

HLA-антитела и их значение при трансплантации почки

М.Ш. Хубутя, Н.В. Боровкова, Р.В. Сторожев, Н.В. Доронина, М.В. Сторожева, А.С. Перцев, А.В. Пинчук
НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

Контакты: Наталья Валерьевна Боровкова, borovkovanv@yandex.ru

Цель исследования — оценка влияния преусуществующих HLA-антител на течение посттрансплантационного периода, а также изучение динамики выработки донор-специфических антител у реципиентов после пересадки аллогенной трупной почки. **Материалы и методы.** Исследовано 110 образцов сыворотки крови пациентов, включенных в «Лист ожидания» (ЛО) трансплантации почки (ТП). Для оценки влияния наличия преусуществующих антител на течение посттрансплантационного периода обследовано 55 пациентов (32 мужчины и 23 женщины в возрасте от 28 до 63 лет), которым в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с октября 2009 по сентябрь 2010 г. была выполнена ТП. Далее мы осуществляли контроль над уровнем HLA-антител в посттрансплантационном периоде. Всего было обследовано 27 пациентов (15 мужчин и 12 женщин в возрасте от 26 до 61 года) после ТП, выполненной в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с марта по сентябрь 2010 г.

Результаты и обсуждение. С ноября 2009 г. у всех пациентов, включенных в ЛО ТП в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, определяют уровень преусуществующих HLA-антител в сыворотке крови. На сегодняшний день обследовано 110 пациентов, из них 69 мужчин и 41 женщина ожидают пересадку почки.

Заключение. Определение уровня преусуществующих HLA-антител у реципиентов, готовящихся к ТП, обязательно, поскольку позволяет на практике выделить группу пациентов, нуждающихся в более тщательном подборе донорских органов и проведении предоперационной подготовки, которая включает методы экстракорпоральной гемокоррекции и медикаментозной терапии.

Ключевые слова: HLA-антитела, трансплантация почки, криз отторжения, азотвыделительная функция

HLA antibodies and their value during renal transplantation

M.Sh. Khubutia, N.V. Borovkova, R.V. Storozhev, N.V. Doronina, M.V. Storozheva, A.S. Pertsev, A.V. Pinchuk
N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care, Moscow

Objective: to evaluate the effects of pre-existing HLA antibodies on the posttransplantation period and to study changes in the generation of donor-specific antibodies in recipients after allogeneic cadaveric kidney transplantation.

Materials and methods. One hundred and ten serum samples from patients on the kidney transplantation waiting list (WL) were tested for pre-existing HLA antibodies. To evaluate the effect of preantibodies, the investigators examined 55 patients (32 males and 23 females, whose age was 28 to 63 years) who had undergone kidney transplantation at the N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care in October 2009 to September 2010. In the second part of the investigation, HLA antibody levels were monitored in the posttransplantation period. A total of 27 patients (15 males and 12 females aged 26 to 61 years) were examined after kidney transplantations made at the N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care in March to September 2010.

Results and discussion. Since November 2009, the serum level of pre-existing HLA antibodies had been measured in all the patients registered on the kidney transplantation WL at the N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Care. One hundred and ten patients have been examined today; of them 69 males and 41 females are waiting for kidney transplantation.

Conclusion. The level of pre-existing HLA antibodies must be estimated in the recipients to be prepared for kidney transplantation since this makes it possible to identify in practice a group of patients requiring a more thorough selection of donor organs and preoperative preparation that involves the methods of extracorporeal blood correction and medical therapy.

Key words: HLA antibodies, kidney transplantation, rejection crisis, nitrogen-excretory function

Введение

Живаемость аллогенного трансплантата почки зависит от многих причин: состояния и времени холодовой ишемии трансплантата, возраст донора, тяжести состояния реципиента и др. Среди них особое значение имеет подбор донора и реципиента по антигенам системы HLA (human leucocyte antigens). Так, по данным Hugo K. Kaneku и Paul I. Terasaki [1, 2], совместимость по HLA-антигенам улучшает вы-

живаемость трансплантата почки на 15% в раннем и на 10% в позднем посттрансплантационном периоде. HLA-антигены вызывают в организме реципиента иммунную реакцию, приводящую к выработке специфических антител (HLA-антитела). Поэтому наиболее важным диагностическим тестом в подборе пары донор—реципиент является реакция cross-match, позволяющая определить наличие у реципиента антител к антигенам системы HLA донора.

