

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-3-24-31

ПРЕДРЕПЕРФУЗИОННАЯ ПОРТАЛЬНО-АРТЕРИАЛЬНАЯ ПЕРФУЗИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ РАСТВОРОМ НТК, СОДЕРЖАЩИМ ТАКРОЛИМУС, УМЕНЬШАЕТ ЧАСТОТУ ВОЗНИКНОВЕНИЯ РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ

А.Е. Щерба, С.В. Коротков, Д.Ю. Ефимов, А.Ф. Минов, О.А. Лебедь, А.А. Коритко, А.М. Дзядзько, О.О. Руммо

РНПЦ трансплантации органов и тканей УЗ «9-я городская клиническая больница», Минск, Республика Беларусь

В предыдущих исследованиях было показано, что такролимус может подавлять воспаление и иммунный ответ во время ишемически-реперфузионного повреждения трансплантата печени (Kristo I., *Transpl Int.*, 2011). **Цель исследования.** Оценить влияние back-table портальной и артериальной перфузии раствором НТК и альбумина, содержащим такролимус, на частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантата печени. **Материалы и методы.** Для достижения поставленной цели было организовано интервенционное проспективное рандомизированное исследование (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01887171) в двух параллельных группах по 43 пациента. Критерии включения: первичная ортотопическая трансплантация печени от донора со смертью мозга с последовательной портально-артериальной реперфузией. В основной группе на операции back-table выполняли перфузию воротной вены под давлением 40–60 см водяного столба раствором НТК в объеме 500 мл с содержанием такролимуса 20 нг/мл, а затем перфузию печеночной артерии 500 мл такого же раствора под давлением 40–50 мм рт. ст., перед имплантацией графта в воротную вену вводили 200 мл 5% раствора альбумина с содержанием такролимуса 20 нг/мл. В контрольной группе такролимус не был добавлен. **Результаты.** Группы были сопоставимы (основная против контрольной соответственно) по баллу MELD, стеатозу, баллонной дистрофии трансплантатов печени, возрасту реципиента, времени тепловой ишемии и общему времени ишемии. Средний возраст донора был выше в основной группе (44,5 против 39 лет). Общая частота ранней дисфункции аллогraftа (РДА) была 27,9%. Частота РДА была значительно ниже в основной группе (6/43 против 18/43, $p = 0,003$), также частота тяжелой РДА была значимо ниже в основной группе (1/43 против 10/43; $p = 0,009$). Средний уровень АСТ и АЛТ через 24 ч после реперфузии были значительно ниже в основной группе (1004 против 1596; $p = 0,03$ и 449 против 759, $p = 0,057$). **Заключение.** Применение инфузии раствора НТК и альбумина с такролимусом в воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорской печени к имплантации позволяет уменьшить частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантата печени.

Ключевые слова: дисфункция трансплантата печени, портально-артериальная перфузия.

PORTAL AND ARTERIAL FLUSHING WITH HTK AND TACROLIMUS CAN ATTENUATE THE INCIDENCE OF EARLY LIVER ALLOGRAFT DYSFUNCTION

A.E. Shcherba, S.V. Korotkov, D.Yu. Efimov, A.F. Minou, O.A. Lebedz, A.A. Karytka, A.M. Dzyadzko, O.O. Rummo

Republican Scientific and Practical Center for Organ and Tissue Transplantation, the 9th Minsk Clinical Hospital, Minsk, Republic of Belarus

It was shown that Tacrolimus (Tac) can suppress inflammation and immune response involved in liver ischemia-reperfusion injury (IRI) (Kristo I., *Transpl Int.*, 2011). **Aim.** We hypothesize that back-table arterial and portal liver perfusion with Tac can influence the incidence and severity of early allograft dysfunction (EAD).

Для корреспонденции: Щерба Алексей Евгеньевич. Адрес: 220045, г. Минск, Республика Беларусь, ул. Семашко, 8. Тел. (375-29) 333-06-89. E-mail: aleina@tut.by.

For correspondence: Shcherba Aliaksei. Address: 220045, Semashko str. 8, Minsk, Belarus. Tel. (375-29) 333-06-89. E-mail: aleina@tut.by.

A prospective randomized study was conducted (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01887171). **Materials and methods.** Criteria of the inclusion: First liver transplantation from DBD donor with sequential portal-arterial reperfusion. At back-table portal vein and hepatic artery were perfused each by 500 ml of HTK solution containing 20 ng/ml Tac during 10–15 min followed by portal flushing with 200 ml 5% solution of Albumin containing 20 ng/ml Tac and by resting of liver in effluent. No Tac was added in the control group. Primary Outcome: EAD (Olthoff KM, et al. Liver Transpl. 2010) and severe EAD (P.R.Salvalaggio, et al. Transpl. Proceedings, 2012). **Results.** No difference was found between groups (main vs. control) in terms of MELD (16 vs. 16), steatosis (10 vs. 10%), ballooning (45 vs. 40%) of liver grafts, recipient age (50 vs. 50 y.o.), warm ischemia time (50 vs. 50 min) and total ischemia time (482.5 vs. 485.0 min). Median donor age was higher in the main group (44.5 vs. 39.0 y.o.). The overall rate of EAD was 27.9%. EAD rate was significantly lower in the main group (6/43 vs. 18/43; $p = 0.003$). The rate of moderate-to-severe EAD was lower in the main group (1/43 vs. 10/43; $p = 0.009$). The median levels of AST and ALT in 24 h after reperfusion were significantly lower in the intervention group (1004 vs. 1596; $p = 0.03$ and 449 vs. 759; $p = 0.057$). **Conclusion.** Portal and arterial back-table liver perfusion with HTK solution with Tacrolimus may contribute to lower EAD incidence and severity.

