

Применение комбинированного способа консервации печеночного трансплантата в эксперименте

**А. С. Сохарев, К. А. Краснов, А. В. Будаев,
О. А. Краснов, Е. Ю. Плотникова**

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово, Россия
Городская клиническая больница № 3
им. М. А. Подгорбунского, Кемерово, Россия

Ключевые слова: трансплантация печени, ишемически-реперфузионное повреждение, гипотермия, антиоксидантная терапия, перфторан

Введение

Трансплантация печени в настоящее время является «золотым стандартом» при лечении терминальных стадий заболеваний печени независимо от этиологии. Количество удачных трансплантаций печени связано не с количеством потенциальных доноров, а с качеством трансплатата, его функциональностью. Существуют причины, по которым даже безупречно проведенная пересадка печени приводит к гибели пациента ввиду первичного нефункционирования трансплантата. Основной причиной является ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) [1, 5, 10, 11].

Важную роль в возникновении ИРП играет оксидативный стресс, обусловленный дисбалансом производства и инактивацией активных форм кислорода (АФК), в значительной степени из-за окислительной деструкции липидов, белков и нуклеиновых кислот в пораженной ткани [1, 13]. Поэтому для профилактики ИРП трансплантата перспективной методикой является медикаментозная терапия, интервенция которой должна быть направлена на механизм образования свободных радикалов. Свободные радикалы обладают чрезвычайно коротким периодом полураспада. Сроки вмешательства имеют решающее значение. Некоторые медикаментозные препараты могут оказывать проокислительные эффекты при определенных обстоятельствах [7, 8, 9].

Различия между дозой медикаментозного препарата, временем и способом введения могут привести к непредвиденным результатам. Оценка медикаментозного воздействия препаратов требует лабораторных испытаний, в которых эффекты лечения могут быть тщательно изучены, а только затем рекомендованы для клинического применения [10, 12, 14]. Учитывая то обстоятельство, что

проблема противоишемической защиты трансплантата печени далека от совершенства, представляется достаточно актуальным разработка современных методов воздействия, позволяющих эффективно бороться с этими расстройствами [7, 5, 15].

Цель исследования — оценить применение комбинированного способа консервации для профилактики ИРП при трансплантации печени у лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследования проведены на 60 кроликах самцах породы Шиншилла в возрасте 6–7 мес., массой (2000±150) г (в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06.2003, «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», принципами Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996)). Кролики разделены на три группы по 20 животных. В первой группе консервация печени проводилась раствором НТК. Во второй группе применялся комбинированный способ: раствор НТК и неоксигенированная перфторорганическая эмульсия. Соотношение НТК и эмульсии — 4:1. В третьей группе консервация печени проводилась в неоксигенированной перфторорганической эмульсии. Консервация печени проводилась бесперфузионным методом в течение 8 ч, при температуре 4–5°C. С целью изучения биохимических показателей, системы гемостаза и общего анализа крови при эксплантации и после реперфузии бралась кровь. Обработка данных проводилась в программе Statistica 6.0, для описательных статистик были рассчитаны средние значения, стандартное отклонение, ошибка среднего. Для выявления различий в средних значениях признаков использовался критерий Манна — Уитни, сравнение процентов осуществлялось с помощью углового преобразования Фишера, для выявления взаимосвязей строились таблицы сопряженности и применялся критерий Пирсона. Различия считались значимыми при уровне значимости $p=0,05$ [3].

Результаты исследований

Для описательной статистики данных до консервации трансплантатов печени и после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов были рассчитаны в группах средние значения, стандартное

отклонение, стандартная ошибка. С помощью критерия Манна – Уитни сравнивались средние значения показателей в группах трансплантатов печени кроликов до

консервации. Результаты сравнения средних значений показателей в группах трансплантатов печени кроликов до консервации представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1

Результаты сравнения средних значений показателей в первой и второй группах трансплантатов печени кроликов до консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	1-я	2-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	3,31	3,21	0,989209
АсАТ, Ед/л	52,09	51,84	0,797197
АлАТ, Ед/л	59,60	58,48	0,675014
Протромбиновый индекс, %	88,25	91,25	0,417078
АЧТВ, с	36,25	35,60	0,279252
Фибриноген, г/л	2,95	3,00	0,786775

Примечания: АсАТ — аспаратаминотрансфераза; АлАТ — аланинаминотрансфераза; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время.

