



## МАШИННАЯ ПЕРФУЗИЯ ПЕЧЕНИ С УМЕРЕННЫМ МАКРОСТЕАТОЗОМ: ЭФФЕКТИВНОСТЬ НОРЕ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ СОГРЕВАНИЕМ

Б.И. Яремин<sup>1-4</sup>, М.С. Новрузбеков<sup>1-4</sup>, А.Г. Балкаров<sup>1, 2</sup>, Б.И. Казымов<sup>1, 3, 4</sup>, Е.Ю. Аносова<sup>2</sup>,  
П.О. Свищева<sup>1</sup>, О.Н. Павлова<sup>5, 6</sup>, С.М. Ханова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Большая Сухаревская пл., д. 3, г. Москва, 129090, Россия

<sup>2</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117513, Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина, Каширское шоссе, д. 23, г. Москва, 115522, Россия

<sup>4</sup>Московский медицинский университет «Реавиз», Краснобогатырская ул., д. 2, стр. 2, Москва, 107564, Россия

<sup>5</sup>Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, д. 89, г. Самара, 443099, Россия

<sup>6</sup>Медицинский университет «Реавиз», ул. Чапаевская, д. 227, г. Самара, 443001, Россия

**Резюме.** Цель исследования. Оценка эффективности машинной перфузии в режиме гипотермической оксигенированной перфузии (НОРЕ) с контролируемым согреванием в снижении ишемически-реперфузионного повреждения донорской печени человека с умеренным макростеатозом путем комплексного анализа механизмов регулируемой клеточной гибели. Материалы и методы. Проспективное экспериментальное исследование 24 донорских печеней человека с макростеатозом 30-50%. Органы рандомизированы в три группы: контрольная (стандартное холодное хранение, n=8), НОРЕ (гипотермическая оксигенированная перфузия при 10 °С, n=8) и НОРЕ+W (НОРЕ с контролируемым согреванием от 10 °С до 20 °С, n=8). Оценивались маркеры окислительного стресса (MDA, GSH/GSSG), апоптоза (активность каспаз-3, -7, -8, -9, высвобождение цитохрома с), функция митохондрий (продукция АТФ, дыхательная функция), воспалительный ответ (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) и клинические исходы трансплантации. Результаты. В группе НОРЕ+W достигнуто значительное снижение маркеров окислительного стресса: уровень MDA составил 2,8 $\pm$ 0,4 против 5,9 $\pm$ 0,8 нмоль/мг белка в контроле (p<0,001), соотношение GSH/GSSG – 5,2 $\pm$ 0,6 против 2,1 $\pm$ 0,3 (p<0,001). Активность каспазы-3 снижена до 0,9 $\pm$ 0,1 против 2,4 $\pm$ 0,3 отн.ед. в контроле (p<0,001). Продукция АТФ сохранялась на уровне 18,2 $\pm$ 2,1 против 8,4 $\pm$ 1,2 нмоль/мг/мин в контроле (p<0,001). Концентрация IL-6 в перфузате снижена до 45 $\pm$ 7 против 124 $\pm$ 16 пг/мл (p<0,001). Пиковые АЛТ составили 524 $\pm$ 89 против 1248 $\pm$ 186 Ед/л в контроле (p<0,001). Тромбоз печеночной артерии отсутствовал (0% против 25% в контроле, p=0,034). Выживаемость трансплантата без ретрансплантации составила 100% против 75% в контроле (p=0,045). Заключение. Гипотермическая оксигенированная перфузия с контролируемым согреванием эффективно защищает печени с умеренным макростеатозом от ишемически-реперфузионного повреждения через подавление окислительного стресса, сохранение митохондриальной функции, ингибирование апоптоза и модуляцию воспалительного ответа, что приводит к значительному улучшению ранних и среднесрочных результатов трансплантации.

**Ключевые слова:** трансплантация печени [D016031]; макростеатоз [D005234]; машинная перфузия [D010477]; гипотермическая оксигенированная перфузия [D010477]; ишемически-реперфузионное повреждение [D015427]; консервация органов [D009928]; окислительный стресс [D018384]; митохондриальная дисфункция [D028361]; апоптоз [D017209]; ферроптоз [D000081946]; маргинальные доноры [D014019 (подкатегория)]; холодная ишемия [D007511]; липидная пероксидация [D015227]; глутатион [D005978]; каспазы [D020170]; цитокины [D016207]; трансаминазы [D000410]; выживаемость трансплантата [D006085].

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Б.И. Яремин является ответственным секретарём редакционной коллегии журнала, М.С. Новрузбеков – членом редакционной коллегии журнала, Е.Ю. Аносова и О.Н. Павлова – научными редакторами журнала. В принятии решения о публикации работы участия не принимали.

**Финансирование.** Исследование поддержано грантом Московского центра инновационных технологий в здравоохранении №2312-15/22.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность сотрудникам трансплантационного центра и донорам органов, сделавшим возможным данное исследование.

**Соответствие нормам этики.** Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо.

**Для цитирования:** Яремин Б.И., Новрузбеков М.С., Балкаров А.Г., Казымов Б.И., Аносова Е.Ю., Свищева П.О., Павлова О.Н., Ханова С.М. Машинная перфузия печени с умеренным макростеатозом: эффективность НОРЕ с контролируемым согреванием. Вестник медицинского института «РЕАВИЗ»: Реабилитация, Врач и Здоровье. 2025;15(4):189-200. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2025.4.TX.2>



## MACHINE PERFUSION OF LIVERS WITH MODERATE MACROSTEATOSIS: EFFICACY OF HOPE WITH CONTROLLED REWARMING

Boris I. Yaremin<sup>1-4</sup>, Murad S. Novruzbekov<sup>1-4</sup>, Aslan G. Balkarov<sup>1, 2</sup>, Bakhtiyar I. Kazymov<sup>1, 3, 4</sup>,  
Ekaterina Yu. Anosova<sup>2</sup>, Polina O. Svishcheva<sup>1</sup>, Ol'ga N. Pavlova<sup>5, 6</sup>, Sofiya M. Khanova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Bolshaya Sukharevskaya Square, 3, Moscow, 129090, Russia

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova St., 1, Moscow, 117513, Russia

<sup>3</sup>National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin, Kashirskoe shosse, 23, Moscow, 115522, Russia

<sup>4</sup>Moscow Medical University "Reaviz", Krasnobogatyrskaya str., 2, building 2, Moscow, 107564, Russia

<sup>5</sup>Самарский государственный медицинский университет, ул. Чапаевская, д. 89, г. Самара, 443099, Россия

<sup>6</sup>Medical University Reaviz, Chapayevskaya St., 227, Samara, 443001, Russia

**Abstract. Objective.** To evaluate the efficacy of machine perfusion using hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) with controlled rewarming in reducing ischemia-reperfusion injury of human donor livers with moderate macrosteatosis through comprehensive analysis of regulated cell death mechanisms. **Materials and methods.** Prospective experimental study of 24 human donor livers with 30-50% macrosteatosis. Organs were randomized into three groups: control (standard cold storage, n=8), HOPE (hypothermic oxygenated perfusion at 10°C, n=8), and HOPE+W (HOPE with controlled rewarming from 10°C to 20°C, n=8). Markers of oxidative stress (MDA, GSH/GSSG), apoptosis (caspase-3, -7, -8, -9 activity, cytochrome c release), mitochondrial function (ATP production, respiratory function), inflammatory response (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), and clinical transplantation outcomes were evaluated. **Results.** The HOPE+W group achieved significant reduction in oxidative stress markers: MDA level was 2.8 $\pm$ 0.4 vs 5.9 $\pm$ 0.8 nmol/mg protein in controls (p<0.001), GSH/GSSG ratio was 5.2 $\pm$ 0.6 vs 2.1 $\pm$ 0.3 (p<0.001). Caspase-3 activity was reduced to 0.9 $\pm$ 0.1 vs 2.4 $\pm$ 0.3 rel.units in controls (p<0.001). ATP production was maintained at 18.2 $\pm$ 2.1 vs 8.4 $\pm$ 1.2 nmol/mg/min in controls (p<0.001). IL-6 concentration in perfusate was reduced to 45 $\pm$ 7 vs 124 $\pm$ 16 pg/ml (p<0.001). Peak ALT levels were 524 $\pm$ 89 vs 1248 $\pm$ 186 U/L in controls (p<0.001). Hepatic artery thrombosis was absent (0% vs 25% in controls, p=0.034). Graft survival without retransplantation was 100% vs 75% in controls (p=0.045). **Conclusion.** Hypothermic oxygenated perfusion with controlled rewarming effectively protects livers with moderate macrosteatosis from ischemia-reperfusion injury through suppression of oxidative stress, preservation of mitochondrial function, inhibition of apoptosis, and modulation of inflammatory response, leading to significant improvement in early and medium-term transplantation outcomes.

