

На правах рукописи

МАКСИМОВА
Арина Юрьевна

**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ЛАБОРАТОРНОМУ МОНИТОРИНГУ ФУНКЦИИ
ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Екатеринбург – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, доцент

Базарный Владимир Викторович
Бессонова Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

Гуляева Инна Леонидовна — доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой патологической физиологии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Храмых Татьяна Петровна — доктор медицинских наук, доцент, заведующая кафедрой топографической анатомии и оперативной хирургии, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «___» мая 2022 г. в «___» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 21.2.074.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке им. В.Н. Климова ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д. 17 и на сайте университета <http://www.usma.ru>, а с авторефератом на сайте ВАК при Минобрнауки России: vak.minobrnauki.gov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Базарный
Владимир Викторович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в экономически развитых странах ежегодно наблюдается прирост числа пациентов с хроническими заболеваниями печени различной этиологии [<https://www.who.int/ru>]. Во многих случаях единственным радикальным методом лечения является ортотопическая трансплантация печени (ОТП) (Баходирова С.Б. и др., 2017; Trotter J. F. et al., 2017). Однако данный способ имеет ограничение из-за постоянно растущего разрыва между количеством реципиентов и доступным количеством донорских органов. Существующее несоответствие заставило трансплантологов прибегнуть к использованию органов от субоптимальных доноров (Hayashi H. et al, 2018; Nair A. et al., 2018; Chae M. S. et al., 2020;). При этом в эпоху MELD (Model for End Stage Liver Disease), когда приоритет включения в лист ожидания (ЛО) получают те пациенты, у которых тяжесть заболевания выше, ОТП подвергаются реципиенты в тяжелом состоянии, что в итоге привело к уменьшению смертности до операции и оказало значительное влияние на повышение частоты осложнений и на снижение выживаемости реципиентов после трансплантации (Vodkin I. et al., 2017; Hayashi H. et al., 2018; Sasaki T. et al., 2018).

В настоящее время внимание специалистов сосредоточено на сохранении функции трансплантата печени после ОТП. Во многом судьба трансплантата зависит от посттрансплантационных осложнений. Их этиология и патогенез разнообразны и интенсивно изучаются. Особое внимание среди них привлекает дисфункция трансплантата печени (ДТ), встречаемость 8-24% (Ceglarek U. et al., 2016; Neves D. B. et al., 2016; Chae M. S. et al., 2018). Неблагоприятный исход ДТ обусловлен несвоевременной диагностикой, ограниченной рядом причин: отсутствием общепринятых лабораторных критериев данного осложнения, консенсуса среди специалистов в терминологии и классификации, большой

разнородностью причин возникновения ДТ и недостаточной изученностью механизмов патогенеза (Neves D. B. et al., 2016; Salviano M. E. M. et al., 2019; Barruesco-Francioni J. E. et al., 2020).

Сегодня следует признать, что концепция патогенеза посттрансплантационных осложнений при ОТП еще полностью не сформулирована, что ограничивает возможности разработки новых способов лабораторного мониторинга функции трансплантата и ее коррекции.

Степень разработанности проблемы

При анализе публикаций, посвященных изучению посттрансплантационных осложнений, прежде всего – дисфункции трансплантата печени, было выявлено, что до сих пор отсутствует согласованное мнение о патогенезе данной патологии, что ограничивает внедрение новых методов диагностики и коррекции ДТ (Bolondi G. et al., 2016; Yang J. et al., 2017). Бесспорно, одной из ведущих причин развития этого осложнения является ишемически-реперфузионное повреждение (ИПР) (Per C. et al., 2013; Weiss T. S. et al., 2019; Li Y. et al., 2020) хотя многие авторы считают также значимыми другие этиологические и патогенетические факторы. В частности, в последние годы появились данные о значении отдельных цитокинов, участвующих в результате сложных патологических процессов после ИПР, которые требуют уточнения (Балашкая С.Ю. и др., 2021; Martínez J. A. et al., 2019; Beltrame P. et al., 2019). При этом в отношении различных цитокинов отсутствуют четкие критерии, которые помогли бы своевременно оценить функцию трансплантата печени, прогнозировать развитие осложнений, в частности, установить диагноз ДТ.

Цель исследования

Установить закономерности изменений гематологических и цитокиновых реакций в периоперационном периоде после ортотопической трансплантации печени в целях повышения информативности лабораторного мониторинга дисфункции трансплантата печени.

Задачи

1. Выявить закономерности реакции системы крови реципиентов с нормальным и осложненным течением посттрансплантационного периода для создания лабораторных критериев диагностирования дисфункции трансплантата.

2. Определить уровень плазменных биомаркеров повреждения и восстановления ткани печени у реципиентов для выявления механизмов патогенеза дисфункции печеночного трансплантата.

3. Разработать алгоритм лабораторного мониторинга пациентов после ортотопической трансплантации печени.

4. Оценить в эксперименте влияние цитофлавина на состояние регенерирующей печени как метода возможной стимуляции восстановительных процессов печени после трансплантации у больных с дисфункцией печени.

Научная новизна исследования

Впервые был проведен комплексный анализ цитокинового профиля пациентов до и после ОТП с использованием мультипараметрического иммунофлуоресцентного анализа. Повышение продукции IL-8 у реципиентов с ДТ является одним из ведущих механизмов повреждения трансплантата печени, а его высокая прогностическая значимость говорит о возможности рассматривать данный показатель в качестве прогностического маркера тяжелого течения посттрансплантационного периода.

