

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-4-71-76

## ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА PDGF-BB И ST2 ПРИ ОТПОРЖЕНИИ ТРАНСПЛАНТИРОВАННОГО СЕРДЦА

О.П. Шевченко<sup>1, 2</sup>, А.А. Улыбышева<sup>1, 3</sup>, А.В. Аксенова<sup>1</sup>, Н.П. Можейко<sup>1</sup>,  
Е.А. Стаханова<sup>1</sup>, В.В. Донцов<sup>2</sup>, Е.А. Никитина<sup>1</sup>, А.О. Шевченко<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Цель:** определить связь концентрации биомаркеров sCD40L, PDGF-BB, PIGF-1, ST2 в плазме крови реципиентов сердца с наличием и выраженностью гистохимических и иммуногистохимических признаков отторжения сердечного трансплантата. **Материалы и методы.** В исследование включены 98 пациентов с трансплантированным сердцем в возрасте от 12 до 69 ( $43 \pm 14$ ) лет, из них 78 мужчин. У 68 реципиентов до трансплантации сердца была диагностирована дилатационная кардиомиопатия, у 30 – ишемическая болезнь сердца. Концентрацию плацентарного фактора роста (PIGF-1), фактора роста тромбоцитов (PDGF-BB), растворимой формы лиганда CD40 (sCD40L) измеряли с использованием мультиплексной технологии; концентрацию стимулирующего фактора роста ST2 – с помощью иммуноферментного анализа. **Результаты.** Концентрация каждого биомаркера не зависела от пола, возраста и диагноза до трансплантации. У 37 пациентов (по результатам 49 биопсий) были диагностированы признаки отторжения. Гистохимические признаки острого клеточного отторжения – у 30 реципиентов (в 41 биоптате): 1А – у 25 пациентов (в 34 биоптатах), 1В – у двух пациентов (в трех биоптатах), 3А – у четырех пациентов. Иммуногистохимические признаки антителоопосредованного отторжения выявлены у трех пациентов. Сочетание острого клеточного и гуморального отторжения обнаружено у четырех пациентов (в пяти биоптатах). Концентрация PDGF-BB, измеренная в день эндомиокардиальной биопсии, была достоверно выше у пациентов с отторжением ( $p = 0,02$ ). У реципиентов сердца с уровнем PDGF-BB выше медианы (2473,7 пг/мл) риск отторжения был в 1,64 раза выше, чем у пациентов с уровнем ниже медианы. У реципиентов с концентрацией и ST2, и PDGF-BB, превышающей значения медианы, относительный риск отторжения возрастал до  $2,11 \pm 0,34$  [95% ДИ 1,08–4,11]. Наибольшей диагностической значимостью в отношении отторжения трансплантата обладала панель из трех биомаркеров (sCD40L, PIGF-1, ST2):  $RR = 2,51 \pm 0,38$  [95% ДИ 1,18–5,3]. **Заключение.** PDGF-BB обладает умеренной прогностической значимостью в отношении отторжения трансплантированного сердца. Наибольшей диагностической значимостью обладает панель из трех биомаркеров: sCD40L, PIGF-1, ST2.

**Ключевые слова:** трансплантация сердца, отторжение, биомаркеры, мультиплексный анализ, sCD40L, PDGF-BB, PIGF-1, ST2.

**Для корреспонденции:** Улыбышева Адэля Анверовна. Адрес: 123182, Москва, ул. Щукинская, д. 1. Тел. (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru.

**For correspondence:** Ulybysheva Adelya Anverovna. Address: 1, Shchukinskaya st., Moscow, 123182, Russian Federation. Tel. (499) 190-38-77. E-mail: transplant2009@mail.ru

# THE DIAGNOSTIC VALUE OF PLATELET-DERIVED FACTOR PDGF-BB AND ST2 IN HEART REJECTION

O.P. Shevchenko<sup>1, 2</sup>, A.A. Ulybysheva<sup>1, 3</sup>, A.V. Aksonova<sup>1</sup>, N.P. Mozhejko<sup>1</sup>,  
E.A. Stakhanova<sup>1</sup>, V.V. Dontsov<sup>2</sup>, E.A. Nikitina<sup>1</sup>, A.O. Shevchenko<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

