

## ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РАСТВОРИМОЙ ФОРМЫ ЛИГАНДА CD40 ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПЕЧЕНИ ДЕТЯМ С ВРОЖДЕННЫМИ И НАСЛЕДСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Шевченко О.П.<sup>1</sup>, Цирульникова О.М.<sup>1</sup>, Гичкун О.Е.<sup>1, 2</sup>, Макарова Л.В.<sup>1</sup>, Цирульникова И.Е.<sup>1</sup>, Ахаладзе Д.Г.<sup>1</sup>, Шмерко Н.П.<sup>1</sup>, Готье С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития России, г. Москва

<sup>2</sup> ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования», кафедра клинической лабораторной диагностики, г. Москва

В исследование включено 67 детей с циррозом печени в исходе врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы в возрасте от 4 до 36 месяцев, 25 здоровых детей в возрасте от 7 до 24 месяцев и 38 доноров фрагмента печени в возрасте от 18 до 56 лет. Уровень sCD40L до трансплантации ( $3,3 \pm 2,2$  нг/мл) не отличался от такового у здоровых детей того же возраста, но был выше, чем у взрослых – родственных доноров печени ( $4,1 \pm 2,3$  нг/мл и  $1,07 \pm 1,1$  нг/мл соответственно,  $p < 0,01$ ). У реципиентов с исходно высоким ( $\geq 3,3$  нг/мл) уровнем sCD40L риск развития дисфункции трансплантата выше ( $RR = 2,1$ ,  $p < 0,0029$ ), чем в группе без таковой. Уровень sCD40L, определяемый на этапе дотрансплантационного обследования, имеет прогностическое значение в качестве предиктора развития дисфункции пересаженной печени.

*Ключевые слова:* растворимая форма лиганда CD40, трансплантация печени.

## PROGNOSTIC VALUE OF SOLUBLE CD40 LIGAND AFTER LIVER TRANSPLANTATION IN CHILDREN WITH CONGENITAL AND HEREDITARY DISEASES OF HEPATOBILIARY SYSTEM

Shevchenko O.P.<sup>1</sup>, Tsiurulnikova O.M.<sup>1</sup>, Gichkun O.E.<sup>1, 2</sup>, Makarova L.V.<sup>1</sup>, Tsiurulnikova I.E.<sup>1</sup>, Akhaladze D.G.<sup>1</sup>, Shmerko N.P.<sup>1</sup>, Gautier S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

<sup>2</sup> Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

The aim of the study was to evaluate plasma levels of sCD40L in children before and after living donor liver transplantation (LDLT) and its prognostic value with postoperative course. The study included 67 children with end-stage liver disease (ESLD), aged from 4 to 36 months before and after LDLT, 25 healthy children aged from 7 to 24 months and 38 adult living-related liver donors, aged from 18 to 56 years.

In children with ESLD pre-transplant plasma level of sCD40L ( $3.3 \pm 2.2$  ng/ml) did not differ in children with and without liver disease but were significantly higher in patients with end-stage liver disease than in donors ( $4.1 \pm 2.3$  ng/ml and  $1.07 \pm 1.1$  ng/ml, resp.,  $p < 0.01$ ).

Graft dysfunction frequency was significantly higher in recipients with high sCD40L level ( $\geq 3.3$  ng/ml). A measurement of pre-transplant sCD40L concentrations might be useful to identify patients with ESLD at high risk for graft dysfunction development.

*Key words:* soluble CD40 ligand, pediatric liver transplantation.

Статья поступила в редакцию 05.04.12 г.

**Контакты:** Гичкун Ольга Евгеньевна – врач диагностической лаборатории.

Тел. 8 926 182 62 30, e-mail: GichkunOE@gmail.com

Трансплантация печени – эффективный метод лечения, позволяющий получать хорошие клинические результаты у пациентов с тяжелой печеночной недостаточностью в терминальной стадии. В России программа родственной трансплантации печени детям успешно выполняется с 1997 года [1]. Развитие клинической трансплантологии делает актуальными задачи, связанные с прогнозированием и наблюдением за течением послеоперационного периода, желательным с использованием неинвазивных методов. В последние годы к числу изучаемых биохимических и иммунологических маркеров, позволяющих осуществлять мониторинг посттрансплантационного периода у реципиентов солидных органов, относят маркеры активации клеток иммунной системы [3, 4].