Key words: liver allograft dysfunction, portal and arterial flushing.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация печени (ТП) радикально изменила прогноз пациентов с терминальной стадией хронической патологии печени и некоторыми новообразованиями. Успех операции, однако, осложнен несоответствием между количеством пациентов листов ожидания и доступных доноров даже после внедрения SPLIT-технологий и родственной трансплантации. Данное несоответствие выражается в 10–20% смертности в листах ожидания и потребности в органах от доноров с расширенными критериями. Однако использование умерших доноров с расширенными критериями сопряжено с развитием ранней дисфункции трансплантата (РДТ), в основе которого лежит ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) [1]. Salvalaggio с соавт. показали, что тяжелая РДТ сопровождается значительно меньшей однолетней выживаемостью трансплантата (54,6% против 91,8%, $p < 0,001$) и пациента (71,7% против 94%, $p < 0,001$) по сравнению с умеренно выраженной РДТ [2].

Ряд фенотипических факторов риска ассоциирован с развитием РДТ, среди которых со стороны донора выделяют возраст донора, уровень Na сыворотки крови, жировой гепатоз, гипотензию, длительный период холодовой ишемии, тепловую ишемию более 40 мин, длительность ИВЛ у донора более 5 сут, донор с небьющимся сердцем и расщепленный или редуцированный трансплантат [3]. Со стороны реципиента известны такие факторы риска, как значение балла MELD и срочность трансплантации [4].

Bussutil с соавт. предложили механизм ИРП с участием таких факторов, как эндотелин-1, активация Купферовых клеток, наработка реактивных медиаторов кислорода, активация адгезионных молекул на поверхности эндотелиальных клеток синусоидальных вен, спазм и тромбоз синусоидальных вен, ишемия, апоптоз и некроз гепатоцитов [5].

Поскольку на большинство факторов риска РДТ невозможно (возраст донора, MELD, срочность, жировой гепатоз, потребность в вазопрессорах) или трудно воздействовать (время холодовой и тепловой ишемии, повреждение при кондиционировании), основными стратегиями предупреждения РДТ являются сокращение сроков общей и тепловой ишемии, машинная перфузия и фармакологическая гепатопротекция. В силу доступности и воспроизводимости фармакологическая гепатопротекция является одним из широко изучаемых способов ослабления ИРП и профилактики РДТ. В этом направлении было исследовано влияние метилпреднизолонa [6], севофлурана [7], оксида азота [8], ацетилцистеина, специфического блокатора Р-селектина и др. [9].

Экспериментальные данные свидетельствуют о потенциальной роли ингибитора кальциневрина такролимуса в ослаблении ИРП и гепатопротекции при ТП [10–12]. Было показано, что такролимус способен угнетать воспаление и иммунный ответ в трансплантированной печени на геномном уровне, а также имеются данные о протективной функции ингибиторов кальциневрина при ИРП сердца, что свидетельствует об органо-неспецифическом возможном механизме действия [13, 14]. Однако клиническая эффективность такролимуса в гепатопротекции на основании известных публикаций остается сомнительной в силу неадекватной мощности известных исследований, характеристик пациентов и способа введения лекарственного средства (по 13 и 10 пациентов в группе, средний уровень гепатоза 1%, время общей ишемии 384 мин, введение только в воротную вену или портально-артериальная инфузия во время формирования кавальных анастомозов т. е. *in situ*) [15].

В этой связи мы организовали собственное клиническое исследование и выдвигаем гипотезу о том, что портально-артериальная перфузия трансплантата печени раствором НТК, содержащим такроли-

мус, с последующей отмывкой печени раствором альбумина, содержащим такролимус, во время back-table операции может уменьшить частоту и/или выраженность РДТ трансплантата печени.

Цель. Оценить влияние back-table портальной и артериальной перфузии раствором НТК и флашинга раствором альбумина, содержащим такролимус, на частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантата печени.