Таблица 2

Результаты сравнения средних значений показателей в первой и третьей группах трансплантатов печени кроликов до консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	1-я	3-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	3,31	2,73	0,239323
АсАТ, Ед/л	52,08	55,48	0,481827
АлАТ, Ед/л	59,60	58,62	0,635866
Протромбиновый индекс, %	88,25	87,90	0,978362
АЧТВ, с	36,25	36,40	0,913317
Фибриноген, г/л	2,95	2,99	0,755086

Таблица 3

Результаты сравнения средних значений показателей во второй и третьей группах трансплантатов печени кроликов до консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	2-я	3-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	3,21	2,73	0,159544
АсАТ, Ед/л	51,84	55,48	0,180577
АлАТ, Ед/л	58,47	58,62	0,818150
Протромбиновый индекс, %	91,25	87,90	0,473481
АЧТВ, с	35,60	36,40	0,350703
Фибриноген, г/л	3,00	2,99	0,755743

Для описательной статистики данных после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов были рассчитаны в группах средние значения, стандартное отклонение, стандартная ошибка. С помощью критерия Манна – Уитни сравнива-

лись средние значения показателей в группах трансплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации. Результаты сравнения средних значений показателей между группами представлены в таблицах 4–6.

Таблица 4

Результаты сравнения средних значений показателей в первой и второй группах трансплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	1-я	2-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	5,81	5,44	0,002086
АсАТ, Ед/л	606,73	322,82	0,000000
АлАТ, Ед/л	614,17	277,60	0,000000
Протромбиновый индекс, %	62,80	74,70	0,000000
АЧТВ, с	53,60	45,35	0,000000

Таблица 5

Результаты сравнения средних значений показателей в первой и третьей группах трансплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	1-я	3-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	5,81	6,31	0,002100
АсАТ, Ед/л	606,73	1040,15	0,000000
АлАТ, Ед/л	614,17	978,10	0,000000
Протромбиновый индекс, %	62,80	39,60	0,000000
АЧТВ, с	53,60	56,55	0,045296
Фибриноген, г/л	1,66	1,39	0,000245

Таблица 6

Результаты сравнения средних значений показателей во второй и третьей группах трансплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе		Уровень значимости различий (p)
	2-я	3-я	
Билирубин общий, мкмоль/л	5,44	6,31	0,000000
АсАТ, Ед/л	322,82	1040,15	0,000000
АлАТ, Ед/л	277,60	978,10	0,000000
Протромбиновый индекс, %	74,70	39,60	0,000000
АЧТВ, с	45,35	56,55	0,000000
Фибриноген, г/л	2,32	1,39	0,000000

С помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями сравнивались средние значения показателей в разных группах и разных замерах. Основные результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения общего билирубина представлены на рис. 1.

Дисперсионный анализ показал, что произошли статистически значимые изменения в среднем значе-

нии показателей в различных группах до и после консервации трансплантатов печени кроликов ($p=0,00001$). Причем если до консервации трансплантата в третьей группе наблюдался самый низкий уровень билирубина, то после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов наиболее низкий уровень наблюдается во второй группе, в то время как самой высокой уровень билирубина – у

трансплантатов печени кроликов третьей группы. Основные результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения АсАТ до и после 8-часовой консервации представлены на рис. 2.

Дисперсионный анализ показал, что на исследуемый показатель влияет взаимосвязь факторов ($p=0,00001$): имеются статистически значимые различия в средних значениях показателя до и после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов в зависимости от группы. Так, если до кон-

сервации средние значения АсАТ в трех группах различались незначимо, то после консервации отмечаются статистически значимые различия: наиболее низкий уровень АсАТ наблюдается во второй группе, в то время как в первой и третьей группах уровень АсАТ был статистически значимо выше. Основные результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения АлАТ в группах до и после 8-часовой консервации представлены на рис. 3.

