

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

АССОЦИАЦИЯ УРОВНЯ РАСТВОРИМЫХ ЦИТОКИНОВ С РАЗВИТИЕМ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ

РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе

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

Проведено проспективное обсервационное случай-контроль исследование 52 последовательных орто-топических трансплантаций печени от донора со смертью мозга пациентам от 18 до 65 лет. Период исследования: январь 2013 - январь 2014. Группы были сформированы на основании различных клинических исходов: частота развития ранней дисфункции аллогraftа (РДА), острого отторжения (ОО), билиарных и инфекционных осложнений, а также выживаемость трансплантата. Анализ был построен на выявлении связи между различными цитокинами (интерлейкинами (ИЛ) -2, 6, 8, 17, 23, ФНО- α , МВБ-1 α , сосудисто-эндотелиальный фактор роста (VEGF)) и клиническими исходами. ИЛ-2, 6, 8, 17, 23, ФНО- α , МВБ-1 α , VEGF были измерены в 3 образцах крови методом мультиплексного иммуноанализа (Luminex 200): в печеночных венах спустя 1 час после реперфузии (проба 1), в периферической крови через 24 часа (проба 2) и 72 часа (проба 3) после реперфузии соответственно. Для определения экспрессии CD68+ на операции back table протоколно выполнялась биопсия трансплантата.

Результаты нашего исследования подтверждают концепцию роли повреждения печени в организме донора в развитии воспалительного ответа у реципиента. Также показана взаимосвязь фактора роста сосудистого эндотелия с развитием билиарных осложнений.

Ключевые слова: ассоциация уровня растворимых цитокинов.

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

SOLUBLE CYTOKINE PROFILES AND COMPLICATIONS AFTER LIVER TRANSPLANTATION

A prospective case-controlled study was conducted. 52 consecutive adult full-size DBD LT were enrolled. Study period: January 2013 – January 2014. Interleukin (IL)-2, 6, 8, 17, 23, TNF- α , MIP-1 α , VEGF were measured in 3 blood samples by multiplex immunoassay (Luminex 200): in hepatic veins 1h after reperfusion, in peripheral blood 24h and 72h after reperfusion consequently. Liver biopsy was performed at the back-table for CD68 staining.

Investigated outcomes: early allograft dysfunction (EAD), biopsy-proven acute rejection (BPAR), biliary and infectious complications and graft survival were assessed according to standard criteria.

Our study supports the concept of liver damage in donor as well as the role of angiogenesis in biliary complications and regeneration.

Key words: association of level of soluble tsitokin.

Трансплантация печени (ТП) является стандартом лечения хронических заболеваний печени в терминальной стадии, фульминантной печеночной недостаточности и некоторых опухолевых заболеваний. Успешное развитие данного вида лечения за последние 30 лет является результатом совершенствования хирургической техники, открытия новых иммуносупрессивных препаратов, оптимизации периоперационного ведения пациентов. При этом, госпитальная летальность после трансплантации печени не превышает 4–15%, а доля пациентов проживших после пересадки печени более 5 лет составляет 62–85% [3]. Тем

не менее частота возникновения послеоперационных осложнений составляет от 20 до 70%. В структуре послеоперационных осложнений выделяют (1) хирургические, (2) соматические (в том числе инфекционные) и (3) иммунологические (таблица 1) [4]. Для каждой группы осложнений выделяют определенные факторы риск, при этом, существует необходимость в прогнозировании и диагностике осложнений, а также объективизации оценки иммунного статуса пациента после трансплантации печени на основании критериев, обоснованных фундаментально и удобных в практическом применении. [5–6]

Таблица 1. Виды ранних послеоперационных осложнений, возникающих после трансплантации печени

Группа осложнений	Виды осложнений	Частота встречаемости, %
Хирургические	Сосудистые	8–22
	Билиарные	4–39
	Послеоперационное кровотечение	10–15
	Неспецифические (кишечная непроходимость, нагноение послеоперационной раны)	10–21
Соматические	Ранняя дисфункция трансплантата	8–44
	Первично нефункционирующий трансплантат	1–6
	Инфекционные	15–72
	Острое почечное повреждение	3–24
Иммунологические	Острое отторжение (гуморальное и клеточное)	10–30

В 1944 году Menkin [7] описал вещества, «растворимые пироксины», полученные путем очистки из воспалительных экссудатов, наличие которых было связано с развитием лихорадки. В последующие 30 лет были открыты различные факторы роста, интерфероны, митогенные факторы, и в 1974 году Cohen с соавторами [8] был предложен термин «цитокины».

