

Динамика количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов при длительной консервации

Р.Е. Калинин¹, И.А. Сучков¹, В.В. Карпов^{1,2} ✉, А.П. Швальб³, Д.В. Гузаиров¹,
Т.М. Черданцева¹

¹ Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Рязань, Российская Федерация;

² Областная клиническая больница, Рязань, Российская Федерация;

³ Областной клинический противотуберкулезный диспансер, Рязань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. Актуальной проблемой применения свежезаготовленных гомографтов является определение максимальной длительности консервации для безопасного использования в реконструктивной сосудистой хирургии. Решение требует проведения гистологических исследований.

Цель. Определить оптимальные сроки применения гомографтов на основании динамики количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов, консервированных в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина и флуконазола при температуре +4°C.

Материалы и методы. Выполнено исследование артериальных и венозных гомографтов от посмертного донора при соблюдении правил забора органов и тканей. Гомографты консервированы в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл) при температуре +4°C. С интервалом от 7 до 84 суток выполнялась вырезка участков артериального и венозного графтов, которые фиксировались в формалине. Затем готовились стеклопрепараты. Всего изучено 120 артериальных и 120 венозных образцов. Оценивалось количество ядер миоцитов в 0,01 мм² мышечных порций стенок.

Результаты. На 42-е сутки зарегистрировано уменьшение количества ядер миоцитов артериальных гомографтов на 56% относительно значений 7 суток ($p=0,003$), уменьшение количества ядер миоцитов венозных гомографтов на 55% ($p=0,024$); уменьшение ядер регистрировалось также во всех последующих контрольных точках.

Заключение. Оптимальным сроком применения артериальных гомографтов можно считать срок консервации в растворе RPMI 1640 до 211 суток. Венозные гомографты возможно использовать в срок до 421 суток, несмотря на снижение количества ядер миоцитов после 351 суток, так как в срок до конца 421 суток нет отёка стенки венозных гомографтов.

Ключевые слова: гомографт; патоморфология трупных гомографтов; консервация гомографта; RPMI 1640; ядра миоцитов.

Как цитировать:

Калинин Р.Е., Сучков И.А., Карпов В.В., Швальб А.П., Гузаиров Д.В., Черданцева Т.М. Динамика количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов при длительной консервации // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2025. Т. 33, № 3. С. 345–360. DOI: 10.17816/PAVLOVJ678783 EDN: BIYONU



Dynamics of the Number of Myocyte Nuclei in Muscle Portions of Arterial and Venous Homograft Walls During Long-Term Preservation

Roman E. Kalinin¹, Igor A. Suchkov¹, Vyacheslav V. Karpov^{1,2} ✉, Aleksandr P. Shvalb³, Dmitriy V. Guzairov¹, Tatyana M. Cherdantseva¹

¹ Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation;

² Regional Clinical Hospital, Ryazan, Russian Federation;

³ Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Ryazan, Russian Federation

ABSTRACT

INTRODUCTION: An important issue of use of freshly prepared homograft's in the reconstructive vascular surgery is the maximal length of their preservation for safe application. Histological examinations are required.

AIM: To determine the optimal timing of the use of homograft's based on the dynamics of the number of myocyte nuclei of muscle portions of arterial and venous homograft walls preserved in RPMI 1640 solution with the addition of gentamicin and fluconazole at a temperature of +4°C.

MATERIALS AND METHODS: The study of arterial and venous homograft's from a posthumous donor was performed in compliance with the rules for collecting organs and tissues. The homograft's were preserved in RPMI 1640 solution with the addition of gentamicin (400 µg/ml) and fluconazole (20 µg/ml) at a temperature of +4°C. At intervals of 7 days up to 84 days, sections of the arterial and venous grafts were cut out and fixed in formalin. Then glass slides were prepared. A total of 120 arterial and 120 venous samples were studied. The number of myocyte nuclei in 0.01 mm² muscle portions of the walls was estimated.

RESULTS: On day 42, a decrease in the number of myocyte nuclei in arterial homograft's by 56% was recorded relative to the values of day 7 ($p=0.003$), a decrease in the number of myocyte nuclei in venous homograft's by 55% ($p=0.024$); a decrease in nuclei was also recorded at all subsequent control points.

CONCLUSION: The optimal period for the use of arterial homograft's can be considered the period of preservation in RPMI 1640 solution for up to 21 days. Venous homograft's can be used for up to 42 days, despite the decrease in the number of myocyte nuclei after 35 days, since there is no edema of the venous homograft wall until the end of the 42 day.

Keywords: homograft; pathomorphology of cadaveric homograft's; homograft preservation; RPMI 1640; myocyte nuclei.

To cite this article:

Kalinin RE, Suchkov IA, Karpov VV, Shvalb AP, Guzairov DV, Cherdantseva TM. Dynamics of the Number of Myocyte Nuclei in Muscle Portions of Arterial and Venous Homograft Walls during Long-Term Preservation. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2025;33(3):345–360. DOI: 10.17816/PAVLOVJ678783 EDN: BIYONU

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация органов и/или тканей человека является средством спасения жизни и восстановления здоровья граждан и должна осуществляться на основе соблюдения законодательства Российской Федерации и прав человека в соответствии с гуманными принципами, провозглашенными международным сообществом, при этом интересы человека должны превалировать над интересами общества или науки¹. Согласно перечню объектов трансплантации (Приложение к приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии наук от 4 июня 2015 г. № 306н/3) сосуды (участки сосудистого русла) фигурируют под пунктом 21, и могут применяться в лицензированных медицинских учреждениях по профилю *трансплантация*².

Все чаще возможности трансплантации органов и тканей находят применение при различных заболеваниях. Так, артериальные и венозные гомографты занимают особое место в сосудистой хирургии. При ряде нозологических форм болезней системы кровообращения сосудистым трупным графтам нет реальной альтернативы.

Наличие парапротезной инфекции ограничивает возможности реконструктивной сосудистой хирургии с использованием синтетических протезов. В Соединенных Штатах Америки проведено многоцентровое исследование с применением электронных баз данных, включено 14 лечебно-профилактических учреждений, имеющих наибольший объем выборки пациентов с парапротезной инфекцией аорты. Применялись гомографты для реконструктивно-восстановительных операций аорты при ее инфекции или при высоком риске инфицирования синтетического графта. По данным американских коллег, гомографты необходимо применять первично при парапротезной инфекции аорты [1]. Парапротезная инфекция возникает в 1–6% всех оперативных вмешательств с применением синтетических кондуитов [2, 3]. На сегодняшний день нет четкого решения этой проблемы.

В Российской Федерации отсутствуют клинические рекомендации по ведению пациентов с сосудистой парапротезной инфекцией. Европейским обществом сосудистых хирургов (англ.: *European Society for Vascular Surgery, ESVS*) разработаны «Клинические практические рекомендации по лечению инфекции сосудистых графтов и эндографтов». Согласно этому документу, при повторной реконструкции в качестве возможных решений следует рассматривать *криоконсервированные*

аллотрансплантаты (класс и уровень убедительности — IIa C) [4].

Применение гомографтов также возможно при формировании постоянного сосудистого доступа для программного гемодиализа. Использование венозного гомографта при формировании постоянного сосудистого доступа показывает, что применение свежезаготовленных трупных гомографтов от мультивисцерального посмертного донора является эффективным методом при инфицировании постоянного сосудистого доступа для программного гемодиализа [5]. При отсутствии аутологичного материала применение синтетических протезов при дистальном шунтировании артерий нижних конечностей также возможно, но результаты их использования дискутабельны. Сегодня также возможно эффективно использовать гомографты больным с аневризмами подколенных артерий [6].

В России применяются свежезаготовленные гомографты влажного хранения [3, 5–9]. Одной из актуальных проблем применения этих графтов является определение максимальной длительности консервации для безопасного использования в клинической практике. Важно четкое понимание сроков хранения свежезаготовленных гомографтов и их «жизнеспособности». Для ответа на эти вопросы необходимо проведение гистологических исследований.