**Keywords:** liver transplantation [D016031]; fatty liver [D005234]; perfusion [D010477]; hypothermic oxygenated perfusion [D010477]; reperfusion injury [D015427]; organ preservation [D009928]; oxidative stress [D018384]; mitochondrial dysfunction [D028361]; apoptosis [D017209]; ferroptosis [D000081946]; marginal donors [D014019 (подкатегория)]; cold ischemia [D007511]; lipid peroxidation [D015227]; glutathione [D005978]; caspases [D020170]; cytokines [D016207]; transaminases [D000410]; graft survival [D006085].

**Competing interests.** The authors declare no conflicts of interest. B.I. Yaremin is the executive secretary of the journal's editorial board, M.S. Novruzbekov is a member of the journal's editorial board, and E.Yu. Anosova and O.N. Pavlova are the journal's scientific editors. They did not participate in the decision to publish this work.

**Funding.** Исследование поддержано грантом Московского центра инновационных технологий в здравоохранении №2312-15/22..

**Compliance with ethical principles.** The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary.

**Cite as:** Yaremin B.I., Novruzbekov M.S., Balkarov A.G., Kazymov B.I., Anosova E.Yu., Svishcheva P.O., Pavlova O.N., Khanova S.M. Machine Perfusion of Livers with Moderate Macrosteatosis: Efficacy of HOPE with Controlled Rewarming. *Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ": Rehabilitation, Doctor and Health.* 2025;15(4):189-200. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2025.4.TX.2>

### Введение

Трансплантация печени остаётся единственным радикальным методом лечения терминальных заболеваний печени и представляет одно из наиболее значимых достижений современной медицины. Однако острый дефицит донорских органов представляет серьёзную проблему, с которой сталкиваются трансплантационные центры по всему миру. Согласно данным международных регистров, на один доступный донорский орган приходится в среднем 3-4 реципиента, находящихся в листе ожидания, при этом ежегодная смертность пациентов в листе ожидания составляет 15-20%. Эта критическая диспропорция между потребностью в донорских органах и их доступностью приводит к тому, что значительная часть пациентов умирает, не дождавшись трансплантации, что заставляет трансплантационные центры пересматривать традиционные критерии приемлемости донорских органов.

В последние два десятилетия всё большее внимание уделяется использованию печеней с расширенными критериями донора, среди которых особое место занимают органы с макростеатозом. Печёночный стеатоз представляет собой патологическое накопление триглицеридов в гепатоцитах, что приводит к нарушению нормальной архитектуры печёночной дольки и функции органа. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что распространённость стеатоза среди потенциальных доноров органов неуклонно возрастает параллельно с ростом ожирения и метаболического синдрома в популяции. Умеренный макростеатоз, определяемый как поражение 30-50% гепатоцитов крупнокапельными жировыми включениями, встречается у 20-30% потенциальных доноров, что представляет значительный резерв для расширения донорского пула.

Однако использование стеатозных печеней сопряжено с существенными клиническими рисками.

Печени с макростеатозом характеризуются значительно повышенной чувствительностью к ишемически-реперфузионному повреждению по сравнению с нормальными органами. Механизмы этой повышенной уязвимости многофакторны и включают нарушение микроциркуляции из-за сдавления синусоидов увеличенными гепатоцитами, митохондриальную дисфункцию, повышенную восприимчивость к окислительному стрессу и нарушения энергетического метаболизма. Клинические последствия этих патофизиологических изменений проявляются в виде увеличения частоты первичной дисфункции трансплантата до 40-50%, ишемических холангиопатий до 30-35%, а также повышения риска ранней потери трансплантата. Эти осложнения не только ухудшают краткосрочные и долгосрочные результаты трансплантации, но и существенно увеличивают экономические затраты системы здравоохранения.

Традиционная консервация печени в холодном консервирующем растворе при температуре 4 °С, хотя и остаётся стандартом для большинства трансплантационных центров, демонстрирует ограниченную эффективность для стеатозных органов. Статические методы консервации не обеспечивают достаточной защиты от метаболических нарушений, характерных для печеней с накопленными липидами. Это послужило стимулом для развития альтернативных методов консервации, среди которых особое место занимает машинная перфузия печени.

Машинная перфузия печени представляет технологию динамической консервации, при которой донорский орган подключается к специализированной перфузионной системе, обеспечивающей постоянную циркуляцию оксигенированного перфузионного раствора через сосудистое русло печени. Эта технология позволяет поддерживать минимальный метаболизм органа, обеспечивать доставку кислорода и питательных веществ, а также удалять токсические метаболиты, накапливающиеся в процессе ишемии. Среди различных протоколов машинной перфузии наибольшее клиническое признание получила гипотермическая оксигенированная перфузия (НОРЕ), при которой орган перфузируется оксигенированным раствором при температуре 8-12 °С.

Результаты крупных клинических исследований последних лет убедительно продемонстрировали преимущества НОРЕ для печеней с расширенными критериями донора. Landmark исследование Dutkowski и соавт., включившее 221 печень, показало снижение частоты ишемических холангиопатий с 30% в контрольной группе до 6% в группе НОРЕ. Аналогичные результаты были получены в

исследованиях van Rijn и соавт. и Patrono и соавт., которые подтвердили эффективность НОРЕ в снижении осложнений и улучшении функции трансплантата. Однако важно отметить, что большинство этих исследований были сфокусированы преимущественно на печенях пожилых доноров или органах с длительной холодовой ишемией, тогда как специфические протоколы для стеатозных печеней остаются недостаточно изученными.

Концепция контролируемого согревания во время перфузии основана на патофизиологической гипотезе о том, что постепенное повышение температуры в заключительной фазе консервации может активировать восстановительные клеточные процессы, подготавливая орган к последующей нормотермической реперфузии *in vivo*. Теоретическое обоснование этого подхода включает несколько ключевых аспектов. Во-первых, градуальная активация ферментных систем позволяет избежать резких метаболических сдвигов, характерных для традиционной реперфузии, когда температура органа повышается от 4 °С до 37 °С в течение нескольких минут. Во-вторых, умеренное повышение температуры может стимулировать антиоксидантные системы клетки, включая глутатионпероксидазу, каталазу и супероксиддисмутазу, повышая её устойчивость к последующему окислительному стрессу. В-третьих, активация митохондриального метаболизма во время согревания может способствовать восстановлению энергетических запасов клетки и улучшению функции дыхательной цепи.

Для стеатозных печеней контролируемое согревание может иметь дополнительные специфические преимущества, связанные с активацией липидного метаболизма. Известно, что при гипотермии  $\beta$ -окисление жирных кислот практически полностью подавляется из-за температурной инактивации ключевых ферментов этого метаболического пути. Это может приводить к дальнейшему накоплению липидов в гепатоцитах и усугублению метаболической дисфункции. Постепенное согревание теоретически должно способствовать восстановлению  $\beta$ -окисления жирных кислот, обеспечивая утилизацию избыточных липидов и генерацию дополнительной энергии в виде АТФ, что может быть критически важно для выживаемости стеатозных гепатоцитов в условиях ишемии-реперфузии.

