

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

МАКСИМОВА

Арина Юрьевна

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

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Базарный Владимир Викторович

доктор медицинских наук, доцент

Бессонова Елена Николаевна

Екатеринбург—2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)...	11
1.1. Ортотопическая трансплантация печени как метод лечения пациентов с терминальной стадией заболевания печени.....	11
1.2. Дисфункция трансплантата печени — одна из проблем современной трансплантологии.....	18
1.3. Современный взгляд на механизмы восстановления и повреждения печени.....	23
1.4. Лабораторные методы прогнозирования и диагностики дисфункции трансплантата печени.....	31
Резюме.....	36
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
2.1. Характеристика клинического исследования.....	38
2.2. Характеристика экспериментального исследования.....	42
2.3. Моделирование частичной гепатэктомии.....	45
2.4. Лабораторные исследования.....	47
2.4.1. Гематологические исследования.....	47
2.4.2. Биохимические исследования.....	48
2.4.3. Иммунохимическое исследование.....	49
2.4.4. Гистологическое исследование печени лабораторных животных.....	53
2.5. Статистическая обработка данных.....	54

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И ЦИТОКИНОВОЙ СЕТИ У РЕЦИПИЕНТОВ ПЕЧЕНИ.....	57
3.1. Динамическая оценка гематологических показателей реципиентов в день операции и после ортотопической трансплантации печени	57
3.2. Динамическая оценка биохимических показателей у реципиентов в периоперационном периоде.....	70
3.3. Изменения уровня плазменных цитокинов у реципиентов после ортотопической трансплантации печени и пациентов до трансплантации.....	74
Резюме.....	85
Глава 4. ВЛИЯНИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ.....	87
4.1. Влияние цитофлавина на морфологическое состояние печени лабораторных животных после частичной гепатэктомии.....	91
4.2. Влияние цитофлавина на гематологические параметры лабораторных животных после частичной гепатэктомии.....	97
4.3. Влияние цитофлавина иммунологические параметры лабораторных животных после частичной гепатэктомии.....	101
Резюме.....	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	116
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в экономически развитых странах ежегодно наблюдается прирост числа пациентов с хроническими заболеваниями печени различной этиологии [179]. Из них около 30% — это трудоспособное население, чаще — мужчины в возрасте от 35 до 60 лет [<https://rustransplant.com/>]. Ведущими причинами развития данных заболеваний считается алкогольное повреждение, вирусные гепатиты В, С и неалкогольный стеатогепатит (НАСГ). Длительное повреждение печени вышеуказанными факторами приводит к необратимым последствиям, а именно циррозу.

В настоящее время смертность по причине цирроза печени неуклонно растет. Существует мнение, что к 2025 году летальность от цирроза печени (ЦП) обгонит смертность от сердечно-сосудистых заболеваний [166]. При этом консервативные методы лечения ЦП на стадии декомпенсации не дают длительный положительный эффект, поэтому единственным радикальным методом лечения является ортотопическая трансплантация печени (ОТП) [4, 170]. 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 доноров с расширенными критериями (ECD-extended criteria donor), которых также называют маргинальными или субоптимальными донорами [57, 62, 113, 129, 152]. Чаще всего трансплантация органов от субоптимальных доноров связана с тяжелым течением посттрансплантационного периода. 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, ортотопической трансплантации печени подвергаются реципиенты в тяжелом состоянии. Все вышеперечисленное привело к

уменьшению летальности в листе ожидания, но в то же время оказало значительное влияние на увеличение числа осложнений в послеоперационном периоде и на снижение выживаемости после трансплантации [129, 152, 174]. Среди существующих осложнений после ОТП все чаще встречаются инфекционные, сосудистые, билиарные и дисфункция.

Многие авторы выделяют такое своеобразное осложнение, как дисфункция трансплантата (ДТ). Она встречается в 8-24% случаев и является наименее изученным посттрансплантационным осложнением [51, 59, 62, 137]. 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 [68, 137, 138]. Для решения проблемы посттрансплантационных осложнений (в том числе при ДТ, нефункционирующем трансплантате) рекомендуют повторную ОТП, которая не всегда возможна, в частности из-за дефицита донорских органов, а фармакологическая терапия осложнений также имеет ряд ограничений [63, 51].

Изложенное выше указывает на то, что отсутствие детальной патофизиологической картины посттрансплантационных осложнений при ОТП ограничивает возможности разработки новых способов полноценного восстановления функции органа и его лабораторного мониторинга.

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 [131, 149]. Бесспорно, одной из ведущих причин развития этого осложнения является ишемически-реперфузионное повреждение (ИПР) [69, 120, 176], 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 [19, 44, 54, 59, 173]. 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 исследования

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 современной системы Luminex и панели интерлейкинов, факторов роста, хемокинов. Его результаты позволили выявить наибольшее прогностическое значение уровня IL-8 при ДТ печени. Показаны динамические изменения количества тромбоцитов в периоперационном периоде у пациентов после ортотопической трансплантации печени, на основе которых был разработан способ, позволяющий прогнозировать течение посттрансплантационного периода у реципиентов после ОТП (Патент РФ № 2747718 «Способ прогнозирования течения раннего послеоперационного периода у пациентов после трансплантации печени»). Также были выявлены нарушения функциональной способности тромбоцитов у реципиентов с ДТ.

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 у больных с ДТ 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 в условиях ограниченного количества функционирующих гепатоцитов нами было проведено экспериментальное исследование на лабораторных мышах.

Для этих целей использованы современный мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ (Luminex 200) и современные методы морфометрического и статистического анализа.

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, 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 объем 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.

Глава 1.

ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Ортотопическая трансплантация печени

как метод лечения пациентов с терминальной стадией заболевания печени

Трансплантация печени уже более 50 лет является общепринятым радикальным методом лечения пациентов с декомпенсированной стадией цирроза печени различной этиологии и гепатоцеллюлярным раком. При этом она обладает высокой эффективностью. Благодаря последним достижениям в хирургии, развитию методов иммуносупрессии удалось добиться хороших краткосрочных результатов выживаемости реципиентов после трансплантации [38, 40, 122, 132]. Ортотопическая трансплантация печени — это технология, представляющая собой многоэтапное хирургическое вмешательство с удалением пораженной печени и позадипеченочного отдела полой вены у реципиента, после чего донорский орган помещается в типичную анатомическую позицию с последующей реваскуляризацией и реконструкцией желчных протоков [50, 51, 55, 117].

Донорский орган может быть получен посмертно после констатации смерти мозга или от живого донора — часть печени. Родственная пересадка печени считается вынужденной альтернативой донорства, которая имеет больше сложностей в этическом плане и на хирургическом этапе в части ограниченной массы получаемого органа. Поэтому в трансплантологии превалирует посмертное донорство.

Однако стоит отметить, что для такой категории реципиентов, как дети в условиях отсутствия детского посмертного донорства, использование классической трансплантации не считается удобным, поскольку не позволяет

трансплантировать полноразмерный орган. В результате этого в педиатрической практике применяют трансплантацию доли печени от живого родственного донора, редко — сплит-трансплантацию, которая подразумевает разделение печени умершего донора для пересадки одновременно двум и более реципиентам [11]. Алгоритм оценки качества печени для успешной операции включает:

- не более 2 вазопрессоров;
- $\text{Na} < 160$ ммоль/л;
- трансаминазы не более 2 норм;
- при УЗИ печень однородная, изэхогенная / умеренно гиперэхогенная;
- отсутствие анатомических аномалий [11].

С целью решения проблемы нехватки органов для пациентов старше 18 лет сообщество трансплантологов решило прибегнуть к использованию доноров печени с расширенными критериями отбора [38, 55, 113, 114]. На сегодняшний день оптимальным донором обычно считают пациента, удовлетворяющего следующим критериям:

- возраст до 45 лет;
- смерть от изолированной травмы черепа с интактными органами брюшной и грудной полостей;
- отсутствие стеатоза;
- отсутствие гемодинамических и биохимических нарушений на момент эксплантации;
- пребывание в РАО не более 5 дней.

К донорам с расширенными критериями относят:

- жировой гепатоз (стеатоз) более 40%;
- механические повреждения печени;
- повышенный уровень билирубина и трансаминаз;
- доноры с небьющимся сердцем;
- продолжительное время холодовой ишемии более 10 часов;
- время вторичной холодовой ишемии более 40 минут [114].

Сплит-трансплантация и традиционная трансплантация органа от субоптимального донора связаны с риском тяжелого течения посттрансплантационного периода. В связи с этим актуальной стала проблема оценки тяжести и прогнозирования течения ЦП и посттрансплантационных осложнений. В клинике Мейо (США) была разработана классификация тяжести состояния пациентов с терминальными заболеваниями печени MELD (Model for End Stage Liver Disease). Она стала активно применяться во всем мире для определения очередности выполнения ОТП. Расчет этого показателя осуществляется по формуле (Таблица 1):

$$\text{MELD} = 10 \times [0,957 \ln (\text{креатинин мкмоль/л} / 88,4)] + 0,378 \times \ln (\text{общий билирубин мкмоль/л} / 17,1) + 1,12 (\text{МНО}) + 0,643 \quad (1)$$

Таблица 1 — Корреляция MELD и выживаемость больных

MELD	Классификация	Периоды, мес.	Выживаемость %
10 баллов	Умеренная	3	74%
		6	66%
		12	59%
20 баллов	Тяжелая	3	52%
		6	40%
		12	30%
30 баллов	Критическая	3	11%
		6	5%
		12	2%

Таким образом, ОТП подвергаются реципиенты в более тяжелом состоянии, что в итоге привело к уменьшению смертности в листе ожидания и оказало значительное влияние на развитие частоты осложнений и выживаемости после трансплантации [92]. Поскольку современные технологии в трансплантологии позволили увеличить продолжительность жизни пациентов и снизить смертность в листе ожидания, то в настоящее время внимание врачей сосредоточилось на сохранении функционирующего трансплантата печени после операции.

Во многом судьба трансплантата зависит от посттрансплантационных осложнений. Этиология возникновения их разнообразна, но в основном выделяют две большие группы — хирургические и нехирургические. К первой группе относят билиарные осложнения (БО) — желчеистечение, стриктуры желчных путей (5-30%), сосудистые осложнения — тромбоз, стеноз печеночной артерии, печеночной вены, портальной вены (3,8-20,4%).

Лидирующее по частоте положение среди всех хирургических осложнений занимает билиарная патология, которая связана с длительным дорогостоящим лечением, а порой и со смертью реципиента. Одной из основных причин развития БО является техническая погрешность в наложении анастомоза, что может привести к желчеистечению в брюшную полость, билиарной обструкции, абсцессу желчевыводящих путей [13, 102]. Кроме того, влияет и качество трансплантата, который может содержать камни в холедохе, что становится причиной непроходимости или острого холангита. Данное патологическое состояние встречается в 84% случаев после трансплантации от живого донора и в 16% — при трансплантации трупной печени [66]. Оно может проявляться как в ранние (1-2 месяца после ОТП), так и в поздние послеоперационные сроки (позднее первого полугодия) [1, 66]. Еще на этапе пребывания в стационаре у 5% реципиентов выявляют желчеистечение в результате несостоятельности билиарного анастомоза, что приводит к образованию билиомы (околопеченочное скопление желчи). Как в ранние, так и в поздние сроки у реципиентов может встречаться билиарная обструкция, вызванная стенозом в месте анастомоза в результате фиброзной пролиферации ткани [102]. Диагностика вышеописанных состояний не составляет труда и сводится к одному методу — холангиографии, которая может быть прямой (с введением контраста) и МР-холангиография (магнитно-резонансная холангиография) [66].

Далее следуют сосудистые осложнения, а именно: тромбоз печеночной артерии (ПА) и воротной вены (ВВ), стеноз печеночной артерии, синдром обкрадывания селезеночной артерии. Данные патологические состояния имеют многофакторную этиологию. Однако ведущей причиной также остаются

технические аспекты, которые включают гематомы, частичные надрывы интимы донорского органа, выбор метода артериальной/венозной реконструкции, качество стенки и анатомические особенности артериального/венозного сосуда донора и реципиента, наличием порто-кавальных шунтов, дооперационных тромбозов [25].

Все осложнения, сопряженные с нарушением кровотока в печеночной артерии, могут вызывать ишемию желчевыводящих путей. Это обусловлено тем, что желчные протоки кровоснабжаются исключительно из сети ПА. Тромбоз печеночной артерии является наиболее грозным осложнением и проявляется как в первые часы, так и в первые месяцы после трансплантации.

Необычным и очень редким осложнением считается псевдоаневризма печени. Она связана с ангиопластикой в месте анастомоза, биопсией трансплантата. Клинически никак не проявляется, а разрыв может привести к гиповолемическому шоку [102]. Синдром обкрадывания селезеночной артерии приводит к снижению артериального кровотока печени. Чаще встречается у пациентов с ранее существовавшей портальной гипертензией, большими портокавальными шунтами и значительной спленомегалией.

Осложнения в воротной вене — это тромбоз или стеноз. Оба они развиваются в месте анастомоза и клинически могут проявляться как портальной гипертензией, так и печеночной недостаточностью [102].

В литературе активно обсуждался вопрос о значении ожирения в развитии сосудистых осложнений после ОТП. В одном обзоре, включавшем шесть ретроспективных когортных исследований, было показано, что частота сосудистых осложнений была одинаковой в группе с высоким индексом массы тела (ИМТ) и контрольной группе, как и выживаемость пациентов, выживаемость трансплантата и частота осложнений со стороны желчевыводящих путей. При анализе групп, когда ИМТ был скорректирован с учетом асцита, различий также обнаружено не было. Однако у реципиентов, основным заболеванием которых было алкогольное заболевание печени, с ИМТ ≥ 30 кг/м² частота сосудистых осложнений была выше, чем у реципиентов с ИМТ < 30 кг/м² [165]. То есть

высокий ИМТ до трансплантации не является фактором риска выживания пациентов и осложнений со стороны желчевыводящих путей после ОТП.

Ко второй группе нехирургических осложнений причисляют инфекционные: бактериальные (энтеробактерии, неферментирующие бактерии, энтерококки, золотистый стафилококк), вирусные (вирусный гепатит В, С, Е, Д, цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барр), грибковые (грибы рода *Aspergillus*, *Candida* и другие) осложнения и микстинфекции (18-28%), ДТ (8-24%) и отторжение трансплантата (5-30%) [24, 38, 112]. Любой инфекционный патоген может вызвать осложнение у реципиента после ОТП.

Для повышения выживаемости реципиента и трансплантата всем пациентам после ОТП назначают пожизненную иммуносупрессивную терапию, которая включает ингибиторы кальциневрина (такролимус), кортикостероиды. Однако в 20% случаях со временем может развиваться состояние иммунотолерантности, позволяющее снизить дозы препаратов или полностью отменить их [40]. Основной целью данного медикаментозного лечения является предупреждение развития отторжения аллотрансплантата за счет снижения пролиферации и цитотоксического действия Т-клеток, а также подавления выработки антител В-клетками.

При этом одним из неизбежных побочных эффектов используемой терапии является развитие инфекционных осложнений. Они могут проявляться в ближайшие сроки в виде госпитальных инфекций, возбудителями которых являются бактерии и дрожжи, в ранние сроки — инфекции, полученные с донорским органом, а именно вирусные инфекции, в поздние сроки — внебольничные инфекции [24]. В первый месяц после трансплантации чаще возникают внутрибрюшные бактериальные инфекции. Следующим органом, страдающим от инфекционных осложнений, являются легкие. Ранее была установлена прямая взаимосвязь между развитием пневмонии и длительностью нахождения на искусственной вентиляции легких [24]. Далее встречаются хирургические раневые инфекции и инфекции мочевыводящих путей. Кроме того, у ранее неинфицированного реципиента в более поздние сроки могут быть

выявлены цитомегаловирус, гепатит Е, которые поступили вместе с донорским органом. Стоит отметить, что часто после ОТП возникает рецидив основного заболевания, например, гепатита В и С [31].

Особую озабоченность трансплантологов вызывает рост распространенности инвазивных грибковых заболеваний, особенно среди наиболее тяжелых больных с декомпенсированным ЦП, острой или хронической печеночной недостаточностью, тяжелой иммунодепрессией. У таких пациентов развитие микоза часто усугубляет дисфункцию печени и внепеченочных органов, требует тщательного обследования перед операцией, а после трансплантации — противогрибковой профилактики. Развитие микоза в ранние сроки после ОТП значительно ухудшает выживаемость трансплантата и пациента [89].

Однако даже на фоне персонифицированной иммуносупрессивной терапии может развиваться реакция «трансплантат против хозяина», что представляет угрозу для жизни пациента. Встречается острое клеточное отторжение и хроническое. Первое происходит в течение первого месяца после ОТП и потенциально обратимо. Симптомы включают лихорадку, желтуху и повышение активности трансаминаз и лейкоцитоз. Хроническое отторжение обычно возникает через несколько месяцев или более. Пациенты с данной патологией имеют лабораторные признаки холестаза и характерные проявления желтухи. Для постановки диагноза необходима биопсия печени, поскольку точная интерпретация имеет решающее значение в тактике ведения реципиента [66, 120]. В настоящее время благодаря своевременной диагностике и успешному лечению в некоторых случаях получается избежать нарушение функции пересаженного органа.

Помимо уже описанных посттрансплантационных осложнений на последнем месте по частоте, но не по значимости, находятся нейротоксические осложнения — 3,6% [37]. Основной причиной развития данной патологии является прием иммуносупрессивных препаратов, а именно такролимуса. Механизмы действия этого фармакологического средства на клетки нервной

системы до конца не изучены. Клинически неврологические осложнения могут проявляться энцефалопатией и/или полинейропатией [83].

Вместе с тем на фоне развившихся после трансплантации органа осложнений, которые приводят к повреждению паренхимы печени, зачастую развивается такое патологическое состояние, как сердечно-сосудистая дисфункция. Большое внимание уделяют этой дисфункции из-за сложной и не своевременной диагностики, поскольку ее клинические проявления перекрываются клиникой цирроза печени и в состоянии покоя плохо видны [102]. Также встречается почечная дисфункция, посттрансплантационная системная гипертензия, остеопороз, посттрансплантационный сахарный диабет, который увеличивает риск развития инфекционных и сердечно-сосудистых осложнений, злокачественные новообразования [45].

Все же из всех перечисленных посттрансплантационных осложнений особое внимание заслуживает дисфункция трансплантата печени, поскольку именно это патологическое состояние вызывает споры среди гастроэнтерологов, гепатологов и трансплантологов из-за отсутствия общепринятой номенклатуры и диагностических критериев.

1.2 Дисфункция трансплантата печени — одна из проблем современной трансплантологии

Дисфункция трансплантата является одним из наиболее сложных и серьезных осложнений после ОТП. Она характеризуется совокупностью патологических изменений в паренхиме печени и уменьшением объема функционирующей ткани, которые приводят к нарушению функции донорского органа [87, 91]. Поскольку опыт наблюдений за этим осложнением невелик, среди клиницистов и исследователей имеются некоторые разногласия в терминологии и подходах к диагностике ДТ. В попытках прийти к единому пониманию мы провели комплексный обзор литературы. В 2006 году Moreno R. и Berenguer M. была предложена классификация посттрансплантационных осложнений, согласно

которой ДТ — это термин, который объединяет в себе несколько состояний, не связанных друг с другом: ранняя дисфункция, первично нефункционирующий трансплантат, рецидив вирусной инфекции, острое клеточное отторжение. Позже, в 2010 году, Olthoff с соавторами высказали другое мнение о том, что дисфункция аллотрансплантата — это патологическое состояние, которое имеет несколько степеней тяжести: первая — это обратимая дисфункция, вторая — нефункционирующий трансплантат, то есть необратимая [22, 51]. При этом нефункционирующий трансплантат представляет собой тяжелое состояние, которое сопровождается коагулопатией или фибринолизом, ацидозом, гиперкалиемией, олигурией или анурией, гипогликемией и быстрым повышением уровня трансаминаз. Кроме того, характеризуется массивным некрозом гепатоцитов, приводящим в итоге к ретрансплантации или смерти [138], в то время, как обратимая дисфункция имеет лишь преходящие клинические и лабораторные изменения.

Отсутствие в медицинской литературе согласованного определения понятий «дисфункция трансплантата», «ранняя дисфункция трансплантата», «нефункционирующий трансплантат» стало причиной неоднозначных подходов к трактовке лабораторных критериев, что усложняет проведение эффективного лабораторного мониторинга за реципиентом [131]. На сегодняшний день в качестве маркеров дисфункции трансплантата были предложены показатели, отражающие функцию печени (функциональные пробы), такие как: трансаминазы, факторы свертывания крови, билирубин, аммиак и / или лактат [67, 131]. Ряд авторов утверждали, что ранняя ДТ печени характеризуется наличием хотя бы одной из переменных: билирубин = 10 мг/мл, международное нормализованное отношение (МНО) = 1,6 в течение первых семи послеоперационных дней и аминотрансферазы > 2000 МЕ / л в первую неделю послеоперационного периода [131, 138]. Однако другие авторы высказали мнение о том, что такие значения показателей более характерны для глубокого и длительного повреждения печени при первично нефункционирующем трансплантате [31, 138]. Возникшие разногласия среди гепатологов заставили

исследователей обратить внимание на этиологию и патогенез дисфункции трансплантата.

В настоящее время ДТ описывается как многофакторный процесс, связанный с исходным статусом донора и реципиента, состоянием и размером трансплантата, продолжительностью и травматичностью самой хирургической манипуляции, длительностью ишемии и реперфузии, иммуносупрессивной терапией [100, 137].

Вместе с тем клинический опыт выявил основной этиологический фактор, способствующий возникновению ДТ, — это ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП), которое активирует ряд цитокиновых реакций [20, 60, 91, 138]. Хорошо известно, что ИРП поражает все паренхиматозные клетки печени, а именно гепатоциты, синусоидальные эндотелиальные клетки печени (LESC) и холангиоциты.

Во время ишемической фазы повреждения нехватка субстратов и кислорода приводит к дефициту АТФ и к продукции активных форм кислорода, которые затем вызывают окислительный стресс и закрепляют повреждение паренхимы печени. Как это ни парадоксально, когда кровоток в печени восстанавливается, доступность кислорода еще больше усиливает окислительный стресс, увеличивая повреждение донорской печени [94, 117].

В ранней фазе реперфузии происходит увеличение кровенаполнением микрососудов и повышение внутрикапиллярного гидростатического давления, что приводит к избыточной экстравазации жидкости, развитию отека и притока инфильтрата воспалительных клеток, включающих нейтрофилы и макрофаги [167]. Также во время реперфузии пуриновые метаболиты вымываются из клетки, за счет чего теряется необходимый субстрат для восстановления АТФ, что с новой силой инициирует гипоксическое повреждение гепатоцитов [117]. Таким образом, возникающие в результате биохимические и морфологические изменения со стойкой гипоксией вызывают образование свободных радикалов, которые повреждают эндотелиальные клетки, гепатоциты и активируют клетки Купфера. Вместе с тем активированные клетки Купфера также начинают

высвободить активные формы кислорода, включая анион супероксида и перекись водорода, которые усиливают окислительный стресс, что пролонгирует повреждение паренхимы печени. После запускается последующий каскад событий, включая последовательность провоспалительных медиаторов, приводящую к рекрутированию активированных лейкоцитов, нейтрофилов и значительному повреждению печени. Считается, что первыми в цитокиновый каскад включаются IL-12, IL-23, экспрессируемые звездчатыми и купферовскими клетками, которые были активированы на этапе ишемии [177]. Данные цитокины усиливают воспалительную реакцию за счет увеличения миграции лимфоцитов в очаг и стимуляции высвобождения из собственных клеток печени наиболее важного медиатора воспалительного ответа — фактора некроза опухоли (TNF- α). TNF- α способствует высвобождению из гепатоцитов и клеток Купфера хемоаттрактантов нейтрофилов, особенно хемокинов CXCL. Вместе с тем данный фактор роста активирует молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1 и P-selectin на эндотелиальных клетках сосудов [94].

Не существует четких границ во времени, отделяющих раннюю фазу ИРП от поздней. С точки зрения происходящих процессов внутри трансплантата поздняя фаза ИРП определяется рекрутированием нейтрофилов в трансплантат печени и повреждением гепатоцитов через протеазы. Особое внимание заслуживает не только активация клеток, продуцирующих необходимые хемокины, но и молекулы адгезии, экспрессируемые на поверхности эндотелиальных клеток и нейтрофилов, поскольку эти молекулы ответственны за трансмиграцию клеток из микроциркуляторного русла в печень. P-селектин, синтезируемый LESC, и L-селектин, экспрессируемый на поверхности нейтрофилов, обеспечивают начальный захват клеток крови. Позднее включаются более прочные адгезивные взаимодействия между интегринами — это молекулы нейтрофилов и ICAM-1 и VCAM-1, экспрессируемые на эндотелиальных клетках, что обуславливает полную остановку и миграцию в паренхиму печени [94] (Рисунок 1).

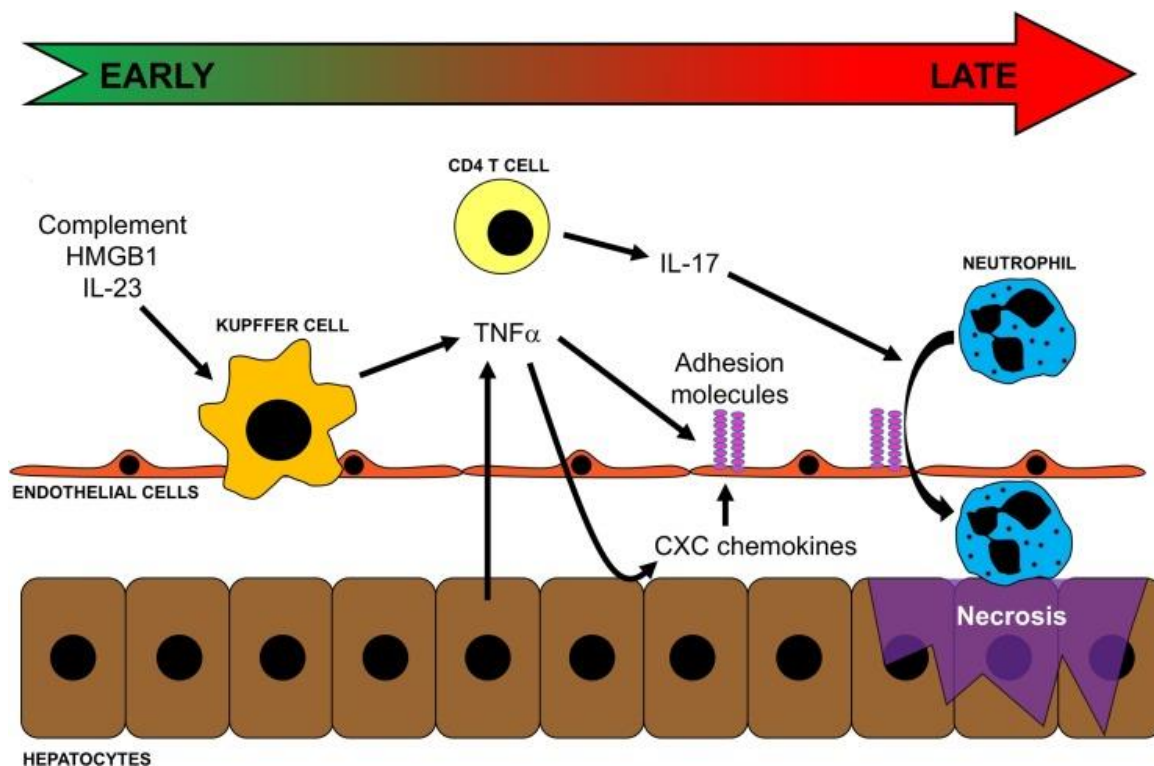


Рисунок 1 — Формирование воспалительного ответа в результате ишемически-реперфузионного повреждения печени (цитируется по Konishi T. et al., 2017) (endothelial cells — эндотелиальные клетки, hepatocytes — гепатоциты, neutrophil — нейтрофил, Kupffer cell — клетка Купфера, CD4 T cell — Т-лимфоциты, necrosis — некроз, adhesion molecules — молекулы адгезии, CXC chemokines — хемокины, TNF alpha — фактор некроза опухоли, IL-17 — интерлейкин)

Описанные выше действующие механизмы подтверждаются патогистологическими данными, которые включают острый воспалительный инфильтрат, гепатоцеллюлярное повреждение, такое как коагуляционный некроз, которые характеризуют дисфункцию трансплантата [117, 176].

Таким образом, возникающие в результате биохимические и морфологические изменения со стойкой гипоксией вызывают образование активных форм кислорода, свободных радикалов, что усиливает митохондриальную дисфункцию. Данное состояние является стимулом как для апоптоза, так и для некроза в зависимости от интенсивности процесса, но для ИРП окончательным способом гибели гепатоцитов является некроз.

Стоит отметить, что ИПП-повреждению подвержены все реципиенты, однако в одном случае мы наблюдаем благоприятное течение послеоперационного периода, а в другом случае развивается дисфункция трансплантата. Возможно, это связано с нарушением баланса между процессами повреждения и восстановления печени. Понимание возникающих в ответ на ИПП репаративных и регенеративных механизмов печени остается неполным и требует дальнейшего изучения этой проблематики.

1.3 Современный взгляд на механизмы восстановления и повреждения печени

Регенерация — это воспроизведение, восстановление различных структурных элементов взамен утраченных [15, 30]. Она является важнейшим, фундаментальным и универсальным свойством живого организма, позволяющим поддерживать необходимый уровень его функциональной активности. На сегодняшний день выделяют два вида регенерации: физиологическую и репаративную, возникающую в результате действия различных повреждающих агентов [5, 28, 30, 33, 69, 176].

Если физиологической регенерацией обладают многие ткани, то с точки зрения репаративной регенерации печень является уникальным органом, способным полностью восстанавливать за короткий срок до 70% утраченного объема [67, 84]. Эта исключительная способность печени является сложным и хорошо организованным процессом, регуляция которого осуществляется на всех биологических уровнях: внутриклеточном, межклеточном (непосредственных контактов клеток, факторы роста, цитокины), внутритканевом (продукты тканевого распада), организменном (гормональном, иммунном, нервном) [30, 33, 65, 79, 109, 110].

Выделяют три основные регенераторные фазы: фаза инициации или прайминга, фаза пролиферации и фаза завершения, которые наблюдаются от первых 5 минут до 5-7 дней [73, 106, 110, 155, 171]. В ходе первой фазы, которая

запускается в первые часы после повреждения, происходит активация всех сигнальных путей. Далее, через 5 часов после резекции начинается активная пролиферация клеток, опосредованная одновременно цитокинами и факторами роста. Она может быть подразделена на два периода: первый, в течение которого наблюдается пролиферация гепатоцитов и холангиоцитов, второй — пролиферация звездчатых клеток (HSC), эндотелиальных клеток и клеток Купфера [99, 109, 111].

