

# Длительная нормотермическая аутоперфузия сердечно-легочного комплекса *ex vivo* как метод эффективного кондиционирования трансплантата: экспериментальное исследование

## Для корреспонденции:

Александр Геннадьевич Макаев, [makaev\\_a@meshalkin.ru](mailto:makaev_a@meshalkin.ru)

Поступила в редакцию 16 июля 2023 г. Исправлена 8 сентября 2023 г. Принята к печати 11 сентября 2023 г.

**Цитировать:** Жульков М.О., Таркова А.Р., Зыков И.С., Макаев А.Г., Протопопов А.В., Муртазалиев М.Н., Косимов Ф.Ю., Кармадонова Н.А., Смирнов Я.М., Кливер Е.Э., Волков А.М., Агаева Х.А., Сирота Д.А. Длительная нормотермическая аутоперфузия сердечно-легочного комплекса *ex vivo* как метод эффективного кондиционирования трансплантата: экспериментальное исследование. *Патология кровообращения и кардиохирургия*. 2023;27(4):33-42. <https://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2023-4-33-42>

## Финансирование

Исследование выполнено в рамках проекта № 23-25-10013 (соглашение № 23-25-10013 от 20.04.2023 г. с Российским научным фондом, соглашение № р-52 от 03.04.2023 г. с Министерством науки и инновационной политики Новосибирской области).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Вклад авторов

Концепция и дизайн работы:  
М.О. Жульков, Д.А. Сирота, И.С. Зыков  
Сбор и анализ данных: все авторы  
Статистическая обработка данных: М.О. Жульков  
Написание статьи: М.О. Жульков  
Исправление статьи: М.О. Жульков, Д.А. Сирота, И.С. Зыков  
Утверждение окончательного варианта статьи: все авторы

## ORCID

М.О. Жульков, <https://orcid.org/0000-0002-8220-3500>  
А.Р. Таркова, <https://orcid.org/0000-0002-4291-6047>  
И.С. Зыков, <https://orcid.org/0000-0001-6253-9026>  
А.Г. Макаев, <https://orcid.org/0000-0002-0678-1026>  
А.В. Протопопов, <https://orcid.org/0000-0002-2617-2447>  
М.Н. Муртазалиев, <https://orcid.org/0009-0004-3896-6158>  
Ф.Ю. Косимов, <https://orcid.org/0009-0009-8392-1270>  
Н.А. Кармадонова, <https://orcid.org/0000-0002-1082-0876>  
Я.М. Смирнов, <https://orcid.org/0009-0000-2435-9868>  
Е.Э. Кливер, <https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>  
А.М. Волков, <https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>  
Х.А. Агаева, <https://orcid.org/0000-0002-1648-1529>  
Д.А. Сирота, <https://orcid.org/0000-0002-9940-3541>

М.О. Жульков<sup>1</sup>, А.Р. Таркова<sup>1</sup>, И.С. Зыков<sup>1</sup>, А.Г. Макаев<sup>1</sup>, А.В. Протопопов<sup>1</sup>, М.Н. Муртазалиев<sup>1</sup>, Ф.Ю. Косимов<sup>2</sup>, Н.А. Кармадонова<sup>1</sup>, Я.М. Смирнов<sup>3</sup>, Е.Э. Кливер<sup>1</sup>, А.М. Волков<sup>1</sup>, Х.А. Агаева<sup>1</sup>, Д.А. Сирота<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Российская Федерация

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Российская Федерация

## Аннотация

**Цель.** Провести сравнительное исследование эффективности 6-часовой нормотермической аутоперфузии сердечного трансплантата *ex vivo* и фармакохолодовой консервации кустодиолом (Custodiol НТК, Dr Franz Köhler Chemie GmbH, Бенсхайм, Германия).

**Методы.** В качестве модели для проведения серии острых экспериментов использовали свиней породы ландрас весом  $50 \pm 5$  кг в возрасте 4–5 мес. ( $n = 10$ ). В экспериментальной группе ( $n = 5$ ) кондиционирование сердечно-легочного комплекса проводили методом аутоперфузии в течение 6 ч. В контрольной группе восстановление насосной функции сердца осуществляли после 6-часовой фармакохолодовой консервации кустодиолом. Оценивали эффективность консервации трансплантата путем измерения параметров гемодинамики, ударной работы сердца, концентрации маркеров ишемии миокарда.

**Результаты.** После реперфузии и изоляции работающего сердечно-легочного комплекса сердечный выброс составил 0,63 [0,37; 0,80] и 0,37 [0,23; 0,37] л/мин в экспериментальной и контрольной группах соответственно ( $p < 0,05$ ). Концентрация креатинфосфокиназы-МВ, лактатдегидрогеназы, тропонина I и лактата в оттекающей из коронарного синуса крови была в 2 раза выше в группе контроля.

**Заключение.** Нормотермическая аутоперфузия показала значительное преимущество в сохранении морфофункционального статуса донорского сердца по сравнению с фармакохолодовой консервацией кустодиолом в течение 6 ч кондиционирования трансплантата *ex vivo*.

© Жульков М.О., Таркова А.Р., Зыков И.С., Макаев А.Г., Протопопов А.В., Муртазалиев М.Н., Косимов Ф.Ю., Кармадонова Н.А., Смирнов Я.М., Кливер Е.Э., Волков А.М., Агаева Х.А., Сирота Д.А., 2023



**Ключевые слова:** аутоперфузия; консервация сердца; нормотермическая перфузия; реперфузионное повреждение; трансплантация сердца; фармакохолодовая консервация

## Введение

Трансплантация сердца является основным методом спасения жизни пациентов с терминальной стадией сердечной недостаточности. Однако в полной мере потенциал этой операции не реализован по причине ограниченного числа донорских органов [1–4]. С момента выполнения первой в мире трансплантации сердца в 1967 г. Кристианом Барнардом и его командой подход к сохранению трансплантата претерпел значительные изменения [5–7]. Сегодня статическая фармакохолодовая консервация остается наиболее часто используемым способом сохранения донорского материала [8]. Несмотря на широкое применение кустодиола, этот метод ассоциирован с высоким риском реперфузионных повреждений и дисфункции в посттрансплантационном периоде [9]. Данные осложнения, связанные с пролонгированием периода ишемии, препятствуют эффективному использованию донорского пула и доступности высокотехнологичной медицинской помощи.

