© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.61-089.843-089.168.1-06-092:[612.017.1:577.21]-078.33

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИЛЕЙКОЦИТАРНЫХ ДОНОР-СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В РАННЕМ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

М.Ш. Хубутия, член-корреспондент РАМН, профессор, **Н.В. Боровкова**, доктор медицинских наук, **Н.В. Доронина**, **Н.В. Шмарина**, кандидат медицинских наук, **Р.В. Сторожев**, **Л.В. Чудакова**

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения Москвы

E-mail: Borovkovanv@yandex.ru

Для оценки выявляемости и прогностической значимости донор-специфических антител к HLA изучены образцы сыворотки крови 66 реципиентов. Донор-специфические антитела (DSA) выявлены в сыворотке 15 (22,7%) пациентов. Для оценки влияния DSA на течение раннего посттрансплантационного периода проанализированы результаты лечения 38 реципиентов почки. Выявлено, что образование антител к HLA донора сопровождалось развитием реакции отторжения у 5 реципиентов из 8, что в 2 случаях привело к утрате трансплантата. Из 30 реципиентов, у которых образования DSA не выявлено, реакция отторжения трансплантата диагностирована в 4 случаях. У 3 больных отмечен криз острого клеточного отторжения. Таким образом, образование de novo DSA к HLA является прогностически неблагоприятным фактором в плане развития реакции отторжения и гибели трансплантата.

Ключевые слова. *HLA-антитела, донор-специфические антитела (DSA), криз отторжения, трансплантация органов*

DETERMINATION OF DONOR SPECIFIC HLA ANTIBODIES IN THE EARLY POST-TRANSPLANT PERIOD

M.Sh. Khubutia, N.V. Borovkova, N.V. Doronina, N.V. Shmarina, R.V. Storozhev, L.V. Chudakova

N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow, Russian Federation

To assess the detection and prognostic significance of donor-specific HLA antibodies serum samples from 66 recipients were examined. Donor-specific antibodies (DSA) have been identified in the sera of 15 patients (22,7%). To assess the effect on DSA during the early post-transplant period, the results of treatment of 38 renal transplant recipients have been analyzed. that donor-specific HLA antibodies were found to be accompanied by the development of rejection in 5 out of 8 recipients, that in two cases led to the loss of the graft. Among the 30 patients in whom no DSA were found, the graft rejection was diagnosed in 4 cases. The acute cellular rejection was recorded in three patients. Thus, de novo generation of donor-specific HLA antibodies is a poor prognostic factor in terms of rejection and graft loss.

Key words: *HLA-antibodies, donor-specific antibodies (DSA), rejection crises, organ transplantation*

ВВЕДЕНИЕ

Одной из главных причин потери трансплантата является реакция отторжения донорского органа. Она происходит в разные сроки после операции и обусловлена реакцией на антигены главного комплекса гистосовместимости клеток пересаженного органа, против которых вырабатываются антитела [1, 7]. Различают сверхострую, острую и хроническую реакции отторжения. Сверхострая реакция отторжения (HAR-реакция) протекает бурно с первых минут или часов после пересадки органа. Острая реакция отторжения (ACR-реакция; AHR-реакция) чаще развивается со 2-х по 90-е сутки после операции. Хроническая реакция отторжения (CAR-реакция) диагностируется через несколько недель, месяцев и лет после операции, может несколько раз рецидивировать после подавления ее иммуносупрессивной терапией [5, 6]. Реакция отторжения трансплантата обусловлена клеточными и(или) гуморальными иммунными механизмами. В ответ на чужеродные человеческие лейкоцитарные антигены (HLA) в организме реципиента вырабатываются донор-специфические антитела (DSA).

В настоящее время DSA определяют разными способами. В основе серологического метода лежит комплементзависимый лимфоцитотоксический тест – cross-match (кросс-матч) реакция. Выявление у реципиента антител к HLA донора (кросс-матч-реакция) является обязательной процедурой перед трансплантацией органа [8].

В последние годы широкое распространение получили методы мультиплексного анализа с детекцией результатов на платформе Luminex (x-MAP технология). X-MAP-технология основана на использовании панели микросфер, имеющих различные спектральные характеристики. Это позволяет с максимальной точностью выявить антитела к известным кросс-реактивным группам антигенов I и II классов системы HLA (в отличие от лимфоцитотоксического теста), что помогает определиться с тактикой лечения.