Ко-стимулирующая сигнальная система CD40-CD40L играет важную роль в механизмах иммунной регуляции, в частности активации Т-лимфоцитов, антигенпрезентирующих и эндотелиальных клеток [2, 3, 10, 14]. Лиганд CD40 (CD40L) является трансмембранным гликопротеидом семейства факторов некроза опухолей. Описана активация гена CD40L и экспрессия белка при хроническом отторжении почки и остром отторжении сердечного трансплантата [5, 6]; экспрессия CD40L в нормальной ткани и стабильных трансплантатах печени практически не выявляется. При хроническом отторжении трансплантата печени CD40L обнаруживается на поверхности купферовских клеток и макрофагов [7, 8, 12]. Основным источником циркулирующей в крови растворимой формы CD40L (sCD40L) – активированные Т-лимфоциты и тромбоциты [13].

Целью настоящей работы явился анализ содержания и динамики sCD40L в плазме крови детей, страдающих врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы до и после трансплантации печени и возможности использования этого биомаркера для прогнозирования и наблюдения за течением посттрансплантационного периода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 67 детей в возрасте от 4 до 36 ( $14 \pm 6$ ) месяцев в терминальной стадии печеночной недостаточности в исходе врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы, 32 мальчика и 35 девочек. Обследовано также 38 взрослых родственных доноров фрагмента печени, из них 22 мужчины и 16 женщин в возрасте от 18 до 56 ( $37 \pm 19$ ) лет. Группу сравнения составили 25 детей без патологии печени, в возрасте от 7 до 24 ( $14 \pm 7$ ) месяцев, проходивших плановое диспансерное обследование после лечения по поводу перенесенного дисбактериоза кишечника.

Основными заболеваниями, приведшими к циррозу печени, были атрезия желчевыводящих путей – у 42 детей, болезнь Байлера – у 8, синдром Алажилия – у 11 детей, синдром Кароли – у 6 пациентов. Всем пациентам была выполнена ортотопическая трансплантация левого латерального сектора печени от живого родственного донора. Все пациенты получали 2–3-компонентную иммуносупрессивную терапию, включающую такролимус или циклоспорин А.

В качестве материала для исследования использована плазма крови, которую получали до трансплантации, на 5–7, 12–15 и 24–34-е сутки после операции.

Плановое обследование включало общий и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, определение активности ферментов печени, анализ коагулограммы, измерение концентрации такролимуса и циклоспорина, вирусологическое (в лаборатории трансплантационной иммунологии, заведующий – к. м. н. В.Ю. Абрамов) и бактериологическое (в бактериологической лаборатории, заведующая – д. м. н. Н.И. Габриэлян) исследования. Всем пациентам выполняли УЗИ органов брюшной полости. Помимо рутинных биохимических исследований в плазме крови пациентов с помощью иммуноферментного метода измеряли концентрацию sCD40L, sCD30, sFas и sFasL (BenderMedSystems, Австрия), неоптерина (IBL, Германия). Анализ концентрации С-реактивного белка проводили методом иммунотурбидиметрии (Diasys, Германия).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием пакета прикладных программ для научно-технических расчетов SPSS 15.0 (LEAD Technologies Inc., США). Достоверность различий количественных параметров в двух группах определялась по t-критерию Стьюдента (для признаков с нормальным распределением) и по U-критерию Манна–Уитни (непараметрические данные). Для оценки связи количественных и качественных признаков рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия, при которых вероятность ошибки составляла менее 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У детей, страдающих циррозом печени вследствие врожденных и наследственных заболеваний гепатобилиарной системы, уровень sCD40L составил  $3,3 \pm 2,2$  нг/мл и не отличался от такового у детей без патологии печени ( $4,1 \pm 2,3$  нг/мл). У здоровых взрослых – родственных доноров печени уровень sCD40L был достоверно ниже, чем у детей с печеночной недостаточностью и здоровых детей того же возраста (рис. 1). Вероятно, обнаруженный

факт является признаком возрастных различий в уровнях этого биомаркера.