Аутолиз — самопереваривание тканей, клеток или их частей под действием их собственных ферментов [10]. К морфологическим признакам некроза относятся характерные изменения клетки и межклеточного вещества — *кариопикноз* (конденсация хроматина) *кариорексис* (распад ядра), *кариолизис* (растворение ядра), набухание коллагеновых и эластических волокон, их распад и лизис [10]. Пикноз, рексис и лизис ядра — последовательные стадии процесса, отражающие динамику активации гидролаз — рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы. Изменения могут охватывать часть клетки (фокальный коагуляционный некроз), которая отторгается, или всю клетку (коагуляция цитоплазмы). Коагуляция завершается *плазморексисом* — распадом цитоплазмы на глыбки. Заключительный этап — разрушение мембранных структур клетки, что ведет к ее гидратации, развивается гидролитическое расплавление цитоплазмы — *плазмолиз*. Расплавление в одних случаях охватывает всю клетку (цитолиз), в других — лишь её часть (фокальный колликовационный некроз) [11]. Поскольку гомографт консервируется в растворе

¹ Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application [Интернет]. Режим доступа: https://freepub.edqm.eu/publications/AUTOPUB_17/detail. Дата обращения: 20.04.2025.

² Закон Российской Федерации от 22 декабря 1992 г. № 4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека (с изменениями и дополнениями)». Режим доступа: <http://base.garant.ru/136366/>. Дата обращения: 20.04.2025.

RPMI 1640, вероятно, некробиотические процессы будут протекать по типу *колликвационного некроза*.

По мнению авторов, наиболее «чувствительными» маркерами аутолиза ткани при морфогистологическом методе исследования стенки графта являются динамика её толщины в различные сроки консервации и динамика количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов. Динамика толщины различных порций стенок трупных гомографтов при консервации была уже изучена и опубликована [12].

Цель — определить оптимальные сроки применения артериальных гомографтов на основании динамики количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов, консервированных в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл) при температуре +4°C, в сроки до 84 суток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С октября по ноябрь 2024 года выполнено исследование артериальных и венозных гомографтов от смертного донора при соблюдении правил забора органов и тканей. Гомографты консервированы в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл) при температуре +4°C.

Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Протокол № 4 от 09.11.2021).

С интервалом от 7 до 84 суток выполняли вырезку участков артериального и венозного графтов, фиксиро-

ванных в формалине. Затем готовили стеклопрепараты. Производили вырезку трупных артерий и вен, которые далее укладывали в пластиковые кассеты и помещали в автоматический гистологический процессор Tissue-Tek VIP 6 (Sakura, Япония) для фиксации и проводки в течение 12 часов. Выполняли заливку в заливочные формы с пластиковыми кольцами чистым парафином в диспенсере Tissue-Tek TEK 5 (Sakura, Япония), после охлаждения изготавливали срезы толщиной до 5 микрон на микротоме ротационном полуавтоматическом Accu-Cut SRM (Sakura, Япония). Срезы помещали на предметное стекло толщиной 3 мм, затем окрашивали готовыми красителями в мультитейнере автоматическом для микропрепаратов Tissue-Tek Prisma (Sakura, Япония). Окрашивание проводили гематоксилин-эозином.

Гистологическое исследование проводили на 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 84-е сутки после забора гомографтов, по десять артериальных и венозных препаратов соответственно. Получили 12 групп сравнения артериальных и венозных гомографтов. Изучили 120 артериальных и 120 венозных образцов. Оценили количество ядер миоцитов средней оболочки гомографтов с использованием автоматического подсчета в программе Image-PRO Plus 6.0 (рис. 1) и пересчетом полученных значений на 0,01 мм² (10 тыс. мкм²) площади средней оболочки стенки сосудистого гомографта. Подсчет производили в одном поле зрения на среднем увеличении (×100) с использованием цифровой обработки, для выделения ядер мышечных клеток. Использовали программное обеспечение NDP.view2 (U12388-01; Hamamatsu Photonics KK).

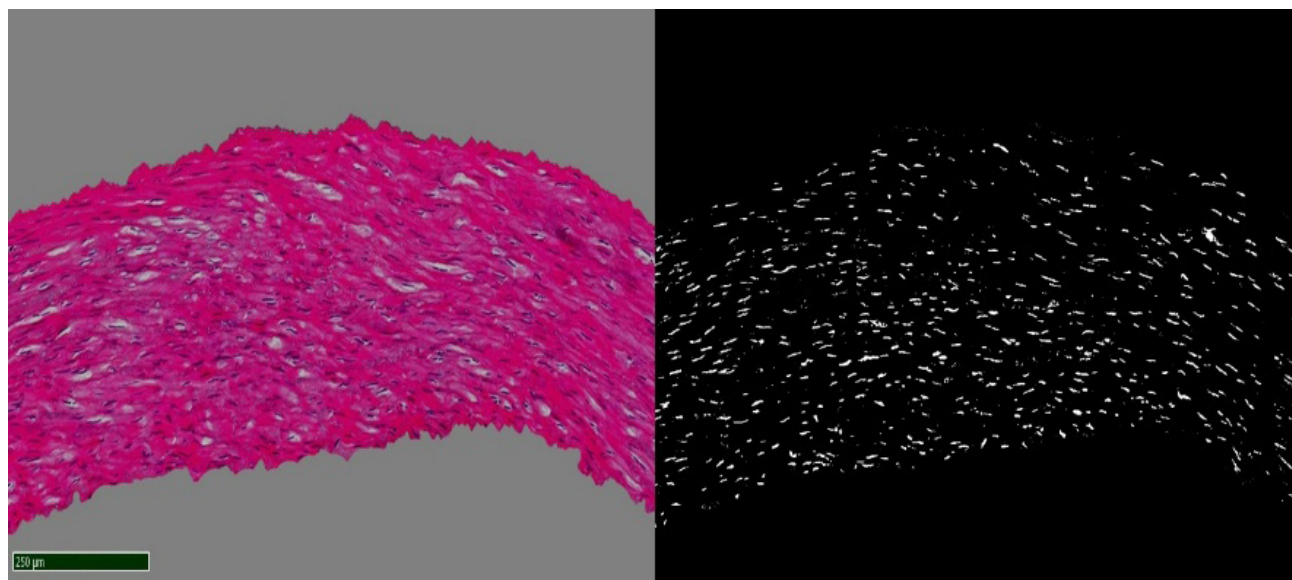


Рис. 1. Этапы цифровой обработки стенки гомографта (ув. ×100).

Fig. 1. The stages of digital processing of the homograph wall (magnified ×100).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 10.0 (Stat Soft Inc., США). В связи с нормальным характером распределения данных (по критерию Шапиро–Уилка) для оценки статистической значимости динамических различий количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов внутри групп применяли дисперсионный анализ повторных измерений (Repeated Measures ANOVA), попарные апостериорные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейсла. Количественные показатели представлены средним значением и стандартным отклонением. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез составил 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Средние значения и стандартные отклонения количеств ядер миоцитов в 0,01 мм² мышечной порции стенки артериального гомографта представлены в таблице 1, динамика количества ядер миоцитов

артериального графта — на рисунке 2. Согласно полученным результатам, имеет место *уменьшение* количества ядер миоцитов артериальных гомографтов относительно значений 7 суток на 56% в конце 42 суток ($p=0,003$), на 59% — в конце 49 суток ($p<0,0001$), на 62% — в конце 56 суток ($p<0,0001$), на 59% — в конце 63 суток ($p<0,0001$), на 62% в конце 70 суток ($p<0,0001$), на 60% — в конце 77 суток ($p<0,0001$), на 62% — в конце 84 суток ($p<0,0001$).

Средние значения и стандартные отклонения количеств ядер миоцитов в 0,01 мм² мышечной порции стенки венозного гомографта представлены в таблице 2, динамика количества ядер миоцитов — на рисунке 3. Зарегистрировано *уменьшение* количества ядер миоцитов венозных гомографтов относительно значений 7 суток на 55% в конце 42 суток ($p=0,024$), на 50% — в конце 49 суток ($p<0,0001$), на 53% — в конце 56 суток ($p<0,0001$), на 50% — в конце 63 суток ($p<0,0001$), на 53% — в конце 70 суток ($p<0,0001$), на 55% — в конце 77 суток ($p<0,0001$), на 58% — в конце 84 суток ($p<0,0001$).