Большой интерес представляет определение DSA в посттрансплантационном периоде, так как образованные *de novo* DSA являются решающим фактором развития отторжения трансплантата [2–4]. Вновь образующиеся антитела против антигенов трансплантата не вызывают немедленного прекращения его деятельности (в отличие от предсуществующих антител), тем не менее эти посттрансплантационные антитела в итоге могут стать причиной хронического отторжения трансплантата. Они могут образовываться как через 3–21 сут, так и через несколько лет после пересадки органа, даже при отрицательной перекрестной пробе cross-match на момент трансплантации. DSA в посттрансплантационном периоде можно определять как классическим серологическим методом (лимфоцитотоксический тест), так и с помощью x-MAP-технологии, позволяющей проводить детекцию IgG-антител к I и II классу HLA.

Цель настоящей работы – оценить выявляемость и прогностическое значение DSA к HLA в раннем посттрансплантационном периоде.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью определения наличия DSA к HLA исследованы образцы сыворотки крови у 66 реципиентов (38 мужчин и 28 женщин в возрасте от 26 до 53 лет), которым в период с июня 2011 г. по июль 2012 г. в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского выполнена трансплантация органа. Из числа обследованных 38 были реципиенты почки, 6 – поджелудочной железы и почки, 12 – печени, 5 – легких и 5 – сердца. DSA определяли в сыворотке крови реципиентов с 5-х по 28-е сутки посттрансплантационного периода. У ряда пациентов оценку DSA проводили также в более поздние сроки.

В качестве диагностикума для определения DSA служили лимфоциты, выделенные из селезенки органного донора. Вместе с трансплантируемыми органами у донора брали фрагмент селезенки. Небольшие фрагменты селезенки гомогенизировали, получали суспензию лимфоцитов, затем (после добавления криопротекторов) клетки селезенки помещали на хранение в жидкий азот при температуре -196°С. Это позволило сохранить жизнеспособность лимфоцитов длительное время (1 год и более) и контролировать наличие DSA у реципиента после аллотрансплантации.

Определение DSA проводили с помощью набора LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) производства Gen-Probe (США). Набор содержит смесь Luminex-частиц; одни из них в смеси конъюгированы с моноклональными АТ к I классу HLA, другие – ко II классу HLA. При смешивании с лизатом клеток донора эти 2 категории частиц связываются с растворенными донорскими молекулами HLA. Принцип метода состоит в реакции антиген – антитело. Если образец пациента положительный, то комплекс микросферы – лизат – HLA АТ даст положительную реакцию; если образец пациента отрицательный, этот комплекс даст фоновый сигнал. Чтобы исключить ошибку подготовительной стадии (связывания лизата с микросферами), в систему вводят специальный контроль. Этот реагент вносят в дополнительную лунку планшета вместо образца. Наряду с исследуемыми образцами и контролем в тесте предусмотрены лунки под положительную и отрицательную контрольные сыворотки (соответственно ПК и ОК), содержащие и не содержащие антитела к HLA-антигенам I и II классов. Таким образом, в наборе предусмотрены контроль частиц и контрольные сыворотки, обеспечивающие точность определения антител к антигенам донора.

DSA определяли также серологическим методом с помощью лимфоцитотоксического теста (кроссматч-реакция). Для этого к сыворотке крови реципиента добавляли лимфоциты селезенки доноров. Лимфоцитотоксический тест (ЛЦТ) проводили в плашках Терасаки. В плашку с сывороткой реципиента добавляли 1 мкл суспензии лимфоцитов доноров. После 30-минутной инкубации в лунку вносили 5 мкл кроличьего комплемента и инкубировали еще 60 мин. Затем окрашивали лимфоциты эозином и фиксировали клетки 20% формалином. Через 30 мин подсчитывали относительное число погибших лимфоцитов (табл. 1) [8].

Скрининг антител к 1 и 2 классам HLA (донорнеспецифические антитела) проводили на платформе Luminex с помощью наборов LABScreen ONE LAMBDA (США) и LIFECODES Lifescreen Gen-Probe (США). Тестируемые сыворотки инкубировали с микросферами, покрытыми очищенными HLA-антигенами. HLA-антитела, присутствующие в тестируемых сыворотках, связывались с антигенами на поверхности микросфер. Не связавшиеся компоненты удаляли путем 3-кратной промывки буфером. Реактивность каждой сыворотки оценивали по флюоресцентному сигналу от каждой микросфе-

Таблица 1

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЦТ*

Количество погибших клеток, %	Баллы	Результат
0–10	1	Отрицательный
11–20	2	Сомнительный
21–50	4	Слабоположительный
51–80	6	Положительный
81–100	8	Резко положительный

*A. Zachary, G. Teresi (eds.). ASHI Laboratory Manual (2nd ed.). Lenexa, KS: American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 1990.

