

□ 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
АССОЦИИРОВАННЫ 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]. A 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

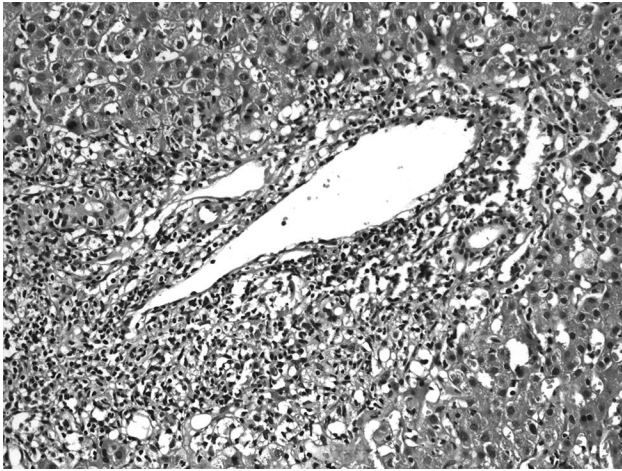


Рисунок 1. Гистологическая картина острого клеточного отторжения трансплантата печени. Полиморфноклеточная инфильтрация портального тракта с разрушением пограничной пластинки. Поражение желчных протоков с лимфоцитарной инфильтрацией. Эндотелиит портальной вены

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. Прогнозность 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, стеатоз 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 прогностичностью (с чувствительностью 78% и специфичностью 88%, $AUC = 0,797$,

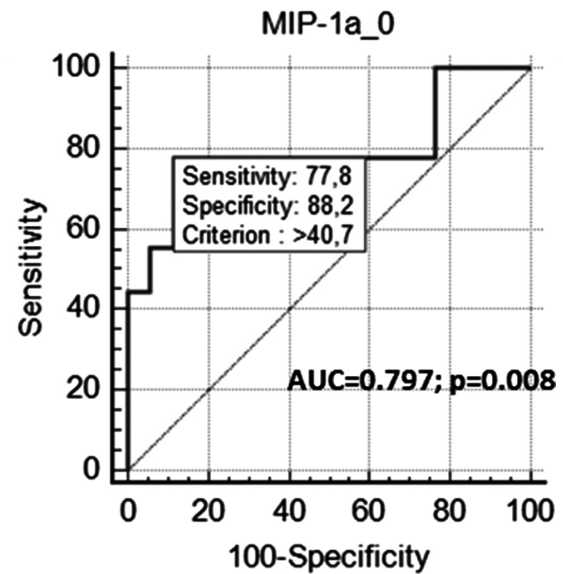


Рисунок 2. Характеристическая кривая МВБ-1а как предиктора развития острого отторжения трансплантата печени (ROC-анализ)

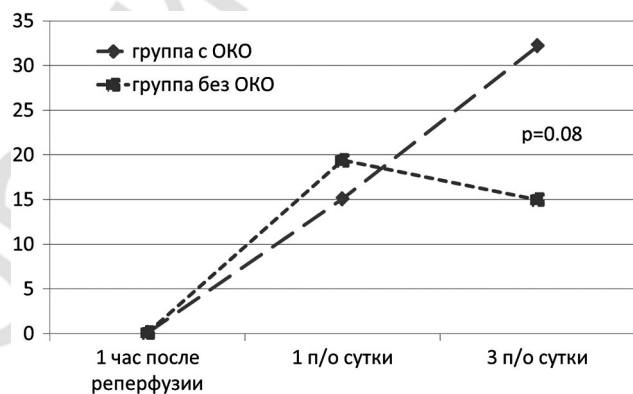


Рисунок 3. Динамика ИЛ-2 в группах с и без острого отторжения трансплантата печени

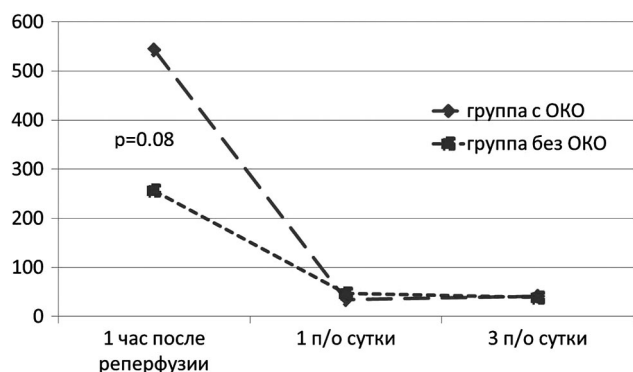


Рисунок 4. Динамика ИЛ-8 в группах с и без острого отторжения трансплантата печени

$p = 0,0087$) 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	ВГ С	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 192,1пг/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.