Конечные точки исследования: частота РДТ, уровень АСТ и АЛТ в первые 24 и 48 ч после трансплантации печени, ишемически реперфузионное повреждение (ИРП) по данным биопсии через 2 ч после портальной реперфузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В основе работы лежит проспективное рандомизированное одноцентровое двойное слепое исследование (evaluation of preimplantation Portal vein and hepatic Artery flushing with TACrolimus; зарегистрировано на clinicaltrials.gov, NCT01887171). Критерии включения: возраст донора 15–65 лет, макровезикулярный стеатоз менее 40%, содержание натрия менее 165 ммоль/л, длительность ИВЛ менее 11 сут, время холодной ишемии менее 13 ч, АСТ и АЛТ менее 200 Ед./л, общий билирубин менее 50 мкмоль/л; со стороны реципиента – возраст реципиента 18–69 лет, классическая методика операции с последовательной портально-артериальной реперфузией. Критерии исключения: трансплантация печени от живого родственного донора, редуцированные/split трансплантат, полиорганная недостаточность у реципиента перед ТП, первично не функционирующий трансплантат как показание к ТП. Расчет размера групп исследования произведен с учетом мощности исследования 0,80, вероятности ошибки I типа, α , равной 0,05, и анализа результатов 166 ТП, выполненных до исследования (среднее значение АСТ пациентов с РДТ в первые сутки составило 4476 ± 3591 Ед./л против 947 ± 466 Ед./л пациентов без РДТ). Таким образом, полагая, что применение портально-артериальной перфузии трансплантата печени раствором НТК, содержащим такролимус, приведет к снижению частоты РДТ с 30 до 5%, каждая группа исследования должна включать 35–41 пациентов [16]. На основании расчета мощности в исследование было включено 86 пациентов (по 43 в каждой группе). Рандомизация была обеспечена за счет вскрытия конвертов перед операцией back-table.

Всем умершим донорам вводился метилпреднизолон в дозе 1,0 гр внутривенно перед началом мультиорганного забора. На этапе донорской операции выполнялась биопсия сегмента III для последующей оценки степени жирового гепатоза и баллонной дистрофии.

Во время операции back-table канюлировали воротную вену и общую печеночную артерию. Выполняли перфузию воротной вены под давлением 40–60 см водяного столба раствором НТК в объеме 500 мл с содержанием такролимуса 20 нг/мл, а затем перфузию печеночной артерии 500 мл такого же раствора под давлением 40–50 мм рт. ст. Необходимое давление в артерии создавали с помощью ручного компрессионного инфузора. Затем с высоты 40–60 см в воротную вену вводили 200 мл 5% раствора с содержанием такролимуса 20 нг/мл. Донорскую печень оставляли в емкости или, при ожидаемом времени до имплантации более 30 мин, после стерильной упаковки в транспортировочные целлофановые пакеты помещали в камеру холодильника (температура 2–6 °С). В группе сравнения такролимус в раствор НТК не добавлялся. После завершения перфузии образец эффлюэнта у 16 случайно выбранных пациентов основной группы был взят для определения концентрации такролимуса.

Пробы крови печеночных вен сразу, через 1 ч после портальной реперфузии, пробы периферической крови через 24 и 72 ч после операции были использованы для определения уровней интерлейкинов (IL) 2, 6, 8, 17, 23 методом мультиплексного иммуноанализа.

Через 2 ч после портальной реперфузии выполнялась биопсия участка сегмента III для оценки выраженности ИРП. Биоптат помещался в буферизованный формалин и транспортировался в морфологическую лабораторию. Протокол забора образцов крови и биоптатов представлен в табл. 1.

Мультиплексный анализ выполнялся на анализаторе Luminex 200, основанном на технологии xMAP компании Luminex (США) с использованием магнитных частиц «MilliplexMag» и панелей в составе коммерческих тест-систем MILLIPLEX («Milliprobe», США). Концентрация такролимуса была определена аппаратным методом на анализаторе ARCHITECT i2000SR.

Критериями РДТ выбраны: 1) общий билирубин более 170 мкмоль/л на 7-е послеоперационные сутки, или 2) МНО более 1,6 на 7-е послеоперационные сутки, или 3) уровень аминотрансфераз (АСТ или АЛТ) более 2000 Ед./л в течение первой недели после трансплантации [17]. Согласно данным Salvalaggio с соавт., РДТ была разделена на легкую (АСТ и АЛТ менее 3000 Ед./л) и умеренно-тяжелую (АСТ и АЛТ более 3000 Ед./л, МНО более 1,6 и общий билирубин более 170 мкмоль/л) [2].

Таблица 1

Протокол исследования
Study protocol

| Биопсия печени во время мультиорганного забора (донорский биоптат) | Образцы крови во время трансплантации печени | | | | Биопсия печени через 2 ч после портальной реперфузии | Образцы крови через 24 и 72 ч после реперфузии |
|--|--|--------|--|---------------------------------|--|---|
| | Из воротной вены | Из НПВ | Печеночные вены | | | |
| | | | 0 мин после портальной реперфузии | 1 ч после портальной реперфузии | | |
| ИГХ-окраска на CD68, HMGB1, HIF-1 α | ЛПСБ, IL-6 | | P-selectin, IL-2, 6, 8, 17, 23, TNF- α , MIP-1 α | | ИГХ-окраска на CD68, HMGB1, HIF-1 α | IL-2, 6, 8, 17, 23, TNF- α , MIP-1 α , VEGF |

Примечание. ИГХ – иммуногистохимический, ЛПСБ – липополисахарид-связывающий белок, НПВ – нижняя полая вена.