Таблица 1. Количество ядер миоцитов мышечной порции стенки артериального гомографта в контрольных точках наблюдения
Table 1. The number of myocyte nuclei of the muscular portion of the arterial homograft wall at the control points of observation

Группа биообразцов	Срок наблюдения, сутки	Количество ядер миоцитов, M±SD, в 0,01 мм ²	p
1	7	12,300±0,949	>0,05
2	14	11,400±0,966	>0,05
3	21	9,900±0,876	>0,05
4	28	9,400±0,516	>0,05
5	35	8,400±0,516	>0,05
6	42	5,400±0,843	0,003
7	49	5,000±0,667	<0,0001
8	56	4,700±0,823	<0,0001
9	63	5,000±0,665	<0,0001
10	70	4,700±0,675	<0,0001
11	77	4,900±0,738	<0,0001
12	84	4,700±0,675	<0,0001



Рис. 2. Динамика количества ядер миоцитов в 0,01 мм² артериального графта (M±SD).
Fig. 2. Dynamics of the number of myocyte nuclei in 0.01 mm² arterial graft (M±SD). One-way analysis of variance [mean + standard deviation].

Выявлены порции мышечной стенки с участками изменения ядер в виде фрагментации и их лизиса (рис. 4). Для демонстрации полученных результатов представляем слайды гистологических препаратов в ограниченном, но репрезентативном ассортименте (рис. 5–16).

Таблица 2. Количество ядер миоцитов мышечной порции стенки венозного гомографта в контрольных точках наблюдения

Table 2. The number of myocyte nuclei of the muscular portion of the venous homograft wall at the control points of observation

Группа биообразцов	Срок наблюдения, сутки	Количество ядер миоцитов, М±SD, в 0,01 мм²	p
1	7	10,400±0,966	>0,05
2	14	9,900±1,449	>0,05
3	21	8,600±0,516	>0,05
4	28	8,500±0,527	>0,05
5	35	7,500±0,524	>0,05
6	42	5,700±0,675	0,024
7	49	5,200±0,789	<0,001
8	56	4,900±0,738	<0,001
9	63	5,200±0,632	<0,001
10	70	4,900±0,738	<0,001
11	77	4,700±0,675	<0,001
12	84	4,400±0,516	<0,001

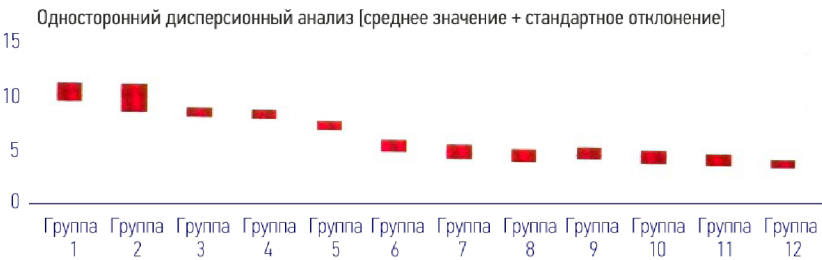


Рис. 3. Динамика количества ядер миоцитов в 0,01 мм² венозного графта (M±SD).

Fig. 3. Dynamics of the number of myocyte nuclei in 0.01 mm² of venous graft (M±SD).

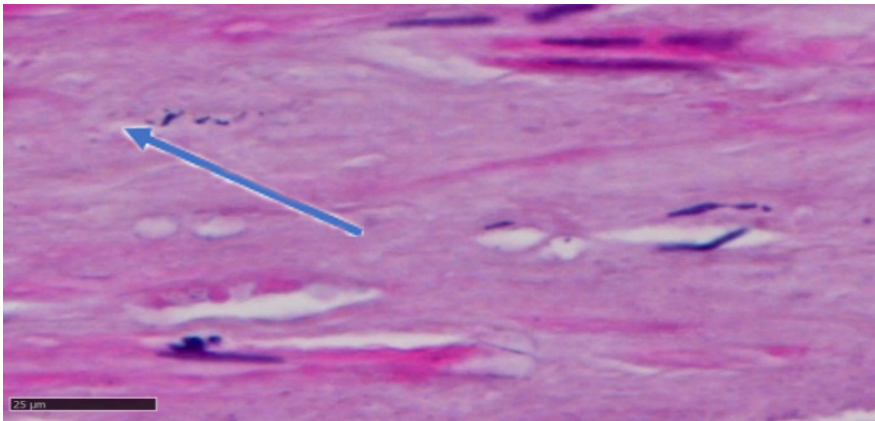


Рис. 4. Фрагментация и лизис ядер гладких миоцитов в гомографте. Указано стрелкой (ув. ×400).

Fig. 4. Fragmentation and lysis of smooth myocyte nuclei in a homograft. Indicated by an arrow (magnified × 400).

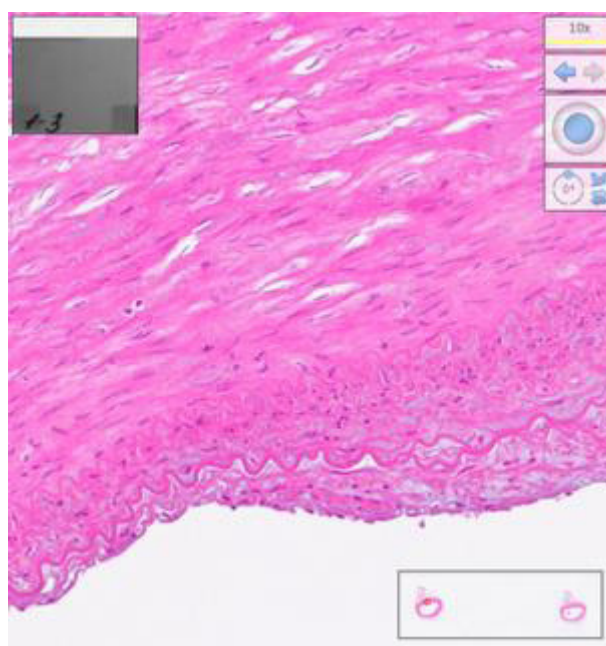


Рис. 5. Артериальный гомографт, 7 суток консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: эндотелиоциты частично сохранены, ядра их гиперхромные, набухшие, умеренный отек интимы, хорошо дифференцирована внутренняя эластическая мембрана, участки расщепления внутренней эластической мембраны, контуры лейомиоцитов четко определяются, ядра не набухшие, вакуолизация отдельных миоцитов (пустоты вокруг ядер в среднем слое).

Fig. 5. Arterial homograph, day 7 of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: endotheliocytes are partially preserved, their nuclei are hyperchromic, swollen, moderate edema of the intima, the inner elastic membrane is well differentiated, the cleavage sites of the inner elastic membrane, the contours of leiomyocytes are clearly defined, the nuclei are not swollen, vacuolization of individual myocytes (voids around the nuclei in the middle layer).

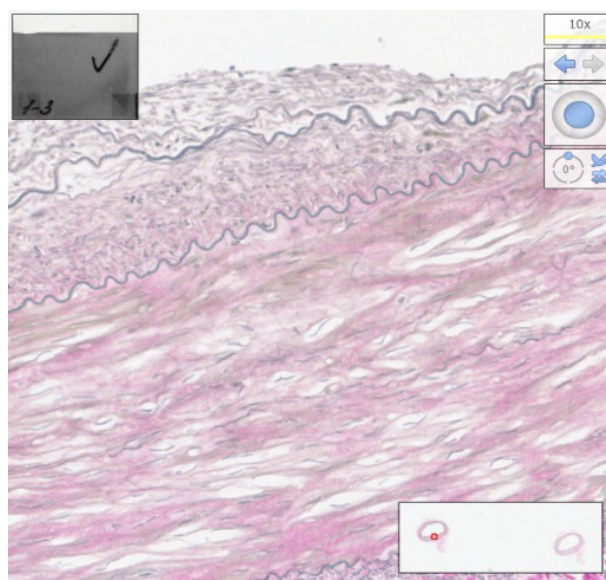


Рис. 6. Артериальный гомографт, 7 суток консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: темно-синяя, хорошо выраженная внутренняя эластическая мембрана в виде двух монолиний, в среднем слое — волнистые тонкие эластические волокна, коллаген в виде розоватого фона без визуализации волокон.