Гепатоциты являются первыми клетками, которые входят в клеточный цикл и подвергаются пролиферации [10, 73, 110, 171]. Основным их митогеном считается гепатоцитарный фактор роста (HGF), который присутствует в матриксе печени в достаточно больших количествах [142]. Благодаря ремоделированию матрикса после частичной гепатэктомии и активизации урокиназой данный фактор становится доступным гепатоцитам и вводит их в клеточный цикл за счет сигнального пути HGF/Met (тирозин-протеинкиназный). После истощения запасов HGF начинают синтезировать клетки печени [65, 84, 100, 109, 155, 159].

Перисинусоидальные клетки (клетки Ито, звездчатые клетки HSC-hepatic stellate cells) являются одним из главных источников данного фактора роста [61, 64, 171]. HSC — это клетки миофибробластного происхождения, которые располагаются в пространстве Диссе и в спокойном состоянии накапливают витамин А [79, 82]. Под действием тромбоцитарного фактора роста (PDGF), который синтезируется гепатоцитами, звездчатые клетки переходят в активное состояние и начинают продуцировать межклеточный матрикс и ряд цитокинов, участвующих как в фазе инициации (HGF), так и в завершении процесса регенерации (TGF- β) [64, 79, 109].

Синусоидальные эндотелиальные клетки печени также являются источником HGF и других цитокинов: эпидермальный фактор роста (EGF), связывающийся с гепарином (НВ EGF), IL-6, IL-1 [96]. Эти клетки активируются через VEGFR1 в ответ на сосудистый фактор роста (VEGF), фактор роста фибробластов (FGF-1) и ангиопоэтин, продуцируемый гепатоцитами, тем самым образуя сеть взаимно поддерживаемой пролиферации [96, 107, 155].

Трансформирующий фактор роста (TGF- β) также является митогеном эндотелиальных клеток, который синтезируется гепатоцитами во время регенерации. Кроме того, он усиливает эффекты прямых активаторов (HGF, TNF). Помимо классических путей активации LSEC существует мнение, что гемодинамические нарушения после частичной гепатэктомии приводят к увеличению портального кровотока, вследствие чего происходит турбулентное движение в сосудах, которое механически воздействует на эндотелиальные клетки печени. В результате последние активируются и начинают синтезировать вышеуказанные цитокины [106, 155]. Повышенное напряжение, которое испытывают на себе LSEC, способствует выделению оксид азота (NO). Последний усиливает чувствительность гепатоцитов к HGF [69, 82, 96, 106].

В то же время из-за увеличения портального давления липополисахариды, продуцируемые кишечными бактериями, попадают в кровоток вместе с комплиментами (C3a, C5a) и в последующем связываются со своими рецепторами на поверхности клетки Купфера [109, 159, 171]. В результате происходит стимуляция сигнального пути ядерного фактора KB (NF-KB), что приводит к транскрипции фактора некроза опухоли и интерлейкина-6, который способствует оптимизации процессов ранней стадии регенерации печени. Фактор некроза опухоли, высвободившись из клетки Купфера, связывается с рецепторами, находящимися на поверхности гепатоцитов, стимулирует стресс-активируемую протеинкиназу SAPK и запускает сигнальный путь JNK в гепатоците [171]. Интерлейкин-6 также связывается со своим рецептом на поверхности клетки и запускает сигнальный путь STAT3, что приводит к активации синтеза ДНК в гепатоцитах. Кроме того, клетки Купфера синтезируют EGF, связывающийся с гепарином (HB EGF) [84, 99].

Помимо уже перечисленных факторов роста, извне печени постоянно поступают через воротную вену члены семейства EGF и VEGF, продуцируемые внепеченочными органами, что называется «ось кишечник – печень» [99, 106, 176]. Так было установлено, что в результате частичной гепатэктомии повышенные значения адреналина и норэпинефрина стимулировали выработку

EGF из желез Бруннера. EGF имеет прямой митогенный эффект в отношении гепатоцитов, а также считается, что он уравнивает митогенным действием TGF β на начальных этапах регенерации [84].

Гипоксия печени, возникшая в результате снижения артериального кровотока из-за портальной гипертензии, является одним из сильнейших индукторов ангиогенеза, а фактор, индуцируемый гипоксией (HIF-1 α), как известно, играет важную роль в гипоксической адаптации. Но до сих пор остаются споры о влиянии гипоксии на регенерацию и о механизмах воздействия [19, 69, 99, 176].

Несмотря на большое количество уже обнаруженных сигнальных сетей, исследования цитокинов и клеток, участвующих в процессе регенерации, с каждым годом продолжают расти. Так, рядом авторов было показано, что в регуляцию восстановительных процессов вносят свой вклад не только собственные клетки печени, но также важное значение отводится тромбоцитам [43, 95, 171, 124, 129, 159]. Предполагается, что эти клетки стимулируют регенерацию через три различных механизма: прямое воздействие на гепатоциты, опосредованный эффект через коллаборацию с синусоидальными эндотелиальными клетками печени и совместный эффект с клетками Купфера. После частичной гепатэктомии в течение первых 10 минут поры синусоидальных клеток увеличиваются, и тромбоциты начинают мигрировать и накапливаться в пространстве Диссе [95, 121, 124].

Прямой контакт между гепатоцитами и тромбоцитами стимулирует высвобождение из «кровяных пластинок» факторов роста: HGF, инсулиноподобный фактор роста (IGF-1) и VEGF. Данные цитокины посредством сигнальных путей ERK 1/2 и Akt приводят к пролиферации гепатоцитов. В свою очередь, IGF-1 считается наиболее важным медиатором регенерации печени в тромбоцитах человека, так как было установлено, что HGF содержится в малом количестве [77, 91, 95, 121, 129]. Взаимодействие тромбоцитов с LSEC стимулирует активацию последних фактором VEGF и способствует секреции из них IL-6, который ускоряет синтез ДНК в гепатоцитах [96, 172]. Тромбоциты

могут вызывать регенерацию печени путем усиления функции клеток Купфера и инициации продукции TNF- α , IL-6. Также контакт с клетками Купфера вызывает активацию обеих клеток [54, 95, 159]. Наконец, взаимодействие между HSC и тромбоцитами способствует ингибированию экспрессии коллагена I типа посредством передачи сигналов цАМФ. Этот механизм основан на увеличении концентрации аденозина из-за распада АДФ и АТФ, которых много в плотных гранулах тромбоцитов [95]. В результате аденозин прикрепляется через свои рецепторы к HSC, предотвращая их активацию.

Таким образом, описанная выше сеть межклеточного взаимодействия, цитокинов, сигнальных путей опосредует вход печеночных клеток в клеточный цикл. В результате комплексное взаимодействие приводит к самовосстановлению утраченной части органа.

Однако, как стало известно позже, когда компенсаторные механизмы гепатоцитов истощены, а воздействие патологического фактора продолжается (например, хронический вирусный гепатит, неалкогольная жировая болезнь печени) или оно носило фульминантный характер, или это было массивное повреждение структуры печени (гепатэктомия более $\frac{2}{3}$ печени), то в процесс регенерации включаются стволовые клетки печени [101].

Наличие пула стволовых клеток было обнаружено у грызунов в середине 80-х годов и получило название «овальные клетки печени». Уже в 90-х годах присутствие этих клеток было показано в печени человека, и их стали называть клетки-предшественники (LPC) [71, 78]. Анатомическое расположение этих клеток предполагает, что они лежат внутри или непосредственно рядом с каналом Геринга. Клетки-предшественники характеризуются своей бипотентной способностью, они могут дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты, что подтверждается их одновременной экспрессией маркеров клеток желчных протоков (цитокератин 19, А6 и OV6) и гепатоцитов (α -фетопроtein и альбумин) [101, 104]. Чаще всего клетки обнаруживаются при тяжелом или хроническом повреждении печени. Поэтому существует мнение, что большинство

пролиферирующих клеток-предшественников представляют промежуточную стадию дифференцировки, а не собственно стволовые клетки [6, 71, 143].

Продолжая изучение стволовых клеток, другие исследователи предположили, что собственными клетками печени могут быть звездчатые клетки. Более того, маркеры стволовых клеток нестин, CD105, рецептор нейротрофина p75 (p75NTR) и лиганд c-kit были обнаружены в этих клетках [104], что позволило сделать вывод о том, что звездчатые клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки (резидентные МСК печени), из которых созревают клетки-предшественники [169], хотя их вклад в регенерацию остается предметом дискуссий.

Кроме того, предполагается внепеченочное происхождение стволовых клеток, а именно из МСК костного мозга. Возможно, эти клетки мигрируют в печень по сосудистому руслу, затем перемещаются в канальца Геринга, где под действием различных триггеров начинают дифференцироваться в гепатоциты и холангиоциты [108].

Существует еще одна гипотеза о стволовых клетках печени. В недавних исследованиях было показано, что при определенных условиях зрелые гепатоциты могут трансдифференцироваться в овальные клетки, которые, в свою очередь, обеспечивают переход в гепатоциты и / или холангиоциты [104, 163]. А также в некоторых исследованиях зрелые гепатоциты и желчные клетки проявили себя как факультативные стволовые клетки друг для друга [104]. Таким образом, все вышесказанное свидетельствует о сложности регенеративных механизмов, протекающих в печени в ответ на повреждение.

Порой наблюдается смещение баланса между регенеративными свойствами и образованием соединительной ткани в сторону последней, приводит к формированию фиброза печени. Фиброз — это патологический процесс, характеризующийся увеличением доли поврежденных гепатоцитов и избыточным отложением коллагенов, что приводит к нарушению функции печени [17, 51, 52, 53, 58, 119, 123, 173]. Главным инициатором фиброгенеза являются активированные звездчатые клетки, которые пролиферируют в миофибробласты.

После чего они начинают синтезировать коллаген I, III и фибронектин, постепенно замещая коллагены IV, VI, образуя при этом рубцовую ткань в пространстве Диссе [46, 64, 79]. На сегодняшний день описано достаточное количество путей активации звездчатых клеток [72, 79, 86, 155, 175]. Основным считается запуск пролиферации HSC под действием тромбоцитарного фактора роста (PDGF) и TGF- β . Последний синтезируется клетками Купфера после повреждения печени [72, 98, 114, 125, 175]. Также под действием гипоксической среды резидентные макрофаги способны продуцировать активные формы кислорода, которые повреждают гепатоциты и активируют HSC [79, 153].

В то же время бактериальный липополисахарид, уровень которого повышается у пациентов с фиброзом и циррозом, активирует макрофаги и звездчатые клетки за счет передачи сигналов на Toll-подобный рецептор. После HSC начинают продуцировать различные хемокины, которые усиливают миграцию нейтрофилов, лейкоцитов в печень [64].

Помимо уже перечисленных участников воспалительного ответа, немалая роль принадлежит тромбоцитам. Они имеют две амбивалентные функции, с одной стороны они усиливают регенераторные механизмы, а с другой — за счет продукции тромбоцитарного фактора роста и TGF- β активируют изолированные HSC, усугубляя фиброз [16, 23, 125].

В недавних исследованиях была продемонстрирована важная роль IL-17, IL-22, IL-33, IL-8. Поврежденные гепатоциты и LSEC высвобождают интерлейкин-33, который может действовать как на прямую, активируя звездчатые клетки, так и опосредованно, индуцируя продукцию IL-13 в резидентных макрофагах, что усиливает передачу сигналов TGF- β через IL-4R α и STAT6 в HSC, способствуя фиброзу печени. IL-17 — провоспалительный и профиброгенный цитокин, который активирует несколько путей: через STAT3 в HSC, способствуя увеличению синтеза коллагена I, и через NF- κ B клетках Купфера, в результате чего индуцируется синтез цитокинов: TGF- β , IL-1 β , IL-6 и IL-17A. Внутрипеченочный IL-8, который синтезируют макрофаги и частично гепатоциты, также способствует активации HSC [79, 123, 145, 156, 166]. Если

фактор, вызывающий фиброзный ответ, продолжает действовать, то наступает уже следующая необратимая стадия патологического процесса (Рисунок 2).

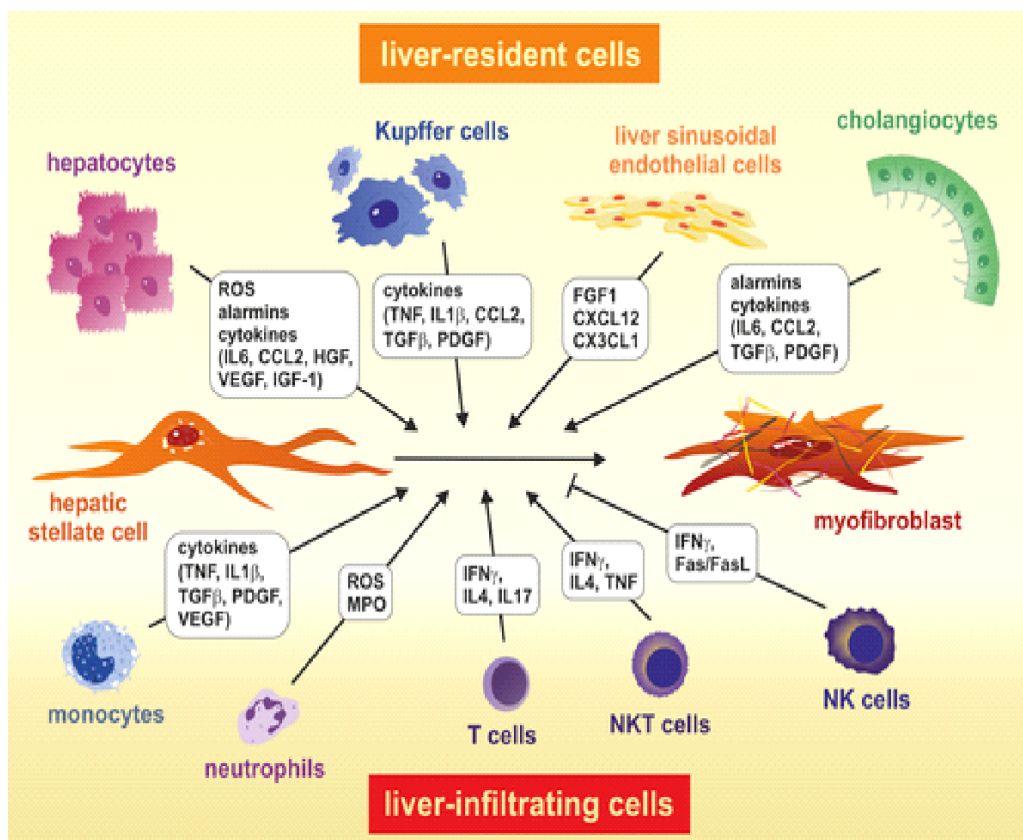


Рисунок 2 — Механизмы повреждения печени (цитируется по Weiskirchen R. et al., 2016) (hepatic stellate cell — звездчатая клетка печени, hepatocytes — гепатоциты, Kupffer cells — клетки Купфера, liver sinusoidal endothelial cells — синусоидальные эндотелиальные клетки печени, cholangiocytes — холагиоциты, myofibroblast — миофибробласт, NK cells — натуральные киллеры, NKT cells — натуральные киллеры Т-клетки, T cells — Т клетки, neutrophils — нейтрофилы, monocytes — моноциты, ROS — активные формы кислорода, alarmins — клеточные компоненты, cytokines — цитокины, MPO-миелопероксидаза, IL — интерлейкин, CCL — хемокин, HGF — гепатоцитарный фактор роста, VEGF — сосудистый фактор роста, IGF1 — инсулиноподобный фактор роста, TNF — фактор некроза опухоли, TGF — трансформирующий фактор роста, PDGF — тромбоцитарный фактор роста, FGF — фактор роста фибробластов, IFN — интерферон, Fas/Fas1 — трансмембранный белок типа 2)

Что же касается механизмов восстановления и повреждения печени после ишемически-реперфузионного синдрома, то основные триггеры регенерации в том процессе до сих пор остаются неизученными. Известно, что пролиферация гепатоцитов начинается в периваскулярных зонах. После повреждения активно включаются в процесс восстановления паренхиматозные и непаренхиматозные клетки, их взаимодействия хорошо скоординированы и описаны частично выше. Также есть данные об участии клеток-предшественников, но пути активации их после ИПР еще не выяснены [94].

Возможно, у пациентов с ДТ процессы повреждения превалируют над процессами восстановления, в результате чего наблюдается уменьшение объема функционирующей ткани. Очевидно, что такая сложная природа дисфункции, отсутствие понимания механизмов возникновения заболевания и отсутствие консенсуса в критериях данного состояния затрудняют оценку потенциальных биомаркеров [60, 68].

1.4 Лабораторные методы прогнозирования и диагностики дисфункции трансплантата печени

Одним из подходов к предупреждению развития осложнений после ОТП является своевременная оценка и прогнозирование функции пересаженного органа. Пункционная биопсия с последующим исследованием гепатобиоптата — это золотой стандарт в диагностике состояния трансплантата [12, 56, 62, 97, 128, 157, 158]. Считается, что ее можно совершать на 5-й день или в крайнем случае на 10-й день после ортотопической трансплантации печени для подтверждения дисфункции при сохранении изменений лабораторных показателей, причина которых не может быть объяснена известными факторами еще до проявления клинической картины [150]. Однако в клинической практике биопсию проводят только в случае крайней необходимости, когда все другие методы исследований не дали однозначных результатов или для идентификации отторжения. Кроме

того, данная манипуляция имеет высокий риск кровотечений, перфорации органа, развития сепсиса [75].

Из всех визуализационных инструментальных методов, используемых в алгоритме динамического мониторинга за пациентом после ОТП, на первом месте стоит ультразвуковое исследование (УЗИ) [13], поскольку данная технология позволяет проводить в реальном времени нетравматичное многократное обследование состояние трансплантата. Для исключения поражений со стороны сосудистого русла применяют ультразвуковую доплерографию (УЗДГ), с помощью которой определяют скорость артериального кровотока (50-200 см/сек.), индекс резистентности (0,5-0,8), время ускорения потока (0,08 сек.), скорость венозного кровотока (не более 100 см/сек.). Кроме того, используют эхографию для обнаружения признаков дилатации билиарного дерева.

Помимо перечисленных инструментальных методов диагностики осложнений в алгоритм мониторинга за реципиентом входят лабораторные маркеры, шкалы и тесты [68, 161]. Биохимические тесты (АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ, общий билирубин, альбумин, ПТИ, желчные кислоты), отражающие функцию печени, являются первой ступенью в диагностике осложнений. Значение этих показателей хорошо описано во многих источниках, но их не всегда эффективно используют в прогнозировании осложнений и наблюдении за судьбой трансплантата. Между тем, такой параметр, как индекс альбумин / билирубин, позволяет предсказывать с высокой вероятностью развитие как билиарных осложнений, так и пневмонии [47].

Также в качестве маркера прогнозирования послеоперационных ближайших и отдаленных результатов было предложено использовать концентрацию общего холестерина (ОХС) в сыворотке реципиента после ОТП. Было установлено, что если $ОХС < 1,42$ ммоль/л на 3-й день после операции, то вероятность развития ранней дисфункции аллотрансплантата увеличивается [149].

Вторая ступень лабораторного мониторинга включает использование различных дополнительных маркеров. К ним можно отнести С-реактивный белок (СРБ) и индекс NLR (отношение нейтрофилов к лимфоцитам), известный как

маркер системной воспалительной реакции. Его уже использовали для ранней дифференциальной диагностики инфекционных осложнений. Однако на сегодняшний день установлено, что СРБ и NLR не обладают высокой чувствительностью и специфичностью [49]. Поэтому Perrakis A. с соавторами предложили использовать прокальцитонин как маркер осложнений и прогностический фактор смертности в посттрансплантационном периоде, но его применение оказалось ограниченным, так как данный показатель закономерно прогнозирует только дисфункцию, возникшую на фоне бактериальных и грибковых инфекций [38, 139, 141].

Для прогнозирования развития билиарных осложнений было предложено использовать МНО. Так, было показано, что после ОТП БО коррелировали с низким МНО реципиента до операции [147].

Считается, что фоновый уровень натрия в сыворотке крови (Na) коррелирует с тяжестью цирроза печени, что, в частности, отражено в формуле MELD-Na. В одном исследовании оценили связь между концентрацией Na и краткосрочной выживаемостью после ОТП. Оказалось, что ни гипонатриемия (< 130 мэкв/л), ни гипернатриемия (> 145 мэкв/л) до трансплантации не предсказывали 3-месячную выживаемость. Гипонатриемия, как правило, приводила к частому развитию неврологических осложнений, которые приводили к длительной госпитализации [140].

Для диагностики отторжения аллотрансплантата рекомендуют использовать антитела к рецептору ангиотензина II типа 1 (AT1R). В исследовании было выявлено, что антитела AT1R чаще встречаются у реципиентов с данной патологией и могут быть фактором риска неблагоприятных исходов. Но для повышения прогностической значимости концентрацию AT1R необходимо учитывать совместно с HLA-антителами [48].

Помимо уже описанных методов диагностики риска развития ДТ используют отношение СРБ к альбумину (СРБ/АЛБ) у пациентов, перенесших трансплантацию печени от живого донора. Park J. с соавторами установили, что если СРБ/АЛБ выше порогового значения, то есть $> 20\%$, то вероятность ДТ

увеличивается в 2 раза. Кроме того, пациенты с высоким соотношением СРБ/АЛБ имеют худшую выживаемость, чем пациенты с низким СРБ/АЛБ в течение периода наблюдения [134]. Для прогнозирования исхода дисфункции трансплантата использовали в качестве биомаркера гиалуроновую кислоту, которая не уступала другим печеночным тестам. В исследовании было продемонстрировано, что высокий уровень ГК в плазме был значимым предиктором 1-летней смертности [80].

Предлагалось использовать в качестве прогностического маркера посттрансплантационного периода фактор свертывания V и количество тромбоцитов. Среди реципиентов с ДТ, у которых фактор V > 36,1 Ед/мл (P = 0,001), 1, 3 и 6-месячная выживаемость составила 98%, 95% и 95% соответственно [154]. Veltrame P. с соавторами в своем исследовании отметили, что количество тромбоцитов < $70 \times 10^9/\text{л}$ на 5-е сутки после ОТП является независимым фактором риска смерти через 12 месяцев [54].

В другом исследовании было показано, что дооперационное количество тромбоцитов более $49,5 \times 10^9/\text{л}$ было независимым фактором риска осложнений после ОТП и ранней ДТ [136].

Важно отметить, что на сегодняшний день в трансплантационных центрах в мониторинге используют в основном общие сывороточные параметры первой степени, поскольку другие маркеры не доказали свою прогностическую ценность. Однако существующие печеночные тесты неспецифичны для оценки типа нарушений в печени, так как изменение их уровня могут быть сопряжены с любым другим видом послеоперационных осложнений [17]. В связи с чем исследователи предложили использовать прогностические модели UCLA-FRS (University of California Los Angeles-Futility Risk Score), SOFT (Survival Outcomes Following Liver Transplantation), DRI (Donor Risk Index), BAR (Balance of Risk), которые не нашли в трансплантологии печени широкого применения, так как основываются на большом перечне показателей реципиента и донора, что создает технические сложности [44, 130, 146, 160].

Ввиду этого продолжается поиск лабораторных биомаркеров для прогнозирования развития послеоперационных осложнений и нарушений функции пересаженного органа. В последние годы специалисты установили значение интерлейкинов и факторов роста в развитии посттрансплантационных осложнений [62, 83, 88]. Было предложено использовать в качестве раннего маркера инфекционных осложнений ИЛ-6, поскольку данный цитокин стимулирует острую фазу воспаления [88]. J.M. Kim и соавторами сделана попытка прогнозирования развития дисфункции трансплантата печени на основе определения уровня плазменных цитокинов ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12 [52, 129, 151]. В это же время наши соотечественники предложили использовать в качестве предиктора трансформирующий фактор (TGF-beta 1), но применение данного показателя рекомендовано только у детей-реципиентов [38] (Таблица 2).

Таблица 2 — Предикторы осложненного посттрансплантационного периода

Показатели	Авторы
АЛТ, АСТ > 1500 МЕ/мл МНО > 1,6 БИЛИРУБИН > 171 мкмоль/л	Sood S. 2014
Прокальцитонин	Perrakis A.2016
CD8+	Никушина В.П. 2015
Общий холестерин	Yang J. 2017
ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12	Woo Y.S.2017,
ИЛ-6	Faitot F. 2018 Чугунова О.А. 2017
Гиалоурановая кислота	Rostved A.A. 2018
Трансформирующий фактор роста бета 1	Курабекова Р.М. 2019
Сывороточный фактор 5	Gorgen A. 2019
СРБ/альбумин	Park J. 2019
СРБ	Figiel W. 2020
Индекс-отношение нейтрофилов к лимфоцитам	Figiel W. 2020
Тромбоциты	Beltrame P. 2019
Антитела к рецептору ангиотензина II типа 1 (AT1R)	Wozniak L.J. 2020
АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ, ИЛ-6, альбумин, sMICN	Iacob S. 2020

Современной тенденцией стало использование нескольких параметров для повышения статистической значимости теста. Iacob S. с соавторами для дифференциальной диагностики дисфункции аллотрансплантата от других, менее прогрессирующих подтипов повреждения, предложили прогностическую модель, основанную на 7 параметрах (сывороточная ЩФ, АЛТ, АСТ, ГГТ, sMICA, IL6 и альбумин), но пока их результаты носят исключительно исследовательский характер и не применяются в клинике [133].

Таким образом, инструментальные методы позволяют исключить все хирургические осложнения, а некоторые лабораторные показатели могут быть использованы только в качестве прогностических маркеров сосудистых, инфекционных и билиарных осложнений. Однако ни инструментальных признаков, ни биомаркеров дисфункции трансплантата в настоящее время четко не определено. Их установление поможет на ранних этапах выявить пациентов с данным осложнением и своевременно скорректировать терапию, что в дальнейшем приведет к повышению эффективности трансплантационной помощи.

Резюме

Дисфункция трансплантата на сегодняшний день является недостаточно изученным осложнением, возникающим после трансплантации печени [51, 59, 62, 116, 137]. Отсутствие консенсуса среди специалистов в терминологии, в факторах, влияющих на развитие данного состояния, в критериях дисфункции трансплантата, в лабораторных маркерах обусловлено недостаточными патофизиологическими знаниями.

В современной концепции патогенеза дисфункции важная роль принадлежит ишемическо-реперфузионному повреждению, которое является неизбежным следствием трансплантации [60, 120, 173]. Однако у некоторых реципиентов наблюдается благоприятное течение послеоперационного периода, а

у других развивается осложнение в виде плохо функционирующего трансплантата и его потеря [60, 88, 120, 137].

Таким образом, усилия исследователей должны быть направлены на изучение механизмов, протекающих в печени после трансплантации, а именно — повреждение и стимулируемые процессы восстановления, поскольку несвоевременное выявление и коррекция дисбаланса этих механизмов приводят к развитию дисфункции трансплантата, а выявление ключевых биомаркеров, участвующих в патогенезе ДТ, поможет в создании оптимального алгоритма мониторинга за реципиентом после ОТП.

Глава 2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Решение задач работы требовало проведения клинических и экспериментальных исследований.

С целью изучения патогенетических механизмов дисфункции трансплантата проводили исследование в два этапа:

– 1 этап — ретроспективное исследование историй болезней реципиентов, перенесших ортотопическую трансплантацию печени;

– 2 этап — проспективное исследование по типу «случай — контроль». В экспериментальной части работы для изучения восстановительных процессов в печени использовали модель частичной гепатэктомии в подробном описании С. Mitchell и Н. Willenbring (2014). Для оценки состояния печени определяли гематологические показатели, некоторые иммунологические параметры крови, а также проводили морфологическое исследование биоптата.

2.1 Характеристика клинического 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 (Рисунок 3).

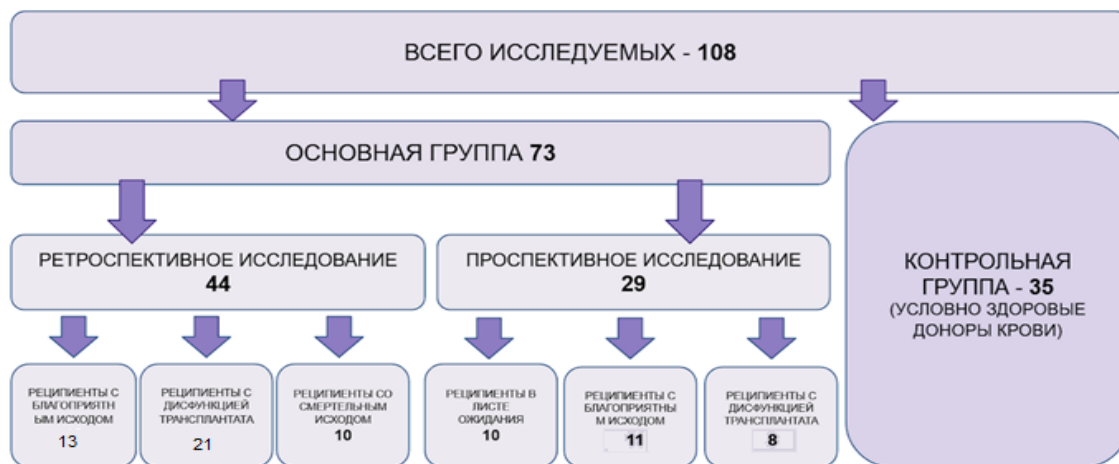


Рисунок 3 — Распределение пациентов по группам

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 ортотопической трансплантации. Показаниями к трансплантации явились цирроз печени невирусной этиологии (холестатические заболевания печени, аутоиммунный гепатит, алкогольная болезнь печени, неалкогольный стеатогепатит) — 21%, цирроз печени в исходе вирусных гепатитов — 70%, гепатоцеллюлярная карцинома на фоне вирусной этиологии — 7%, другие показания (болезнь Коновалова Вильсона, альвеококкоз печени, гигантские гемангиомы) — 2%. Диагноз ставился на основании стандартных клинико-лабораторных критериев, степень тяжести определяли по шкалам MELD и Child-Pugh.

Критерии включения пациентов в исследование:

- возраст старше 18 лет;
- первичная трансплантация печени;
- MELD менее 30 баллов.

Критерии исключения пациентов из исследования:

- возраст младше 18 лет;
- ретрансплантация печени;
- трансплантация печени от живого донора;
- первично нефункционирующий трансплантат.

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.

На первом этапе клинического исследования мы провели ретроспективный анализ историй болезней пациентов, поступивших в гастроэнтерологическое отделение для выполнения трансплантации печени, которые включали в себя саму ОТП и ранний послеоперационный период, средний срок госпитализации составил 21 день. Все реципиенты в зависимости от исходов были разделены на три группы:

1. Первую группу составили 16 реципиентов печени с благоприятным посттрансплантационным периодом.
2. Во вторую группу вошли 18 реципиентов с развившейся в посттрансплантационном периоде дисфункцией трансплантата.
3. Третью группу представили 10 реципиентов со смертельным исходом после ортотопической трансплантации печени (Таблица 3).