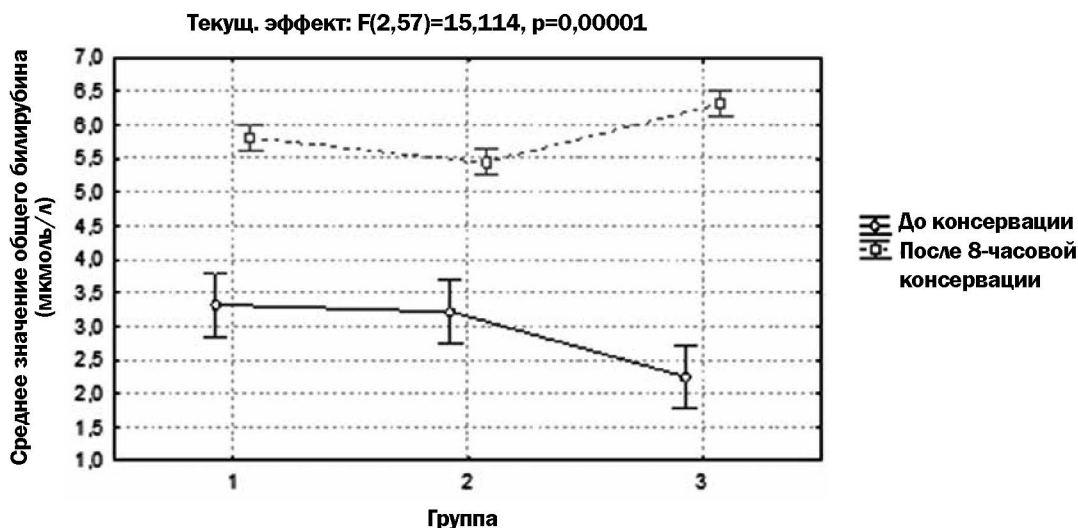


Рис. 1. График средних значений общего билирубина (мкмоль/л) в трех группах до и после консервации.

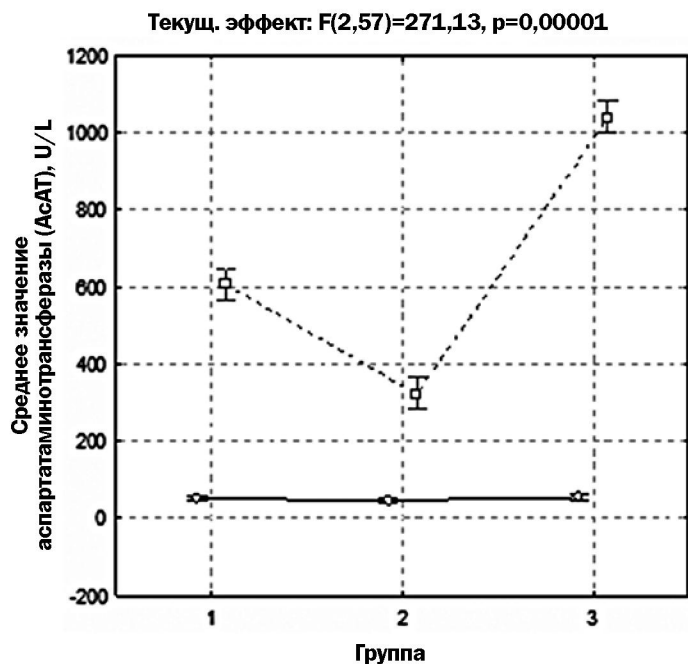


Рис. 2. График средних значений АсАТ, Ед/л в трех группах до и после 8-часовой консервации.