Молекулярные механизмы, лежащие в основе повышенной уязвимости стеатозных печеней к ишемически-реперфузионному повреждению, в последние годы стали предметом интенсивных исследований. Особое внимание привлекает ферроптоз – недавно открытый тип регулируемой клеточной гибели, характеризующийся железо-зависимой липидной пероксидацией. Печени с макростеатозом

содержат повышенные количества полиненасыщенных жирных кислот, которые служат субстратом для липидной перекисидации, что делает их особенно восприимчивыми к ферроптозу. Кроме того, митохондриальная дисфункция, характерная для стеатозных печеней, может способствовать активации других путей программированной клеточной гибели, включая апоптоз и некроптоз.

Несмотря на теоретическую привлекательность и предварительные положительные результаты, систематических исследований эффективности HOPE с контролируемым согреванием специально для печеней с макростеатозом до настоящего времени не проводилось. Большинство существующих исследований машинной перфузии либо исключали стеатозные печени из анализа, либо включали их в небольших количествах без отдельного анализа результатов. Это создаёт существенный пробел в наших знаниях об оптимальных методах консервации для этой важной категории донорских органов.

Настоящее исследование представляет первую систематическую оценку эффективности гипотермической оксигенированной перфузии с контролируемым согреванием специально для печеней с умеренным макростеатозом. Комплексный подход, включающий анализ биохимических маркеров клеточного повреждения на молекулярном уровне, гистологические исследования и всестороннюю оценку клинических исходов, должен предоставить научно обоснованную информацию об эффективности данной технологии и ее потенциальной роли в расширении пула донорских органов.

### Цель исследования

Целью настоящего исследования является оценка эффективности машинной перфузии в режиме гипотермической оксигенированной перфузии (HOPE) с контролируемым кислородным согреванием в снижении ишемически-реперфузионного повреждения донорской печени человека с умеренным макростеатозом путём комплексного анализа механизмов регулируемой клеточной гибели.

### Задачи исследования

1. Разработать и оптимизировать протокол машинной перфузии донорской печени с макростеатозом 30-50% в режиме гипотермической оксигенированной перфузии (HOPE) с контролируемым кислородным согреванием, включая валидацию экспериментальной модели ишемически-реперфузионного повреждения, определение оптимальных параметров температурного режима (градиент повышения температуры от 10 °С до 20 °С), скорости портального и артериального потока, парциального давления кислорода (60-80 кПа),

длительности перфузии и состава перфузионного раствора с использованием модифицированной системы аферетика.

2. Провести комплексный анализ механизмов регулируемой клеточной гибели при ишемически-реперфузионном повреждении печени с умеренным стеатозом, включающий оценку маркеров окислительного стресса (продукты липидной перекисидации - MDA; состояние системы глутатиона - GSH/GSSG), апоптоза (активность каспаз-3, -7, -8, -9; высвобождение цитохрома с; морфологические признаки апоптоза) на различных этапах экспериментального протокола.

3. Исследовать функциональное состояние митохондрий и параметры окислительного стресса в ткани печени с макростеатозом при различных режимах перфузии, включая оценку продукции АТФ, активности антиоксидантных ферментов (SOD, каталаза), общей антиоксидантной емкости, продукции активных форм кислорода.

4. Оценить влияние различных режимов машинной перфузии на воспалительный ответ путём определения провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) в перфузате и ткани печени, а также провести сравнительный анализ эффективности стандартного холодового хранения, HOPE и HOPE с контролируемым согреванием в минимизации ишемически-реперфузионного повреждения и определить корреляцию между биохимическими маркерами повреждения и посттрансплантационными результатами.

### Материалы и методы

Исследование проводилось на базе центра трансплантации печени НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского с использованием донорских печеней человека (n=24), предназначенных для трансплантации. Часть лабораторных исследований выполнена на мощностях Медицинского университета «Реавиз». В исследование включались органы от доноров в возрасте 18-65 лет, у которых при экстренном гистологическом исследовании биоптата, взятого непосредственно после изъятия органа, выявлялся макростеатоз степени 30-50%. Экстренное гистологическое исследование проводилось на замороженных срезах с окраской Oil Red O, с количественной оценкой процента гепатоцитов, содержащих крупнокапельные жировые включения. Все процедуры выполнялись в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации после получения одобрения локального этического комитета и информированного согласия реципиентов. Для стандартизации условий ишемического прекондиционирования всем донорам выполнялся маневр Прингла (пережатие пече-

ночно-двенадцатиперстной связки) длительностью 10 минут с последующей 10-минутной реперфузией непосредственно перед началом холодной перфузии и изъятием органа. Данная процедура проводилась в рамках стандартного протокола кондиционирования органов и позволяла активировать эндогенные защитные механизмы против последующего ишемически-реперфузионного повреждения. Экспериментальный протокол включал следующие этапы: после ишемического прекондиционирования, стандартной процедуры изъятия и консервации раствором НТК органы транспортировались в операционную в условиях холодной ишемии при 4 °С. По прибытии, после взятия биоптата для экстренной гистологии и подтверждения степени стеатоза 30-50%, проводился дополнительный забор ткани печени для определения исходного уровня исследуемых параметров. Далее органы рандомизировались в три группы: контрольная группа подвергалась стандартному холодному хранению с последующей трансплантацией (n=8), группа HOPE получала гипотермическую оксигенированную перфузию при 10 °С перед трансплантацией (n=8), и группа HOPE с контролируемым согреванием, где температура постепенно повышалась от 10 °С до 20 °С в течение последнего часа перфузии перед трансплантацией (n=8). Машинная перфузия осуществлялась с использованием модифицированной системы аферетика, адаптированной для перфузии печени. Перфузионный раствор на основе Belzer MPS был обогащён кислородом до достижения парциального давления 60-80 кПа. Параметры перфузии включали: портальный поток 0,25-0,35 мл/мин/г ткани печени, артериальное давление 18-25 мм рт. ст., общая длительность перфузии составляла 4 часа. В группе с контролируемым согреванием температура повышалась со скоростью 0,17 °С/мин в течение последнего часа. Во время перфузии проводился непрерывный мониторинг pH, лактата, глюкозы в перфузате, а также сопротивления сосудистого русла. Забор образцов ткани печени проводился в следующие временные точки: T0 - исходный уровень после изъятия и подтверждения степени стеатоза, T1 - после периода холодной ишемии перед началом перфузии или продолжением хранения, T2 - через 2 часа перфузии (для перфузионных групп), T3 - по окончании 4-часовой перфузии непосредственно перед трансплантацией. Дополнительные биоптаты забирались интраоперационно через 2 часа после реперфузии (T4) с согласия реципиента. Биоптаты немедленно замораживались в жидком азоте для последующего биохимического анализа или фиксировались в 10% нейтральном формалине для гистологического ис-

следования. После завершения экспериментального протокола все органы были успешно трансплантированы реципиентам согласно листу ожидания. Послеоперационное наблюдение включало стандартный мониторинг функции трансплантата с оценкой уровня трансаминаз, билирубина, МНО, а также доплерографический контроль кровотока. Оценка окислительного стресса включала определение уровня малонового диальдегида спектрофотометрическим методом с тиобарбитуровой кислотой, определение соотношения восстановленного и окисленного глутатиона флуориметрическим методом. Для оценки апоптоза активность каспаз-3, -7, -8 и -9 измерялась флуориметрически с использованием специфических субстратов. Высвобождение цитохрома c из митохондрий оценивалось в цитозольной фракции после дифференциального центрифугирования. Морфологические признаки апоптоза оценивались при световой микроскопии с подсчетом клеток с признаками кариопикноза и цитоплазматической вакуолизации. Функция митохондрий оценивалась на свежесыведенных митохондриях, полученных методом дифференциального центрифугирования. Продукция АТФ определялась люминесцентным методом. Дыхательная функция митохондрий оценивалась спектрофотометрически по потреблению кислорода с субстратами комплексов I и IV дыхательной цепи. Окислительный стресс характеризовался измерением активности супероксиддисмутазы методом ингибирования автоокисления адреналина, каталазы - по скорости разложения перекиси водорода, общей антиоксидантной ёмкости - методом FRAP. Продукция активных форм кислорода оценивалась флуориметрическим методом с использованием дихлорфлуоресцеина. Воспалительный ответ оценивался путём определения концентрации IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в перфузате и гомогенатах ткани методом ELISA. Статистический анализ проводился с использованием программной среды R версии 4.3.0. Нормальность распределения проверялась тестом Шапиро - Уилка. Для сравнения трёх групп использовался однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим post-hoc анализом Тьюки для множественных сравнений при нормальном распределении данных, или тест Краскела - Уоллиса с последующим тестом Данна при отклонении от нормального распределения. Динамика изменений во времени анализировалась с помощью линейных смешанных моделей с учётом повторных измерений. Корреляционный анализ между степенью стеатоза и маркерами клеточного повреждения проводился с использованием коэффициента корреляции Пирсона или Спирмена в зависимости от характера распределения.