Биоптаты печени фиксировались в формалине с фосфатным буфером и транспортировались в транспортном холодильнике при температуре 2–4 °С. После гистологической проводки уплотненный, обезвоженный и обезжиренный участок ткани печени инфильтрировался парафином с последующим формированием парафинового блока. Гистологические срезы толщиной 4 мкм окрашивались гематоксилином и эозином, суданом красным/черным, а также MSB и ШИК-реакцией.

Статистический анализ выполнен с помощью пакета STATISTICA 8 для Windows и SPSS 22 для Macintosh. Средние величины показаны как медиана (25%; 75%). Поиск литературных источников был произведен в электронных базах данных Medscape, Pubmed (NLM) и Cochrane.org с применением программного пакета Endnote®Web для Macintosh.

Характеристика пациентов представлена в табл. 2. Группы были сравнимы по баллу MELD, возрасту реципиента, длительности общей и тепловой ишемии трансплантата, уровню стеатоза и баллонной дистрофии. Возраст донора был достоверно больше в группе сравнения, что могло бы быть принято во внимание при неподтверждении альтернативной гипотезы.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клиническая эффективность

Общая частота ранней дисфункции трансплантата составила 27,9% (24/86). Ранняя дисфункция трансплантата по критериям К.М. Olthoff с соавт. развилась у 6 пациентов основной группы (13,9%), что было достоверно меньше, чем в группе сравнения, 18/43 (41,8%), ($\chi^2 = 6,33$; $p = 0,003$). Частота умеренно-тяжелой РДТ по критериям Salvalaggio с соавт. в основной группе, 1/43 (2,3%), была также значительно меньше, чем в группе сравнения, 10/43 (23,2%), (Fisher exact; $p = 0,009$).

Анализ максимальных значений АСТ и АЛТ в первые 24 и 48 ч после реперфузии показал, что уровень АСТ₂₄ в основной группе, 1004 (641; 1515) Ед./л, был достоверно и значительно ниже, чем в группе сравнения, 1596 (675; 2781) Ед./л (Mann–Whitney; $p = 0,03$). Имела место тенденция к меньшему уровню АЛТ₂₄ в основной группе, 449 (384; 939) Ед./л, по сравнению с контрольной, 759 (437; 1087) Ед./л (Mann–Whitney; $p = 0,057$). Менее значимые различия были получены для средних максимальных значений, АСТ₄₈ и АЛТ₄₈.

Первичное нефункционирование трансплантата развилось в одном случае в каждой группе (Fisher

Таблица 2

Характеристика пациентов
Patients description

| № | Показатель | Основная группа, n = 43 | Группа сравнения, n = 43 | p |
|---|----------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------|
| 1 | MELD | 16 (11; 20) | 16 (14; 21) | 0,43 |
| 2 | Возраст реципиента, лет | 50 (38; 56) | 50 (40; 58) | 0,54 |
| 3 | Возраст донора, лет | 44,5 (37; 51) | 39 (26; 47) | 0,043 |
| 4 | Время общей ишемии, мин | 482,5 (400; 525) | 485 (425; 515) | 0,93 |
| 5 | Время тепловой ишемии, мин | 50 (45; 60) | 50 (45; 60) | 0,52 |
| 6 | Жировой гепатоз, % | 10 (3; 20) | 10 (3; 30) | 0,68 |
| 7 | Баллонная дистрофия, % | 45 (30; 50) | 40 (15; 55) | 0,7 |
| 8 | Кровопотеря, мл | 1200 (900; 1700) | 1500 (800; 2200) | 0,33 |

ехаст; $p = 1$). Частота почечной недостаточности с потребностью в ПЗТ в раннем послеоперационном периоде не отличалась в основной, 9/43, и контрольной, 6/43, группах ($\chi^2 = 0,7$; $p = 0,5$). Частота септических осложнений также достоверно не отличалась в исследуемых группах и составила 20% (9/43) в основной и 16,2% (7/43) в группе сравнения ($\chi^2 = 0,31$; $p = 0,7$).

Госпитальная летальность составила 4,6% (2/43) в основной группе и была незначительно меньше, чем в группе сравнения – 6,9% (3/43), (Fisher exact; $p = 1$). Причиной летального исхода на 28-е и 60-е сут в основной группе явились первичное нефункционирование трансплантата в первом и сепсис в обоих случаях (*MRSA + Acinetobacter* и *Enterococcus + Acinetobacter*). Причиной летального исхода на 7, 23 и 65-е сут в группе сравнения явились первичное нефункционирование трансплантата ($n = 1$), острый герпетический гепатит ($n = 1$) и сепсис ($n = 1$; *Enterococcus + Acinetobacter*).