Таблица 3 — Общая характеристика реципиентов, участвующих в ретроспективном исследовании (n-44)

Группы больных	Число больных	Соотношение мужчин : женщин	Возраст больных, лет (Me)
1 группа — реципиенты с благоприятным посттрансплантационным периодом	13	5:3	42 (41-56)
2 группа — реципиенты с развившейся дисфункцией в посттрансплантационном периоде	21	2:1	44 (42-55)
3 группа — реципиенты со смертельным исходом после трансплантации	10	3:2	43 (42-56)

В историях болезни учитывали показатели общего анализа крови и биохимического исследования, проводимых в день операции (0 сутки) и после на 3, 10-е сутки.

На втором этапе мы провели проспективное исследование «случай—контроль», в которое было включено 19 реципиентов, перенесших ортотопическую трансплантацию печени и пришедших на плановый прием (через 3 месяца), и 10 пациентов, находящихся в листе ожидания (Таблица 4). В первую группу входили пациенты из листа ожидания (10 человек). Вторую группу представляли реципиенты с благоприятным течением послеоперационного периода (11 человек). Третья группа — реципиенты с дисфункцией трансплантата (8 человек). У всех пациентов оценивали общий анализ крови и концентрацию некоторых плазменных цитокинов.

Таблица 4 — Общая характеристика пациентов, участвующих в проспективном исследовании (n=29)

Группы больных	Число больных	Соотношение мужчин : женщин	Возраст больных, лет (Me)
1 группа — пациенты в листе ожидания	10	1:2	45 (42-48)
2 группа — реципиенты с благоприятным течением посттрансплантационного периода	11	7:4	44 (43-54)
3 группа — реципиенты с дисфункцией трансплантата	8	5:3	44 (43-55)

Все пациенты после трансплантации проходили осмотр невролога и когнитивный тест — тест связи чисел. На основании проведенного осмотра, результатов тестирования, жалоб со стороны пациентов на нарушение сна,

быструю утомляемость, слабость, снижение памяти и концентрации внимания у всех реципиентов диагностировали энцефалопатию.

Контрольную группу составляли 56 условно здоровых доноров крови, сопоставимых по полу и возрасту со всеми исследуемыми группами.

2.2 Характеристика экспериментального исследования

Экспериментальное исследование было проведено на 60 самцах белых мышей в возрасте 7-8 месяцев, массой 24-31 г. В эксперимент отбирали только здоровых животных, прошедших двухнедельную адаптацию к условиям вивария [18, 42]. Мыши содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России в клетках площадью 45 см² при температуре 18-22°C при естественном световом цикле, свободном доступе к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами».

Выполнение исследований было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» (протокол № 4 от 19.04.2019). Все болезненные манипуляции с животным выполняли в условиях контролируемого наркоза 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, Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях № 123, от 18.03.1986 и протокола к ней от 22.06.1998, а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» Международного совета медицинских научных организаций (CIOMS) 1985 года.

Количество экспериментальных животных и распределение их по группам представлены в таблице 5. В зависимости от проводимой манипуляции мыши были разделены на три группы наблюдения: 1-ая группа — интактные мыши, неоперированные и нелеченые ($n = 20$); 2-ая — контрольные мыши, оперированные (проводили частичную гепатэктомию), нелеченые, вместо препарата получали физраствор ($n = 20$); 3-я — основная группа — животные, которым была выполнена частичная гепатэктомию, после чего они получали внутривнутрибрюшинно препарат цитофлавина (ООО «НТФФ «ПОЛИСАН» Санкт-Петербург, Россия) на протяжении недели ($n = 20$).

Таблица 5 — Распределение лабораторных животных по группам ($n = 60$)

Сутки после ЧГ	Интактные животные	Контрольная группа	Основная группа
3 сутки	20	10	10
7 сутки		10	10

Цитофлавин вводили внутривнутрибрюшинно в дозе 0,014 мл/10 г. массы тела в течение 7 суток ежедневно, однократно. Первое введение производили в конце операции до послойного ушивания брюшины. При выборе режима дозирования руководствовались общепринятыми экспериментальными подходами, изложенными в литературе [3].

Отечественный препарат цитофлавин относится к фармакотерапевтической группе метаболитических средств. В его состав входит янтарная кислота — 300 мг., инозин — 50 мг., никотинамид — 25 мг., рибофлавин — 5 мг., а также ряд вспомогательных веществ. Главным действующим веществом препарата считается янтарная кислота, которая является эндогенным внутриклеточным субстратом цикла Кребса. Она быстро трансформируется в фумаровую кислоту и далее в другие метаболиты цикла трикарбоновых кислот, что в итоге стимулирует синтез АТФ в клетках [8, 9]. Остальные вещества также участвуют в активации ферментов цикла. Так, никотинамид активирует никотинамид-зависимые

ферменты, необходимые для клеточного дыхания [7]. Инозин обладает способностью стимулировать синтез ключевых ферментов-нуклеотидов — ФАД и НАД. Рибофлавин активирует сукцинатдегидрогеназу и другие окислительно-восстановительные коферменты[2].

Таким образом, все компоненты препарата оптимизируют реакции цикла Кребса, тем самым способствуя быстрому синтезу АТФ. А их взаимопотенцирующее действие обуславливает метаболическую энергокоррекцию, антигипоксическую и антиоксидантную активность препарата, что определяет его фармакологические свойства и лечебную эффективность [2, 3, 7]. Кроме того, как было показано в исследовании Цыган Н.В и соавторов (2013 г.), данный препарат повышает концентрацию VEGF в цитолизате головного мозга и усиливает неоангиогенез [39]. Поэтому мы предположили возможным использование препарата в экспериментальном исследовании для коррекции и/или стимуляции восстановительных процессов печени у мышей после частичной гепатэктомии.

Выведение из эксперимента производили на 3 и 7-е сутки путем эвтаназии за счет передозировки (в 2-3 раза) наркотическим веществом эфиром. Дизайн экспериментального исследования представлен в виде схемы (Рисунок 4).

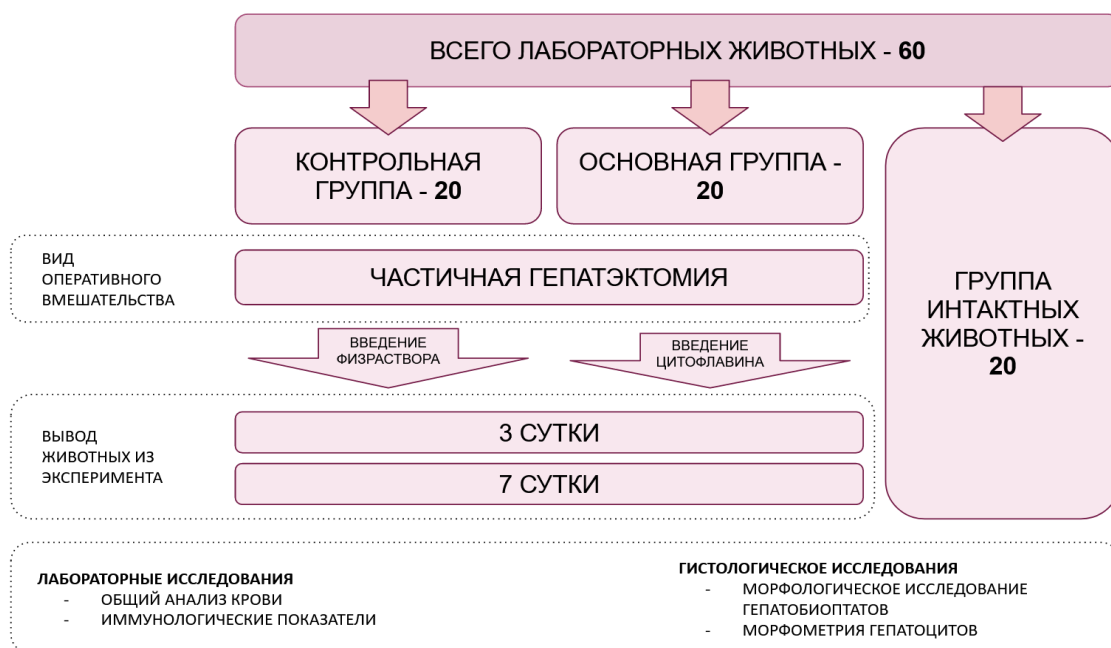


Рисунок 4 — Дизайн-схема экспериментального исследования

2.3 Моделирование частичной гепатэктомии

Механизмы регенерации печени чаще всего изучают в экспериментальной модели — частичной гепатэктомии (ЧГ), суть которой заключается в удалении двух третей печени лабораторного животного. Данный способ впервые был описан G.M. Higgins и R.M. Anderson в 1931 году и обрел большую популярность за счет простой воспроизводимости, которая обусловлена тем, что многодолевая структура печени грызунов позволяет легко выделить и удалить левую боковую, левую медиальную и правую медиальную доли, не вызывая повреждения тканей двух оставшихся долей.

Нами была проведена ЧГ печени мыши в более подробном описании С. Mitchell и Н. Willenbring (2014) (Рисунок 5).

Операцию проводили в интервале между 9-ю и 12-ю часами дня, что исключало суточные колебания митотической активности клеток печени. Использовали общий наркоз — ксилазин 2% и золетил 100 в соотношении 1:1 (0,1 мл. ксилазина 2% + 0,1 мл. золетила 100, и доводили до 1 мл 0,9% раствором натрия хлорида). Мышь фиксировали при помощи корнцанга, захватив им кожу в области затылка, далее внутримышечно инсулиновым шприцом в бедро вводили наркоз 0,02 мл. После чего животное фиксировали в положении лежа на спине на операционном столе за четыре конечности. Операционную область брили и обрабатывали кожу 70% этанолом. Далее, начиная с 0,3 см выше мечевидного отростка и до 0,5 см ниже пупка, проводили срединную лапаротомию и мобилизацию печени посредством рассечения серповидной связки. На следующем этапе поочередно накладывали шелковые лигатуры на основания левой (33% от массы печени) и средней (37% от массы печени) доли печени с их последующим удалением. Критерием адекватности наложения лигатур служило побледнение удаляемых долей. Далее промывали брюшную полость подогретым на водяной бане до 37°C 0,9% раствором натрия хлорида и ушивали операционную рану в два слоя (брюшина с мышцами и кожа). Операцию завершали обработкой раны аэрозоль-спреем «Террамицин», который содержит в

качестве действующего вещества окситетрациклин гидрохлорид. Вся операция занимала в среднем около 15-20 минут на одно животное в условно стерильных условиях [111].



Рисунок 5 — Частичная гепатэктомия по методу С. Mitchell и Н. Willenbring.
 А — срединная лапаротомия (а — срединная доля печени, b — левая латеральная доля печени); Б — наложение лигатуры и ишемия удаляемой доли;
 В — 70% гепатэктомия (с — правая доля печени)

С патофизиологической точки зрения после 70% резекции в печени запускаются многочисленные процессы, которые при нормальных условиях приводят к восстановлению утраченного объема.

Во-первых, происходит гемодинамическое изменение кровотока в воротной вене и увеличение напряжения сдвига. Количество кровотока на единицу объема оставшейся доли печени неизбежно повышается, что влияет на микроструктуру синусоид печени. В течение 6 часов после ЧГ наблюдается расширение синусоидального диаметра, межклеточных пространств, пространства Диссе и увеличение фенестрации. В итоге повышение синусоидальной перфузии приводит к сдвигу напряжения, застою паренхимы печени, повышению давления в портальной вене и к повреждению собственных клеток печени [19, 84]. В то же время в ответ на повышенное напряжение сдвига LSEC выделяют оксид азота (NO), который усиливает чувствительность гепатоцитов к HGF и гепатотропного IL-6 [88, 99, 100].

Во-вторых, уменьшение количества функционирующих гепатоцитов инициирует активный процесс регенерации, который увеличивает потребление кислорода клетками печени. Однако скорость доставки кислорода не увеличивается, а наоборот, снижается из-за портальной гипертензии оставшейся части.

И в-третьих, как итог из вышесказанного, развивается гипоксия ткани, одним из признаков которой является снижение тканевого pO_2 . Как было показано в исследовании Савилова П.Н., в остатке печени величина pO_2 на 3 и 7-е сутки после частичной гепатэктомии была ниже нормы на 39% и 18% соответственно [32]. В то же время Маэно с соавторами продемонстрировали, что гипоксия, которая развивается в оставшемся участке оперированной печени, приводит к накоплению белка HIF-1 α , который играет положительную регуляторную роль в процессе регенерации печени за счет увеличения экспрессии VEGF, эритропоэтина и гликолитических ферментов, обеспечивая тем самым адаптацию к условиям гипоксии.

В результате запуска описанных выше механизмов после частичной гепатэктомии при нормальных условиях у здоровых животных наблюдается полное восстановление удаленной части к 7-10 суткам.

2.4 Лабораторные исследования

2.4.1 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 оценки кроветворной системы у лабораторных животных в экспериментальной части был использован автоматизированный гематологический анализатор MEK 6400 J/K (Nihon Kohden Corporation, Japan). Исследовали следующие параметры: лейкоциты (WBC), эритроциты (RBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний объем

эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC), тромбоциты (PLT), средний объем тромбоцитов (MPV). Параметры WBC, RBC и PLT измерялись по методу обнаружения электростатического сопротивления. Исследование выполнялось в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем прибора. Для подсчета лейкоцитарной формулы окрашивали мазки крови по Романовскому-Гимзе и подсчитывали процентное содержание лейкоцитов (на 200 клеток).

Кроме того, проводили исследование костного мозга лабораторных животных. Материал получали из бедренной кости путем ее продувания в каплю буферного фосфатного солевого раствора (PBS). Затем жидкость с клетками центрифугировали на цитоцентрифуге Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific, USA). Далее высушивали препарат на воздухе. После окрашивали по Романовскому-Гимзе и подсчитывали процентное содержание клеток: бласт, промегакариобласт, мегакариоцит базофильный, полихроматофильный, оксифильный (на 1000 клеток).

Для изучения индуцированной агрегации тромбоцитов использовали турбодиметрический метод Борна, основанный на исследовании оптической плотности плазмы. Исследование проводили в ГАУЗ СО СОКБ № 1 совместно с врачом Алтуховой Л.В. на комбинированном агрегометре Chronolog 590 (USA), в качестве индуктора использовали АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл и объеме 18 мкл.

2.4.2 Биохимические исследования

В связи с ранее предложенными критериями Sood S. и соавторами, ДТ печени диагностируется, если значения билирубина > 10 мг/мл, аминотрансфераз (АСТ, АЛТ) > 1500 МЕ/мл. Поэтому у реципиентов печени в историях болезни учитывали следующие биохимические показатели: аспаратаминотрансферазу (АСТ), аланинаминотрансферазу (АЛТ), общий билирубин, альбумин. Весь спектр исследований был выполнен на автоматическом анализаторе AU 5800 (Beckman Coulter, USA).

Активность ферментов, которая отражает абсолютное содержание фермента в сыворотке крови, определяли кинетическим УФ-методом (скорость окисления НАДФН пропорциональна активности АСТ, АЛТ). Количество общего билирубина измеряли колориметрическим модифицированным методом Йендрашика-Грофа, основанном на реакции диазотирования билирубина диазосульфаниловой кислотой в присутствии ускорителя реакции кофеина-бензоата натрия. Концентрацию альбумина определяли колориметрическим методом с использованием красителя «бромкрезоловый зеленый».

Исследование проводили в ГАУЗ СО СОКБ № 1 в клинико-диагностической лаборатории (заведующий — к.м.н. Мазеин Д.А.).

Вместе с биохимическими показателями для установления диагноза ДТ учитывали международное нормализованное отношение (МНО > 1,6). Показатель МНО является расчетным показателем протромбинового времени и вычисляется по формуле:

$$\text{МНО} = (\text{ПТВ пациента} / \text{ПТВ норма})^{\text{МНЧ}}. \quad (2)$$

Данный параметр определяли с использованием анализатора STA R Max (France).

2.4.3 Иммунохимическое исследование

Определяли концентрации цитокинов (Таблица 6) в плазме пациентов 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.

Данная технология подобна сэндвич-ELISA: используются пары соответствующих антител для идентификации интересующего белка. Однако в качестве твердой поверхности для нанесения образца используются магнитные частицы, которые представляют собой агарозные флуоресцентные-меченые

частицы с диаметром 6.45 мкм. Внутри эти гранулы окрашены с точными пропорциями красного и инфракрасного флуорофоров для создания 100 спектрально уникальных сигнатур, которые могут быть идентифицированы системами обнаружения Luminex. Таким образом, каждый магнитный шарик является спектрально уникальным и несет на себе антитело, специфичное для одного целевого белка, а данный комплекс идентифицируется с помощью биотинилированных антител и стрептавидин-R-фикоэритрина (RPE) [93].

Выполнение методики включало объединение и инкубирование небольшого объема биологического образца (25 мкл.) со смесью специально подготовленных магнитных микросфер в 96-луночном плоскодонном планшете. После ряда промывок моющим раствором на магните в каждую лунку добавляли смесь детектирующих антител, специфичных для исследуемых цитокинов, и стрептавидин-R-фикоэритрина (RPE). Далее 96-луночный планшет загружали в Luminex 200. Внутри анализатора контролируемый отбор минимального объема пробы из реакционной смеси осуществлялся при помощи иглы. Затем образец проходил через обжимающую жидкость и уже с пониженной скоростью поступал в оптическую подсистему.

Таким образом, происходила гидродинамическая фокусировка, то есть микросферы выстраивались в цепочку друг за другом и облучались индивидуально. Для обнаружения магнитных частиц использовали два лазера: репортный лазер — зеленый с длиной волны 534 нм.; классификационный лазер — красный с длиной волны 635 нм. Красный лазер использовали для различения спектральной сигнатуры, зеленый — для определения количества флуоресценции RPE, которое пропорционально количеству белка, присутствующего в образце. 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). В ходе исследования стандарты и образцы вносились в лунки планшета, на дне которых было

иммобилизировано антитело, специфичное для мышинового HGF. После чего 96-луночный планшет промывали на вошере Wellwash (Thermo Fisher Scientific, USA). Далее, дозатором добавляли стрептавидин, конъюгированный с HRP. Повторно промывали и вносили раствор субстрата TMB, а после — стоп-реагент. Интенсивность цвета измеряется при длине волны 450 нм на фотометре Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA).

Обработка результатов выполнялась с помощью программы Skanlt RE 4.1. Также в плазме крови лабораторных животных определяли 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.

Таблица 6 — Перечень определяемых в исследовании цитокинов у реципиентов и лабораторных животных

Название	Синоним	Источник биологического материала
1	2	3
IFN-alpha/gamma	Интерферон	человек
IL-12p70	Интерлейкин-12 p70	человек
IL-13	Интерлейкин-13	человек
IL-1 alpha/beta	Интерлейкин-1	человек
IL-2	Интерлейкин-2	человек
IL-4	Интерлейкин-4	человек
IL-5	Интерлейкин-5	человек
IL-6	Интерлейкин-6	человек
TNF-alpha/beta	фактор некроза опухоли	человек
GM-CSF	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста	человек
IL-18	Интерлейкин-18	человек
IL-10	Интерлейкин-10	человек
IL-17A	Интерлейкин-17A	человек

1	2	3
IL-21	Интерлейкин-21	человек
IL-22	Интерлейкин-22	человек
IL-23	Интерлейкин-23	человек
IL-27	Интерлейкин-27	человек
IL-9	Интерлейкин-9	человек
IL-31	Интерлейкин-31	человек
IL-15	Интерлейкин-15	человек
IL-1RA	антагонист рецептора интерлейкина-1	человек
IL-7	Интерлейкин-7	человек
Eotaxin	Хемокин, эотаксин	человек
GRO-alpha	Хемокин, онкоген	человек
IL-8	Хемокин-8, интерлейкин-8	человек
IP-10	Хемокин-10	Человек
MCP-1	Моноцитарный хемотаксический протеин-1	человек
MIP-1alpha/ beta	Хемокин, воспалительный белок макрофагов	человек
SDF-1alpha	Хемокин, фактор стромальных клеток-1	человек
RANTES	Хемокин	человек
NGF	Фактор роста нервов	человек
BDNF	Нейротрофический фактор мозга	человек
EGF	Эпидермальный фактор роста	человек
FGF	Фактор роста фибробластов	человек
HGF	Гепатоцитарный фактор роста	человек/мышь
LIF	Лейкемия-ингибирующий фактор	человек
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста	человек
PlGF-	Плацентарный фактор роста	человек
SCF	Фактор стволовых клеток	человек
VEGF-A, D	Сосудистый фактор роста	человек
TGF-beta	Трансформирующий фактор роста	человек/мышь

2.4.4 Гистологическое исследование печени лабораторных животных

Для оценки восстановительных процессов в тканях проводили морфологическое исследование. Для этого животных забивали под эфирным наркозом до исследования (контрольная группа) и через 3, 7 сутки после операции. У умерщвленных животных извлекали печень, разрезали на кусочки $4 \times 4 \times 5$ и фиксировали 10% раствором формалина в течение 24 часов. Проводка материала и приготовление парафиновых блоков осуществлялись на гистопроцессоре MICROM EC 350-2 (Thermo Fisher Scientific, USA) по методике, рекомендованной производителем. Приготовление срезов осуществлялось путем резки блока при помощи специального устройства ротационного микротомы LEICA RM 2245 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Germany), который позволил получить серийные срезы толщиной 4-5 мкм, пригодные для окрашивания и микроскопии. Окрашивание срезов происходило в два этапа: предварительная обработка и собственно окраска. На первом этапе проводили депарафинирование срезов, помещенных на предметное стекло с помощью ксилола и спирта, далее следовала промывка проточной водой. После срезы окрашивали гематоксилин-эозином, просветляли, заключая в прозрачную среду, накрывали покровным стеклом и высушивали в термостате 48 часов. Далее готовые гистологические микропрепараты изучали при увеличении 100, 200 и 400 раз с помощью микроскопа OLYMPUS CX41 (Japan). Исследовали не менее 10 полей зрения в каждом препарате. Микрофотографии получали с помощью программы «Видео-Тест Морфология 5.0».

Для морфометрического анализа данных использовали компьютерную программу анализа изображений (Phenix Phmias 3.0). С этой целью производили микросъемку случайных полей зрения гистологических препаратов цифровой камерой (HAYEAR, China) на базе микроскопа OLYMPUS CX41 (Japan), объектив — 10, окуляр — 10 (не менее 10 полей зрения в каждом гистологическом срезе). Производилась оценка следующих морфометрических показателей печени: количество двуядерных клеток на 1000 гепатоцитов (%),

количество дистрофически измененных клеток на 1000 гепатоцитов (%), митотический индекс (МИ, %), площадь гепатоцита (мкм^2), площадь ядра (мкм^2), площадь цитоплазмы (мкм^2) и ядерно-цитоплазматическое соотношение (ЯЦИ).

Приготовление и описание препаратов было выполнено совместно с к.м.н. Валаминой И.Е.

2.5 Статистическая обработка данных

Полученные в ходе исследования результаты подлежали статистической обработке на основании принципов вариационной статистики.

На первом этапе исследуемые выборки проверяли на нормальность распределения по трем параметрам. Косвенный параметр включал в себя оценку коэффициента асимметрии и эксцесса. Графический — построение частотной гистограммы, ящичной диаграммы, нормально-вероятностного графика. К расчетным методам анализа относят критерии Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. После вычисления интерпретировали их уровень значимости p по следующим правилам: для критерия Колмогорова-Смирнова — если $p < 0,2$, то распределение ненормальное; для критерия Шапиро-Уилка — если $p < 0,05$, то распределение ненормальное. Таким образом, в ходе анализа было установлено, что выборки не подчиняются закону нормального распределения, поэтому на втором этапе статистического анализа 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. Для выявления различий в двух зависимых выборках применили критерий Вилкоксона.

Корреляционный анализ использовали для установления взаимосвязей между параметрами. Расчет коэффициента производился методом Спирмена. Интерпретацию полученных данных проводили при помощи шкалы Чеддока (Таблица 7).

Таблица 7 — Шкала Чеддока для качественной оценки тесноты связи

Качественная характеристика тесноты связи		Количественная мера тесноты связи	
		Прямая связь	Обратная связь
Слабая		0,1-0,3	(-0,3)-(-0,1)
Умеренная	средняя	0,3-0,5	(-0,5)-(-0,3)
Заметная		0,5-0,7	(-0,7)-(-0,5)
Высокая	сильная	0,7-0,9	(-0,9)-(-0,7)
Весьма высокая		0,9-1	(-1)-(-0,9)

Далее для объективной оценки качества лабораторного теста использовали ROC-анализ (Receiver Operator Characteristic) с расчетом диагностической чувствительности, специфичности и площади под кривой (AUC — Area Under Curve).

Диагностическая чувствительность — это доля истинно положительных случаев; и рассчитывается как доля действительно болеющих людей в обследованной группе, которые по результатам теста выявляются как больные:

$$ДЧ = \frac{ИП}{КЗ} * 100\%, \quad (3)$$

где ДЧ — чувствительность;

ИП — истинно положительные случаи;

КЗ — количество всех заболевших.

Диагностическая специфичность — это доля истинно отрицательных случаев, среди всех людей, не имеющих болезни:

$$ДС = \frac{ИО}{ЗП} * 100\%, \quad (4)$$

где ДС — специфичность;

ИО — истинно отрицательные случаи;

ЗП — здоровые пациенты.

При визуальной оценке ROC-кривой обращали внимание на то, как проходит кривая: чем ближе она к верхнему левому углу, тем выше предсказательная способность, и наоборот, чем меньше ее изгиб, тем менее эффективна модель. Однако для лучшей оценки качества модели рассчитывали площадь под кривой. Для интерпретации результатов использовалась экспертная шкала (Таблица 8).

Таблица 8 — Экспертная шкала для значений AUC

Интервал AUC	Качество модели
0,9-1,0	Отличное
0,8-0,9	очень хорошее
0,7-0,8	Хорошее
0,6-0,7	Среднее

Также нами был использован дополнительный критерий — отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ), определяемый как доля лиц без заболевания из общего числа отрицательных результатов диагностического теста:

$$\text{ОПЦ} = \frac{\text{ИО}}{\text{ИО} + \text{ЛО}} \quad (5)$$

где Ло — ложноотрицательный результат;

ИО — истинноотрицательный результат.

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

Глава 3.

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИЙ СИСТЕМЫ КРОВИ И ЦИТОКИНОВОЙ СЕТИ У РЕЦИПИЕНТОВ ПЕЧЕНИ

В настоящее время такая технически сложная и трудоемкая хирургическая операция, как ортотопическая трансплантация печени, стала рутинным методом лечения инкурабельных пациентов с заболеванием печени. Вместе с тем этот метод связан с риском ишемически-реперфузионного повреждения, которое инициирует массивный некроз гепатоцитов. Уменьшение объема полноценно функционирующей ткани служит одним из пусковых механизмов развития такого осложнения, как ДТ. Данная патология наряду с другими осложнениями может привести к потере трансплантата и стать одной из причин летальности в послеоперационном периоде. Поэтому для улучшения ранних и отдаленных результатов ОТП исследователи считают необходимым изучение патогенеза дисфункции трансплантата, расширение возможностей лабораторной оценки его состояния [138]. Можно полагать, что успехи в этой области могут быть связаны с периоперационным динамическим наблюдением и оценкой лабораторных показателей реципиентов печени. В связи с вышесказанным в данной главе нами была исследована динамика лабораторных показателей на посттрансплантационном этапе в сравнении с дооперационным уровнем.

3.1. Динамическая оценка гематологических показателей реципиентов в день операции и после ортотопической трансплантации печени

Система крови является одной из наиболее реактивных систем организма. Поскольку она реагирует на любые типы вмешательств, то общий анализ крови способен быть тем инструментом, который может обеспечить лабораторный мониторинг за состоянием пациента и позволит оценить патофизиологические сдвиги. В повседневной клинической практике и в научной литературе у больных с терминальной стадией заболеваний печени двух- и трехростковые цитопении

встречаются крайне часто [95, 118, 168]. Одним из механизмов, обуславливающих уменьшение числа клеток и форменных элементов крови, является нарушение функции печени и, как следствие, уменьшение синтеза физиологических стимуляторов эритропоэза и тромбоцитопоэза [81].

Прежде всего анализу были подвергнуты изменения в периоперационном периоде стандартных гематологических показателей: RBS, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, WBC, PLT, MPV (Таблица 9).

В день операции и на посттрансплантационном этапе во всех группах наблюдалось снижение количества эритроцитов и гематокрита относительно контрольной группы, остальные эритроцитарные показатели находились в пределах нормы. Статистически значимых различий между группами по данным показателям выявлено не было. Уровень гемоглобина достигал своего минимума к 3 суткам во всех группах. Количество лейкоцитов увеличивалось во всех группах к 10 суткам и максимально повышалось в группе со смертельным исходом в 1,2 раза относительно благоприятного исхода ($p < 0,05$). Мы полагаем, что изменения эритрона и лейкоцитарная реакция были неспецифичными, они встречаются при любых хирургических вмешательствах. Стремление повысить информативность рутинного анализа крови привело нас к анализу расчетных гематологических индексов, которые в последние годы нередко используются в клинической практике, в том числе при ОТП [105].

К таким индексам принадлежит лимфоцитарно-моноцитарное отношение (LMR), отношение нейтрофилов к лимфоцитам (NLR), отношение количества тромбоцитов к лимфоцитам (PLR). Ранее Мапо Y. с соавторами описывали применение LMR у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой для прогнозирования рецидива после операции [105]. Проанализировав LMR у реципиентов в периоперационном периоде, превышение порогового значения ($LMR > 3,45$) было выявлено у реципиентов с благоприятным исходом в 1,5 раза до операции и в группе со смертельным исходом в 1,3 раза на 3 сутки (Таблица 10).