Другим не менее важным исследованием является определение предсуществующих антител в сыворотке крови реципиента. Предсуществующие антитела (анти-HLA-антитела) — это иммуноглобулины класса G, образование которых связано с предшествующей сенсibilизацией несовместимыми HLA-антигенами в результате гемотрансфузий, прошлых трансплантаций, беременностей [2]. Проводить определение HLA-антител у реципиентов рекомендуется при включении в «Лист ожидания» (ЛО) трансплантации почки (ТП) и далее 1 раз в 3–6 мес [3–5]. В научной литературе уделяется большое внимание пациентам, сенсibilизированным к HLA. Отмечается, что такие пациенты требуют более тщательного подбора донорских органов, а также применения активных методов десенсibilизации на этапах подготовки к операции и в раннем послеоперационном периоде [2, 6–9]. По данным авторов, у 30% реципиентов из ЛО ТП определяются HLA-антитела [1, 2, 6, 7]. Однако данных об особенностях течения посттрансплантационного периода у реципиентов с предсуществующими HLA-антителами недостаточно [8, 9]. Поэтому целью настоящей работы служила оценка влияния предсуществующих HLA-антител на течение посттрансплантационного периода, а также изучение динамики выработки донор-специфических антител у реципиентов после пересадки аллогенной трупной почки.

Материалы и методы

С целью определения наличия предсуществующих HLA-антител исследовано 110 образцов сыворотки крови пациентов из ЛО ТП. Для оценки влияния наличия предсуществующих антител на течение посттрансплантационного периода обследовано 55 пациентов (32 мужчины и 23 женщины в возрасте от 28 до 63 лет), которым в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с октября 2009 по сентябрь 2010 г. была выполнена ТП. В зависимости от наличия предсуществующих антител, выделены 2 группы: 1-я (основная) группа — пациенты, сенсibilизированные к антигенам системы HLA ($n=15$); 2-я (группа сравнения) — пациенты, у которых не выявлены предсуществующие антитела ($n=40$). Распределение пациентов по полу и возрасту представлено в таблице 1.

Таблица 1. Распределение пациентов по полу и возрасту

Группа	Число больных	Пол (м/ж)	Средний возраст, лет
1-я (с HLA-антителами)	15	5/10	48,8
2-я (без HLA-антител)	40	27/13	44,3

Всем 55 пациентам обеих групп была выполнена ТП по поводу терминальной стадии хронической почечной недостаточности (ХПН). Наиболее частой причиной возникновения терминальной ХПН как

в 1-й, так и во 2-й группе был хронический гломерулонефрит.

Во второй части нашего исследования мы осуществляли контроль над уровнем HLA-антител в посттрансплантационном периоде. Всего было обследовано 27 пациентов (15 мужчин и 12 женщин в возрасте от 26 до 61 года) после ТП, выполненной в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского в период с марта по сентябрь 2010 г. Определение уровня HLA-антител проводили на 7-е и 14-е сутки посттрансплантационного периода и далее при наличии клиники криза отторжения.

Определение HLA-антител I и II классов проводили на платформе Luminex (xMAP Technology) с помощью наборов LABScreen фирмы One Lambda (США). Тестируемые сыворотки инкубируются с микросферами LABScreen, покрытыми очищенными HLA-антигенами. HLA-антитела, присутствующие в тестируемых сыворотках, связываются с антигенами на поверхности микросфер. Несвязавшиеся компоненты удаляются путем 3-кратной промывки буфером. Затем комплексы антиген–антитело метятся при помощи античеловеческих антител, связанных с R-фикоэритрином. Детекцию света, излучаемого фикоэритрином от каждой микросферы, проводят на приборе Luminex [10]. Реактивность каждой сыворотки оценивается по флуоресцентному сигналу от каждой микросферы после коррекции неспецифического связывания по микросфере с негативным контролем. Результаты исследования выражаются в условных единицах (у. е.). В норме содержание антител к антигенам HLA не превышает 1,6 у. е.