Содержание sCD40L, определяемое в крови детей на этапе дотрансплантационного обследования, не зависело от возраста пациентов в исследуемом диапазоне (от 4 до 36 месяцев,  $r = 0,015$ ,  $p > 0,05$ ) и не различалось у мальчиков и девочек ( $3,6 \pm 2,3$  и  $3,4 \pm 2,1$  нг/мл соответственно,  $p > 0,05$ ). Не было выявлено связи концентрации sCD40L с биохимическими лабораторными параметрами – уровнем билирубина ( $r = 0,13$ ,  $p > 0,05$ ), альбумина ( $r = -0,23$ ,  $p > 0,05$ ), общего белка ( $r = 0,15$ ,  $p > 0,05$ ) и креатинина ( $r = 0,18$ ,  $p > 0,05$ ), активностью ферментов печени (аланинаминотрансферазы,  $r = 0,43$ ,  $p > 0,05$ ; аспаргатаминотрансферазы,  $r = 0,28$ ,  $p > 0,05$ ;  $\gamma$ -глутамилтрансферазы,  $r = 0,37$ ,  $p > 0,05$ ; щелочной фосфатазы,  $r = 0,11$ ,  $p > 0,05$ ). При расчете коэффициентов корреляции была выявлена достоверная связь между уровнем sCD40L и количеством

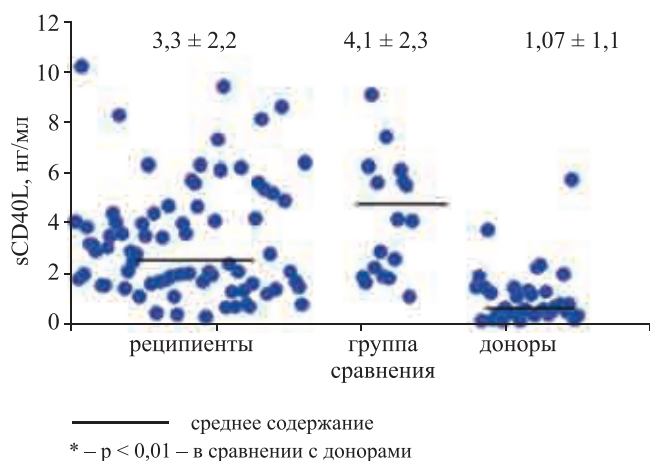


Рис. 1. Уровень sCD40L до трансплантации у детей, страдающих врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы, группы сравнения и родственных доноров печени

лимфоцитов ( $r = -0,54$ ,  $p < 0,05$ ), уровнем sCD40L и концентрацией фибриногена в плазме крови ( $r = -0,39$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Не выявлено связи содержания sCD40L с уровнями других биомаркеров: активации клеток иммунной системы – sCD30 ( $r = 0,04$ ,  $p > 0,05$ ), неоптерина ( $r = -0,1$ ,  $p > 0,05$ ), воспаления (С-реактивного белка,  $r = -0,07$ ,  $p > 0,05$ ), апоптоза – sFas ( $r = -0,15$ ,  $p > 0,05$ ) и sFasL ( $r = 0,18$ ,  $p > 0,05$ ).

После родственной трансплантации фрагмента печени уровень sCD40L в плазме крови реципиентов был  $3,9 \pm 1,7$  нг/мл на 5–7-е сутки,  $5,8 \pm 0,86$  нг/мл – на 10–14-е сутки и к 24–34-м суткам после операции составил  $4,2 \pm 3,1$  нг/мл. Достоверными различия были только в конце 2-й недели после трансплантации. У доноров в течение первого месяца после резекции доли печени содержание sCD40L изменялось незначительно (рис. 3).

