

Д. А. Федорук, Л. В. Кирковский, Д. Н. Садовский, К. И. Петренко,
О. А. Лебедь, А. М. Федорук, О. О. Руммо

ВЛИЯНИЕ ГИПОТЕРМИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНИРОВАННОЙ МАШИННОЙ ПЕРФУЗИИ НА СТЕПЕНЬ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТОВ ПЕЧЕНИ

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

Прогрессивно увеличивающееся несоответствие количества эффективных доноров количеству пациентов, нуждающихся в трансплантации, ведет к необходимости использования аллогraftов от доноров с расширенными критериями. Данный факт приводит к увеличению частоты дисфункций трансплантатов, уровня билиарных осложнений, снижению выживаемости трансплантатов.

Цель исследования. Оценить влияние различных методов консервации на степень ишемического повреждения трансплантатов печени.

Материалы и методы. В ходе случай-контроль исследования проводилась оценка влияния гипотермической машинной перфузии с дополнительной оксигенацией перфузирующего раствора и статической холодовой консервации на степень повреждения клеток печени. Трансплантаты печени, признанные маргинальными в ходе операции мультиорганного забора, эксплантировались по классической методике и подвергались статической холодовой консервации (СХК) на период транспортировки. Во время операции «back-table» выполнялось полное разделение паренхимы печени по линии Кантле. После рандомизации методом случайных чисел одна доля подвергалась СХК при температуре 4 °С (группа контроля, n = 10), а вторая – гипотермической оксигенированной машинной перфузии через воротную вену 2 литрами раствора Belzer UW MPS при температуре от +4 до +10 °С, перфузионном давлении 3 мм рт.ст., потоке 100% O₂ – 1 л/мин, pO₂ = 34,7±1,1кПа в течение 4 часов (группа исследования, n = 10). Забор образцов эффлюента и участков паренхимы для биохимической и морфологической оценки выполнялся в начале исследования, через 2 и 4 часа от начала эксперимента в обеих группах.

Результаты. Применение гипотермической оксигенированной машинной перфузии в течение 4 часов в конце этапа статической холодовой консервации приводит к достоверному снижению уровня выработки свободных радикалов и позволяет снизить уровень цитолитических ферментов АСТ, АЛТ, ЛДГ в сравнении со статической холодовой консервацией.

Заключение. Было установлено, что применение гипотермической машинной перфузии позволяет уменьшить степень повреждения трансплантатов печени в условиях ишемии.

Ключевые слова: трансплантация печени, машинная перфузия, статическая холодовая консервация, митохондрии, активные формы кислорода.

D. A. Fedaruk, L. V. Kirkovsky, D. N. Sadousky, K. I. Petrenko,
O. A. Lebedz, A. M. Fedaruk, O. O. Rummo

INFLUENCE OF HYPOTHERMIC OXYGENATED MACHINE PERFUSION ON THE DEGREE OF ISCHEMIC DAMAGE OF ECD LIVER GRAFTS

Progressively increasing discrepancy between the number of effective donors and the number of patients requiring transplantation leads to use of allografts from extended criteria donors. This fact leads to an increase of early allograft dysfunction, the level of biliary complications, and a decrease of graft survival.

Objective. To assess the effect of various preservation methods on the degree of ischemic damage to liver grafts.

Materials and methods. During the case-control study, the effect of hypothermic oxygenated machine perfusion and static cold storage on the degree of liver cells damage was assessed. Liver transplants that were recognized as extended criteria during the multi-organ retrieval procedure were explanted according to the classical method and were preserved with static cold storage (SCS) for the period of transportation. During the “back-table” procedure, a complete separation of the liver parenchyma along the Cantle line was performed. After randomization by random number method, one part was preserved with static cold storage at a temperature of 4°C (control group, n = 10), and the second was preserved by hypothermic oxygenated machine perfusion through the portal vein with 2 liters of Belzer

UW MPS solution at a temperature from +4 to +10 °C, perfusion pressure 3 mmHg, 100% O₂ flow – 1 l / min, pO₂ = 34.7 ± 1.1 kPa for 4 hours (study group, n = 10). The sampling of effluent and parenchyma biopsies for biochemical and morphological evaluation were performed at the beginning of the study, after 2 and 4 hours after the start of the experiment in both groups.

Results. The use of hypothermic oxygenated machine perfusion for 4 hours at the end of static cold storage reduces the level reactive oxygen species and as well as the level of AST, ALT, LDH in comparison with static cold storage alone.

Conclusion. It was found that the use of hypothermic machine perfusion can reduce the degree of ischemic liver grafts damage.

Key words: liver transplantation, machine perfusion, static cold storage, mitochondria, reactive oxygen species.

