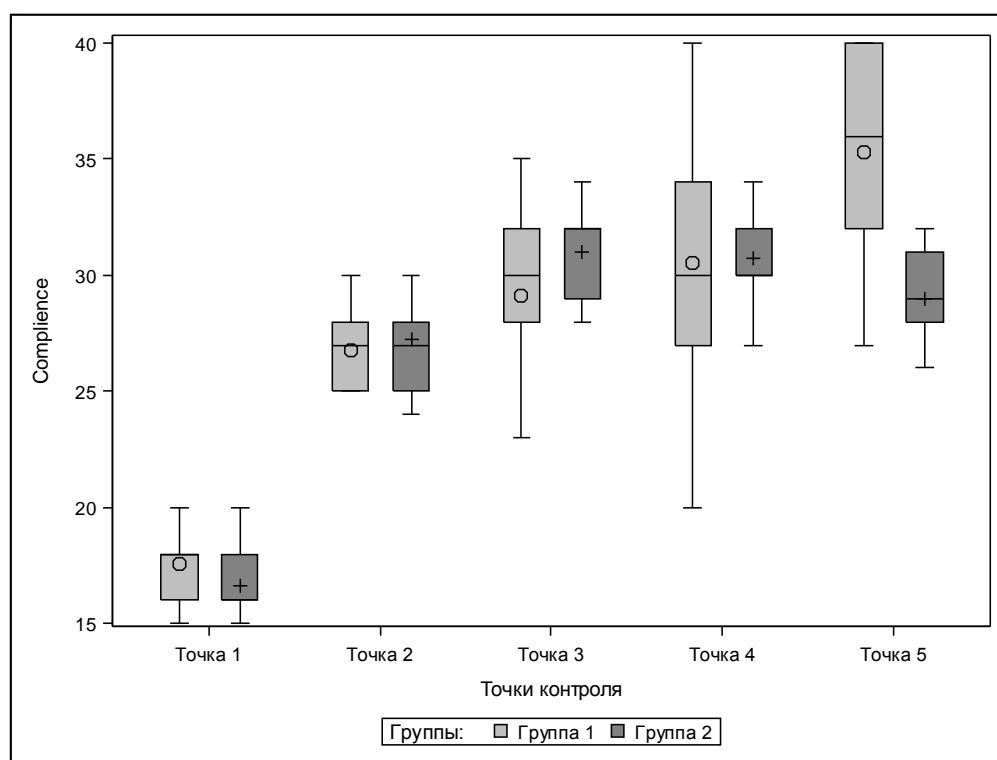


Рисунок 4 – Показатели комплаенса в группах сравнения: Compliance – динамический комплайнс, точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Кругиками и крестиками обозначены медианы, горизонтальными линиями в прямоугольниках обозначены средние значения. P - показатель статистической значимости Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа

Показатели динамического комплайенса в контрольных точках контрольной и экспериментальной группы представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели динамического комплайенса

Показатель	Точка контроля	Группа 1 (экспериментальная)	Группа 2 (контрольная)	p
Compliance	1	18 [16-18]	16 [16-18]	0,19
	2	27 [25-28]	27 [25-28]	0,9
	3	30 [28-32]	32 [29-32]	0,3
	4	30 [27-34]	30 [30-32]	0,8
	5	36 [32-40]	29 [28-31]	0,0007

Примечание: Compliance – динамический комплайнс, точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. P - показатель статистической значимости Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа. Показатели представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (указаны в квадратных скобках). Сравнение показателей выполнялось с помощью теста Краскелла-Уоллиса, различия считаются статистически значимыми при $p < 0,05$

Анализ гемодинамики

Динамика изменений легочного сосудистого сопротивление

В экспериментальной группе в точке контроля №1 легочное сосудистое сопротивление составило 10 [9-11] Wood/м², в группе сравнения, показатель легочное сосудистое сопротивление составило 9 [8-10] Wood/м². В точке 2 отмечается динамика к снижению легочного сосудистого сопротивления, которое составило в экспериментальной группе 9 [8,8-10] Wood/м², против 8 [7,7-8,5] Wood/м², в контрольной группе. Спустя два часа перфузии прослеживается тенденция к снижению легочного сосудистого сопротивления составившее в 1 группе 8,8 [7,3-9] Wood/м², против 7,5 [6,5-8,0] в контрольной группе. В точке 4 легочное сосудистое сопротивление в экспериментальной группе составило 7,7 [6,5-8,3] Wood/м² против 6,5 [6,0-7,5] Wood/м² в контрольной группе. В точке 5 соответствующей трем часам перфузии показатель легочного сосудистого сопротивления в первой группе остался без изменений и составил 7,6 [6,0-8,3] Wood/м², в контрольной группе прослеживалась динамика к его снижению и составила 5,5 [5-6,1] мм.рт.ст. Показатели легочного сосудистого сопротивления представлены в на рисунке 5.