**Aim:** to determine the association between plasma concentrations of biomarkers (sCD40L, PDGF-BB, PIGF-1, ST2) with histochemical and immunohistochemical signs of heart rejection. **Materials and methods.** The study included 98 heart recipients aged from 12 to 69 (mean age  $43 \pm 14$ ) years, of which 78 men. In 68 patients dilated cardiomyopathy was diagnosed, 30 recipients were diagnosed with coronary heart disease. The concentrations of placental growth factor (PIGF-1), platelet-derived growth factor (PDGF-BB), soluble CD40 ligand (sCD40L) were measured using xMAP technology. The concentrations of ST2 cardiac biomarker were measured by ELISA. **Results.** No correlation was found between the levels of biomarkers (sCD40L, PDGF-BB, PIGF-1, ST2) and gender, age and diagnosis. The rejection was diagnosed via biopsy in 49 biopsies taken from 37 recipients. 1A rejection was found in 25 patients (34 biopsies), 1B rejection was identified in 2 patients (3 biopsies), 3A rejection was diagnosed in 4 patients. Immunohistochemical signs of humoral rejection were identified in 3 patients. The combination of acute cellular and humoral rejection was found in 4 patients (5 biopsies). The PDGF-BB level was measured at the same day as the biopsy was taken, and it was shown to be significantly higher in patients with rejection ( $p = 0.02$ ). Rejection frequency was significantly higher in patients with high PDGF-BB level ( $\geq 2473.7$  pg/ml, RR =  $1.64 \pm 0.23$ ; 95% CI [1.03–2.61]). Rejection frequency increased to  $2.11 \pm 0.34$  [95% CI [1.08–4.11]] in recipients with ST2 and PDGF-BB concentration higher than the median value. The highest predictive value for heart rejection can be reached by a panel of three biomarkers: sCD40L, PIGF-1 and ST2 (RR =  $2.51 \pm 0.38$ ; 95% CI [1.18–5.3]). **Conclusion.** PDGF-BB has moderate predictive value for heart rejection. The highest predictive value for heart rejection was reached by a panel of three biomarkers: sCD40L, PIGF-1 and ST2.

*Key words:* heart transplantation, rejection, biomarkers, multiplex analysis, sCD40L, PDGF-BB, PIGF-1, ST2.

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы достигнут ощутимый прогресс в лечении пациентов с трансплантированным сердцем: улучшение качества жизни и увеличение ее продолжительности. Среди осложнений, особенно в ранние сроки после трансплантации, важное место занимает острое клеточное и гуморальное (антителоопосредованное) отторжение. Основным методом верификации отторжения трансплантированного сердца является исследование миокарда трансплантата, полученного при эндомикардиальной биопсии (ЭМБ), с помощью гистохимических и иммуногистохимических методов [1, 2]. Однако этот метод является инвазивным, кроме того, он не позволяет прогнозировать и выявлять отторжение на доклинической стадии. Исследования по поиску путей выявления отторжения на основе неинвазивных технологий, в том числе с помощью определения в крови концентрации специфических молекул (биомаркеров), патогенетически связанных с его развитием, являются перспективными для дальнейшего изучения [3, 4]. Предполагают, что отторжение даже небольшой степени тяжести по результатам

ЭМБ, развивающееся в раннем посттрансплантационном периоде, может быть связано с более высоким риском нежелательных событий в отдаленные сроки после трансплантации и снижением выживаемости реципиентов сердца [5].

Показано участие ряда биомаркеров в развитии сердечно-сосудистых осложнений у больных сердечной недостаточностью и у пациентов с трансплантированным сердцем, а также возможность использования оценки концентрации биомаркеров для прогнозирования и диагностики отторжения сердечного трансплантата [6–8]. К предполагаемым кандидатам на роль неинвазивных индикаторов риска отторжения трансплантата относят биомаркеры воспаления, активации эндотелия (плацентарный фактор роста PIGF, фактор роста эндотелия сосудов VEGF-A), костимуляции Т-лимфоцитов (sCD40L), тромбоцитарный фактор роста (PDGF-BB) и др., а также комплексные тесты, основанные на сочетании нескольких биомаркеров (мультимаркерный анализ) [9–11].