Аппаратные методы нормотермической перфузии донорских органов *ex vivo* позволяют уменьшить время ишемии, а также ишемическое и реперфузионное повреждение, что обеспечивает лучшие результаты трансплантации [7; 10]. Платформы нормотермической перфузии поддерживают орган в физиологической среде путем рециркуляции богатого кислородом перфузата [11]. При этом данные устройства позволяют провести функциональную оценку трансплантата и, следовательно, более точно прогнозировать посттрансплантационные исходы [12–14], уменьшить время ишемии и степень реперфузионного повреждения [15; 16], а в некоторых случаях обеспечить восстановление изначально непригодных для трансплантации органов [17; 18]. Однако проблема масштабирования современных технологий длительного кондиционирования донорских органов во многом определяется экономической составляющей. Например, стоимость однократного применения перфузионного комплекта без учета дополнительных расходных средств системы Organ Care System Heart (TransMedics, Андовер, США) составляет 40 000 долларов США, что в условиях огра-

ничения расходов многих систем здравоохранения выступает препятствием для широкого внедрения данных технологий [19]. В связи с этим разработка эффективного и экономически выгодного способа длительного кондиционирования сердца является актуальной проблемой трансплантологии.

Несмотря на описанный R.L. Hardesty и B.P. Griffith клинический опыт 20 трансплантаций сердца после дистанционного забора и кондиционирования органа методом аутоперфузии, интерес к данной методике угас по причине достаточной эффективности фармакохолодовой консервации разработанным к тому времени раствором Бретшнайдера, получившим торговое название кустодиол [20]. Однако на территории Российской Федерации дальнейшее развитие метода длительной нормотермической аутоперфузии может позволитькратно увеличить объем трансплантологической помощи при минимальных экономических затратах.

Цель — провести сравнительное исследование эффективности 6-часовой нормотермической аутоперфузии сердечного трансплантата *ex vivo* и фармакохолодовой консервации кустодиолом.

## Методы

### Подготовка животных к эксперименту

В качестве экспериментальной модели для проведения серии острых экспериментов использовали свиней породы ландрас, самок весом  $50 \pm 5$  кг в возрасте 4–5 мес. ( $n = 10$ ). Уход, обеспечение эксперимента, наблюдение и вывод животных из него выполняли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (заключена в Страсбурге 18.03.1986 г.). Протокол исследования одобрен решением комиссии по биоэтике ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (протокол № 2 от 01.09.2022 г.). В экспериментальной группе ( $n = 5$ ) кондиционирование сердца проводили в условиях 6-часовой нормотермической аутоперфузии сердечно-легочного комплекса *ex vivo*, затем выполняли фармакохолодовую консервацию кустодиолом при  $4^\circ\text{C}$  в течение 1 ч с последующей реперфузией аппаратом искусственного кровообращения. В качестве группы контроля

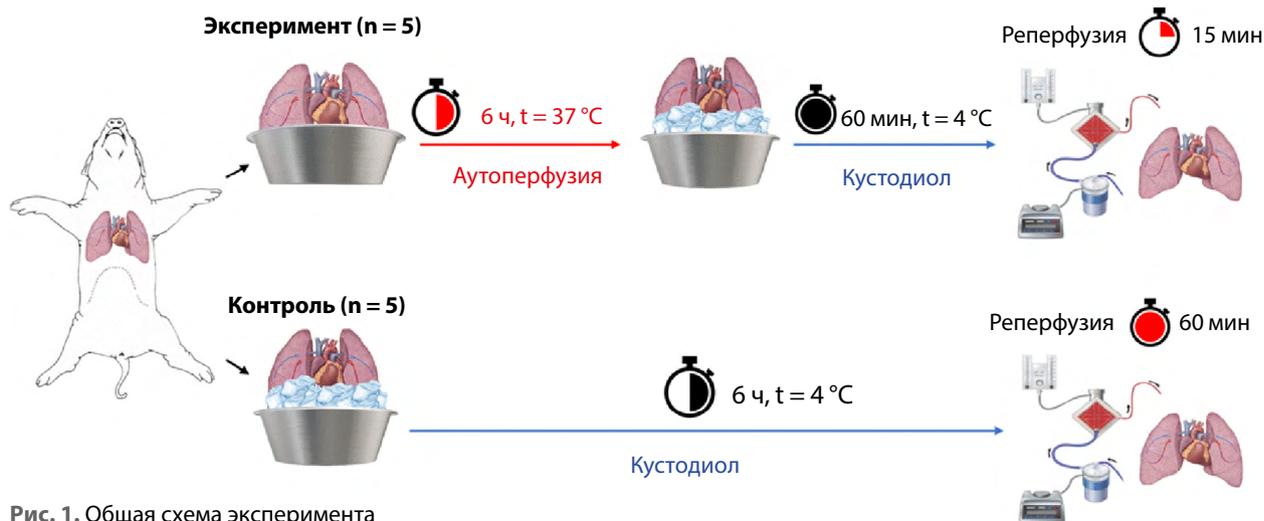


Рис. 1. Общая схема эксперимента

(n = 5) выступали сердца, консервированные в течение 6 ч согласно принятому в клинике протоколу фармакохолодовой консервации трансплантата кустодиолом. Дизайн исследования показан на рис. 1.

В день эксперимента всем животным натошак выполняли премедикацию (Золетил 100). Дозу подбирали индивидуально согласно весоростовым параметрам. После наступления сна подготавливали операционное поле и область катетеризации сосудов шеи. Затем животное транспортировали на операционный стол и закрепляли в положении на спине для последующей интубации трахеи, установки центрального артериального и венозного катетеров. Эксперимент выполняли в условиях эндотрахеального наркоза севофлураном и миорелаксации (рокурония бромид). Искусственную вентиляцию легких проводили с помощью наркозно-дыхательного аппарата Fabius Plus (Draeger, Любек, ФРГ) с положительным давлением на вдохе (20–30 см вод. ст.) и на выдохе (5–8 см вод. ст.) с дыхательным объемом 8 мл/кг и частотой 12–14 дыханий в минуту. Параметры жизнедеятельности фиксировали с помощью монитора IntelliVue MP70 (Philips, Амстердам, Нидерланды).

Во время экспериментов осуществляли мониторинг инвазивного артериального давления путем катетеризации правой общей сонной артерии, центрального венозного давления путем катетеризации правой наружной яремной вены, нарушений ритма сердца электрокардиографией, температуры тела, газового состава крови. Анализ крови проводили с помощью автоматического гематологического анализатора ХТ-4000i (Sysmex Europe, Нордерштедт, Германия) согласно рекомендациям производителя. Параметры центральной гемодинамики исследовали

путем катетеризации правых отделов сердца катетером Свана – Ганса, а также с помощью портативной многофункциональной ультразвуковой системы CX50 (Philips Ultrasound, Ботелл, США) с электрокардиографической синхронизацией.