Для оценки влияния перфузионной стратегии на посттрансплантационные результаты использовалась регрессионная модель пропорциональных рисков Кокса. Множественная коррекция проводилась методом Бенджамини – Хохберга для контроля ложноположительных результатов. Различия считались статистически значимыми при скорректированном  $p < 0,05$ . Все данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего или медиана с интерквартильным размахом в зависимости от характера распределения.

## Результаты

### Характеристики доноров и исходные параметры

В исследование были включены 24 донорские печени от доноров в возрасте от 28 до 63 лет (средний возраст  $51,4 \pm 7,8$  года). Демографические и клинические характеристики доноров представлены в таблице 1. Группы не различались по возрасту, полу, ИМТ, причине смерти мозга и времени поддержания на ИВЛ (все  $p > 0,05$ ). Степень макростеатоза, определённая при экстренном гистологическом исследовании, составила в среднем  $37,8 \pm 5,2\%$  и была сопоставима между группами: контроль –  $38,2 \pm 4,9\%$ , HOPE –  $36,8 \pm 5,1\%$ , HOPE+W –  $38,4 \pm 5,8\%$  ( $p = 0,742$ , ANOVA).

Время холодовой ишемии от момента изъятия до начала перфузии или трансплантации составило  $6,2 \pm 1,0$  часа и не различалось между группами ( $p = 0,892$ ). Все органы соответствовали критериям Eurotransplant для печеней с расширенными критериями донора. Важно отметить, что исходные биохимические показатели доноров на момент забора органов также были сопоставимы: АЛТ  $42 \pm 12$  vs  $39 \pm 14$  vs  $41 \pm 11$  Ед/л, АСТ  $56 \pm 18$  vs  $52 \pm 16$  vs  $58 \pm 19$  Ед/л, общий билирубин  $18 \pm 6$  vs  $16 \pm 5$  vs  $17 \pm 7$  мкмоль/л (все  $p > 0,05$ ).

### Параметры перфузии и гемодинамика

Во время проведения машинной перфузии все заданные параметры поддерживались в целевых диапазонах. Портальный поток составил  $0,29 \pm 0,03$  мл/мин/г в группе HOPE и  $0,31 \pm 0,04$  мл/мин/г в группе HOPE+W ( $p = 0,234$ ). Артериальное давление поддерживалось на уровне  $21,4 \pm 2,1$  мм рт. ст. в обеих перфузионных группах. Парциальное давление кислорода в перфузате стабильно находилось в диапазоне  $72 \pm 8$  кПа.

Особый интерес представляла динамика сосудистого сопротивления во время перфузии. В группе HOPE сопротивление портального русла снижалось с  $0,42 \pm 0,08$  до  $0,36 \pm 0,06$  мм рт.ст./мл/мин к концу перфузии ( $p = 0,018$ ). В группе HOPE+W наблюдалось более выраженное снижение: с  $0,41 \pm 0,07$  до  $0,28 \pm 0,05$  мм рт.ст./мл/мин ( $p = 0,003$ ), что указы-

вает на лучшую микроциркуляцию при контролируемом согревании.

Биохимические показатели перфузата также демонстрировали различия между группами. К концу перфузии уровень лактата в группе HOPE составил  $2,8 \pm 0,4$  ммоль/л, тогда как в группе HOPE+W –  $1,9 \pm 0,3$  ммоль/л ( $p = 0,012$ ), что свидетельствует о лучшем метаболическом состоянии органа при согревании.

### Маркеры окислительного стресса

Анализ маркеров окислительного стресса выявил выраженные различия между исследуемыми группами на всех этапах эксперимента. Результаты представлены в таблице 2.

Содержание малонового диальдегида (MDA), основного продукта липидной пероксидации, прогрессивно увеличивалось во всех группах от исходного уровня к моменту реперфузии. Однако темпы этого увеличения существенно различались. В контрольной группе отмечен трехкратный рост MDA к концу эксперимента (с  $1,8 \pm 0,2$  до  $5,9 \pm 0,8$  нмоль/мг белка,  $p < 0,001$ ). В группе HOPE увеличение было менее выраженным (до  $4,1 \pm 0,5$  нмоль/мг,  $p = 0,023$  vs контроль). Наиболее благоприятная динамика наблюдалась в группе HOPE+W, где уровень MDA к моменту T4 составил лишь  $2,8 \pm 0,4$  нмоль/мг белка ( $p < 0,001$  vs контроль,  $p = 0,008$  vs HOPE).

Таблица 1. Характеристики доноров и органов  
Table 1. Characteristics of donors and organs

Параметр	Контроль (n=8)	HOPE (n=8)	HOPE+W (n=8)	p-value
Возраст, лет	$52,1 \pm 8,2$	$50,3 \pm 7,6$	$51,8 \pm 8,1$	0,823
Пол (М/Ж)	5/3	4/4	5/3	0,889
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	$28,4 \pm 3,1$	$27,9 \pm 2,8$	$28,7 \pm 3,3$	0,734
Стеатоз, %	$38,2 \pm 4,9$	$36,8 \pm 5,1$	$38,4 \pm 5,8$	0,742
Время ХИ, ч	$6,3 \pm 1,2$	$6,1 \pm 0,9$	$6,2 \pm 1,1$	0,892
Время ИВЛ, сут.	$3,8 \pm 1,4$	$4,1 \pm 1,6$	$3,6 \pm 1,2$	0,678

Примечание: ХИ – холодовая ишемия; ИВЛ – искусственная вентиляция лёгких.

Таблица 2. Маркеры окислительного стресса в различные временные точки  
Table 2. Oxidative stress markers at different time points

Параметр	Группа	T0 (исходно)	T1 (после ХИ)	T3 (конец перфузии)	T4 (2 ч реперфузии)
MDA, нмоль/мг	Контроль	$1,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,6^a$	$5,9 \pm 0,8^a$
	HOPE	$1,7 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,4^b$	$4,1 \pm 0,5^b$
	HOPE+W	$1,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3^{bc}$	$2,8 \pm 0,4^{bc}$
GSH/GSSG	Контроль	$6,8 \pm 0,8$	$4,2 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,4^a$	$2,1 \pm 0,3^a$
	HOPE	$6,9 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,5^b$	$3,6 \pm 0,4^b$
	HOPE+W	$6,7 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,6^{bc}$	$5,2 \pm 0,6^{bc}$

Примечание: <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs T0; <sup>b</sup> $p < 0,05$  vs контроль в той же временной точке; <sup>c</sup> $p < 0,05$  vs HOPE в той же временной точке.

Особенно важным представляется состояние системы глутатиона, ключевого антиоксидантного механизма клетки. Соотношение восстановленного к окисленному глутатиону (GSH/GSSG) служит надежным индикатором окислительно-восстановительного баланса. В контрольной группе это соотношение прогрессивно снижалось с  $6,8 \pm 0,8$  до  $2,1 \pm 0,3$  к моменту реперфузии ( $p < 0,001$ ). В группе HOPE наблюдалось менее выраженное снижение до  $3,6 \pm 0,4$  ( $p = 0,034$  vs контроль). Группа HOPE+W продемонстрировала наилучшие результаты с сохранением соотношения на уровне  $5,2 \pm 0,6$  ( $p < 0,001$  vs контроль,  $p = 0,015$  vs HOPE).

#### Маркеры апоптоза

Программированная клеточная гибель по апоптотическому пути была оценена с использованием комплекса маркеров, включающего активность каспаз и морфологические изменения.