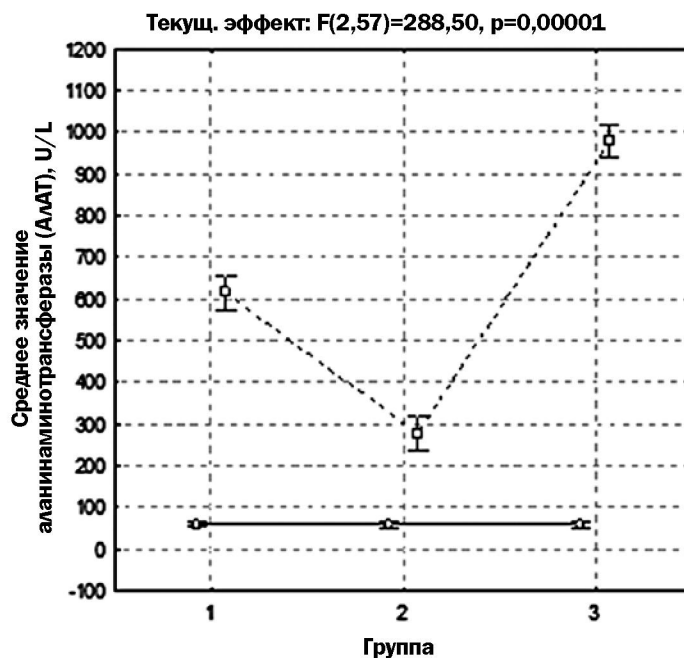


Рис. 3. График средних значений АлАТ в трех группах до и после 8-часовой консервации.

Дисперсионный анализ показал, что выявлены статистически значимые изменения в средних значениях показателя, произошедшие до и после 8-часовой консервации в разных группах ($p=0,00001$). Причем если до консервации трансплантатов печени кроликов средние значения АлАТ в трех группах различались незначительно, то после 8-часовой консервации трансплантатов наиболее низкий уровень наблюдается во второй группе, а самый высокий — в третьей группе.

Обсуждение результатов

Исследования, проведенные на лабораторных животных, показали, что по всем показателям статистически значимых различий в средних значениях показателей в сравниваемых группах до консервации не выявлено. После консервации трансплантатов печени кроликов отмечаются статистически значимые различия в группах в зависимости от консервирующего раствора.

При сравнении с помощью критерия Манна — Уитни в группе с комбинированным консервантом после 8-часовой консервации трансплантатов печени кролика по сравнению с первой и третьей группами статистически значимо ниже уровень общего билирубина ($p_{1-2}=0,002086$, $p_{2-3}=0,000000$), а наиболее высокий уровень билирубина отмечается в третьей группе. Аналогичная ситуация с уровнем свободного и связанного билирубина.

При сравнении с помощью критерия Манна — Уитни во второй группе (комбинированный консервант) после 8-часовой консервации трансплантатов печени кролика по сравнению с первой и третьей группами статистически значимо ниже уровень АСАТ и АлАТ — синдром цитолиза: (АСАТ $p_{1-2}=0,000000$, $p_{2-3}=0,000000$; АлАТ $p_{1-2}=0,000000$, $p_{2-3}=0,000000$), а наиболее высокий уровень АСАТ и АлАТ отмечается в третьей группе.

При сравнении с помощью критерия Манна — Уитни во второй группе после 8-часовой консервации трансплантатов печени кролика по сравнению с первой и третьей группами статистически значимо выше уровень гемостаза (фибриноген, протромбиновый индекс, АЧТВ), то есть показатели наиболее приближены к норме: (фибриноген $p_{1-2}=0,000006$, $p_{2-3}=0,000000$; протромбиновый индекс $p_{1-2}=0,000000$, $p_{2-3}=0,000000$, АЧТВ $p_{1-2}=0,000000$, $p_{2-3}=0,000000$), а проявления наиболее тяжелой гипокоагуляции отмечаются в третьей группе.

По результатам исследования применение перфторорганической эмульсии как самостоятельного консерванта невозможно по следующим причинам: не предотвращает отек клетки (осмолярность — 280–310 мОсм/л; рН — 7,2–7,8); не влияет на калий-натриевый насос ввиду концентрации ионов натрия и калия, приближенных к плазме крови; невозможность поддержания гомеостаза и рН клетки ввиду отсутствия в составе буферной системы. Перфторорганическая эмульсия не влияет на внутриклеточный метаболизм и тем самым не поддерживает внутриклеточный гомеостаз во время холодовой ишемии. Применение перфторорганической эмульсии заклю-

чается в акцепции АФК и отсутствии влияния на клеточный метаболизм в условиях ишемии [4].