Для оценки сердечной функции рассчитывали:

- сердечный выброс в трех точках: сразу после гемодинамической изоляции сердечно-легочного комплекса (точка 1), после реперфузии сердца (точка 2) и через 20–30 мин после окончания реперфузии (точка 3);
- глобальную ударную работу левого желудочка (англ. left ventricular stroke work, LVSW) по формуле:

$$LVSW = SV \times (ESP - EDP),$$

где: SV (англ. stroke volume) — ударный объем;

ESP (англ. end-systolic pressure) — конечное систолическое давление;

EDP (англ. end-diastolic pressure) — конечное диастолическое давление;

- силу выброса левого желудочка (англ. ventricular power output, VPO) по формуле:

$$VPO = LVSW \times HR,$$

где HR (англ. heart rate) — сердечный ритм;

- мощность сердечного выброса (англ. cardiac power output, CPO) по формуле:

$$CPO = CO \times MAP,$$

где: CO (англ. cardiac output) — сердечный выброс; MAP (англ. mean arterial pressure) — среднее артериальное давление;

- рекрутируемую преднагрузкой ударную работу сердца (англ. preload recruitable stroke work, PRSW) по формуле:

$$PRSW = LVSW / EDP.$$

Для оценки ишемического повреждения миокарда измеряли концентрацию тропонина I, креатинфосфокиназы-MB, лактатдегидрогеназы и лактата в образцах крови, взятых из коронарного синуса.

### Хирургическая техника эксперимента

Эксплантацию работающего сердечно-легочного комплекса (рСЛК) выполняли через срединную стернотомию. Изоляцию комплекса начинали с удаления перикарда и мобилизации верхней полой вены, затем выделяли брахиоцефальный ствол, левую подключичную артерию, нижнюю полую вену. Трахею осторожно отделяли от пищевода электрокоагулятором, добиваясь гемостаза. После введения гепарина (3 мг/кг массы тела) левую подключичную артерию перевязывали максимально дистально, через культю артерии устанавливали интродьюсер для измерения инвазивного артериального давления в корне аорты и проведения диагностических катетеров. Затем лигировали и пересекали брахиоцефальный ствол, в культю артерии устанавливали артериальную канюлю 18 Fr, которую соединяли с артериальным резервуаром, фиксированным на высоте 1 м над уровнем сердца. После пережатия нисходящей грудной аорты на уровне перешейки открывали артериальную магистраль и начинали забор артериальной крови в резервуар. После стабилизации уровня крови и артериального давления в бедренную вену вводили 1,0–1,5 л раствора Рингера. После этого перевязывали и пересекали полые вены, трахею пересекали и повторно интубировали трубкой с манжетой. Окончательно отделяли рСЛК от окружающих тканей, переносили в контейнер с теплым физиологическим раствором (38 °С), пережимали артериальную магистраль и продолжали наблюдение в течение 6 ч. На всем протяжении аутоперфузии производили непрерывную инфузию 5% раствора кальция хлорида (3–5 мл/ч) и 10% глюкозы (5–10 мл/ч) для поддержания уровня в крови в референтном интервале.

Через 6 ч нормотермического кондиционирования рСЛК выполняли кардиоплегию введением в корень аорты 2 л раствора кустодиол (Custodiol НТК, Dr Franz Köhler Chemie GmbH, Бенсхайм, Германия). Хранили рСЛК в кустодиоле при температуре 4 °С в течение 1 ч. По прошествии этого времени сердечно-легочный комплекс перфузировали в течение 15–20 мин в экспериментальной и 60 мин в контрольной группе с использованием аппарата искусственного кровообращения, заполненного собственной кровью животного. В случае необходимости проводили электрическую дефибрилляцию.

После согревания и восстановления сердечной деятельности рСЛК наполняли кровью, изолировали и проводили ультразвуковую оценку сердечной деятельности.

Образцы миокарда для гистологического исследования иссекали из верхушечной части левого желудочка сердца, фиксировали в 10% нейтральном формалине, после фиксации обезживали в спиртах возрастающей крепости и заливали в парафин с помощью диспенсера с нагревающей и охлаждающей платами. Из парафиновых блоков на микротоме Microm HM 550 (Thermo Scientific, Уолтем, США) приготавливали гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Перед окраской проводили депарафинацию срезов по 10–15 мин в двух порциях чистого ксилола с последующим удалением его в трех порциях спирта нисходящей крепости (абсолютный — 70°) до дистиллированной воды. Гистологические срезы окрашивали по стандартным методикам: гематоксилином и эозином, по методу ван Гизона с комбинированной докраской эластических волокон орсеином, а также проводили PAS-реакцию. Поляризационно-микроскопическое исследование миокарда выполняли на микроскопе Axio Scope.A1 (Zeiss, Оберкохен, Германия), снабженном анализатором и поляризатором, фотокамерами AxioCam HRm и AxioCam HRc (Zeiss, Оберкохен, Германия) и программным обеспечением ZEN blue (Zeiss, Оберкохен, Германия).

### Статистический анализ

Для составления представления о выборке применяли методы описательной статистики. Данные представлены как Me [Q1; Q3]. Достоверность различий между сравниваемыми группами (p) для непрерывных данных рассчитывали с использованием непараметрических критериев Манна – Уитни в независимых группах и Уилкоксона в зависимых. Уровень значимости между сравниваемыми группами считали достоверным при  $p < 0,05$ , что соответствует критериям, принятым в медико-биологических исследованиях.

### Результаты

Значения сердечного выброса приведены в табл. 1. Во всех экспериментах контрольной группы восстановление нормального сердечного ритма требовало электрической дефибрилляции и электрокардиостимуляции. При этом во всех случаях через час после окончания реперфузии и самостоятельного функционирования рСЛК сердца

**Табл. 1.** Изменение сердечного выброса (л/мин)

Группа	Исходно	Сразу после реперфузии	Через 30 мин после реперфузии
Контрольная (n = 5)	0,83 [0,74; 1,86]	0,45* [0,29; 0,56]	0,37* [0,23; 0,52]
Экспериментальная (n = 5)	0,84 [0,78; 0,94]	0,57 [0,25; 1,88]	0,63 <sup>#</sup> [0,37; 0,80]

*Примечание.* \* —  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; <sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля. Данные представлены как Ме [Q1; Q3].