Таблица 9 — Динамические изменения гематологических показателей реципиентов
в день операции и после ОТП (Me, Q1, Q3)

Показатели	Сутки	Контрольная группа (n-35)	Благоприятный исход (n-16)	Дисфункция трансплантата (n-18)	Смертельный исход (n-10)
1	2	3	4	5	6
RBC, 10 ¹² /л	0	4,2 (3,8 - 4,9)	3,8 (3,4 - 4,4) p1 = 0,4	3,6 (3,4 – 4,0) p3 = 0,4	3,6 (3,1-4,0) p2 = 0,5
	3		3,1 (2,7-4,0) p1 = 0,5	3,0 (2,7-3,6) p3 = 0,7	3,2 (2,8-3,9) p2 = 0,2
	10		3,3 (3,0-3,8) p1 = 0,8	3,1 (2,9-4,0) p3 = 0,5	3,4 (3,1-3,4) p2 = 0,7
HGB г/л	0	138,0 (125,0-149,0)	115,0 (107,0-139,0) p1 = 0,4	114,0 (98,0-124,0) p3 = 0,1	114,0 (107,0-128,0) p2 = 0,4
	3		55,0 (29,0-101,0) p1 = 0,1	94,0 (85,0-103,0) p3 = 0,06	94,0 (90,0-96,0) p2 = 0,5
	10		104,0 (95,0-116,0) p1 = 0,4	101,0 (92,0-110,0) p3 = 0,04	101,0 (98,0-106,0) p2 = 0,4
HCT %	0	42,0 (35,1-48,4)	33,1 (31,2-39,1) p1 = 0,4	31,0 (29,3-33,0) p3 = 0,3	30,2 (29,4-33,4) p2 = 0,3
	3		29,0 (28,2-32,4) p1 = 0,3	28,0 (26,5-30,4) p3 = 0,07	27,9 (25,6-32,5) p2 = 0,08
	10		31,7 (29,5-32,3) p1 = 0,3	29,8 (27,5-31,5) p3 = 0,07	29,9 (25,6-32,8) p2 = 0,09

1	2	3	4	5	6
MCV fl	0	65,0 (73,1-101,0)	83,3 (78,7-94,4) p1 = 0,4	88,0 (72,5-91,6) p3 = 0,09	93,0 (87,2-94,5) p2 = 0,09
	3		85,4 (83,4-86,5) p1 = 0,09	96,1 (92,5-100,2) p3 = 0,6	106,0 (95,6-119,3) p2 = 0,04
	10		89,0 (87,6-91,3) p1 = 0,1	93,2 (89,2-95,6) p3 = 0,4	89,3 (82,5-90,1) p2 = 0,4
MCH pg	0	23,3 (22,0-31,1)	30,2 (27,2-33,8) p1 = 0,08	32,1 (25,5-32,5) p3 = 0,07	33,6 (32,4-34,5) p2 = 0,4
	3		28,5 (27,5-29,3) p1 = 0,3	29,3 (23,3-31,6) p3 = 0,07	36,0 (33,4-37,6) p2 = 0,3
	10		30,1 (27,9-32,1) p1 = 0,4	30,1 (24,5-32,5) p3 = 0,5	31,8 (29,5-32,4) p2 = 0,08
MCH C g/l	0	337,2 (310,0-379,2)	348,5 (341,7-373,2) p1 = 0,09	339,0 (320,3- 345,2) p3 = 0,4	350,0 (320,3-367,6) p2 = 0,5
	3		334,5 (332,1-339,2) p1 = 0,08	337,0 (319,4-345,2) p3 = 0,06	343,0 (325,5-356,6)
	10		348,1 (341,4-56,7) p1 = 0,09	337,0 (320,1-350,5) p3 = 0,06	340,0 (325,355,3) p2 = 0,05
WBC, 10 ⁹ /l	0	4,5 (3,8-9,1)	4,1 (3,8-5,3) p1 = 0,8	4,3 (3,5-5,6) p3 = 0,6	5,6 (4,9-6,6) p2 = 0,9
	3		8,9 (6,7-9,6) p1 = 0,1	5,7 (5,1-7,6) p3 = 0,2	10,2 (10,2-10,2) p2 = 0,3
	10		9,6 (5,4-12,3) p1 = 0,03	8,2 (5,7-10,6) p3 = 0,05	11,6 (6,1-22,6) p2 = 0,03

Примечание: p1 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «дисфункция трансплантата»; p2 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «смертельный исход»; p3 — достоверность различий между группами «смертельный исход» и «дисфункция трансплантата».

Таблица 10 — Индекс LMR у реципиентов в день операции и на посттрансплантационном этапе (Me, Q1, Q3)

Сутки	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантата (n=18)	Смертельный исход (n=10)
0	4,6 (3,8-5,2)	2,7 (1,8-3,0)	1,2 (1,0-2,7)
3	2,3 (1,9-2,6)	1,5 (1,1-2,1)	4,0 (3,5-4,7)
10	1,1 (1,0-1,7)	1,6 (1,2-2,3)	2,2 (1,6-2,6)

Следующий индекс, который был рассчитан, — это отношение нейтрофилов к лимфоцитам. Согласно исследованиям Hayashi H. NLR > 5 является также простым и полезным косвенным маркером различных воспалительных изменений и может выступать в качестве предиктора осложненного послеоперационного течения [129]. Вследствие чего мы оценили отношение нейтрофилов к лимфоцитам во всех исследуемых группах (Таблица 11).

Таблица 11 — Индекс NLR у реципиентов в день операции и на посттрансплантационном этапе (Me, Q1, Q3)

Сутки	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантата (n=18)	Смертельный исход (n=10)
0	1,5 (0,5-1,7)	2,3 (1,8-3,1)	2,8 (2,3-3,5)
3	11,0 (9,4-12,1)	16,0 (12,5-17,2)	7,0 (5,6-8,4)
10	6,0 (4,3-7,1)	4,4 (3,6-5,2)	8,9 (6,1-9,2)

На дотрансплантационном этапе показатель NLR во всех группах не превышал допустимое пороговое значение. В посттрансплантационном периоде в группе с благоприятным течением данный параметр увеличивался в 2,2 раза и в 1,2 раза на 3 и 10-е сутки соответственно. В то время как в группе с дисфункцией трансплантата NLR достигал своего максимума к 3 суткам и превышал пороговое значение в 3,2 раза ($NLR > 5$), а на 10-е сутки снижался, но не достигал предоперационного уровня. В группе реципиентов со смертельным исходом данный параметр постепенно увеличивался на 3-и сутки в 1,4 раза и на 10-е сутки — в 1,7 раза от порогового значения ($NLR > 5$).

Еще одним индексом, который используется в качестве неинвазивного прогностического косвенного маркера фиброза и характера воспалительной реакции печени, является PLR [126] (Таблица 12).

Таблица 12 — Индекс PLR у реципиентов в день операции
и на посттрансплантационном этапе (Me, Q1, Q3)

Сутки	Благоприятный исход (n-16)	Дисфункция трансплантата (n-18)	Смертельный исход (n-10)
0	77,8 (75,3-83,6)	91,8 (88,3-96,5)	119,0 (110,1-120,3)
3	94,2 (86,2-97,8)	106,6 (95,6-110,4)	62,5 (59,2-67,2)
10	94,1 (87,6-98,2)	77,6 (69,3-81,3)	91,8 (89,1-96,7)

В группе с ДТ заметное повышение индекса было выявлено на 3 сутки и было в 1,1 раза больше относительно порогового значения — 98,5, предложенного Ren A. с соавторами. У реципиентов со смертельным исходом повышение PLR было зафиксировано только на трансплантационном этапе. Индекс PLR у пациентов с благоприятным исходом был ниже порогового значения.

Вместе с тем рекомендуют использовать все вышепредставленные индексы совместно с оценкой уровня тромбоцитов в ранние послеоперационные сроки для повышения прогностической точности (Таблица 13) [129].

Таблица 13 — Динамические изменения количества тромбоцитов реципиентов в день операции и после ОТП (Me, Q1, Q3)

Показатели	Сутки	Контрольная группа (n=35)	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантат (n=18)	Смертельный исход (n=10)
PLT, 10 ⁹ /л	0	240,0 (192,0-318,0)	109,0 (93,0-146,0) p1 = 0,4	101,0 (75,0-166,0) p3 = 0,1	143,0 (120,0-170,0) p2 = 0,1
	3		66,0 (44,0-90,0) p1 = 0,01	32,0 (21,0-81,0) p3 = 0,06	75,0 (18,0-98,0) p2 = 0,5
	10		113,0 (63,0-197,0) p1 = 0,04	101,0 (92,0-110,0) p3 = 0,06	101,0 (72,0-140,0) p2 = 0,04

Примечание: p1 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «дисфункция трансплантата»; p2 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «смертельный исход»; p3 — достоверность различий между группами «смертельный исход» и «дисфункция трансплантата».

Это связано с тем, что в настоящее время существуют данные об активном участии PLT в восстановительных процессах печени как за счет прямого контакта с собственными клетками печени, так и опосредованно, за счет синтеза HGF и других цитокинов [95, 121, 124]. Кроме того, S. Nakanuma с соавторами установили, что после трансплантации печени часть тромбоцитов оседает в пространстве Диссе и может служить одной из причин повреждения трансплантата [70]. Таким образом, количество тромбоцитов в ранние сроки после трансплантации предложили рассматривать в качестве прогностического

маркера течения послеоперационного периода. Так, Beltrame P. в своем исследовании сообщил о том, что низкое содержание тромбоцитов у реципиентов печени связано с плохим восстановлением трансплантата и плохими краткосрочными и отдаленными последствиями [54].

Основываясь на упомянутых выше литературных данных, мы решили оценить диагностическую значимость количества тромбоцитов в ранние послеоперационные сроки в нашем исследовании (Таблица 14).

Таблица 14 — Диагностические характеристики количества тромбоцитов при дисфункции трансплантата на 3 и 10 сутки

Сутки	Cut-off	ДЧ	ДС	AUC
3	$56 \times 10^9/l$	65	54	0,46
10	$85 \times 10^9/l$	43	68	0,57

Поскольку значения диагностической чувствительности и специфичности были низкими, то можно сделать вывод о том, что одноточечное измерение количества тромбоцитов в раннем посттрансплантационном периоде не имеет никакой диагностической значимости. Поэтому мы сконцентрировали внимание на динамических изменениях PLT у пациентов.

В результате нами была выявлена определенная тромбоцитарная реакция. На предтрансплантационном этапе во всех группах определялась выраженная тромбоцитопения: достоверное снижение количества тромбоцитов, что является характерным для кандидатов на ОТП с терминальной стадией заболевания печени. При этом в группах с благоприятным исходом и с дисфункцией в день операции мы наблюдаем более выраженную тромбоцитопению. Однако некоторые авторы считают, что это может являться благоприятным фоном для трансплантации, так как при реперфузии донорской печени снижается шанс возникновения сосудистых осложнений — тромбозов [95, 121, 159, 164].

В постоперационном периоде наблюдалось снижение количества тромбоцитов, которое достигло своего самого низкого значения к 3 суткам в

группах с благоприятным исходом, с дисфункцией трансплантата и со смертельным исходом на 40%, 69%, 49% соответственно относительно дооперационных значений ($p < 0,05$). На 10 сутки прослеживалось постепенное увеличение числа тромбоцитов на 42% в группе с благоприятным исходом, на 69% — в группе с дисфункцией относительно значений 3 суток каждой группы соответственно ($p < 0,05$). При этом в группе со смертельным исходом наблюдалось незначительное повышение числа тромбоцитов на 26% относительно 3 суток ($p > 0,05$).

Следует отметить, что в ходе исследования на дотрансплантационном этапе была выявлена тромбоцитопения, которая часто встречается у кандидатов на трансплантацию и имеет несколько причин возникновения: секвестрация клеток в селезенке вследствие портальной гипертензии, снижение синтеза тромбопоэтина гепатоцитами, аутоиммунное повреждение тромбоцитов [118]. Для установления характера тромбоцитопении принято использовать такой показатель, как средний объем тромбоцитов (MPV). MPV — это один из параметров рутинного анализа крови, который отражает степень зрелости тромбоцитов. Принято считать, что если $MPV > 7,9$ фл, то уменьшение количества тромбоцитов связано с их повышенным разрушением в селезенке, если же $MPV < 7,4$ фл, то тромбоцитопения носит гипопродуктивный характер, обусловленный снижением пролиферативной активности клеток мегакариоцитарного дифферона [21]. Оценив показатель MPV, нами было установлено, что до операции, независимо от исхода, тромбоцитопения носила гипердеструктивный тип ($MPV > 7,9$ фл). Повышенное разрушение тромбоцитов чаще всего связывают с увеличением селезенки в результате портальной гипертензии, которая встречается у всех пациентов с терминальной стадией заболевания печени на дотрансплантационном этапе (Таблица 15) [168].

Что же касается тромбоцитопении у реципиентов после ОТП, то, по данным литературы, она встречается примерно у 90% всех исследуемых [54]; в нашем наблюдении она имела гипердеструктивный характер ($MPV > 7,9$). Механизм снижения количества «кровяных пластинок» к 3 суткам многофакторный, но

ведущая роль отводится секвестрации их в трансплантате, захвату клетками Купфера при реперфузии [121].

Таблица 15 — MPV у реципиентов в день операции
и на посттрансплантационном этапе (фл) (Me, Q1, Q3)

Сутки	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантата (n=18)	Смертельный исход (n=10)
0	8,3 (7,9-8,7)	8,5 (8,1-9,6)	7,8 (6,5-8,6)
3	10,2 (9,5-10,7)	10,4 (9,8-10,9)	7,9 (6,2-8,3)
10	10,1 (9,6-11,6)	11,0 (10,5-12,5)	10,6 (9,7-11,4)

Кроме того, высокие значения MPV, как сообщается в некоторых публикациях, косвенно отражают степень выраженности воспалительного процесса в печени при патологических состояниях, связанных с данным органом [58, 141]. В нашем исследовании MPV находился в пределах референтного интервала, однако в условиях сниженного количества тромбоцитов было принято решение оценить отношение MPV фл / PLT× 10⁹/л. Возможно, это так же, как и в упомянутой публикации, косвенно отражает выраженность воспалительной реакции (Таблица 16).

Таблица 16 — MPV/PLT у реципиентов в день операции и на
посттрансплантационном этапе (Me, Q1, Q3)

Сутки	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантата (n=18)	Смертельный исход (n=10)
0	0,7 (0-1,3)	0,8 (0-1,7)	0,5 (0-1,1)
3	1,6 (1,2-2,6)	3,2 (2,1-3,6)	1 (0-1,5)
10	0,8 (0-1,3)	1 (0-1,4)	1 (0-1,3)

Было обнаружено, что индекс MPV/PLT был максимально увеличен на 3-и сутки во всех группах, однако в группе реципиентов с ДТ был выше в 2 раза относительно благоприятного исхода и в 3,2 раза — относительно группы со смертельным исходом. К 10 суткам индекс снижался в группах реципиентов с благоприятным исходом и ДТ, в то время как у реципиентов со смертельным исходом отношение MPV/PLT оставалось на том же уровне, что и на 3 сутки.

Поскольку в нашем исследовании были выявлены достоверные динамические изменения количества тромбоцитов, а ранее в литературе описывалось участие продуктов тромбоцитов, высвобождаемых при их активации, в восстановительных процессах печени, то мы сочли необходимым оценить агрегационную активность PLT (турбодиметрический оптический метод по Брону с индуктором АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл, референсный интервал 50-70%) (Таблица 17) [43].

Таблица 17 — Амплитуда кривой светопропускания с использованием индуктора АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл (%), (Me, Q1, Q3)

Благоприятный исход (n-16)	Дисфункция трансплантата (n-18)	Смертельный исход (n-10)
26,0 (19,0- 59,0) p1 = 0,04	10,0 (7,5-14,0) p2 = 0,1	20,5 (7,7-35,5) p3 = 0,8

Примечание: p1 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «дисфункция трансплантата»; p2 — достоверность различий между группами «благоприятный исход» и «смертельный исход»; p3 — достоверность различий между группами «дисфункция трансплантата» и «смертельный исход».

Исследование проводили на 3-и сутки, так как именно в этот день регистрировалось минимальное количество тромбоцитов, что, возможно, влияет на дальнейшее развитие посттрансплантационного исхода. Во всех группах

амплитуда кривой светопропускания была ниже порога допустимых значений, то есть агрегационная активность была снижена, что отчасти обусловлено тромбоцитопенией и применением анестетиков [34]. Однако более выраженное падение функции тромбоцитов отмечалось в группе реципиентов с ДТ. Показатель амплитуды кривой светопропускания был достоверно ниже (в 2,6 раза) относительно группы пациентов с благоприятным исходом.

Исходя из полученных результатов агрегатометрии и литературных данных об имеющемся внутриклеточном энергодефиците в результате ИПР, нами было предложено изучить влияние природного метаболита (янтарной кислоты) на агрегационную функцию тромбоцитов. В качестве препарата, содержащего янтарную кислоту, использовали цитофлавин. На первом этапе оценили действие данного препарата в качестве дополнительного индуктора к АДФ у пациента с нормальной функцией PLT (Рисунок 6).

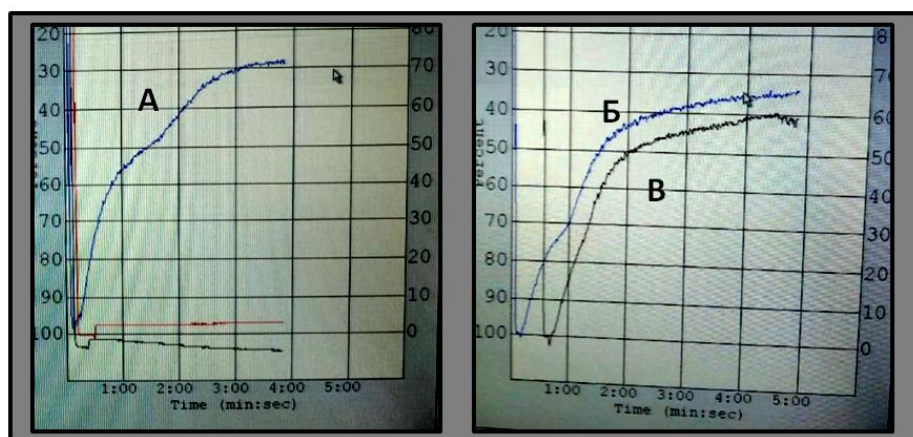


Рисунок 6 — Агрегатограмма реципиента с нормальной функцией тромбоцитов (А — с индуктором АДФ; Б — с индуктором АДФ и 5 мкл цитофлавина; В — с индуктором АДФ и 2 мкл цитофлавина)

Классический индуктор агрегации вносили в пробу в стандартном количестве, а оптимальную концентрацию цитофлавина определили в предварительном исследовании.

Под влиянием основного индуктора наблюдали классическую двухволновую агрегацию, амплитуда была 70%, то есть в пределах нормы. При

использовании в качестве дополнительного индуктора 5 мкл цитофлавина значительных изменений в агрегатограмме выявлено не было. При добавлении 2 мкл препарата наблюдали более быстрое наступление 2 волны, амплитуда также была в пределах нормы — 67%. Поскольку теория о том, что цитофлавин может быть использован в качестве индуктора агрегации тромбоцитов, подтвердилась, то следующим этапом мы провели оценку функции PLT у реципиента после ОТП (Рисунок 7).

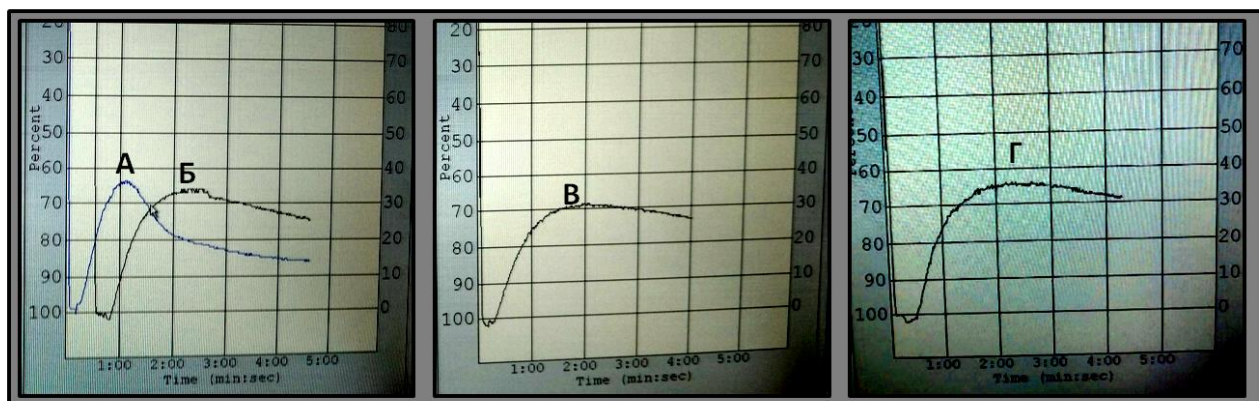


Рисунок 7 — Агрегатограмма реципиента после ОТП (А — с индуктором АДФ; Б — с индуктором АДФ и 1 мкл цитофлавина; В — с индукторов АДФ и 5 мкл цитофлавина; Г — с индуктором АДФ и 2 мкл цитофлавина)

Изучая полученные результаты пациента после ОТП, было установлено снижение агрегации тромбоцитов: амплитуда — 32%, вторая волна отсутствует и отмечается активная дезагрегация. При использовании 1 мкл, 5 мкл и 2 мкл препарата наблюдали пролонгирование 1 волны и более медленную дезагрегацию, амплитуда равнялась 35%, 32%, 35% соответственно. В связи с полученными экспериментальными данными можно предположить, что препарат «Цитофлавин» обладает не только энергокорректирующим, антиоксидантным действием, но и может выступать в качестве индуктора активации тромбоцитов, что приводит к высвобождению из последних цитокинов и других биологических веществ, участвующих в восстановительных процессах в печени.

Таким образом, после ОТП происходит усиленное разрушение тромбоцитов, снижение их агрегационной активности, которое наблюдалось во всех группах. Однако у реципиентов с ДТ и со смертельным исходом тромбоцитопения носила более выраженный характер (снижение на 69% и 49%), что обусловлено захватом PLT в печени клетками Купфера при реперфузии [115, 129]. Активация макрофагов усиливает синтез некоторых цитокинов, что приводит к более выраженному воспалительному ответу, которое возникает в следствие ИПП и подтверждается повышением индексов: NLR, PLR, MPV/PLT — у реципиентов с ДТ и LMR, NLR, MPV/PLT — у пациентов со смертельным исходом. В то же время восстановление количества тромбоцитов к предоперационным значениям, происходившее к 10 дню на фоне нормальных значений индексов в группе с благоприятным исходом и в группе с дисфункцией, свидетельствует о функционировании трансплантата и отличает эти группы от группы со смертельным исходом. Помимо тромбоцитопении в этой группе сохраняются повышенные значения NLR, что, возможно, свидетельствует о более продолжительном воспалительном ответе.

3.2 Динамическая оценка биохимических показателей у реципиентов в периоперационном периоде

Наряду с параметрами клинического анализа периферической крови были исследованы АЛТ, АСТ, билирубин, альбумин и МНО. Выбор показателей был обусловлен тем, что ранее авторы предложили использовать для определения ДТ печени следующие критерии: билирубин ≥ 10 мг/мл, международное нормализованное отношение $\geq 1,6$, аминотрансферазы ≥ 1500 МЕ/л [137]. Совместно с этим в большом проспективном исследовании было показано, что повышение более 1500 МЕ/мл АСТ на 3 сутки после операции и АСТ, АЛТ на 7 сутки являются предикторами ранней дисфункции трансплантата печени [103]. Поэтому мы обратили внимание на изменение этих показателей в периоперационном периоде (Таблица 18).

Таблица 18 — Сравнение динамических изменений биохимических параметров реципиентов
в день операции и на посттрансплантационном этапе (Me, Q1, Q3)

Показатели	Сутки	Благоприятный исход (n=16)	Дисфункция трансплантата (n=18)	Смертельный исход (n=10)
1	2	3	4	5
АЛТ МЕ/л	0	45,0 (35,0-71,0) p1 = 0,5	56,6 (31,2-88,7) p3 = 0,3	33,0 (29,0-74,0) p2 = 0,5
	3.	377,0 (283,0-727,0) p1 = 0,5 p* = 0,04	323,0 (198,0-504,0) p3 = 0,07 p* = 0,03	820,0 (358,2-1231,5) p2 = 0,1 p* = 0,01
	10.	147,0 (104,0-198,0) p1 = 0,08 p** = 0,03	94 (55,0-148,0) p3 = 0,54 p** = 0,01	133,0 (53,0-244,0) p2 = 0,7 p** = 0,01
АСТ МЕ/л	0	66,0 (45,0-91,0) p1 = 0,8	60,0 (39,5-138,2) p3 = 0,6	55,0 (45,0-89,0) p2 = 0,9
	3	207,0 (168,0-302,0) p1 = 0,1 p* = 0,01	171,0 (107,0-250,0) p3 = 0,01 p* = 0,02	605,0 (303,3-870,0) p2 = 0,03 p* = 0,01
	10	53,0 (42,0-62,0) p1 = 0,03 p** = 0,02	28,0 (17,0-41,0) p3 = 0,08 p** = 0,02	66,5(34,5-129,5) p2 = 0,7 p** = 0,03
Билирубин общий мг/мл	0	38,2 (28,7-62,6) p1 = 0,4	48,0(35,0-86,0) p3 = 0,1	78,8 (70,3-138,0) p2 = 0,04
	3	29,5 (19,3-80,3) p1 = 0,1 p* = 0,04	26,9 (15,8-45,9) p3 = 0,06 p* = 0,3	55,6 (24,1-75) p2 = 0,5 p* = 0,08

1	2	3	4	5
	10	23,7 (20,4-37) p1 = 0,4 p** = 0,03	17,6 (12,7-26,5) p3 = 0,04 p** = 0,04	32,5 (18,1-101,3) p2 = 0,4 p** = 0,07
Альбумин г/л	0	33,2 (28,5-35,8) p1 = 0,7	30,0 (27,0-35,0) p3 = 0,6	30,4 (25,8-31,7) p2 = 0,3
	3	27,8 (25,3,0-60,0) p1 = 0,9	28,0 (25,4-30,3) p3 = 0,04	23,3 (22,0-24,9) p2 = 0,04
	10	36,2 (31,1-37,7) p1 = 0,3 p** = 0,02	33,3 (31,0-35,9) p3 = 0,07 p** = 0,05	30,9 (27,0-31,8) p2 = 0,06
МНО	0	1,5 (1,4-1,6) p1 = 0,3	1,3 (1,2-1,4) p3 = 0,4	1,5 (1,4- 1,6) p2 = 0,06
	3	1,2 (1,2-1,3) p1 = 0,08 p* = 0,3	1,2 (1,1-1,3) p3 = 0,09 p* = 0,2	1,2 (1,1-1,2) p2 = 0,3 p* = 0,5
	10	1,5 (1,1-1,5) p1 = 0,3 p** = 0,8	1,1 (1,0- 1,2) p3 = 0,4 p** = 0,02	1,1 (1,0-1,1) p2 = 0,04 p** = 0,2

Примечание: p1 — достоверность различий между группой с благоприятным течением послеоперационного периода и группой с дисфункцией; p2 — достоверность различий между группой с благоприятным течением и группой со смертельным исходом; p3 — достоверность различий между группой с дисфункцией трансплантата и группой со смертельным исходом; p* — достоверность различий между 0 сутками и 3 сутками в одной группе (непараметрический критерий Вилкоксона); p** — достоверность различий между 3 сутками и 10 сутками в одной группе (непараметрический критерий Вилкоксона).

Активность АЛТ в группах пациентов с благоприятным течением посттрансплантационного периода, с дисфункцией трансплантата и со смертельным исходом к 3 суткам увеличивалась в 8,3, 5,7, 24,8 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению со значениями 0 суток. Затем, к 10 дню уровень снизился в 3,2, 1,6, 4 раза, но не достиг дооперационных значений. Одновременно с повышением АЛТ на 3 сутки наблюдалось повышение АСТ во всех группах в 3,1, 2,8, 11 раз по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$), а к 10 суткам происходило восстановление исходной концентрации АСТ только в группе с благоприятным исходом и ДТ. При этом надо отметить, что активность трансаминаз достигала критических значений к 3 суткам во всех группах, но не превышала рекомендуемого порогового значения (1500 МЕ/л). Вместе с тем было выявлено достоверное динамическое снижение концентрации билирубина во всех группах в 1,2, 1,7, 1,4 раза на 3 сутки и в 1,2, 1,5, 1,7 раза на 10 день соответственно. Только у реципиентов с ДТ и у пациентов с благоприятным исходом уровень билирубина приближался к норме. В то же время отмечалась тенденция к снижению уровня альбумина во всех группах относительно значений до операции. На 10 день концентрация альбумина повышалась у пациентов с благоприятным исходом, ДТ и со смертельным исходом в 1,3, 1,1, 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$), но достигло значений нормы только у благоприятного исхода. Кроме изменений биохимических параметров было зафиксировано динамическое снижение МНО в группах с ДТ и со смертельным исходом. Однако МНО не превышало порогового значения ($\geq 1,6$) ни в одной группе.

Поскольку АЛТ и АСТ являются ферментами, которые содержатся внутри гепатоцитов, то увеличение этих параметров в крови свидетельствует о повреждении собственных клеток печени. Таким образом, повышение активности аминотрансфераз на дотрансплантационном этапе у реципиентов связано с цитолитическим синдромом на фоне длительного воспаления при декомпенсированной стадии цирроза. Также до операции у всех реципиентов отмечали синдром печеночно-клеточной недостаточности, что подтверждалось низким уровнем альбумина, повышенными концентрациями билирубина и

трансаминаз. В раннем послеоперационном периоде увеличение АЛТ и АСТ в 3-4 раза является следствием массивного повреждения гепатоцитов в результате ИРП [120, 94]. Вместе с тем стоит отметить, что после трансплантации такой показатель, как концентрация билирубина, снижался во всех группах на 3 сутки относительно дооперационных значений, что отчасти свидетельствует о достаточной экскреторной функции трансплантата. Концентрация альбумина достигла значений нормы к 10 дню только у реципиентов с благоприятным исходом, что указывает на достаточную синтетическую функцию трансплантированного органа.

Стоит отметить, что в послеоперационном периоде в группе реципиентов с дисфункцией трансплантата уровни критериев АЛТ, АСТ, МНО не превышали установленных авторами пороговых значений в ранний послеоперационный период. Более того, на 10 сутки показатели АСТ, МНО приближались к нормальным значениям. Из чего можно предположить, что пороговые значения показателей, которые ранее были предложены, являются неэффективными для установления диагноза «дисфункция печеночного трансплантата».

3.3 Изменения уровня плазменных цитокинов у реципиентов после ортотопической трансплантации печени и пациентов до трансплантации

В настоящее время цитокинам отводят важную роль как в развитии цирроза, определяя тяжесть заболевания, так и в детерминировании характера посттрансплантационного периода [29, 62, 88, 90]. Ранее в исследованиях было показано, что под воздействием TNF-alpha происходит трансформация звездчатых клеток в миофибробласты, которые усиливают фибротическое повреждение печени [153]. Также указывалась роль про- и противовоспалительных цитокинов в посттрансплантационном исходе [158].

Поэтому в данной работе возникла необходимость проведения сравнительного анализа цитокинового статуса пациентов в листе ожидания и

реципиентов после трансплантации спустя 3 месяца. Контрольную группу составили 35 практически здоровых доноров крови. Для определения концентрации цитокинов использовали мультиплексную панель, включающую 45 плазменных цитокинов различного биологического действия: про- и противовоспалительные интерлейкины, хемокины, факторы роста, интерфероны. В пределах нижнего и верхнего уровней чувствительности тест-системы выявлялся 21 цитокин: IL-12, IL-4, IL-6, TNF-alpha, 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 (Таблица 19, 20). Уровни 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, IL-31, IL-1 alpha, TNF, Eotaxin, GRO, MCP-1, MIP-1, SDF, SCF были либо ниже предела чувствительности, либо выявлялись в небольшом количестве образцов.

Таблица 19 — Сравнительная характеристика концентраций факторов роста в плазме крови реципиентов после ОТП (спустя 3 месяца) и пациентов, находящихся в листе ожидания (pg/ml) (Me, Q1, Q3)

Показатели	Контрольная группа (n = 35)	Пациенты в ЛО (n = 10)	Реципиенты после ОТП (n = 19)
1	2	3	4
PDGF	552,0 (457,0-1753,6)	370,0 (289-416,8) p2 = 0,03	270,0 (225,5-333,5) p1 = 0,001 p3 = 0,14
PIGF	363,2 (290,9-481,5)	47,2 (1,6-63,7) p2 = 0,01	25,7 (1,6-271,6) p1 = 0,008 p3 = 0,77
VEGF-A	990,5 (807,4-1505,8)	94,4 (46,3-205,4) p2 = 0,05	196,8 (70,9-299,1) p1 = 0,001 p3 = 0,29
BDNF	2077 (1037,7-3548,9)	196,6 (90,7-294,4) p2 = 0,03	234,7 (149,3-345,3) p1 = 0,01 p3 = 0,37

1	2	3	4
NGF	63,4 (12,1- 78,5)	124,7 (69,5- 145,6) p2 = 0,4	68,0 (54,6-76,7) p1 = 0,1 p3 = 0,07
HGF	229, 3 (176,4-256,4)	650,7 (534,6-689,2) p2 = 0,3	140,9 (118,4-156,7) p1 = 0,1 p3 = 0,5
TNF alpha	0,9 (0-1,2)	41,1 (32,6-48,6) p2 = 0,4	0 (0-1,3) p1 = 0,2 p3 = 0,07
FGF	16,8 (6,7-21,1)	22,0 (18,2-23,5) p2 = 0,06	0 (0-1,1) p1 = 0,3 p3 = 0,05
EGF	32,5 (29,3-33,6)	48,3 (42,3-51,3) p2 = 0,07	30,4 (22,6-32,2) p1 = 0,06 p3 = 0,07
GM-CSF	5,5 (0,7-6,5)	222,0 (145,3-234,5) p2 = 0,03	0,1 (0-2,1) p1 = 0,1 p3 = 0,06

Примечание: p1 — достоверность различий между контрольной группой и группой реципиентов после ОТП; p2 — достоверность различий между контрольной группой и группой реципиентов в листе ожидания; p3 — достоверность различий между группой реципиентов в листе ожидания и группой реципиентов после ОТП.

При анализе результатов обращает внимание снижение концентрации представителей семейства сосудисто-эндотелиальных факторов роста. Уровень PIGF, VEGF снижался у пациентов, стоящих в листе ожидания в 7,6 и в 10,4 раза относительно контрольной группы ($p < 0,05$). В группе реципиентов после трансплантации содержание в плазме данных факторов роста достоверно уменьшалось в 14,1 и в 5 раз по отношению к контролю. При этом статистически значимых различий между исследуемыми группами выявлено не было.

Кроме того, мы оценили концентрацию факторов роста, которые активно участвуют в процессе фиброгенеза в печени — PDGF, TNF-alpha, GM-CSF.

Уровень PDGF снижался в обеих группах в 1,4 и в 2 раза соответственно относительно контроля ($p < 0,05$). GM-CSF был повышен только в группе пациентов из ЛО в 44,4 раза также по отношению к контролю ($p < 0,05$). Содержание TNF-alpha в плазме пациентов из ЛО имело тенденцию к увеличению. Достоверных различий между группами выявлено не было.

Факторы роста HGF, EGF, FGF принято считать факторами, активно участвующими в восстановительных процессах при повреждении ткани печени. Концентрации EGF, FGF достоверно не изменялись в обеих группах по отношению к контролю. Концентрация гепатоцитарного фактора роста имела тенденцию к повышению лишь у пациентов из ЛО.

Вместе с тем достоверные различия между контрольной группой и пациентами до и после ОТП были выявлены по уровню BDNF. Он был ниже в 10,5 раза у пациентов из ЛО и в 8,8 раза — у реципиентов после ОТП. Значимых различий между группами по показателю NGF выявлено не было.

Далее, мы провели оценку уровней про- и противовоспалительных интерлейкинов и цитокинов (Таблица 20).

Таблица 20 — Сравнительная характеристика концентраций факторов роста в плазме крови реципиентов после ОТП (спустя 3 месяца) и пациентов, находящихся в листе ожидания (pg/ml) (Me, Q1, Q3)

Показатели	Контрольная группа (n = 35)	Пациенты в ЛО (n = 10)	Реципиенты после ОТП (n = 19)
1	2	3	4
IL-1RA	326,1 (0-502,2)	42,7 (42,7-42,7) p2 = 0,02	42,7 (0-42,7) p1 = 0,04 p3 = 0,49
IL-4	0 (0- 0,5)	38,1 (0-39,4) p2 = 0,2	0 (0-1,1) p1 = 0,5 p3 = 0,08
IL-6	0,1 (0-0,2)	12,8 (10,4-25,4) p2 = 0,02	10,4 (5,2-10,4) p1 = 0,05 p3 = 0,11

1	2	3	4
IL-7	17,5 (9,2-23,1)	2,1 (0-3,2) p2 = 0,4	0,1 (0-1,2) p1 = 0,09 p3 = 0,6
IL-10	0 (0-1,1)	3,1 (0-3,1) p2 = 0,01	0 (0-2,1) p1 = 0,92 p3 = 0,15
IL-12	2,5 (0,2-3,5)	7,4 (4,5-8,5) p2 = 0,1	0 (0-0) p1 = 0,9 p3 = 0,08
MIP-1 alpha	13,7 (10,2-15,1)	94 (92,1-98,2) p2 = 0,09	7,3 (4,5-8,1) p1 = 0,9 p3 = 0,14
RANTES	186,8 (167,2-192,3)	141,9 (132,1-156,3) p2 = 0,06	113,8 (110,3-132,2) p1 = 0,2 p3 = 0,15
LIF	16,8 (13,1-21,2)	1,9 (0-22,0) p2 = 0,23	0 (0-0) p1 = 0,05 p3 = 0,21
CXCL8/IL-8	0,1 (0-3,6)	4,7 (0,5-9,6) p2 = 0,03	0,3 (0-2,4) p1 = 0,23 p3 = 0,01

Примечание: p1 — достоверность различий между контрольной группой и группой реципиентов после ОТП; p2 — достоверность различий между контрольной группой и группой реципиентов в листе ожидания; p3 — достоверность различий между группой реципиентов в листе ожидания и группой реципиентов после ОТП.

Концентрация противовоспалительного интерлейкина-1RA была снижена в группе пациентов из ЛО в 7,7 раза и у реципиентов после ОТП — в 7,7 раза относительно контроля ($p < 0,05$). В то же время уровень представителя этой же группы IL-10 статистически значимо увеличивался у пациентов из ЛО в 3 раза по отношению к контрольной группе. У реципиентов после ОТП данный интерлейкин не изменялся. Достоверных изменений между группами по концентрациям противовоспалительных цитокинов выявлено не было.

К представителям группы провоспалительных интерлейкинов и хемокинов относят: IL-6, IL-8, IL-12, MIP-1 alpha, порой и LIF. В группе пациентов из ЛО достоверно увеличивалась концентрация IL-6 на 12 единиц, а IL-8 — на 38 единиц относительно контроля. Также прослеживалась тенденция к повышению MIP-1 alpha. У реципиентов после ОТП уровень IL-6 был больше на 10 единиц, а концентрация LIF снижалась на 16 единиц по отношению к контролю ($p < 0,05$). При этом содержание IL-12, MIP-1 alpha у реципиентов из ОТП имело тенденцию к снижению.

Как было установлено ранее в исследовании RANTES, IL-7 коррелируют со степенью выраженности фиброза печени [29]. Однако в нашем исследовании значимых изменений между группами по данным параметрам выявлено не было.

Таким образом, у пациентов из ЛО было выраженное снижение концентрации представителей семейства сосудисто-эндотелиальных факторов роста, обусловленное тяжестью поражения печени и развивающимися при этом полиорганными расстройствами. Ранее считалось, что VEGF участвует только в ангиогенезе, влияет на проницаемость сосудов и является маркером эндотелиальной дисфункции [96]. Однако стало известно об участии данного фактора роста в нейрогенезе, нейропротекции, миграции и выживании нейронов [19]. Возможно, наблюдаемое снижение данного фактора у пациентов из ЛО сопряжено с нейротоксическим повреждением клеток головного мозга при печеночной энцефалопатии, которая является неотъемлемым сопутствующим заболеванием при тяжёлой патологии печени. Вместе со снижением уровня VEGF происходило и уменьшение концентрации BDNF, что также указывает на тяжесть энцефалопатии у пациентов с декомпенсированной стадией цирроза [83].

Был выявлен дисбаланс факторов роста, участвующих в восстановительных процессах (HGF, EGF, FGF) и в фиброгенезе (PDGF, TNF-alpha, GM-CSF). Данные изменения являются характерными для пациентов из ЛО, что обусловлено необратимыми изменениями в паренхиме печени. Однако тромбоцитарный фактор роста, который продуцируется активированными звездчатыми клетками печени, с одной стороны, может отражать степень

выраженности фиброгенеза, а с другой — активно участвовать в восстановительных процессах в печени за счет стимуляции миграции тромбоцитов.

Интерлейкины и хемокины (IL-8, IL-6, IL-12 MIP1) были повышены или имели тенденцию к увеличению, что отражает имеющуюся воспалительную реакцию. IL-12 — это провоспалительный цитокин, который регулирует Th-1 ответ и усиливает активацию макрофагов, клеток Купфера, которые начинают синтезировать IL-8. Как сообщалось ранее, IL-8 является одним из основных провоспалительных цитокинов, его активный синтез провоцирует возникновение локального воспалительного процесса, который инициирует фиброгенез печени, активацию коллаген-продуцирующих звездчатых клеток печени и уменьшению количества функционирующих гепатоцитов печени [155, 156]. IL-6 чаще относят к классу провоспалительных цитокинов, также он является одним из ведущих митогенов гепатоцитов [65].

В то же время повышенная продукция противовоспалительного интерлейкина-10 играет решающую роль в ингибировании секреции провоспалительных цитокинов клеток Th1, однако его продукция на данной стадии заболевания недостаточна для разрешения процесса [62].

Исследование цитокинового профиля реципиентов через три месяца после трансплантации выявило снижение концентраций про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1RA, IL-10, IL-4, IL-12, LIF, MIP 1-alpha), что обуславливается иммуносупрессивной терапией, основной мишенью которой являются Т-клетки, продуцирующие эти цитокины [62, 156]. Поскольку IL-10 снижает экспрессию профибротических генов, включая TGF- β и TNF- α , то его недостаточная продукция, возможно, снижает шансы сохранности трансплантированного органа [62]. Сохранение низкой концентрации VEGF, BDNF, с одной стороны, возможно, обусловлено энцефалопатией, которая обусловлена нейротоксическим эффектом иммуносупрессивных препаратов [83]. Кроме этого, низкие концентрации VEGF свидетельствуют об эндотелиальной дисфункции, причиной которой может быть ИПР [94]. При этом низкий уровень PDGF, PIGF и VEGF, которые содержатся в

гранулах тромбоцитов, обусловлен снижением продукции этих клеток. Вероятно, это происходит в результате недостаточного синтеза тромбопоэтина печенью, поврежденной также длительной иммуносупрессией [95, 121, 124, 159]. Повышение уровня IL-6 способствует оптимизации восстановительных процессов в печени за счет связывания со своим рецептором на поверхности гепатоцитов и запуском сигнального пути STAT3, который приводит к активации синтеза ДНК в клетке [65, 88, 106, 109].

Все вышеизложенное указывает на взаимосвязь патофизиологических процессов, протекающих во время терминальной стадии цирроза печени и после трансплантации с плеiotропными эффектами цитокинов [127]. Поэтому, учитывая ранее полученные нами данные и публикации, указывающие на важную роль цитокинов в развитии посттрансплантационных осложнений [62], мы провели детальную оценку профиля плазменных цитокинов у реципиентов печени в зависимости от исходов ОТП [63, 68] (Таблица 21).

Таблица 21 — Сравнительная характеристика концентраций цитокинов в плазме крови реципиентов с благоприятным посттрансплантационным периодом и с осложнением в виде дисфункции трансплантата (pg/ml) (Me, Q1, Q3)

Показатели	Контрольная группа (n = 35)	Благоприятный исход (n = 8)	Дисфункция трансплантата (n = 11)
1	2	3	4
PDGF	552,0 (457,0-1753,6)	270,0 (242,0-317,4) p1 = 0,03	280,0 (196,6-346,1) p2 = 0,02 p3 = 0,06
BDNF	2077 (1037,7-3548,9)	187,7 (165,3-196,6) p1 = 0,04	196,6 (168,2-201,3) p2 = 0,02 p3 = 0,08
PIGF	363,2 (290,9-481,5)	1,7 (1,62-249,8) p1 = 0,04	98,7 (1,6-273) p2 = 0,01 p3 = 0,07
VEGF-A	990,5 (807,4-1505,8)	101,9 (54,5-295,8) p1 = 0,03	205,9 (158,2-251,4) p2 = 0,04 p3 = 0,06

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4
IL-6	0 (0-0)	10,5 (5,2-10,47) p1 = 0,03	10,5 (7,86-10,47) p2 = 0,04 p3 = 0,06
IL-15	1,5 (0-5,3)	3,5 (3,54-3,54) p1 = 0,03	3,5 (2,6-3,5) p2 = 0,07 p3 = 0,08
IL-1RA	326,1 (0-502,2)	42,7 (0,05-42,7) p1 = 0,01	42,7 (32,0-73,8) p2 = 0,06 p3 = 0,08
IL-8	0,1 (0-3,6)	0,1 (0-0,09) p1 = 0,06	3,6 (1,3-19,3) p2 = 0,04 p3 = 0,01

Примечание: p1 — достоверность между контрольной группой и группой пациентов с благоприятным течением послеоперационного периода; p2 — достоверность между контрольной группой и группой реципиентов с дисфункцией трансплантата; p3 — достоверность между группой реципиентов с дисфункцией трансплантата и группой пациентов с благоприятным течением послеоперационного периода.

Концентрации факторов роста PIGF и VEGF-A, отвечающие за ангиогенез, были снижены в 213 раз, 3,7 раза, в 9,8 раза и 4,8 раза в группе с благоприятным исходом и с ДТ соответственно ($p < 0,05$). Уровень BDNF был ниже в группе с благоприятным исходом в 11 раз и в группе с ДТ — в 10 раз относительно контроля ($p < 0,05$).

В группе пациентов с благоприятным течением содержание IL-15, IL-6 было выше в 0,4, 10,4 раза относительно группы сравнения. При развитии дисфункции трансплантата значение IL-1RA было достоверно ниже в 7,6 раза, а статистически значимое увеличение концентраций наблюдалось не только у IL-15, IL-6, но и у IL-8 в 0,4, 10,4, 3,6 раза относительно контрольной. Вместе с тем достоверные различия между группами реципиентов после ОТП были выявлены по IL-8.

Уровень данного цитокина был выше у реципиентов с ДТ в 3,6 раза относительно пациентов с благоприятным исходом.

Поскольку нас интересует предупреждение развития осложнений, то, исходя из данных таблицы 19, в которой статистически значимая зависимость была получена только между частотой развития дисфункции и уровнем интерлейкина-8 (Манна-Уитни; $p < 0,01$), на роль предиктора дисфункции трансплантата мы можем рассмотреть ИЛ-8. Данный показатель выше у реципиентов с дисфункцией трансплантата на 3,6, чем у пациентов с благоприятным послеоперационным течением и контрольной группы ($p < 0,01$).

Учитывая, что система цитокинов представляет собой «сеть» с неоднородными механизмами регуляции, мы считали необходимым проведение корреляционного анализа связи уровня ИЛ-8 с другими интерлейкинами и факторами роста (Таблица 22). Анализ полученных результатов в группе пациентов с благоприятным послеоперационным периодом позволил выявить статистически значимую умеренную положительную корреляцию между уровнями ИЛ-8 и ИЛ-6, ИЛ-15, ИЛ-1RA.

Таблица 22 — Корреляционная связь между уровнем интерлейкин-8 и других плазменных цитокинов в крови у реципиентов с благоприятным течением послеоперационного периода и у реципиентов с дисфункцией трансплантата

Показатели	ИЛ – 8			
	Коэффициент корреляции		p	
	Благоприятный исход	Дисфункция трансплантата	Благоприятный исход	Дисфункция трансплантата
PDGF-BB	0,439	-0,048	$p > 0,05$	$p > 0,05$
PIGF	-0,166	-0,262	$p > 0,05$	$p > 0,05$
VEGF-A	-0,036	-0,238	$p > 0,05$	$p > 0,05$
TNF-alfa	0,067	0,5	$p < 0,05$	$p > 0,05$
ИЛ-6	0,618	0,310	$p < 0,05$	$p > 0,05$
ИЛ15	0,618	0,292	$p < 0,05$	$p > 0,05$
ИЛ-1RA	0,655	0,381	$p < 0,05$	$p > 0,05$

В группе пациентов с ДТ не было выявлено достоверной корреляции концентрации IL-8 и других цитокинов, что указывает на вероятность нарушения механизмов иммунорегуляции восстановительных процессов в печени. Вместе с тем для установления зависимости исхода ОТП, а именно развития ДТ, от уровня исследуемых интерлейкинов и факторов роста мы рассчитали Хи квадрат. Мы установили, что из всех изучаемых показателей значимая зависимость была установлена только по показателю IL-8 ($p = 0,003$).

Выявленные сдвиги требовали оценки их клинической ценности, которая была выполнена в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические». Для оценки диагностической значимости теста был проведен ROC-анализ (Таблица 23).

Таблица 23 — Диагностические характеристики плазменных цитокинов при дисфункции трансплантата

Показатели	ДЧ	ДС	AUC
PDGF-BB	65	71	0,35
PIGF	79	59	0,59
VEGF-A	68	60	0,66
TNF-alfa	56	73	0,46
IL-6	59	62	0,58
IL15	69	80	0,61
IL-1RA	30	79	0,62
IL-8	75	91	0,87

В результате была рассчитана диагностическая чувствительность (ДЧ) теста — 75%, диагностическая специфичность (ДС) — 91% при cut-off 1,73. Отрицательная прогностическая ценность (ОПЦ) — 84,6%, которая показывает нам, с какой вероятностью человек с отрицательным результатом теста не будет иметь признаков дисфункции трансплантата. При этом значение площади под

кривой AUC (Area Under Curve) составило 0,87, что в соответствии с экспертной шкалой для значений AUC (0,9-1,0 — отличное, 0,8-0,9 — очень хорошее, 0,7-0,8 — хорошее, 0,6-0,7 — среднее) свидетельствует об очень хорошем качестве модели.

Полученные нами статистически значимые результаты свидетельствуют о том, что после ОТП наступает нарушение цитокинового баланса. При этом достоверные различия между группами пациентов с благоприятным течением послеоперационного периода и с дисфункцией трансплантата были выявлены только по уровню интерлейкин-8. Известно, что ИЛ-8 является одним из основных провоспалительных хемокинов, который синтезируется в основном клетками моноцитами и макрофагами [155]. Однако недавно было установлено, что при хронических заболеваниях печени основным источником ИЛ-8 становятся гепатоциты и клетки Купфера [156]. Так, в группе пациентов с дисфункцией трансплантата внутрипеченочный синтез интерлейкина-8 провоцирует миграцию активированных нейтрофилов, лейкоцитов и макрофагов в печень [62, 135], в результате чего усиливается воспалительный ответ. При этом ИЛ-8 также участвует в формировании профиброгенной микросреды за счет активации коллаген-продуцирующих звездчатых клеток печени. Более того, данный цитокин запускает трансдифференцировку зрелых гепатоцитов в холангиоциты с помощью активации сигнального пути Notch, тем самым уменьшая количество функционирующих гепатоцитов печени [155].

Резюме

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

Во-первых, дисфункция трансплантата сопровождается неспецифическими изменениями картины крови — анемии, лейкоцитозом. Особенной чертой данной патологии является характерное динамическое изменение уровня тромбоцитов с 0 до 10 суток: критическое снижением PLT (на 69% от дооперационных значений)

на 3 сутки, сопровождавшиеся выраженным падением агрегационной функции PLT в результате активного разрушения их в трансплантате, что влечет за собой усиление воспалительного ответа. Вместе с тем в этот же срок повышались индексы NLR, PLR, MPV/PLT, косвенно характеризующие воспалительную реакцию, что указывает нам на массивное повреждение ткани печени в результате ишемии и реперфузии в ходе ОТП. Тем не менее к 10 суткам прослеживается восстановление количества тромбоцитов на фоне нормальных значений индексов.

Во-вторых, ранний посттрансплантационный период у реципиентов с ДТ характеризуется синдромом печеночно-клеточной недостаточности и цитолитическим синдромом, возникающим в результате повреждения гепатоцитов вследствие ИРП. Однако значения АЛТ и АСТ не превышали 1500 МЕ/мл, что свидетельствует о недостаточной чувствительности данных параметров как ключевых маркеров, определяющих дисфункцию трансплантата.

В-третьих, можно заключить, что для пациентов до трансплантации характерно увеличение уровня провоспалительных цитокинов и факторов роста, участвующих в фиброгенезе, обусловливаемое глубоким и необратимым повреждением паренхимы печени. Снижение концентрации BDNF, возможно, связано с энцефалопатией, развившейся на фоне приема такролимуса. У реципиентов после операции наблюдается изменение концентраций цитокинов, что отражает степень иммунодепрессии на фоне приема иммуносупрессивной терапии и поддерживающей инфузионной терапии. IL-6 в комплексе с нормальным значением IL-8 характеризует восстановительные процессы печени. При этом было подтверждено активное участие интерлейкина-8 в патогенезе дисфункции трансплантата. Высокие значения ДС, ДЧ и ОПЗ метода, основанного на определении IL-8 у реципиентов в посттрансплантационном периоде, свидетельствуют о возможности использования его в клинической практике в качестве лабораторного критерия развивающейся дисфункции.

Глава 4.

ВЛИЯНИЕ ЦИТОФЛАВИНА НА ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ПЕЧЕНИ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ЧАСТИЧНОЙ ГЕПАТЭКТОМИИ

Дисфункция трансплантата, как и некоторые другие часто встречающиеся осложнения после ОТП, сопровождается уменьшением количества функционирующих гепатоцитов в результате действия нескольких факторов: ишемически-реперфузионное повреждение, влекущее за собой дисциркуляторные нарушения и развитие локального воспаления, недостаточный размер трансплантата, иммуносупрессивная терапия, степень стеатоза донорского органа, возраст донора и вирусный гепатит [76, 100]. В ходе клинического исследования нами были выявлены новые патогенетические механизмы, влияющие на развитие ДТ, в частности, усиление продукции IL-8, а также усиление разрушения тромбоцитов и снижение их агрегационной функции. Оценив полученные результаты, можно полагать, что существует несколько перспективных направлений фармакологической коррекции неинфекционных осложнений ОТП, в том числе ДТ.

Первый путь — это регулирование воспалительного ответа путем снижения уровня IL-8 (CXCL8). В настоящее время существует препарат репариксин, который является неконкурентным аллостерическим ингибитором активации рецепторов хемокинов CXCR1, CXCR2. В 2017-2018 годах был проведен ряд многоцентровых рандомизированных исследований (ClinicAllTrials.gov Identifier: NCT03031470; ID Number: TPL-RPL-01-Pilot Study of Reparixin for Early Allograft Dysfunction Prevention in Liver Transplantation) препарата, которые подтвердили его эффективность в качестве средства, профилактирующего развитие ДТ [111]. Хотя до сих пор данное средство не вошло в перечень рекомендуемых препаратов для коррекции ДТ и других осложнений.

Второй возможный путь может быть связан с увеличением количества тромбоцитов. В 2021 году Н. Yoshinari с соавторами показали, что применение в качестве препарата, увеличивающего популяцию тромбоцитов, тромбопоэтина, повышало содержание этих форменных элементов у детей-реципиентов после трансплантации [144]. Однако эти результаты имеют исследовательский характер. При этом стоит отметить тот факт, что при повышении количества тромбоцитов увеличивается риск развития сосудистых осложнений — тромбоза воротной вены и печеночной артерии.

Третий путь был основан на участии тромбоцитов в восстановительных процессах в печени (см гл. 1). Поскольку увеличение популяции PLT приводит к развитию осложнений, то мы посчитали возможным воздействовать на агрегационную способность тромбоцитов, тем самым увеличить процент активированных тромбоцитов и факторов, участвующих в восстановительных процессах в печени. Кроме того, у реципиентов с ДТ в результате ИПР происходит уменьшение массы функционирующих гепатоцитов, а оставшиеся клетки испытывают энергодефицит. Поэтому эффективным методом коррекции данного состояния являются препараты, способные активизировать и оптимизировать восстановительные процессы в печени. При этом стимуляция восстановительных процессов в печени после повреждения по-прежнему остается актуальной и труднорешаемой задачей современной гепатологии [30, 33, 106].

Ранее коллективом кафедры патологической физиологии Уральского государственного медицинского университета были изучены морфофункциональные аспекты регенерации печени после частичной гепатэктомии (ЧГ) [5, 6, 15, 17, 30, 41]. Было установлено, что адаптивный рост печени после ЧГ, осуществляемый только за счет имеющихся ресурсов в системе, имеет две пролиферативные волны, которые заканчиваются к первым 72 часам после операции [30, 33]. Однако иногда метаболического потенциала бывает недостаточно для (спонтанной) адаптации и полного восстановления структуры, функций органа по причине обширного и/или длительного повреждения печени [7, 26]. В связи с этим большую популярность набирают исследования, связанные

с поиском способов коррекции, стимуляции адаптивного роста печени после повреждения на модели регенерирующей печени с использованием различных фармакологических препаратов [148]. Ранее такие препараты были объединены в группу гепатопротекторных средств, призванных повышать устойчивость печени к патологическим воздействиям [26, 148]. Более точное описание предложил академик РАМН, профессор В.Т. Ивашкин: «Гепатопротекторы — это фармакотерапевтическая группа разнородных лекарственных средств, которые препятствуют разрушению клеточных мембран и стимулируют регенерацию гепатоцитов» [14]. Из-за разнообразия данной группы, которое обусловлено отсутствием однонаправленного механизма действия, общего сырья и/или активного компонента, не существует единой классификации. По типу сырья и/или активного компонента гепатопротекторы были подразделены на препараты растительного, животного происхождения, содержащие эссенциальные фосфолипиды, аминокислоты или их производные, витамины-антиоксиданты и витаминоподобные соединения, препараты разных групп. Наиболее часто используемой является классификация, основанная на механизме действия на печень: антиоксиданты, средства, осуществляющие репарацию мембран гепатоцитов и стимуляторы регенерации паренхимы печени [26, 27].

При выборе препарата для стимуляции регенерации печени мы полагали, что он должен обеспечить оптимизацию пластических и энергетических процессов, кровоснабжение органа. Одним из средств с известными антигипоксантами и антиоксидантными свойствами является янтарная кислота. Поэтому гепатопротекторные свойства сукцината в последние годы активно изучаются [85, 162]. Известным отечественным препаратом, содержащим янтарную кислоту, является цитофлавин. В его состав также входят инозин, никотинамид и рибофлавин, участвующие в цикле трикарбоновых кислот, что может обеспечить применение препарата как средства метаболической терапии в условиях индуцированной регенерации органа. Таким образом, цитофлавин, обладающий способностью нормализовать как пластические, так и энергетические процессы, является перспективным средством для лечения

осложнений после ОТП как потенциальный препарат, корригирующий функцию трансплантата.

Особый интерес представляет выявленная нами способность данного препарата оказывать корригирующее влияние на агрегационную способность тромбоцитов. Полученные нами результаты исследования и известная способность препарата обеспечить оптимизацию пластических и энергетических процессов подтолкнули нас к изучению цитофлавина как средства терапии поражения печени при посттрансплантационных осложнениях.

Детальное изучение влияние препарата на печень невозможно без использования адекватной экспериментальной модели. Первое, на что мы обратили внимание, это возможность использования в качестве экспериментальной модели ортотопическую трансплантацию печени. Эта модель на мышах была описана в 1991 году Qian с соавторами [116]. Метод был разработан с применением принципа манжеты, ранее применявшегося при трансплантации печени у крысы, что упростило венозно-сосудистый анастомоз по сравнению с техникой ручного наложения швов [92]. Позднее, в 2016 году, Nakano R. с коллегами описали подробный протокол выполнения с некоторыми техническими нюансами [116]. Однако данный способ имеет ряд ограничений: техническая сложность, которая требует специальной подготовки исследователя, продолжительность операции (на одно животное в среднем уходит от 2 до 3 часов), необходимость использования высокотехнологичного оборудования [116], но самое главное — отсутствие убедительных данных о соответствии данной модели на лабораторных животных аналогичной патологии у человека. В связи с этим модель ортотопической трансплантации считается сложновоспроизводимой и практически не используется исследовательскими группами в мире.

Поэтому в качестве первого этапа изучения препарата было принято решение использовать модель частичной гепатэктомии по С. Mitchell и Н. Willenbring (2014), поскольку ее применение считается актуальным для клинических сценариев, в которых количество функционирующей ткани является ограничивающим фактором. Кроме того, ЧГ считается одной из основных

моделей изучения адаптивного роста после оперативного повреждения в условиях инициированной регенерации [30]. Подробная методика воспроизведения представлена во 2 главе.

4.1 Влияние цитофлавина на морфологическое состояние печени лабораторных животных после частичной гепатэктомии

Для оценки восстановительных процессов в печени проводили морфологическое исследование гепатобиоптатов, полученных на 3 и 7 сутки. Гистологическое исследование ткани печени интактной группы позволило выявить следующее: выраженное балочно-радиарное строение долек печени, гепатоциты полигональной формы с эозинофильной цитоплазмой, ядра округлые, средних размеров, хроматин нежно-зернистый. Портальные тракты не расширены, встречались единичные лимфоциты. Кроме того, в некоторых портальных трактах обнаруживались небольшие группы скопления эозинофилов (Рисунок 8).