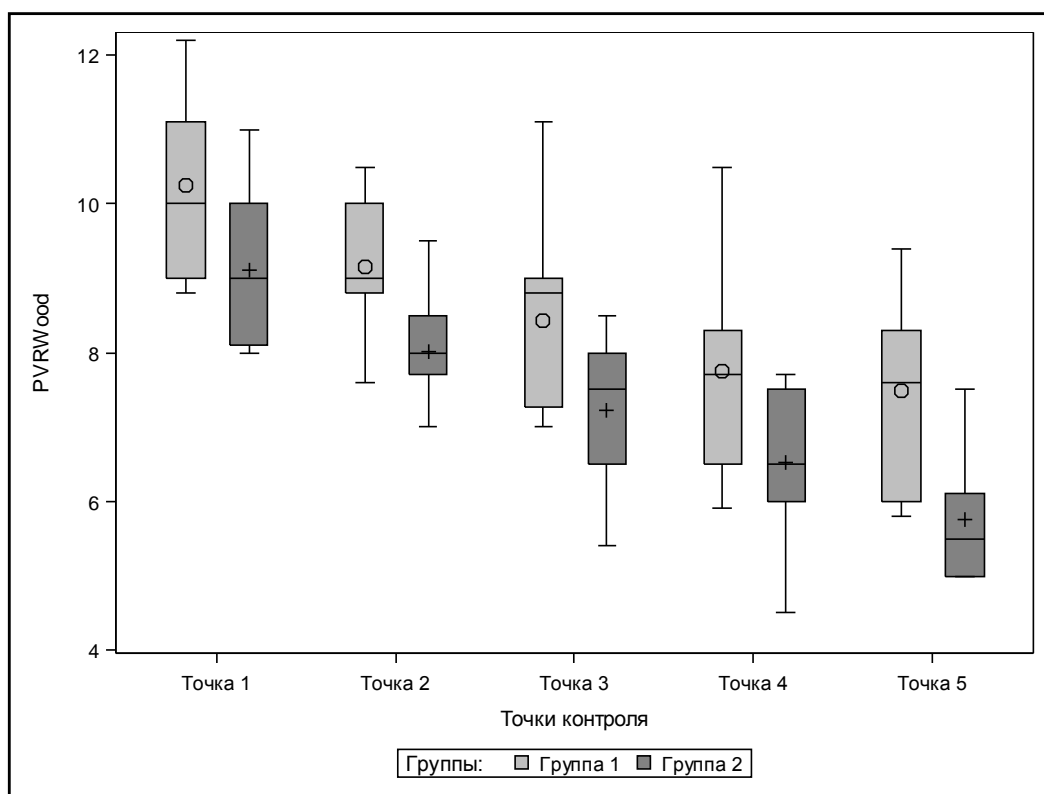


Рисунок 5 – Легочное сосудистое сопротивление во время перфузии эксплантата экспериментальным раствором и раствором Стина: PVR – легочное сосудистое сопротивление измеряемое Wood/м² точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Кругжками и крестиками обозначены медианы, горизонтальными линиями в прямоугольниках обозначены средние значения. Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа

Показатели легочного сосудистого сопротивления в контрольных точках, контрольной и экспериментальной группы представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Значения легочного сосудистого сопротивления

Показатель	Точка контроля	Группа 1 (экспериментальная)	Группа 2 (контрольная)	р
PVRWood	1	10 [9-11]	9 [8.1-10]	0,0095
	2	9 [8.8-10]	8 [7.7-8.5]	0,0016
	3	8.8 [7.3-9.0]	7.5 [6.5-8.0]	0,01
	4	7.7 [6.5-8.3]	6.5 [6.0-7.5]	0,01
	5	7.6 [6.0-8.3]	5.5 [5.0-6.1]	0,0007

Примечание: PVR – легочное сосудистое сопротивление, измеряемое Wood/м² точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Р - показатель статистической значимости Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа. Показатели представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (указаны в квадратных скобках). Сравнение показателей выполнялось с помощью теста Краскелла-Уоллиса, различия считаются статистически значимыми при $p < 0,05$