Установлены характерные для дисфункции трансплантата печени динамические изменения количества тромбоцитов (уменьшение более чем на 41%

к 3 суткам и повышение более чем на 40% к 10 суткам), снижение функциональной способности и нарушение. На основе выявленных особенностей тромбоцитарной реакции был разработан способ, позволяющий прогнозировать течение посттрансплантационного периода у реципиентов после ОТП (Патент на изобретение 2747718 С1 «Способ прогнозирования течения раннего послеоперационного периода у пациентов после трансплантации печени»).

Впервые в эксперименте на лабораторных животных показано, что введение препарата цитофлавин усиливает регенераторный ответ в печени после частичной гепатэктомии. Полученные результаты могут служить поводом для изучения позитивного влияния данного препарата на восстановление функции трансплантата у больных с дисфункцией после ОТП.

Теоретическая и практическая значимость работы

Современные представления о патогенезе осложнений после трансплантации печени расширены на основе данных об изменениях уровня цитокинов, ростовых факторов. Это позволило предложить новые способы прогнозирования посттрансплантационных осложнений, в частности ДТ. Определена клиническая информативность выявленных лабораторных параметров, предложены для клинической практики информативные тесты.

Полученные результаты в эксперименте говорят о целесообразности использования цитофлавина для нормализации восстановительных процессов в печени после ее повреждения.

Методология и методы диссертационного исследования

Для изучения механизмов дисфункции трансплантата печени было проведено клиническое ретроспективное и проспективное исследование реципиентов после ОТП, в котором определяли гематологические, биохимические и иммунохимические показатели. С целью определения возможностей патогенетической коррекции состояния печени цитофлавином в

условиях ограниченного количества функционирующих гепатоцитов нами было проведено экспериментальное исследование на лабораторных мышах.

Положения, выносимые на защиту

1. Динамические изменения количества тромбоцитов отражают течение нормального и осложненного дисфункцией трансплантата постоперационного периода после ортотопической трансплантации печени.

2. Изменение уровня плазменного интерлейкина-8 является прогностическим маркером дисфункции трансплантата печени. Разработанный авторский способ позволяет диагностировать ДТ.

3. Введение цитофлавина улучшает адаптационный ответ печени после частичной гепатэктомии у мышей.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов и обоснованность выводов определяются использованием современных лабораторных методов исследования, объемом клинико-экспериментального исследования, применением адекватных задачам методов статистического анализа.

Основные результаты исследований доложены и обсуждены на IV Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (г. Екатеринбург, 2019 г.); российских конгрессах лабораторной медицины (г. Москва, 2019, 2020, 2021 гг.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии» (г. Санкт-Петербург, 2019 г.); Втором межрегиональном медицинском форуме УФО «Технологии эффективного здравоохранения» 2021 (г. Екатеринбург, 2021 г.); 9-ой научно-практической конференции с международным участием «Московская трансплантология. Задачи сегодняшнего дня» (г. Москва, 2021 г.).

Предложенный алгоритм лабораторного мониторинга внедрен в клиническую практику областного гепатологического центра ГАУЗ СО СОКБ № 1. Результаты диссертационной работы включены в учебный процесс на кафедрах патологической физиологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России (темы «Патофизиология печени», «Патофизиология воспаления») и на кафедре клинической лабораторной диагностики и бактериологии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России («Лабораторная диагностика болезней печени»).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 3 статьи – в печатных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, из них 1 статья – в журнале, входящем в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus. По материалам исследования получен Патент РФ № 2747718 «Способ прогнозирования течения раннего послеоперационного периода у пациентов после трансплантации печени».

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 138 страницах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, двух глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций; сопровождается 27 таблицами и 21 рисунком. Список литературы включает 43 отечественных и 136 иностранных источников.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Решение задач работы требовало проведения клинических и экспериментальных исследований.

Материалы и методы исследования

Нами было проведено два этапа клинического исследования, которые включали в себя ретроспективный анализ 44 историй болезней реципиентов после ОТП и проспективное исследование 29 пациентов до и после ОТП (рис. 1).

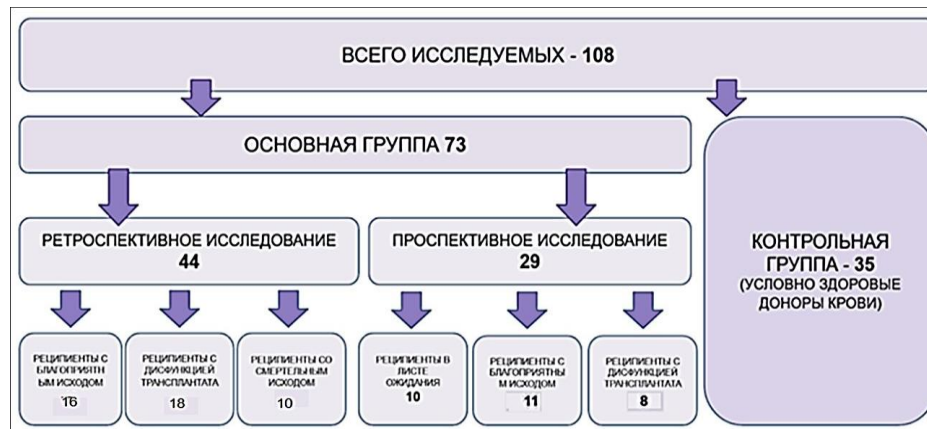


Рисунок 1 – Распределение пациентов по группам

Все исследуемые реципиенты поступали в гастроэнтерологическое отделение ГАУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница № 1» (главный врач – Трофимов И.М.), г. Екатеринбург, с 2018 по 2020 гг. для выполнения ОТП. Показаниями к трансплантации явились цирроз печени невирусной этиологии – 21%, цирроз печени в исходе вирусных гепатитов – 70%, гепатоцеллюлярная карцинома на фоне вирусной этиологии – 7%, другие показания – 2%. Диагноз ставился на основании стандартных клинико-лабораторных критериев, степень тяжести определяли по шкалам MELD и Child-Pugh.