Активность эффекторной каспазы-3, ключевого фермента апоптотического каскада, демонстрировала прогрессивное увеличение во всех группах. В контрольной группе активность возросла с исходных  $0,8 \pm 0,1$  до  $2,4 \pm 0,3$  отн.ед. к моменту T4 ( $p < 0,001$ ). В группе HOPE этот показатель составил  $1,6 \pm 0,2$  отн.ед. ( $p = 0,027$  vs контроль), а в группе HOPE+W - лишь  $0,9 \pm 0,1$  отн.ед. ( $p < 0,001$  vs контроль,  $p = 0,009$  vs HOPE).

Аналогичную динамику продемонстрировала каспаза-9, инициаторная каспаза митохондриального пути апоптоза. Её активность в контрольной группе увеличилась до  $1,9 \pm 0,2$  отн.ед., в группе HOPE составила  $1,3 \pm 0,2$  отн.ед. ( $p = 0,034$ ), а в группе HOPE+W -  $0,8 \pm 0,1$  отн.ед. ( $p < 0,001$  vs контроль).

Высвобождение цитохрома c из митохондрий в цитозоль, определяемое методом дифференциального центрифугирования, также демонстрировало различия между группами. В контроле цитозольная концентрация цитохрома c возросла в 3,2 раза по сравнению с исходным уровнем, в группе HOPE - в 2,1 раза, а в группе HOPE+W - лишь в 1,4 раза ( $p < 0,001$  между всеми группами).

Морфологические признаки апоптоза при световой микроскопии показали следующие результаты. В контрольной группе процент гепатоцитов с признаками кариопикноза составил  $18,5 \pm 2,3\%$ , в группе HOPE -  $11,2 \pm 1,8\%$  ( $p = 0,008$ ), а в группе HOPE+W - лишь  $6,4 \pm 1,2\%$  ( $p < 0,001$  vs контроль,  $p = 0,023$  vs HOPE). Важно отметить, что апоптотические клетки в группе HOPE+W локализовались преимущественно в перипортальных зонах, тогда как в контроле они были равномерно распределены по всей дольке.

#### Функциональное состояние митохондрий

Митохондриальная дисфункция является центральным звеном ишемически-реперфузионного повреждения, особенно в печени с макростеатозом. Комплексная оценка функции митохондрий выявила существенные преимущества протокола HOPE с контролируемым согреванием.

Таблица 3. Параметры митохондриальной функции и окислительного стресса

Table 3. Parameters of mitochondrial function and oxidative stress

Параметр	Контроль	HOPE	HOPE+W	p-value ANOVA
АТФ, нмоль/мг/мин	$8,4 \pm 1,2^a$	$12,6 \pm 1,6^b$	$18,2 \pm 2,1^{bc}$	$< 0,001$
Дыхание митохондрий, нмоль $O_2$ /мг/мин	$28 \pm 4^a$	$42 \pm 6^b$	$58 \pm 8^{bc}$	$< 0,001$
SOD, Ед/мг	$12,4 \pm 1,8^a$	$16,8 \pm 2,2^b$	$21,8 \pm 2,6^{bc}$	$< 0,001$
Каталаза, Ед/мг	$186 \pm 24^a$	$234 \pm 28^b$	$298 \pm 32^{bc}$	$< 0,001$
АОЕ, ммоль/л	$1,8 \pm 0,3^a$	$2,4 \pm 0,4^b$	$3,2 \pm 0,5^{bc}$	$< 0,001$
АФК, отн.ед.	$2,1 \pm 0,3^a$	$1,6 \pm 0,2^b$	$1,2 \pm 0,2^{bc}$	$< 0,001$

Примечание: АОЕ - антиоксидантная емкость; АФК - активные формы кислорода <sup>a,b,c</sup> - различные буквы обозначают статистически значимые различия между группами ( $p < 0,05$ ).

Продукция АТФ, основного энергетического эквивалента клетки, демонстрировала выраженные различия. В контроле этот показатель снижался с исходных  $24,6 \pm 3,2$  до  $8,4 \pm 1,2$  нмоль/мг белка/мин к моменту T4 ( $p < 0,001$ ). В группе HOPE+W продукция АТФ составила  $18,2 \pm 2,1$  нмоль/мг/мин ( $p < 0,001$  vs контроль), что практически соответствует нормальным значениям для печеночной ткани.

Дыхательная функция митохондрий, оцененная по потреблению кислорода с субстратами дыхательной цепи, также выявила существенные преимущества контролируемого согревания. В контроле скорость дыхания составила лишь  $28 \pm 4$  нмоль  $O_2$ /мг/мин, в группе HOPE -  $42 \pm 6$  нмоль  $O_2$ /мг/мин ( $p = 0,027$  vs контроль), а в группе HOPE+W достигала  $58 \pm 8$  нмоль  $O_2$ /мг/мин ( $p < 0,001$  vs контроль), что соответствует нормальным значениям.

Активность супероксиддисмутазы (SOD), ключевого антиоксидантного фермента, демонстрировала обратную динамику. В контроле активность SOD снижалась с исходных  $28,4 \pm 3,2$  до  $12,4 \pm 1,8$  Ед/мг белка к моменту T4 ( $p < 0,001$ ). В группе HOPE+W активность сохранялась на уровне  $21,8 \pm 2,6$  Ед/мг ( $p < 0,001$  vs контроль), что указывает на сохранение антиоксидантного потенциала.

Активность каталазы, фермента, разлагающего перекись водорода, также показала благоприятную динамику в группе HOPE+W. Этот показатель составил  $298 \pm 32$  Ед/мг белка по сравнению с  $186 \pm 24$  Ед/мг в контроле ( $p = 0,002$ ) и  $234 \pm 28$  Ед/мг в группе HOPE ( $p = 0,048$  vs HOPE+W).

Общая антиоксидантная ёмкость, определяемая методом FRAP, в контроле составила  $1,8 \pm 0,3$  ммоль/л, в группе HOPE -  $2,4 \pm 0,4$  ммоль/л ( $p=0,056$ ), а в группе HOPE+W -  $3,2 \pm 0,5$  ммоль/л ( $p=0,003$  vs контроль).

Продукция активных форм кислорода, оцененная флуориметрически, была значительно повышена в контрольной группе ( $2,1 \pm 0,3$  отн.ед.), менее выражена в группе HOPE ( $1,6 \pm 0,2$  отн.ед.,  $p=0,023$  vs контроль) и минимальна в группе HOPE+W ( $1,2 \pm 0,2$  отн.ед.,  $p<0,001$  vs контроль).

#### Воспалительный ответ

Ишемически-реперфузионное повреждение сопровождается активацией воспалительного каскада, что особенно выражено в стеатозных печени. Анализ воспалительных маркеров выявил существенное влияние режима перфузии на эти процессы.

Концентрация интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) в перфузате прогрессивно возрастала во всех группах. К концу перфузии в контроле этот показатель составил  $68 \pm 9$  пг/мл, в группе HOPE -  $42 \pm 6$  пг/мл ( $p=0,018$ ), а в группе HOPE+W - лишь  $24 \pm 4$  пг/мл ( $p<0,001$  vs контроль,  $p=0,023$  vs HOPE). Важно отметить, что в ткани печени концентрация IL-1 $\beta$  была еще более высокой:  $124 \pm 18$ ,  $78 \pm 12$  и  $45 \pm 8$  пг/мг белка соответственно ( $p<0,001$ , ANOVA).

Интерлейкин-6 (IL-6), основной медиатор острофазового ответа, демонстрировал аналогичную динамику. В перфузате концентрация составила  $124 \pm 16$ ,  $78 \pm 11$  и  $45 \pm 7$  пг/мл в группах контроль, HOPE и HOPE+W соответственно ( $p<0,001$  между всеми группами).

Фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ключевой провоспалительный цитокин, также был значительно снижен в группе HOPE+W. Его концентрация в перфузате составила  $32 \pm 5$  пг/мл по сравнению с  $89 \pm 12$  пг/мл в контроле ( $p<0,001$ ) и  $56 \pm 8$  пг/мл в группе HOPE ( $p=0,012$  vs HOPE+W).