Однако данные о связи концентрации биомаркеров в крови реципиента сердца с наличием и тяжестью отторжения противоречивы и получены на

небольшом числе наблюдений; их результаты различаются у разных исследователей.

В настоящей работе произведено определение связи концентрации биомаркеров костимуляции Т-лимфоцитов (sCD40L), тромбоцитарного фактора роста (PDGF-BB), плацентарного фактора роста (PlGF-1), стимулирующего фактора роста (ST2) в плазме крови реципиентов сердца с развитием гистохимических и иммуногистохимических признаков отторжения сердечного трансплантата и возможной диагностической значимости указанных биомаркеров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 98 пациентов, которым в период с 2010-го по 2016 год в Федеральном научном центре трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова была выполнена трансплантация сердца (ТС). Возраст реципиентов – от 12 до 69 ( $43 \pm 14$ ) лет, из них 78 (79,6%) мужчин и 20 (20,4%) женщин. У 68 реципиентов до ТС была диагностирована дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 30 – ишемическая болезнь сердца (ИБС). Длительность наблюдения реципиентов после ТС составила от 7 до 1559 суток, медиана 20 [8; 313] суток.

Все реципиенты проходили плановое обследование, включающее анализ жалоб и анамнеза заболевания, клинический осмотр, термометрию, лабораторные и инструментальные методы исследования. Неинвазивные методы диагностики включали электрокардиографию в 12 отведениях, эхокардиографию, нагрузочную пробу, ультразвуковую доплерографию сосудов. Пациентам ежегодно или по показаниям проводилось коронароангиографическое исследование.

Выполнение ЭМБ проводилось на 5–7-е сутки, затем на 17–20-е сутки после ТС, в последующем при плановом обследовании или по показаниям. Верификацию острого клеточного и антителоопосредованного отторжения производили на основании гистохимического, иммуногистохимического исследования образцов эндомикардиальных биоптатов. Все пациенты получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию, включающую комбинацию ингибиторов кальциневрина (такролимус) и цитостатиков (микофенолата мофетил или микофеноловая кислота), а также варьирующие дозы преднизолона перорально, в зависимости от сроков после операции и частоты эпизодов отторжения трансплантата.

Материалом для исследования концентрации биомаркеров служила плазма венозной крови пациентов, взятой натощак в день выполнения ЭМБ; всего исследовано 125 образцов (1–4 от каждого па-

циента, в среднем  $1,3 \pm 0,2$ ). Концентрацию PlGF-1, PDGF-BB, sCD40L измеряли с использованием мультиплексной технологии с помощью сформированной для цели настоящего исследования панели биомаркеров (набор реагентов Simplex ProcartaPlex™, Affymetrix, США). В мультиплексной технологии объединены принципы проточной флуориметрии с применением флуоресцентно окрашенных магнитных микросфер, нагруженных специфическими антителами, и твердофазного иммуноферментного анализа [12–14]. Детекция результатов проводилась на проточном флуоресцентном анализаторе Luminex (Luminex Corporation, США). Концентрацию ST2 измеряли с помощью иммуноферментного анализа Presage ST2 (Critical Diagnostics, Сан-Диего, США).

Анализ и обработка данных производились с помощью пакета прикладных программ для научно-технических расчетов IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США). При сравнении зависимых выборок рассчитывали парный критерий Уилкоксона, для сравнения независимых переменных применяли U-критерий Манна–Уитни. Для всех критериев критический уровень значимости принимался равным 5%, т. е. нулевая гипотеза отвергалась при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты измерения уровней биомаркеров в плазме крови пациентов с трансплантированным сердцем представлены в таблице. Диапазон концентраций исследуемых аналитов варьировал в широких пределах и соответствовал непараметрическому распределению; данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха [I и IV квартилей].