Цитокины являются иммуномодуляторными молекулами, играющими роль медиаторов воспаления, иммунного ответа и клеточного взаимодействия. Хорошо известно, что цитокины обладают плейотропной активностью и в зависимости от концентрации, микроокружения, времени продукции оказывают парадоксально различные воздействия.

Также было показано, что концентрация растворимых и внутриклеточных цитокинов может являться суррогатным прогностическим маркером развития различных осложнений после трансплантации печени. Так например, концентрация растворимого интерлейкина (ИЛ)-17 и внутриклеточная экспрессия γ -интерферона (γ -ИФН) в CD4(CD8) CD69-лимфоцитах в раннем послеоперационном периоде могут быть использованы в качестве предикторов развития острого клеточного отторжения после трансплантации печени и почек. По результатам многочисленных исследований о роли ИЛ-6 в ишемически-реперфузионном повреждении (ИРП) и регенерации печени были сделаны следующие выводы: а) ИЛ-6 является медиатором острофазного ответа, б) ИЛ-6 усиливает компенсаторную пролиферацию гепатоцитов и оказывает цитопротективный эффект при ИРП и в) данные свойства ИЛ-6 указывают на его возможное использование в качестве терапевтического агента у пациентов, перенесших трансплантацию печени. Было также установлено, что рост концентрации α -фактора некроза опухолей (ФНО- α), ИЛ-6 и ИЛ-8 после реперфузии может быть ассоциирован с развитием легочных осложнений после ТП [1, 2, 9–12].

При изучении вклада факторов роста фибробластов и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) в развитие иммунореактивности было выявлено [2, 13], что последний является важным промежуточным звеном между повреждением печеночной паренхимы, вызванным различными физическими, химическими и биологическими факторами (в том числе во время ишемически-реперфузионного повреждения), и последующей активацией клеточного компонента иммунного ответа после трансплантации печени.

Именно фундаментально обоснованная роль различных цитокинов в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения, иммунологического ответа и регенерации печени является предпосылкой для создания новых подходов к профилактике и лечению осложнений после трансплантации печени. Была сформулирована гипотеза об участии ряда провоспалительных цитокинов и факторов роста в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения, развитии иммунологических и инфекционных осложнений у пациентов после трансплантации печени.

Цель исследования

Оценить взаимосвязь между периоперационным уровнем ИЛ-2, 6, 8, 17, 23, ФНО- α , МВБ-1 α , VEGF в периферической крови и печеночных венах и развитием осложнений после трансплантации 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 февраля 2013

по февраль 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), эластазы, р-селектина и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) методом мультиплексного иммуноанализа.

Таблица 2. Протокол исследования

Биопсия печени во время мультиорганного забора (донорский биоптат)	Образцы крови во время трансплантации печени из печеночных вен 1 час после реперфузии (проба 1)	Образцы крови через 24 и 72 часа после реперфузии (проба 2 и 3)
ИГХ окраска на CD68	p-selectin, IL - 2, 6, 8, 17, 23, TNF- α , MIP-1 α	IL - 2, 6, 8, 17, 23, TNF- α , MIP-1 α , VEGF

Методика мультиплексного иммуноанализа

На первом этапе проводили инкубацию микросфер с образцом (сыворотка, плазма, супернатант культуры клеток), после чего выполняли отмывку несвязавшихся с микросферами компонентов. Для отмывки были использованы два способа в зависимости от типа используемых микросфер. При использовании обычных полистироловых микросфер отмывку выполняли путем фильтрации с использованием специального вакуумного коллектора и фильтрационных 96-луночных плоскодонных планшетов. При использовании магнитных микросфер отмывку проводили путем магнитной сепарации. На следующем этапе комплекс аналитической микросферы инкубировали с детекторными биотинилированными антителами. Несвязавшиеся компоненты снова отмывали, после чего к образовавшемуся сэндвичу добавляли флуоресцентный краситель стрептавидин-фикоэритрин (SA-PE), который связывается с биотиновой меткой на детекторных антителах. 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 сигнала

выражались в единицах MFI (медиана интенсивности флуоресценции). Для анализа на мультиплексном анализаторе Luminex 200, основанном на технологии xMAP компании Luminex (США) с использованием магнитных частиц «Milliplex Mag», были выбраны панели в составе коммерческих тест-систем MILLIPLEX («Millipore», США). В качестве материала исследования использовалась сыворотка крови. Измерения проводили в соответствии с инструкцией производителя. Анализ полученных уровней MFI и построение стандартной кривой проводилось при помощи программы xPonent (рисунок 1).