Ишемически-реперфузионное повреждение

Морфологическое исследование для оценки ИРП было выполнено в 23 случаях в группе сравнения и 24 в основной группе. Частота тяжелого ИРП (некроз в периферической и 2-й зоне более 30%, апоптоз 3–5%) составила 26% (6/23) в группе сравнения и была значимо больше, чем в основной группе, 4,1% (1/24), (Fisher exact; $p = 0,04$). Статистически менее значимое отличие между группами было получено для умеренно-тяжелого ИРП (некроз более 15%, апоптоз 1,5–5%).

Концентрация такролимуса в эффлюэнте

Медиана концентрации такролимуса в эффлюэнте, в котором находилась донорская печень после завершения перфузии, составила 6,6 (5,3; 14,7) нг/мл.

Серологические маркеры

В результате анализа клинических ассоциаций уровней ИЛ-2, 6, 8, 17, 23 в образцах крови печеночных вен (сразу после портальной реперфузии и через один час) и периферической крови через 24 ч после реперфузии была получена достоверная корреляция между длительностью ИВЛ донора и уровнем ИЛ-6 в печеночных венах трансплантата через 1 ч после реперфузии (Spearman, $\rho = 0,4$; $p = 0,03$); между уровнем ИЛ-6 в периферической крови через 24 ч после реперфузии и АЛТ₂₄ (Spearman Rank Order, $\rho = 0,38$; $p < 0,05$); между уровнем ИЛ-17 в периферической крови через 24 часа после реперфузии и АСТ₄₈ (Spearman Rank Order,

$\rho = 0,39$; $p < 0,05$); между разницей уровня ИЛ-17 в периферической крови через 24 ч с уровнем в печеночных венах через один час после портальной реперфузии и АСТ₄₈ (Spearman Rank Order, $\rho = 0,4$; $p < 0,05$).

Получение корреляций между уровнями исследованных интерлейкинов и клиническими данными, связанными с ИРП, позволило нам предположить вовлечение данных медиаторов в механизм ИРП и рассматривать их как потенциальные суррогатные маркеры эффективности/неэффективности реперфузии такролимусом.

Так, прирост уровня ИЛ-17 между пробами крови печеночных вен сразу после портальной реперфузии и через один час был достоверно меньше в группе пациентов, получивших инфузию такролимуса в воротную вену и печеночную артерию во время back-table-операции (рис. 1).

В группе с добавлением такролимуса в консервирующий раствор на back-table было отмечено статистически значимое снижение концентрации ИЛ-6 через 24 часа после операции, 2,2 (0,1; 20,9) нг/мл, по сравнению с контрольной группой 37,6 (6,1; 56,2) нг/мл, $p = 0,03$; рис. 2) и тенденция к снижению концентрации ИЛ-2 через 24 ч после операции, 0,83 (0,1; 14,9) нг/мл, в сравнении с уровнем ИЛ-2, 42,01 (18,9; 50,6) нг/мл, в группе без такролимуса ($p = 0,07$; рис. 3). Также имела место тенденция к снижению уровня ИЛ-23 в пробе печеночных вен через 1 час после реперфузии в основной группе по сравнению с уровнем ИЛ-23 в группе без такролимуса ($p = 0,05$; рис. 4).

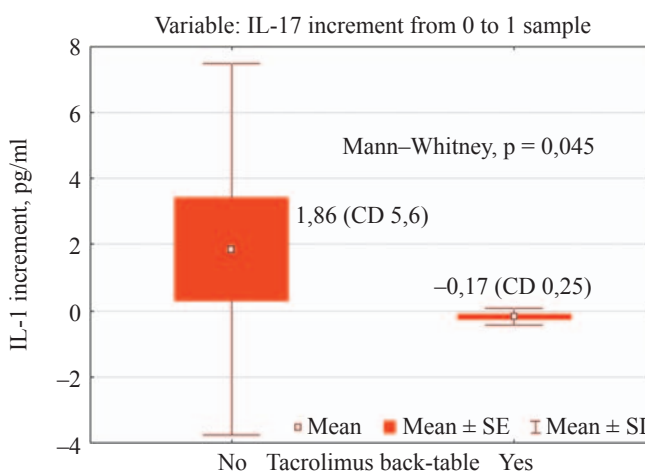


Рис. 1. Прирост уровня ИЛ-17 между пробами крови печеночных вен во время ТП и на 1-е п/о сутки в группах с инфузией и без инфузии такролимуса в воротную вену и печеночную артерию во время back-table-операции

Fig. 1. The increase in the level of IL-17 between the hepatic vein blood samples during liver transplantation and on the first day after transplantation in the groups with and without tacrolimus infusion into the portal vein and the hepatic artery during back-table operation

