

Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, А. И. Киреева, А. В. Носик,
Г. В. Жук, А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо

**АССОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ПОЛИМОРФИЗМОМ РЕЦЕПТОРОВ TLR-4
ДОНОРА И РИСКОМ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ
ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ**

РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе

УЗ «9-я городская клиническая больница» (г. Минск, Республика Беларусь)

Было показано, что рецепторы TLR (Toll-like receptors) – 4 играют ключевую регуляторную роль в развитии отторжения и иммунологической толерантности после трансплантации печени. Более того, была выявлена ассоциация полиморфизма некоторых единичных нуклеотидных последовательностей (ЕНП) TLR-4 донора и выраженной дисфункцией печеночного графта. Тем не менее, не существует проспективного исследования, в котором бы оценивалась взаимосвязь между полиморфизмом рецепторов TLR-4 донора и частотой острого отторжения трансплантата печени.

Цель исследования: оценить влияние полиморфизма некоторых единичных нуклеотидных последовательностей TLR-4 на частоту развития острого отторжения после трансплантации печени в Республике Беларусь.

В исследование включены 53 последовательных пациента старше 18 лет, перенесших ортотопическую трансплантацию печени (ОТП) от донора со смертью мозга в условиях РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я ГКБ» в период с февраля 2013 по февраль 2014гг. На этапе мультиорганного забора у донора выполняли взятие пробы цельной крови с выделением в последующем ДНК и секвенированием генов TLR-4 в ЕНП rs11536865, rs5030717 и rs913930 с использованием анализатора 3500 Genetic Analyzer, «Life technologies», USA. Острое отторжение (ОО) оценивалось по стандартным Banff критериям по результатам гистологического исследования. Для оценки взаимосвязи между полиморфизмом TLR-4 и частотой ОО использовали тест Fisher и регрессионный анализ.

Частота ОО составила 26,4% (14/53). В данной когорте ЕНП rs11536865 была моноаллельной (GG генотип); в то время как rs5030717 и rs913930 были представлены 3 генотипами (AA, AG, GG и TT, TC, CC, соответственно). Была выявлена тенденция к ассоциации минорной аллели C в rs 913930 и более благоприятного исхода (частота ОО в случае генотипов CC и C/T против TT составила 11,1% (2/18) против 34,2% (12/35) соответственно, $p = 0,07$, $\chi^2 = 2,95$). При этом, взаимосвязи между полиморфизмом ЕНП rs 5030717 и ОО выявлено не было ($p = 0,5$).

Результаты данного пилотного исследования показали потенциальную ассоциацию полиморфизма TLR-4 доноров в пределах rs 913930 и частотой острого отторжения после трансплантации печени в Республике Беларусь.

Ключевые слова: трансплантация печени, полиморфизм рецепторов TLR-4, иммунологическая реактивность реципиента.

*D. Y. Efimov, S. V. Korotkov, A. I. Kireeva, A. V. Nosik, H. V. Zhuk,
A. M. Dzyadzko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo*

ASSOCIATION BETWEEN DONOR TLR-4 POLYMORPHISM AND ACUTE REJECTION AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN BELARUS

It has been shown that TLR-4 have a key regulatory role in allograft rejection and tolerance in liver transplantation. Moreover a significant association between some single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the deceased donor TLR-4 gene and liver graft failure (LGF) was reported. But there is no prospective study to assess association between TLR-4 polymorphism and acute rejection after liver transplantation.

The aim of the study was to assess influence of the donor TLR-4 polymorphism on the acute rejection incidence after liver transplantation in Belarusian population.

53 sequential DBD adult liver transplants from standard criteria donors were included in the prospective case-control study. Blood probe taken at procurement operation were analyzed and three SNPs (rs11536865 (G/C), rs5030717(A/G) and rs913930 (T/C) as previously described to be associated with LGF) within the TLR-4 gene were sequenced (3500 Genetic Analyzer, «Life technologies», USA). Acute rejection was assessed with standard Banff criteria on graft biopsy (BPAR). The Fisher exact test and regression analysis were used to assess association between BPAR and SNPs.

The overall BPAR incidence was 26,4% (14/53). In given cohort the rs11536865 was monoallelic (GG genotype); both rs5030717 and rs913930 had 3 genotypes (AA, AG, GG and TT, TC, CC consequently). The trend toward protective effect of minor C allele within rs 913930 was revealed (BPAR incidence in CC and TC genotypes vs TT genotype was 11,1% (2/18) vs 34,2% (12/35), $p = 0,07$, $\chi^2 = 2,95$). There were no association between rs 5030717 SNPs and the risk of BPAR ($p = 0,5$).

The results of this pilot study showed the potential association of donor TLR-4 polymorphism within rs 913930 and the risk of BPAR in Belarusian population. The study is ongoing to clarify further the role of donor TLR-4 polymorphism and liver transplantation outcomes.

Key words: liver transplantation, TLR-4 polymorphism, immunologic reactivity of recipient.

Толл-подобные рецепторы (ТЛР, Toll-like receptors) представляют собой семейство паттерн-распознающих рецепторов, лигандами которых могут выступать как экзогенные патоген ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), так и эндогенные частицы, возникающие в результате

клеточного повреждения, или повреждение ассоциированные молекулярные паттерны (damage-associated molecular patterns, DAMPs). ТЛР-рецепторы широко экспрессированы в печени и играют ключевую роль в иммунном ответе при эндотоксинемии, вирусных гепатитах и ишемически-реперфузионном повреждении (ИРП). В настоящий

момент у млекопитающих описано 13 типов TLR-рецепторов, у человека выделяют 10 функциональных типов, наиболее значимыми из которых являются TLR-2 и 4. [1, 10]

В целом, печень – это уникальный иммунологический орган, который постоянно подвержен массивной нагрузке экзогенными аллоантигенами, поступающими через систему воротного кровотока. При этом, существует баланс между иммунотолерантностью к экзогенным пищевым и аутоантигенам и иммунореактивностью к патогенным микроорганизмам, липополисахариду (ЛПС) бактерий, различным токсинам. Выделяют понятие «портальной толерантности» – явления иммунологической гипореактивности печени при попадании антигена через систему воротного кровотока. Данное явление существует благодаря особой микроангиоархитектонике печени, клеточному составу, специфике межклеточных взаимодействий, а также преобладанием неспецифического антиген независимого иммунного ответа над адаптивным антиген зависимым. Так, в «здоровой» печени, благодаря сниженной экспрессии TLR-2 и 4 на Купферовых клетках, при поступлении аллогенных лигандов данных рецепторов из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) через систему воротного кровотока возникают явления иммунологической толерантности. [9–12]

TLR-4 является особым паттерн-распознающим рецептором, обладающим уникальной структурой, которая позволяет ему связываться как с PAMP, так и DAMP. Данная особенность, а также широкая распространенность TLR-4 на гепатоцитах, эндотелиоцитах, Купферовских и звездчатых клетках, Т-лимфоцитах (в том числе и Т-регуляторных лимфоцитах) определяет его ключевую роль в различных процессах, связанных с трансплантацией печени. Современная концепция участия TLR-рецепторов в развитии толерантности/отторжения после трансплантации печени базируется на том, что во время холодовой консервации и последующей реперфузии высвобождается большое количество PAMPs и DAMPs, которые стимулируют TLR-сигнальный путь и активируют антиген презентующие дендритные клетки (АПК) [3, 4, 6]. Активированные АПК через TLR-рецепторы усиливают презентацию аллоантигенов, стимулируют Т-лимфоциты и усугубляют повреждение печеночного графта. [5–8]

Интересные особенности были выявлены при исследовании мышей, с заблокированным геном TLR-4: у последних наблюдали повышенный уровень циркулирующих примированных CD8+ Т-лимфоцитов. Было показано, что посредством TLR-4

рецепторов на гепатоцитах происходит «захват» в печень с последующим апоптозом циркулирующих примированных CD8+ Т-лимфоцитов. То есть уровень экспрессии TLR-4 является регулятором пула Т-клеток памяти. Также в исследовании *Deng et al* была продемонстрирована положительная корреляция между экспрессией TLR-2 и 4 на моноцитах и частотой острого отторжения. Более того, пульс-терапия стероидами способствовала снижению экспрессии данных рецепторов. В доказательство роли TLR-4 в патогенезе отторжения после трансплантации солидных органов, ряд исследователей изучал ассоциацию полиморфизма единичных нуклеотидных последовательностей (ЕНП) рецепторов TLR-4 с развитием острого отторжения. Так, была продемонстрирована ассоциация полиморфизмов TLR-4 Asp299Gly (rs4986790) и Thr399Ile (rs4986791) с уменьшением эпизодов острого клеточного отторжения при трансплантации почки и легкого. Однако, результаты изучения данного фактора при трансплантации печени противоречивы, при этом, большинство исследований сконцентрированы вокруг ЕНП TLR-4 реципиента. *William S. Oetting et al* было показано, что наличие минорной аллели С в ЕНП TLR-4 rs11536856, rs5030717 и rs913930 донора ассоциировано с худшей выживаемостью графта. Тем не менее, в исследовании не конкретизируется, с каким осложнением (инфекционным, иммунологическим и т.п.) связано снижение выживаемости графта. [8–13, 15, 16]

Таким образом, нами была сформирована гипотеза о том, что полиморфизм определенных единичных нуклеотидных последовательностей гена TLR-4 ассоциирован с развитием острого отторжения трансплантата печени в белорусской популяции.

Цель исследования: оценить влияние полиморфизма некоторых единичных нуклеотидных последовательностей TLR-4 на частоту развития острого отторжения после трансплантации печени в Республике Беларусь.

Материалы и методы

В исследование включены 53 последовательных пациента старше 18 лет, перенесших ортотопическую трансплантацию печени (ОТП) от донора со смертью мозга в условиях РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я ГКБ» г. Минска в период с февраля 2013 по февраль 2014 года. Критерии включения: трансплантация печени от умершего донора со стандартными критериями (уровень АСТ и АЛТ менее 200, жировой гепатоз менее 40%, уровень натрия до 165 мколь/л,

возраст до 60 лет, применение вазопрессоров допускаться). Критерии исключения: трансплантация от родственного донора, редуцированный графт, возраст реципиента менее 18 лет. После констатации смерти мозга у умершего донора выполняли взятие пробы цельной крови из периферической вены в пробирку с антикоагулянтом с выделением в последующем ДНК и секвенированием генов TLR-4 в ЕНП rs11536865, rs5030717 и rs913930 по описанной ниже ме-

тодике. Острое отторжение оценивалось по стандартным Vanff критериям по результатам гистологического исследования.

Методика определения в гене TLR-4 клинически значимых полиморфизмов

Подобраны олигонуклеотидные праймеры для амплификации трех локусов гена TLR4, в которых расположены полиморфизмы (ЕНП) rs 11536865 (G/C), rs 5030717(A/G), rs 913930 (T/C) (таблица 1).

Таблица 1. Последовательность олигонуклеотидов для определения полиморфизмов гена TLR-4

ЕНП*	OBSERVED*	MAF*	Location [13]	Праймеры
rs11536865	C/G	C=0.0427	5' (- 728)	F:CCTCAAAGCCATGAGTCACC R:TCTTCAAGGCTCTCTCTCCA Size: 247 bp
rs5030717	A/G	G=0.0958	intron 2 (-833)	F:TGGTTGGTAAACCTCTGCCTA R:AGGAGGTGAAGTGAACAGCAA Size: 174 bp
rs913930	C/T	C=0.1769	3' UTR (-7083)	F:TGTGGGTGGTTATTCTCCATT R:CAAATGCTTGGCTTAAGAATCA Size: 227 bp

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>

Отработаны условия проведения амплификации для получения специфичных ПЦР-продуктов трех исследуемых локусов гена TLR-4 (Рисунок 1). ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1 x ПЦР буфер, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µL Phusion Green Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo scientific», Финляндия), по 0,25 µM прямого и обратного праймера («Праймтех», Беларусь) и 5 µL геномной ДНК. Режим амплификации: 98 °C – 30 сек.; 35 циклов: 98 °C – 10 сек., 60 °C – 15 сек., 72 °C – 15 сек.; 72 °C – 5 мин.; 12 °C – 5 мин.

Для проведения ПЦР геномную ДНК выделяли из образцов крови доноров с использованием набора для выделения ДНК «Нуклосорб» («Праймтех», Беларусь).

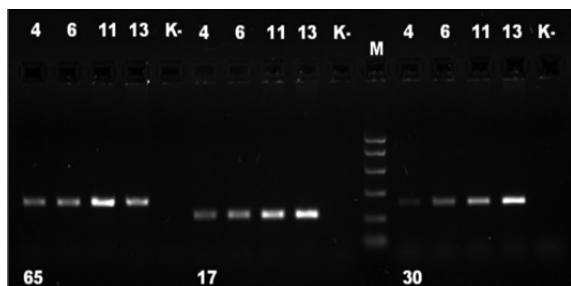


Рис. 1. Специфичные ПЦР-продукты локусов гена TLR-4, в которых расположены ЕНП: rs 11536865 (65) – 247 п.н.; rs 5030717 (17) – 174 п.н.; rs 913930 (30) – 225 п.н.; К – отрицательный контрольный образец; М – маркер

Отработана методика выявления ЕНП методом секвенирования. Для постановки секвенирующей ПЦР использовали Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Life technologies», США). Секвенирование проводили на приборе 3500 Genetic Analyzer («Life technologies», США). Анализировали результаты с использованием программы Sequencing Analysis («Life technologies», США).

При проектировании, проведении и анализе результатов исследований были использованы принципы и стандарты проведения и анализа клинических исследований описанные Stephen B Hulley с соавт. и Aviva Petrie & Caroline Sabin [2, 14] Во всех сравнительных исследованиях вероятность ошибки I типа, α, принята равной 0,05, вероятность ошибки II типа, β, принята равной 0,20 (мощность 0,80). Распределение численных величин признано ненормальным, в этой связи средние величины представлены как медиана с 25% и 75% квартилями. Для оценки взаимосвязи между полиморфизмом ЕНП гена TLR-4 и частотой острого отторжения использовали тест Fisher и регрессионный анализ.

Результаты и обсуждение

Разработанная методика определения полиморфизмов ЕНП rs 11536865, rs 5030717, rs 913930 в гене TLR4 на основе секвенирования позволила выявить генотипы, потенциально ассоциированные с развитием острого отторжения транспланта-

та печени. В пределах rs 5030717 были выявлены три генотипа: AA (гомозигота) и два генотипа с минорной аллелью G - AG (гетерозигота) и GG (гомозигота) (рисунок 2). По данным *William S. et al.* аллель G - ассоциирована с дисфункцией печеночного графта ($p = 0,0008$, для европейцев - $p = 0,07$ и афроамериканцев - $p = 0,002$) [13]. В пределах rs 913930 были выявлены выявлены 3 генотипа: TT (гомозигота) и два генотипа с минорной аллелью C - TC, CC (гетеро- и гомозиготный, соответственно) (рисунок 3). По данным *William S. et al.* для

всех доноров аллель C ассоциирована с дисфункцией печеночного графта ($p = 0,003$).

Изучение ЕНП rs 11536865 не выявило полиморфизма (все образцы имели генотип GG). Клинически значимый вариант полиморфизма - аллель C (минорная аллель) в исследованных образцах не выявлен.

Изучение частоты встречаемости выявленных генотипов показало, что в rs913930 66% доноров имели генотип TT, 28,3% были гетерозиготами СТ с минорной аллелью C и 5,7% были гомозиготами

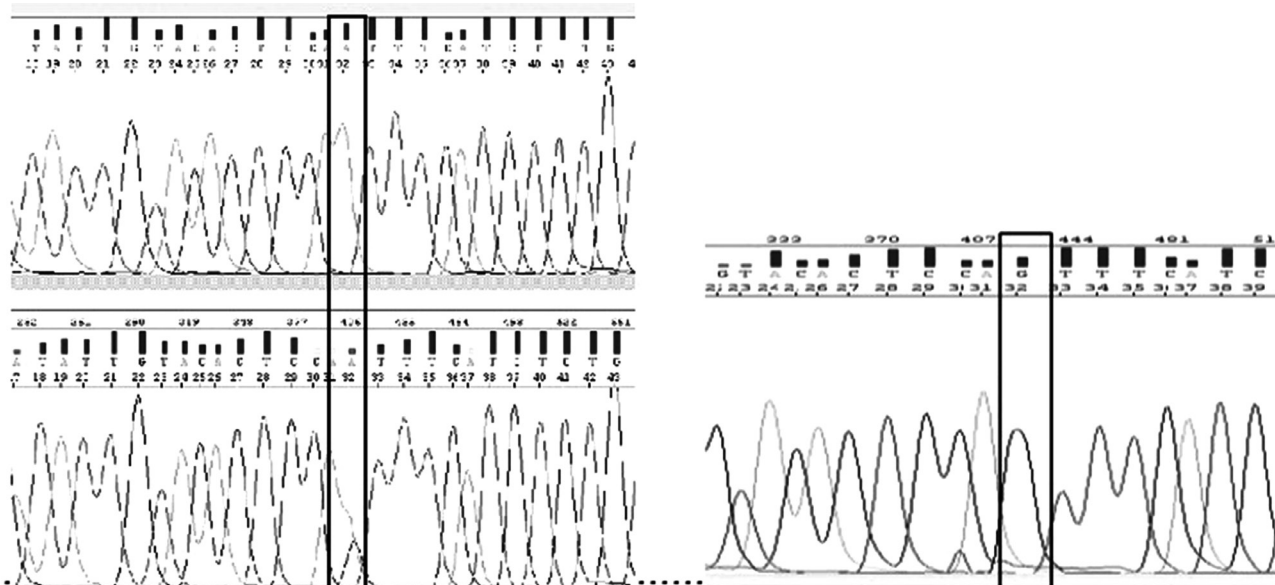


Рис. 2. ЕНП rs 5030717, локализована в intron 2 (-833) ТЛР-4, А>G. Выявлены генотипы: AA, AG (слева сверху вниз) и GG (справа)

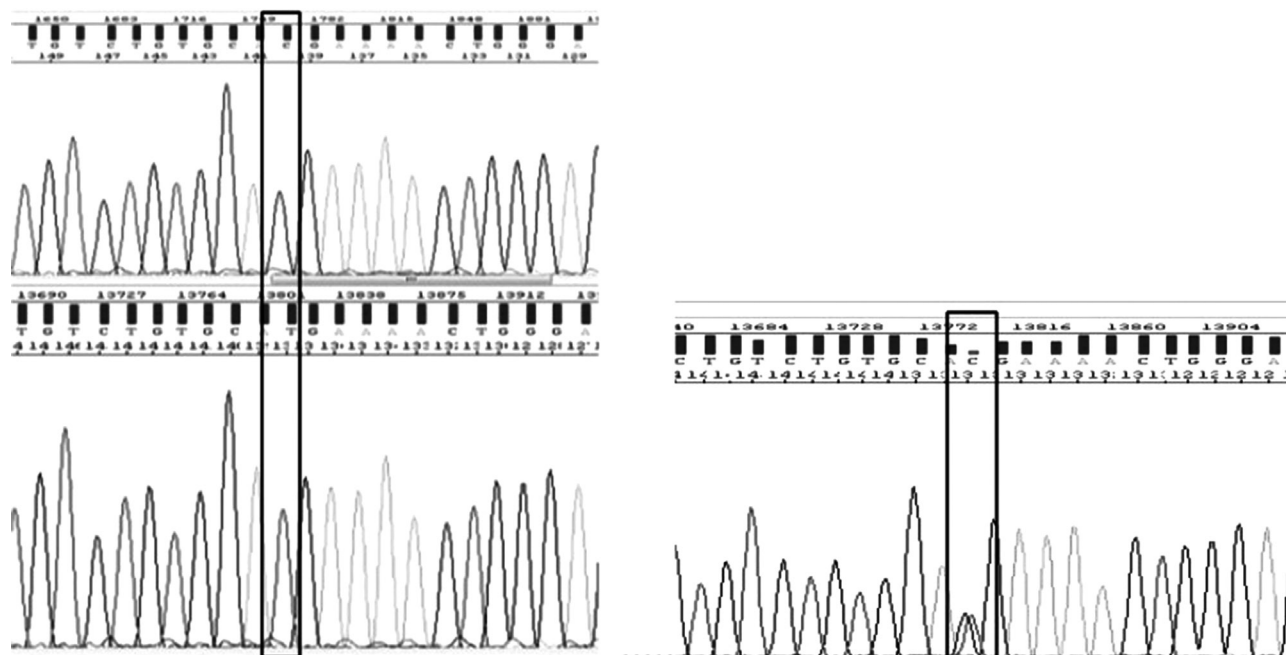


Рис. 3. ЕНП rs 913930, локализована в -7083 за 3' UTR гена ТЛР-4, Т>С. Выявлены генотипы: TT, CC (слева) и СТ (справа)

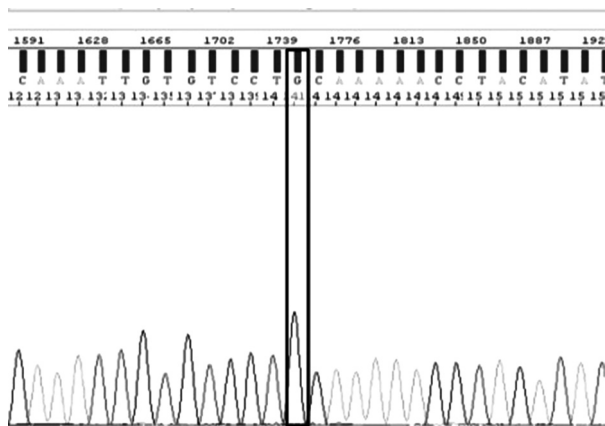


Рис. 4. ЕНП rs 11536865, локализована в 5' (- 728) гена TLR-4, T>C. Выявлен единственный генотип GG

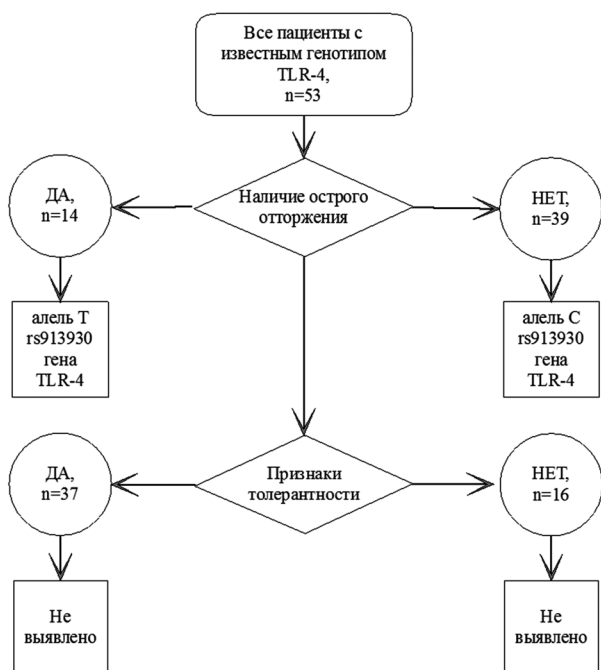


Рис. 5. Схема исследования случай-контроль по выявлению генетических предикторов отторжения и толерантности после трансплантации печени

СС. В rs 5030717 83% доноров имели генотип AA, 11,3% были гетерозиготами AG с минорной алелью A и 5,7% были гомозиготами GG. Все случаи rs11536865 имели клинически не значимый генотип GG (100%).

Подтверждение того, что в выборке образцов крови доноров печени имеются гетерозиготные, потенциально клинически значимые полиморфизмы, явилось причиной продолжение изучения ассоциации их с отторжением и толерантностью в выборке 53 пациентов с известными полиморфизмами. Для выявления ассоциаций потенциально клинически значимых генотипов rs 5030717, rs 913930 в гене TLR4 было проведено исследование случай-контроль в когорте пациентов после трансплантации печени, разделенных на две группы по признаку развития острого отторжения и по клиническим признакам толерантности. Схема исследования и сокращенные полученные результаты представлена на рисунке 5.

Острое отторжение в раннем периоде после трансплантации печени развилось у 14 (26,4%) пациентов. Пропорция пациентов с острым отторжением после ТП от донора с минорной алелью С rs913930 гена TLR-4, 2/18 (11,1%) была значимо меньше, чем при ТП от донора с алелью Т, 12/35 (34,2%) ($\chi^2 = 2,95$; Fisher exact test, $p = 0,07$). Анализ пропорций пациентов с острым отторжением по отношению к генотипу rs5030717 показал отсутствие ассоциации между риском развития острого отторжения и полиморфизмом rs5030717 гена TLR-4 (Fisher exact test, $p = 0,5$; таблица 3). Аллель специфический анализ изучаемых ассоциаций с rs913930 подтвердил тенденцию к меньшему риску развития острого отторжения у пациентов с трансплантатом носителем аллели С rs913930 гена TLR-4 (Fisher test, $p = 0,07$) и выявил потенциально протективную роль генотипа СС (Fisher test, $p = 0,02$; таблица 2).

Таблица 2. Ассоциация острого отторжения с аллелями и генотипами rs913930 гена TLR-4

	Алели (n = 106)		Генотипы (n = 53)		
	С (n = 21)	Т (n = 85)	СС (n = 3)	СТ (n = 15)	ТТ (n = 35)
Острое отторжение	2	24	0	2	12
Неосложненное течение	19	61	3	13	23
p	0,07		0,07		
			0,3		0,02

Таблица 3. Ассоциация острого отторжения с аллелями и генотипами rs5030717 гена TLR-4

	Алели (n = 106)		Генотипы (n = 53)		
	А (n = 94)	Г (n = 12)	AA (n = 44)	AG (n = 6)	GG (n = 3)
Острое отторжение	25	3	12	1	1
Неосложненное течение	69	9	32	5	2
p	0,6		0,6		
			0,4		0,5

Таким образом, проведенное исследование показали вероятную роль полиморфизма гена TLR-4 в последовательности rs913930 в отношении развития острого отторжения, а именно аллели С и генотипа СС, в раннем периоде после трансплантации печени как одного из клинических (фенотипических) признаков иммунотолерантности. На данном этапе исследования мы не выявили ассоциации генотипа rs5030717 гена TLR-4 с острым отторжением и клиническими признаками иммунотолерантности.

Результаты приведенного в данной статье пилотного исследования подчеркивают потенциальную значимость определения полиморфизма ЕНП генов TLR-4 в стратификации риска развития острого отторжения трансплантата печени. Плюсом описанной методики является то, что выполнение ПЦР в реальном времени с определением генотипа донора в момент выполнения ОТП позволяет оценить риск развития отторжения или благоприятного исхода. Так, выявление определенного генотипа, ассоциированного с отторжением или иммунотолерантностью графта, дает возможность персонализировать иммуносупрессивную терапию, что в свою очередь позволяет избежать нежелательных явлений, вызванных гипо- либо гипериммуносупрессией. Недостатком исследования является небольшое количество наблюдений, однако выбор дизайна исследования и следование требуемым для него правилам позволяет делать обоснованные для клинического исследования выводы. Полученная ассоциация аллели С и генотипа СС в последовательности rs913930 гена TLR-4 и клинической иммунотолерантности подтверждают гипотезу о том, что отторжение трансплантата печени имеет генетические предпосылки. Более того, безусловная роль рецепторов TLR-4 в патогенезе иммунологического конфликта донорского графта и организма реципиента обосновывает дальнейшее изучение данной ассоциации.

Литература

1. Au, K. P., Chan, S.-C., Chok, K. S.-H., Sharr, W. W., Dai, W.-C., Sin, S.-L., Wong, T. C.-L., Lo, C.-M., 2015. Clinical factors affecting rejection rates in liver transplantation. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 14, 367–373. doi:10.1016/S1499-3872(15)60391-5
2. Aviva Petrie, Caroline Sabin – 2012. *Medical statistics at a glance*, 3d ed. Wiley-Blackwell, 2012. – 180 p.
3. Bittersohl, H., Steimer, W., 2016. Intracellular concentrations of immunosuppressants, in: *Personalized Immunosuppression in Transplantation*. Elsevier, pp. 199–226.
4. Dasgupta, A., 2016. Limitations of immunoassays used for therapeutic drug monitoring of immunosuppressants, in: *Personalized Immunosuppression in Transplantation*. Elsevier, pp. 29–56.
5. de Mare-Bredemeijer, E. L. D., Mancham, S., Utomo, W. K., de Canck, I., van Thielen, M., de Meester, E., Rossau, R., van der Laan, L. J. W., Hansen, B. E., Tilanus, H. W., Kazemier, G., Janssen, H. L. A., Metselaar, H. J., Kwekkeboom, J., 2013. Genetic polymorphisms in innate immunity receptors do not predict the risk of bacterial and fungal infections and acute rejection after liver transplantation. *Transplant Infectious Disease* 15, 120–133. doi:10.1111/tid.12034.
6. Dembic, Z., 2015. *Activation of Cells of the Immune System*, in: *The Cytokines of the Immune System*. Elsevier, pp. 57–98.
7. Deng, J.-F., Geng, L., Qian, Y.-G., Li, H., Wang, Y., Xie, H.-Y., Feng, X.-W., Zheng, S.-S., 2007. The Role of Toll-Like Receptors 2 and 4 in Acute Allograft Rejection After Liver Transplantation. *Transplantation Proceedings* 39, 3222–3224. doi:10.1016/j.transproceed.2007.02.102.
8. Deng, M., Scott, M. J., Loughran, P., Gibson, G., Sodhi, C., Watkins, S., Hackam, D., Billiar, T. R., 2013. Lipopolysaccharide Clearance, Bacterial Clearance, and Systemic Inflammatory Responses Are Regulated by Cell Type-Specific Functions of TLR4 during Sepsis. *The Journal of Immunology* 190, 5152–5160. doi:10.4049/jimmunol.1300496.
9. Doherty, D. G., 2016. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity* 66, 60–75. doi:10.1016/j.jaut.2015.08.020.
10. Howell, J., Gow, P., Angus, P., Visvanathan, K., 2014. Role of toll-like receptors in liver transplantation: TLRs in Liver Transplantation. *Liver Transplantation* 20, 270–280. doi:10.1002/lt.23793.
11. John, B., Klein, I., Crispe, I. N., 2007. Immune role of hepatic TLR-4 revealed by orthotopic mouse liver transplantation. *Hepatology* 45, 178–186. doi:10.1002/hep.21446.
12. Nace, G. W., Huang, H., Klune, J. R., Eid, R. E., Rosborough, B. R., Korff, S., Li, S., Shapiro, R. A., Stolz, D. B., Sodhi, C. P., Hackam, D. J., Geller, D. A., Billiar, T. R., Tsung, A., 2013. Cellular-specific role of toll-like receptor 4 in hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Hepatology* 58, 374–387. doi:10.1002/hep.26346.
13. Oetting, W. S., Guan, W., Schladt, D. P., Leduc, R. E., Jacobson, P. A., Matas, A. J., Chinnakotla, S., Schröppel, B., Murphy, B. T., Israni, A. K., 2012. Donor polymorphisms of toll-like receptor 4 associated with graft failure in liver transplant recipients. *Liver Transplantation* 18, 1399–1405. doi:10.1002/lt.23549.
14. Stephen B Hulley, Steven R Cummings, Warren S Browner, Deborah G Grady, Thomas B Newman – 2013. *Designing Clinical Research* 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. – 367 p.
15. Testro, A. G., Visvanathan, K., Skinner, N., Markovska, V., Crowley, P., Angus, P. W., Gow, P. J., 2011. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4: TLR4 and liver allograft rejection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, 155–163. doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06324.x
16. Wang, F., Li, L., Li, J., Wang, J., Wang, L., Jiang, W., 2013. High Mobility Group Box-1 Promotes the Proliferation and Migration of Hepatic Stellate Cells via TLR4-Dependent Signal Pathways of PI3K/Akt and JNK. *PLoS ONE* 8, e64373. doi:10.1371/journal.pone.0064373.

Поступила 23.03.2016 г.