Аналізу подвергалась взаимосвязь концентрации цитокинов в пробах 1–3 с нормальным или осложненным течением послеоперационного периода. Наличие осложнений после трансплантации печени регистрировали по общепринятым критериям [4, 14, 15]. Все пациенты получали стандартную трехкомпонентную схему иммуносупрессии.



Рис. 1. Методика мультиплексного иммуноанализа Luminex 200

Исследование одобрено локальным этическим комитетом. Средние величины показаны как медиана (25%; 75%). Достоверность различий между группами определяли тестами Fisher и Mann-Whitney.

Результаты и обсуждение

Согласно сформулированной гипотезе исследования с целью определения влияния длительности ИВЛ донора на риск развития РДТ у реципиента был выполнен корреляционный анализ между длительностью ИВЛ донора с одной стороны и уровнями интерлейкинами (ИЛ)-2, 6, 8, 17, 23, ФНО-а, МВБ-1а, сосудисто-эндотелиальный фактор роста

(VEGF) в образцах № 1-3. Была получена статистически значимая зависимость между длительности ИВЛ донора и уровнем ИЛ-6 в печеночных венах трансплантата через 1 час после реперфузии ($r = 0,4$; $p = 0,03$) (рисунок 2). При изучении роли VEGF в патогенезе ишемически-реперфузионного повреждения, острого отторжения и регенерации печеночного трансплантата было выявлено, что у пациентов, перенесших билиарные осложнения, концентрация VEGF в 3-й пробе статистически значимо ниже, чем у пациентов без данного осложнения (рисунок 3). При этом, меньший уровень VEGF в 3-й пробе был ассоциирован с более длительным пребыванием пациента в стационаре (рисунок 4).

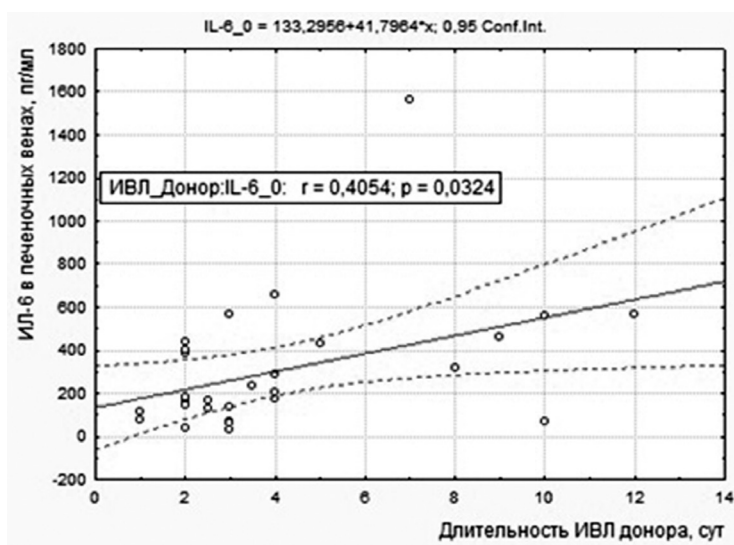


Рис. 2. Корреляция между длительностью ИВЛ донора и уровнем ИЛ-6 в печеночных венах трансплантата через 1 час после реперфузии

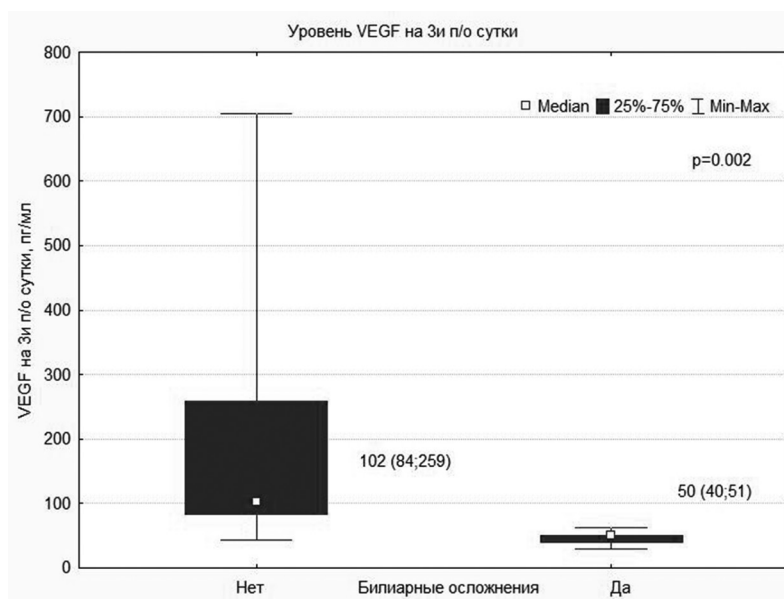


Рис. 3. Уровень VEGF в крови реципиента с и без билиарных осложнений через 72 часа после операции