Показатели изменений давления в легочной артерии

В ходе всего периода перфузии трансплантата в двух группах наблюдения отмечалось стойкое снижение давление в легочной артерии. В экспериментальной группе в точке контроля №1 показатель давления в легочной артерии составил 20 [18-20] мм. рт. ст., в группе 2, показатель легочное сосудистое сопротивление составило 18 [16-19] мм. рт. ст. В точке 2 прослеживается динамика к снижению показателей давления в легочной артерии, которое составило в 1 группе 18 [16-18] мм. рт. ст., против 16 [15-16] мм. рт. ст., группы контроля. Спустя 2 часа перфузии соответствующей 3 временной точке прослеживается тенденция к снижению давления в легочной артерии составившее в экспериментальной группе (группа 1) 16 [15-18] мм. рт. ст., против 15 [13-16] мм. рт. ст., в контрольной группе. В точке 4 значение давления в легочной артерии в 1 группе составило 15 [13-15] Wood/м² против 11 [10-12] мм. рт. ст., во второй группе. В точке 5 показатель давления в легочной артерии в первой группе составил 14 [13-15] мм. рт. ст., против 11 [10-12] мм. рт. ст., во второй группе. Показатели изменений давления в легочной артерии представлены на рисунке 6.

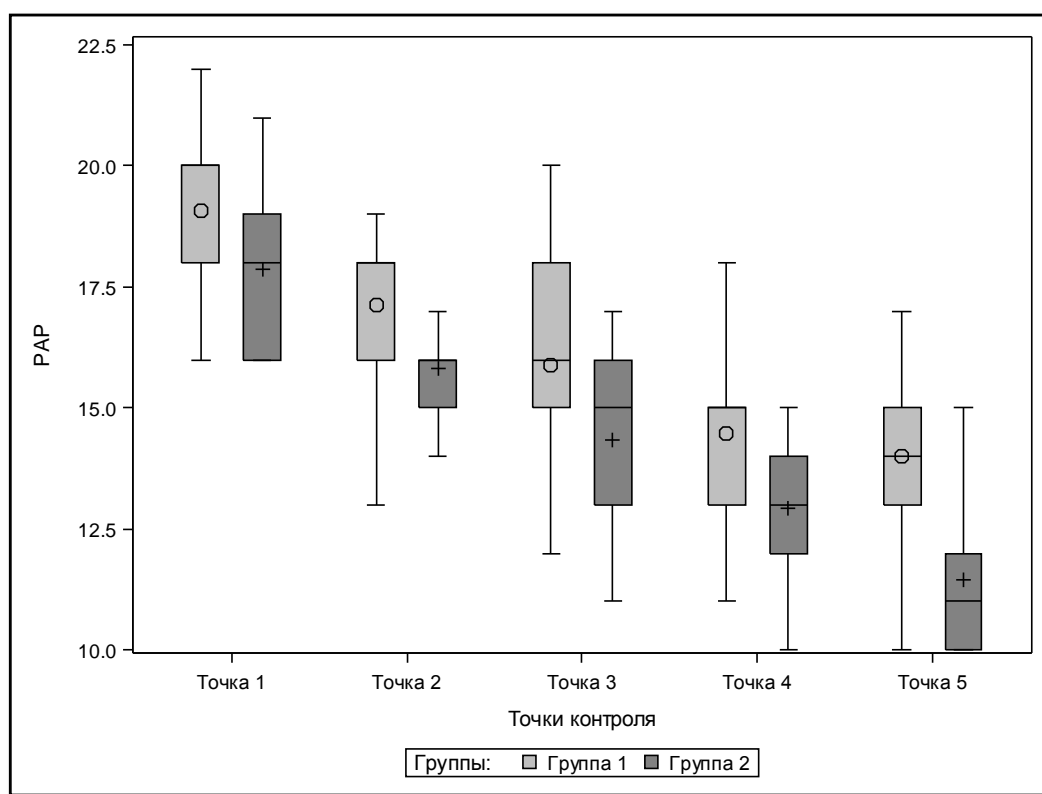


Рисунок 6 – Показатели давления в легочной артерии: PAP – легочное сосудистое сопротивление, измеряемое в мм рт. ст., точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Кружками и крестиками обозначены медианы, горизонтальными линиями в прямоугольниках обозначены средние значения. Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа.

В двух группах прослеживается динамика снижения давления легочной артерии, при этом показатели в 1 группе, статистически значимо уступают второй группе, представленной раствором Стина. Однако несмотря на различия, клинически снижение показателей давления легочной артерии в обеих группах говорит о адекватности и стабильности процедуры нормотермической перфузии легких и служит объективным прогностическим признаком стабильной и эффективной перфузии (таблица 5).