Результаты и обсуждение

С ноября 2009 г. у всех пациентов, включенных в ЛО ТП в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, определяют уровень предсуществующих HLA-антител в сыворотке крови. На сегодняшний день обследовано 110 пациентов, из них 69 мужчин и 41 женщина ожидают пересадку почки. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, предсуществующие антитела определялись в сыворотке крови 35,5% пациентов среди всех ожидающих ТП в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Более высокий процент среди женщин связан, по нашему мнению, с предшествующей сенсibilизацией в результате беременностей. Наиболее иммуногенными оказались пациенты, имеющие A (II) группу крови, так как предсуществующие антитела у них были выявлены в 43,7% случаев. Чрезмерно большой процент выявления HLA-антител среди пациентов AB (IV) группы крови обусловлен малой выборкой (всего 3 пациента).

С целью оценить влияние предсуществующих HLA-антител на течение посттрансплантационного периода проанализированы результаты лечения 55 пациентов после пересадки почки. У 15 пациентов

Таблица 2. Выявляемость предсуществующих антител у мужчин и женщин из ЛО трансплантации почки в зависимости от группы крови

Группа крови	Число обследованных пациентов			Число пациентов с выявленными HLA-антителами (%)		
	Всего	Мужчины	Женщины	Всего	Среди мужчин	Среди женщин
0 (I)	30	18	12	5 (16,6)	1 (5,5)	4 (33,3)
A (II)	48	32	16	21 (43,7)	9 (28,1)	12 (75)
B (III)	29	19	10	11 (37,9)	6 (31,6)	5 (50)
AB (IV)	3	0	3	2 (66,7)	0	2 (66,7)
Итого	110	69	41	39 (35,5)	16 (23,2)	23 (56,1)

(основная группа) при постановке в ЛО было зарегистрировано повышенное содержание антител к I и/или II классу антигенов системы HLA (10,0 у. е. и более при норме до 1,6 у. е.). У пациентов группы сравнения ($n=40$) концентрация HLA-антител не превышала показатели физиологической нормы. В посттрансплантационном периоде у пациентов группы сравнения первичная функция почечного трансплантата отмечалась в $77,5 \pm 1,04\%$ случаев, тогда как в основной группе у пациентов с наличием предсуществующих HLA-антител — лишь в $53 \pm 3,4\%$ наблюдений (табл. 3). Также выявлено, что у пациентов с предсуществующими HLA-антителами наблюдается более медленное восстановление азотвыделительной функции трансплантата. Так, нормализация азотистых оснований в период до 21 сут после трансплантации наблюдалась лишь у $66 \pm 3,7\%$ пациентов 1-й группы против $77,5 \pm 1,05\%$ пациентов группы сравнения (см. табл. 3). Отсутствие нормализации показателей азотистого обмена до выписки из стационара у пациентов 1-й группы составило 26,6%, среди пациентов 2-й группы — всего 7,5%.

Наличие предсуществующих донор-неспецифических HLA-антител заметного влияния на часто-

ту развития реакции отторжения не оказывало. Так, острый криз отторжения зарегистрирован у 2 (13,3%) из 15 пациентов основной группы и у 6 (15 %) из 40 больных в группе сравнения. Это может быть связано с применением поликлональных антител в качестве индукционной иммуносупрессивной терапии и экстракорпоральных методов детоксикации у пациентов с предсуществующими антителами в послеоперационном периоде. Сверхострое отторжение, подтвержденное морфологически, диагностировано как в основной группе, так и в группе сравнения. У пациента Б. с предсуществующими HLA-антителами сверхострое отторжение привело к необратимой утере функции почечного трансплантата, что потребовало повторной аллогенной трансплантации трупной почки. С целью профилактики развития криза отторжения больному проведен курс лечения поликлональными антителами, а также плазмаферез перед операцией и в 1-е сутки после операции. Послеоперационный период протекал без особенностей, функция почечного трансплантата восстановилась на 2-е сутки. У пациента Ч. из группы сравнения также зарегистрировано сверхострое отторжение. Больному проведен курс лечения поликлональными антителами.