Поскольку не существует четких и общепринятых лабораторных критериев дисфункции трансплантата, то распределение пациентов проводилось нами на основе оценки общего состояния реципиента и длительности изменений биохимических показателей. Группу с дисфункцией трансплантата представили пациенты, у которых наблюдалось длительное повышение биохимических маркеров (более 3 месяцев) и при этом были исключены все другие виды осложнений: сосудистые, билиарные, инфекционные. В группу с благоприятным течением послеоперационного периода входили реципиенты с краткосрочными

изменениями биохимических показателей (не более 10 дней). В группу со смертельным исходом включали реципиентов, умерших в течение 21 дня (то есть в период госпитализации) после операции в результате различных хирургических осложнений, в том числе по причине тяжелой дисфункции.

В ретроспективном исследовании все реципиенты в зависимости от исходов были разделены на три группы: 1 группу составили 16 реципиентов печени с благоприятным посттрансплантационным периодом; 2 группу вошли 18 реципиентов с развившейся в посттрансплантационном периоде дисфункцией трансплантата; 3 группу представили 10 реципиентов со смертельным исходом после ортотопической трансплантации печени.

В проспективное исследование было включено 10 человек из листа ожидания (1 группа), 11 реципиентов с благоприятным течением послеоперационного периода (2 группа), 8 реципиентов с дисфункцией трансплантата (3 группа).

Экспериментальное исследование было проведено на 60 самцах белых мышей в возрасте 7-8 месяцев, массой 24-31 г. Все исследования проводили с соблюдением принципа гуманной методологии медико-биологических экспериментов на животных, учитывая требования ГОСТ Р ИСО 10993.2-99 от 01.07.2010, главы 25, ст. 245 УК РФ. Дизайн экспериментального исследования, его новизна, допустимость и приемлемость были утверждены на заседании локального этического комитета ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России (протокол № 4 от 19.04.2019). Всем животным была проведена частичная гепатэктомия (ЧГ) печени в более подробном описании С. Mitchell и Н. Willenbring (2014). Манипуляция выполнялась в условиях контролируемого наркоза (0,1 мл ксилазина 2% + 0,1 мл золетила 100, и доводили до 1 мл 0,9% раствором натрия хлорида). В зависимости от проводимой манипуляции мыши были разделены на три группы наблюдения: 1-ая группа – интактные мыши (n = 20); 2-ая — контрольные мыши: ЧГ + 0,9% раствор натрия хлорида, 3-я (основная) группа – ЧГ + внутрибрюшинно препарат цитофлавин в дозе 0,014 мл/10 г массы тела в течение 7 суток ежедневно (n = 20).

Лабораторные исследования

Гематологические исследования. Общий анализ крови реципиентов и здоровых доноров проводился в соответствии со стандартными процедурами с помощью гематологического анализатора Cell Dyn 3500 (Abbott, USA). Для изучения АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов использовали комбинированный агрегометр Chronolog 590 (USA).

Для оценки кроветворной системы у лабораторных животных в экспериментальной части был использован автоматизированный гематологический анализатор МЕК 6400 J/K (Nihon Kohden Corporation, Japan). Кроме того, проводили цитологическое исследование костного мозга лабораторных животных по стандартной методике.

Биохимическое исследование. Для оценки функции печени у реципиентов учитывали следующие биохимические показатели: аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), общий билирубин, альбумин. Весь спектр исследований был выполнен на автоматическом анализаторе AU 5800 (Beckman Coulter, USA).

Иммунохимический анализ. В плазме пациентов определяли концентрацию цитокинов: IL-12, IL-4, IL-6, TNF-alpha/beta, GM-CSF, IL-15, IL-1RA, IL-7, IL-8, IL-10, MIP 1 alpha, RANTES, NGF, BDNF, EGF, FGF, HGF, LIF, PDGF, PIGF, VEGF-A,D, IFN, IL-13, IL-1, IL-2, IL-5, IL-18, IL-17a, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-9, IFN alpha/gamma, IL-31, IL-1 alpha/beta, TNF, Eotaxin, GRO, MCP-1, MIP-1, SDF, SCF методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, USA) с использованием тест-системы ProcartaPlex Human Cytokine / Chemokine / и ProcartaPlex Simplex Human Growth Factor (Invitrogen, USA) согласно протоколу производителя. Концентрацию каждого цитокина подсчитывали на основе средней интенсивности флуоресценции частиц (MFI) с использованием программного обеспечения xPONENT и ProcartaPlex.

У лабораторных животных определяли концентрацию гепатоцитарного фактора роста (HGF) методом твердофазного иммуноферментного анализа с

использованием набора HGF Mouse–ab100687 (Abcam/USA) и трансформирующий фактор роста (TGF) методом мультипараметрического флуоресцентного анализа с магнитными микросферами (технология xMAP, Luminex 200, USA) с использованием тест-системы ProcartaPlex MouseTGF (Invitrogen, USA) согласно протоколу производителя.

Морфологические исследования. Для оценки восстановительных процессов в тканях проводили морфологическое исследование. Для этого животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом через 3, 7 сутки после операции. Приготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике с помощью автоматизированной заливочной станции MICROM EC 350-2 (Thermo Fisher Scientific, USA) и автоматизированного микротомы LEICA RM 2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany).

Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Phenix Phmias 3.0). Производилась оценка следующих морфометрических показателей гепатобиоптатов: количество двуядерных клеток (‰), количество дистрофически измененных клеток (‰), митотический индекс (МИ, ‰), площадь гепатоцита (мкм^2), площадь ядра (мкм^2), площадь цитоплазмы (мкм^2) и ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ).

Статистическая обработка. Полученные результаты обрабатывали на основании принципов вариационной статистики. Выборки не подчинялись закону нормального распределения, поэтому использовали непараметрические критерии: медиана (Me) и 25-й, 75-й квартиль (Q1; Q3). Для выявления различий количественных признаков двух независимых выборок использовали непараметрический двусторонний критерий Манна-Уитни, в двух зависимых выборках – критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ использовали для установления взаимосвязей между параметрами (критерий Спирмена).

Для объективной оценки клинической ценности лабораторного теста использовали ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) с расчетом

диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и площади под ROC кривой (AUC).

Обработку результатов проводили с использованием компьютерной статистической программы Statistica версия 10.0 (Dell (StatSoft), USA). Для решения графических задач использовали пакет EXCEL 2007 (Windows 7: Home Premium, Microsoft, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке результатов гематологического исследования реципиентов в периоперационном периоде были установлены следующие изменения после ОТП: анемия, лейкоцитоз и тромбоцитопения гипердеструктивного типа, которая прослеживалась как до операции, так и в посттрансплантационном периоде.

Оценка изменения уровня PLT у реципиентов в первые 10 дней после ОТП позволяет считать, что характер изменений уровня тромбоцитов является показателем, отражающим состояния трансплантата. Критическое снижение PLT: cut-off более 41% от исходного уровня (ДЧ=82, ДС=91, AUC=0,81) на 3 сутки относительно дооперационных значений и резкое повышение более 40% (ДЧ=65, ДС=72, AUC=0,66) к 10-ым суткам позволяет прогнозировать дисфункцию трансплантата (рис. 2).

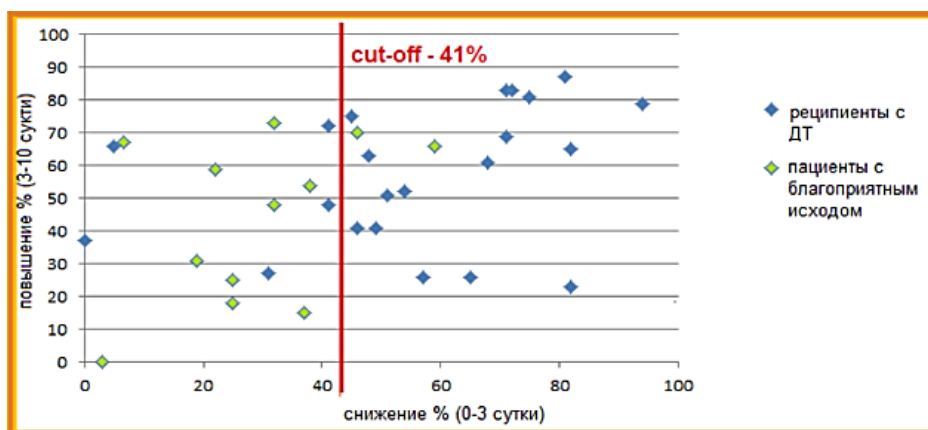


Рисунок 2 – Динамические изменения количества тромбоцитов у реципиентов с дисфункцией трансплантата и с благоприятным исходом

Изменение количества тромбоцитов сопровождалось снижением их агрегационной способности на 30% под влиянием АДФ. Вместе с тем, оценивая динамические изменения количества тромбоцитов, стоит обратить внимание на повышение на 3 сутки расчетных гематологических индексов нейтрофилы/лимфоциты (NLR), тромбоциты/лимфоциты (PLR), средний объем тромбоцитов/тромбоциты (MPV/PLT) в группе с ДТ, что, скорее всего, связано с воспалительным ответом и ИПР при ОТП.

Наряду с параметрами клинического анализа периферической крови были исследованы АЛТ, АСТ, билирубин, альбумин и МНО. На этом основании выявили, что ранний посттрансплантационный период у реципиентов с ДТ характеризуется синдромом печеночно-клеточной недостаточности и цитолитическим синдромом. Однако значения АЛТ и АСТ не превышали 1500 МЕ/мл ни на 3 сутки, ни на 10 сутки, что свидетельствует о недостаточной чувствительности данных параметров как ключевых маркеров, определяющих дисфункцию трансплантата (рис. 3), как это считали некоторые авторы (Neves D. B. et al., 2016).