Таблица 5 – Показатели давления в легочной артерии

Показатель	Точка контроля	Группа 1 экспериментальная	Группа 2 контрольная	p
РАР	1	20 [18-20]	18 [16-19]	0,06
	2	18 [16-18]	16 [15-16]	0,016
	3	16 [15-18]	15 [13-16]	0,049
	4	15 [13-15]	13 [12-14]	0,02
	5	14 [13-15]	11 [10-12]	0,0008

Примечание: РАР – давление в легочной артерии измеряемое в мм рт. ст. точка 1 – 60 минут перфузии, точка 2 – 90 минут перфузии, точка 3 – 120 минут перфузии, точка 4 – 150 минут перфузии, точка 5 – 180 минут конец перфузии. Р - показатель статистической значимости Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа. Показатели представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей (указаны в квадратных скобках). Сравнение показателей выполнялось с помощью теста Краскелла-Уоллиса, различия считаются статистически значимыми при $p < 0,05$

Анализ показателей корреляции индекса оксигенации с легочным сосудистым сопротивлением и динамическим комплайнсом

В ходе исследования была оценена корреляция показателей PaO_2/FiO_2 и легочного сосудистого сопротивления, а также комплаенса. Показатели корреляции представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Корреляционная связь между показателями PaO_2/FiO_2 , легочным сосудистым сопротивлением и комплайнсом

Группа	Показатель	Показатель	r	95% ДИ	p
1	PaO_2/FiO_2	Compliance	0.4	0.2-0.6	0.004
2	PaO_2/FiO_2	Compliance	0.5	0.3-0.7	0.0001
1	PaO_2/FiO_2	PAP	-0.5	-0.7.. -0.3	0.0001
2	PaO_2/FiO_2	PAP	-0.5	-0.5.. -0.3	0.0001
1	PaO_2/FiO_2	PVRDeen	-0.5	-0.6..-0.2	0.0001
2	PaO_2/FiO_2	PVRDeen	-0.4	-0.6..-0.2	0.0001
1	PaO_2/FiO_2	PVRWood	-0.5	-0.6..-0.3	0.0001
2	PaO_2/FiO_2	PVRWood	-0.4	-0.6..-0.2	0.0001

Примечание: Группа 1 – экспериментальная группа, Группа 2 – контрольная группа. Compliance – динамический комплайнс, PAP – давление в легочной артерии, PVRDeen – легочное сосудистое сопротивление измеряемое в Deen \times с/см⁵, PVRWood – легочное сосудистое сопротивление измеряемое в Wood/м², r – коэффициент корреляции, 95% ДИ – 95% доверительный интервал, p – показатель статистической значимости, 1 – экспериментальная группа, 2 – контрольная группа.

Учитывая наличие корреляционной связи между PaO_2/FiO_2 , показателями легочного сосудистого сопротивления и динамического комплаенса были построены регрессионные зависимости, которые позволяют оценить индекс оксигенации по измеряемым показателям (рисунок 7, рисунок 8, рисунок 9, рисунок 10).

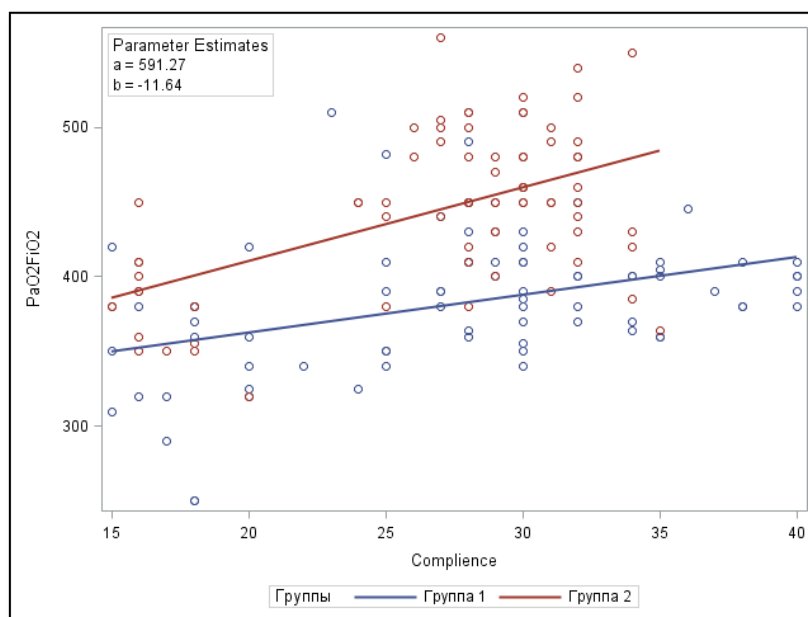


Рисунок 7 - Зависимость индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2 мм. рт. ст) от динамического комплайенса (Compliance, см вод. ст.)