На сегодняшний день ортотопическая трансплантация печени является единственным радикальным методом лечения терминальной стадии заболеваний печени. Количество пациентов, нуждающихся в трансплантации, неуклонно растет, а по данным мировой статистики около 60000 человек умирает от заболеваний печени, которые теоретически могли бы быть излечены трансплантацией [1]. Данные факты заставляют трансплантационную общественность расширять границы существующих критериев и использовать субоптимальные или скомпрометированные трансплантаты. Однако использование органов от доноров с расширенными критериями снижает 1-летнюю выживаемость трансплантата приблизительно на 10%, увеличивает частоту ранних дисфункций трансплантатов [2], а также частоту билиарных осложнений, которые и так являются «ахиллесовой пятой» трансплантации печени. Частота билиарных стриктур составляет от 4% до 15% при трансплантации печени от донора со смертью мозга, но может увеличиваться до 30–50% после трансплантации от донора с расширенными критериями или донора с небьющимся сердцем [3]. Развитие подобных послеоперационных осложнений, как известно, значительно влияет на долгосрочный результат лечения, на частоту ретрансплантаций, качество жизни и стоимость оказанной медицинской помощи.

Статическая холодовая консервация (СХК) является самым распространенным методом сохранения жизнеспособности органов для трансплантации. Несмотря на широкое распространение, СХК имеет ряд недостатков в виде дефицита функционирования микроциркуляторного русла, ограниченной доставки трофических факторов, накопления продуктов метаболизма [4].

В последние десятилетия большое внимание уделяется развитию новых динамических методов кондиционирования органов, позволяющих оптимизировать орган перед имплантацией и таким образом улучшить долгосрочные результаты лечения [5]. В основе динамического перфузионного кондиционирования лежит возможность создания непрерывного потока консервирующего раствора, что способствует улучшению доставки питательных веществ и кислорода, удалению токсичных метаболитов и стабилизации

параметров интерстициальной жидкости. На сегодняшний день в мире существует большое количество различных методов перфузионного кондиционирования печени. Они отличаются между собой по времени начала перфузии, длительности перфузии, температуре перфузионного раствора и наличию оксигенации [3]. Кондиционирование без активного кислорода и питательных веществ ограничено энергетическими резервами печеночных трансплантатов, которые истощаются приблизительно через 24 часа хранения, поскольку в таких условиях анаэробный гликолиз является основным метаболическим путем [6]. Данные условия приводят к формированию внутриклеточного ацидоза, а также истощению нуклеотидов и накоплению пуриновых метаболитов, в частности гипоксантина, который является одним из основных субстратов для формирования активных форм кислорода (АФК) [7, 8]. Среди множества вариантов сохранения донорских органов гипотермическая машинная перфузия в конце периода холодовой консервации является одним из наиболее распространенных методов динамического кондиционирования, так как позволяет снизить активность метаболических процессов за счет гипотермии и, следовательно, вероятность ишемического повреждения клеток. Данный метод дает преимущество в логистике и использовании дополнительного оборудования и расходных материалов для успешной перфузии, а также позволяет компенсировать состояние орган непосредственно перед имплантацией (рисунок 1).

Цель исследования

Провести сравнительную оценку влияния статической холодовой консервации и гипотермической оксигенированной машинной перфузии на степень экспрессии маркеров ишемического повреждения трансплантатов печени.

Материалы и методы

Дизайн носил характер случай-контроль исследования. Критерием включения органов в исследование было наличие стеатоза более 30% от массы органа при макроскопической оценке в ходе операции мультиорганного забора. Эксплантация органов,

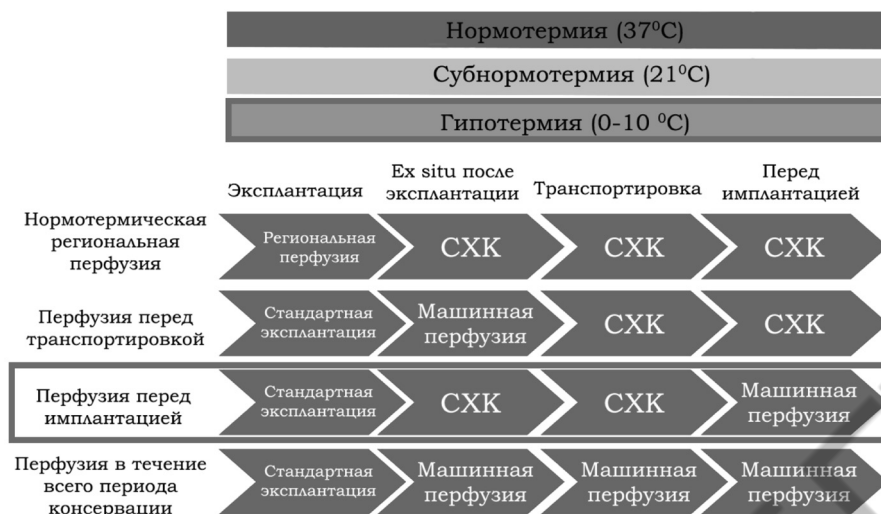


Рис. 1. Варианты динамического кондиционирования трансплантатов печени

признанных непригодными к трансплантации и включенных в исследование, выполнялись по классической методике артериального флешинга с использованием 10 литров раствора Кустодиол (Dr. F. Koehler Chemie GmbH, Германия). На период транспортировки органы подвергались статической холодной консервации (СХК).