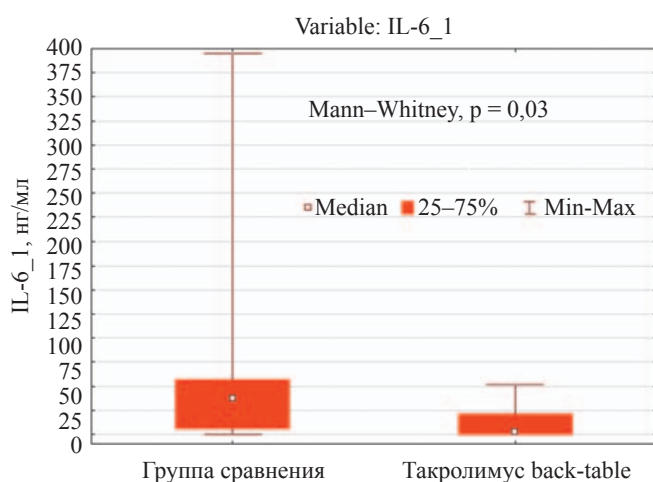


Рис. 2. Отличие концентрации ИЛ-6 через 24 ч после операции между пробами периферической крови в группах с инфузией и без инфузии такролимуса

Fig. 2. IL-6 concentration difference between peripheral blood samples in groups with and without tacrolimus infusion 24 hours after transplantation

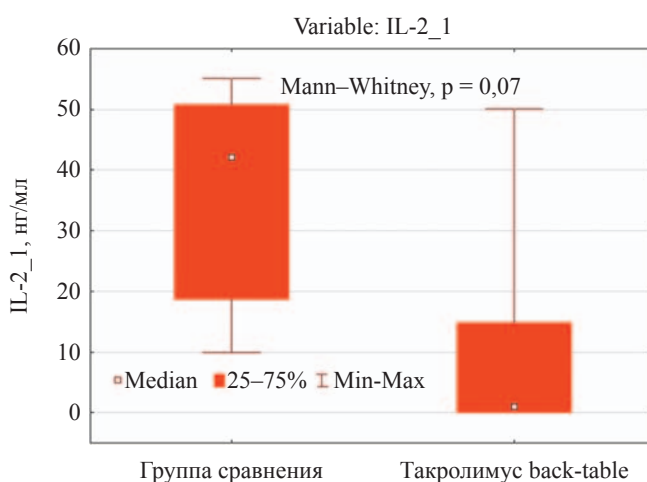


Рис. 3. Отличие концентрации ИЛ-2 через 24 ч после операции между пробами периферической крови в группах с инфузией и без инфузии такролимуса

Fig. 3. IL-2 concentration difference between peripheral blood samples in groups with and without tacrolimus infusion 24 hours after transplantation

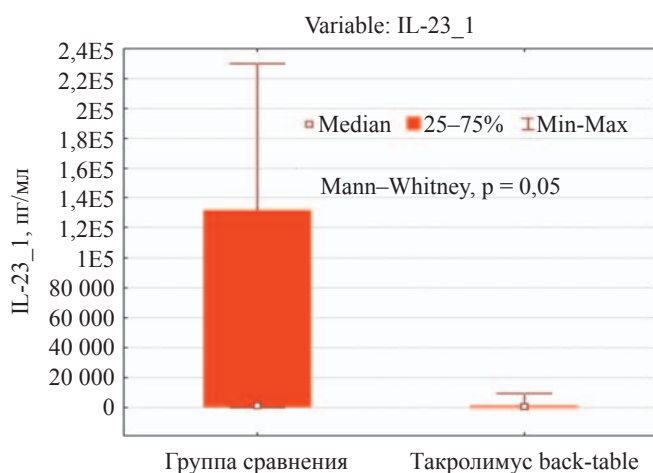


Рис. 4. Отличие концентрации ИЛ-23 (пг/мл) в пробе печеночных вен через 1 час после реперфузии между пробами периферической крови в группах с инфузией и без инфузии такролимуса

Fig. 4. IL-23 concentration (pg/ml) difference in the sample of hepatic veins 1 hour after reperfusion in groups with and without tacrolimus infusion

ОБСУЖДЕНИЕ

Теоретическое обоснование фармакологической гепатопротекции лежит в необходимости ослабления ИРП как причины РДТ при трансплантации печени. Результаты экспериментальных исследований системного применения такролимуса показали его эффективность в отношении ИРП печени [10–12]. Несколько возможных механизмов гепатопротекции при ИРП и ТП известны при использовании такролимуса. Среди них поддержание уровня глутатиона в гепатоцитах по данным эксперименталь-

ных работ [12], инактивация Т-лимфоцитов, вовлеченных в повреждение эндотелиоцитов синусоидов посредством адгезии и высвобождения цитокинов, хемокинов и адгезионных молекул, взаимодействия с Купферовыми клетками и тромбоцитами [18, 19], ослабление адгезии нейтрофилов к эндотелиоцитам синусоидов и ингибирование Купферовых клеток [13, 20], ослабление экспрессии вазоконстрикторных субстанций, в частности эндотелина-1 [21], уменьшение образования реактивных медиаторов кислорода [22] и ингибирование транскрипции гена TLR-4, которому в настоящее время придается ведущая роль в контроле иммунного и воспалительного ответа при ИРП [23].