У 17 реципиентов на 24–34-е сутки после трансплантации была диагностирована дисфункция трансплантата, биохимическими признаками которой были резкое значительное повышение активности ферментов печени и концентрации билирубина и которая была купирована после коррекции иммуносупрессивной терапии.

В группе пациентов, у которых развилась дисфункция трансплантата, исходный уровень sCD40L, определяемый на этапе дооперационного обследования, был достоверно выше такового у пациентов без дисфункции. При динамическом наблюдении в посттрансплантационном периоде установлено, что средний уровень sCD40L у пациентов с развившейся дисфункцией на 5–7-е сутки после трансплантации был также достоверно выше, чем в группе без таковой ( $4,9 \pm 2,3$  нг/мл и  $3,4 \pm 1,1$  нг/мл,  $p < 0,05$ ). Достоверных различий уровня sCD40L между группами на 10–14-е сутки и к концу первого месяца после трансплантации выявлено не было (рис. 4).

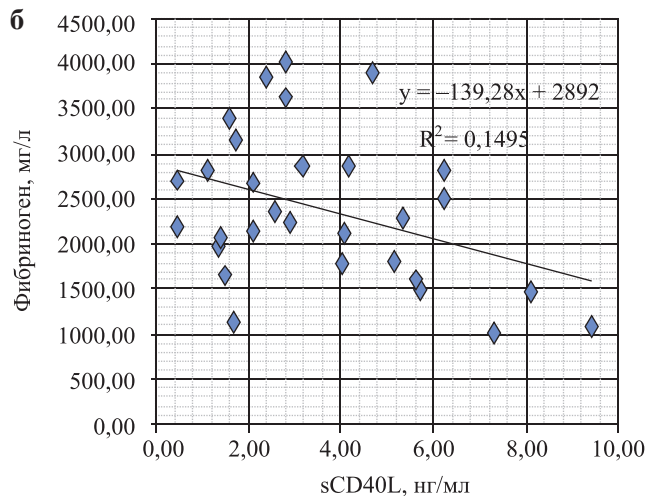
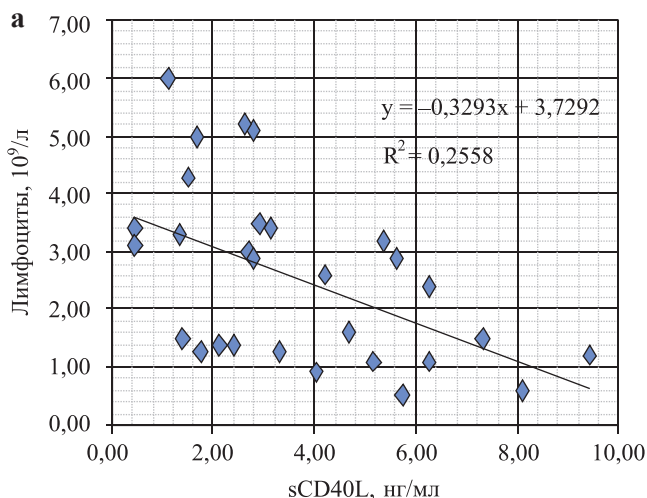


Рис. 2. Зависимость между уровнем sCD40L в плазме крови детей с врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы и количеством лимфоцитов (А), концентрацией фибриногена (Б)

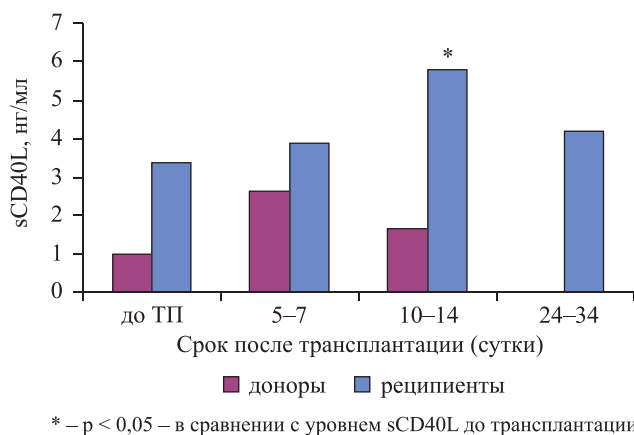


Рис. 3. Динамика уровня sCD40L в плазме крови реципиентов после трансплантации и доноров после резекции печени