Таблица

**Результаты анализа уровней биомаркеров у реципиентов сердца**  
**The results of the analysis of biomarker levels in heart recipients**

Биомаркеры	Медиана [Интерквартильный размах]
sCD40L, пг/мл	7,6 [2,4; 47,3]
PDGF-BB, пг/мл	2473,7 [1461,22; 3899,4]
PlGF-1, пг/мл	150,4 [108,0; 255,4]
ST2, нг/мл	34,2 [16,4; 62,2]

Не было выявлено значимых различий уровней каждого из биомаркеров у мужчин и женщин. Сравнительный анализ концентраций исследуемых биомаркеров показал отсутствие различий у пациентов с ДКМП и ИБС: sCD40L ( $p = 0,44$ ), PDGF-BB ( $p = 0,13$ ), PlGF-1 ( $p = 0,18$ ), ST2 ( $p = 0,68$ ). Не выявлено

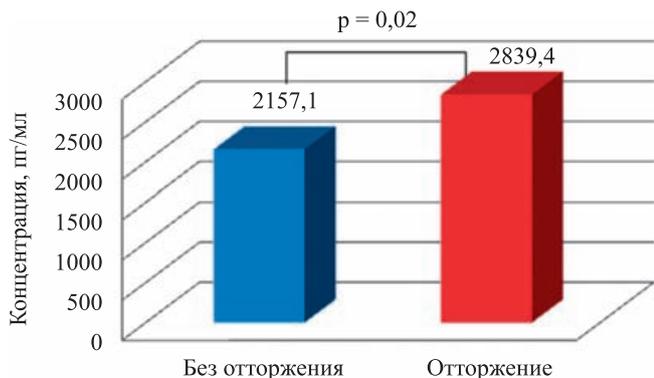


Рис. 1. Сравнительный анализ концентрации PDGF-BB в плазме крови пациентов без отторжения и пациентов с отторжением трансплантированного сердца

Fig. 1. Comparative analysis of PDGF-BB plasma concentration in patients without and with heart rejection

связи уровней исследуемых цитокинов с возрастом пациентов. Обнаружена положительная корреляционная связь между концентрациями PDGF-BB и sCD40L ( $r = 0,01$ ).

В течение периода наблюдения после ТС у 37 пациентов (по результатам 49 биопсий) было диагностировано отторжение. Гистохимические признаки острого клеточного отторжения обнаружены у 30 реципиентов (в 41 биоптате): 1А – у 25 пациентов (в 34 биоптатах), 1В – у двух пациентов (в трех биоптатах), 3А – у четырех пациентов. Иммуногистохимические признаки антителоопосредованного отторжения выявлены у трех пациентов. Сочетание острого клеточного и гуморального отторжения обнаружено у четырех пациентов (в пяти биоптатах). У 61 пациента (в 76 биоптатах) не было обнаружено морфологических и иммуногистохимических признаков отторжения.

Сравнительный анализ показал наличие достоверных различий уровня PDGF-BB у пациентов с выявленными признаками отторжения и без таковых ( $p = 0,02$ ) (рис. 1).

Более того, была обнаружена положительная корреляционная связь между уровнем PDGF-BB и степенью выраженности признаков острого клеточного отторжения ( $r = 0,03$ ).

Величина медианы остальных биомаркеров (sCD40L, PIGF-1, ST2) была несколько выше у пациентов с признаками отторжения, чем у пациентов без таковых, однако эти различия не достигали статистической значимости, а имели характер тенденции (рис. 2).

Относительный риск развития отторжения трансплантированного сердца у пациентов с концентрацией PDGF-BB, превышающей значение медианы, был в 1,64 раза выше, чем у пациентов, у которых концентрация цитокина была ниже ме-

дианы. Остальные биомаркеры (sCD40L, PIGF-1, ST2) не обладали собственной прогностической значимостью: величина относительного риска достоверно не отличалась у пациентов с отторжением и без такового. В то же время их сочетание повышало диагностическое значение каждого из них, так, у пациентов с более высокими концентрациями (выше медианы) и ST2, и PDGF-BB риск развития отторжения увеличивался до  $2,11 \pm 0,34$  [95% ДИ 1,08–4,11]; а при сочетании sCD40L и ST2 – до  $2,14 \pm 0,38$  [95% ДИ 1,03–4,47] соответственно. Наибольшей диагностической значимостью обладала панель из трех биомаркеров: sCD40L, PIGF-1,