Применение раствора НТК позволяет в условиях гипотермии инактивировать функции клеток органа путем удаления внеклеточного натрия и кальция, а также интенсивной буферизации внеклеточного пространства с помощью гистидина, чтобы продлить период холодовой ишемии. Состав раствора НТК аналогичен внеклеточной жидкости с высокой буферной системой и пониженной по сравнению с плазмой крови концентрацией ионов натрия и калия, что позволяет предотвратить клеточный отек и задержать клеточную деструкцию, служит буфером для поддержания надлежущего гомеостаза. В то же время консервация органа в растворе НТК лимитирована во времени ввиду образования АФК и повреждения клеточной стенки [12, 14, 15].

Основным преимуществом неоксигенированной перфторуглеродной эмульсии является ее интактность к тканям и органам, то есть препарат не метаболизируется в клетках (гепатоцитах) в отличие от других антигипоксантов. Уникальная тропность перфторорганической эмульсии к кислороду и послужила основанием для применения комбинированного консерванта с целью акцепции и нейтрализации АФК, а следовательно, снижения свободнорадикального окисления и ИРП в органах и тканях [2, 4].

Применение комбинированного консерванта позволяет профилактировать ИРП в печеночном трансплантате путем поглощения АФК молекулами перфторорганической эмульсии и тем самым предотвращать повреждение органов и тканей. В нашем исследовании мы показали, что комбинированный консервант статистически значимо уменьшает ИРП печеночного трансплантата, со значительным снижением уровня АлАТ и АСАТ по сравнению с другими группами. Таким образом, в группе с комбинированным консервантом отмечается статистически значимое снижение ИРП после 8-часовой консервации печеночного трансплантата кролика.

Выводы

Современное представление об ИРП печеночного трансплантата остается краеугольным камнем в клинической практике. Тем не менее, терапевтические подходы, такие как фармакологическая интервенция, смогут способствовать предотвращению или ограничению ИРП. Применение комбинированного консерванта — новой терапевтической концепции для профилактики ИРП печеночного трансплантата — позволяет получить трансплантат лучшего качества за счет инактивации АФК и уменьшения перекисного окисления липидов.

Литература:

1. Готье С. В. Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2014 году (VII регистра Российского трансплантологического общества) / С. В. Готье, Я. Г. Мойсюк, С. М. Хомяков // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2015. — Т. 17, № 2. — С. 7–22.