**Табл. 2.** Основные параметры ударной работы сердца

Показатель	Контрольная группа (n = 5)		Экспериментальная группа (n = 5)	
	До консервации	После консервации	До консервации	После консервации
LVS <sub>W</sub> , мл · мм рт. ст.	26,09 [5,25; 48,25]	12,67* [1,9; 27,4]	33,89 [21,4; 47,9]	21,06 <sup>#</sup> [15,28; 27,25]
PRSW, мл	0,63 [0,06; 1,20]	0,25* [0,03; 0,57]	0,65 [0,42; 0,88]	0,57 <sup>#</sup> [0,34; 0,76]
VPO, мл · мм рт. ст. · об/мин	2 531,8 [343,2; 4 602,7]	425,7* [157,3; 679,1]	3 000,2 [1 846,2; 4 575,4]	1 452,9 <sup>#</sup> [659,0; 2 397,9]
CPO, Вт	63,13 [35,7; 89,4]	19,2* [2,3; 37,7]	46,2 [32,25; 60,47]	43,03 <sup>#</sup> [25,83; 62,45]

*Примечание.* LVS<sub>W</sub> — англ. left ventricular stroke work, глобальная ударная работа левого желудочка; PRSW — англ. preload recruitable stroke work, рекрутируемая преднагрузкой ударная работа сердца; VPO — англ. ventricular power output, сила выброса левого желудочка; CPO — англ. cardiac power output, мощность сердечного выброса; \* —  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; <sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля. Данные представлены как Ме [Q1; Q3].

не были способны поддерживать стабильные параметры гемодинамики, в отличие от группы аутоперфузии. Основные параметры восстановления насосной функции сердца приведены в табл. 2.

Уровень маркеров ишемии — лактатдегидрогеназы, креатинфосфокиназы-MB, тропонина I и лактата — в оттекающей из коронарного синуса крови в группе контроля после реперфузии в 2 раза превышал таковой в группе аутоперфузии (табл. 3).

При макроскопической оценке наблюдались выраженная гетерогенность и отек миокарда сердец контрольной группы с выраженной констрикцией полостей желудочков (рис. 2).

В биоптатах, взятых после реперфузии в контрольной группе, отмечали мозаичную картину: участки миокарда с сохранной структурой — кар-

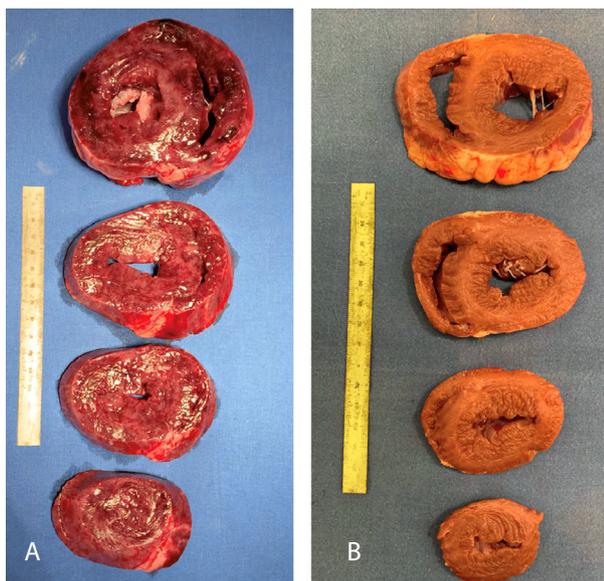
диомиоциты с однородной цитоплазмой, округлыми, гиперхромными ядрами — и участки с явлениями миоцитолитического отека, также в некоторых кардиомиоцитах наблюдали карioreкسيس и исчезновение ядер. Несмотря на наличие свободного просвета кровеносных сосудов, вокруг них фиксировали умеренный периваскулярный отек, распространяющийся на интерстиций, в котором встречались единичные лейкоциты (рис. 3).

В экспериментальной группе, в отличие от контрольной, степень выраженности внутриклеточного и межклеточного отека была значительно меньше, а явления лейкодиapedеза в интерстиции более выраженными. Отмечалась сохранность поперечной исчерченности кардиомиоцитов с зонами усиления анизотропии и субсегментарных контрактур (рис. 4).

**Табл. 3.** Концентрация биохимических маркеров в оттекающей из коронарного синуса крови

Показатель	Контрольная группа (n = 5)		Экспериментальная группа (n = 5)	
	До консервации	После консервации	До консервации	После консервации
Лактатдегидрогеназа, ед/л	603,7 [519; 681]	2 727,8* [2 167,4; 3 446,6]	571,7 [473,6; 635,8]	989,4 <sup>#</sup> [694,7; 1 035,2]
Тропонин I, нг/мл	175,84 [57,7; 309,9]	317 803,98* [44 509,9; 500 000,0]	144,8 [87,5; 187,7]	126 069** [42 437,5; 141 583,1]
Креатинфосфокиназа-MB, ед/л	501,6 [259,5; 790,2]	1 165,5* [806,0; 1 585,5]	227,5 [190,8; 272,4]	374,5 <sup>#</sup> [272,0; 412,5]
Лактат, ммоль/л	3,34 [2,25; 4,55]	11,86* [10,1; 13,5]	5,8 [5,1; 6,7]	7,1 <sup>#</sup> [6,3; 8,4]

*Примечание.* \* —  $p < 0,05$  в сравнении с исходными значениями; <sup>#</sup> —  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля. Данные представлены как Ме [Q1; Q3].



**Рис. 2.** Макропрепарат сердца после окончания эксперимента: контрольная группа (А), экспериментальная группа (В)

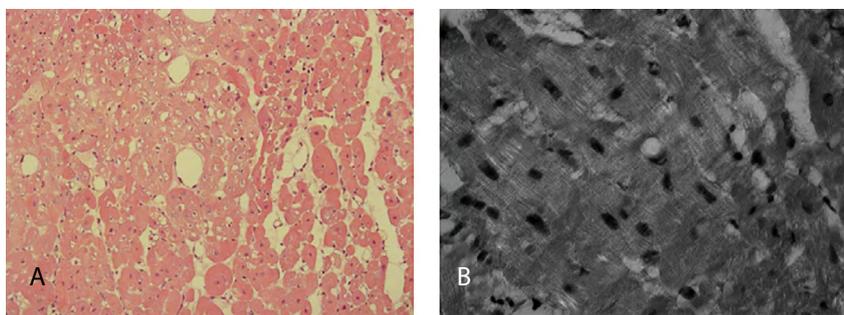
### Обсуждение

Впервые методику выделения работающего за счет аутоперфузии препарата сердце – легкие для проведения физиологических экспериментов разработал Е.Н. Starling в 1920 г. [21]. В.П. Демихов также использовал эту технику для выполнения трансплантации сердца в экспериментах [12], Ф. Robicsek и соавт. в 1959 г. доказали возможность автономного дожития сердечно-легочного комплекса *ex vivo*