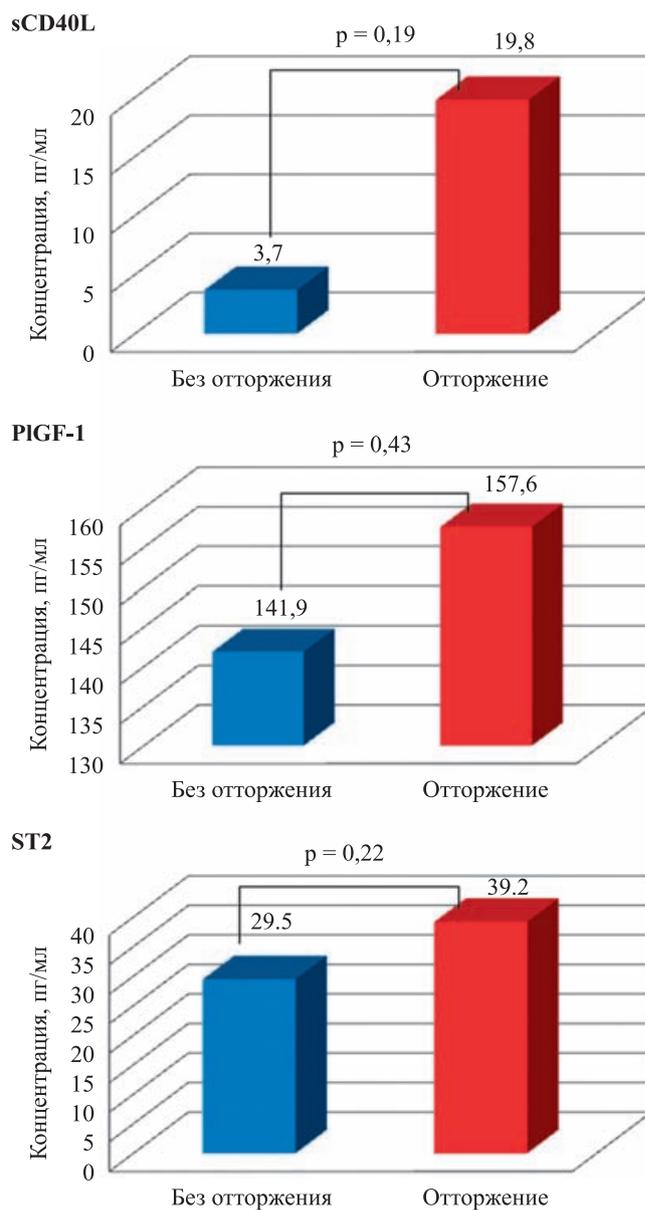


Рис. 2. Сравнительный анализ концентрации sCD40L, PIGF-1 и ST2 в плазме крови пациентов без отторжения и пациентов с отторжением трансплантированного сердца

Fig. 2. Comparative analysis of sCD40L, PIGF-1 and ST2 plasma concentrations in patients without and with heart rejection