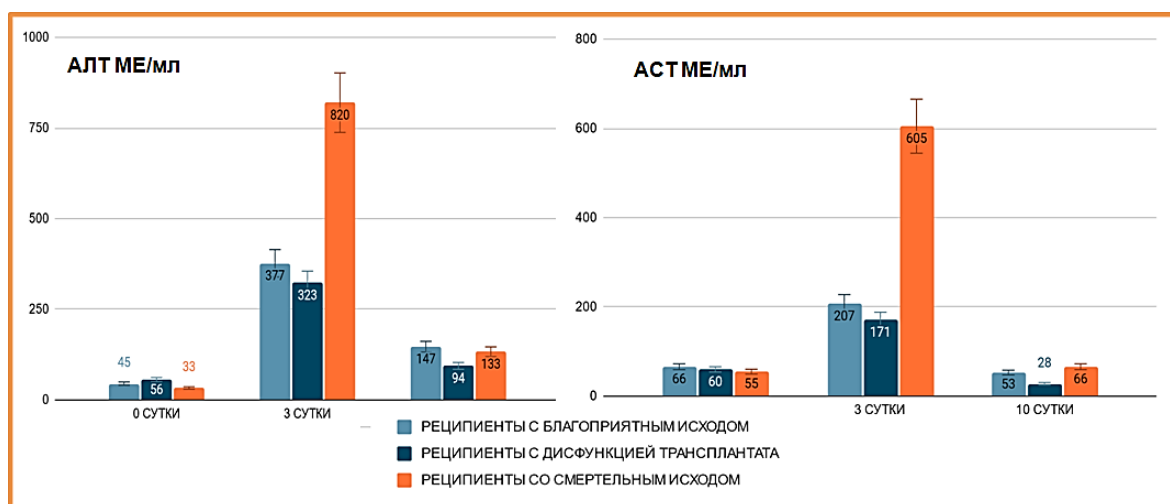


Рисунок 3 – Изменения биохимических показателей 0-3-10 сутки

На основании существующих противоречивых данных о иммунологических механизмах повреждения печени при трансплантации, нами была впервые проведена оценка цитокинового профиля пациентов в ЛО и реципиентов после ОТП.

У реципиентов до трансплантации было выявлено снижение уровня PDGF в 1,4 раза ($p < 0,05$) и повышение концентрации GM-CSF в 44 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$). Так же было установлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов – IL-6, IL-8, обусловливаемое глубоким и необратимым повреждением паренхимы печени. Снижение концентрации BDNF, возможно, связано с энцефалопатией, развившейся при тяжелой печеночной недостаточности. У реципиентов после ОТП было выявлено снижение уровня как про-, так и противовоспалительных цитокинов — IL-1RA, IL-10, IL-4, IL-12, LIF, MIP-alpha, VEGF, BDNF (рис. 4). Указанные сдвиги связаны с иммунодепрессией, а также отражают и развивающиеся в посттрансплантационном периоде нарушения. Так, низкие значения VEGF связаны с эндотелиальной дисфункцией в результате ИПП.

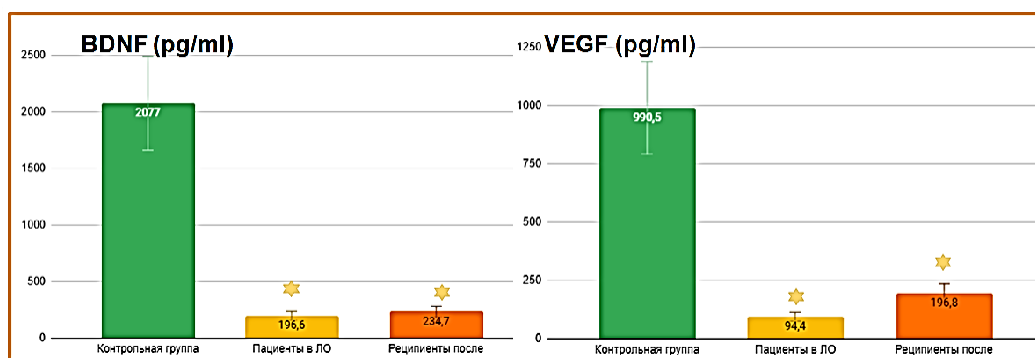


Рисунок 4 – Концентрации VEGF и BDNF у реципиентов в ЛО и после ОТП (пг/мл)

Проведя анализ цитокинового статуса в зависимости от исхода ОТП, достоверные различия между группами пациентов с ДТ и с благоприятным исходом были выявлены по уровню IL-8. ROC-анализ выявил высокие значения ДС и ДЧ метода, что свидетельствует о достаточной клинической ценности и возможности использования его в клинической практике для оценки функции трансплантата после ОТП (рис. 5).

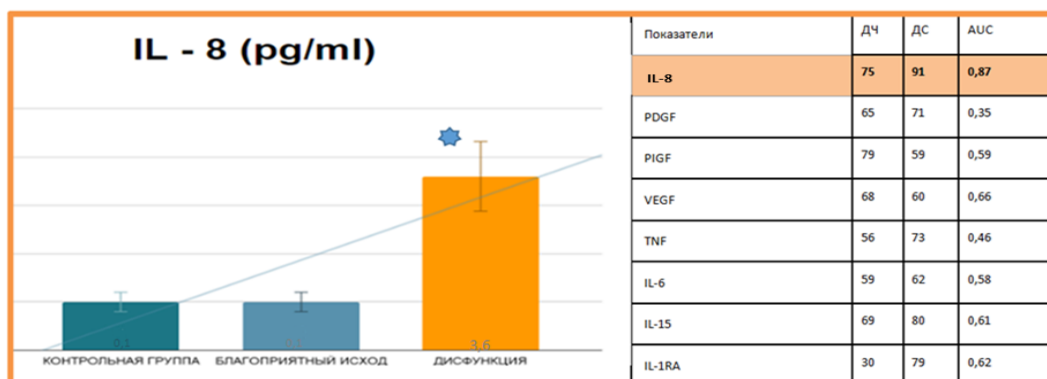


Рисунок 5 – Концентрация интерлейкин-8 у реципиентов печени (пг/мл)

В процессе проведенного исследования нами было изучено 60 лабораторных параметров пациентов до и после трансплантации печени. Оценив клиническую информативность тестов, нами были выделены наиболее ценные маркеры, которые в сочетании уже с используемыми параметрами и шкалами смогли бы повысить эффективность лабораторного мониторинга. Таким образом, нами был разработан алгоритм, который мы рекомендуем включать в рутинные обследования пациентов до и после трансплантации для диагностики и прогнозирования ДТ (рис. 6).