Fig. 6. Arterial homograph, day 7 of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: dark blue, well-defined inner elastic membrane in the form of two monolines, wavy thin elastic fibers in the middle layer, collagen in the form of a pinkish background without fiber visualization.

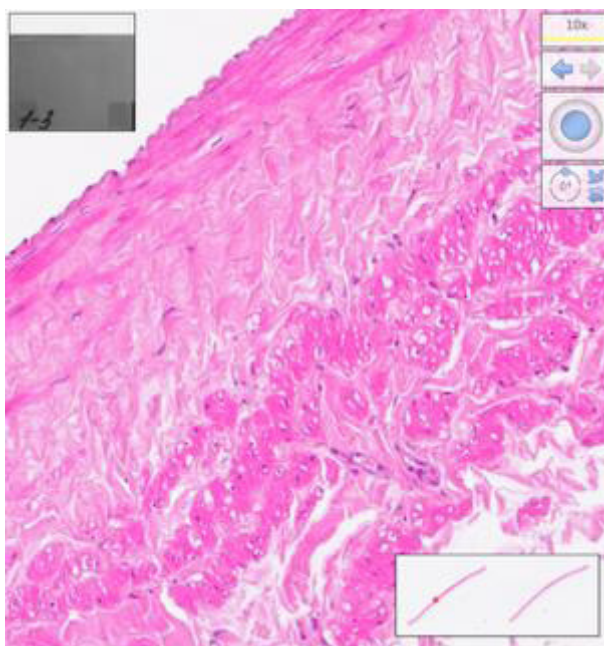


Рис. 7. Венозный гомографт, 7 суток консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: хорошо сохранен эндотелий, интима широкая, с толстыми коллагеновыми волокнами, миоциты среднего слоя четко дифференцированы; обращает на себя внимание хорошо сохранившийся эндотелий *vasa vasorum*.

Fig. 7. Venous homograft, 7 days of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: the endothelium is well preserved, the intima is wide, with thick collagen fibers, the myocytes of the middle layer are clearly differentiated; the well-preserved endothelium *vasa vasorum* attracts attention.

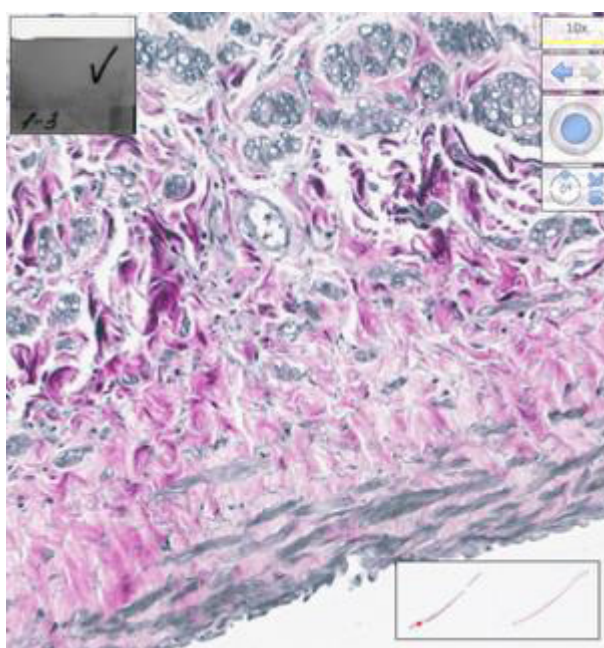


Рис. 8. Венозный гомографт, 7 суток консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: хорошо выражен коллаген в виде толстых волокон фиолетовых оттенков.

Fig. 8. Venous homograft, 7 days of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: collagen is well expressed in the form of thick fibers of purple shades.

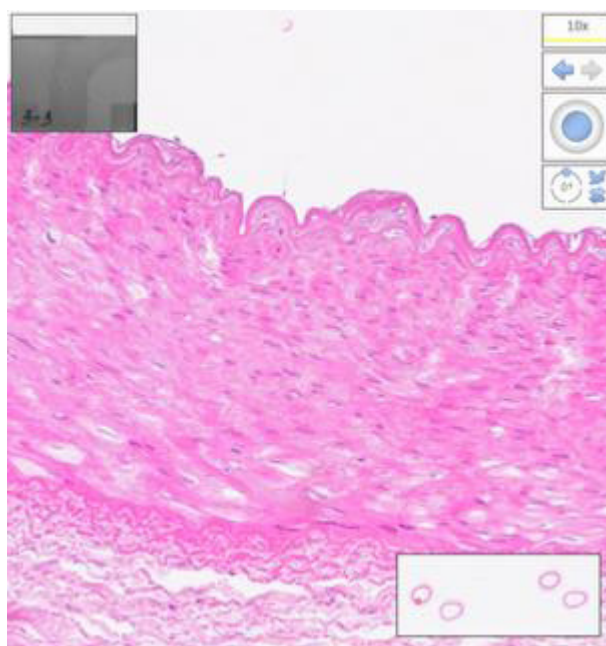


Рис. 9. Артериальный гомографт, 21 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: местами сохранены эндотелиоциты, четко дифференцируется базальная мембрана, интима тонкая, внутренняя эластическая мембрана в виде красной широкой расщепленной линии, контуры гладких миоцитов местами сохранены, ядра тонкие, расположены с неравномерной плотностью, образуя участки опустошения.

Fig. 9. Arterial homograph, 21 days of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: endotheliocytes are preserved in places, the basement membrane is clearly differentiated, the intima is thin, the inner elastic membrane is in the form of a wide red split line, the contours of smooth myocytes are preserved in places, the nuclei are thin, arranged with uneven density, forming areas of devastation.

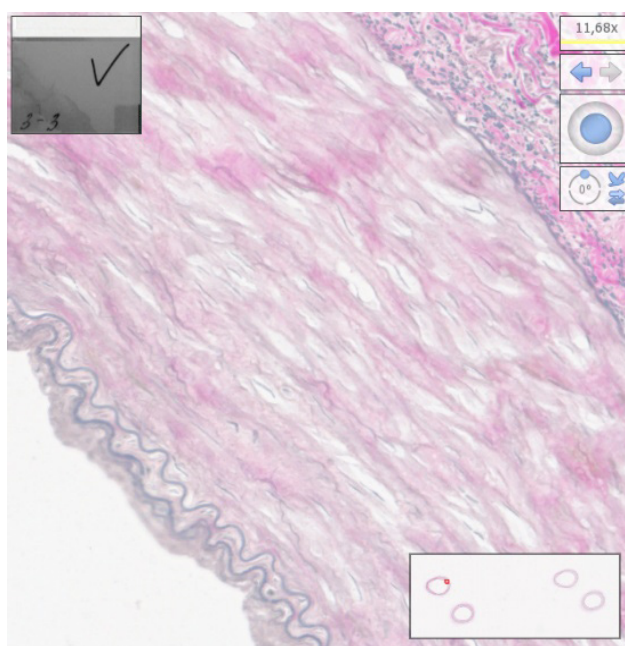


Рис. 10. Артериальный гомографт, 21 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: четко определяется расщепленная внутренняя эластическая мембрана, в средней оболочке тонкие синие (эластические) нити, между ними слабо заметный эозинофильный коллаген.

Fig. 10. Arterial homograph, 21 days of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: the split inner elastic membrane is clearly defined, thin blue (elastic) filaments in the middle shell, with faintly noticeable eosinophilic collagen between them.