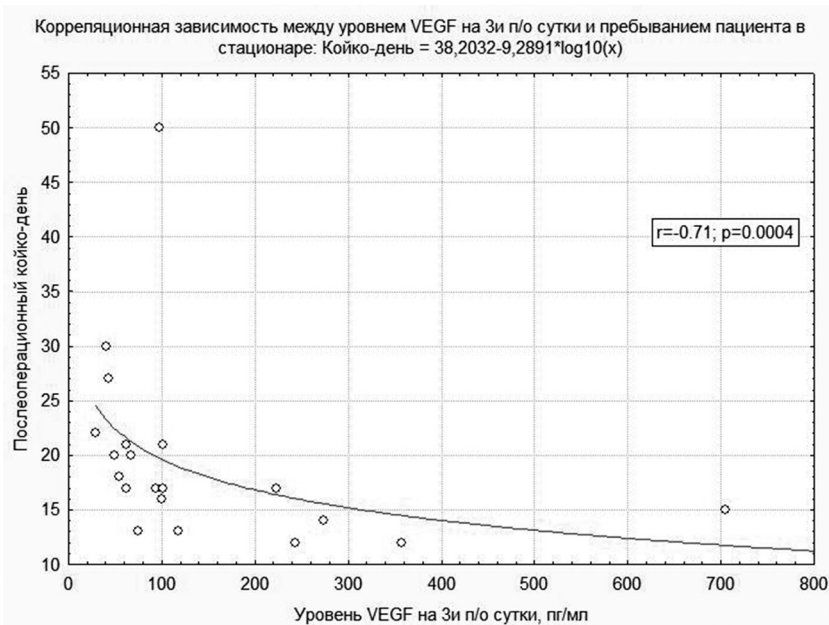


Рис. 4. Корреляция между уровнем VEGF в 3-й пробе и длительностью пребывания пациента в стационаре

Вклад ИЛ-6 как медиатора воспалительного ответа в развитие послеоперационных осложнений у пациентов после ТП был подтвержден следующими фактами: а) у пациентов с раневой инфекцией и с билиарными осложнениями уровень ИЛ-6 в 3-й пробе статистически значимо выше и б) большая концентрация ИЛ-6 через 72 часа после ТП ассоциирована с более длительным пребыванием пациента в стационаре (рисунок 5–6). Также было выявлена корреляционная связь между экспрессией CD68 в печени донора и уровнем ИЛ-23 в 1-й пробе ($\gamma = 0,62, p = 0,03$) и степенью

баллонной дегенерации донорской печени и уровнем ИЛ-2 в 1-й пробе ($\gamma = 0,77, p = 0,02$).

Статистически значимых различий в уровне изучаемых цитокинов по критерию развития ранней дисфункции трансплантата и острого отторжения выявлено не было. Данный факт может быть связан с тем, что у изучаемых пациентов применялась трехкомпонентная схема иммуносупрессии (при этом, частота острого отторжения составила 13,4%), а также не использовались маргинальные графты (частота ранней дисфункции – 18,9%).

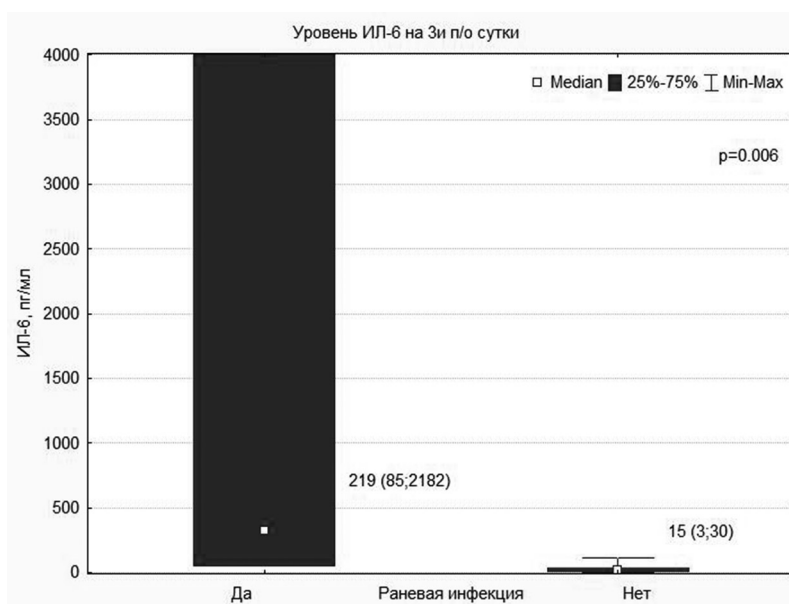


Рис. 5. Уровень ИЛ-6 через 72 часа после реперфузии у пациентов с и без раневой инфекции