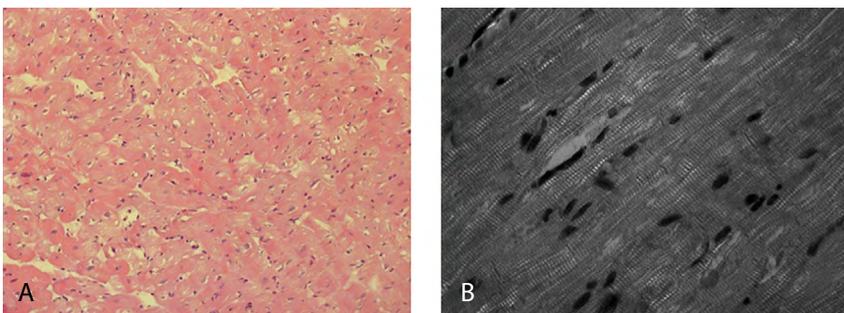
в течение 24 ч [22]. К 1976 г. исследования в этом направлении были приостановлены в связи с разработкой кардиоплегических и консервирующих растворов, позволяющих безопасно сохранять донорские органы в течение достаточного для транспортировки времени [23]. Однако в дальнейшем количество трансплантаций сердца значительно увеличилось, что требовало расширения донорского пула, главным образом за счет отдаленных донорских баз.

Используемый в России фармакохолодовый способ консервации донорского сердца раствором кустодиол позволяет безопасно сохранять функциональный статус трансплантата в течение 4 ч, что существенно ограничивает возможность дистанционного забора [24]. Несмотря на значительное сокращение метаболических потребностей тканей в условиях фармакохолодовой консервации, анаэробный метаболизм и другие клеточные процессы продолжают и при низких температурах (0–4 °С) [25]. Снижение запаса аденозинтрифосфата вызывает ацидоз, а нарушение работы натрий-калиевой мембранной помпы препятствует сохранению электрохимического равновесия и целостности мембран, что приводит к избыточному поступлению в клетку свободного кальция, ответственного за гибель кардиомиоцитов путем апоптоза или некроза [6; 9; 10; 26; 27]. Таким образом, увеличение периода ишемии значительно повышает риск жизнеугрожающих осложнений в посттрансплантационном периоде [28].

**Рис. 3.** Миокард левого желудочка сердца после реперфузии, контрольная группа: окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 400$  (А); поляризационная микроскопия, увеличение  $\times 630$  (В)



**Рис. 4.** Миокард левого желудочка сердца после реперфузии, экспериментальная группа: окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 400$  (А); поляризационная микроскопия, увеличение  $\times 630$  (В)



Для решения этих проблем в последние годы развивают методики нормотермической машинной перфузии *ex vivo* [29]. В отличие от фармакохолодовой консервации донорского органа, машинная перфузия направлена на поддержание его нормальной метаболической активности с возможностью значительного продления безопасного периода кондиционирования трансплантата вне тела [30]. Уже самые ранние исследования нормотермической перфузии сердца *ex vivo* показали значительные преимущества этого метода в сохранении коронарной эндотелиальной вазомоторной функции, снижении миокардиального отека и ацидоза [31]. Принципиально устройства перфузии *ex vivo* включают камеру-контейнер для размещения трансплантата, насос, резервуар для сбора перфузионного раствора, оксигенатор и лейкоцитарный фильтр в случае, когда в качестве перфузионного раствора используют цельную кровь [10; 32; 33]. Эта базовая конфигурация легла в основу коммерческой перфузионной платформы Organ Care System Heart [25]. Данное устройство продемонстрировало высокую эффективность и способность успешно сохранять трансплантат *ex vivo* в течение длительного времени с возможностью проводить широкий спектр манипуляций для оценки его состояния [34].

Однако, несмотря на множество положительных сторон активной аппаратной тепловой перфузии *ex vivo*, за последние 20 лет данная технология не оправдала предполагаемый потенциал значительного расширения пула донорских органов. Главная причина — высокая стоимость подобных систем, которая препятствует их широкому внедрению в клиническую практику [19; 35].

Несмотря на исследования, доказывающие возможность длительного поддержания нормальной функции и метаболизма миокарда в аутоперфузируемом сердечно-легочном комплексе, практически отсутствуют работы, в которых сравнивается эффективность аутоперфузии и фармакохолодовой консервации кустодиолом [4; 36–40]. Вместе с тем получение убедительной достоверной базы превосходства нормотермической перфузии как метода пролонгированного нормотермического кондиционирования сердца *ex vivo* значительно ускорит внедрение данной технологии в реальную клиническую деятельность.

Результаты проведенного исследования демонстрируют значительное преимущество нормотермической аутоперфузии в сохранении морфофункционального статуса трансплантата.

В группе аутоперфузии на протяжении 6 ч сердце самостоятельно обеспечивало коронарную перфузию, средний уровень сердечного выброса составил  $1\,052 \pm 134$  мл/мин. Восстановление сердечной деятельности в группе аутоперфузии требовало 1–2 разрядов дефибриллятора, тогда как в группе контроля во всех экспериментах на этапе реперфузии наблюдалась устойчивая фибрилляция желудочков сердца, требующая многократных (до 10) разрядов дефибриллятора.

Пролонгированная консервация сердца *ex vivo* в течение 6 ч кустодиолом приводила к значительному отеку миокарда на этапе реперфузии, что подтверждают данные гистологического исследования, а также результаты прямой тензиометрии в корне аорты. Так, в течение первых 30 мин во всех экспериментах группы контроля наблюдалось постепенное повышение давления в корне аорты до 200–280 мм рт. ст. при неизменной скорости перфузии (500 мл/мин), вызванное усугубляющимся отеком миокарда в результате реперфузионного повреждения и повышением сопротивления коронарного капиллярного русла. При исследовании сократительной способности миокарда в группе контроля наблюдалось статистически значимое снижение ударной работы левого желудочка по сравнению с группой аутоперфузии независимо от уровня преднагрузки, что подтверждается статистически значимым снижением рекрутируемой преднагрузкой ударной работы сердца в группе контроля.

Морфологическим проявлением снижения сократимости миокарда с повышением уровня тропонина в контрольной группе явилось гетерогенное повреждение миокарда с обусловленными ишемией и реперфузией дисметаболическими изменениями мозаичного характера в виде миоцитолитического и внутриклеточного отека. В экспериментальной группе, где после этапа реперфузии также отметили повышение уровня тропонина, но в меньшей степени относительно контрольной группы, лизисные изменения в кардиомиоцитах были незначительными, а степень внутриклеточного и межклеточного отека значительно меньше.