Примечание к рисунку 7: *Parameter Estimates* – коэффициенты уравнения линейной регрессии $PaO_2/FiO_2 = a + b * Compliance$. a – свободный член, b – множитель. Коэффициенты уравнения линейной регрессии статистически значимы $p_a=0.0001$, $p_b=0.0001$.

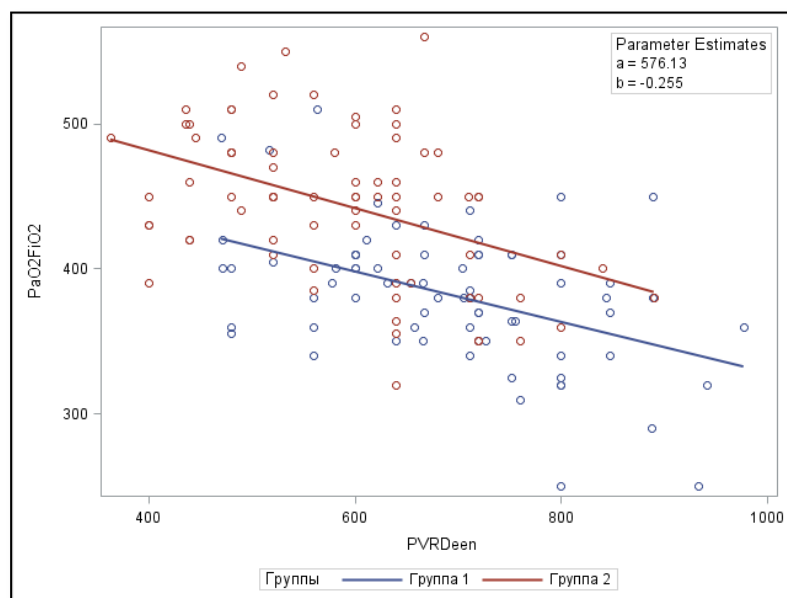


Рисунок 8 - Зависимость индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2 мм рт. ст.) от легочного сосудистого сопротивления (PVR Deen)

Примечание к рисунку 8: *Parameter Estimates* – коэффициенты уравнения линейной регрессии $PaO_2/FiO_2 = a + b * PVR Deen$. a – свободный член, b – множитель. Коэффициенты уравнения линейной регрессии статистически значимы $p_a=0.0001$, $p_b=0.0001$.

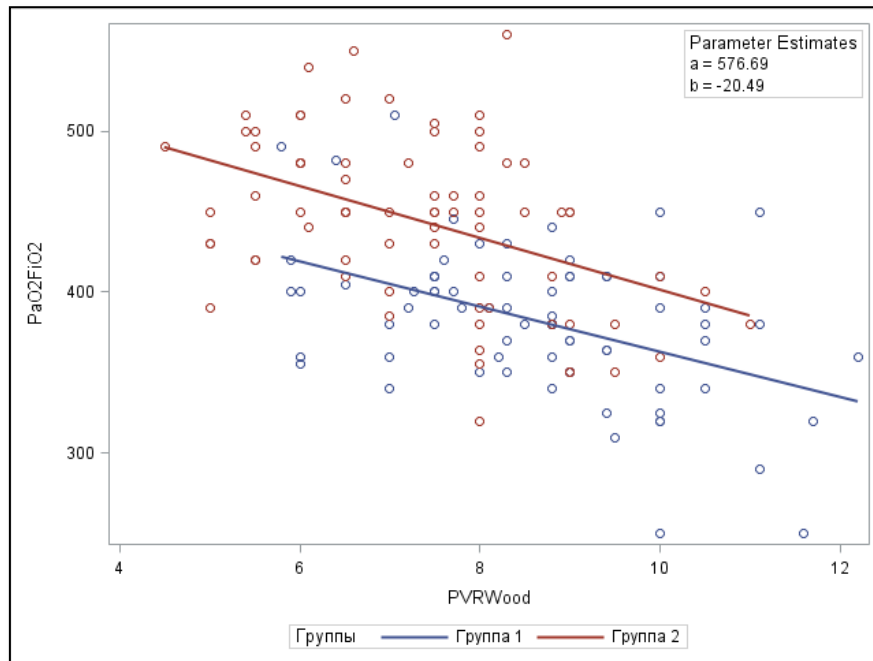


Рисунок 9 - Зависимость индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2 мм рт. ст.) от легочного сосудистого сопротивления (PVR_{Wood})