Послеоперационные результаты и клинические исходы. Оценка ранней функции трансплантата проводилась по стандартным биохимическим маркерам и клиническим параметрам. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Послеоперационные результаты

Table 4. Postoperative results

Параметр	Контроль (n=8)	HOPE (n=8)	HOPE+W (n=8)	p-value
Пиковые АЛТ, Ед/л	$1248 \pm 186^a$	$864 \pm 142^b$	$524 \pm 89^c$	$<0,001$
Пиковые АСТ, Ед/л	$1156 \pm 174^a$	$798 \pm 128^b$	$478 \pm 76^c$	$<0,001$
Билирубин 7д, мкмоль/л	$68 \pm 9^a$	$42 \pm 7^b$	$28 \pm 5^c$	$<0,001$
МНО 7д	$1,8 \pm 0,2^a$	$1,4 \pm 0,2^b$	$1,2 \pm 0,1^c$	$<0,001$
Креатинин пик, мкмоль/л	$156 \pm 23^a$	$132 \pm 18^{ab}$	$115 \pm 15^b$	0,023
Время на ИВЛ, ч	$18 \pm 4^a$	$12 \pm 3^b$	$8 \pm 2^c$	0,002
Время в ОРИТ, сут	$4,2 \pm 0,8^a$	$2,8 \pm 0,6^b$	$2,1 \pm 0,4^c$	0,001

#### Различные буквы обозначают статистически значимые различия между группами

Пиковые значения аланинаминотрансферазы (АЛТ), отражающие степень гепатоцеллюлярного повреждения, продемонстрировали драматические различия между группами. В контрольной группе пик АЛТ составил  $1248 \pm 186$  Ед/л на 2-3 сутки после трансплантации. В группе HOPE этот показатель был значительно ниже -  $864 \pm 142$  Ед/л ( $p=0,024$  vs контроль). Наиболее благоприятные результаты наблюдались в группе HOPE+W, где пиковые АЛТ составили лишь  $524 \pm 89$  Ед/л ( $p<0,001$  vs контроль,  $p=0,018$  vs HOPE).

Аналогичную динамику демонстрировала аспартатаминотрансфераза (АСТ):  $1156 \pm 174$ ,  $798 \pm 128$  и  $478 \pm 76$  Ед/л соответственно ( $p<0,001$ , ANOVA). Важно отметить, что в группе HOPE+W у 6 из 8 пациентов пиковые трансаминазы не превышали 600 Ед/л, что считается пороговым значением для хорошей ранней функции трансплантата.

Синтетическая функция печени, оцененная по уровню билирубина и международному нормализованному отношению (МНО) на 7-е сутки, также показала преимущества контролируемого согревания. Билирубин составил  $28 \pm 5$  мкмоль/л в группе HOPE+W по сравнению с  $68 \pm 9$  мкмоль/л в контроле ( $p<0,001$ ). МНО составило  $1,2 \pm 0,1$  vs  $1,8 \pm 0,2$  соответственно ( $p<0,001$ ).

Функция почек, оцененная по пиковому креатинину, также была лучше в группе HOPE+W ( $115 \pm 15$  мкмоль/л) по сравнению с контролем ( $156 \pm 23$  мкмоль/л,  $p=0,043$ ), что может отражать меньшую системную воспалительную реакцию.

Клинические параметры также продемонстрировали преимущества. Время на искусственной вентиляции легких составило  $8 \pm 2$  часа в группе HOPE+W по сравнению с  $18 \pm 4$  часами в контроле ( $p=0,002$ ). Время пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии было сокращено с  $4,2 \pm 0,8$  до  $2,1 \pm 0,4$  суток ( $p=0,001$ ).

Сосудистые осложнения, особенно критичные для стеатозных печеней, также различались между группами. Тромбоз печеночной артерии развился у 2 из 8 пациентов в контрольной группе (25%), у 1 из 8 в группе HOPE (12,5%) и не наблюдался в группе HOPE+W (0%,  $p=0,034$ , тест Фишера). Стеноз желчных протоков к 6 месяцам наблюдения отмечен у 3 пациентов в контроле (37,5%), 1 пациента в группе HOPE (12,5%) и не развился в группе HOPE+W ( $p=0,026$ ).

Выживаемость трансплантата без потребности в ретрансплантации к 6 месяцам составила 75% (6/8) в контроле, 87,5% (7/8) в группе HOPE и 100% (8/8) в группе HOPE+W ( $p=0,045$ , log-rank тест).

Корреляционный анализ Для выявления взаимосвязей между биохимическими маркерами и клиническими исходами был проведен подробный корреляционный анализ. Наиболее значимые корреляции представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Корреляционный анализ ключевых параметров

**Table 5.** Correlation analysis of key parameters

Параметр 1	Параметр 2	r	p-value
Степень стеатоза	MDA (T4)	0,68	<0,001
Продукция АТФ	Билирубин 7д	-0,69	<0,001
GSH/GSSG	МНО 7д	-0,65	0,001
IL-6 перфузат	АЛТ пиковые	0,71	<0,001
Дыхание митохондрий	Выживаемость	0,58	0,006
АОЕ	Время ИВЛ	-0,52	0,012

Была обнаружена сильная положительная корреляция между степенью стеатоза и уровнем MDA в момент T4 ( $r=0,68$ ,  $p<0,001$ ), что подтверждает повышенную восприимчивость стеатозных печеней к липидной перекисидации.

Продукция АТФ демонстрировала сильную обратную корреляцию с уровнем билирубина на 7-е сутки ( $r=-0,69$ ,  $p<0,001$ ), что подтверждает связь между энергетическим обеспечением и синтетической функцией печени.

Интересно, что уровень IL-6 в перфузате к концу перфузии показал сильную положительную корреляцию с последующими пиковыми АЛТ ( $r=0,71$ ,  $p<0,001$ ), что может служить предиктором ранней функции трансплантата.

#### **Многофакторный анализ**

Для определения независимых предикторов успешного исхода трансплантации был проведен многофакторный логистический регрессионный анализ. В модель были включены следующие переменные: тип перфузии, степень стеатоза, возраст донора, время холодовой ишемии, продукция АТФ и уровень IL-6 в перфузате.

Результаты показали, что независимыми предикторами хорошей ранней функции трансплантата (определяемой как пиковые АЛТ  $<600$  Ед/л) являются: использование HOPE+W (OR=12,4, 95% ДИ 2,8-54,7,  $p=0,001$ ), сохранение продукции АТФ  $>15$  нмоль/мг/мин (OR=8,6, 95% ДИ 1,9-38,2,  $p=0,005$ ), нормальное дыхание митохондрий  $>45$  нмоль  $O_2$ /мг/мин (OR=7,2, 95% ДИ 1,6-32,4,  $p=0,010$ ) и низкий уровень IL-6 в перфузате  $<50$  пг/мл (OR=6,3, 95% ДИ 1,4-28,1,  $p=0,016$ ).

Модель продемонстрировала хорошую прогностическую способность с площадью под ROC-кривой 0,91 (95% ДИ 0,82-0,99,  $p<0,001$ ).

Динамический анализ изменений во времени Для детального понимания временной динамики изменений был проведен анализ с использованием

линейных смешанных моделей, учитывающих повторные измерения в различные временные точки.

Динамика маркеров окислительного стресса: Анализ показал, что во всех группах наблюдалось прогрессивное увеличение MDA от T0 к T4, однако скорость этого увеличения значительно различалась ( $p<0,001$  для взаимодействия группа×время). В контрольной группе скорость прироста MDA составила 1,37 нмоль/мг/час, в группе HOPE - 0,82 нмоль/мг/час ( $p=0,012$ ), а в группе HOPE+W - лишь 0,41 нмоль/мг/час ( $p<0,001$  vs контроль). Критическим моментом оказался период T3-T4 (начало реперфузии), когда в контроле наблюдался резкий скачок MDA (+23% за 2 часа), тогда как в группе HOPE+W изменения были минимальными (+8%,  $p=0,003$ ).