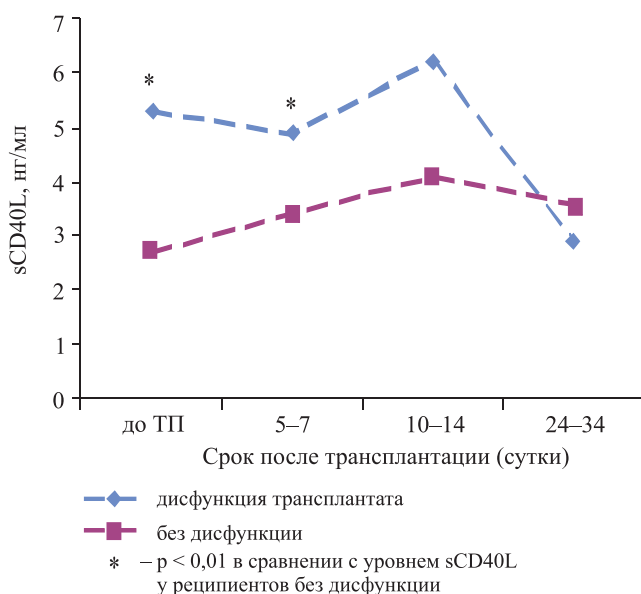


Рис. 4. Динамика уровня sCD40L в плазме крови детей с различным течением посттрансплантационного периода

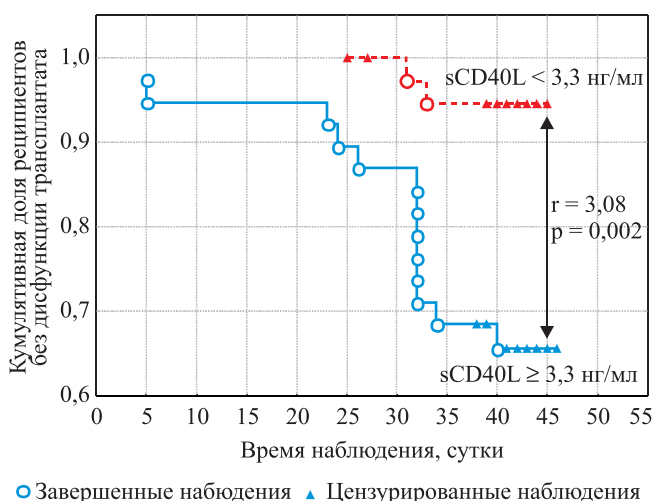


Рис. 5. Сравнение выживаемости без нежелательных событий (дисфункция трансплантата) у реципиентов с различным исходным уровнем sCD40L

Для оценки связи уровня sCD40L, определяемого на этапе дотрансплантационного обследования, с прогнозом развития дисфункции трансплантата мы отобрали реципиентов с уровнем маркера до трансплантации выше и ниже медианы распределения – 3,3 нг/мл.

Анализ показал, что из 38 пациентов с исходно высоким (≥3,3 нг/мл) уровнем sCD40L дисфункция трансплантата развилась у 13 пациентов (40,6%). Среди 39 пациентов с исходно низким уровнем sCD40L только у двоих (5,1%) имела место дисфункция трансплантата в указанные сроки наблюдения. Сравнительный анализ выживаемости без нежелательных событий с использованием метода Каплана – Майера показал достоверные различия в группах пациентов с исходным уровнем sCD40L выше и ниже медианы распределения (r = 3,08, p = 0,002) (рис. 5).