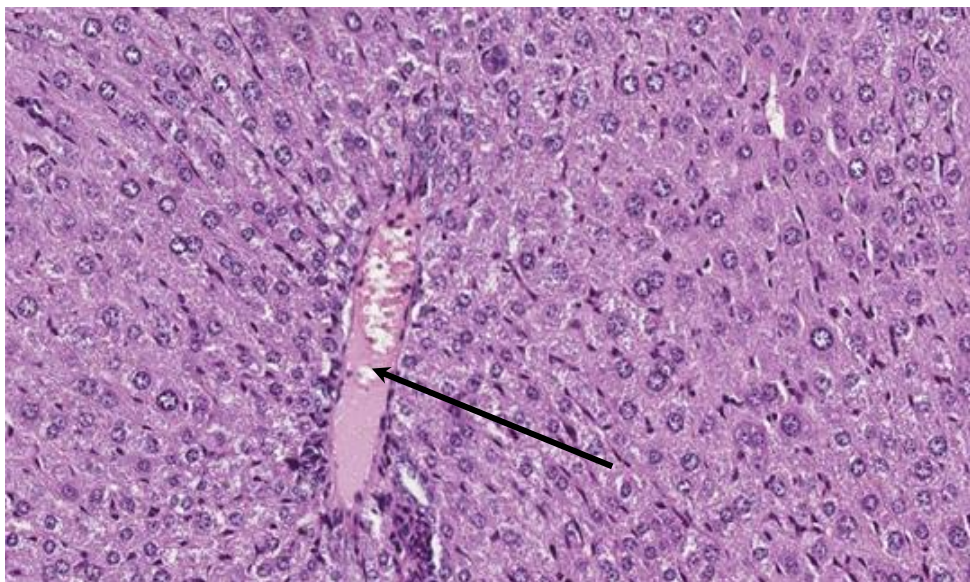


Рисунок 8 — Печень. Интактная группа. Балочное строение сохранено, гепатоциты полигональной формы. Печеночная вена в портальном тракте (стрелка). Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 200

В то же время в контрольной группе оперированных и нелеченых животных на 3-и сутки после частичной гепатэктомии в ткани печени отмечались выраженные дисциркуляторные нарушения. В портальных трактах был резко увеличен просвет печеночной вены, в центральной вене также обнаруживалось расширение просветов и полнокровие. Кроме того, отмечалось расширение синусоидов, в них встречались единичные лимфоциты (Рисунок 8). Имела место дискомплексация печеночных балок. Во всех отделах печеночных долек гепатоциты были в состоянии вакуольной дистрофии, встречались очаговые некрозы (Рисунок 9, 10).

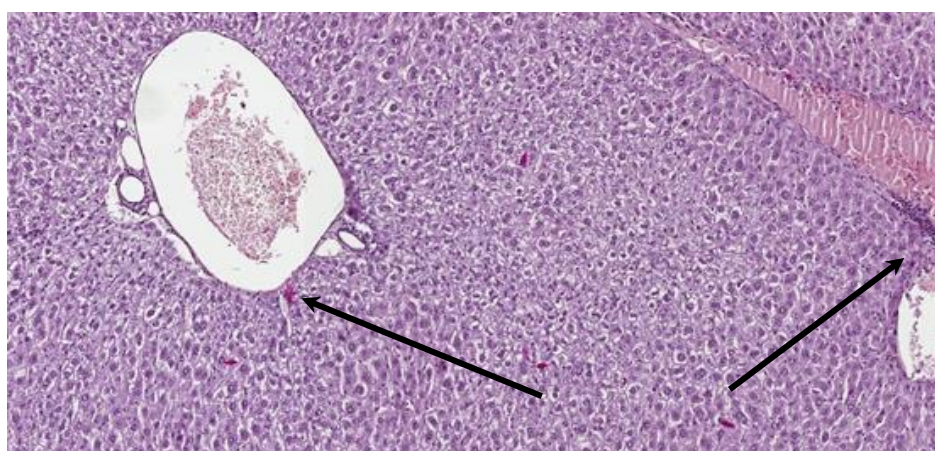


Рисунок 9 — Печень. Частичная гепатэктомия, 3 сутки. Резкое полнокровие печеночной вены в портальном тракте и центральной вене (стрелка).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$

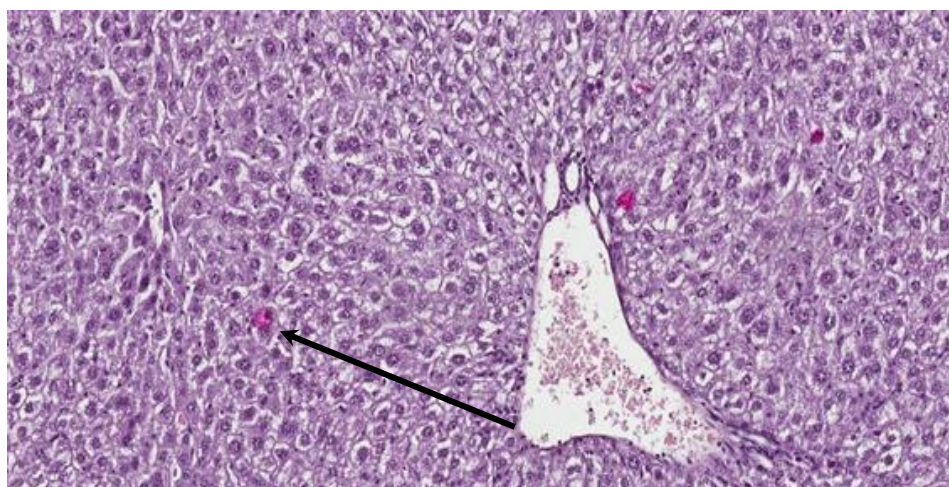


Рисунок 10 — Печень. Частичная гепатэктомия, 3 сут.

Дискомплексация и вакуольная дистрофия гепатоцитов (стрелка).

Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

Морфологическое исследование гепатобиоптата на 7-е сутки после ЧГ показало, что в синусоидах в большом количестве определялись мононуклеары и в небольшом количестве присутствовали сегментоядерные нейтрофилы. Гепатоциты были часто увеличены в размерах, с крупными гиперхромными ядрами, определялись фигуры митозов, двуядерные гепатоциты (Рисунок 11).

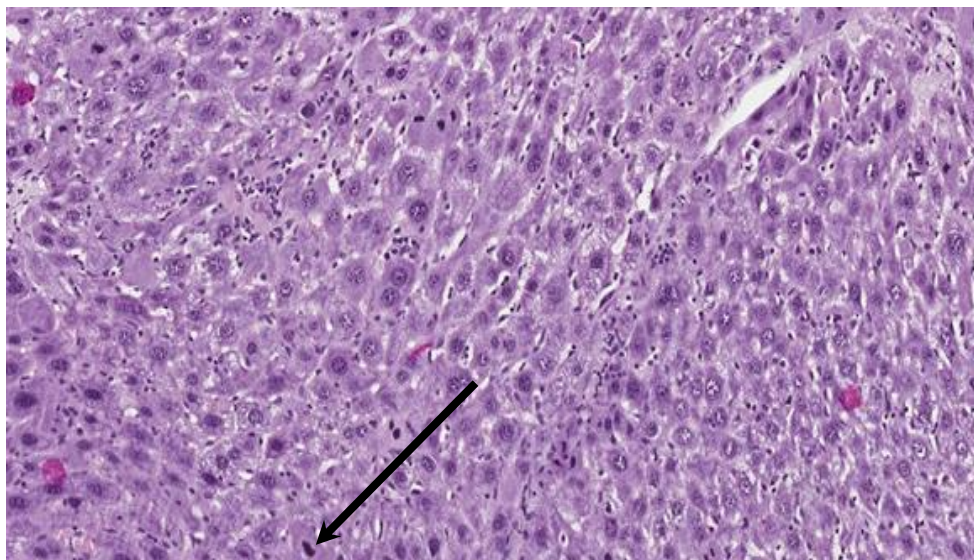


Рисунок 11 — Печень. Частичная гепатэктомия, 7 сут. Гепатоциты с крупными гиперхромными ядрами, встречаются фигуры митозов (стрелка). В синусоидах мононуклеарная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

Вместе с тем при гистологическом исследовании ткани печени животных основной группы была отмечена большая сохранность архитектоники органа. На 3-и сутки сохранялось балочно-радиарное строение, при этом просветы сосудов были расширены, без выраженного полнокровия. Дистрофические изменения были обнаружены только в гепатоцитах центральных зон. В большом количестве определялись митозы (Рисунок 12).

К 7-ым суткам дистрофических изменений в ткани печени практически не было обнаружено, а морфологическое состояние печени почти соответствовало контрольной группе (Рисунок 13).

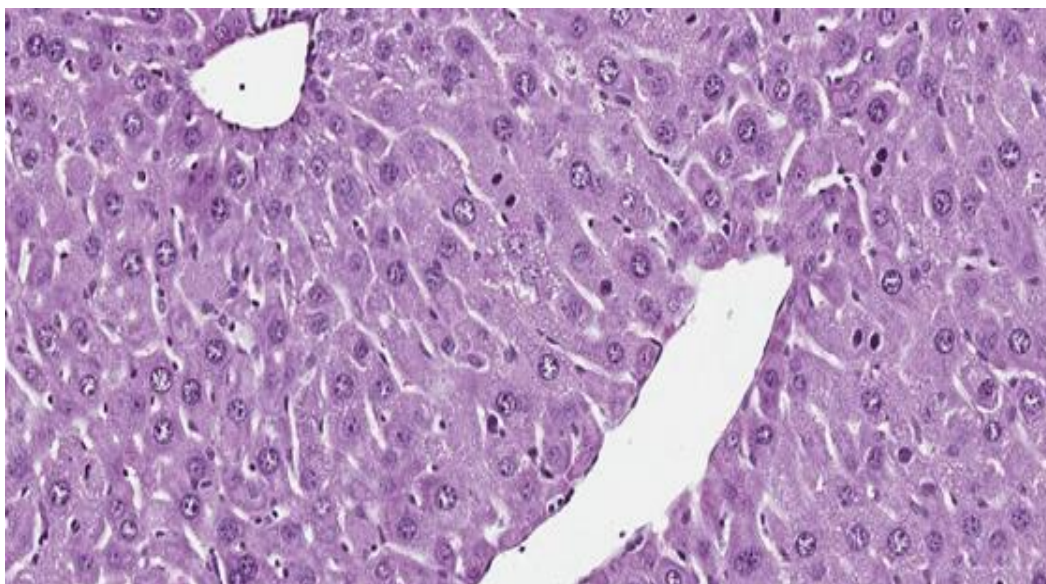


Рисунок 12 — Печень. Частичная гепатэктомия и цитофлавин, 3 сутки. Просветы сосудов расширены, без выраженного полнокровия. Балочно-радиарное строение сохранено. Окраска гематоксилином и эозином. Ув $\times 200$

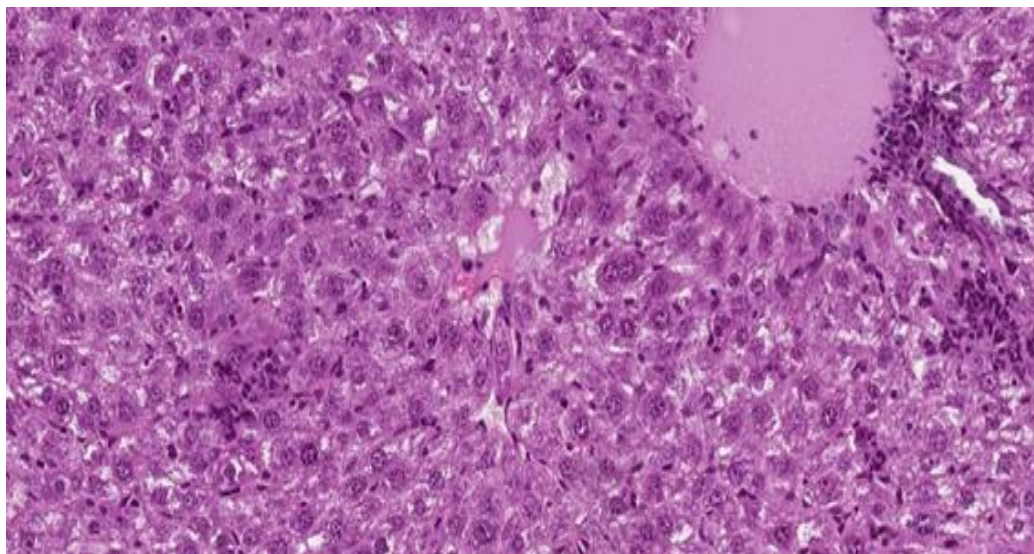


Рисунок 13 — Печень. Частичная гепатэктомия и цитофлавин, 7 сутки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$

Для объективной оценки адаптивного роста использовали количественные показатели: МИ, количество двуядерных и дистрофически измененных клеток на 1000 гепатоцитов на 3 и 7 сутки, площадь ядра, цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическое соотношение (ядерно-цитоплазматический индекс — ЯЦИ) (Таблица 24).

Таблица 24 — Морфометрические показатели печени лабораторных животных, получавших и не получавших цитофлавин после частичной гепатэктомии на 3 и 7 сутки

Показатели	Интактная группа	Контрольная группа		Основная группа	
		ЧГ -3 сутки	ЧГ- 7 сутки	ЧГ+Ц - 3 сутки	ЧГ+Ц - 7 сутки
Митотический индекс ‰	0,01 (0-0,1)	0,15 (0-0,16) p1 = 0,12	0,13 (0-0,14) p3 = 0,21	2,92* (0-5,0) p2 = 0,01	0,21 (0-1,0) p4 = 0,34
Двухядерные клетки на 1000 гепатоцитов ‰	15,0 (11,7-16,2)	5,5 (4,0-12,0) p1 = 0,01	10,0 (7,7-10,5) p3 = 0,1	11,0 (7,7-12,5) p2 = 0,01	5,0 (3,7-7,0) p4 = 0,02
Дистрофически измененные клетки на 1000 гепатоцитов ‰	0,2 (0-0,4)	77,0 (65,0-91,3) p1 = 0,02	5,0 (0,3-6,2) p3 = 0,06	3,0* (1,3-3,2) p2 = 0,13	2,0 (0,5-5,9) p4 = 0,13
Площадь цитоплазмы гепатоцита мкм ²	8,2 (8,1-9,8)	13,6 (12,2-16,1) p1 = 0,01	12,8 (10,5-17,8) p3 = 0,01	12,5 (9,8-15,9) p2 = 0,01	11,9 (7,8-16,9) p4 = 0,01
Площадь ядра гепатоцита мкм ²	7,3 (6,6-8,2)	6,7 (6,2-7,5) p1 = 0,3	9,0 (8,2-10,3) p3 = 0,01	11,2* (9,8-11,8) p2 = 0,01	10,9** (9,6-11,3) p4 = 0,01
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,9 (0,6-1,1)	0,3 (0,2-0,3) p1 = 0,01	1,2 (0,8-1,5) p3 = 0,07	0,8 * (0,6-1,2) p2 = 0,06	0,9 (0,5-1,3) p4 = 0,2

Примечание: p1 — достоверность различий между интактной группой и контрольной группой на 3 сутки; p2 — достоверность различий между интактной группой и основной группой на 3 сутки; p3 — достоверность различий между интактной группой и контрольной группой на 7 сутки; p4 — достоверность различий между интактной группой и основной группой на 7 сутки; * — достоверность различий между контрольной и основной группами на 3 сутки; ** — достоверность различий между контрольной и основной группами на 7 сутки.

В контрольной группе животных, не получавших препарат, была выявлена тенденция к увеличению митотической активности на 3 сутки, которая сохранялась до 7 дня. Вместе с тем наблюдалось достоверное уменьшение двуядерных клеток в 2,7 раза относительно интактных животных. Количество дистрофически измененных клеток составило 77%, что в разы больше, чем в группе неоперированных животных, не получавших цитофлавин. При этом площадь цитоплазмы гепатоцитов была в 1,5 раза больше относительно интактной группы. Изменение размера, вероятно, обусловлено адаптивной реакцией клеток, а именно, дистрофическими изменениями (гидропическая-вакуольная дистрофия), которые возникают в результате прогрессирующего энергодефицита после ЧГ. Однако более корректной характеристикой изменения размеров клетки является ЯЦИ, который был в 3 раза меньше относительно животных интактной группы. К 7-ым суткам в контрольной группе наблюдали тенденцию к повышению количества двуядерных гепатоцитов, сопровождавшуюся снижением дистрофически измененных клеток в 15,4 раза относительно 3-их суток.

В основной группе животных (ЧГ + цитофлавин) при анализе морфометрической характеристики было установлено, что активация процессов восстановления ткани печени отмечается уже на 3-и сутки после операции. Достоверные различия между контрольной и основной группами были выявлены по показателям: митотический индекс, дистрофически измененные клетки, ЯЦИ. МИ был больше у мышей, получавших цитофлавин после операции, в сравнении с мышами после ЧГ и с интактной группой ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации клеточного деления. Количество дистрофически измененных гепатоцитов было меньше в 25 раз относительно контрольной группы. Установлено увеличение размера цитоплазмы и ядра в 1,5 раза относительно интактной группы, что связано с адаптивной гипертрофией. Вместе с тем ЯЦИ был близок к значению неоперированных и нелеченых животных и в 2,6 раза превышал ЯЦИ контрольной группы. На 7-е сутки в основной группе прослеживалась положительная динамика к уменьшению количества двуядерных

клеток в 3 раза и к снижению митотической активности относительно интактной группы.

Обсуждая полученные результаты, нами было установлено, что при применении цитофлавина уже на 3 сутки наблюдается восстановление ткани печени в ответ на повреждение. Данная картина обусловлена как активной клеточной регенерацией, которая подтверждается значительным увеличением МИ в сравнении с группой ЧГ, так и гипертрофией клеток, которая находит свое отражение в высоких значениях площади цитоплазмы и ядра на фоне сохранности архитектоники органа. Активная клеточная регенерация скорее всего обусловлена как прямым действием сукцината на стимуляцию пролиферации самих гепатоцитов, так и на стимуляцию звездчатых клеток, относящихся к их потенциальным предшественникам и продуцирующих целый комплекс ростовых факторов [58, 61, 81, 157, 158].

Таким образом, цитофлавин оптимизирует течение восстановительных процессов в печени в условиях индуцированной регенерации за счет гипертрофии и клеточного деления. Вероятным механизмом этого является активация пролиферативной активности гепатоцитов, так и их энергетического обмена.

4.2 Влияние цитофлавина на гематологические параметры лабораторных животных после частичной гепатэктомии

В ходе многолетних исследований, проводимых нашим коллективом, была сформулирована концепция о взаимосвязи системы кроветворения и восстановительных процессов в печени. Поэтому мы изучили изменения гематологических параметров у лабораторных животных после частичной гепатэктомии без терапии и на фоне введения цитофлавина (Таблица 25).

Таблица 25 — Динамические изменения гематологических показателей у лабораторных животных на 3 и 7 сутки после частичной гепатэктомии (Ме, Q1, Q3)

Показатели	Интактные животные	Контрольная группа		Основная группа	
		ЧГ -3 сутки	ЧГ- 7 сутки	ЧГ+Ц3 - 3 сутки	ЧГ+Ц - 7 сутки
RBC, 10 ¹² /л	8,5 (8,0,3-9)	8,6 (8,4-8,8)	5,2 (4,0-5,7)*	8,0 (7,5-8,3)* p1 = 0,2	6,3 (5,8-6,8)* p2 = 0,01
HCT, %	41,8 (40,1-42,6)	40,4 (39,5-41,4)	25,6 (24,6-26,6)*	36,1 (35,7-40,9) p1 = 0,2	37,8 (36,2-38,2) p2 = 0,01
MCV, fl	46,0 (45,6-46,7)	46,5 (45,2-46,9)	49,6 (47,1-50,3)	46,9 (45,3-46,7) p1 = 0,2	51,6 (50,2-52,3) p2 = 0,05
MCH, pg	15,5 (14,4- 16,3)	14,3 (13,9-14,8)	14,3 (13,5-14,6)	15,5 (14,5-15,7) p1 = 0,2	15,3 (14,4-15,8) p2 = 0,3
MCHC, g/l	317,0 (293,0-325,1)	309,0 (298,1-310,0)	291,0 (290,1-294,0)	308,0 (306,0-309,0) p1 = 0,2	294,0 (290,0-310,0) p2 = 0,1
HGB, g/l	129,0 (128,0-133,0)	125,0 (121,0-128,0)	76,0 (58,0-84,0)*	113,0 (111,0-118,0)* p1 = 0,04	111,0 (92,5-114,5)* p2 = 0,1
PLT, 10 ⁹ /л	387,0 (285,0-483,0)	496,5 (473,2-519,7)	258,0 (155,0-449,0)	620 (526,0-781,7)* p1 = 0,02	510 (308-510) p2 = 0,4
WBC, 10 ⁹ /л	5,2 (5,0-5,2)	4,6 (4,6-4,6)*	6,6 (4,0-15,5)	8,1 (6,8-8,8) * p1 = 0,04	6,4 (5,6-9,4) p2 = 0,9

Примечание: * — достоверность различий контрольной и основной группы по отношению к интактной группе; p1 — достоверность различий между группами ЧГ3 - ЧГ+Ц3; p2 — достоверность различий между группами ЧГ7 - ЧГ+Ц7.

Таким образом, к 3-им суткам после операции были выявлены следующие изменения: количество эритроцитов в контрольной группе имело тенденцию к повышению, а в основной группе уменьшалось на 5,8% относительно интактной группы. К 7-ым суткам RBC достоверно снижался на 38,8% в контрольной группе и на 24,7% — в группе животных, получавших препарат, относительно интактных. Достоверных различий между группами по эритроцитарным индексам выявлено не было.

Уровень гемоглобина уменьшался во всех группах, но критическое значение было выявлено в контрольной группе на 7 сутки и было на 41% меньше относительно интактной. Вместе с тем между контрольной и основной группами существенных различий по количеству эритроцитов и уровню гемоглобина выявлено не было ни на 3-и, ни на 7-е сутки.

Количество тромбоцитов к 3 суткам после ЧГ имело тенденцию к повышению в обеих группах относительно интактной. Однако достоверное увеличение было выявлено только в группе животных, получавших препарат, на 60% относительно интактных и на 31,9% относительно контрольной группы ($p < 0,05$). К 7-ым суткам показатель PLT снизился в обеих группах, однако у мышей после частичной гепатэктомии он был меньше, чем у интактных животных.

Что касается количества лейкоцитов, то изменение этого показателя на 3 сутки в обеих группах было разнонаправлено, но оставалось в пределах референтных значений. У мышей, получавших препарат, количество лейкоцитов увеличилось на 55,7%, а у контрольных животных этот показатель уменьшился на 11,5% относительно интактной группы. При этом различия между контрольной и основной группами по показателю «количество лейкоцитов» были выявлены только на 3 сутки.

Увеличение количества тромбоцитов, лейкоцитов на 7 сутки согласуется с опосредованным эффектом препарата «Цитофлавин» на реакцию системы крови лабораторных животных после частичной гепатэктомии. Этот неспецифический эффект обусловлен действием янтарной кислоты (сукцинат), которая является основным действующим веществом цитофлавина и имеет тропность к рецептору

SUCNR1 (Succinate receptor 1) (GPR91 — G-protein coupled receptor 91). Как было установлено ранее, некоторые гемопоэтические клетки-предшественники, клетки крови и иммунные клетки имеют на своей поверхности данный рецептор [6]. Поскольку в литературе сообщалось о том, что рецептор SUCNR1 находится на поверхности некоторых гемопоэтических клеток, то мы посчитали необходимым оценить мегакариоцитарный росток (Таблица 26).

Таблица 26 — Мегакариоцитарный росток у лабораторных животных на 3 сутки после частичной гепатэктомии (Ме, Q1, Q3)

Показатели, %	Интактные животные	Контрольная группа	Основная группа
		ЧГ - 3 сутки	ЧГ+ЦЗ - 3 сутки
Бласты	3,9 (2,1-4,1)	3,7 (3,3-4,1)	3,8 (2,8-4,1)
Промегакариоциты	1,1 (0-1,3)	1,0 (0-1,0)	1,0 (0-1,0)
Мегакариоцит базофильный	3 (1,6-4,2)	3 (2,9-4,0)	5 (2,0- 6,0)
Мегакариоцит полихроматофильный	7 (3,3-8,1)	5 (1,4-7,4)	4 (1,3-5,5)
Мегакариоцит оксифильный	2 (0-3,6)	3 (0-4,0)	2 (0-3,4)
Прочие клетки	93 (82-101)	84,3 (77,2-90,3)	84,2 (81,3-85,9)
Митозы	3 (0-3,6)	5* (2,4-5,3)	6* (3,2-7,2)

Примечание: * — достоверность различий контрольной и основной группы по отношению к интактной; p1 — достоверность различий между группами ЧГЗ — ЧГ+ЦЗ.

Достоверные различия были выявлены только по уровню митотической активности: в группе животных после ЧГ она была выше в 1,3 раза, а в группе животных после ЧГ, которые получали цитофлавин, — в 2 раза относительно

интактной группы. Достоверных изменений в мегакариоцитарном ростке между группами выявлено не было.

Таким образом, можно полагать, что взаимодействие янтарной кислоты с рецептором SUCNR1, расположенном на гемопоэтических клетках предшественников, активировало пролиферацию клеток, что подтверждается увеличением количества митозов. В конечном счете это привело к увеличению популяций лейкоцитов и тромбоцитов в основной группе [6, 20].

4.3 Влияние цитофлавина на иммунологические параметры лабораторных животных после частичной гепатэктомии

Важными росторегулирующими силами печени являются факторы роста. В частности, гепатоцитарный фактор роста (HGF), который признан одним из основных митогенов, активирующих покоящиеся гепатоциты, вызывая в них репликацию ДНК [178]. В это же время трансформирующий фактор роста бета (TGF- β), наоборот, отвечает за ингибирование восстановительных процессов в печени (Таблица 27) [73].

Таблица 27 — Уровни плазменных цитокинов у лабораторных животных на 3 и 7 сутки после частичной гепатэктомии (Me, Q1, Q3)

Показатели, pg/ml	Интактные животные	Контрольная группа		Основная группа	
		ЧГ -3 сутки	ЧГ - 7 сутки	ЧГ+Ц3 - 3 сутки	ЧГ+Ц - 7 сутки
TGF- β	2,8 (0,17-4,1)	22,4 (16,7-31,6)*	8,4 (4,0-12,3)*	5,54 (4,0-15,0)* p1 = 0,04	3,8 (1,1-6,8) p2 = 0,14
HGF	17,0 (6,5-42,2)	12,0 (2,3-27,3)	10,0 (9,8-17)	44,0 (13,9-63,5)* p1 = 0,04	2,2 (2,1-3,5)* p2 = 0,02

Примечание: * — достоверность различий контрольной и основной группы по отношению к группе интактные животные; p1 — достоверность различий между группами ЧГ3 - ЧГ+Ц3; p2 — достоверность различий между группами ЧГ7 - ЧГ+Ц7.

Концентрация TGF- β в плазме крови контрольной группы увеличивалась в 8 раз на 3-и сутки и в 3 раза — на 7-е сутки после гепатэктомии относительно интактной ($p < 0,05$). В группе мышей, которые после частичной гепатэктомии получали цитофлавин, содержание трансформирующего фактора роста к 3 суткам возросло лишь в 1,9 раза относительно интактных животных ($p < 0,05$). На 7 день концентрация данного цитокина имела тенденцию к снижению и приближалась к значению интактной группы. Достоверные различия между контрольной и основной группами были выявлены только на 3 сутки, уровень TGF- β был выше в группе животных после частичной гепатэктомии в 4 раза, чем у мышей, получавших препарат после операции.

Вместе с тем в контрольной группе после ЧГ прослеживалась тенденция к снижению концентрации гепатоцитарного фактора роста. У животных, получавших препарат, HGF вырос в 2,5 раза на 3 сутки и снизился в 7,7 раза на 7 сутки относительно интактной группы ($p < 0,05$). Значимые изменения концентрации гепатоцитарного фактора роста между основной и контрольной группами были выявлены на 3 и 7 сутки: уровень HGF увеличивался в 3,6 раза и критически снижался в 4,5 раза относительно контрольной группы.

Выявленные изменения концентрации трансформирующего фактора роста в основной группе на 3 сутки могут быть связаны с действием сукцината на звездчатые клетки печени. Ранее Park S.Y. с соавторами описал, что на клетках HSC существуют рецепторы тропные к сукцинату GPR91 (G-protein coupled receptor 91); действие данного вещества инициирует активацию, пролиферацию, миграцию и ингибирует апоптоз этих клеток. В то же время активированные HSC начинают синтезировать провоспалительные цитокины: IL-6, TNF, однако секреция TGF- β не увеличивается, что является особенностью действия данного препарата [161]. С другой стороны, снижение концентрации TGF- β в основной группе может быть связано с повышением количества тромбоцитов, которые в свою очередь подавляют трансдифференцировку покоящихся HSC в клетки с миофибробластоподобным фенотипом, а также снижают продукцию коллагена I типа HSC посредством передачи сигналов цАМФ [121, 171]. Активированные

тромбоциты высвобождают из плотных гранул АДФ и АТФ, которые распадаются и приводят к увеличению концентрации аденозина [159]. В результате аденозин, который проникает в звездчатые клетки через родственные рецепторы, предотвращает активацию HSC и снижает их способность секретировать TGF- β [124, 125].

HGF содержится в достаточном количестве в гепатоцитах, однако в условиях ЧГ к 3 суткам в контрольной группе наблюдается снижение данного фактора, что может быть следствием истощения клеток. При использовании препарата в основной группе мы наблюдали ярко выраженный рост уровня HGF. Увеличение концентрации данного фактора может быть связано, с одной стороны, с внутриклеточным действием компонентов цитофлавина. Янтарная кислота, рибофлавин и другие составляющие препарата влияют на субстраты и коферменты в цикле Кребса, восстанавливая его функцию и увеличивая продукцию АТФ [8, 74]. Тем самым усиливается метаболический потенциал гепатоцитов и пролонгируется адаптивный рост. С другой стороны, уровень HGF может быть повышен не только за счет секреции гепатоцитами, но и за счет продукции HGF тромбоцитами, активация и повышение количества которых было описано ранее [106].

Исходя из вышесказанного, выявленные изменения лабораторных параметров связаны с активацией тромбоцитов через рецептор SUCNR1(GPR91) и активную продукцию факторов роста.

Резюме

Таким образом, в результате проведенного морфологического и гематологического исследования было установлено, что в условиях применения цитофлавина наблюдается оптимизация течения восстановительных процессов в печени после ЧГ. С одной стороны, это обусловлено гипертрофией, которая проявляется увеличением площади ядра, цитоплазмы гепатоцитов на фоне сохраненной структуры органа, также клеточным делением, о чем

свидетельствует значимое увеличение МИ; с другой стороны, в результате увеличения концентрации HGF и снижения уровня TGF- β в основной группе. Данные изменения связаны с активацией тромбоцитов, которые начинают выпускать из своих гранул АТФ и АДФ. Рядом реакций они преобразуются в аденозин, препятствующий дифференцировке HSC и снижающий способность секретировать TGF- β . В то же время активированные тромбоциты продуцируют HGF.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ортотопическая трансплантация печени открыла прекрасную возможность продлить жизнь инкурабельных пациентов с терминальной стадией цирроза и гепатоцеллюлярным раком. Ежегодно в России совершается 600 трансплантаций, из них 75% приходится на трансплантацию от умерших доноров [36]. В то же время около 1300 пациентов находятся в листе ожидания, однако не все получают своевременную помощь [149]. Поэтому сообщество трансплантологов и гастроэнтерологов прибегло к расширению пула доноров, что увеличило выживаемость пациентов с терминальной стадией заболевания печени, но также привело к повышению развития ряда осложнений в послеоперационном периоде. Однако считается, что на состояние трансплантата во время и после ОТП помимо качества донорского органа в значительной степени оказывает неизбежное влияние ИПР, которое запускает ряд механизмов повреждения ткани печени. Одним из них является тканевая гипоксия, развивающаяся при трансплантации вследствие прекращения кровотока. При этом особенно чувствительными к гипоксии считаются гепатоциты и синусоидальные эндотелиальные клетки, в которых, в первую очередь, обнаруживается нарушение энергообеспечения. Вторым механизмом является эндотелиальная дисфункция, вызванная гемодинамическими изменениями кровотока (напряжением сдвига) как при «синдроме малого размера», так и при достаточном объеме трансплантата. Третий фактор — это отек перекапиллярных тканей вследствие сдвига напряжения в сосудах. Это происходит за счет увеличения фенестрации эндотелиоцитов, в результате чего жидкая часть крови выходит в пространство Диссе. Кроме этого, вместе с жидкой частью происходит миграция клеток крови в перисинусоидальное пространство [137]. Взаимодействие тромбоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов с собственными клетками печени приводит к их последующей активации и синтезу провоспалительных цитокинов: TNF, IL-17, IL-8, IL-6, что усиливает воспалительный ответ [99, 100]. Четвертым механизмом является повышение давления в портальной вене в результате

перераспределения кровотока, если до этого у реципиентов было много коллатералей. Эти механизмы являются пусковыми как для инициации повреждения, так и для активации восстановительных процессов. Дисбаланс между этими процессами приводит к чрезмерно обширному повреждению. В результате трансплантат не может поддерживать функциональный гомеостаз, что приводит к развитию постоперационных осложнений. Их структура представлена в главе 1.