Примечание к рисунку 9: *Parameter Estimates* – коэффициенты уравнения линейной регрессии $PaO_2/FiO_2 = a + b * PVR_{Wood}$. a – свободный член, b – множитель. Коэффициенты уравнения линейной регрессии статистически значимы $p_a=0.0001$, $p_b=0.0001$.

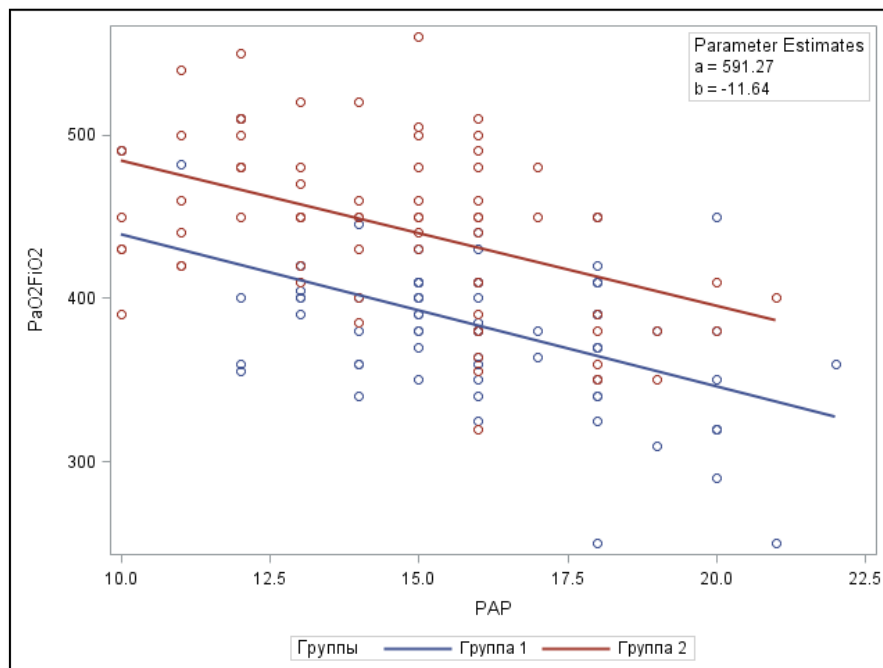


Рисунок 10 - Зависимость индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2 мм рт.ст.) от давления в легочной артерии (PAP мм рт. ст.)

Примечание к рисунку 10: *Parameter Estimates* – коэффициенты уравнения линейной регрессии $PaO_2/FiO_2 = a + b * PVR_{PAP}$. a – свободный член, b – множитель. Коэффициенты уравнения линейной регрессии статистически значимы $p_a=0.0001$, $p_b=0.0001$.

Индекс оксигенации определяли в течение всего времени машинной перфузии трансплантата, что позволило определять жизнеспособность и функцию изолированных легких во время перфузии. Полученные данные, позволяют определять предполагаемую оксигенирующую функцию легочного трансплантата в течение всего периода машинной перфузии по показателям гемодинамики (легочное сосудистое сопротивление). Это позволяет получать данные в реальном времени. Несомненно, эта возможность носит вспомогательную функцию и не может заменить газоанализатор при определении респираторного индекса. Однако данный подход упростит оценку при транспортировке легких в условиях нормотермической перфузии

Морфологические исследования

При гистологическом исследовании использовалась оценка, основанная на полуколичественном анализе изменений, наблюдаемых при обычной световой микроскопии.

В обеих группах паренхима лёгкого имела гистологические признаки функционирующей ткани без патологических изменений. В большинстве срезов отмечались хорошо раздутые альвеолы. Микроателектатические участки были распределены неоднородно в обеих группах и встречались только на отдельных участках. Умеренная интерстициальная инфильтрация отмечалась в нескольких образцах. Не было выявлено очевидной разницы в микроструктуре легочной паренхимы в сравниваемых группах, в связи с чем статистический анализ провести не представлялось возможным (рисунок 11, рисунок 12).