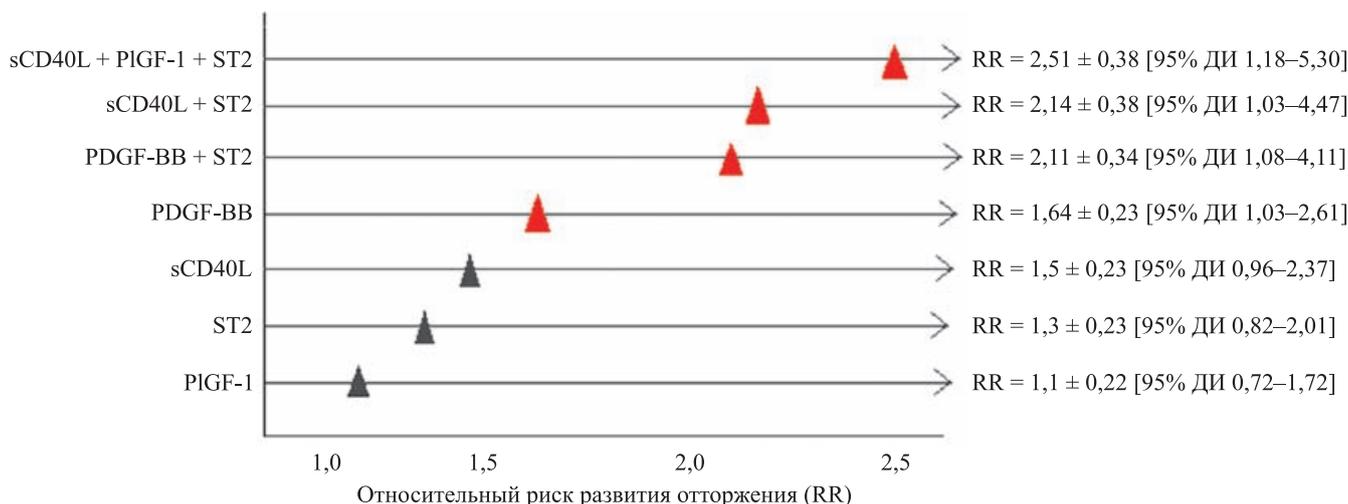


Рис. 3. Относительный риск развития отторжения трансплантированного сердца у пациентов при концентрации биомаркеров, превышающей величину медианы

Fig. 3. Relative risk of heart rejection in patients with biomarkers levels higher than a median value

ST2 (рис. 3). Относительный риск развития отторжения при превышении концентрации значения медианы трех биомаркеров был в 2,51 раза выше, чем у пациентов с меньшими концентрациями.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Концентрация тромбоцитарного фактора роста PDGF-BB у пациентов с трансплантированным сердцем с наличием гистохимических и иммуногистохимических признаков отторжения достоверно выше, чем у реципиентов сердца без признаков отторжения ( $p = 0,02$ ).

Риск развития отторжения у пациентов с высоким уровнем PDGF-BB (выше медианы) достоверно выше, чем у пациентов с концентрацией ниже значения медиан:  $RR = 1,64 \pm 0,23$  [95% ДИ 1,03–2,61]. Измерение концентрации ST2 не несет самостоятельного прогностического значения, однако его использование в комплексе с PDGF-BB увеличивает диагностическое и прогностическое значение последнего. Наибольшей диагностической значимостью обладает панель из трех биомаркеров: sCD40L, PIGF-1, ST2 ( $RR = 2,51 \pm 0,38$ ).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Готье СВ, Шевченко АО, Попцов ВН. Пациент с трансплантированным сердцем: Руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.: Тверь: Триада, 2014. 144. Gautier SV, Shevchenko AO, Popstov VN. Patsient s transplantirovannym serdtsem: Rukovodstvo dlya vrachej po vedeniyu patsientov, perenesshikh trasnplanta-tsiyu serdtsa. M.: Tver': Triada, 2014. 144.
2. Космачева ЕД, Кижватова НВ, Гордеева ЕВ и др. Осложнения в послеоперационном периоде у пациентов, перенесших ортоптическую трансплантацию