Таблица 3. Особенности течения послеоперационного периода у обследуемых пациентов

Параметр	Число пациентов (%)	
	Основная группа (с HLA-антителами)	Группа сравнения (без HLA-антител)
Первичная функция трансплантата	31 ($77,5 \pm 1,4$)	8 ($53,3 \pm 3,4$)
Отсроченная функция трансплантата	9 ($22,5 \pm 1,4$)	7 ($46,6 \pm 3,4$)
Применение поликлональных антител	3 ($7,5 \pm 0,6$)	3 ($20 \pm 2,7$)
Плазмаферез	4 ($10 \pm 0,75$)	3 ($20 \pm 2,7$)
Развитие острого канальцевого некроза	5 ($12,5 \pm 0,83$)	4 ($26,6 \pm 9,2$)
Развитие острого криза отторжения	6 ($15 \pm 0,9$)	2 ($13,3 \pm 2,3$)

ми с положительным эффектом. В настоящее время трансплантат функционирует.

Таким образом, с помощью современных методов исследования с использованием xMAP-технологии (Luminex) удалось выявить предрасполагающие HLA-антитела у 35,5% пациентов из ЛО ТП, что соответствует данным, полученным N. Lachmann, Paul I. Terasaki, C. Schoenemann [2]. При этом чаще всего HLA-антитела выявляются у женщин с группой крови А (II). Пациенты с предрасполагающими HLA-антителами требуют более тщательного подбора донорских органов. Также Paul I. Terasaki и соавт. [7] отмечают необходимость проведения десенсибилизирующей терапии с применением плазмафереза и ритуксимаба (моноклональные антитела мыши/человека, обладающие специфичностью к CD20 антигену) на этапах подготовки к операции и в раннем послеоперационном периоде. Наличие предрасполагающих HLA-антител оказывает существенное влияние на течение посттрансплантационного периода. У пациентов с повышенным содержанием HLA-антител в 50% случаев наблюдается отсроченная функция трансплантата и замедленное восстановление азотывделительной функции. Кроме того, по данным литературы [5], наличие предрасполагающих HLA-антител в 6,6% случаев ведет к потере трансплантата почки.

Во второй части нашего исследования мы осуществляли контроль над уровнем HLA-антител в посттрансплантационном периоде. Выявлено, что у пациентов группы сравнения (без предрасполагающих HLA-антител) в посттрансплантационном периоде в 80% случаев значимого увеличения уровня HLA-антител не отмечено. Приведем пример. Больной Э., посттрансплантационный период протекал без осложнений, первичная функция трансплантата (2-е сутки), к 7-м суткам — нормализация азотистых оснований. Как видно из рисунка 1, уровень HLA-антител в период наблюдения до 14 сут находится в пределах физиологической нормы.

При исходно повышенном уровне предрасполагающих HLA-антител при подборе донорского

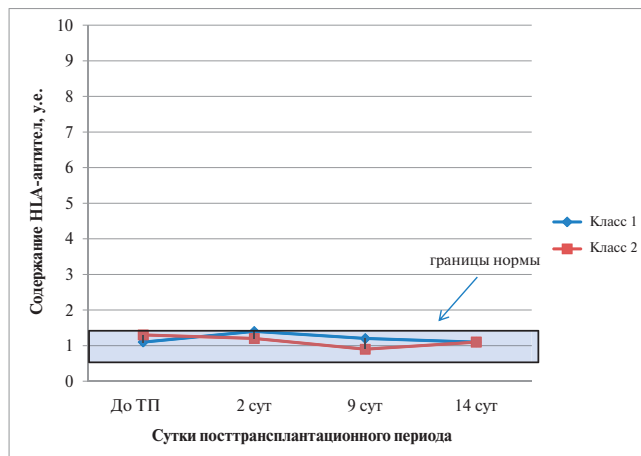


Рис. 1. Динамика уровня HLA-антител у больного Э.