2. Перфторан — перфторуглеродный кровезаменитель с газотранспортной функцией: пособие для врачей / В. П. Сухоруков, А. А. Рагимов, С. Ю. Пушкин [и др.]. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва, 2008. — 79 с.
3. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 384 с.
4. Фармакоэкономическая оценка применения лекарственного средства перфторан в клинической практике / С. Ф. Багненко, И. В. Шлык, Б. В. Батоцыренов [и др.] // Вестник службы крови России. — 2005. — № 2. — С. 46–51.
5. Цой Д. Л. Профилактика и лечение ишемически-реперфузионных повреждений при трансплантации печени — возможный путь к расширению донорского пула / Д. Л. Цой, Я. Г. Мойсюк // Вестник трансплантологии и искусственных органов. — 2013. — Т. 15, № 3. — С. 102–114.
6. Adam A. N. I. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury / A. N. I. Adam. — International journal of general medicine. — 2014. — Vol. 7. — P. 483–489.
7. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation / S. Weiss, K. Kotsch, M. Francuski [et al.] // Am. J. Transplant. — 2007. — Vol. 7. — P. 1584–1593.
8. Caldwell C. C. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury / C. C. Caldwell, J. Tschoep, A. B. Lentsch // J. Leukoc. Biol. — 2007. — Vol. 82. — P. 457–464.
9. Inflammatory responses in a new mouse model of prolonged hepatic cold ischemia followed by arterialized orthotopic liver transplantation / X. D. Shen, F. Gao, B. Ke [et al.] // Liver Transpl. — 2005. — Vol. 11. — P. 1273–1281.
10. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation — from bench to bedside / Y. Zhai, H. Petrowsky, R. W. Busuttil [et al.] // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. — 2013. — Vol. 2. — P. 79–89.
11. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks — a review / M. Abu-Amara, S. Y. Yang, N. Tapuria [et al.] // Liver Transpl. — 2010. — Vol. 16. — P. 1016–1032.
12. Liver protection strategies in liver transplantation / J. J. Jia, J. H. Li, L. Jiang [et al.] // Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int. — 2015. — Vol. 14, No 1. — P. 34–42.
13. Quesnelle K. M. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver / K. M. Quesnelle, P. V. Bystrom, L. H. Toledo Pereyra // Arch. Toxicol. — 2015. — Vol. 2. — P. 103–109.
14. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models / R. F. Golen, M. J. Reiniers, M. Heger [et al.] // Journal of Hepatology. — 2015. — Vol. 14. — P. 88–90.
15. Zhai Y. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation / Y. Zhai, R. W. Busuttil, J. W. Kupiec-Weglinski // Am. J. Transplant. — 2011. — Vol. 11. — P. 1563–1569.

УДК 2.616.36–089.843

RU Применение комбинированного способа консервации печеночного трансплантата в эксперименте

А. С. Сохарев, К. А. Краснов, А. В. Будаев, О. А. Краснов, Е. Ю. Плотникова

Кемеровская государственная медицинская академия, Кемерово, Россия
Городская клиническая больница № 3 им. М. А. Подгорбунского, Кемерово, Россия

Ключевые слова: трансплантация печени, ишемически-реперфузионное повреждение, гипотермия, антиоксидантная терапия, перфторан

Статья посвящена одной из проблем трансплантации печени и способам ее решения. Частота осложнений после трансплантации печени напрямую зависит от ишемически-реперфузионного повреждения трансплантата. В связи с глобальным дефицитом донорских органов применяются различные технологии для сохранения и функционирования трансплантата. В данной статье рассмотрены основные звенья патогенеза и предложена новая методика для профилактики ишемически-реперфузионного повреждения печени.

УДК 2.616.36–089.843

UA Застосування комбінованого способу консервації печінкового трансплантата в експерименті

А. С. Сохарев, К. А. Краснов, О. В. Будаєв, О. А. Краснов, К. Ю. Плотнікова

Кемерівська державна медична академія, Кемерово, Росія
Міська клінічна лікарня № 3 ім. М. О. Подгорбунського, Кемерово, Росія

Ключові слова: трансплантація печінки, ішемічно-реперфузійне ушкодження, гіпотермія, антиоксидантна терапія, перфторан

Стаття присвячена одній з проблем трансплантації печінки і способам її вирішення. Частота ускладнень після трансплантації печінки безпосередньо залежить від ішемічно-реперфузійного ушкодження трансплантата. У зв'язку з глобальним дефіцитом донорських органів застосовуються різні технології для збереження і функціонування трансплантата. У даній статті розглянуто основні ланки патогенезу і запропонована нова методика для профілактики ішемічно-реперфузійного ушкодження печінки.

EN The use of the combined method of preservation of liver transplant in the experiment

A. S. Sokharev, K. A. Krasnov, A. V. Budaev, O. A. Krasnov, E. Y. Plotnikova

Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russia
City clinical hospital No 3 n. a. M. A. Podgorbunsky, Kemerovo, Russia

Key words: liver transplantation, ischemia-reperfusion injury, hypothermia, antioxidant therapy, perftoran

This article is dedicated to one of the problems of liver transplantation and how to solve it. The incidence of complications after liver transplantation depends on ischemia-reperfusion injury of the graft. The global shortage of donor organs causes usage of different techniques of graft conservation and functioning. This article describes the basic links of pathogenesis and offers a new technique for the prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver.