

□ Оригинальные научные публикации

Д. Ю. Ефимов, С. В. Коротков, Г. В. Жук,
Е.А. Янушевская, Ю. С. Березнева, А. А. Коритко,
А. М. Дзядзько, А. Е. Щерба, О. О. Руммо

УРОВНИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2, 8 И МАКРОФАГАЛЬНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО БЕЛКА-1 α В ПЕЧЕНОЧНЫХ ВЕНАХ НЕПОСРЕДСТВЕННО ПОСЛЕ РЕПЕРФУЗИИ АССОЦИИРОВАНЫ С ВОЗНИКНОВЕНИЕМ ОСТРОГО ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ

РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе
УЗ «9-я городская клиническая больница» (г. Минск, Республика Беларусь)

Острое отторжение является одним из наиболее часто возникающих осложнений после трансплантации печени. «Золотым стандартом» диагностики отторжения является биопсия трансплантата печени, выполнение которой требует времени, материальных затрат и ассоциировано с риском вмешательства. Более того, морфологическая интерпретация результатов биопсии бывает противоречива. В связи с этим существует необходимость в разработке неинвазивных методов диагностики острого отторжения печеночного трансплантата.

Цель исследования – оценить значимость серологических маркеров воспалительного ответа в диагностике острого отторжения у пациентов после трансплантации печени.

Результаты анализа показали, что уровень МВБ-1 α , определяемого во время выполнения трансплантации печени, может являться маркером развития острого клеточного отторжения. Диагностическая значимость серологических маркеров воспалительного ответа у пациентов после трансплантации печени требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: отторжение трансплантата печени.

**D. Y. Efimov, S. V. Korotkov, H. V. Zhuk,
E. A. Yanushevskaya, Y. S. Berezneva, A. A. Karytka,
A. M. Dzyadzko, A. E. Shcherba, O. O. Rummo**

INTERLEUKIN-2, 8 AND MACROPHAGE INFLAMMATORY PROTEIN-1 α LEVELS IN HEPATIC VEINS INITIALLY AFTER REPERFUSION ARE ASSOCIATED WITH ACUTE LIVER TRANSPLANT REJECTION

Acute rejection (AR) after liver transplantation is one of the most frequent complication following this procedure. Currently, the real necessity of development of non-invasive biomarkers of AR exists.

The aim – of the study was to evaluate the association between different cytokines levels and acute liver transplant rejection.

MIP-1 α level in hepatic vein 1h after reperfusion may be used as a biomarker of acute liver transplant rejection development. Further investigation to find out markers and predictors of complications after liver transplantation is needed.

Key words: liver transplant rejection.

Трансплантация печени (ТП) является оптимальным видом лечения хронических заболеваний печени в терминальной стадии. В Республике Беларусь однолетняя и трехлетняя выживаемость после данного вмешательства составляет 91 и 85% соответственно, при этом, в настоящий момент около 300 пациентов живет с трансплантированной печенью [1]. Частота развития острого отторжения (ОО) по данным литературы трансплантата печени варьирует в пределах 18–46%

в течение первого года после ТП, при этом, большинство эпизодов случаются в первые 2 месяца [2, 3]. Развитие данного иммунологического осложнения влечет за собой такие негативные последствия, как увеличение койко-дня, необходимость инвазивной диагностики (пункционной биопсии печени), снижение качества жизни пациента. Более того, рецидивирующие эпизоды острого отторжения приводят к постоянному повреждению трансплантата, развитию хронического отторже-

ния и, в конечном итоге, – потере графта [4]. В связи с этим существует необходимость в улучшении диагностики прогнозирования острого отторжения с помощью неинвазивных методов.

Известно, что большинство цитокинов обладают иммуномодуляторным эффектом, который *in vitro* был продемонстрирован для интерлейкинов (ИЛ)-1, 2, 4, 6, 10, 17 и в виде активации пролиферации и цитотоксического эффекта [5–7]. Определение конкретной функции каждого цитокина при отторжении трансплантата является сложной задачей, однако, доказана их экспрессия как в системном кровотоке, так и в самом графте при развитии данного патофизиологического процесса.

Уровень ФНО- α повышается при отторжении трансплантата и может предшествовать биохимическим маркерам повреждения печеночной паренхимы за 1–2 дня. Однако, уровень ФНО- α повышается и при инфекционных осложнениях, что уменьшает его диагностическую способность как маркера острого отторжения [8]. Несмотря на это, было показано, что уровень ФНО- α в момент реперфузии может быть ассоциирован с развитием острого отторжения, при этом, авторы данного исследования предположили, что ФНО- α может стимулировать прикрепление лимфоцитов реципиента к эндотелию трансплантата, индуцируя экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости [9]. А Imagawa с соавторами показали, что использование анти-ФНО моноклональных антител на модели у крыс приводит к улучшению выживаемости графта после трансплантации [10].

Как и в случае с ФНО- α , повышенная экспрессия рецепторов к ИЛ-2 является неспецифическим маркером отторжения, при этом, в нескольких исследованиях на животных было отмечено, что пониженные уровни ИЛ-2 и ФНО- α ассоциированы с большей выживаемостью графта. Ингибирование Такролимусом (базисным иммуносупрессантом) транскрипции гена ИЛ-2 и повышенный уровень активированных рецепторов к ИЛ-2 в момент отторжения доказывают центральную роль ИЛ-2 в развитии отторжения трансплантата. Фактически, именно понимание роли рецепторов ИЛ-2 в развитии острого отторжения явилось стимулом к созданию таргетных антагонистов рецепторов ИЛ-2, использование которых позволяет снизить частоту острого отторжения после трансплантации печени [11–13].

Роль ИЛ-6 заключается в стимулировании дифференцировки В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов, а также в индуцировании экспрессии рецепторов к ИЛ-2. Ohzato с соавторами при измерении ИЛ-6 у обезьян, подвергшихся трансплантации печени, выявили, что уровень ИЛ-6 в плазме ассоциирован с развитием острого отторжения и предшествует биохимическим показателям (повышению уровня аминотрансфераз) [14]. При этом авторы предположили, что источником ИЛ-6 в плазме явились активированные моноциты. Более того, недавно была выявлена роль ИЛ-6 в индукции Т-хелперов (17). Т-хелперы (17) являются субпопуляцией CD4+Т-лимфоцитов, которые характеризуются продукцией ИЛ-17 и участвуют в патогенезе аутоиммунных заболеваний и отторжения аллографтов [15, 16]. Fabrega с соавторами было показано, что ИЛ-17 стимулирует выработку ИЛ-6 и ФНО- α , связывает врожденное и приобретенное звено иммунного ответа и активирует Т-лимфоциты [17].

Таким образом, мы сформировали гипотезу о том, что ряд цитокинов участвуют в развитии острого отторжения трансплантата печени и могут быть использованы в качестве биомаркеров и предикторов развития данного осложнения.

Цель исследования

Оценить ассоциацию между периоперационным уровнем ИЛ-2, 6, 8, 17, 23, ФНО- α и МВБ-1 α в периферической крови и печеночных венах и развитием раннего острого отторжения трансплантата печени.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели было организовано проспективное случай-контроль исследование, включающее 52 последовательных пациента, перенесших ортотопическую трансплантацию печени от донора со смертью мозга на базе учреждения здравоохранения «9-я городская клиническая больница» в период с января 2013 по январь 2014 года. Критерии включения: возраст старше 18 и младше 65 лет, первичная трансплантация печени, согласие пациента на участие. Критерии исключения: возраст младше 18 и старше 65 лет, ретрансплантация печени, трансплантация печени от живого родственного донора, первично нефункционирующий трансплантат, несогласие пациента на участие в исследовании. Показанием для проведения трансплантации печени явились: вирусный С цирроз печени – в 23, первичный билиарный цирроз – в 13, криптогенный цирроз печени – в 5 и другие в 11 случаях. Интегральный показатель MELD (Model for End-stage Liver Disease) составил 17 (13;21), возраст пациентов 48 (38;56) лет.

Всем пациентам проспективно выполнялся забор проб из печеночных вен через один час после реперфузии (проба № 1), а также из периферической крови через 24 часа (проба №2) и через 72 часа (проба №3) после реперфузии трансплантата печени, в которых определяли уровни ИЛ-2, 6, 8, 17, 23, ФНО- α , макрофагального воспалительного белка-1 α (МВБ-1 α) методом мультиплексного иммуноанализа.

Методика мультиплексного иммуноанализа

На первом этапе проводили инкубацию микросфер с образцом (сыворотка, плазма, супернатант культуры клеток), после чего выполняли отмывку несвязавшихся с микросферами компонентов. На следующем этапе комплекс аналит-микросфера инкубировали с детекторными биотинилированными антителами. На последнем этапе для того, чтобы провести детекцию соответствующих аналитов, в образце проводили считывание сигналов флуоресцентной метки в анализаторе Luminex. Во время измерения, в проточной камере Luminex, в потоке обжимающей жидкости, каждая микросфера подвергалась облучению двумя лазерами с разной длиной волны, и сигнал, испускаемый флуорофорами, регистрировался фотодетекторами прибора. Интенсивность флуоресценции фикоэритрина пропорциональна концентрации (наличию) искомого аналита. Результаты считывания сигналов выражались в единицах MFI (медиана интенсивности флуоресценции). Для анализа на мультиплексном анализаторе Luminex 200, основанном на техноло-

Оригинальные научные публикации

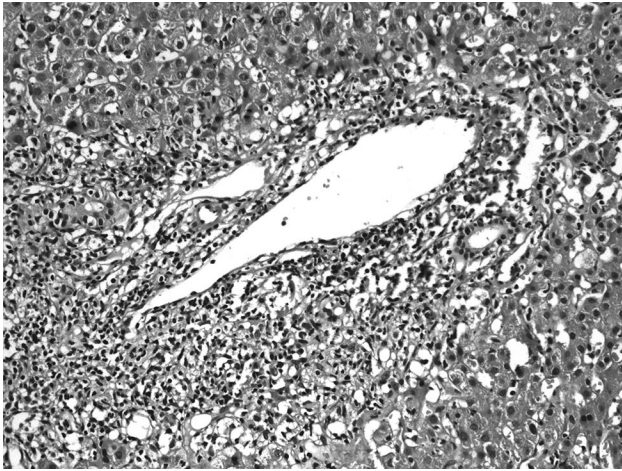


Рисунок 1. Гистологическая картина острого клеточного отторжения трансплантата печени. Полиморфноклеточная инфильтрация портального тракта с разрушением пограничной пластинки. Поражение желчных протоков с лимфоцитарной инфильтрацией. Эндотелиит портальной вены

гии xMAP компании Luminex (США) с использованием магнитных частиц «MilliplexMag», были выбраны панели в составе коммерческих тест-систем MILLIPLEX («Millipore», США).

Аналізу подвергалась взаимосвязь концентрации цитокинов в пробах 1–3 с нормальным течением послеоперационного периода или с развитием острого отторжения. Наличие острого отторжения регистрировали по клиническим данным и гистологической верификации путем выполнения пункционной биопсии (рисунок 1). Все пациенты получали стандартную трехкомпонентную схему иммуносупрессии. Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Средние величины показаны как медиана (25; 75%). Достоверность различий между группами определяли тестами Fisher и Mann-Whitney. Прогностивность маркеров оценивали методом логистической регрессии.

Результаты и обсуждение

Острое клеточное отторжение (ОКО) развилось у 10 (19,2%) пациентов, срок возникновения – на 7 (4;9) сутки после операции. Сравнительная характеристика групп пациентов, перенесших ОКО, и без проиллюстрирована в таблице. Так, острое отторжение трансплантата развивалось у реципиентов более молодого возраста и приводило к увеличению койко-дня на 7 суток. При этом, исследуемые группы пациентов значимо не отличались по таким критериям, как время общей ишемии, возраст донора, показание к трансплантации, стеноз графта.

При анализе уровня провоспалительных цитокинов были выявлены статистически значимые различия в уровне МВБ-1а, определяемого во время выполнения трансплантации (МВБ-1а составил 90,9 пг/мл (45,5;117,6) в группе пациентов с ОКО против 27,4 пг/мл (15,7;36,1) в группе пациентов без ОКО, $p = 0,01$). Методом логистической регрессии было определено, что значение МВБ-1а (определяемого во время ОТП) более 40,7 пг/мл обладает хорошей прогностивностью (с чувствительностью 78% и специфичностью 88%, $AUC = 0,797$,

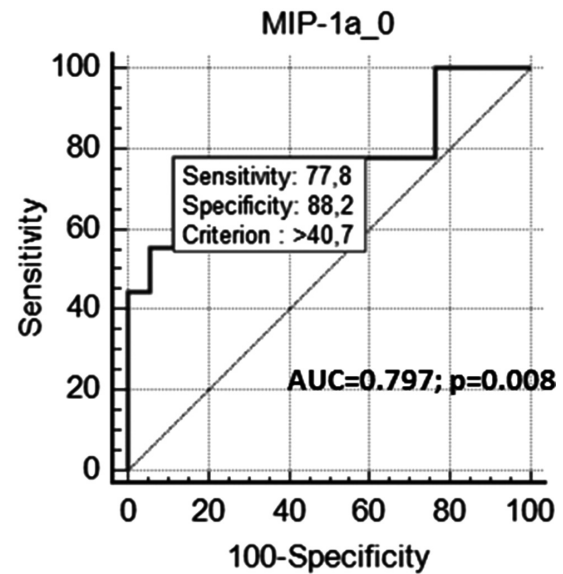


Рисунок 2. Характеристическая кривая МВБ-1а как предиктора развития острого отторжения трансплантата печени (ROC-анализ)

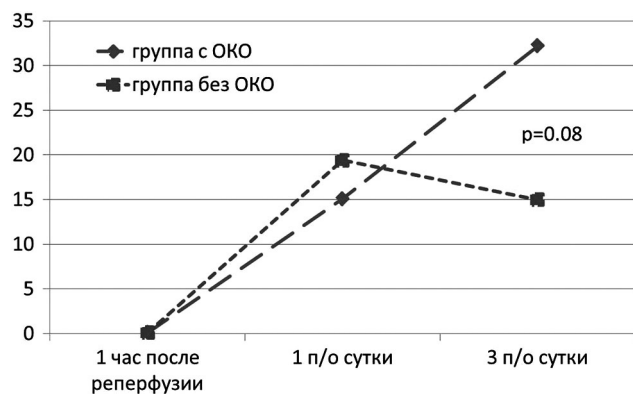


Рисунок 3. Динамика ИЛ-2 в группах с и без острого отторжения трансплантата печени

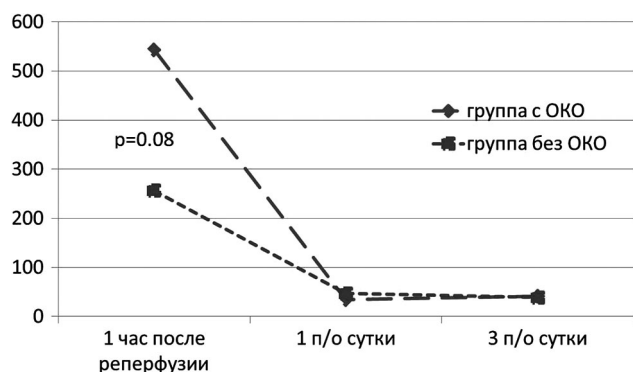


Рисунок 4. Динамика ИЛ-8 в группах с и без острого отторжения трансплантата печени

$p = 0,0087$) в отношении развития острого клеточного отторжения (рисунок 2). Также было выявлено, что динамика МВБ-1а за 1–3 сутки после операции (СПО) статистически значимо ($p = 0,028$) отличается в изучаемых группах: у пациентов, перенесших ОКО отмечается прирост на 11,8 (6,6; 20,1) пг/мл, тогда как при неослож-

Таблица. Сравнительная характеристика групп пациентов с и без острого клеточного отторжения трансплантата печени

Показатель		Группа пациентов перенесших ОКО, n = 10	Группа пациентов без ОКО, n = 42	p
Показания к ОТП	ВГС	3/10 (30%)	20/42 (47,6%)	0,68
	Аутоиммунное заболевание	4/10 (40%)	9/42 (21,4%)	0,24
Общее время ишемии, мин		448 (420;490)	456 (402;525)	0,8
Возраст реципиента, лет		28 (19;33)	52 (48;56)	0,0002
Возраст донора, лет		37 (24;49)	43 (25;56)	0,33
Койко-день		22 (16;27)	15 (13;19)	0,03
Стеатоз, %		6 (0;15)	10 (5;30)	0,1
Частота ранней дисфункции		1/10 (10%)	10/42 (23,8%)	0,66

ненном течении отмечается незначительное снижение (МВБ-1а_{Δ3-1} = -1,1 (-24,9; 4,0). При изучении динамики уровня ИЛ-2 было выявлено, что больший прирост данного показателя за первые 3-е суток после операции отмечается в группе пациентов с ОКО (32(22;56) против 11 (-0,4; 29), p = 0,08) (рисунок 3). Более того, было отмечено, что у пациентов с ОКО имеет место тенденция к повышенному уровню ИЛ-8 (во время выполнения ОТП) (543 пг/мл (198,4; 635,9) в группе пациентов с ОКО против 192,1 пг/мл (69,4; 289,6) в группе пациентов без ОКО, p = 0,07) (рисунок 4). Статистически значимых различий в уровнях ИЛ-6, ИЛ-17, ИЛ-23 и ФНО-α выявлено не было.