После доставки донорского органа в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» в операционной в стерильных условиях выполнялась операция подготовки и разделение печени на две равные части по линии Кантле. По завершении этапа подготовки и разделения правой доле печени присваивался номер 1 (один), а левой доле – номер 2 (два). После рандомизации по принципу случайных чисел с использованием генератора <https://randstuff.ru/number> определяли долю, которая в дальнейшем кондиционировалась с помощью гипотермической машинной перфузии с дополнительной оксигенацией перфузирующего раствора (ГМПО) – группа исследования (n = 10). Другая часть печени кондиционировалась методом статической холодной консервации (СХК) – группа контроля (n = 10).

Проведение статической холодной консервации печени

По завершении операции разделения и этапа рандомизации, для консервации печени методом СХК часть органа, состоящая из 4-х сегментов, в условиях операционной отмывали консервирующим раствором и помещали в полиэтиленовый пакет с 500 мл раствора. Пакет с частью печени на 240 минут выкладывали на лед, находящийся в металлической емкости объемом 5 л. Температуру поддерживали на уровне от +4 до +6 °C. В начале консервации, через 120 и 240 минут от начала эксперимента проводи-

ли измерение массы доли печени с использованием электронных весов и температуры ядра органа с использованием электронного термометра (Checktemp® Hanna, США), а также осуществляли забор проб при промывании консервирующим раствором Belzer MPS (UW Machine Perfusion Solution, Bridge to life, США) и выполняли трепан-биопсии иглой G-14 (Bard, Германия), с получением столбика ткани для анализа 20×2,1 мм.

Проведение гипотермической машинной перфузии печени с дополнительной оксигенацией перфузирующего раствора

Гипотермическая машинная перфузия печени с дополнительной оксигенацией выполнялась на разработанном и сконструированном нами испытательном стенде [9].

По завершении этапа рандомизации, в условиях операционной стерильный внутренний контур испытательного стенда заполняли охлажденными до +4 °C 2000 мл раствора Belzer MPS (UW Machine Perfusion Solution, Bridge to life, США). Для реализации ГМПО подключение доли печени к испытательному стенду выполняли путем канюляции ветви воротной вены. Скорость потока перфузии регулировалась таким образом, чтобы поддерживать целевое давление в воротной вене равное 3 мм.рт.ст. Температуру поддерживали на уровне от +4 до +10 °C.

Активную оксигенацию перфузирующего раствора осуществляли потоком 100% кислорода из портативного баллона. Уровень подачи кислорода устанавливался на отметке 1 л/мин. Целевое парциальное давление кислорода в перфузионном растворе было на уровне более 30кПа (225 мм.рт.ст).

Параметры перфузионного кондиционирования контролировали интегрированные датчики-анализаторы. Информация с датчиков отображалась в режи-

ме реального времени на измерителе давления, оксигенации и температуры.

ГМПО проводили в течение 240 минут. Внутренний контур аппаратного комплекса сохранялся стерильным.

Вид рабочей части испытательного стенда для гипотермической машинной перфузии с дополнительной оксигенацией перфузирующего раствора в процессе перфузии доли печени представлен на рисунке 2.

Также как и в случае СХК в начале кондиционирования, через 120 и 240 минут от начала эксперимента проводили измерение массы доли печени с использованием электронных весов и температуры ядра органа с использованием электронного термометра (Checktemp® Hanna, США), а также осуществляли забор проб эфлюента из печеночной вены и выполняли трепан-биопсии иглой G-14 (Bard, Германия), с получением столбика ткани для анализа 20×2,1 мм.