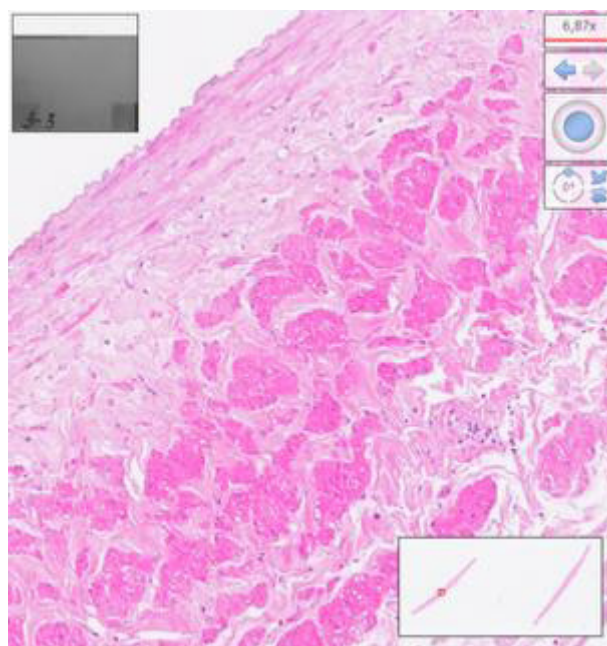


Рис. 11. Венозный гомографт, 21 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: эндотелиоциты местами сохранены, ядра их гиперхромные, базальная мембрана хорошо дифференцируется, интима широкая, плотная, контуры миоцитов преимущественно сохранены, сохранен эндотелий *vasa vasorum*.

Fig. 11. Venous homograph, 21 days of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: endotheliocytes are preserved in places, their nuclei are hyperchromic, the basement membrane is well differentiated, the intima is wide and dense, the contours of the myocytes are predominantly preserved, the endothelium *vasa vasorum* is preserved.

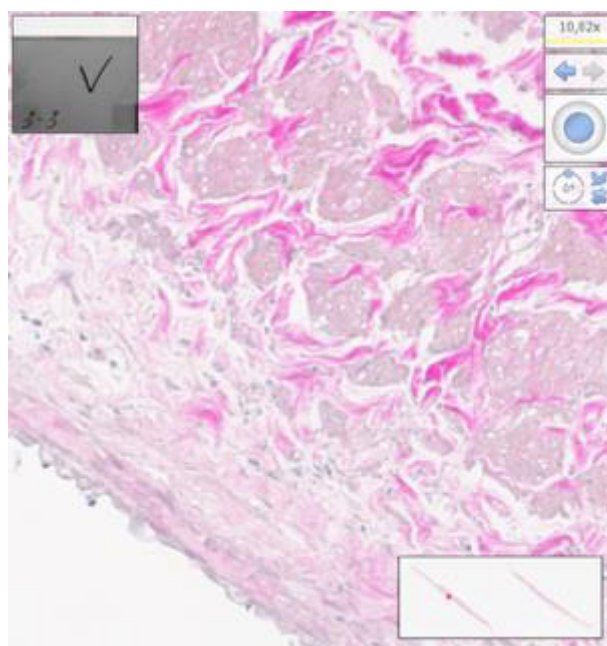


Рис. 12. Венозный гомографт, 21 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: collagen бледно окрашивается в интима и хорошо воспринимает краситель в средней оболочке.

Fig. 12. Venous homograph, 21 days of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: collagen is pale colored in intimacy and well perceives the dye in the middle shell.

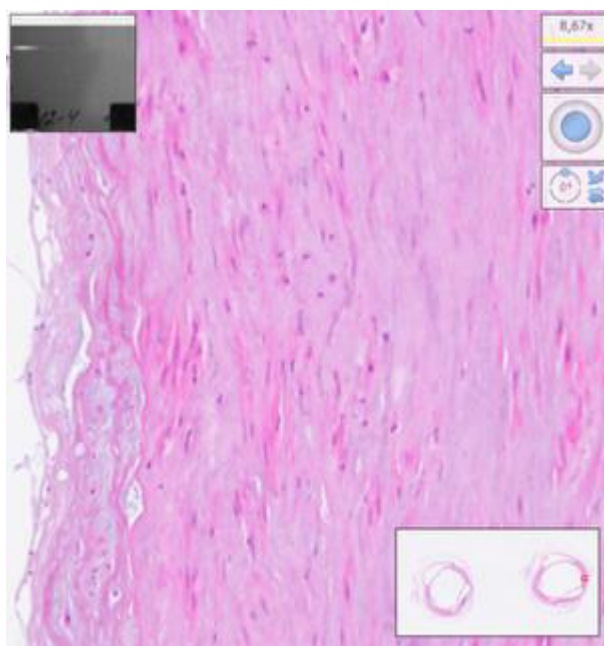


Рис. 13. Артериальный гомографт, 84 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: единичные эндотелиоциты с плоским бледным ядром, базальная мембрана фрагментирована, с участками отслоения, интима уплотнена, внутренняя эластическая мембрана в виде фрагментов разной длины и толщины; миоциты единичные, у некоторых сохранены контуры, ядра бледные, широкие зоны опустошения.

Fig. 13. Arterial homograph, 84 days of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: single endotheliocytes with a flat pale nucleus, the basement membrane is fragmented, with areas of detachment, the intima is compacted, the inner elastic membrane in the form of fragments of different lengths and thicknesses; single myocytes, some retain contours, pale nuclei, wide areas of devastation.

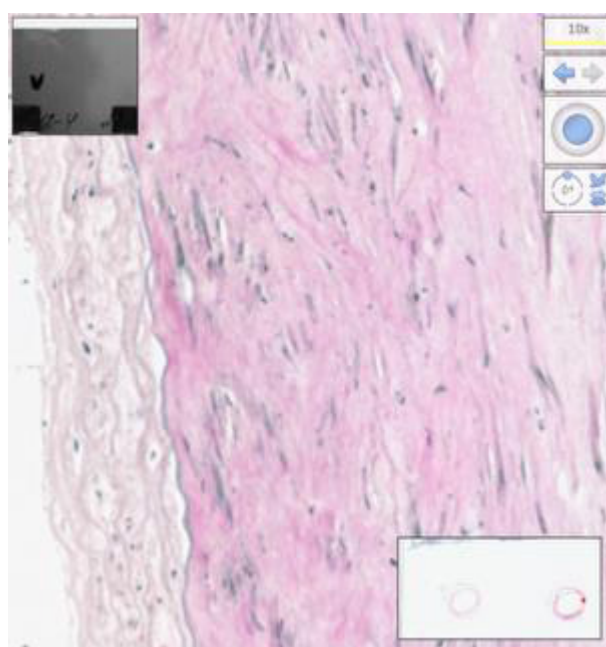


Рис. 14. Артериальный гомографт, 84 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: волокна интимы бледные, разобщенные, внутренняя эластическая мембрана в виде четкой монолинии, в средней оболочке светло-фиолетовый волокнистый фон разной плотности окрашивания.

Fig. 14. Arterial homograph, 84 days of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: intima fibers are pale, disconnected, the inner elastic membrane is in the form of a clear monoline, in the middle shell there is a light purple fibrous background of different coloring densities.

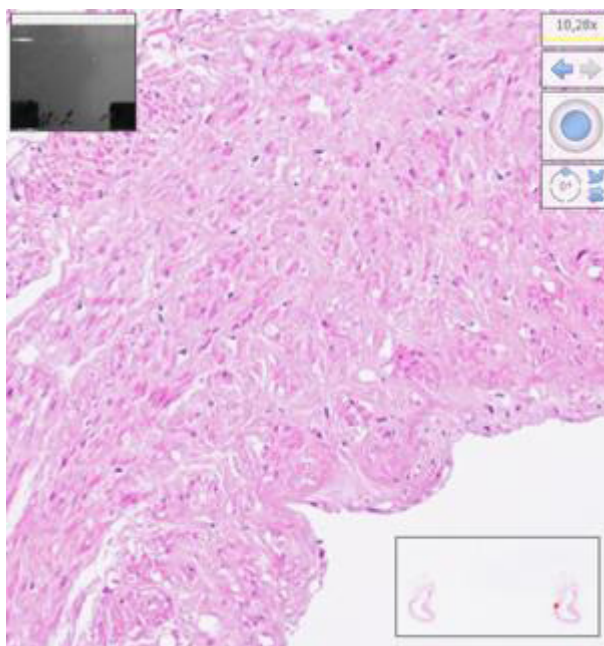


Рис. 15. Венозный гомографт, 84 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска гематоксилин-эозином, цифровое увеличение: эндотелиоциты сохранены на многих участках, базальная мембрана тонкая, контуры миоцитов средней оболочки преимущественно сохранены, ядра бледные, определяются не везде, множественные мелкие зоны опустошения, эндотелий *vasa vasorum* не определяется.

Fig. 15. Venous homograph, 84 days of preservation in RPMI 1640 solution. Hematoxylin-eosin staining, digital magnification: endotheliocytes are preserved in many areas, the basement membrane is thin, the contours of the myocytes of the middle shell are predominantly preserved, the nuclei are pale, not everywhere, multiple small areas of devastation, the endothelium *vasa vasorum* is not determined.

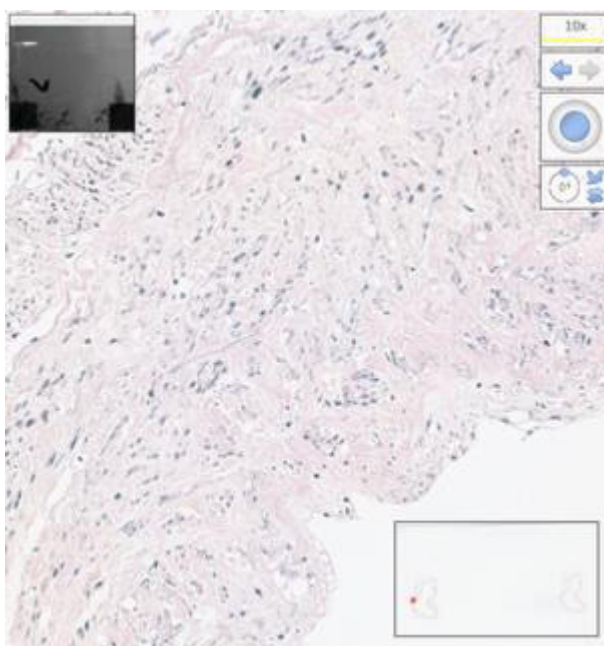


Рис. 16. Венозный гомографт, 84 сутки консервации в растворе RPMI 1640. Окраска по Вейгерту–Ван Гизону, цифровое увеличение: в интима и мышечном слое бледное окрашивание коллагеновых волокон в светло-красные оттенки.

Fig. 16. Venous homograph, 84 days of preservation in RPMI 1640 solution. Weigert–Van Gieson coloring, digital magnification: pale coloration of collagen fibers in light red shades in the intima and muscle layer.

ОБСУЖДЕНИЕ

По мнению авторов, динамика количества ядер миоцитов мышечных порций стенок артериального и венозного гомографтов отражает происходящие миолитические процессы в консервированном графте, являясь одним из наиболее чувствительных маркеров гибели клеток.

Гладкие миоциты имеют в срезе средний размер 200×4 мкм (условная площадь 800 мкм^2) и размер ядер 10×3 мкм (условная площадь 30 мкм^2). Исходя из этого, в 10 тыс. мкм^2 ($0,01 \text{ мм}^2$) поперечного среза артерии в меди может располагаться порядка 13 гладко-мышечных клеток и, соответственно, столько же ядер. Следовательно, изменение плотности расположения ядер (их количество на единицу площади) может говорить о степени аутолиза миоцитов и обезвоживания основного вещества.

Свежезаготовленные гомографты, безусловно, сохраняют «жизнеспособность». Клетки гомографта «живут» в питательной среде. *In vitro* кровотока нет, следовательно, продукты метаболизма приведут к некробиотическим изменениям стенки гомографта в течение определенного срока в результате процессов аутолиза. По нашему мнению, термин «аутолиз» отражает суть этого процесса [13].

«Прочность» трупного гомографта обусловлена коллагеновыми и эластическими волокнами. Именно от «жизнеспособности» и будут зависеть биофизические свойства этих волокнистых структур.

Изменения межклеточного вещества при некрозе охватывают как межуточное вещество, так и волокнистые структуры. Коллагеновые волокна тоже набухают, превращаются в плотные гомогенные массы, распадаются или лизируются. Изменения эластических волокон заключаются в набухании, распаде, расплавлении (эластолиз). Ретикулярные волокна нередко сохраняются в очагах некроза длительное время, но затем подвергаются фрагментации и глыбчатому распаду. Распад волокнистых структур связан с активацией специфических ферментов — коллагеназ и эластаз. Таким образом, в межклеточном веществе при некрозе чаще всего развиваются изменения, характерные для фибриноидного некроза. Те же изменения возникают в стенках сосудов, в структуру которых входят эластические и коллагеновые волокна. В динамике некротических изменений, особенно клетки, существует смена процессов коагуляции и колликации, однако нередко отмечают преобладание одного из них [10, 11].

По данным морфологического исследования «жизнеспособности» свежих венозных и артериальных гомографтов, консервированных в питательной среде 199 (И.С. Мухамадеев и соавт., 2007), с 15-х суток в гистологических препаратах обнаруживались признаки набухания фибриллярных структур во всех слоях сосудистой стенки, а также деструкция ядер лейомиоцитов до 15–30%. На 30-е сутки исследования доля разрушенных ядер составила 50%. На 40-е сутки были выявлены обширные зоны гибели лейомиоцитов и гибель ядер

в 75–90%. *Оптимальным сроком консервации в среде 199 и использования гомографтов в практике являются первые 15–30 суток* [13].

В проведенных авторами морфологических исследованиях консервированных трупных гомографтов не выявлено тотальных зон аутолиза в слоях стенки графта в сроки до 84 суток. В исследовании Мухамадеева И.С. с соавт. (2007) [13] применялся консервирующий раствор — среда 199, в нашем исследовании — RPMI 1640.

Авторы предложили консервировать гомографты в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл) при температуре $+4^\circ\text{C}$. В литературе найдено только одно морфологическое исследование трупных гомографтов с использованием для консервации раствора RPMI 1640 до 42 суток. В нем на протяжении всех контрольных точек полностью была сохранена структура нативной стенки трупных гомографтов, отсутствовали очаги тотального аутолиза стенки во всех микропрепаратах. К 28 суткам было выявлено разрежение мышечной порции стенки, набухания миоцитов, изменения ядер в виде фрагментации и лизиса [12].

Гистологическое исследование в сроки до 84 недель в доступной литературе не найдено. При этом в нашем исследовании в сроки 84 суток тотального аутолиза стенки не выявлено, что также может быть обусловлено качеством консервирующей среды.

В проведенном авторами исследовании зарегистрировано уменьшение количества ядер миоцитов мышечной стенки артериальных гомографтов на 56% в конце 42 суток ($p=0,003$), венозных гомографтов — на 55% в конце 42 суток ($p=0,024$) относительно соответствующих значений 7 суток. Это связано, по мнению авторов, с отеком мышечной порции и изменениями ядер в виде фрагментации и лизиса.