Выводы

1. Острое клеточное отторжение трансплантата печени сопровождается характерным изменением уровня ИЛ-2, 8 и МВБ-1а в печеночных венах через 1 час после портальной реперфузии.

2. МВБ-1а, определяемый в момент трансплантации, может быть использован в качестве раннего серологического предиктора развития острого отторжения.

Таким образом, связь ОКО с ранним изменением локальных уровней ИЛ-2, 8 и МВБ-1а в печеночных венах подтверждает их патогенетическую роль в развитии острого отторжения у пациентов, перенесших трансплантацию печени от стандартных доноров и со средним временем общей ишемии до 8 часов.

Литература

1. Руммо, О. О. Семь лет трансплантации печени в Республике Беларусь. Вестник трансплантологии и искусственных органов. Том 17, № 2 (2015): 100-104.
2. Andrea, R. Mueller, Klaus-Peter Platz, Bernd Kremer. Early postoperative complications following liver transplantation. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. 2004. Vol. 18, № 5. P. 881-900.
3. Song, AT et al. Liver transplantation: Fifty years of experience. World J Gastroenterol. 2014 May 14; 20 (18):5363-5374.
4. Shaked, A., Ghobrial R. M., Merion R. M. et al. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. Am. J. Transplant. 2009;9(2):301-308.
5. Millán, O. et al. Should IFN-γ, IL-17 and IL-2 be considered predictive biomarkers of acute rejection in liver and kidney transplant? Results of a multicentric study. Clinical Immunology (2014) 154, 141-154.

6. Mohammad Hossein Karimi et al. Study of the relationships between IL-23R, IL-17, IL-21 polymorphisms and serum level of IL-17, IL-21 with acute graft rejection in Iranian liver transplant recipients. Immunol Invest, 2014; 43(1): 69-85

7. Hayato, Nakagawa et al. Impact of serum levels of IL-6 and adiponectin on all-cause, liver-related, and liver-unrelated mortality in chronic hepatitis C patients. J Gastroenterol. Hepatol. 2015 Feb;30(2):379-88. doi: 10.1111/jgh.12719.

8. Imagawa, D. K., Millis J. M., Olthoff K. M. et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. I. Evidence that elevated levels of tumor necrosis factor-alpha predict rejection following orthotopic liver transplantation. Transplantation. 1990; 50(2):219-225.

9. Hamilton, G., Prettenhofer M., Zommer A. et al. Intraoperative course and prognostic significance of endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in liver transplant recipients. Immunobiology. 1991;182(5):425-439.

10. Imagawa, D. K., Millis J. M., Olthoff K. M. et al. The role of tumor necrosis factor in allograft rejection. II. Evidence that antibody therapy against tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin enhances cardiac allograft survival in rats. Transplantation. 1990; 50(2):189-193.

11. Tong, H., Chen K., Chen H. et al. Emodin prolongs recipient survival time after orthotopic liver transplantation in rats by polarizing the Th1/Th2 paradigm to Th2. Anat Rec (Hoboken). 2011;294(3):445-452.

12. Lai, X., Li J. Z., Lian Z. R. et al. Advantages of promoting interleukin-10 by silence of histone deacetylase 11 in inducing tolerance in orthotopic liver transplantation in rats. Transplant Proc. 2011;43(7):2728-2732.

13. Goralczyk, A. D., Hauke N., Bari N. et al. Interleukin 2 receptor antagonists for liver transplant recipients: a systematic review and metaanalysis of controlled studies. Hepatology. 2011; 54(2):541-554.

14. Ohzato, H., Monden M., Yoshizaki K. et al. Serum interleukin-6 levels as an indicator of acute rejection after liver transplantation in cynomolgous monkeys. Surg Today. 1993; 23(6): 521-527.

15. Xie, X., Ye Y., Zhou L. et al. Kupffer cells promote acute rejection via induction of Th17 differentiation in rat liver allografts. Transplant Proc. 2010;42(9):3784-3792.

16. Yao, Z., Painter S. L., Fanslow W. C. et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. J Immunol. 1995;155(12): 5483-5486.

17. Fabrega, E., Lopez-Hoyos M., San Segundo D. et al. Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. Liver Transpl. 2009;15(6):629-633.

Поступила 2.09.2015 г.