Оценка влияния различных способов гипотермического кондиционирования на повреждение клеток печени производили с использованием биохимических анализаторов «Architect c8000» и «Architect c4000» (Abbott Laboratories Co., США). Морфологическое исследование биоптатов печени проводили по стандартной окраске гематоксилин-эозин. Для проведения иммуногистохимического исследования уровня экспрессии антигенов HIF-1 α , Caspase-3 в гистологическом материале печени исследуемый материал фиксировался в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в течение 24 часов. Гистологическая проводка материала осуществлялась в автоматическом режиме с использованием гистопроцессора карусельного типа Leica TP 1020 по стандартной (спирты-ксилол-парафиновая среда) методике. Затем материал заливался в парафиновую среду для микротомирования. При помощи ротационного электромеханического микротомы «Microm HM340E» приготавливались срезы толщиной 3 мкм, которые монтировались на высокоадгезивные стекла (Dako, Дания) и подсушивались в течение 12 часов при температуре 37 °C, затем 1 час при 60 °C. Стекла с адгезированными срезами депарафинировались в трех сменах ксилола, пяти сменах спиртов нисходящей концентрации. Для нивелирования антиген-маскирующего действия формалиновой фиксации срезы проходили высокотемпературную предобработку в Tris/EDTA буфере. Срезы обрабатывались 3%-ной перекисью водорода для блокировки эндогенной пероксидазы в течение 10 минут. В последующем проводилась инкубация с первичными антителами. Окрашенные препараты исследовались в проходящем свете с помощью микроскопа LeicaDM 2500, микрофото съемка проводилась с увеличением x400 микрофотокамерой LeicaDFC425. Морфометрический анализ проводился с использованием программного морфометрического пакета Image Pro Plus.



Рис. 2. Вид рабочей части испытательного стенда в процессе перфузии доли печени

Результаты и обсуждение

Несмотря на то, что статическая холодовая консервация остается «золотым стандартом» в сохранении трансплантатов печени, развивающиеся динамические методы консервации в различных вариациях демонстрируют преимущество над СХК [10]. Как известно, при температурах 15–17 °C и в области около 0 °C в липидах мембран возникают фазовые переходы, а в белках – конформационные перестройки. Термически зависимое разрушение белково-липидных структур клетки активизирует мембранные фосфолипазы, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), нарушает работу мембраносвязанных ферментов, энергетического обмена в клетках, создавая условия для развития в них энергетического дисбаланса. Таким образом, гипотермия, особенно при длительном многочасовом воздействии на органы, из фактора противоишемической защиты становится фактором ишемического повреждения. Так, в условиях холодовой ишемии в клетках органа развивается целый ряд патофизиологических процессов: отек клетки, повреждение мембран, расход молекул АТФ, формирование активных форм кислорода и внутриклеточного ацидоза. В совокупности эти процессы могут привести к гибели клеток печени.

Преодоление недостатков статической холодовой консервации возможно путем создания условий для искусственной циркуляции через трансплантаты перфузирующего раствора, который будет с одной

стороны элиминировать продукты метаболизма клеток и катаболические ферменты, с другой – являться источником энергетических субстратов, с третьей – иметь свойства системы транспортировки кислорода, с четвертой – поддерживать функциональную состоятельность микроциркуляторного русла [11].

В ходе исследования сравнение основных параметров доноров печени в группах с применением СХК и ГМПО не выявило статистически значимых различий. Не обнаружено достоверных различий в методике эксплантации и транспортировки донорских органов (таблица 1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика основных параметров доноров печени в группах исследования, Ме [25; 75]

Показатель	Группа	
	СХК, n = 10	ГМПО, n = 10
Пол (муж./жен.)	6/4	6/4
Возраст (лет)	53[53; 54]	53[53; 54]
Масса органа (г):		
исходная	598 [420; 812]	906 [866; 1040]
в конец исследования	606 [500; 854]	959 [882; 1130]
Время холодовой ишемии (мин)	480 [360; 540]	480 [360; 540]
Температура (°C):		
в начале исследования	4,5 [2,9; 5,9]	4,5 [2,9; 6,0]
в конец исследования	8,55 [5,4; 11]	7,65 [6,8; 8,8]

Исходная масса долей органов достоверно отличалась в группах исследования ($p = 0,014$, Mann – Whitney U-Test). В связи с этим, расчет исследуемых биохимических показателей осуществлялся на 1 грам паренхимы печени.

Наиболее известными и широко применимыми маркерами повреждения гепатоцитов в клинической

практике являются аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

Сравнительный анализ уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ) показал, что через 240 минут исследования в группе гипотермической оксигенированной машинной перфузии определялись меньшие значения данного фермента 1,9 [1,53; 3] ЕД/л на 1 г печени в сравнении с контрольной группой 2,4 [1,94; 5, 6] ЕД/л на 1г печени (рисунок 3) ($p = 0,22$, Mann – Whitney U-Test).

В результате анализа уровней аланинаминотрансферазы (АЛТ) в эфлюенте через 240 минут исследования было установлено, в группе гипотермической оксигенированной машинной перфузии определялись меньшие значения АЛТ 0,9 [0,68; 2] ЕД/л на 1 г печени в сравнении с трансплантатами, которые подвергались статической холодной консервации 1,8 [0,72; 5,2] ЕД/л на 1 г печени (рисунок 4) ($p = 0,36$, Mann – Whitney U-Test).

Также установлено, что через 240 минут в трансплантатах, подвергавшихся гипотермической оксигенированной машинной перфузии, определялись достоверно меньшие значения уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) 8,3 [6,13; 12,5] ЕД/л на 1 г печени в сравнении со статической холодной консервацией 26,4 [9,17; 41,1] ЕД/л на 1 г печени ($p = 0,013$, Mann – Whitney U-Test) (рисунок 5).

Одним из основных патофизиологических явлений, вносящим наибольший вклад в развитие ишемически-реперфузионного повреждения трансплантатов печени, является повреждение митохондрий гепатоцитов.

В условиях дефицита кислорода, как при СХК, митохондрии остаются в состоянии высокого потока электронов. В данных условиях молекулы кислорода

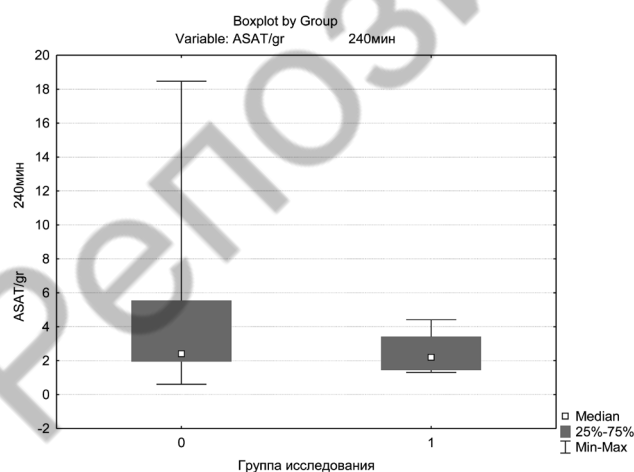


Рис. 3. Значения медиан уровней аспаратаминотрансферазы в эфлюенте через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа

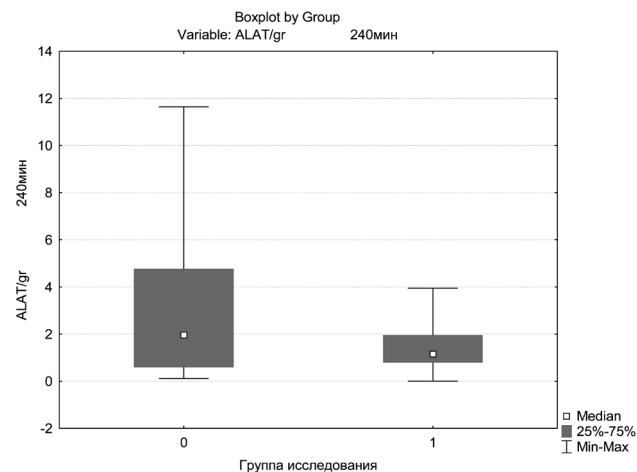


Рис. 4. Значения медиан уровней аланинаминотрансферазы в эфлюенте через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа

в дыхательной цепи принимают только один электрон вместо четырёх, как в условиях нормоксии. Это в свою очередь приводит к образованию митохондриальных активных форм кислорода (АФК) [12]. Во время гипотермической оксигенированной перфузии происходит переключение с высокого потокового переноса электронов в электрон транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий в начале перфузии на низкий поток переноса электронов в течение приблизительно 60–90 мин перфузии, что позволяет снизить уровень продуцируемых АФК.

Сравнительный анализ уровня активных форм кислорода (FORT) в группах исследования показал, что через 120 и 240 минут исследования в группе гипотермической оксигенированной машинной перфузии происходит достоверно меньшее их накопление в эфлюенте в сравнении с группой СХК ($p_{120\text{мин}} = 0,028$, $p_{240\text{мин}} = 0,03$, Wilcoxon Matched Pairs Test) (Рисунок 6).

Повреждение мембран митохондрий приводит к активации белков семейства BCL-2 (B-cell lymphomas gene 2), которые могут активировать проницаемость митохондриальной наружной мембраны, стимулируя порообразующую активность белков BAX (BCL-2 associated X protein – белок X, ассоциированный с BCL-2) и BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer – гомологичный антагонист/киллер Bcl-2) [13,14]. О степени повреждения митохондрий гепатоцитов может свидетельствовать уровень ферментов, в основном сосредоточенный в их мембранах. Так, глутаматдегидрогеназа – фермент, катализирующий обратимую реакцию превращения L-глутаминовой кислоты в α -кетоглутаровую, может являться эффективным маркером в оценке степени повреждения митохондриальных мембран. Через 240 минут в трансплантатах, подвергавшихся гипотермической машинной

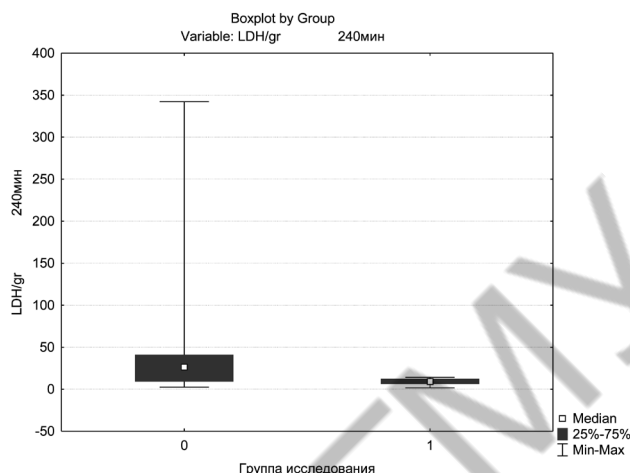


Рис. 5. Значения медиан уровней лактатдегидрогеназы в эфлюенте через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа

перфузии с оксигенацией, определялись достоверно меньшие значения уровня глутаматдегидрогеназы (ГЛДГ) 0,1 [0,06; 0,1] ЕД/л на 1 г печени в сравнении со статической холодной консервацией 0,3 [0,18; 0,4] ЕД/л на 1 г печени ($p = 0,005$, Mann – Whitney U-Test) (рисунок 7).

Открытие митохондриальных пор приводит к высвобождению митохондриальных АФК и белков: цитохрома С, прямого ингибитора апоптоз-связывающего белка с низким рI (DIABLO) и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) [13, 15]. Данные молекулы запускают расщепление инициаторной каспазы 8, а также активацию проапоптотических белков, что приводит к сборке апоптосомного комплекса (цитохром с, Araf-1, каспаза 9) и активации каспазы 3 [14].

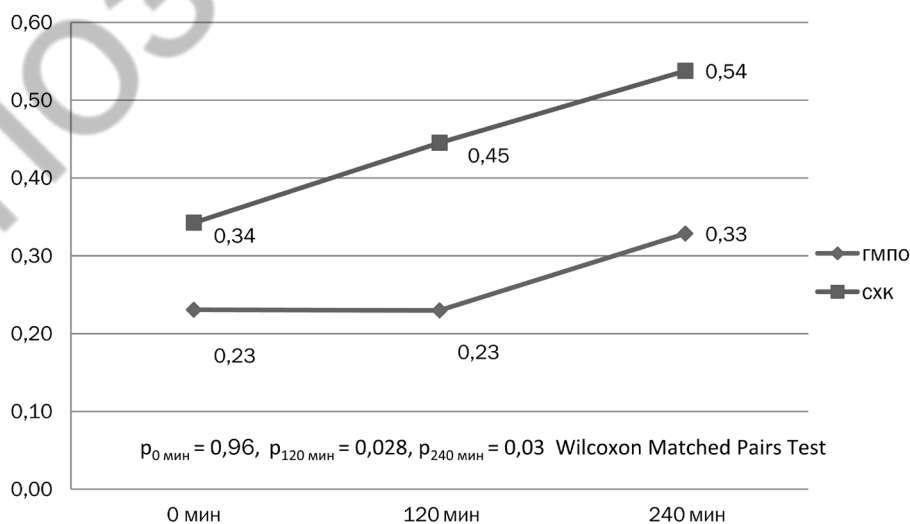


Рис. 6. Динамика уровней АФК (FORT) в эфлюенте в начале, через 120 минут и 240 минут исследования.

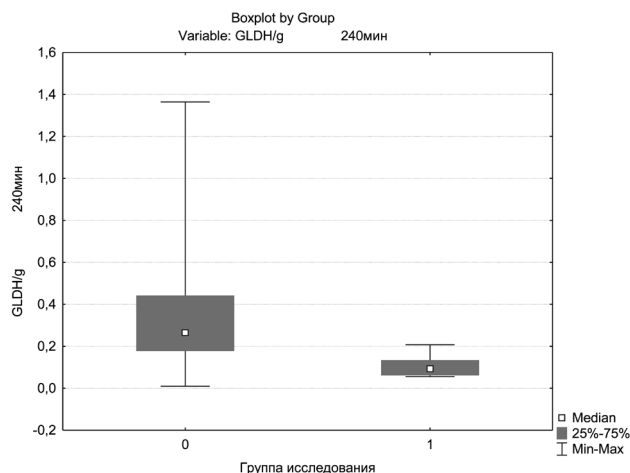


Рис. 7. Значения медиан уровней глутаматдегидрогеназы в эфлюенте через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа

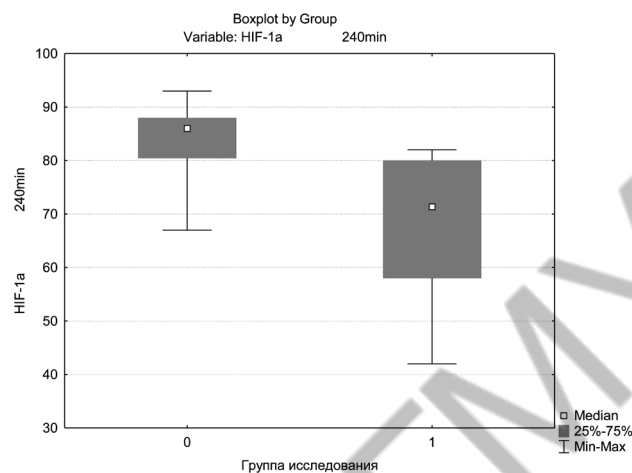


Рис. 9. Значения медиан уровней экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1α) через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа.

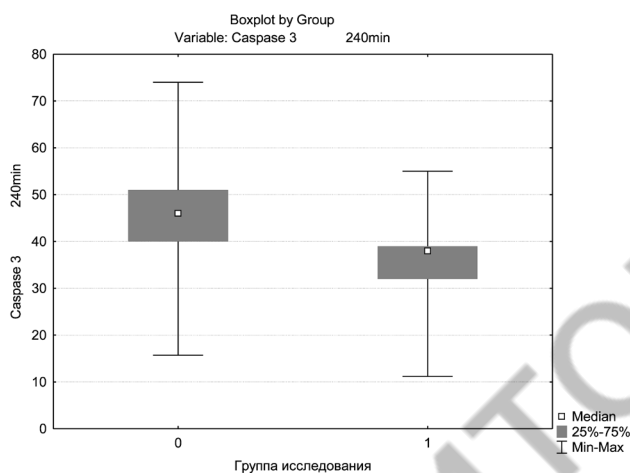


Рис. 8. Значения медиан уровней экспрессии каспазы 3 через 240 минут исследования, Mann – Whitney U-Test. 0 – контрольная группа. 1 – экспериментальная группа

Каспаза 3, как известно, является одним из ключевых ферментов, запускающий процесс апоптоза клеток [16]. При проведении иммуногистохимического анализа биоптатов печени из групп исследования было выявлено, что в трансплантатах, подвергавшихся гипотермической оксигенированной машинной перфузии, экспрессия каспазы 3 (Caspase 3) определялась в достоверно меньшей доле гепатоцитов 37,5 [32; 39] % в сравнении со статической холодной консервацией 46 [40; 51] % ($p = 0,05$, Mann – Whitney U-Test) (рисунок 8, 10 В, Г).

Известно, что применение гипотермической машинной перфузии с оксигенацией приводит к снижению скорости потребления кислорода в течение первого часа до достижения базального уровня через 90 минут [17, 18]. Иммуногистохимический анализ

биоптатов печени из групп исследования выявил, что в трансплантатах, подвергавшихся гипотермической оксигенированной машинной перфузии, экспрессия фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1α) через 120 минут 60,5 [56; 71,6] % и 240 минут исследования 69,7 [57; 80] % определялась в достоверно меньшей доле гепатоцитов в сравнении с группой трансплантатов, которые подвергались статической холодной консервации 80,5 [73; 82] % и 86 [80,5; 88] %, соответственно ($p_{120min} = 0,03$, $p_{240min} = 0,007$, Mann – Whitney U-Test) (Рисунок 9, 10 А, Б), что свидетельствует о меньшей гипоксии гепатоцитов в группе ГМПО.

Таким образом, применение гипотермической оксигенированной машинной перфузии (ГМПО) в течение 4 часов в конце этапа статической холодной консервации приводит к достоверному снижению уровня выработки свободных радикалов и позволяет снизить уровень цитолитических ферментов АСТ, АЛТ, ЛДГ в сравнении со статической холодной консервацией.

Использование данного метода консервации позволяет достоверно уменьшить уровень экспрессии фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1α), каспазы 3, а также уровень ГЛДГ в эфлюенте, что свидетельствует о меньшем повреждении митохондрий гепатоцитов.

По морфометрическим и лабораторным параметрам гипотермическая оксигенированная машинная перфузия в конце периода холодной консервации демонстрирует преимущество в защите клеток печени от ишемического повреждения по сравнению с полной статической холодной консервацией (СХК).