Как было отмечено, ДТ является самым частым и наименее изученным осложнением, возникающим после ортотопической трансплантации печени [138]. Отсутствие в сообществе гастроэнтерологов и трансплантологов единой номенклатуры, общепринятых критериев диагностики ДТ, а также большое разнообразие факторов риска препятствуют принятию стандартизированных процедур лечения и требуют дальнейшего изучения его патогенеза [137].

В связи с вышеизложенным нами была поставлена цель — сформулировать патогенетическое обоснование новых подходов к диагностике дисфункции печеночного трансплантата для повышения эффективности мониторинга пациентов.

Исследования на пациентах были направлены преимущественно на оценку изменений некоторых лабораторных параметров в периоперационном периоде. Первое, на что мы обратили внимание, — это изменения картины крови у пациентов после ОТП: анемия, лейкоцитоз. Вместе с тем стоит отметить и тромбоцитопению, которая имела гипердеструктивный тип и прослеживалась как до операции, так и в посттрансплантационном периоде. Как ранее отмечалось в главе 3, тромбоцитопения менее $60 \cdot 10^9/l$ на 3-7 сутки ассоциирована с недостаточным регенераторным ответом трансплантата и плохими краткосрочными и отдаленными послеоперационными результатами. Поэтому нами был проведен ROC-анализ количества тромбоцитов на 3 и 10 сутки. Такой подход позволяет рассчитать ДЧ, ДС и площадь под ROC-интегральную оценку клинической ценности.

Рассчитав диагностическую значимость одноточечного исследования, мы получили низкие значения ДЧ, ДС и AUC, что навело нас на мысль о необходимости оценивать не суточные (одноточечные) изменения количества тромбоцитов, а их динамическое изменение до операции — 3 сутки и 3-10 сутки (Рисунок 14).

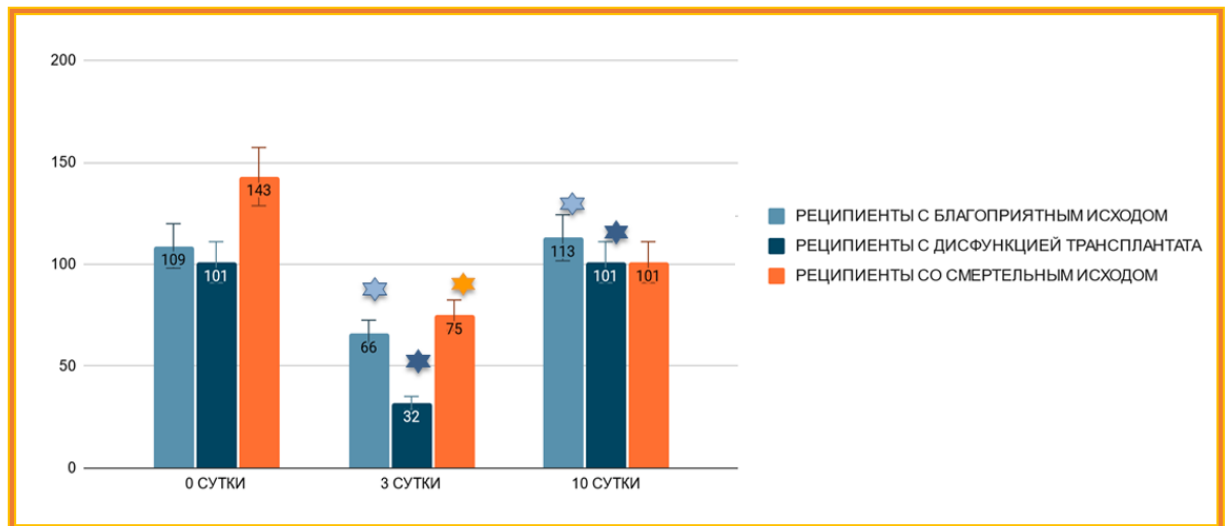


Рисунок 14 — Динамические изменения количества тромбоцитов у реципиентов до и после ОТП

Проанализировав динамические изменения PLT у реципиентов в первые 10 дней после ОТП, нами было установлено, что характер изменений уровня тромбоцитов является доступным маркером, отражающим состояния донорской печени. Критическое снижение PLT более 41% (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. При этом, оценив диагностическую значимость динамических изменений, мы установили, что при заданных порогах отсечения на каждые сутки ДЧ = 54, ДС = 76 (Рисунок 15).

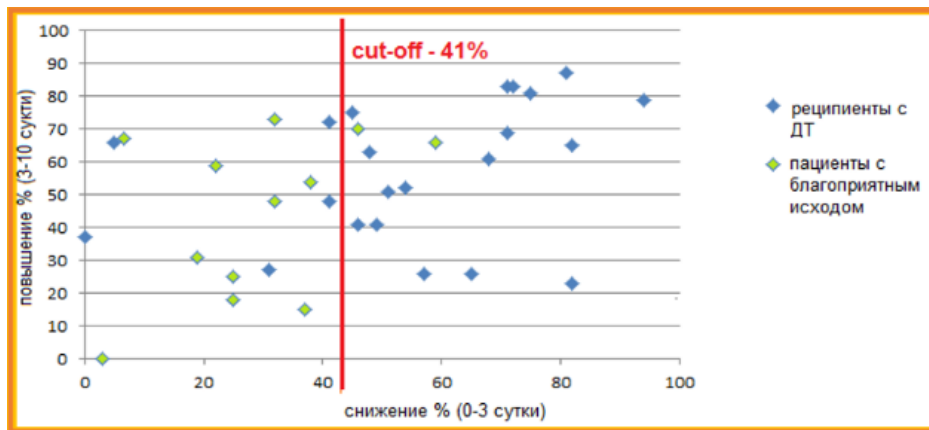


Рисунок 15 — Динамические изменения количества тромбоцитов у реципиентов с дисфункцией трансплантата и с благоприятным исходом

Кроме изменения количества тромбоцитов отмечалось и снижение их агрегационной способности, что отчасти обусловлено тромбоцитопенией и возможным применением других препаратов — анестетиков и антиагрегантов. Вместе с тем, оценивая динамические изменения количества тромбоцитов, стоит обратить внимание на гематологические индексы NLR, PLR, MPV/PLT. Для ДТ характерно повышение значений этих показателей на 3 сутки, что связано с активным воспалительным ответом в результате ИПП в ходе ОТП.

Далее, на основании существующих литературных данных о иммунологических механизмах повреждения печени до и после трансплантации, нами была впервые проведена оценка цитокинового профиля пациентов в ЛО и реципиентов после ОТП.

В ходе клинического исследования установили, что для пациентов в ЛО характерно смещение баланса между противо- и провоспалительными цитокинами в сторону последних благодаря активации секреции IL-8, IL-6, IL-12 MIP1. Кроме того, для данной группы было характерно увеличение концентраций факторов роста, участвующих в фиброгенезе (PDGF, TNF alpha, GM-CSF). Особое внимание привлекло снижение уровня BDNF, что, возможно, связано с печеночной энцефалопатией у пациентов с декомпенсированной стадией цирроза печени. Описанный цитокиновый профиль является характерным для пациентов из ЛО, что обусловлено необратимыми изменениями в паренхиме печени.

У реципиентов после ОТП было выявлено снижение концентраций всех исследуемых цитокинов. Основной причиной наблюдаемой картины является действие иммуносупрессивной терапии. Такролимус — это основной препарат, назначаемый всем реципиентам после ОТП, действие которого направлено на подавление активации Т-клеток, в результате чего наблюдается снижение синтеза как про-, так и противовоспалительных интерлейкинов и хемокинов — IL-1RA, IL-10, IL-4, IL-12, LIF, MIP-alpha. Также применяют кортикостероиды, которые препятствуют пролиферации и активации Т-клеток. Вместе с тем данное лечение сопряжено с нейротоксическим действием, которое проявляется у реципиентов энцефалопатией и снижением уровня VEGF, BDNF [83]. Кроме того, низкие значения VEGF связаны с эндотелиальной дисфункцией в результате ИПР. Уменьшение концентрации PDGF, PIGF и VEGF, которые содержатся в гранулах тромбоцитов, обусловлено снижением продукции этих клеток. Вероятно, это происходит в результате недостаточного синтеза тромбопоэтина печенью, поврежденной также длительной иммуносупрессией, как это отмечено в публикациях [96]. Проведя анализ цитокинового статуса в зависимости от исхода ОТП, достоверные различия между группами пациентов с ДТ и с благоприятным исходом были выявлены по показателю IL-8. При этом проведенный ROC-анализ выявил высокие значения ДС и ДЧ метода, что свидетельствует о прогностической силе и возможности использования его в клинической практике для диагностирования ДТ (Рисунок 16).

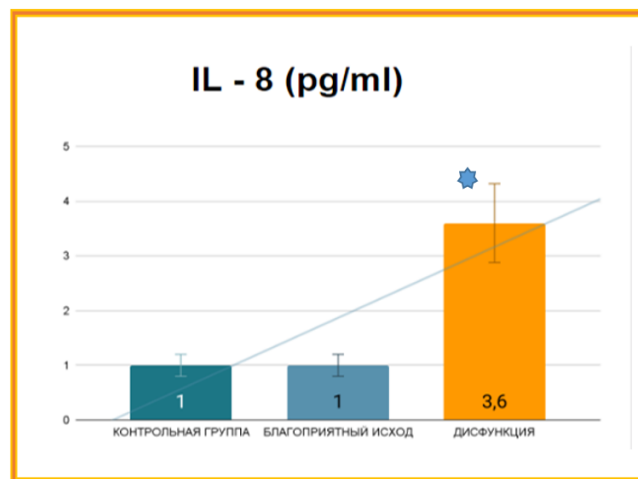


Рисунок 16 — Концентрации интерлейкин-8 у реципиентов печени (пг/мл)

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 (Рисунок 17).

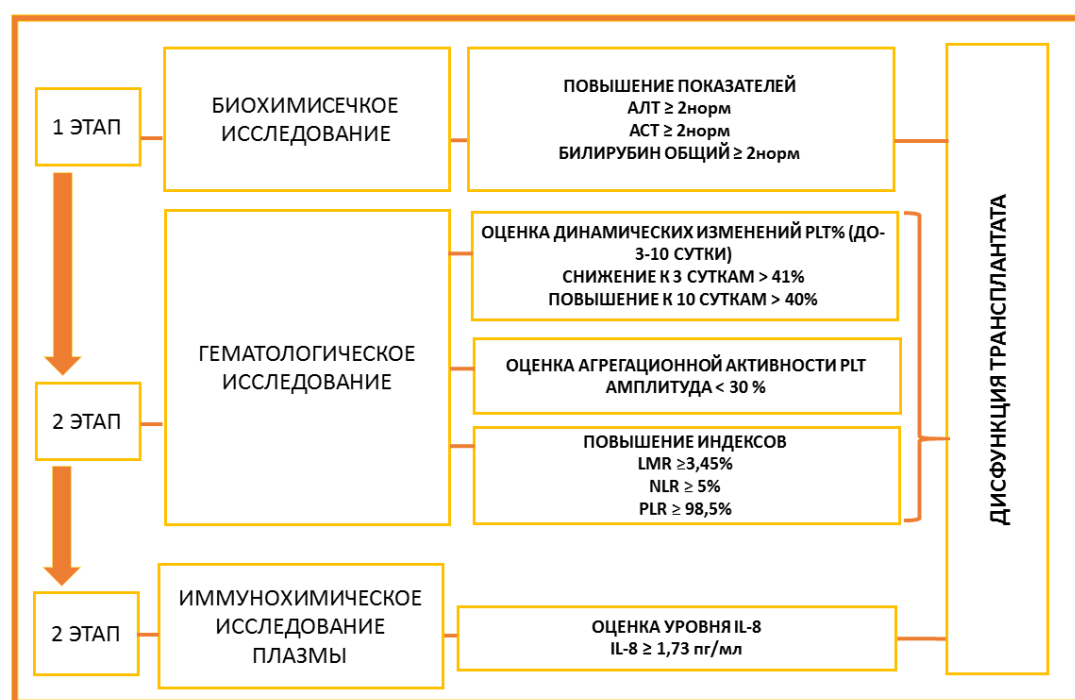


Рисунок 17 — Алгоритм лабораторного мониторинга для диагностики ДТ

Установление новых патогенетических механизмов ДТ вызвало у нас 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.

Воспалительный ответ, который является следствием ИПР, играет важное значение в развитии ДТ. Как было выявлено в ходе клинического исследования,

для реципиентов с дисфункцией характерно повышение концентрации IL-8 в послеоперационном периоде. Основным источником данного хемокина являются моноциты, макрофаги. Также существуют данные о том, что одним из источников этого цитокина являются клетки Купфера. Внутривнутрипеченочный синтез IL-8 и его циркуляция в крови провоцирует миграцию активированных нейтрофилов, лейкоцитов в печень, усиливая тем самым воспаление. Вместе с тем IL-8 участвует в формировании профиброгенной микросреды за счет активации коллаген-продуцирующих звездчатых клеток печени. Поэтому мы сочли возможным применение препарата, действие которого направлено на регулирование уровня IL-8. В настоящее время существует препарат репариксин, который ингибирует активацию. На одном из этапов клинического исследования данный препарат подтвердил свою эффективность в качестве средства, профилактирующего развитие ДТ за счет блокирования ряда активностей, связанных с IL-8 и рекрутированием лейкоцитов [115]. Применение данного препарата в клинической практике для коррекции ДТ и других осложнений остается предметом спора.

Кроме воспалительного ответа, в результате ИПР происходит 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 [35]. Кроме того, в клиническом исследовании нами была выявлена способность данного препарата оказывать корректирующее 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 изменения гематологических и иммунологических параметров, сочетающихся с особенностями морфологической картины. Данные результаты свидетельствуют о положительном влиянии цитофлавина на состояние печени за счет активного пролиферативного ответа.

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 (Рисунок 18).

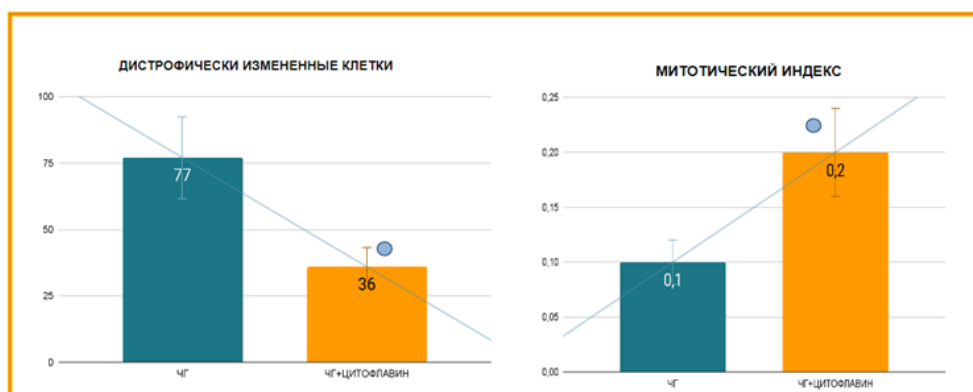


Рисунок 18 — Уровень МИ и дистрофически измененных гепатоцитов в гепатобиоптате лабораторных животных после ЧГ на 3 сутки (%)

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 (Рисунок 19).

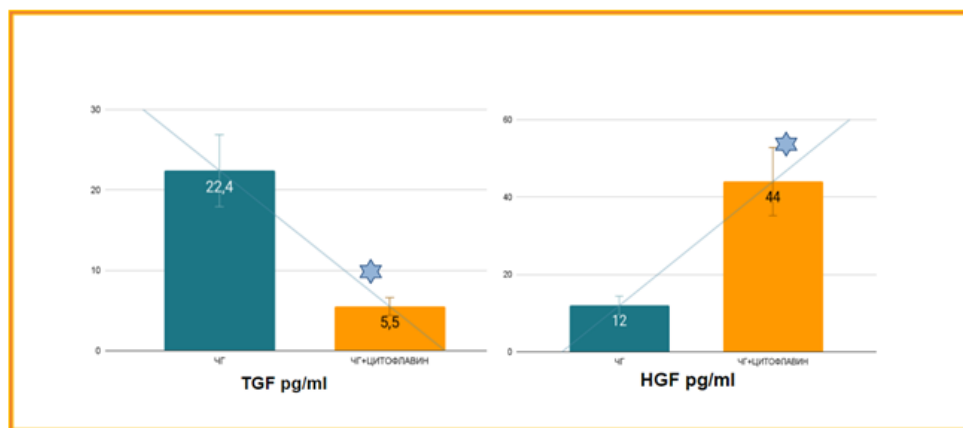


Рисунок 19 — Концентрации гепатоцитарного и трансформирующего факторов роста в плазме крови лабораторных животных на 3 после ЧГ (пг/мл)

На основании данных литературы и проведенных исследований, нами были сформулированы основные патогенетические пути влияния цитофлавина на состояние печени (Рисунок 20).

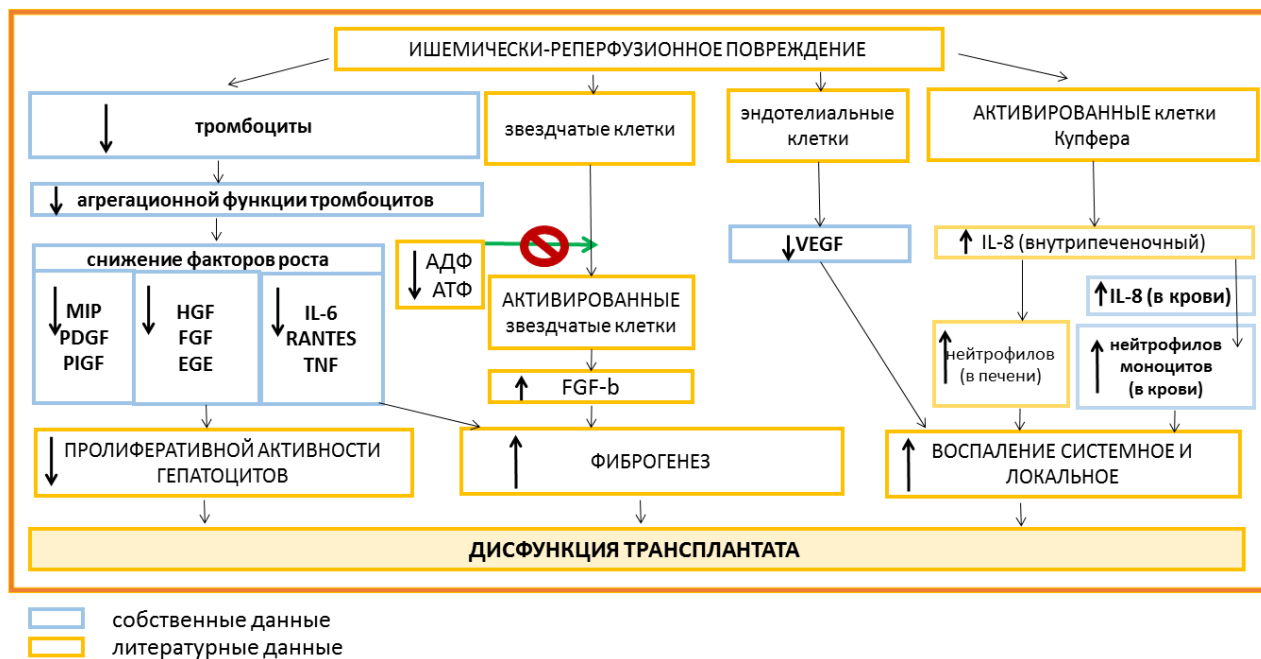


Рисунок 21 — Патогенез развития дисфункции трансплантата после ортотопической трансплантации печени

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 IL-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.

6. 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.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ДТ	– дисфункция трансплантата
ЧГ	– частичная гепатэктомия
ОТП	– ортотопическая трансплантация печени
ЛО	– лист ожидания
БО	– билиарные осложнения
ИМТ	– индекс массы тела
ИПР	– ишемически-реперфузионное повреждение
АТФ	– аденозинтрифосфат
АДФ	– аденозиндифосфат
АСТ	– аспартатаминотрансфераза
АЛТ	– аланинаминотрансфераза
МНО	– международное нормализованное отношение
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
WBC	– лейкоциты
RBC	– эритроциты
HGB	– гемоглобин
HCT	– гематокрит
MCV	– средний объем эритроцита
MCH	– среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCHC	– средняя концентрация гемоглобина в эритроците
RDW	– ширина распределения эритроцитов
PLT	– тромбоциты
MPV	– средний объем тромбоцита
PDW	– относительная ширина распределения тромбоцитов по объему
HSC	– звездчатые клетки печени/перисинусоидальные клетки/ клетки Ито
LSEC	– эндотелиальные клетки
IL	– интерлейкин
CXCL	– хемокин

IL-1RA	– антагонист рецептора интерлейкина - 1
HGF	– гепатоцитарный фактор роста
PIGF	– плацентарный фактор роста
PDGF	– тромбоцитарный фактор роста
TNF-alfa	– фактор некроза опухоли
TGF-beta	– трансформирующий фактор роста
BDNF	– нейротрофический фактор мозга
EGF	– эпидермальный фактор роста
VEGF	– сосудистый фактор роста
NGF	– фактор роста нервов
FGF	– фактор роста фибробластов
GM-CSF	– гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор роста
MIP 1 alpha	– хемокин, воспалительный белок макрофагов
RANTES	– хемокин
LIF	– лейкемия-ингибирующий фактор
NF-KB	– универсальный фактор транскрипции

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анастомотические билиарные стриктуры после трансплантации печени (обзор) / М. В. Попов, С. Э. Восканян, А. П. Дунаев [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2019. – Т. 15, № 2. – С. 296-301.

2. Антигипоксанты в современной клинической практике / С. В. Оковитый, Д. С. Суханов, В. А. Заплутанов [и др.] // Клиническая медицина. – 2012. – № 9. – С. 63-69.

3. Баженова, Е. Д. Влияние цитофлавина на процессы апоптоза нейронов коры головного мозга у мышей на модели физиологического и патологического старения / Е. Д. Баженова, Д. Л. Соколова, Д. Л. Теплый // Архив патологии. – 2019. – Т. 81, № 4. – С.59–65.

4. Баходирова, С.Б. Ортопическая трансплантация печени / С.Б. Баходирова, К.С. Тангиркулова // Авицена. – 2019. - №3. –С.11-12.

5. Блинкова, Н. Б. Полиплоидия гепатоцитов в регенерации печени при хроническом гепатите у пациентов из разных возрастных групп / Н. Б. Блинкова, С. В. Сазонов, С. Л. Леонтьев. – Екатеринбург : Юника, 2017. – 115 с.

6. Влияние сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и звездчатых клеток печени на морфофункциональное состояние печени после введения CCL4 / И. Ю. Маклакова, С. В. Цвиренко, В. В. Базарный, Д. Ю. Гребнев // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 3. – С. 48-55.

7. Влияние сукцинатсодержащего препарата на некоторые параметры крови при монотерапии эпилепсии у детей / Л. А. Носаль, Н. В. Симонова, В. А. Доровских [и др.] // Амурский медицинский журнал. – 2020. – № 2. – С. 39-42.

8. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на процессы репаративной регенерации печени в эксперименте / Д. С. Сухано, Т. И. Виноградова, Н. В. Заболотных [и др.] // Хирургия. – 2011. – № 1. – С. 56-60.

9. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на структурные изменения в печени при остром экспериментальном холецистите / С. В. Якубовский, С. Л. Анищенко, А. А. Емельянова [и др.] // Архив патологии. – 2012. – № 6. – С. 28-32.

10. Гепатоцитарный апоптоз и иммунная дисфункция при декомпенсации алкогольного цирроза печени с разными степенями острой на фоне хронической печеночной недостаточности / А.С. Родина, М.Э. Шубина, И.В. Курбатова, [др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т.172, №10. – С.416-421.

11. Готье, С. В. Сплит трансплантация печени: опыт одного центра / С. В. Готье, А. Р. Монахов, О. М. Цирульникова // Альманах клинической медицины. – 2020. – № 48 (3). – С.162-170.

12. Диагностическая эффективность трансформирующего фактора роста бета 1 при оценке риска развития дисфункции трансплантата у детей-реципиентов печени / Р. М. Курабекова, О. М. Цирульникова, И. Е. Пашкова [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2019. – Т.29, № 3. – С. 58-65.

13. Донова, Л. В. Эхография при трансплантации печени. Обзор литературы / Л. В. Донова, М. С. Новрузбеков, К. М. Магомедов // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. – 2021. – № 1. – С.87-96.

14. Ивашкин, В. Т. Рациональная фармакотерапия заболеваний органов пищеварения: руководство для пра. Тктикующих врачей / В. Т. Ивашкин., Т.Л. Лапина; Под общ. ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной – Москва : Литтерра, 2006. – 552 с

15. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени / В. В.Базарный, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 357-364.

16. Корой, П. В. Тромбоциты как индикаторы печеночного фиброза / П. В. Корой, А. В. Ягода // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2007. – № 3. – С. 55-63.

17. Лабораторная диагностика цирроза печени / В. В. Базарный, Е. Н. Бессонова, Л. И. Савельев, Н. Ф. Климушева [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во УГМУ, 2018. – 42 с.

18. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – 3-е изд. перераб.и доп. / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Киев : Вища школа. Головное изд-во, 1983. – 383 с.

19. Локальная и системная продукция 47 цитокинов у пациентов с продвинутыми стадиями первичной открытой глаукомы / Н. В. Балацкая, С. Ю. Петров, В. И. Котелин, И. Г. Куликова // Современные проблемы науки и образования. – 2021. – № 3. – С. 132-139.

20. Минина, М. Г. Морфология ишемических повреждений в нулевых биоптатах печени посмертных доноров / М. Г. Минина, Д. В. Воронов, И. М. Ильинский // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 70.

21. Мининкова, А. И. Аналитические возможности гематологических анализаторов в оценке тромбоцитов (обзор литературы) / И. А. Минакова // Клин. лаб. Диагностика. – 2012 – № 3. – С. 27-34.

22. Морфологическая оценка трансплантата печени: роль экспресс-биопсии / М. С. Новрузбеков, О. Д. Олисов, В. А. Гуляев [и др.] // Трансплантология. – 2016. – № 4. – С. 19-26.

23. Мультикомплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных циррозом печени / А. А. Останин, Н. М. Старостина, И. В. Меледина [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – № 17 (6). – С. 539-552.

24. Никулина, В. П. Дифференциальная диагностика инфекционных и неинфекционных осложнений у пациентов после трансплантации печени на основании мониторинга иммунологических показателей / В. П. Никулина, Г. В. Булава, М. А. Годков // Трансплантология. – 2015. – № 3. – С.22-27.

25. Новрузбеков, М. С. Сосудистые осложнения после ортотопической трансплантации печени / М. С. Новрузбеков, О. Д. Олисов // Трансплантология. – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 35-50.

26. Оковитый, С. В. Комбинированное применение гепатопротекторов / С. В. Оковитый // Лечащий врач. – 2020. – № 8. – С. 38-43.
27. Оковитый, С. В. Применение сукцинатов в спорте / С. В. Оковитый, С. В. Радько // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2015. – № 92 (6). – С.59-65.
28. Плеханов, А.Н. Регенерация печени: решенные и проблемные вопросы / А.Н. Плеханов, А.И. Товаршинов // Хирургия. Журнал Н.И. Пирогова. – 2021. - №2. - С.88-93.
29. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С / К. А. Сысоев, А. Б. Чухловин, Д. М. Шахманов [и др.]. // Инфекция и иммунитет. – 2013. – Т 3, № 1. – С. 49-58.
30. Оценка показателей регенераторной активности у больных хроническим вирусным гепатитом (ХГ) при старении / Н. Б. Крохина, С. В. Сазонов, А. П. Ястребов, Н. А. Серов // Актуальные вопросы медицины и экологии: Сб. научн.тр. – Екатеринбург : Изд-во УГМА. – 1999. – С. 53.
31. Ранняя дисфункция трансплантата печени: факторы риска, клиническое течение и исходы / Я. Г. Мойсюк, В. Н. Попцов, А. И. Сушков [и др.] // Трансплантология.- 2016. - №2. – С.-45-56.
32. Савилов, П. Н. Кровоток и напряжение кислорода в печени при различных способах её повреждения и гипероксии / П. Н. Савилов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2020. – Т. 64, № 2. – С. 54-62.
33. Саркисов, Д. С. Соотношение клеточной и внутриклеточной форм репаративной регенерации в печени при ее дистрофии / Д. С. Саркисов, Л. Д. Крымский, К. В. Боцманов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1969. – Т. 65, № 3. – С. 103-105.
34. Система гемостаза в норме и при трансплантации печени (обзор) / В. И. Решетняк, С. В. Журавель, Н. К. Кузнецова // Общая реаниматология. – 2018. – Т. 14, № 5. – С.58-84.

35. Сравнительная эффективность цитофлавина и его составных компонентов при окислительном стрессе в эксперименте / В. А. Доровских, Н. В. Симонова, Д. И. Переверзев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80, № 4. – С. 18-22.

36. Трансплантационные технологии в многопрофильной клинике: опыт и перспективы развития / Н. Ф. Климушева, Ф. И. Бадаев, Е. Н. Бессонова [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И. И. Мечникова. – 2014. – Т. 6, № 3. – С. 82-92.

37. Хасанова, Э. Р. Неврологические нарушения после трансплантации внутренних органов / Э. Р. Хасанова, К. З. Бахтиярова // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. – Т. 12, № 4. – С.90-97.

38. Хубутя, М. Ш. Послеоперационные осложнения у реципиентов при трансплантации печени: современные представления о патогенезе и основных направлениях профилактики и лечения / М. Ш. Хубутя, А. В. Чжао, К. Б. Шадрин // Вестник Трансплантологии и искусственных органов. – 2009. – № 11 (2). – С.60-66.