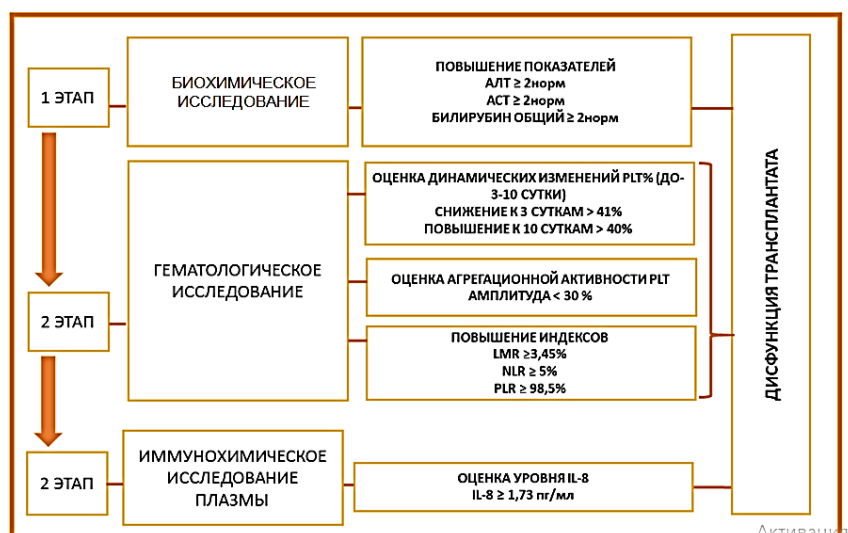


Рисунок 6 – Алгоритм лабораторного мониторинга для оценки функции трансплантата печени

Установление новых патогенетических механизмов ДТ вызвало желание разработать способ патогенетического лечения. Проанализировав полученные

ранее результаты клинического исследования и данные литературы, нами была рассмотрена возможность коррекции фармакологическими средствами, действие которых было направлено на разные звенья патогенеза данного осложнения.

При ДТ кроме воспалительного ответа в результате ИПП происходит одновременное снижение количества тромбоцитов и уменьшение массы функционирующих гепатоцитов, а оставшиеся клетки испытывают энергодефицит на фоне длительной гипоксии и дисциркуляторных нарушений. При этом осуществить полноценный адаптационный рост без адекватного пластического и энергетического обеспечения невозможно в сложившейся ситуации. Поэтому при выборе препарата для стимуляции регенерации печени мы руководствовались его метаболическим потенциалом.

Одним из средств с известными антигипоксантами и антиоксидантными свойствами является цитофлавин, компоненты которого активно участвуют в цикле трикарбоновых кислот (Доровских В. А. и др., 2017). Кроме того, в клиническом исследовании нами была выявлена способность данного препарата оказывать корригирующее влияние на агрегационную способность тромбоцитов.

Поскольку апробацию препарата было невозможно провести в клиническом исследовании, а экспериментальной модели ДТ не существует, то нами была рассмотрена возможность в качестве первого этапа оценить влияние препарата на печень с использованием модели адаптивного роста после оперативного повреждения в условиях инициированной регенерации ЧГ. Кроме того, ее применение считается актуальным для клинических сценариев, в которых количество функционирующей ткани является ограничивающим фактором.

В ходе экспериментального исследования нами были выявлены увеличение МИ и снижение уровня гепатоцитов с дистрофией, что сопровождается изменением баланса факторов роста с разнонаправленным действием на регенерацию печени. Данные результаты свидетельствуют о положительном влиянии цитофлавина на восстановительные процессы в печени.

С одной стороны, это было обусловлено стимуляцией компонентами цитофлавина энергетического обмена, что усилило клеточную и внутриклеточную регенерацию. Гипертрофия проявлялась увеличением площади цитоплазмы и ядра гепатоцитов. Клеточная регенерация характеризовалась увеличением количества митозов на 3 сутки после ЧГ. Вместе с тем наблюдалось выраженное снижение дистрофически измененных клеток. Все вышеописанные изменения были на фоне сохраненной архитектоники органа (рис. 7).

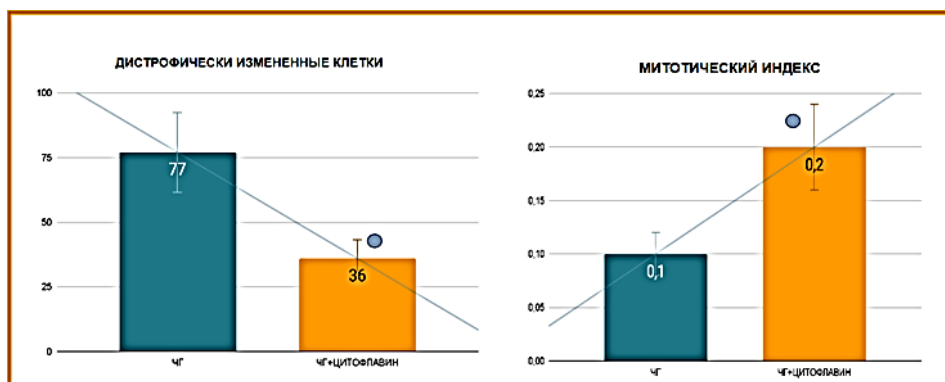


Рисунок 7 – Митотическая активность и число дистрофически измененных гепатоцитов у лабораторных животных после ЧГ на 3 сутки (%)

С другой стороны, за счет действия препарата на рецепторы SUCNR1, расположенные на тромбоцитах и звездчатых клетках. В результате взаимодействия SUCNR1 с сукцинатом происходила активация тромбоцитов, которые самостоятельно начинали секретировать HGF. Вместе с тем активированные тромбоциты взаимодействовали с HSC, подавляя продукцию TGF из звездчатых клеток. Таким образом, увеличение уровня основного митогена гепатоцитов HGF и снижение концентрации TGF, который отвечает за ингибирование восстановительных процессов в печени, приводило к улучшению восстановительных процессов в печени после ЧГ (рис. 8).