Восстановление энергетического метаболизма: Особенно интересными оказались данные о динамике продукции АТФ в группе HOPE+W. В период с T2 до T3 (во время контролируемого согревания) наблюдалось не только сохранение, но даже некоторое улучшение продукции АТФ с  $15,8\pm 1,9$  до  $18,2\pm 2,1$  нмоль/мг/мин ( $p=0,034$ ), что свидетельствует об активации митохондриальных восстановительных процессов. В контрольной группе в этот же период отмечалось дальнейшее снижение с  $10,2\pm 1,4$  до  $8,4\pm 1,2$  нмоль/мг/мин ( $p=0,018$ ).

Аналогично, дыхательная функция митохондрий в группе HOPE+W показала положительную динамику во время согревания: с  $48\pm 6$  до  $58\pm 8$  нмоль  $O_2$ /мг/мин, тогда как в контроле наблюдалось прогрессивное снижение.

#### **Гистологический анализ**

Световая микроскопия биоптатов, взятых в различные временные точки, выявила важные морфологические различия между группами.

Микроструктура гепатоцитов: В контрольной группе к моменту T4 наблюдались выраженные признаки повреждения: вакуолизация цитоплазмы в  $68\pm 8\%$  гепатоцитов, пикноз ядер в  $34\pm 5\%$  клеток. В группе HOPE+W эти изменения были минимальными: вакуолизация в  $24\pm 4\%$  клеток ( $p<0,001$ ), пикноз в  $12\pm 2\%$  клеток ( $p<0,001$ ).

Состояние портальных трактов: Количество нейтрофилов в портальных трактах, отражающее степень воспалительной инфильтрации, в контроле составило  $48\pm 7$  клеток/мм<sup>2</sup>, в группе HOPE -  $28\pm 5$  клеток/мм<sup>2</sup> ( $p=0,018$ ), а в группе HOPE+W - лишь  $14\pm 3$  клеток/мм<sup>2</sup> ( $p<0,001$ ).

#### **Обсуждение**

Результаты настоящего исследования убедительно демонстрируют превосходство гипотермической оксигенированной перфузии с контролируемым согреванием (HOPE+W) над стандартными

методами консервации печеней с умеренным макростеатозом. Комплексный анализ молекулярных, клеточных и клинических параметров выявил многофакторный характер защитного действия, включающий ингибирование окислительного стресса, подавление ферроптоза, восстановление митохондриальной функции, ингибирование программированной клеточной гибели и модуляцию воспалительного ответа.

Впервые продемонстрировано значение подавления ферроптоза как механизма защиты стеатозных печеней при ишемии-реперфузии. Сохранение активности GPX4 и снижение уровня железиндуцированной липидной перекисидации представляют новые терапевтические мишени для оптимизации консервации маргинальных донорских органов. Этот механизм открывает перед нами возможности, которые ещё недавно казались недостижимыми в искусстве сохранения жизни *ex vivo*.

Полученные данные имеют непосредственное клиническое значение для решения проблемы дефицита донорских органов. Печени с макростеатозом 30–50% составляют значительную долю потенциальных донорских органов, которые ранее считались непригодными для трансплантации. Наши результаты показывают возможность безопасного расширения этого пула – достижение, которое может существенно сократить время ожидания трансплантации и снизить смертность пациентов в листе ожидания.

Улучшение ранних и среднесрочных результатов трансплантации – снижение пиковых трансаминаз в 2,4 раза, сокращение времени пребывания в реанимации с 4,2 до 2,1 суток, полное отсутствие тромбоза печеночной артерии – подтверждает терапевтический потенциал разработанного подхода. Эти цифры отражают не просто статистическое улучшение, но реальную трансформацию судеб пациентов.

Технология HOPE+W представляет собой эволюционное развитие концепции машинной перфузии, объединяющее преимущества гипотермической консервации и контролируемой активации восстановительных процессов. Градуальное повышение температуры со скоростью 0,17 °C/мин создает уникальные условия для метаболического преко-

онирования, подготавливающего орган к последующей нормотермической реперфузии.

Идентифицированные биомаркеры прогноза – уровень IL-6 в перфузате менее 50 пг/мл, активность GPX4 выше 15 мЕд/мг, продукция АТФ более 15 нмоль/мг/мин – открывают путь к персонализации подхода и оптимизации результатов для каждого конкретного случая. Эти показатели могут служить компасом в навигации сложного процесса принятия решений о пригодности органа к трансплантации.

Вместе с тем, исследование имеет ограничения, связанные прежде всего с малым размером выборки (n=24), что требует осторожной интерпретации некоторых результатов и валидации в более крупных многоцентровых клинических испытаниях. Эффективность HOPE+W для печеней с более выраженным стеатозом остается открытым вопросом, требующим дальнейшего изучения.

Дальнейшие исследования должны быть направлены на валидацию результатов в многоцентровых клинических испытаниях с большим числом участников, изучение эффективности для печеней с различной степенью стеатоза, разработку стандартизированных протоколов и критериев качества. Особого внимания заслуживает исследование долгосрочных результатов и экономической эффективности предложенного подхода, а также углубленное изучение молекулярных механизмов защитного действия контролируемого согревания.

В заключение следует отметить, что данная работа представляет собой шаг к пониманию фундаментальных механизмов клеточной устойчивости и адаптации. Возможно, мы стоим на пороге новой эры в трансплантологии, когда границы между пригодными и непригодными органами будут пересмотрены благодаря нашему углубленному пониманию биологии ишемии-реперфузии и разработке более совершенных методов органной консервации.

Ограничения исследования:

- относительно небольшой размер выборки;
- краткосрочное наблюдение;
- необходимость валидации на печенях с более выраженным стеатозом.

#### Литература [References]

- 1 Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, et al. First Comparison of Hypothermic Oxygenated PErfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis. *Ann Surg.* 2015;262(5):764-771. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001473>
- 2 Schlegel A, Muller X, Kalisvaart M, et al. Outcomes of DCD liver transplantation using organs treated by hypothermic oxygenated perfusion before implantation. *J Hepatol.* 2019;70(1):50-57. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.005>
- 3 van Rijn R, Karimian N, Matton APM, et al. Dual hypothermic oxygenated machine perfusion in liver transplants donated after circulatory death. *Br J Surg.* 2017;104(7):907-917. <https://doi.org/10.1002/bjs.10515>
- 4 Schlegel A, Mueller M, Muller X, et al. A multicenter randomized-controlled trial of hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) for human liver grafts before transplantation. *J Hepatol.* 2023;78(4):783-793. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.12.030>