Таким образом, к концу 42 суток процессы некробиоза, происходящие в консервированных артериальных и венозных гомографтах, возможно верифицировать простым гистологическим исследованием, что не требует проведения иммуногистохимического исследования. По данным предыдущего исследования авторов, выявлено увеличение толщины мышечного слоя артериального гомографта к 28 суткам ($p=0,01$) на 49,8% относительно значений этого показателя на 21 сутки, а в венозном гомографте — статистически значимое снижение толщины стенки вены без адвентиции к концу 42 суток [12]. Здесь нет противоречия. К 28 суткам увеличивается толщина мышечной порции, но статистически достоверное уменьшение количества ядер отмечается к концу 42 суток. *Судить о безопасности применения, консервированных графтов возможно только комплексно.* К 21 суткам нет отека стенки и нет уменьшения количества ядер миоцитов. Следовательно, *безопасным сроком применения артериальных гомографтов можно считать срок до 21 суток.* В венозном графте складывается иная картина. К 42 суткам отмечено снижение

количества ядер мышечной порции, но от ека всей стенки графта без адвентиции нет. Если руководствоваться данными только исследования количества ядер миоцитов мышечной стенки венозного графта, то безопасным сроком применения венозного графта можно считать срок до 35 суток, так как в этот срок консервации нет снижения количества ядер миоцитов. В нашем предыдущем исследовании толщины стенки алловены без адвентиции в различные сроки консервации показано, что на протяжении всего срока исследования (до конца 42 суток) нет утолщения этого показателя [12], а *утолщение стенки*, по мнению авторов, самый «*сильный*» предиктор аутолиза стенки. Следовательно, *безопасным сроком применения венозных гомографтов можно считать срок до 42 суток, несмотря на снижение количества ядер миоцитов после 35 суток.*

Механизмы деградации охватывают все структурные элементы стенки сосуда: клетки, волокна, межклеточное вещество. Скорость и механизмы их инволюции различны. Клеточный состав включает эндотелиоциты сосуда и эндотелиоциты *vasa vasorum*, перициты, фибробласты и фиброциты, лейомиоциты; волокнистые структуры — базальная мембрана эндотелия, внутренняя эластическая мембрана, коллагеновые и эластические волокна интимы и меди; основное вещество — протеогликаны, гликопротеины и гликозаминогликаны, а также вода и ионы. Согласно общепринятому представлению, охлаждение снижает ферментативную активность и замедляет биохимические реакции, но при восстановлении оптимальной температуры в период до 2–3 суток активность возвращается к исходной. Следует отметить, что в задачи нашего исследования не входило подробное изучение механизмов деградации структур стенки, мы касались этой проблемы исключительно с точки зрения сохранения прочности графта и возможности его трансплантации в отдаленные сроки (до 6 недель). Именно поэтому гистологическое изучение стенки сосудов мы начали с конца первой недели, а не с первого часа после извлечения.

Клетки. В агональном периоде перед забором материала снижается энергетическое обеспечение клетки, что приводит ее через известные механизмы к дистрофии, тотальному или фокальному некрозу, апоптозу. После извлечения прекращаются все энергозависимые процессы в клетке, в том числе апоптоз. Остановка АТФ-зависимых насосов приводит к осмотическому равновесию вне- и внутриклеточной сред, набуханию цитоплазмы и очаговому или тотальному разрушению мембран. Повреждение мембран лизосом приводит к некрозу клетки, объем которого зависит от активности и количества ферментов, различных для разных типов клеток. Разрушение клеточных мембран приводит к выходу ферментов, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММП), разрушающих коллаген и эластин. Однако количество фермента ограничено, и его активность в условиях гипотермии близится к нулю. Клетки эндотелия теряют связь с матриксом

в связи с деградацией фиксирующих белков, однако отсутствие внутрисосудистого движения создает обманчивую гистологическую картину стабильности эндотелия. Отдельно следует коснуться клеток мононуклеарного ряда, всегда в той или иной степени присутствующих в тканях. При их распаде выделяется большое количество лизосомальных ферментов, вызывающих одномоментный лизис внеклеточного матрикса и клеточных мембран. При понижении температуры активность их резко падает.

Волокнистые структуры. Как уже отмечалось, коллаген и эластин подвергаются действию ММП и лизосомальных ферментов, однако это происходит в течение короткого времени (порядка трех суток) и с участием ограниченного количества ферментов. Данный ферментативный выброс, видимо, не может значительно снизить прочностные характеристики волокнистого каркаса. В дальнейшем при снижении температуры гидролитическая деструкция полностью прекращается. Происходит гидратация коллагена с набуханием волокон и изменением его физико-химических характеристик. Эластин, как гидрофобный материал, практически не подвергается действию воды. Таким образом, в течение нескольких недель происходит гидратация коллагена с утолщением интимы и меди, причем в вене более выраженное по сравнению с артерией.

Основное вещество. Действие ММП и лизосомальных ферментов снижает гидрофильность основного вещества и расщепляет клеточно-матриксные связи. Ферментативный гликолиз при низкой положительной температуре замедляется, но не останавливается, однако ферментативная активность убывает до нуля в течение первой недели. Параллельно происходит вымывание протеогликанов и гликозаминогликанов в окружающий раствор, что сопровождается истончением стенки и уплотнением сохранившихся миоцитов.

Вышеизложенные рассуждения рассматриваются нами с точки зрения возможности прогноза поведения графта при трансплантации. Согласно приведенным умозаключениям, использование сосуда в первые несколько суток после его охлаждения и консервации должно привести к «оживлению» ферментов, выделившихся при ишемическом повреждении и вызвать массивный некроз клеток и внеклеточного матрикса с последующим разрушением стенки. В течение первой недели после извлечения графта и помещения его в консервант с низкой положительной температурой заканчивается прогрессирующая ферментативная деградация структур стенки. В последующие недели происходит гидратация коллагена при интактности эластических волокон, частичная утрата белково-углеводного комплекса основного вещества, набухание и разобщение лейомиоцитов, набухание и гидратация эндотелиоцитов. Таким образом, биомеханическая прочность графта в наибольшей степени определяется оставшимися структурами: мало поврежденными эластическими волокнами и гидратированными коллагеновыми волокнами. Мышечные

клетки разобщены и уже не формируют волокон, следовательно, не являются опорной структурой. Сохранившаяся часть белково-углеводного геля выполняет скорее связывающую функцию, нежели опорную. Таким образом, при возникновении функциональной нагрузки можно рассчитывать только на волокнистый каркас. Очевидно, что при трансплантации стенки сосудистого графта должны выдерживать продольную нагрузку в месте сшивания и поперечную нагрузку на всем протяжении, особенно при замещении артериального сегмента. Отсюда вытекает, что гистологическим эквивалентом биомеханической прочности на поздних стадиях хранения является состояние эластических и коллагеновых волокон.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К концу 42 суток консервации свежезаготовленных трупных гомографтов в растворе RPMI 1640 с добавлением гентамицина (400 мкг/мл) и флуконазола (20 мкг/мл) при температуре +4°C выявлено снижение количества ядер миоцитов стенок артериального и венозного гомографтов относительно значений 7 суток. В период 42–84 суток консервации как в артериях, так и в венах нет статистически значимого уменьшения количества ядер миоцитов мышечной стенки гомографтов.

Учитывая в комплексе морфологические исследования авторов, оптимальным сроком применения артериальных гомографтов можно считать срок консервации в растворе RPMI 1640 до 21 суток. Венозные гомографты возможно использовать в срок до 42 суток, несмотря на снижение количества ядер миоцитов после 35 суток, так как в срок до конца 42 суток нет отека стенки венозных гомографтов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Р.Е. Калинин — концепция и дизайн исследования; И.А. Сучков — анализ данных, редактирование; В.В. Карпов — сбор материала, статистическая обработка данных, написание текста; А.П. Швальб — концепция и дизайн исследования; Д.В. Гузаиров — анализ данных; Т.М. Черданцева — редактирование. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Этическая экспертиза. Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Протокол № 4 от 09.11.2021). Исследование артериальных и венозных гомографтов от посмертного донора выполнено с соблюдением правил забора органов и тканей (Федеральный закон №323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (с изменениями и дополнениями от 13.07.2021); Закон Российской Федерации от 22.12.1992 №4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека» (с изменениями и дополнениями); Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии наук № 306н/3 от 04.06.2015 «Об утверждении перечня объектов трансплантации» (с изменениями и дополнениями); Приложение к Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации и Российской академии наук № 73н/2 от 20.02.2019).

Согласие на публикацию. Протокол исследования одобрен с возможностью отсутствия подписания информированного согласия по объективным причинам — посмертное исследование биоматериалов — при строгом выполнении Протокола исследования и перечисленных выше нормативных актов.