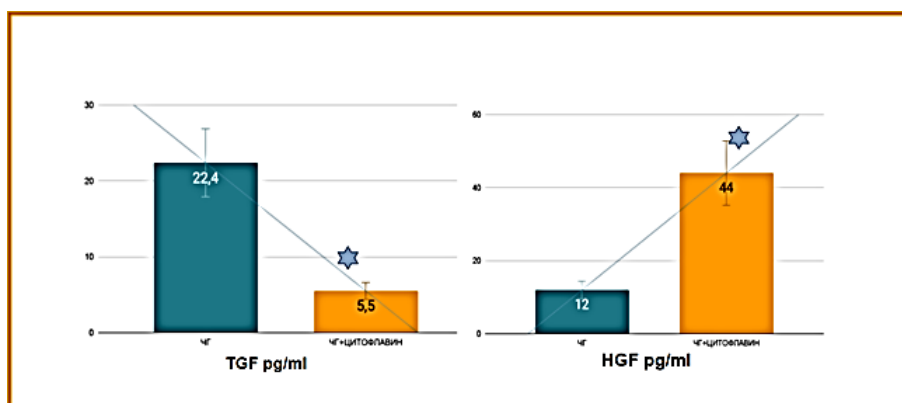


Рисунок 8 – Концентрации гепатоцитарного и трансформирующего факторов роста в плазме крови лабораторных животных на 3 после ЧГ (пг/мл)

На основании данных литературы и проведенных исследований, нами были сформулированы основные патогенетические пути влияния цитофлавина на состояние печени (рис. 9).



Рисунок 9 – Механизмы влияния препарата цитофлавин на восстановительные процессы в печени после частичной гепатэктомии

Проанализировав морфологические и лабораторные данные, можно заключить об эффективности препарата «Цитофлавин» в качестве стимулятора адаптивного роста после повреждения печени. Вместе с тем одним из главных критериев для апробации фармакологического средства в клинической практике у пациентов после ОТП является его совместимость с основным иммуносупрессивным препаратом (такролимусом), который назначается всем

пациентам в посттрансплантационном периоде. Используя онлайн сервис <https://checkmedicament.tk/>, мы оценили совместимость этих препаратов. В результате негативных взаимодействий между ними обнаружено не было. Поэтому мы считаем возможным в дальнейшем решение вопроса о применении цитофлавина в клинической практике для коррекции дисфункции трансплантата печени.

Объединив выявленные новые патогенетические механизмы, влияющие на развитие ДТ, с уже имеющимися литературными данными клинических и экспериментальных исследований, мы представили обобщенную схему патогенеза дисфункции трансплантата печени (рис. 10).



Рисунок 10 – Патогенез развития дисфункции трансплантата после ортотопической трансплантации печени

Таким образом, успехи в развитии концепции патогенеза, лабораторного мониторинга помогут своевременно стратифицировать пациентов с дисфункцией трансплантата и назначить соответствующее лечение, что в дальнейшем снизит риск ретрансплантации или смерти и увеличит эффективность трансплантационной помощи.

ВЫВОДЫ

1. Дисфункция трансплантата печени сопровождается характерной тромбоцитарной реакцией, которая проявляется критическим снижением уровня тромбоцитов и их агрегационной функции и нарушением соотношения клеток и форменных элементов крови (индексы нейтрофилы/лимфоциты, тромбоциты/лимфоциты, средний объем тромбоцитов/тромбоциты) в периоперационном периоде.

2. Повышение активности АЛТ, АСТ >1500 МЕ/мл после трансплантации не может рассматриваться как бесспорный биомаркер дисфункции трансплантата печени, cut-off требует уточнений.

3. У реципиентов после трансплантации печени наблюдается цитокиновый дисбаланс, что обусловлено как особенностями течения посттрансплантационного периода у пациента, так и действием иммуносупрессивной терапии. Нарушение продукции ИЛ-8 у реципиентов можно рассматривать как один из ведущих триггеров повреждения трансплантата печени. Установлено, что для посттрансплантационного периода характерно снижение уровня плазменных факторов роста (фактор роста эндотелия сосудов, мозговой нейротрофический фактор) у реципиентов печени.

4. Разработанный алгоритм лабораторного мониторинга, основанный на определении динамических изменений количества тромбоцитов, их агрегационной функции, гематологических индексов (нейтрофилы/лимфоциты, тромбоциты /лимфоциты, средний объем тромбоцитов/тромбоциты) в ранние послеоперационные сроки и уровня интрелейкина-8 спустя 3 месяца, позволяет своевременно оценивать функцию трансплантата печени и прогнозировать развитие дисфункции трансплантата.

5. Цитофлавин стимулирует репаративные процессы в поврежденной печени посредством участия в регуляции продукции факторов роста: увеличение уровня гепатоцитарного фактора роста (HGF) и снижение содержания фиброгенного фактора – трансформирующего фактора роста (TGF- β).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установленные закономерности о иммунологических реакциях и реакциях системы крови при дисфункции трансплантата печени необходимо внедрить в учебный процесс на кафедрах патологической физиологии при изучении тем «Патофизиология печени», «Патофизиология воспаления» и в дисциплину «Клиническая лабораторная диагностика» при изучении раздела «Лабораторная диагностика болезней печени».