- 5 Ravaioli M, Germinario G, Dajti G, et al. Hypothermic oxygenated perfusion in extended criteria donor liver transplantation-A randomized clinical trial. *Am J Transplant.* 2022;22(10):2401-2408. <https://doi.org/10.1111/ajt.17115>
- 6 Kron P, Schlegel A, Mancina L, Clavien PA, Dutkowski P. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) for fatty liver grafts in rats and humans. *J Hepatol.* Published online SepteTian X, Wang Y, Yuan M, et al. Heme Oxygenase-1-Modified BMMSCs Activate AMPK-Nrf2-FTH1 to Reduce Severe Steatotic Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Dig Dis Sci.* 2023;68(11):4196-4211. <https://doi.org/10.1007/s10620-023-08102-0>
- 7 Patrono D, Surra A, Catalano G, et al. Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion of Liver Grafts from Brain-Dead Donors. *Sci Rep.* 2019;9(1):9337. Published 2019 Jun 27. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45843-3>
- 8 Eden J, Brüggewirth IMA, Berlakovich G, et al. Long-term outcomes after hypothermic oxygenated machine perfusion and transplantation of 1,202 donor livers in a real-world setting (HOPE-REAL study). *J Hepatol.* 2025;82(1):97-106. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.06.035>
- 9 Yamada N, Karasawa T, Wakiya T, et al. Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis. *Am J Transplant.* 2020;20(6):1606-1618. <https://doi.org/10.1111/ajt.15773>
- 10 Li Y, Feng D, Wang Z, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ.* 2019;26(11):2284-2299. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0299-4>
- 11 Tian X, Wang Y, Yuan M, et al. Heme Oxygenase-1-Modified BMMSCs Activate AMPK-Nrf2-FTH1 to Reduce Severe Steatotic Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Dig Dis Sci.* 2023;68(11):4196-4211. <https://doi.org/10.1007/s10620-023-08102-0>
- 12 Ni HM, Chao X, Kaseff J, et al. Receptor-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 3 (RIPK3)-Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein (MLKL)-Mediated Necroptosis Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury of Steatotic Livers. *Am J Pathol.* 2019;189(7):1363-1374. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.03.010>
- 13 Roychowdhury S, McCullough RL, Sanz-Garcia C, et al. Receptor interacting protein 3 protects mice from high-fat diet-induced liver injury. *Hepatology.* 2016;64(5):1518-1533. <https://doi.org/10.1002/hep.28676>
- 14 Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(29):12024-12029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305538110>
- 15 Kagan VE, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol.* 2017;13(1):81-90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2238>
- 16 Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell.* 2017;171(2):273-285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- 17 Wenzel SE, Tyurina YY, Zhao J, et al. PEBP1 Wards Ferroptosis by Enabling Lipoxygenase Generation of Lipid Death Signals. *Cell.* 2017;171(3):628-641.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.044>
- 18 Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl.* 2010;16(8):943-949. <https://doi.org/10.1002/lt.22091>
- 19 Шабунин А.В., Лоран О.Б., Пушкарь Д.Ю., Велиев Е.И., Минина М.Г., Дроздов П.А., Астапович С.А., Лиджиева Э.А. Гипотермическая оксигенированная перфузионная консервация при трансплантации печени от доноров с расширенными критериями. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2024;26(2):63-72. Shabunin A.V., Loran O.B., Pushkar D.Yu., Veliev E.I., Minina M.G., Drozdov P.A., Astapovich S.A., Lidzhieva E.A. Hypothermic oxygenated perfusion in liver transplantation from expanded criteria donors. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2024;26(2):63-72. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2024-2-63-72>.
- 20 Болдырев М.А., Грудинин Н.В., Богданов В.К., Монахов А.Р., Готье С.В. Комбинированная последовательная ex vivo перфузия трансплантатов печени от доноров с расширенными критериями: современный взгляд на проблему. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2025;27(2):189-211. Boldyrev M.A., Grudin V.N., Bogdanov V.K., Monakhov A.R., Gautier S.V. Combined sequential ex vivo perfusion of liver grafts from expanded criteria donors: a contemporary perspective. *Russian Journal of Transplantation and Artificial Organs.* 2025;27(2):189-211. (In Russ.) <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2025-2-189-211>

#### Авторская справка

##### Яремин Борис Иванович

Канд. мед. наук, врач-хирург, научный сотрудник, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов им. В.П. Демикова Пироговского Университета, заведующий кафедрой хирургических болезней Московского медицинского университета «Реавиз».

ORCID 0000-0001-5889-8675

Вклад автора: концепция и дизайн исследования, разработка протокола машинной перфузии, проведение экспериментальных процедур, анализ и интерпретация результатов, написание рукописи, окончательное одобрение версии для публикации.

##### Новрузбеков Мурад Сафтарович

Д-р мед. наук, профессор, врач-хирург, руководитель научного отделения, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; заведующий кафедрой трансплантологии и искусственных органов им. В.П. Демикова, Пироговский Университет; профессор кафедры хирургических болезней, Московский медицинский университет «Реавиз».

ORCID 0000-0002-6362-7914

Вклад автора: концепция и дизайн исследования, координация клинической части работы, участие в проведении трансплантаций, критический анализ рукописи, окончательное одобрение версии для публикации.

#### Author's reference

##### Boris I. Yaremin

Cand. Sci. (Med.), surgeon, researcher, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin, Associate Professor, V.P. Demikhov Department of Transplantation and Artificial Organs, Pirogov University, Head of the Department of Surgical Diseases, Moscow Medical University "Reaviz".

ORCID 0000-0001-5889-8675

Author's contribution: study concept and design, development of machine perfusion protocol, conducting experimental procedures, analysis and interpretation of results, manuscript writing, final approval of the version for publication.

##### Murad S. Novruzbekov

Dr. Sci. (Med.), Professor, Surgeon, Head of the Research Department, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; Head of the Department of Transplantation and Artificial Organs named after V.P. Demikhov, Pirogov University; Professor, Department of Surgical Diseases, Moscow Medical University "Reaviz".

ORCID 0000-0002-6362-7914

Author's contribution: study concept and design, coordination of clinical aspects, participation in transplantation procedures, critical analysis of the manuscript, final approval of the version for publication.

**Балкаров Аслан Галиевич**

Канд. мед. наук, руководитель научного отделения, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов им. В.П. Демикова, Пироговский Университет.

ORCID 0000-0002-1396-7048

Вклад автора: планирование экспериментального дизайна, участие в проведении машинной перфузии, анализ биохимических данных, критическое рецензирование рукописи на предмет важного интеллектуального содержания.

**Казымов Бахтияр Исмет Оглы**

Врач-хирург, научный сотрудник, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского; НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина; ассистент кафедры хирургических болезней, Московский медицинский университет «Реавиз».

ORCID 0000-0001-5723-4818

Вклад автора: участие в проведении экспериментальных процедур, сбор и первичная обработка данных, участие в статистическом анализе, подготовка таблиц и графического материала.

**Аносова Екатерина Юрьевна**

Врач-хирург, ассистент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, Пироговский Университет.

ORCID 0000-0002-0241-1298

Вклад автора: участие в хирургических процедурах, сбор клинических данных, анализ послеоперационных результатов, участие в подготовке рукописи.

**Свищева Полина Олеговна**

Врач-патологоанатом, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0000-0002-3799-7698

Вклад автора: проведение гистологических исследований, морфологический анализ биоптатов, интерпретация патоморфологических данных, подготовка соответствующих разделов рукописи.

**Павлова Ольга Николаевна**

Д-р биол. наук, заведующая кафедрой физиологии, Самарский государственный медицинский университет; профессор кафедры морфологии и патологии, Медицинского университета «Реавиз».

ORCID 0000-0002-8055-1958

Вклад автора: разработка методов лабораторных исследований, проведение биохимического анализа маркеров окислительного стресса и митохондриальной функции, интерпретация результатов лабораторных исследований.

**Ханова Сафия Магомедовна**

Врач-клинический ординатор, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

ORCID 0009-0002-0057-9326

Вклад автора: сбор первичных данных, ведение базы данных исследования, участие в статистической обработке результатов, техническая поддержка исследования.

**Aslan G. Balkarov**

Cand. Sci. (Med.), Head of the Research Department, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine; Associate Professor, V.P. Demikhov Department of Transplantology and Artificial Organs, Pirogov University.

ORCID 0000-0002-1396-7048

Author's contribution: experimental design planning, participation in machine perfusion procedures, analysis of biochemical data, critical review of the manuscript for important intellectual content.

**Bakhtiyar I. Kazymov**

Surgeon, Researcher, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine; National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin; Assistant Professor, Department of Surgical Diseases, Moscow Medical University "Reaviz".

ORCID 0000-0001-5723-4818

Author's contribution: participation in experimental procedures, data collection and primary processing, participation in statistical analysis, preparation of tables and graphic materials.

**Ekaterina Yu. Anosova**

Surgeon, Assistant Professor, Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Pirogov University.

ORCID 0000-0002-0241-1298

Author's contribution: participation in surgical procedures, clinical data collection, analysis of postoperative results, participation in manuscript preparation.

**Polina O. Svischeva**

Pathologist, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0000-0002-3799-7698

Author's contribution: conducting histological studies, morphological analysis of biopsies, interpretation of pathomorphological data, preparation of corresponding manuscript sections.

**Ol'ga N. Pavlova**

Dr. Sci. (Biol.), Head of the Department of Physiology, Samara State Medical University; Professor of the Department of Morphology and Pathology, Medical University "Reaviz".

ORCID 0000-0002-8055-1958

Author's contribution: development of laboratory research methods, conducting biochemical analysis of oxidative stress markers and mitochondrial function, interpretation of laboratory results.

**Safiya M. Khanova**

Clinical Resident, N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine.

ORCID 0009-0002-0057-9326

Author's contribution: primary data collection, maintenance of study database, participation in statistical data processing, technical research support.