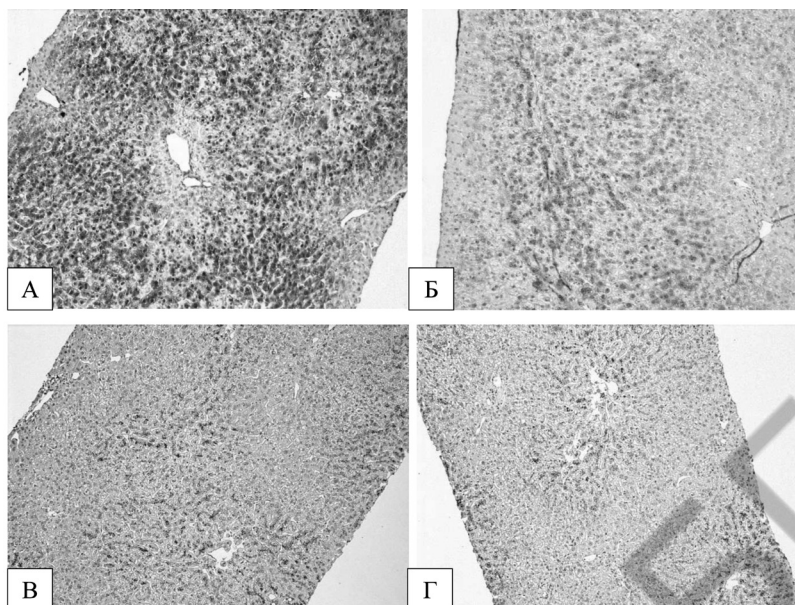


Рис. 10. Иммуногистохимический анализ биоптатов печени в группах исследования через 240 минут от начала эксперимента, $\times 40$. А – экспрессия HIF-1 α в контрольной группе. Б – экспрессия HIF-1 α в экспериментальной группе. В – экспрессия Caspase 3 в контрольной группе. Г – экспрессия Caspase 3 в экспериментальной группе.

Литература

1. Asrani SK, Larson Kim, W. R., Therneau, T. M., Benson, J. T., Kremers, W. K., Rosen, C. B., Gores, G. J., & Dickson, E. R. (2006). Deaths on the liver transplant waiting list: an analysis of competing risks. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 43(2), 345–351. <https://doi.org/10.1002/jgt.10053>
2. DeLemos AS, Vagefi PA. Expanding the donor pool in liver transplantation: Extended criteria donors. *Clin Liver Dis*. 2013;2(4):156–159. doi:10.1002/cld.222
3. Weeder PD, Van Rijn R, Porte RJ. Machine perfusion in liver transplantation as a tool to prevent non-anastomotic biliary strictures: Rationale, current evidence and future directions. *J Hepatol*. 2015;63(1):265–275. doi:10.1016/j.jhep.2015.03.008
4. Olschewski P, Gass P, Ariyakhagorn V, и др. The influence of storage temperature during machine perfusion on preservation quality of marginal donor livers. *Cryobiology*. 2010;60(3):337–343. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.03.005
5. Schlegel A, Kron P, Dutkowski P. Hypothermic Oxygenated Liver Perfusion: Basic Mechanisms and Clinical Application. *Curr Transplant Reports*. 2015;2(1):52–62. doi:10.1007/s40472-014-0046-1
6. Van Rijn R, Van Leeuwen OB, Matton APM, и др. Hypothermic Machine Preservation of the Liver: State of the Art. *J Surg Res*. 2018;223:263–274. doi:10.1016/j.jss.2017.11.052
7. Lipowsky HH, Lescanic A. The Effect of Doxycycline on Shedding of the Glycocalyx Due to Reactive Oxygen Species. *Microvasc Res*. 2013;90. doi:10.1016/j.mvr.2013.07.004
8. Petrowsky H, Clavien PA. Principles of Liver Preservation. *Transplant Liver Third Ed*. 2015:582–599. doi:10.1016/B978-1-4557-0268-8.00044-0
9. Устройство для консервации донорской ткани в условиях гипотермии: пат. 11222 Респ. Беларусь: МПК А01N 1/02 / А. М. Федорук, Н. М. Яковец, В. А. Ленкевич, Е. В. Гулевич, Д. А. Федорук, Л. В. Кирковский, О. О. Руммо; дата публ.: 30.10.2016.
10. Menasche P, Termignon JL, Pradier F, et al. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1994;8(4):207.
11. Vekemans K, et al. Artificial circulation of the liver: machine perfusion as a preservation method in liver transplantation. *Anat Rec* (Hoboken). 2008 Jun;291(6):735–40. doi: 10.1002/ar.20662.
12. Van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(8):1382.
13. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861.
14. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J*. 2003;22(17):4385.
15. Van Gurp M, Festjens N, van Loo G, Saelens X, Vandenabeele P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):487.
16. Porter A.G., Jänicke R.U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):99–104.
17. Monbaliu D, Vekemans K, De Vos R, et al. Hemodynamic, biochemical, and morphological characteristics during preservation of normal porcine livers by hypothermic machine perfusion. *Transplant Proc*. 2007;39(8):2652.
18. Dirkes MC, Post IC, Heger M, van Gulik TM. A novel oxygenated machine perfusion system for preservation of the liver. *Artif Organs*. 2013;37(8):719.

Поступила 11.03.2020 г.