ры после коррекции неспецифического связывания по микросфере с негативным контролем. В норме интенсивность флюоресценции MFI не превышала 500 ед.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В раннем посттрансплантационном периоде (с 5-х по 20-е сутки) DSA выявлены в сыворотках крови 15 (22,7%) пациентов из 66 обследованных. У 5 пациентов DSA были обнаружены уже в момент трансплантации, при отрицательной кросс-матч-реакции. Выявляемость DSA у пациентов при трансплантации органов представлена в табл. 2.

Таким образом, гуморальный иммунный ответ с выработкой специфических антител к лейкоцитарным антигенам донора у 22,7% реципиентов развивается уже в раннем посттрансплантационном периоде. Обращает на себя внимание также тот факт, что в ряде случаев у реципиентов имеются предсуществующие DSA к HLA, которые не детектируются общепринятым серологическим методом. Поэтому было решено проанализировать эффективность выявления DSA в посттрансплантационном периоде в ЛЦТ и с помощью набора LIFECODES Donor Specific Antibody (DSA) на платформе Luminex.

В табл. 3 представлены результаты определения антител у реципиентов с использованием диагностикумов. С помощью метода на платформе Luminex DSA выявлены у 5 реципиентов, течение посттрансплантационного периода у которых осложнилось развитием реакции отторжения. Серологическим методом антитела выявлены только у 1 реципиента. Таким образом, для определения DSA в посттрансплантационном периоде мы рекомендуем использовать методы, основанные на использовании x-MAP технологии.

С целью выявления влияния DSA на течение раннего посттрансплантационного периода проанализированы результаты лечения 38 реципиентов почки. Оценивали: длительность восстановления функции трансплантата, наличие дисфункции трансплантата, развитие реакции отторжения.

Результаты проведенного анализа представлены в табл. 4, из которой видно, что у 4 пациентов из 8 с выявленными DSA отмечалась отсроченная функция почечного трансплантата. Образование *de novo* антител к лейкоцитарным антигенам донора в раннем посттрансплантационном периоде сопровождалось развитием реакции отторжения у 5 реципиентов из 8, что в 2 случаях привело к утрате трансплантата. Среди реципиентов, у которых образования DSA в раннем посттрансплантационном периоде не выявлено, реакция отторжения трансплантата диагностирована у 4. У 3 пациентов отмечен криз острого клеточного отторжения. У 1 реципиента на 2-е сутки отмечена гибель трансплантата, обусловленная острым гуморальным отторжением. Ни в момент

Таблица 2

НАЛИЧИЕ DSA ПРИ ПЕРЕСАДКЕ ОРГАНОВ И В РАННЕМ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Реципиенты органов	Число обследованных	Выявлены DSA	
		в момент трансплантации	в раннем посттрансплантационном периоде
Почки	38	2	7
Поджелудочной железы	6	0	1
Сердца	5	1	2
Легких	5	1	2
Печени	12	1	3
ВСЕГО	66	5 (7,5%)	15 (22,7%)

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ DSA У РЕЦИПИЕНТОВ ОРГАНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИАГНОСТИКУМОВ

Метод исследования	Число образцов клеток	Отсутствие донор-специфических антител	Наличие донор-специфических антител
Серологический (ЛЦТ)	18	17	1
Метод по технологии x-MAP на платформе Luminex		13	5

Таблица 4

ОСОБЕННОСТИ ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОГО ПЕРИОДА У РЕЦИПИЕНТОВ ПОЧКИ С ВЫЯВЛЕННЫМИ DSA

Параметр	Реципиенты	
	с DSA (n=8)	без DSA (n=30)
Отсроченная функция трансплантата	4 (50)	5 (16,6)
Реакция отторжения	5 (62,5)	4 (13,3)
Утрата трансплантата	2 (25)	1 (3)

Примечание. В скобках – %.

трансплантации, ни в период потери трансплантата (2-е сутки послеоперационного периода) антитела к лейкоцитарным антигенам донора в сыворотке крови реципиента не определялись. Можно предположить, что реакция отторжения у него вызвана не HLA-антителами или что DSA в достаточном для их детекции количестве могли образоваться в более позднем периоде.