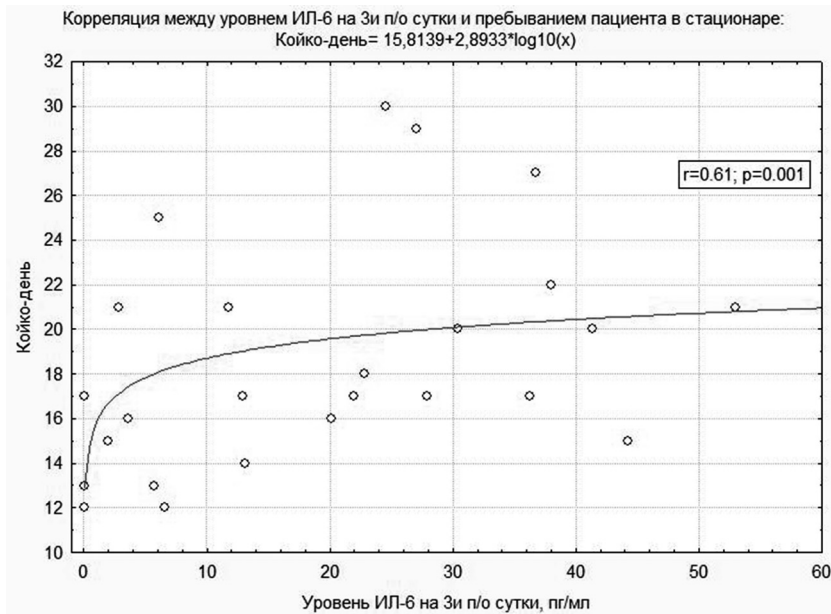


Рис. 6. Корреляция между уровнем ИЛ-6 через 72 часа после реперфузии и длительностью пребывания пациента в стационаре

Выводы

1. Более длительное пребывание донора на ИВЛ способствует более выраженной воспалительной реакции и ишемически-реперфузионному повреждению.

2. Более высокий уровень VEGF способствует благоприятному течению послеоперационного периода после трансплантации печени (меньшая частота билиарных осложнений и более короткий койко-день).

3. Интерлейкин-6 вносит значимый вклад и является интегральным медиатором воспаления в развитии послеоперационных осложнений.

Таким образом, результаты нашего исследования подтверждают концепцию роли повреждения печени в организме донора в развитии воспалительного ответа у реципиента. Также показана взаимосвязь фактора роста сосудистого эндотелия с развитием билиарных осложнений.

Литература

1. 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.
2. Zhou TB, Yang GS. Roles of vascular endothelial growth factor in acute rejection reaction following liver transplantation. *Transpl Immunol*. 2011 Dec;25(4):207–9. doi: 10.1016/j.trim.2011.08.001. Epub 2011 Aug 11.
3. <http://www.unos.org/>
4. Andrea R. Mueller, Klaus-Peter Platz, Bernd Kremer. Early postoperative complications following liver transplan-

tation. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. Vol. 18, N 5, pp. 881–900, 2004.

5. Cameron AM, et al. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg*. 2006;243(6):748e753.

6. Song AT et al. Liver transplantation: Fifty years of experience. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14; 20 (18):5363–5374.

7. Menkin V. Chemical basis of fever. *Science* 1994, 100, 337–338.

8. Cohen S., Bigazzi P. E., Yoshida T., Similarities of T-cell function in cell-mediated immunity and antibody production.

9. 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.

10. 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.

11. Rez`a Saidi, Seyed Kamran Hejazi Kenari. Liver Ischemia/Reperfusion Injury: an Overview. *Journal of Investigative Surgery, Early Online*, 1–14, 2014.

12. Paul J. Chestovich et al. IL-22: Implications for Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation*. 2012 March 15; 93(5): 485–492. doi:10.1097/TP.0b013e3182449136.

13. Zhang C et al. Expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in acute rejection reaction following rat orthotopic liver transplantation. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):483–487.

14. Olthoff KM et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transplantation* 2010; 16:943–949.

15. Saner FH et al. Pulmonary and blood stream infections in adult living donor and cadaveric liver transplant patients. *Transplantation* 2008;85:1564–8.

Поступила 5.11.2015 г.