органа по HLA-антигенам и адекватной иммуносупрессивной терапии у 5 пациентов из 12 отмечено постепенное снижение содержания HLA-антител, сопровождавшееся благоприятным течением раннего послеоперационного периода. Так, у пациентки Ч. отмечался высокий уровень HLA-антител как к I, так и ко II классу (класс I — 95,4 у.е., класс II — 119 у.е.). В раннем послеоперационном периоде на фоне проведения иммуносупрессивной терапии уровень HLA-антител несколько повысился на 7-е сутки и снизился к 14-м суткам — после проведения плазмафереза (рис. 2). Мочевыделительная функция восстановилась к 14-м суткам.

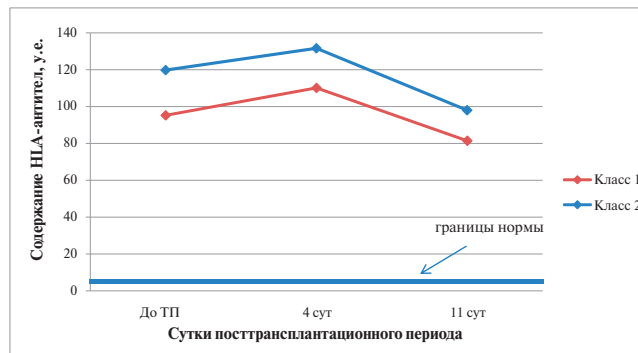


Рис. 2. Динамика уровня HLA-антител у больной Ч.

Еще одним примером, подтверждающим необходимость тщательного подбора по антигенам главного комплекса гистосовместимости, может служить больная А. Уровень предрасполагающих HLA-антител при постановке в ЛО составил 77,9 у.е. к I классу и 123,3 у.е. — ко II классу. Подбор донор—реципиент: полное совпадение по локусам А и DR, несовпадение по локусу В. На 7-е сутки посттрансплантационного периода уровень HLA-антител ко II классу снизился до 32,5 у.е., в то время как содержание HLA-антител к I классу возросло до 195,6 у.е. (рис. 3). Несмотря на наличие первичной функции трансплантата, у больной развился криз отторжения на 7-е сутки, подтвержденный морфологически. На фоне проведения терапии атгамом (иммуноглобулин анти тимоцитар-

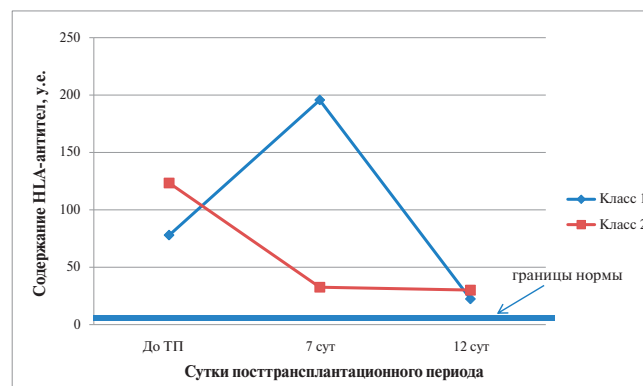


Рис. 3. Динамика уровня HLA-антител у больной А.

ный) и сеансов плазмафереза криз отторжения был купирован, наблюдалось снижение концентрации HLA-антител.

Также отмечено, что нарастание уровня HLA-антител как при исходно повышенных цифрах, так и при исходном их отсутствии имеет неблагоприятное значение и может сопровождать развитие криза отторжения. Так, у пациентки Г., 56 лет, с клиникой криза отторжения через 5 мес после аллогенной трансплантации трупной почки было выявлено значительное повышения уровня антител I класса (96,3 у. е.) и умеренное повышение антител II класса (20 у. е.). Криз отторжения подтвержден морфологически.