Динамика изменения маркеров ишемии миокарда отражает достаточную эффективность автономного поддержания аутоперфузии в изолированном сердечно-легочном комплексе, однако очевидна необходимость улучшения состава перфузата и использования адъювантных фармакологических и вентиляционных мер для предупреждения развития отека тканей и снижения газообменных

свойств аутологических легких при проведении длительной нормотермической аутоперфузии сердечного трансплантата на этапе транспортировки.

## Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют значительное преимущество метода нормотермической аутоперфузии в сохранении морфофункционального статуса трансплантата. Применение нормотермической аутоперфузии сердца *ex situ* позволяет значительно расширить географию донорских баз без увеличения времени холодовой ишемии и обеспечить возможность динамической оценки сердечной функции и метаболизма донорского сердца. При этом сохранение автономно генерируемого коронарного потока позволяет не нарушать вазомоторную ауторегуляцию коронарного русла и, следовательно, обеспечивать оптимальные условия доставки кислорода и макроэргов в трансплантате.

## Список литературы / References

1. Colvin M., Smith J.M., Hadley N., Skeans M.A., Uccellini K., Goff R., Foutz J., Israni A.K., Snyder J.J., Kasiske B.L. OPTN/SRTR 2018 Annual data report: Heart. *Am J Transplant.* 2020;20 Suppl s1:340-426. PMID: 31898418. <https://doi.org/10.1111/ajt.15676>
2. Kim W.R., Lake J.R., Smith J.M., Schladt D.P., Skeans M.A., Harper A.M., Wainright J.L., Snyder J.J., Israni A.K., Kasiske B.L. OPTN/SRTR 2016 Annual data report: Liver. *Am J Transplant.* 2018;18 Suppl 1:172-253. PMID: 29292603. <https://doi.org/10.1111/ajt.14559>
3. Hart A., Smith J.M., Skeans M.A., Gustafson S.K., Wilk A.R., Robinson A., Wainright J.L., Haynes C.R., Snyder J.J., Kasiske B.L., Israni A.K. OPTN/SRTR 2016 Annual data report: Kidney. *Am J Transplant.* 2018;18 Suppl 1(Suppl 1):18-113. PMID: 29292608; PMCID: PMC5772947. <https://doi.org/10.1111/ajt.14557>
4. Жульков М.О., Зыков И.С., Сирота Д.А., Агаева Х.А., Сабетов А.К., Повещенко О.В., Бозоров С.Ш., Фомичев А.В., Чернявский А.М. Способ длительного кондиционирования донорского сердца методом аутоперфузии. *Вестник экспериментальной и клинической хирургии.* 2022;15(3):214-220. <https://doi.org/10.18499/2070-478X-2022-15-3-214-220>
5. Zhulkov M.O., Zykov I.S., Sirota D.A., Agaeva H.A., Sabetov A.K., Poveschenko O.V., Bozorov S.Sh., Fomichev A.V., Chernyavsky A.M. Long-term conditioning of a donor heart by autoperfusion. *Journal of Experimental and Clinical Surgery.* 2022;15(3):214-220. (In Russ.) <https://doi.org/10.18499/2070-478X-2022-15-3-214-220>
6. Barnard C.N. The operation. A human cardiac transplant: an interim report of a successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Cape Town. *S Afr Med J.* 1967;41(48):1271-1274. PMID: 4170370.
7. Guibert E.E., Petrenko A.Y., Balaban C.L., Somov A.Y., Rodriguez J.V., Fuller B.J. Organ preservation: current concepts and new strategies for the next decade. *Transfus Med Hemother.* 2011;38(2):125-142. PMID: 21566713; PMCID: PMC3088735. <https://doi.org/10.1159/000327033>
8. Mehta V., Taylor M., Hasan J., Dimarakis I., Barnard J., Callan P., Shaw S., Venkateswaran R.V. Establishing a heart transplant programme using donation after circulatory-determined death donors: a United Kingdom based single-centre experience. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2019;29(3):422-429. PMID: 31098641. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivz121>
9. Фомичев А.В., Хван Д.С., Агаева Х.А., Жульков М.О., Доронин Д.В., Чернявский А.М. Опыт использования донорского сердца с продленной холодовой ишемией. *Российский кардиологический журнал.* 2020;25(8):4011. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4011>
10. Fomichev A.V., Khvan D.S., Agaeva H.A., Zhulkov M.O., Doronin D.V., Chernyavsky A.M. Experience of heart transplantation with an extended cold ischemic time of donor heart. *Russian Journal of Cardiology.* 2020;25(8):4011. (In Russ.) <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-4011>
11. Ravikumar R., Leuvenink H., Friend P.J. Normothermic liver preservation: a new paradigm? *Transpl Int.* 2015;28(6):690-699. PMID: 25847684. <https://doi.org/10.1111/tri.12576>
12. Messer S., Ardehali A., Tsui S. Normothermic donor heart perfusion: current clinical experience and the future. *Transpl Int.* 2015;28(6):634-642. PMID: 24853906. <https://doi.org/10.1111/tri.12361>
13. Chang D.D., Han J.J. The TransMedics Organ Care System for the liver receives FDA pre-market approval. *Artif Organs.* 2022;46(1):25-26. PMID: 34802155. <https://doi.org/10.1111/aor.14115>
14. Демихов В.П. Пересадка жизненно важных органов в эксперименте: опыты по пересадке сердца, легких, головы, почек и других органов. М.: Медгиз, 1960. 259 с.
15. Demikhov V.P. *Transplantation of vital organs in an experiment: Experiments on transplantation of the heart, lungs, head, kidneys and other organs.* Moscow: Medgiz Publ.; 1960. 259 p. (In Russ.)
16. Zych B., Popov A.F., Stavri G., Bashford A., Bahrami T., Amrani M., De Robertis F., Carby M., Marczin N., Simon A.R., Redmond K.C. Early outcomes of bilateral sequential single lung transplantation after *ex-vivo* lung evaluation and reconditioning. *J Heart Lung Transplant.* 2012;31(3):274-281. PMID: 22088786. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2011.10.008>
17. Iyer A., Gao L., Doyle A., Rao P., Cropper J.R., Soto C., Dinale A., Kumarasinghe G., Jabbour A., Hicks M., Jansz P.C., Feneley M.P., Harvey R.P., Graham R.M., Dhital K.K., MacDonald P.S. Normothermic *ex vivo* perfusion provides superior organ preservation and enables viability assessment of hearts from DCD donors. *Am J Transplant.* 2015;15(2):371-380. PMID: 25612491. <https://doi.org/10.1111/ajt.12994>
18. Vogel T., Brockmann J.G., Quaglia A., Morovat A., Jassem W., Heaton N.D., Coussios C.C., Friend P.J. The 24-hour normothermic machine perfusion of discarded human liver grafts. *Liver Transpl.* 2017;23(2):207-220. PMID: 27809409. <https://doi.org/10.1002/lt.24672>
19. Angelico R., Perera M.T.P.R., Ravikumar R., Holroyd D., Coussios C., Mergental H., Isaac J.R., Iqbal A., Cilliers H., Muiesan P., Friend P.J., Mirza D.F. Normothermic machine perfusion of deceased donor liver grafts is associated with improved postreperfusion hemodynamics. *Transplant Direct.* 2016;2(9):e97. PMID: 27795989; PMCID: PMC5068202. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000611>
20. Wallinder A., Ricksten S.-E., Hansson C., Riise G.C., Silverborn M., Liden H., Olausson M., Dellgren G. Transplantation of initially rejected donor lungs after *ex vivo* lung perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;144(5):1222-1228. PMID: 22995721. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.08.011>
21. Jamieson R.W., Zilvetti M., Roy D., Hughes D., Morovat A., Coussios C.C., Friend P.J. Hepatic steatosis and normothermic perfusion-preliminary experiments in a porcine model. *Transplantation.* 2011;92(3):289-295. PMID: 21681143. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318223d817>