Таким образом, образование *de novo* DSA к HLA является прогностически неблагоприятным фактором в плане развития реакции отторжения и гибели трансплантата.

Чтобы проанализировать выявляемость DSA и донор-неспецифических антител к HLA после пересадки органов и оценить их прогностическое значение, обследованы сыворотки у 34 пациентов в разные сроки посттрансплантационного периода. У 22 пациентов антител к HLA не выявлено, посттрансплантационный период протекал без особенностей.

У 4 пациентов (2 реципиента сердца и 2 – печени) скрининг не выявил антитела к HLA, но обнаружены DSA. Криз отторжения, подтвержденный морфологически, диагностирован у 2 реципиентов сердца. При этом в 1 случае реакция отторжения трансплантата подтверждена при биопсии и после коррекции иммуносупрессивной терапии купирована. Другой пациент погиб; на аутопсии отмечены признаки реакции отторжения. У 1 реципиента печени в посттрансплантационном периоде выявлены клинические признаки реакции отторжения трансплантата, что потребовало назначения пульс-терапии; при повторном исследовании после проведенного лечения DSA не выявлены. Еще у 1 реципиента печени, несмотря на наличие DSA к HLA, посттрансплантационный период протекал без особенностей, клинических или морфологических признаков отторжения не зарегистрировано.

Выраженное содержание донор-неспецифических антител к HLA (интенсивность флюоресценции – MFI – от 4000 до 24 919) и отсутствие DSA зарегистрированы в посттрансплантационном периоде у 4 пациентов (1 реципиент сердца и 3 – почки). У реципиента сердца течение посттрансплантационного периода осложнилось развитием тяжелой вирусной инфекции, ставшей причиной смерти больного. У реципиентов почки клинических или гистологических признаков отторжения не диагностировано, однако отмечались отсроченная функция трансплантата и медленное восстановление уровня сывороточных мочевины и креатинина.

Одновременно DSA и донор-неспецифические антитела к HLA выявлены у 4 реципиентов почки, из которых у 3 диагностирован криз отторжения.

Таким образом, выработка донор-неспецифических антител к HLA в посттрансплантационном периоде не только отражается на течении посттрансплантационного периода, но не увеличивает риск развития реакции отторжения трансплантата. В то же время образование *de novo* антител к лейкоцитарным антигенам донора в 62% случаев сопровождало острое гуморальное отторжение, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [2, 3]. Отметим, что при трансплантации печени наличие DSA в момент пересадки и образование антител в посттрансплантационном периоде не оказывали существенного влияния на частоту отторжения трансплантата.

ВЫВОДЫ:

1. В посттрансплантационном периоде на фоне иммуносупрессивной терапии у 22,7% реципиентов образуются DSA к HLA.

2. Вновь образованные DSA к HLA влияют на течение посттрансплантационного периода, являются предвестником реакции отторжения трансплантата.

3. С целью прогнозирования и ранней диагностики криза отторжения в посттрансплантационном периоде рекомендуется осуществлять мониторинг DSA к HLA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cornell L., Smith R., Colvin R. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance // AnnuRev Pathol. – 2008; 3: 189–220.
2. Zeevi A., Spichty K., Joseph P. et al. Increased risk for bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients who develop post transplant donor specific HLA antibodies // Tissue antigens. – 2011; 77 (5): 386.
3. Bardi R., Boujemaa S., Kallala Ch. et al. Monitoring of donor specific anti-HLA antibodies (DSA) in kidney transplantation patients // Tissue antigens. – 2012; 79 (6): 497.
4. Nils Lachmann, Paul I. Terasaki, Constanze Schönemann. Donor-Specific HLA Antibodies in Chronic Renal Allograft Rejection: A Prospective Trial with a Four-Year Follow-Up // Clin. Transplants. – 2006; 13: 171–99.
5. Solez K., Colvin R., Racusen L. Banff `05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (`CAN`) // Am. J. Transplant. – 2007; 7 (3): 518–26.
6. Solez K., Colvin R., Racusen L. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions // Am. J. Transplant. – 2008; 8 (4): 753–60.
7. Tomasoni S., Remuzzi G., Benigni A. Allograft rejection: acute and chronic studies // Contrib Nephrol. – 2008; 159: 122–34.
8. Zachary A. ASHI Laboratory Manual // American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. – 2 nd. – NY – 1990; 307–20.