2. Определение количества тромбоцитов, их агрегационной функции в периоперационном периоде до операции (0 сутки), 3 и 10 сутки после трансплантации, уровня интерлейкина-8 спустя 3 месяца после ОТП рекомендуется использовать в целях лабораторного мониторинга в посттрансплантационном периоде для раннего выявления дисфункции трансплантата печени.

3. Цитофлавин необходимо использовать в разработке новых способов экспериментальной терапии болезней печени.

СПИСОК РАБОТ,

ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Модификация репаративной регенерации печени лабораторных животных после частичной гепатэктомии/ Максимова А.Ю., Базарный В.В., Валамина И.Е. [и др.]//Пермский медицинский журнал. – 2022. – Т.1 – С. 94-104.

2. Максимова А.Ю. Цитокиновый профиль реципиентов после трансплантации / Максимова А.Ю., Бессонова Е.Н., Базарный В.В. // Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2021. – Т.18.№ 2. – С. 110-116.

3. Максимова А.Ю. Прогностическое значение уровня сывороточных цитокинов в оценке осложнений после трансплантации печени // Максимова А.Ю., Бессонова Е.Н., Базарный В.В. // Трансплантология. – 2021. – Т.13.№ 1. – С. 33-40.

4. Максимова А.Ю. Оценка тромбоцитарных показателей в автоматизированном анализе крови у пациентов с циррозом печени /

Максимова А.Ю., Гаренских Н.В., Бессонова Е.Н., Базарный В.В.// Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2019. - Т.16.№ 3. – С.351-356.

5. Максимова А.Ю. Определение уровня сывороточного интерлейкина-8 у реципиентов до и после трансплантации печени / Базарный В.В., Бессонова Е.Н., Максимова А.Ю. // Сборник тезисов 9-ой научно-практической конференции с международным участием Московская трансплантология «Задачи сегодняшнего дня (к 20-летию Центра трансплантации печени НИИ СП им. Н.В. Склифосовского)». М. – 2021. – С. 53

6. Максимова А.Ю. Значение оценки тромбоцитарных показателей у пациентов с циррозом печени и у реципиентов в посттрансплантационном периоде / Базарный В.В., Бессонова Е.Н., Максимова А.Ю. // В книге: Материалы научно-практических конференций в рамках VII Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2021). М. – 2021. – С. 34

7. Максимова А.Ю. Тромбоцитарная реакция как предиктор осложнений у реципиентов печени / Базарный В.В., Бессонова Е.Н., Максимова А.Ю.// В книге: Материалы научно-практических конференций в рамках VI Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2020). М. – 2020. – С. 34.

8. Максимова А.Ю. Гематологические предикторы выживаемости пациентов после ортотопической трансплантации печени / Базарный В.В., Максимова А.Ю., Бессонова Е.Н.// В книге: Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019). М. – 2019. – С. 31-32.

9. Максимова А.Ю. Характеристика гематологических параметров у реципиентов печени / Максимова А.Ю., Базарный В.В., Бессонова Е.Н. // В сборнике: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Актуальные вопросы гематологии и трансфузиологии". Сборник тезисов. С.-Пб., 2019. – С.26.

10. Максимова А.Ю. Изменение тромбоцитарных параметров у пациентов с циррозом печени / Максимова А.Ю., Базарный В.В., Бессонова Е.Н. // В сборнике: Актуальные вопросы современной медицинской науки и

здравоохранения. Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов, IV Форума медицинских и фармацевтических вузов России «За качественное образование». Екатеринбург, 2019. – С. 92-97.

Патенты на изобретения

Патент № 2747718 РФ. Способ прогнозирования течения раннего послеоперационного периода у пациентов после трансплантации печени: 2020123841: заявл. 13.07.2020 : опубл. 13.05.2021 / Базарный В.В., Бессонова Е.Н., Максимова А.Ю.; заявитель ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. – 7с.: ил.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АСТ	– аспаргатаминотрансфераза
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
ДТ	– дисфункция трансплантата
ИИР	– ишемически-реперфузионное повреждение
ЛО	– лист ожидания
МНО	– международное нормализованное отношение
ОТП	– ортотопическая трансплантация печени
ЧГ	– частичная гепатэктомия
BDNF	– нейротрофический фактор мозга
CXCL	– хемокин
EGF	– эпидермальный фактор роста
FGF	– фактор роста фибробластов
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста
HGF	– гепатоцитарный фактор роста
IL	– интерлейкин
IL-1RA	– антагонист рецептора интерлейкина - 1
LIF	– лейкемия-ингибирующий фактор
MIP 1 alpha	– хемокин, воспалительный белок макрофагов

NGF	– фактор роста нервов
PDGF	– тромбоцитарный фактор роста
PIGF	– плацентарный фактор роста
PLT	– тромбоциты
RANTES	– хемокин
TGF-beta	– трансформирующий фактор роста
TNF-alfa	– фактор некроза опухоли
VEGF	– сосудистый фактор роста

Максимова Арина Юрьевна

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВЫХ ПОДХОДОВ
К ЛАБОРАТОРНОМУ МОНИТОРИНГУ ФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА
ПЕЧЕНИ

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета 21.2.074.03
от 16.03.2022 г. ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России

подписано в печать 17.03.2022 г. Формат 60x84 1/16. Усл.печ.л.1,0. Тираж 60 экз.
Отпечатано в типографии Студия 11,
г. Екатеринбург, ул. пр. Космонавтов, 11 Б