Проведенный анализ показал, что исходно высокий уровень sCD40L, определяемый на этапе дотрансплантационного обследования, имеет прогностическое значение в качестве предиктора развития дисфункции пересаженной печени.

Относительный риск развития дисфункции трансплантата у реципиентов печени с исходно высоким уровнем sCD40L, определяемым до трансплантации, признан статистически достоверным и составил 2,11; 95% доверительный интервал попал в пределы 1,47–3,03, p = 0,0029.

Результаты настоящего исследования позволяют сделать следующее заключение.

У детей с врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы содержание sCD40 в плазме крови выше, чем у здоровых взрослых, что, по-видимому, может быть отражением возрастных различий.

Исходно высокий (≥3,3 нг/мл) уровень sCD40L, выявляемый на этапе дооперационного обследования, имеет прогностическое значение в отношении развития дисфункции трансплантата у детей после родственной трансплантации фрагмента печени.

Измерение концентрации sCD40L на этапе дооперационного обследования может быть полезно для прогнозирования течения посттрансплантационного периода.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В., Константинов Б.А., Цирульникова О.М. Трансплантация печени // М.: Медицинское информационное агентство. 2008. 296 с.
2. Шевченко О.П., Орлова О.В., Казаков Э.Н. и др. Клиническое значение растворимого лиганда CD40 у реципиентов сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. № 1. С. 40–45.
3. Шевченко О.П., Орлова О.В., Халилулин Т.А. Иммуносупрессия, иммунная толерантность и костимуля-

- ция Т-лимфоцитов // Иммуносупрессия при трансплантации солидных органов; под ред. С.В. Готье. М.–Тверь: Триада. 2011. С. 423–470.
4. Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Олефиренко Г.А. и др. Уровень sCD30 при трансплантации печени у детей с врожденными и наследственными заболеваниями печени и желчевыводящих путей // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2011. № 4. С. 37–43.
  5. Contin C., Pitako V., Delmes Y. et al. Potential role of sCD40L in the humoral immune response impairment of uraemic patients // Immunology. 2003. Vol. 110 (1). P. 131–140.
  6. Antoniadou C., Bakogiannis C., Tousoulis D. et al. The CD40/CD40L system linking inflammation with atherothrombosis // J. Am. Coll. Cardiol. 2009. Vol. 54 (8). P. 669–677.
  7. Gaweco A.S., Wiesner R.H., Yong S. et al. CD40L (CD154) expression in Human liver allograft during chronic ductopenic rejection // Liver transplantation and surgery. 1999. Vol. 5. № 1. P. 1–7.
  8. Gaweco A.S., Wiesner R.H., Yong S. et al. Kupffer Cell expression of CD40L (CD154) in Human Chronic Liver Allograft Rejection // Transplantation proceedings. 1999. Vol. 31. P. 560–561.
  9. Jung D.Y., Kim E.Y., Joo S.Y. et al. Prolonged survival of islet allografts in mice treated with rosmarinic acid and antiCD154 antibody/Exp Mol Med. 2008. Vol. 40. P. 1.
  10. Larsen C.P., Alexander D.Z., Hollenbaugh D. et al. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway // Transplantation. 1996. Vol. 61. P. 4–9.
  11. Muiesan P., Vergani D., Mieli-Vergani G. Liver transplantation in children // J. Hepatol. 2007. Vol. 2. P. 340–348.
  12. Oertelt S., Invernizzi P., Selmi C. et al. Soluble CD40L in plasma of patients with primary biliary cirrhosis // Ann NY Acad Sci. 2005. Vol. 1051. P. 205–210.
  13. Van Kooten C., Banchereau J. CD40-CD40 ligand // J. of Leukocyte biology. – 2000. Vol. 67. P. 2–17.
  14. Xiuda Shen, Yue Wang, Feng Gao, Feng Ren. CD4 T Cells Promote Tissue Inflammation via CD40 Signaling Without De Novo Activation in a Murine Model of Liver Ischemia/Reperfusion Injury // Hepatology. 2009. P. 1537–1546.