39. Цыган, В. Н. Этиопатогенетическая нейрорепаративная терапия энцефалопатии / В. Н. Цыган, О. Е. Гурская, Н. С. Ильинский // Вестник военно-медицинской академии. – 2018. – Т.20. – С 30-34.

40. Шевченко О. П. Биомаркеры иммунной толерантности при трансплантации печени / О. П. Шевченко, Р. М. Курабекова, О. М. Цирульникова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2016. – Т.18, № 3. – С. 137-144.

41. Шешенина, А. В. Особенности процессов клеточной регенерации в печени больных хроническим гепатитом В / А. В. Шешенина, С. В. Сазонов // Морфология. – 2012. – Т. 141, №3. – С.178-179.

42. Юшков, Б. Г. Понятие нормы в физиологии и патофизиологии / Б. Г. Юшков, Е. А. Корнева, В. А. Черешнев // Физиологические константы лабораторных животных. – Екатеринбург : УрО РАН, 2021. – 864 с.

43. Юшков, Б. Г. Тромбоциты и регенерация // Бюллетень сибирской медицины. – 2021. – Т. 20, № 2. – С.216-227.
44. Accuracy of the BAR score in the prediction of survival after liver transplantation / J. A. Martínez, S. Pacheco, J. P. Bachler [et al.] // Ann.Hepatol. – 2019. – Vol. 18 (2). – P.386–392.
45. Adult liver transplantation: UK clinical guideline - part 2: surgery and post-operation / C. Millson, A. Considine, M. E. Cramp [et al.] // Frontline gACTroenterology. – 2020. – Vol. 11 (5). – P.385–396.
46. Afdhal, N. H. Diagnosing fibrosis in hepatitis C: is the pendulum swinging from biopsy to blood test? / N. H. Afdhal // Hepatology. – 2003. – Vol. 37. – P. 972-974.
47. Albumin-bilirubin score for predicting post-transplant complications following adult-to-adult living donor liver transplantation / W. Zhang, C. Liu, Y. Tan, [et al.] // Ann Transplant. – 2018. – Vol. 23. – P.639-646.
48. Angiotensin II type-1 receptor antibodies are associated with active allograft dysfunction following pediatric liver transplantation / L. J. Wozniak, M. J. Hickey, A. P. Chan [et al.] // Transplantation. – 2020. – Vol. 104 (12). – P. 2547-2556.
49. Applicability of common inflammatory markers in diagnosing infections in early period after liver transplantation in intensive care setting / W. Figiel, M. Grąt, G. Niewiński [et al.] // Scientific reports. – 2020. – Vol. 10 (1). – P. 3918.
50. Approach to the liver transplant early postoperative period: an institutional standpoint / B. Amaral, M. Vicente, T. Araújo [et al.] // Rev Bras Ter Intensiva. – 2019. – Vol. 31 (4). – P. 561-570.
51. A proposal to grade the severity of early allograft dysfunction after liver transplantation / P. Salvalaggio, R. C. Afonso, G. Felga [et al.] // Einstein. – 2013. – Vol. 11 (1). – P. 23-31.
52. Aydın, M. M. Liver fibrosis / M. M. Aydın, K. C. Akçalı // Turk J GACTroenterol. – 2018. – Vol. 29 (1). – P. 14-21.
53. Bedossa, P. Sampling variability of the liver fibrosis in chronic hepatitis C / P. Bedossa, D. Dargere, V. Paradis // Hepatology. – 2003. – Vol. 38. – P. 1449-1457.

54. Beltrame, P. Low platelet count: Predictor of death and graft loss after liver transplantation / P. Beltrame, S. Rodriguez, A. M. B. Brandão // *World J Hepatol.* – 2019. – Vol. 11 (1). – P. 99-108.
55. Biomarkers of Liver Injury during Transplantation in an Era of Machine Perfusion / R. H. Bhogal, D. F. Mirza, S. C. Afford [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (5). – P. 1578.
56. Bodzin, A. S. Liver transplantation today: where we are now and where we are going / A. S. Bodzin, T. B. Baker // *Liver Transpl.* – 2018. – Vol. 24 (10). – P. 1470-1475.
57. Bozkurt B. Living donor liver transplantation / B. Bozkurt, M. Dayangac, Y. Tokat // *Chirurgia (Bucur).* – 2017. – Vol. 112 (3). – P. 217-228.
58. Can mean platelet volume determine the severity of liver fibrosis or inflammation in patients with chronic hepatitis B? / B. Ceylan, M. Fincanci, C. Yardimci, [et al.] // *J GACTroenterol Hepatol.* – 2013 – Vol. 25. – P.606-612.
59. Ceglarek, U. Circulating sterols as predictors of early allograft dysfunction and clinical outcome in patients undergoing liver transplantation / U. Ceglarek, K. Kresse, S. Becker // *Metabolomics.* – 2016. – Vol. 12 (12). – P. 182.
60. Cell biology of ischemia/reperfusion injury / T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz [et al.] // *Int Rev Cell Mol Biol.* – 2012. – Vol. 298. – P. 229-317.
61. Cell-permeable succinate prodrugs rescue mitochondrial respiration in cellular models of acute acetaminophen overdose/ S. Piel, I. Chamkha, A. K. Dehlin [et al.] // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 6. – P.41-46.
62. Chae, M. S. The impact of serum cytokines in the development of early allograft dysfunction in living donor liver transplantation / M. S. Chae, J. W. Kim, H. S. Chung // *Medicine.* – 2018. – Vol. 97 (16). – P. 400.
63. Chen, X. B. Primary graft dysfunction after liver transplantation / X. B. Chen, M.Q. Xu // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2014. – Vol. 3 (2). – P. 125-37.
64. Cho, E. H. Succinate as a regulator of hepatic stellate cells in liver fibrosis / E. H. Cho // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2018. – Vol 21 (9). – P.455.

65. Clemens, M. M. Mechanisms and biomarkers of liver regeneration after drug-induced liver injury / M. M. Clemens, M. R. McGill, U. Apte // *Adv Pharmacol.* – 2019. – Vol. 85. – P. 241-262.
66. Coelho, J. C. U. Biliary complications after liver transplantation / J. C. U. Coelho, L. O. Leite, A. Molena // *Arq Bras Cir Dig.* – 2017. – Vol. 30 (2). – P.127-131.
67. Duda, D. G. Potential circulating biomarkers of recurrence after hepatic resection or liver transplantation in hepatocellular carcinoma patients / S. O Dima, D. Cucu, A. Sorop [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2020. – Vol. 12 (5). – P.1275.
68. Early graft dysfunction after liver transplant: Comparison of different diagnostic criteria in a single-center prospective cohort / J. E. Barrueco-Francioni, G. Seller-Pérez, R. Lozano-Saéz [et al.] // *Med Intensiva.* – 2020. – Vol. 44 (3). – P. 150-159.
69. Expression of Notch-Hif-1 α signaling pathway in liver regeneration of rats/ Y. Li, Y. Xu ,H. Wang [et al.] // *J Int Med Res.* – 2020. – Vol. 48 (9). – P.34-56.
70. Extravasated platelet aggregation in liver zone 3 may correlate with the progression of sinusoidal obstruction syndrome following living donor liver transplantation: a case report/ S. Nakanuma, T. Ohta, H. Tajima [et al.]// *Exp Ther Med.* – 2015. – Vol. 9. – P. 1119-1124.
71. Forbes, S. J. Liver regeneration — mechanisms and models to clinical application / S. J. Forbes, P. N. Newsome // *Nat Rev GACTroenterol Hepatol.* – 2016. – Vol. 13 (8). – P. 473-485.
72. Friedman, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275 (4). – P.2247-2250.
73. Gilgenkrantz, H. Understanding liver regeneration: from mechanisms to regenerative medicine / H. Gilgenkrantz, A. Collin de l'Hortet // *Am J Pathol.* – 2018. – Vol. 188 (6). – P. 1316-1327.
74. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates GPR91/ F. M. Castro, C. J. Aguiar, J. A. Rocha Franco [et al.] // *Cell Commun Signal* – 2016. – Vol. 12. – P.14.

75. Guidelines on the use of liver biopsy in clinical practice from the british society of gACTroenterology, the royal college of radiologists and the royal college of pathology / J. Neuberger, J. Patel, H. Caldwell [et al.] // Gut. – 2020. – Vol. 69 (8). – P. 1382-1403.

76. Halliday, N. Liver transplantation: post-transplant management / N. Halliday, R.H. Westbrook // Br J Hosp Med (Lond). – 2017. – Vol.78,№ 5. –P.278-285.

77. Hamaia, S. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines / S. Hamaia, C. Li, J. P. Allain // Blood. – 2001. – Vol. 98 (8). – P. 2293-2300.

78. Hepatic stem cells / S. Forbes, P. Vig, R. Poulson [et al.] // J Pathol. – 2012 – Vol. 226 (3). – P.510-518.

79. Higashi, T. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis / T. Higashi, S. L. Friedman, Y. Hoshida // Adv Drug Deliv Rev. – 2017. – Vol. 121. – P. 27-42.

80. Hyaluronic acid is a biomarker for allograft dysfunction and predicts 1-year graft loss after liver transplantation / A. A. Rostved, S. R. Ostrowski, L. Peters [et al.] // Transplant Proc. – 2018. – Vol. 50 (10). – P. 3635-3643.

81. Hypertension collaborative group. Incidence, prevalence, and clinical significance of abnormal hematologic indices in compensated cirrhosis / A. A. Qamar, N. D. Grace, R. J. Groszmann [et al.] // Clin GACTroenterol Hepatol. – 2009. – Vol. 7 (6). – P. 689-95.

82. Hypoxia sensing by hepatic stellate cells leads to VEGF-dependent angiogenesis and may contribute to accelerated liver regeneratio./ K. Dirscherl, M. Schläpfer, B. Roth Z'graggen [et al.] // Sci Rep. – 2020. –Vol. 10 (1). – P.4392.

83. Impact of immunosuppressive therapy on brain derived cytokines after liver transplantation / M. Dirks, H. Pflugrad, A. B. Tryc [et al.] // Transpl Immunol. – 2020. – Vol. 58. – P. 101-248.

84. Impaired liver regeneration after hepatectomy and bleeding is associated with a shift from hepatocyte proliferation to hypertrophy / I. Matot, N. Nachmansson, O. Duev, [et al.] // FASEB J. – 2017. – Vol. 31 (12). – P. 5283-5295.

85. Improved succinate production by metabolic engineering / K. K. Cheng, G. Y. Wang, J. Zeng, J. A. Zhang // *Biomed Res Int.* – 2013. – Vol. 20. – P. 53-58.
86. Inflammation-based prognostic scores in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma after liver transplantation / A. Ren, Z. Li, X. Zhang [et al.] // *Journal of Hepatocellular Carcinoma.* – 2020. – Vol. 23. – P.101-106.
87. Influence of intraoperative oxygen content on early postoperative graft dysfunction in living donor liver transplantation: A STROBE-compliant retrospective observational study / H. M. Lee, T. Kim, H. J. Choi [et al.] // *Medicine (BAJITimore).* – 2020. – Vol. 99 (21). – P.20-33.
88. Interleukin 6 at reperfusion: a potent predictor of hepatic and extrahepatic early complications after liver transplantation / F. Faitot, C. Besch, B. Lebas [et al.] // *Clin Transplant.* – 2018. – Vol. 32 (9). – P. 133-157.
89. Invasive fungal infection before and after liver transplantation / A. Ferrarese, A. Cattelan, U. Cillo [et al.] // *World J GACTroenterol.* – 2020. – Vol. 26 (47). – P.7485-7496.
90. Joshi, M. Chemokine-mediated robust augmentation of liver engraftment: a novel approach / M. Joshi, M. Oltean, P. B. Patil // *Stem Cells Transl Med.* – 2015. – Vol. 4 (1). – P. 21-30.
91. Jowkar, S. Preconditioning effect of remifentanil versus fentanyl in prevalence of early graft dysfunction in patients after liver transplant: a randomized clinical trial / S. Jowkar, M. B. Khosravi, M. A. Sahmeddini [et al.] // *Exp Clin Transplant.* – 2020. – Vol. 18 (5). – P. 598-604.
92. Kamada, N. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anACTomosis and biliary drainage / N. Kamada, R. Y.Calne // *Transplantation.* – 1979. – Vol. 28. – P. 47–50.
93. Khalifian, S. The use of luminex assays to measure cytokines / S. Khalifian, G. Raimondi, G. Brandacher // *J Invest Dermatol.* – 2015. – Vol. 135 (4). – P. 1-5.
94. Konishi, T. Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and regeneration / T. Konishi, A. B. Lentsch // *Gene Expr.* – 2017. – Vol. 17 (4). – P. 277-287.

95. Kurokawa, T. Platelets in liver disease, cancer and regeneration / T. Kurokawa, N. Ohkohchi // *World J Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23 (18). – P. 3228-3239.
96. Leve, L. D. Liver sinusoidal endothelial cell: An Update / L. D. DeLeve, A. C. Maretti-Mira // *Semin Liver Dis.* – 2017. – Vol. 37 (4). – P. 377-387.
97. Li, N. Immune cells in liver regeneration / N. Li, J. Hua // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8 (2). – P.3628-3639.
98. Liver fibrosis and CD206+ macrophage accumulation are suppressed by anti-GM-CSF therapy./ A. Tan-Garcia, A. F. Lai, J. P. Sheng Yeong [et al.] // *JHEP Rep.* – 2019. – Vol. 6 (1). – P.100-112.
99. Liver regeneration after hepatectomy and partial liver transplantation / S. Yagi, M. Hirata, Y. Miyachi [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21 (21). – P. 8414.
100. Liver regeneration after liver transplantation / A. Taki-Eldin, L. Zhou, H. Y. Xie, S. S. Zheng // *Eur Surg Res.* – 2012. – Vol. 48 (3). – P. 139-153.
101. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms / M. Tanaka, T. Itoh, N. Tanimizu, A. Miyajima // *J Biochem.* – 2011. – Vol. 149 (3). – P. 231-239.
102. Liver transplant complications radiologist can't miss / Y. Kimura, S. R. Tapia, D. Soto-Trujillo [et al.] // *Cureus.* – 2020. – Vol. 5. – P.84-95.
103. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives / R. F. Meirelles Júnior, P. Salvalaggio, M. B. Rezende [et al.] // *Einstein (Sao Paulo).* – 2015. – Vol. 13 (1). – P.149-52.
104. Luo, X. Directed differentiation of adult liver derived mesenchymal like stem cells into functional hepatocytes / X. Luo, K. Gupta, A. Ananthanarayanan // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8 (1). – P. 2818.
105. Mano, Y. Lymphocyte-to-monocyte ratio is a predictor of survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma / Y. Mano, T. Yoshizumi, K. Yugawa [et al.] // *Liver transplantation.* – 2018. – Vol. 32 – P.1603-1611.
106. Mao, S. A. Liver regeneration / S. A. Mao, J. M. Glorioso, S. L. Nyberg // *Transl Res.* – 2014. – Vol. 163 (4). – P. 352-362.

107. Markers of liver regeneration-the role of growth factors and cytokines: a systematic review / K. Hoffmann, A. J. Nagel, K. Tanabe [et al.] // BMC Surg. – 2020. – Vol. 20 (1). – P.31.

108. Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? / I. V. Kholodenko, L. K. Kurbatov, R. V. Kholodenko [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8 (10). – P. 1127.

109. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration / G. K. Michalopoulos // J Cell Physiol. – 2007. – Vol. 213 (2). – P. 286-300.

110. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications / G. K. Michalopoulos, B. Bhushan // Nat Rev Gastroenterol Hepatol. – 2021. – Vol. 18 (1). – P. 40-55.

111. Mitchell, C. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice / C. Mitchell, H. Willenbring // Nat Protoc. – 2008. – Vol. 3 (7). – P. 1167-70.

112. Moreno, R. Post-liver transplantation medical complications / R. Moreno, M. Berenguer // Ann Hepatol. – 2006. – Vol. 5 (2). – P. 77-85.

113. Nair, A. Extended criteria donors in liver transplantation-from marginality to mainstream / A. Nair, K. Hashimoto // Hepatobiliary Surg Nutr. – 2018. – Vol. 7 (5). – P. 386-388.

114. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis / Y. Lurie, M. Webb, R. Cytter-Kuint [et al.] // World J Gastroenterol. – 2015. – Vol. 21 (41). – P. 67-83.

115. Oo, Y. H. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver./ Y. H. Oo, S. Shetty, D. H. Adams // Dig Dis. – 2010. – Vol. 28 (1). – P. 31-44.

116. Orthotopic mouse liver transplantation to study liver biology and allograft tolerance / S. Yokota, S. Ueki, Y. Ono [et al.] // Nat Protoc. – 2016. – Vol. 11. – P.1163–1174.

117. Palmes, D. Detrimental effect of sinusoidal overperfusion after liver resection and partial liver transplantation / D. Palmes, T. B. Budny, K. H. Dietl // Transpl Int. – 2005. – Vol. 17. – P. 862–87.

118. Panzer, S. Is there an increased frequency of autoimmune thrombocytopenia in hepatitis C infection? / S. Panzer, E. Seel // A review. *Wien Med Wochenschr.* – 2003. – Vol. 153 (19-20). – P. 417-420.
119. Parola, M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues / M. Parola, M. Pinzani // *Mol Aspects Med.* – 2019. – Vol. 65. – P. 37-55.
120. Per, C. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu/ C. Per, M. B. Jiménez-Cactro, J. Gracia-Sancho // *J Hepatol.* – 2013. – Vol. 59 (5). – P.1094-1106.
121. Pereboom, I. T. Platelets in liver transplantation: friend or foe? / I. T. Pereboom, T. Lisman, R. J. Porte // *Liver Transpl.* – 2008. – Vol. 14 (7). – P. 923-931.
122. Pham, Y. H. Liver transplantation in children / Y. H. Pham, T. Miloh // *Clin Liver Dis.* – 2018. – Vol. 22 (4). – P.807-821.
123. Pinzani, M. Fibrosis in chronic liver diseases: diagnosis and management / M. Pinzani, K. Rombouts, S. Colagrande // *J. Hepatol.* – 2005. – Vol. 42. – P. 36.
124. Platelet and liver regeneration after liver surgery / K. Takahashi, C. Liang, T. Oda, N. Ohkohchi // *Surg Today.* – 2020. – Vol. 50 (9). – P. 974-983.
125. Platelet TGF- β 1 deficiency decreases liver fibrosis in a mouse model of liver injury / S. Ghafoory, R. Varshney, T. Robison [et al.] // *Blood Adv.* – 2018. – Vol. 13, № 2 (5). – P.470-480.
126. Platelet to lymphocyte ratio as a predictive biomarker of liver fibrosis (on elACTography) in patients with hepatitis C virus (HCV)-related liver disease / R. Catanzaro, M. Sciuto, C. Lanzafame [et al] // *Indian Journal of GACTroenterology.* – 2020. – № 6. – P. 253-260.
127. Platelet-to-lymphocyte ratio in the setting of liver transplantation for hepatocellular cancer: A systematic review and meta-analysis / Q. Lai, F. Melandro, Z. Larghi Laureiro // *World J GACTroenterol.* – 2018. – Vol. 24 (15). – P. 1658-1665.
128. Ponziani, F.R. Use of liver imaging and biopsy in clinical practice / F. R. Ponziani, A. Gasbarrini, M. Pompili // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 377 (23). – P. 2295-6.

129. Postoperative changes in neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet count: a simple prognostic predictor for adult-to-adult living donor liver transplantation / H Hayashi, H. Takamura, Y. Ohbatake [et al.] // *Asian J Surg.* – 2018. – Vol. 41 (4). – P.341-348.

130. Pozo-Laderas, J. C. Pretransplant predictors of early mortality in adult recipients of liver transplantation in the MELD-Na Era. Predictores pretrasplante de mortalidad precoz en receptores adultos de trasplante hepático en la era MELD-Na // J. C. Pozo-Laderas, M. Rodríguez-Perálvarez, M. C. Muñoz-Villanueva // *Med Intensiva.* – 2019. – Vol. 43 (5). – P. 261-269.

131. Predictive factors of short term outcome after liver transplantation: A review / G. Bolondi, F. Mocchegiani, R. MontAJTti [et al.] // *World J GACTroenterol.* – 2016. – Vol. 14, № 22 (26). – P. 5936-5949.

132. Prediction model for early graft failure after liver transplantation using aspartate aminotransferase, total bilirubin and coagulation factor / J. Rhu, J. M. Kim, K. Kim [et al.] // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11 (1). – P.12-22.

133. Prediction of late allograft dysfunction following liver transplantation by immunological blood biomarkers / S. Iacob, V. Cicinnati, I. Kabar [et al.] // *Transpl Immunol.* – 2021. – Vol. 69. –P.101-118.

134. Predictive utility of the C-reactive protein to albumin ratio in early allograft dysfunction in living donor liver transplantation: A retrospective observational cohort study / J. Park, S. J. Lim, H. J. Choi [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14 (12). – P.63-69.

135. Preformed antibodies detected by cytotoxic assay or multibead array decrease liver allograft survival: Role of human leukocyte antigen compatibility / M. CACTillo-Rama , M. J. CACTro, I. Bernardo [et al.] // *Liver Transpl.* – 2008. – Vol. 14. – P. 554-562.

136. Preoperative platelet count predicts posttransplant portal vein complications in orthotopic liver transplantation: a propensity score analysis / Q. Li, Y. Wang, T. Ma, [et al.] // *BMC Gastroenterol.* – 2021. – Vol. 21. – P.11-23.

137. Primary graft dysfunction of the liver: definitions, diagnostic criteria and risk factors / D. B. Neves, M. B. Rusi, L. G. Diaz [et al.] // *Einstein (Sao Paulo)*. – 2016. – Vol. 14 (4). – P. 567-572.

138. Primary liver graft dysfunction and non-function: integrative literature review / M. E. M. Salviano, A. S. Lima, I. S. Tonelli [et al.] // *Rev Col Bras Cir*. – 2019. – Vol. 46 (1). – P. 2039.

139. Prognostic and diagnostic value of procalcitonin in the post-transplant setting after liver transplantation / A. Perrakis, F. Stirkat, R. S. Croner [et al.] // *Arch Med. Sci*. – 2016. – Vol. 12 (2). – P.372–379.

140. Prognostic impact of peritransplant serum sodium concentrations in liver transplantation / P. Mihaylov, S. Nagai, B. Ekser [et al.] // *Ann Transplant*. – 2019. – Vol. 24. – P.418-425.

141. Prognostic impact of the mean platelet volume/platelet count ratio in terms of survival in advanced non-small cell lung cancer / K. Inagaki, K. Kibata, T. Tamaki [et al.] // *Lung Cancer*. – 2014. – Vol. 83 – P.97-101.

142. Progranulin a promotes compensatory hepatocyte proliferation via HGF/c-Met signaling after partial hepatectomy in zebrafish / K. Y. Chiang, Y. W. Li, Y. H. Li [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22 (20). – P. 11217.

143. Progressive induction of hepatocyte progenitor cells in chronically injured liver / N. Tanimizu, N. Ichinohe, M. Yamamoto [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – P. 390-399.

144. Rapid blood cell recovery with immunosuppressive therapy combined with romiplostim in a patient with very severe hepatitis-associated aplastic anemia who underwent liver transplantation / H. Yoshinari, Y. Kawahara, H. Niijima [et al.] // *Int J Hematol*. – 2021. – Vol. 114 (4). – P.524-527.

145. Ratio of mean platelet volume to platelet count is a potential surrogate marker predicting liver cirrhosis / H. Iida, M. Kaibori, K. Matsui [et al.] // *World J Hepatol*. – 2018. – Vol. 10 (1). – P.82-87.

146. Risk assessment in high- and low-MELD liver transplantation / A. Schlegel, M. Linecker, P. Kron [et al.] // *Am J Transplant*. – 2017. – Vol. 17 (4). – P. 1050–1063.

147. Risk factors for post-liver transplant biliary complications in the absence of arterial complications / A. S. Lima, B. B. Pereira, S. Jungmann, [et al.] // *Arq Bras Cir Dig.* – 2020. – Vol. 33 (3). – P.1541-1551.

148. Riva, G. A. Known hepatoprotectors act as antioxidants and immune stimulators in stressed mice: perspectives in animal health care / G.A. de la Riva, F. J. López Mendoza, G. Agüero-Chapin // *Curr Pharm Des.* – 2018. – Vol. 24 (40). – P.4825-4837.

149. Role of the postoperative cholesterol in early allograft dysfunction and survival after living donor liver transplantation / J. Yang, H. Q. Wang, J. Y. Yang [et al.] // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* – 2017. – Vol. 16 (6). – P.610-616.

150. Safety and efficacy of transjugular liver biopsy in patients with left lobe-only liver transplants / K. A. Lee, A. Taylor B. Bartolome [et al.] // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2019. – Vol. 34 (18). – P. 360-362.

151. Sasaki, T. IL-8 induces transdifferentiation of mature hepatocytes toward the cholangiocyte phenotype / T. Sasaki, Y. Suzuki, K. Kakisaka // *FEBS Open Bio.* – 2019. – Vol. 9 (12). – P. 2105-2116.

152. Schiano, T. D. Should living donor liver transplantation be an option when deceased donation is not? / T. D. Schiano, R. Rhodes // *J Hepatol.* – 2018. – Vol. 68 (5). – P. 1076-1082.

153. Seki, E. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis / E. Seki, D. A. Brenner // *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* – 2015. – Vol. 22 (7). – P.512-518.

154. Serum factor V is a continuous biomarker of graft dysfunction and a predictor of graft loss after liver transplantation / A. Gorgen, C. Prediger, J. E. Prediger [et al.] // *Transplantation.* – 2019. – Vol. 103 (5). – P. 944-951.

155. Serum interleukin-8, osteopontin, and monocyte chemoattractant protein 1 are associated with hepatic fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease / O. Glass, R. Henao, K. Patel // *Hepatol Commun.* – 2018. – Vol. 2 (11). – P. 1344-1355.

156. Shukla, R. V. Time dependent release of interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in platelet concentrate / R. V. Shukla, T. G. Patel, S. C. Gupte // *Indian J Hematol Blood Transfus.* – 2015. – Vol. 31 (2). – P. 259-263.

157. Siddique, I. Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C viral infection / I. Siddique, H. A. El-Naga, J. P. Madda // *Scand. J. GASTroenterol.* –2003. – Vol. 38. – P. 427-432.

158. Sood, S. Immune monitoring post liver transplant / S. Sood, A. G. Testro // *World J Transplant.* – 2014. – Vol. 24, № 4 (1). – P. 30-9.

159. Starlinger, P. The profile of platelet α -granule released molecules affects postoperative liver regeneration / P. Starlinger, S. Haegele, F. Offensperger // *Hepatology.* – 2016. – Vol. 63 (5). – P. 1675-1688.

160. Stepwise combination algorithms of non-invasive markers to diagnose significant fibrosis in chronic hepatitis C / G. SebACTiani, A. Vario, M. Guido [et al.] // *J. Hepatol.* – 2006. – Vol. 44. – P.686-693.

161. Succinate induces hepatic fibrogenesis by promoting activation, proliferation, and migration, and inhibiting apoptosis of hepatic stellate cells / S. Y. Park, C. T. Le, K. Y. Sung [at al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2018. – № 496 (2). – P.673-678.

162. Succinate is a paracrine signal for liver damage / P. R. Correa, E. A. Kruglov, M. Thompson [et al.] // *J Hepatol.* – 2007. – Vol. 47 (2). – P.262-9.

163. Tarlow, B. D. Bipotential adult liver progenitors are derived from chronically injured mature hepatocytes / B. D. Tarlow, C. Pelz, W. E. Naugler // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Vol. 15 (5). – P. 605-618.

164. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling / R. Grozovsky, A. J. Begonja, K. Liu [et al.] // *Nat Med.* – 2015. – Vol. 21 (1). – P. 47-54.

165. The association of obesity with vascular complications after liver transplantation / Y. Shi, B. Huang, R. Deng, Y. Ma // *BMC GASTroenterol.* – 2019. – Vol. 19 (1). – P.39.

166. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017 / G. Sadaf Sepanlou, S. Safiri, C. Bisignano [et al.] // *The Lancet GASTroenterology & Hepatolog.* – 2020. – Vol. 5. – P.245-266.

167. The impact of postreperfusion syndrome on short-term patient and liver allograft outcome in patients undergoing orthotopic liver transplantation / I. Hilmi, C.N. Horton, R.M. Planinsic, [et al.]// *Liver Transpl.* – 2008. – Vol. 14(4). – P. 504-8.

168. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease / O. Mitchell, D. M. Feldman, M. Diakow, [et al.] // *Hepat Med.* – 2016. – Vol. 8. – P. 39-50.

169. Transplanted human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells support liver regeneration in Gunn rats / L. S. Spitzhorn, C. Kordes, M. Megges [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2018. – Vol. 27 (24). – P. 1702-1714.

170. Trotter, J. F. Liver transplantation around the world // *Curr Opin Organ Transplant.* – 2017. – Vol. 22 (2). – P.123-127.

171. Understanding the marvels behind liver regeneration / A. Abu Rmilah, W. Zhou, E. Nelson [et al.] // *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* – 2019 – Vol. 8 (3). – P. 340.

172. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis/ C. S. Melincovici, A. B. Boşca, S. Şuşman [et al.] // *Rom J Morphol Embryol.* – 2018. – Vol. 59 (2). – P.455-467.

173. VEGF mitigates histone-induced pyroptosis in the remote liver injury associated with renal allograft ischemia-reperfusion injury in rats / H. Zhao, H. Huang, A. Alam [et al.] // *Am J Transplant.* – 2018. – Vol. 18 (8). – P. 1890-1903.

174. Vodkin, I. Extended criteria donors in liver transplantation / I. Vodkin, A. Kuo // *Clin Liver Dis.* – 2017. – Vol. 21 (2). – P.289-301.

175. Weiskirchen, R. Liver fibrosis: Which mechanisms matter? / R. Weiskirchen, F. Tacke // *Clin Liver Dis (Hoboken).* – 2016. – Vol. 27 (4). – P.94-99.

176. Weiss, T. S. Augmenter of liver regeneration reduces ischemia reperfusion injury by less chemokine expression, Gr-1 and oxidative stress / T. S. Weiss, M. Lupke, R. Dayoub // *Cells.* – 2019. – Vol. 8 (11). – P. 1421.

177. Zhang, W. Navigating immune cell immunometabolism after liver transplantation / W. Zhang, Z. Liu, X. Xu // *Crit Rev Oncol Hematol.* - 2021. – Vol.160. – P.103-114.

178. Zhangdi, H. J. Crosstalk network among multiple inflammatory mediators in liver fibrosis / H. J. Zhangdi, S. B. Su, F. Wang // World J Gastroenterol. – 2019. – Vol. 25 (33). – P. 4835-4849.

179. Всемирная организация здравоохранения: официальный сайт. Информационный бюллетень. 164. 2013 [Электронный ресурс] - <https://www.who.int/ru/>.