Предварительные клинические исследования Peter SD и Kristo I показали потенциальную пользу от промывывания печени перед реперфузией раствором, содержащим такролимус, в снижении уровней АСТ и АЛТ и угнетении транскрипции провоспалительных цитокинов на геномном уровне. Несмотря на обещающие данные, результаты этих исследований не могли быть интерпретированы как надежные для внедрения в клиническую практику из-за большой вероятности случайной ошибки. В обеих работах размер группы исследования (10 и 13 пациентов) был недостаточным для формирования клинических выводов. Помимо недостатков дизайна эти исследования имели и методические особенности, не сочетающиеся с гепатопротективной сутью метода. Так, в работе Kristo I для перфузии воротной вены применяли давление, равное 147 мм рт. ст., значение, которое оказывает повреждение эндотелия печеночных синусоидов и может привести к печеночной недостаточности [24]. И наконец, в обоих исследова-

ниях донорские органы имели меньший риск ИРП и последующей РДТ в силу незначительного жирового гепатоза (1%, Kristo I) и небольшого среднего времени общей ишемии (384 мин, Peter SD).

Концентрация такролимуса 20 нг/мл в нашем исследовании была выбрана на основании данных о безопасности в предыдущих исследованиях, а также рекомендуемого производителем диапазона поддерживаемых концентраций в плазме крови [25].

Отличие нашего метода состоит в удобном выполнении перфузии на back-table, когда печень охлаждена в емкости с ледяной крошкой; применении давления перфузии воротной вены (40–60 см водяного столба), исключающего повреждение и активацию эндотелиоцитов синусоидов; перфузии печеночной артерии под давлением 40–50 см рт. ст.; в наличии такролимуса и в растворе (альбумин) для отмывки консерванта; оставлении печени в емкости, содержащей эффлюэнт растворов НТК и альбумина с такролимусом до момента трансплантации.

Результатом портально-артериальной перфузии печеночного трансплантата раствором НТК с такролимусом в нашем исследовании явилось не только уменьшение частоты всех РДТ, но особенно умеренно-тяжелых случаев РДТ по критериям P.R. Salvalaggio (2,3% против 23,2%), что не было показано ранее.

Степень некроза гепатоцитов в постреперфузионном биоптате печени является известным признаком консервационного и реперфузионного повреждения и предиктором ранней послеоперационной функции трансплантата печени [26]. Морфологическим подтверждением эффекта данного метода явилось уменьшение частоты тяжелого ИРП в постреперфузионных биоптатах печени, что не было отмечено раньше в исследованиях эффективности предреперфузионного флешинга с такролимусом.

Повреждение печени вследствие ИРП является типичным примером воздействия DAMP (damage-associated molecular patterns – DAMPs). DAMP являются продуктами разрушения собственных тканей, обладающими антигенспецифическими свойствами, и играют основную роль в индукции иммунного и воспалительного ответа в ранней стадии органной недостаточности, до наступления инфицирования. Современная модель DAMP опосредованного повреждения печени представлена ниже: некротизированные гепатоциты выделяют несколько видов DAMP, такие как ядерные негистоновые белки (HMGB1), белки теплового шока, митохондриальные ДНК и циклофиллин А. Внеклеточный HMGB1 связывается с несколькими рецепторами, такими как TLR2, TLR4, TLR9. В ответ на стимуляцию TLR активируются макрофаги и эндотелиальные клетки. Активированные рецепторами TLR-4 макрофаги секретируют IL-23. IL-23 стимулирует $\gamma\delta$ -Т клетки

на продукцию IL-17. IL-17 рекрутирует нейтрофилы в печень [27]. Также известно, что возникновение ранней дисфункции печеночного трансплантата ассоциировано с определенным профилем воспалительных цитокинов в периферической крови как доноров так и реципиентов [28]. В этой связи результаты данной работы примечательны не только изменением уровней IL-2, 6 через 24 ч после реперфузии в периферической крови пациентов основной группы, но и IL-17 и IL-23 в крови, оттекающей от печени, через один час после портальной реперфузии, что объясняет возможный механизм действия портально-артериальной перфузии с такролимусом.

Критикой данного исследования может выступить отсутствие влияния метода на госпитальную летальность. Несмотря на это, изучаемая группа пациентов является частью когорты (307 пациентов на момент написания статьи), в которой пациенты с РДТ имели риск летального исхода, в 2,5 раза превышающий таковой у пациентов без РДТ ($p = 0,012$; 95%ДИ 1,2–5,2). С другой стороны, общая госпитальная летальность в когорте 307 пациентов составляет 6,1%, что с точки зрения статистики не позволяет оценить влияние метода на летальность в группе 43 пациентов. При этом важным является и экономический эффект предотвращения РДТ, поскольку известно, что стоимость лечения пациента с РДТ в несколько раз превышает таковую у пациентов без РДТ.