19. Pettit S.J., Petrie M.C. Transplantation of hearts donated after circulatory-determined death. *Circ Heart Fail*. 2019;12(4):e005991. PMID: 30998399. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.005991>
20. Hardesty R.L., Griffith B.P. Autoperfusion of the heart and lungs for preservation during distant procurement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987;93(1):11-18. PMID: 3540455.
21. Starling E.H., Visscher M.B. The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol*. 1927;62(3):243-261. PMID: 16993846; PMCID: PMC1514842. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1927.sp002355>
22. Robicsek F., Pruitt J.R., Sanger P.W., Daugherty H.K., Moore M., Bagby E. The maintenance of function of the donor heart in the extracorporeal stage and during transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1968;6(4):330-342. PMID: 4913322. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(10\)66033-x](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(10)66033-x)
23. Morimoto T., Golding L.R., Stewart R.W., Harasaki H., Matsushita S., Shimomitsu T., Kasick J., Olsen E., Loop F.D., Nose Y. A simple method for extended heart-lung preservation by autoperfusion. *Trans Am Soc Artif Intern Organs*. 1984;30:320-324. PMID: 6442806.
24. Banner N.R., Thomas H.L., Curnow E., Hussey J.C., Rogers C.A., Bonser R.S.; Steering Group of the United Kingdom Cardiothoracic Transplant Audit. The importance of cold and warm cardiac ischemia for survival after heart transplantation. *Transplantation*. 2008;86(4):542-547. PMID: 18724223. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e31818149b9>
25. Van Raemdonck D., Rega F., Rex S., Neyrinck A. Machine perfusion of thoracic organs. *J Thorac Dis*. 2018;10(Suppl 8):S910-S923. PMID: 29744218; PMCID: PMC5934115. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.02.85>
26. King R.C., Binns O.A., Rodriguez F., Kanithanon R.C., Daniel T.M., Spotnitz W.D., Tribble C.G., Kron I.L. Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2000;69(6):1681-1685. PMID: 10892906. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(00\)01425-9](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(00)01425-9)
27. Monteagudo Vela M., García Sáez D., Simon A.R. Current approaches in retrieval and heart preservation. *Ann Cardiothorac Surg*. 2018;7(1):67-74. PMID: 29492384; PMCID: PMC5827116. <https://doi.org/10.21037/acs.2018.01.06>
28. Ploeg R.J., D'Alessandro A.M., Hoffmann R.M., Eckhoff D., Isaacs R., Knechtle S.J., Pirsch J.D., Stegall M.D., Kalayoglu M., Belzer F.O. Impact of donor factors and preservation on function and survival after liver transplantation. *Transplant Proc*. 1993;25(6):3031-3033. PMID: 8266441.
29. Pinnelas R., Kobashigawa J.A. Ex vivo normothermic perfusion in heart transplantation: a review of the TransMedics Organ Care System. *Future Cardiol*. 2022;18(1):5-15. PMID: 34503344. <https://doi.org/10.2217/fca-2021-0030>
30. Macdonald P.S., Chew H.C., Connellan M., Dhital K. Extracorporeal heart perfusion before heart transplantation: the heart in a box. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):336-342. PMID: 26967996. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000309>
31. Hassanein W.H., Zellos L., Tyrrell T.A., Healey N.A., Crittenden M.D., Birjiniuk V., Khuri S.F. Continuous perfusion of donor hearts in the beating state extends preservation time and improves recovery of function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;116(5):821-830. PMID: 9806389. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)00452-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)00452-8)
32. Makdisi G., Makdisi T., Jarmi T., Caldeira C.C. Ex vivo lung perfusion review of a revolutionary technology. *Ann Transl Med*. 2017;5(17):343. PMID: 28936437; PMCID: PMC5599284. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.07.17>
33. Ceresa C.D.L., Nasralla D., Jassem W. Normothermic machine preservation of the liver: state of the art. *Curr Transplant Rep*. 2018;5(1):104-110. PMID: 29564207; PMCID: PMC5843699. <https://doi.org/10.1007/s40472-018-0186-9>
34. Kaliyev R., Bekbosynov S., Nurmykhametova Z. Sixteen-hour ex vivo donor heart perfusion during long-distance transportation for heart transplantation. *Artif Organs*. 2019;43(3):319-320. PMID: 30585343; PMCID: PMC6590649. <https://doi.org/10.1111/aor.13359>
35. Tatum R., O'Malley T.J., Bodzin A.S., Tchanchalishvili V. Machine perfusion of donor organs for transplantation. *Artif Organs*. 2021;45(7):682-695. PMID: 33349946. <https://doi.org/10.1111/aor.13894>
36. Chien S., Diana J.N., Oeltgen P.R., Todd E.P., O'Connor W.N., Chitwood W.R. Jr. Eighteen to 37 hours' preservation of major organs using a new autoperfusion multiorgan preparation. *Ann Thorac Surg*. 1989;47(6):860-867. PMID: 2757441. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(89\)90021-0](https://doi.org/10.1016/0003-4975(89)90021-0)
37. Chien S.F., Diana J.N., Oeltgen P.R., Salley R. Functional studies of the heart during a 24-hour preservation using a new autoperfusion preparation. *J Heart Lung Transplant*. 1991;10(3):401-408. PMID: 1854768.
38. Chien S., Diana J.N., Todd E.P., O'Connor W.N., Marion T., Smith K. New autoperfusion preparation for long-term organ preservation. *Circulation*. 1988;78(5 Pt 2):III58-III65. PMID: 3180407.
39. Riveron F.A., Ross J.H., Schwartz K.A., Casey G., Sanders O., Eisiminger R., Magilligan D.J. Jr. Energy expenditure of autoperfusing heart-lung preparation. *Circulation*. 1988;78(5 Pt 2):III103-III109. PMID: 3180388.
40. Robicsek F., Masters T.N., Duncan G.D., Denyer M.H., Rise H.E., Etchison M. An autoperfused heart-lung-preparation: metabolism and function. *J Heart Transplant*. 1985;4(3):334-338. PMID: 3916505.