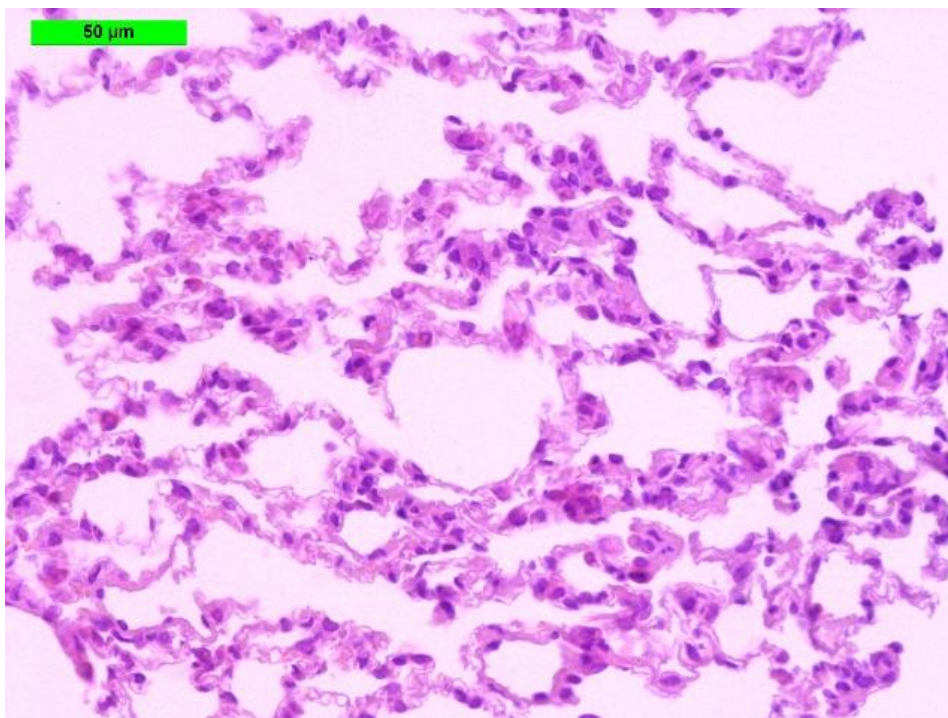


Рисунок 11 Экспериментальная группа, прослеживается сохранность структур легочной ткани, отмечают слабые явления субэндотелиального отека.