Таким образом, применение инфузии раствора НТК и альбумина с такролимусом в воротную вену и печеночную артерию во время подготовки донорской печени к имплантации является эффективным способом, уменьшающим ишемически-реперфузионное повреждение, частоту и выраженность ранней дисфункции трансплантатов со средним сроком консервации и стандартным уровнем стеатоза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013; 59: 1094–1106.
2. Salvalaggio PR, Felga GE, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Early Allograft Dysfunction and Liver Transplant Outcomes: A Single Center Retrospective Study. *Transplantation Proceedings.* 2012; 44: 2449–2451.
3. Pokorny H, Langer F, Herkner H, Schernberger R, Plöchl W, Soliman T et al. Influence of cumulative number of marginal donor criteria on primary organ dysfunction in liver recipients. *Clinical Transplant.* 2005; 19 (4): 532–536.
4. Marc Deschenes. Early allograft dysfunction: Causes, recognition, and management. Special Issue. *Liver Transplantation.* November 2013; 19; S2: S6–S8.
5. The Utility of Marginal Donors in Liver Transplantation Ronald W. Busuttil and Koichi Tanaka. *Liver Transplantation.* 2003; 9; 7 (July): 651–663.

6. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg.* 2008; 248: 1042–1050.
7. Minou AF, Shcherba AE, Dzyadko AM, Rummo OO, Fedoruk AM, Slobodin YV. Preconditioning with Sevoflurane Decreases the Incidence of Early Allograft Dysfunction in Liver Transplant Recipients of Steatotic Grafts. *Liver Transplantation.* May, 2012; 18; 1: S83.
8. Lang JD Jr, Teng X, Chumley P, Crawford JH, Isbell TS, Chacko BK. Inhaled NO accelerates restoration of liver function in adults following orthotopic liver transplantation. *J Clin Invest.* 2007; 117: 2583–2591.
9. Busuttil RW, Lipshutz GS, Kupiec-Weglinski JW, Ponthieux S, Gjertson DW, Cheadle C. rPSGL-Ig for Improvement of Early Liver Allograft Function: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Center Phase II Study. *American Journal of Transplantation.* 2011; 11: 786–797.
10. Takeichi T, Uemoto S, Minamiguchi S, Takeyoshi I, Inomata Y, Tanaka K. Effect of ONO-4057 and tacrolimus on ischemia-reperfusion injury of the liver. *World J Gastroenterol.* 2009; 15 (45): 5712–5715.
11. Huser N, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A. Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Arch Pharm Res.* 2009; 32 (2): 215–220.
12. Pratschke S, Bilzer M, Grutzner U, Angele M, Tufman A, Jauch KW. Tacrolimus preconditioning of rat liver allografts impacts glutathione homeostasis and early reperfusion injury. *J Surg Res.* 2012; 176 (1): 309–316.
13. Kristo I, Wilflingseder J, Kainz A, Marschalek J, Weckerle T, Mühlbacher F. Effect of intraportal infusion of tacrolimus on ischaemic reperfusion injury in orthotopic liver transplantation: a randomized controlled trial. *Transpl Int.* 2011 Sep; 24 (9): 912–919.
14. Jochen D. Muehlschlegel/Closing the pore on reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2014; 121.
15. Peter SD, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, Douglas DD, Moss AA, Mulligan DC. Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003 Feb; 9 (2): 144–149.
16. Designing Clinical Research / Stephen B Hulley, Steven R Cummings, Warren S Browner, Deborah G Grady, Thomas B Newman. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 367p.] [Aviva Petrie & Caroline Sabin. Medical statistics at a glance / Aviva Petrie. 3d ed. Wiley-Blackwell. 2012: 180.
17. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transpl.* 2010 Aug; 16 (8): 943–949.
18. Khandoga A, Hanschen M, Kessler JS, Krombach F. CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology.* 2006; 43 (2): 306–315.
19. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 2008; 86 (5): 710–718.
20. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Deodato B, Arlotta M. Tacrolimus limits polymorphonuclear leucocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32 (3): 429–440.
21. Soda Y, el-Assal ON, Yu L, Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery.* 1999; 125 (1): 23–32.
22. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation.* 1997; 64 (4): 594–598.
23. Howell JI, Sawhney R, Testro A, Skinner N, Gow P, Angus P. Cyclosporine and tacrolimus have inhibitory effects on toll-like receptor signaling after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2013 Oct; 19 (10): 1099–1107.
24. Garcea G, Maddern GJ. Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009; 16: 145–155.
25. <https://www.astellas.us/docs/prograf.pdf>
26. Koçbiyik A, Demirhan B, Sevmis S, Budakoglu I, Karakayali H, Haberal M. Role of postreperfusion subcapsular wedge biopsies in predicting initially poor graft function after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2009 Sep; 41 (7): 2747–2748.
27. Xuefu Wang, Rui Sun, Haiming Wei, and Zhigang Tian. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1)-Toll-Like Receptor (TLR)4-Interleukin (IL)-23-IL-17A Axis in Drug-Induced Damage-Associated Lethal Hepatitis: Interaction of $\gamma\delta$ -T Cells with Macrophages. *HEPATOLOGY.* 2013; 57: 373–384.
28. Friedman BH, Wolf JH, Wang L et al. Serum cytokine profiles associated with early allograft dysfunction in patients undergoing liver transplantation. 2012; 18: 166–176.

Статья поступила в редакцию 30.03.2015 г.
The article was submitted to the journal on 30.03.2015