## Long-term normothermic autoperfusion of the cardiopulmonary complex ex vivo as a method of effective graft conditioning: an experimental study

**Maksim O. Zhulkov**<sup>1</sup>, **Aleksandra R. Tarkova**<sup>1</sup>, **Ilya S. Zykov**<sup>1</sup>, **Alexandr G. Makaev**<sup>1</sup>, **Andrey V. Protopopov**<sup>1</sup>, **Murtazali N. Murtazaliev**<sup>1</sup>, **Faridun Yu. Kosimov**<sup>2</sup>, **Natalya A. Karmadonova**<sup>1</sup>, **Yaroslav M. Smirnov**<sup>3</sup>, **Evgeniy E. Kliver**<sup>1</sup>, **Alexander M. Volkov**<sup>1</sup>, **Hava A. Agaeva**<sup>1</sup>, **Dmitriy A. Sirota**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Meshalkin National Medical Research Center, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Novosibirsk State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

**Corresponding author:** Alexandr G. Makaev, [makaev\\_a@meshalkin.ru](mailto:makaev_a@meshalkin.ru)

## Abstract

**Objective:** To compare the effectiveness of 6-hour normothermic autoperfusion of a heart graft *ex vivo* with pharmaco-cold preservation using Bretschneider's solution (Custodiol, Dr Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Germany).

**Methods:** Landrace pigs weighing  $50 \pm 5$  kg and aged 4–5 months ( $n = 10$ ) were selected as a model for a series of acute experiments. Cardiopulmonary conditioning using autoperfusion was conducted for 6 hours on the experimental group ( $n = 5$ ). On the other hand, the control group underwent a 6-hour pharmaco-cold preservation with Bretschneider solution to recover the heart's pumping function. Graft preservation effectiveness was evaluated by measuring hemodynamic parameters, heartbeat, and myocardial ischemia marker concentrations.

**Results:** After reperfusion and isolation of the working cardiopulmonary complex, cardiac output was 0.63 [0.37; 0.8] L/min and 0.37 [0.23; 0.37] L/min in the experimental and control groups, respectively ( $P < .05$ ). The levels of CPK-MB, LDH, troponin-I, and lactate in the coronary sinus blood was significantly higher in the control group.

**Conclusion:** The study demonstrated significant benefits of normothermic autoperfusion in maintaining the morphofunctional status of the donor heart compared to pharmaco-cold preservation using Bretschneider's solution for 6 hours of *ex vivo* graft conditioning.

**Keywords:** Bretschneider Cardioplegic Solution; Isolated Heart Preparation; Heart Transplantation; Perfusion; Reperfusion; Swine; Tissue Donors

Received 16 July 2023. Revised 8 September 2023. Accepted 11 September 2023.

**Funding:** The study was carried out within the framework of project No. 23-25-10013 (agreement No. 23-25-10013 dated April 20, 2023 with the Russian Science Foundation, agreement No. p-52 dated April 3, 2023 with the Ministry of Science and Innovation Policy of the Novosibirsk Region).

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Contribution of the authors

Conception and study design: M.O. Zhulkov, D.A. Sirota, I.S. Zykov

Data collection and analysis: M.O. Zhulkov, A.R. Tarkova, I.S. Zykov, A.G. Makaev, A.V. Protopopov, M.N. Murtazaliyev, F.Yu. Kosimov, N.A. Karmadonova, Ya.M. Smirnov, E.E. Kliver, A.M. Volkov, H.A. Agaeva, D.A. Sirota

Statistical analysis: M.O. Zhulkov. Drafting the article: M.O. Zhulkov

Critical revision of the article: M.O. Zhulkov, D.A. Sirota, I.S. Zykov

Final approval of the version to be published: M.O. Zhulkov, A.R. Tarkova, I.S. Zykov, A.G. Makaev, A.V. Protopopov, M.N. Murtazaliyev, F.Yu. Kosimov, N.A. Karmadonova, Ya.M. Smirnov, E.E. Kliver, A.M. Volkov, H.A. Agaeva, D.A. Sirota

## ORCID

M.O. Zhulkov, <https://orcid.org/0000-0002-8220-3500>

A.R. Tarkova, <https://orcid.org/0000-0002-4291-6047>

I.S. Zykov, <https://orcid.org/0000-0001-6253-9026>

A.G. Makaev, <https://orcid.org/0000-0002-0678-1026>

A.V. Protopopov, <https://orcid.org/0000-0002-2617-2447>

M.N. Murtazaliyev, <https://orcid.org/0009-0004-3896-6158>

F.Yu. Kosimov, <https://orcid.org/0009-0009-8392-1270>

N.A. Karmadonova, <https://orcid.org/0000-0002-1082-0876>

Ya.M. Smirnov, <https://orcid.org/0009-0000-2435-9868>

E.E. Kliver, <https://orcid.org/0000-0002-3915-3616>

A.M. Volkov, <https://orcid.org/0000-0001-9697-7091>

H.A. Agaeva, <https://orcid.org/0000-0002-1648-1529>

D.A. Sirota, <https://orcid.org/0000-0002-9940-3541>

**Copyright:** © 2023 Zhulkov et al.

**How to cite:** Zhulkov M.O., Tarkova A.R., Zykov I.S., Makaev A.G., Protopopov A.V., Murtazaliyev M.N., Kosimov F.Yu., Karmadonova N.A., Smirnov Ya.M., Kliver E.E., Volkov A.M., Agaeva H.A., Sirota D.A. Long-term normothermic autoperfusion of the cardiopulmonary complex *ex vivo* as a method of effective graft conditioning: an experimental study. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya = Circulation Pathology and Cardiac Surgery*. 2023;27(4):33-42. (In Russ.) <https://dx.doi.org/10.21688/1681-3472-2023-4-33-42>