- сердца. *Клиническая медицина*. 2014; 92 (4): 30–34. Kosmacheva ED, Kizhvatova NV, Gordeeva EV i dr. Oslozhneniya v posleoperatsionnom periode u patsientov, perenesshikh ortopticheskuyu transplantatsiyu serdtsa. *Klinicheskaya meditsina*. 2014; 92 (4): 30–34.
3. Frick M, Antretter H, Pachinger O, Pözl G. Biomarker for diagnosis of rejection after heart transplantation. *Herz*. 2010; 35 (1): 11–16.
4. Насырова АА, Шевченко АО. Функциональные показатели магистральных артерий и риск отторжения трансплантированного сердца. *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том VII. 2015 год. Под ред. С.В. Готье. М. Тверь: Триада, 2016: 331–350. Nasyrova AA, Shevchenko AO. Funktsional'nye pokazateli magistral'nykh arteriy i risk ottorzheniya transplantirovannogo serdtsa. *Transplantologiya: itogi i perspektivy*. Tom VII. 2015 god. Pod red. SV Gautier. M. Tver': Triada, 2016: 331–350.
5. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryava AY et al. The Registry of International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2015. 34: 1264–1277.
6. Martinez-Dolz L, Almenar L, Reganon E. et al. What is the best biomarker for diagnosis of rejection in heart transplantation? *Clinical Transplantation*. 2009; 23: 672–680.
7. Стаханова ЕА, Шевченко ОП. Роль мультиплексного анализа биомаркеров неоангиогенеза и воспаления при трансплантации сердца. *Трансплантология: итоги и перспективы*. Том VII. 2015 год. Под редакцией С.В. Готье. М. Тверь: Триада, 2016: 422–442. Stakhanova EA, Shevchenko OP. Rol' mul'tipleksnogo analiza biomarkerov neoangiogeneza i vospaleniya pri transplantatsii serdtsa. *Transplantologiya: itogi i perspektivy*. Tom VII. 2015 god. Pod redaktsiey SV Gautier. M. Tver': Triada, 2016: 422–442.
8. Kennel PJ, Schulze PC. Novel Biomarker Approaches for Managing Patients With Cardiac Transplantation.

*Current Heart Failure Reports*. 2015 Oct; 12 (5): 328–332. doi: 10.1007/s11897-015-0269-1.

9. Sack FU, Vielfort TJ, Koch A. et al. The role of platelet derived growth factor in endomyocardial biopsies shortly after heart transplantation in relation to postoperative course. *European Journal Cardiothoracic Surgery*. 2004; 25 (1): 91–97.

10. Lee GY, Choi JO, Ju ES, Lee YJ, Jeon ES. Role of Soluble ST2 as a Marker for Rejection after Heart Transplant. *Korean Circ. J.* 2016 Nov; 46 (6): 811–820. doi: 10.4070/kcj.2016.46.6.811.

11. Dengler TJ, Gleissner CA, Klingenberg R et al. Biomarkers after heart transplantation: nongenomic. *Heart Failure Clin.* 2007 Jan; 3 (1): 69–81.

12. Долгов ВВ, Шевченко ОП, Шевченко АО. Биомаркеры в лабораторной диагностике. М. Тверь: Триада,

2014. 288. *Dolgov VV, Shevchenko OP, Shevchenko AO. Biomarkery v laboratornoy diagnostike*. М. Тверь: Триада, 2014. 288.

13. Breen EJ, Polaskova V, Khan A. Bead-based multiplex immune-assays for cytokines, chemokines, growth factors and other analytes: median fluorescence intensities versus their derived absolute concentration values for statistical analysis. *Cytokine*. 2015; 71 (2): 188–198.

14. Biancotto A, Wank A, Perl S. et al. Baseline levels and temporal stability of 27 multiplexed serum cytokine concentrations in healthy subjects. *PLoS One*. 2013; 8 (12): e76091.

Статья поступила в редакцию 10.10.2016 г.  
The article was submitted to the journal on 10.10.2016

**УВАЖАЕМЫЕ ЧИТАТЕЛИ!**

Подписку на журнал «Вестник трансплантологии и искусственных органов» можно оформить в ближайшем к вам почтовом отделении.

**Подписной индекс** нашего издания в каталоге «Газеты и журналы» – **80248**



Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		<b>80248</b> (индекс издания)
			количество комплектов
на 2017 год по месяцам			
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
Куда			
(почтовый индекс)		(адрес)	
Кому			
(фамилия, инициалы)			
-----			
Ф. СП-1	<b>ВЕСТНИК</b> ТРАНСПЛАНТОЛОГИИ И ИСКУССТВЕННЫХ ОРГАНОВ		<b>80248</b> (индекс издания)
			количество комплектов
на 2017 год по месяцам			
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
Куда			
(почтовый индекс)		(адрес)	
Кому			
(фамилия, инициалы)			