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние 3 года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовались.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два внешних рецензента, член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions. R.E. Kalinin — concept and design of the study; I.A. Suchkov — analysis of data, editing; V.V. Karpov — collection of material, statistical processing of data, writing the text; A.P. Shvalb — concept and design of the study; D.V. Guzairov — analysis of data; T.M. Cherdantseva — editing. All authors approved the manuscript (the publication version), and also agreed to be responsible for all aspects of the work, ensuring proper consideration and resolution of issues related to the accuracy and integrity of any part of it.

Ethics approval. The study was approved from the Local Ethics Committee of the Rязan State Medical University (Protocol No. 4 of November 09, 2021). The study of arterial and venous homographs from a postmortem donor was performed in compliance with the rules for organ and tissue sampling (Federal Law No. 323-FL "On the Basics of Public Health Protection in the Russian Federation" (with amendments and additions on July 13, 2021); Law of the Russian Federation dated December 22, 1992 No. 4180-1 "On transplantation of human organs and (or) tissues" (with amendments and additions); Order of the Ministry of Health of the Russian Federation and the Russian Academy of Sciences No. 306n/3 on June 04, 2015 "On Approval of the List of transplant facilities" (with amendments and additions); Appendix to Order of the Ministry of Health of the Russian Federation and the Russian Academy of Sciences No. 73n/2 on February 20, 2019).

Consent for publication. The study protocol was approved with the possibility of not signing informed consent for objective reasons — postmortem examination of biomaterials — subject to strict compliance with the Research Protocol and the regulations listed above.

Funding sources. No funding.

Disclosure of interests. The authors have no relationships, activities or interests for the last three years related with for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality. The authors did not use previously published information (text, illustrations, data) when creating this work.

Data availability statement. The editorial policy regarding data sharing does not applicable to this work, and no new data were collected or created.

Generative AI. Generative AI technologies were not used for this article creation.

Provenance and peer-review. This work was submitted to the journal on its own initiative and reviewed according to the usual procedure. Two external reviewers, a member of the editorial board and the scientific editor of the publication participated in the review.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Harlander–Locke MP, Harmon LK, Lawrence PF, et al. The use of cryopreserved aortiliac allograft for aortic reconstruction in the United States. *J Vasc Surg.* 2014;59(3):669–674. doi: 10.1016/j.jvs.2013.09.009
2. Kalinin RE, Suchkov IA, Karpov VV, et al. The First Experience of Using Allografts in Surgery of Main Arteries of Lower Limbs. *Russian Sklifosovsky Journal "Emergency Medical Care".* 2020;9(3):442–448. doi: 10.23934/2223-9022-2020-9-3-442-448 EDN: IZFWQX
3. Pokrovsky AV, Dan VN, Chupin AV, Gryaznov OG. The use of biological transplants in the femoral–popliteal–tibial position. *Angiology and Vascular Surgery.* 1996;(3):91–100.
4. Chakfé N, Diener H, Lejay A, et al. Editor's Choice — European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2020 Clinical Practice Guidelines on the Management of Vascular Graft and Endograft Infections. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020;59(3):339–384. doi: 10.1016/j.ejvs.2019.10.016 EDN: MKKSRL
5. Kalinin RE, Suchkov IA, Egorov AA, et al. Permanent vascular access for hemodialysis using allogeneic vein. *Russian Journal of Cardiology and Cardiovascular Surgery.* 2021;14(1):98–103. doi: 10.17116/kardio20211401198 EDN: BXC VKF
6. Kalinin RE, Suchkov IA, Karpov VV, Egorov AA. Potentials of Using Allografts in Surgical Treatment of Popliteal Artery Aneurysms. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald.* 2022;30(1):115–122. doi: 10.17816/PAVLOVJ76343 EDN: HZXZBU
7. Dmitriev OV, Italiantshev AY, Chernovalov DA, et al. Prosthetic repair of the aorta with a cadaveric homograft for infection of bifurcated synthetic vascular prosthesis. *Angiology and Vascular Surgery.* 2021;27(3):132–139. doi: 10.33529/ANGIO2021315 EDN: SJKLSV
8. Dmitriev OV, Italiantshev AY, Chernovalov DA, et al. The use of an aortic allograft in infection of an aortic prosthesis in a patient with a multi-storey lesion of the arterial bed of the lower extremities. *Grekov's Bulletin of Surgery.* 2023;182(4):53–59. doi: 10.24884/0042-4625-2023-182-4-53-59 EDN: FRIXHY
9. Khomchuk IA, Kurilov AB, Platonov SA, et al. Extraanatomical surgical treatment of infection of the bifurcation aortic vascular prosthesis using cadaveric arteries. *The Journal of "Emergency Surgery" named after I.I. Dzhanelidze.* 2023;(2):56–61. EDN: PPBTVM
10. Bogomolova IN, Bogomolov DV. Prizhiznennyy nekroz i posmertnyy autoliz: problema differentsial'noy diagnostiki. In: *Avdeyev AI, Yevseyev AN, Vlasuk IV, editors. Izbrannyye voprosy sudebno-meditsinskoj ekspertizy i patologicheskoy anatomii: Khabarovsk, 01 January – 31 December 2012.* Khabarovsk; 2012;(12):25–31. (In Russ.) EDN: XNVJQL
11. Strukov AI, Serov VV. *Pathological anatomy.* 5th ed. Moscow: Litterra; 2012. (In Russ.)
12. Kalinin RE, Suchkov IA, Karpov VV, et al. Features of the morpho-histological picture of homografts in different periods of conservation. *Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal.* 2023;11(4):75–82. doi: 10.33029/2308-1198-2023-11-4-75-82 EDN: OQMJXT
13. Muhamadeev IS, Friend GG, Berezina IA. The evaluation of arterial and venous allografts' viability in vitro depending on the period of preservation. *Morphological Newsletter.* 2007;(1–2):197–201. EDN: MJCNOJ

ОБ АВТОРАХ

***Карпов Вячеслав Владимирович**, канд. мед. наук;
адрес: Российская Федерация, 390026, Рязань, ул. Высоковольная, д. 9;
ORCID: 0000-0001-5523-112X;
eLibrary SPIN: 6245-6292;
e-mail: sdrr.s@yandex.ru

Калинин Роман Евгеньевич, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-0817-9573;
eLibrary SPIN: 5009-2318;
e-mail: kalinin-re@yandex.ru

Сучков Игорь Александрович, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-1292-5452;
eLibrary SPIN: 6473-8662;
e-mail: suchkov_med@mail.ru

Швальб Александр Павлович, канд. мед. наук;
ORCID: 0000-0001-8563-0439;
e-mail: shvalbalik@yandex.ru

Гузаиров Дмитрий Владиславович;
ORCID: 0009-0002-1943-2244;
eLibrary SPIN: 3501-8157;
e-mail: sdrr@mail.ru

Черданцева Татьяна Михайловна, д-р мед. наук, профессор;
ORCID: 0000-0002-7292-4996;
eLibrary SPIN: 3773-8785;
e-mail: cherdan.morf@yandex.ru

AUTHORS' INFO

***Vyacheslav V. Karpov**, MD, Cand. Sci. (Medicine);
address: 9 Vysokovolt'naya st, Ryazan, Russian Federation, 390026;
ORCID: 0000-0001-5523-112X;
eLibrary SPIN: 6245-6292;
e-mail: sdrr.s@yandex.ru

Roman E. Kalinin, MD, Dr. Sci. (Medicine); Professor;
ORCID: 0000-0002-0817-9573;
eLibrary SPIN: 5009-2318;
e-mail: kalinin-re@yandex.ru

Igor A. Suchkov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0002-1292-5452;
eLibrary SPIN: 6473-8662;
e-mail: suchkov_med@mail.ru

Aleksandr P. Shvalb, MD, Cand. Sci. (Medicine);
ORCID: 0000-0001-8563-0439;
e-mail: shvalbalik@yandex.ru

Dmitriy V. Guzairov;
ORCID: 0009-0002-1943-2244;
eLibrary SPIN: 3501-8157;
e-mail: sdrr@mail.ru

Tatyana M. Cherdantseva, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor;
ORCID: 0000-0002-7292-4996;
eLibrary SPIN: 3773-8785;
e-mail: cherdan.morf@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку/Corresponding author