Однако не всегда при развитии криза отторжения определяется высокий уровень HLA-антител, что может быть обусловлено их абсорбцией трансплантатом [9]. В качестве примера приведем динамику содержания HLA-антител у больного Ч. (рис. 4). При постановке в ЛО уровень HLA-антител соответствовал физиологической норме. На 2-е сутки посттрансплантационного периода отмечено незначительное увеличение концентрации антител к I классу главного комплекса гистосовместимости (3,6 у. е.). На 3-и сутки концентрация HLA-антител нормализовалась, при этом у пациента отсутствовала функция трансплантата, отмечались признаки криза отторжения. На фоне сверхострого отторжения произошел разрыв трансплантата, в связи с чем он был удален на 4-е сутки. После отмены иммуносупрессии к 7-м суткам посттрансплантационного периода и на 3-и сутки после удаления трансплантата отмечалось резкое увеличение уровня HLA-антител до 80,0 у. е. После сеансов плазмафереза концентрация HLA-антител снизилась. Повторная трансплантация аллогенной трупной почки проведена на 50-е сутки. Послеоперационный период протекал без осложнений, отме-



Рис. 4. Динамика уровня HLA-антител у больного Ч.

чалась первичная функция трансплантата, азотистые основания восстановились на 12-е сутки. Концентрация HLA-антител на 14-е сутки после повторной трансплантации составила 28,9 у. е.

Заключение

Таким образом, определение уровня предсуществующих HLA-антител у реципиентов, готовящихся к трансплантации почки, является обязательным методом исследования, позволяющим на практике выделить группу пациентов, нуждающихся в более тщательном подборе донорских органов, проведении предоперационной подготовки, включающей методы экстракорпоральной гемокоррекции и медикаментозной терапии. Следует учитывать влияние предсуществующих HLA-антител на течение посттрансплантационного периода и выживаемость трансплантата. Выявление повышенного уровня антител в послеоперационном периоде может служить одним из признаков развития острого криза отторжения, что дает возможность своевременно начать лечение.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kaneku H.K., Terasaki P.I. Thirty year trend in kidney transplants: UCLA and UNOS renal transplants registry. Clin transpl 2006;1–28.
2. Lachmann N., Terasaki P.I., Schoenemann C. Donor-specific HLA antibodies in cronic renal allograft rejection: a prospective trial with a four-year follow-up. In: Terasaki P., ed. Clin transpl 2006;171–200.
3. Morales-Buenrostro L.E., Rodriguez-Romo R., de Leo C. et al. HLA and MICA antibodies: further evidence of their impact on graft loss two years after their detection. Clin transpl 2006;207–18.
4. Rebellato L.M., Ozawa M., Verbanac K.M. et al. Clinical and anti-HLA antibody profile of nine renal transplant recipients with failed grafts: donor specific and non-donor-specific antibody development. Clin transpl 2006: 241–54.
5. Mizutani K., Shibata L., Ozawa M. et al. Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure. Clin transpl 2006;255–64.
6. Tanabe K., Ishida H., Omoto K. et al. Antibody-mediated rejection: a single center experience at Tokyo Women's Medical University. Clin transpl 2006: 363–70.
7. Lefaucheur C., Loupy A., Hill G.S. et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. J Am Soc Nephrol 2010;21:1398–406.
8. Terasaki P.I. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. Am J Transpl 2004;4:438–43.
9. Akalin E., Dinavahi R., Friedlander R. et al. Addition of plasmapheresis decreases the incidence of acute antibody-mediated rejection in sensitized patients with strong donor-specific antibodies. Clin J Am Soc Nephrol 2008; 3:1160–7.
10. Langan L.L., D'Orsogna L., Park L.P. et al. HLA antibodies and soluble CD30 are associated with poor renal graft outcome: updated results of a single-center cross-sectional study. Clin transpl 2006;219–26.