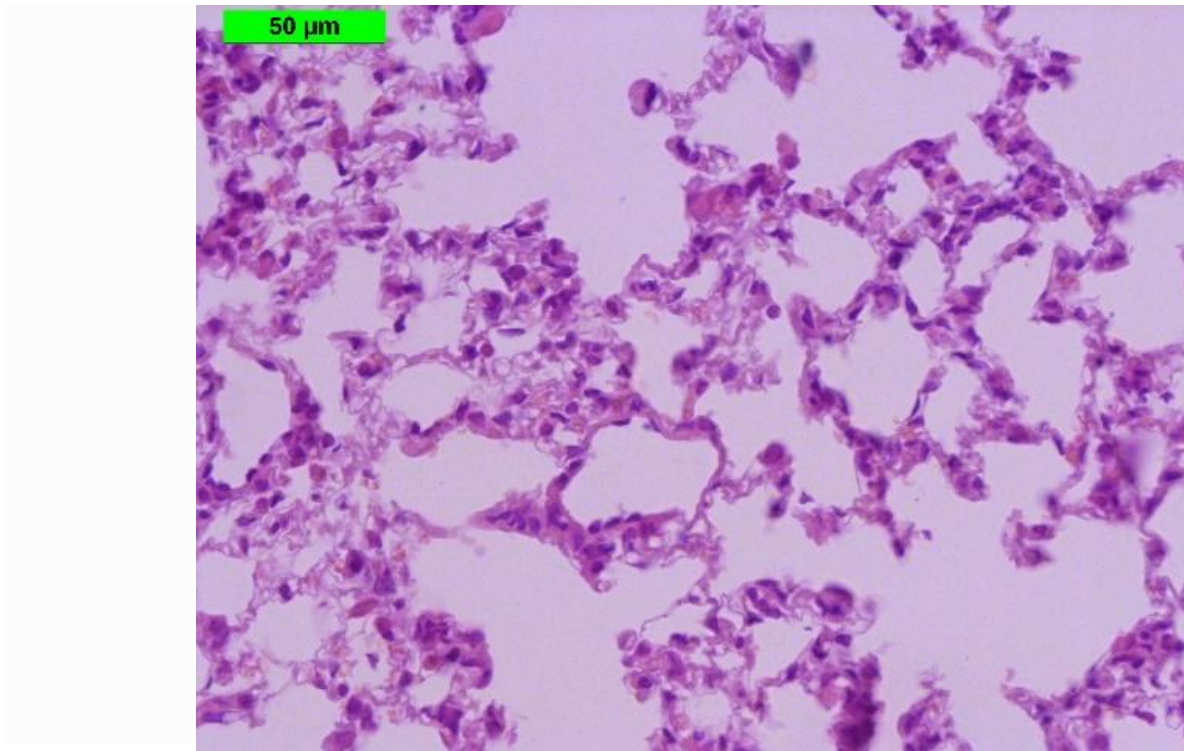


Рисунок 12 - Контрольная группа, отмечается слабовыраженный субэндотелиальный отек, несколько участков разрывов альвеолярной перегородки

В группах сравнения отмечалась одинаковая степень повреждения тканей после холодовой ишемии и по окончании перфузии, что может говорить об эффективности разработанного раствора, которая сопоставим с эффективностью Steen SolutionTM.

ВЫВОДЫ

1. *Ex vivo* перфузия легких в эксперименте с использованием разработанного протокола *ex vivo* перфузии легких с открытым перфузионным контуром обеспечивает физиологические показатели вентиляции и гемодинамики.

2. Разработанный состав перфузионного раствора для проведения нормотермической перфузии изолированных легких с целью их сохранения и реабилитации обеспечивает положительную динамика роста индекса оксигенации (PaO_2/FiO_2 более 350 мм рт.ст.), снижение легочного сосудистого сопротивления с 10 до 7,5 Wood/ m^2 , что свидетельствует о его эффективности.

3. Разработанный перфузионный комплекс, состоящий из общедоступного перфузиологического и анестезиологического оборудования обеспечивает проведение адекватной нормотермической аппаратной *ex vivo* перфузии донорских легких в эксперименте.

4. Разработанный перфузионный раствор обеспечивает функциональную и морфологическую сохранность изолированных легких во всех наблюдениях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Дополнение стандартного перфузионного контура гемоконцентрационной колонкой, позволяет корректировать онкотическое давление перфузата на протяжении всей перфузии

2. Для восполнения дефицита оснований на протяжении всей процедуры *ex vivo* перфузии легких предпочтительно использовать гидрокарбонат натрия 8,4% либо трометамол.

3. С целью повышения газовой емкости перфузата необходимо добавлять отмытые эритроциты до целевого значения гематокрита 10 – 15 %.

4. При выполнении процедуры аппаратной перфузии предпочтительно легкие располагать в положении пронации, что позволяет облегчить дренаж по легочным венам и снизить риск развития отека базальных сегментов легких.

5. Спустя 60 минут перфузии рекомендуется замена раствора по 500 мл каждые 30 минут перфузии с целью удаления метаболитов.

6. Добавление к перфузату метилпреднизолона (1 грамм) снижает системную воспалительную реакцию, а также препятствует развития ишемически-реперфузионного отека легочной паренхимы.

7. Добавление к перфузионной среде эритроцитарной взвеси позволяет достоверно увеличить газовую емкость перфузата.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка эффективности разработанного раствора для нормотермической ex vivo перфузии легких по сравнению со Steen solutionTM (экспериментальное исследование) / С. В. Готье, О. М. Цирульникова, И. В. Пашков, Н.В. Грудинин [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов – 2021. – Т. 23 – № 3, – С. 82–89.

2. Применение пероксиредоксина для пекондиционирования трансплантата сердца крысы / С. В. Готье, О. М. Цирульникова, И. В. Пашков, Н.В. Грудинин [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов – 2020. – Т. 22 – № 2, – С. 158–164.

3. Оценка сохранности миокарда крысы и изолированного сердца барана после пролонгированной 24-часовой гипотермической консервации под давлением газовой смеси на основе монооксида углерода / Е. Е.Фесенко, Е. Л. Гагаринский, А. С. Аверин, Н. В. Грудинин [и др.]// Биофизика – 2020. – Т. 65 – № 4, – С. 780–791.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДИ – доверительный интервал;

ЛСС – легочное сосудистое сопротивление;

РАР – давление в лёгочной артерии;

ЧСС – частота сердечных сокращений;

EVLP – ex vivo lung perfusion;

FiO₂ – фракция кислорода на вдохе;

pH – кислотность раствора;

PaO₂ – парциальное артериальное давление кислорода;

PVR – легочное сосудистое сопротивление;

LAP – давление в левом предсердии;