

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ»  
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И  
СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РАЗРЕШЕНИЕ НА ПРИМЕНЕНИЕ НОВОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ  
ФС № 2010/131 ОТ 9 АПРЕЛЯ 2010 Г.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
H1A-СЕНСИБИЛИЗАЦИИ У БОЛЬНЫХ, НАХОДЯЩИХСЯ НА  
ГЕМОДИАЛИЗЕ И ПОЛУЧАЮЩИХ ГЕМОКОМПОНЕНТНУЮ  
ТЕРАПИЮ

(медицинская технология)

Санкт-Петербург

2010

## **Аннотация**

Новая медицинская технология содержит сведения о частоте, закономерностях и факторах риска развития HLA-сенсibilизации у пациентов с хронической почечной недостаточностью, получающих гемокомпонентную терапию. Разработан алгоритм выявления HLA-антител в сыворотках больных, находящихся на гемодиализе и получающих гемокомпоненты. Предложены рекомендации по профилактике HLA-сенсibilизации и осложнений, обусловленных несовместимостью крови донора и реципиента по HLA-антигенам, у больных с наличием HLA-антител. Представленные в медицинской технологии данные позволят осуществлять профилактику сенсibilизации и повысить эффективность подбора совместимого донорского органа для потенциальных реципиентов почечного трансплантата.

Технология предназначена для врачей клинической лабораторной диагностики, иммунологических лабораторий ЛПУ, занимающихся проблемами трансплантации органов и тканей.

Рекомендуемый уровень использования:

Центры, в том числе научно-практические, специализированных видов медицинской помощи (органного и тканевого донорства и трансплантологии)

Авторы:

Д.м.н., профессор	Л.Н. Бубнова
Д.м.н.	Т.В. Глазанова
К.м.н.	Е.В. Беляева
К.м.н.	А.С. Беркос
К.м.н.	Н.В. Реутова
Врач высшей категории	В.Н. Николенко
Врач высшей категории	Л.М. Моисеева
Врач высшей категории	В.В. Бакай

Организация:

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА» (ФГУ «РосНИИГТ» ФМБА России)

## ***Введение***

Обеспечение иммунологической безопасности переливания компонентов крови является актуальной задачей трансфузионной медицины. Одним из осложнений, требующим проведения профилактических мероприятий, является развитие негемолитических реакций, возникающих вследствие несовместимости по антигенам системы HLA (Dausset J. 1976). У больных, которым выполняются повторные гемотрансфузии, могут возникать фебрильные реакции и крапивница, а также некардиогенный острый отек легких. Особенно важно, что при наличии HLA-сенсibilизации у больных развивается рефрактерность к переливанию тромбоцитов (Румянцев А.Г., 1998, Головкина Л.Л. с соавт., 2000). Наличие HLA-антител у реципиента аллотрансплантата почки способно вызвать острое и гиперострое отторжение (Opelz G., 2005). Одной из групп пациентов, получающих множественные трансфузии гемокомпонентов, являются больные хронической почечной недостаточностью. У этих больных развивается нефрогенная анемия, и urgentные ситуации с резким снижением гемоглобина требуют неотложной коррекции синдрома анемии с использованием гемокомпонентов, содержащих примесь лейкоцитов и тромбоцитов, являющихся факторами развития сенсibilизации к антигенам системы HLA (Колосков А.В. с соавт., 2003).

Известно, что при проведении идентичной гемокомпонентной терапии часть пациентов активно и быстро вырабатывают HLA-антитела, а часть, напротив, не отвечают на сенсibilизирующие воздействия (Хаитов Р.М., 2003). В связи с этим результаты предпринятого исследования влияния различных факторов на возникновение и выраженность сенсibilизации имеют важное клиническое значение. В свою очередь, наличие HLA-сенсibilизации у потенциальных реципиентов почечного аллотрансплантата значительно затрудняет, а порой делает невозможным подбор совместимого донора (Opelz G. et al., 1979, Paul L.C., 2001). Однако известно, что у некоторых реципиентов сенсibilизация может быть представлена антилимфоцитарными аутоантителами, относящимися к классу IgM (Dyer P., 1993, Rodey G., 2000). Эти антитела не оказывают отрицательного воздействия на почечный трансплантат (Roelen D.L. et al., 1994), поэтому их выявление особенно важно для правильной оценки предсуществующей сенсibilизации потенциальных реципиентов.

В предлагаемой медицинской технологии описаны закономерности развития аллосенсibilизации к антигенам главного комплекса гистосовместимости при проведении гемокомпонентной терапии потенциальным реципиентам почечного трансплантата, представлены особенности образования HLA-антител и разработаны

рекомендации для профилактики сенсibilизации к антигенам главного комплекса гистосовместимости, что позволит повысить эффективность подбора почечного трансплантата.

#### ***Показания к использованию новой медицинской технологии***

Данная медицинская технология предназначена для применения при определении степени сенсibilизации к антигенам 1 класса главного комплекса гистосовместимости у больных, находящихся на лечении гемодиализом, с целью оптимизации гемокомпонентной терапии и обеспечения подбора оптимально совместимого почечного трансплантата.

#### ***Противопоказания к использованию новой медицинской технологии***

Противопоказаний нет.

#### ***Материально-техническое обеспечение новой медицинской технологии***

1. центрифуга MiniSpin plus, Eppendorf, Германия (регистрационное удостоверение МЗ РФ № 2002/637).
2. термостат твердотельный программируемый малогабаритный «ТТ-1-ДНК-Техн» (регистрационное удостоверение № 29/07020402/4004-02);
3. микроскоп биологический лабораторный “Leica Microsystems”, Германия (регистрационное удостоверение № 2005/314);
4. дозаторы многофункциональные 1-4-8-12-канальные механические «Biohit» (регистрационное удостоверение № 2005/450) «Biohit Oyj», Финляндия;
5. устройства и приспособления однократного применения для лабораторных исследований биоматериалов «Sarstedt AG & Co» Германия (регистрационный № 2005/1173);
6. термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad Life Science Group, США (регистрационное удостоверение № 2004/75)
7. оборудование лабораторное для исследований методом электрофореза BIO-RAD Laboratories, США (регистрационное удостоверение № 2004/1246);
8. набор сывороток антилейкоцитарных HLA-A, B, C, DR гистотипирующих жидких (HLA) «HLA-сыворотки» (регистрационный № ФСР 2008/02431) ЗАО МЦИиГР «Гисанс» Санкт-Петербург;

9. наконечники полимерные одноразовые к дозаторам пипеточным НП-«Термо-Фишер Сайентифик», Россия (регистрационный № ФСР 2007/01431);
10. набор реагентов для типирования генов главного комплекса гистосовместимости человека *in vitro* «ПРОТРАНС», Германия, (регистрационный № ФСЗ 2009/03600).

### ***Описание медицинской технологии***

Лимфоциты периферической крови потенциальных реципиентов почечного трансплантата исследуют методом серологического типирования для определения HLA-A, B антигенов, и методом молекулярного типирования для определения HLA-DRB1 генов.

Для исследования как антигенов, так и генов I и II классов системы HLA используют периферическую венозную кровь с добавленным к ней антикоагулянтом (цитратом натрия) в стандартном соотношении.

#### Исследование антигенов I класса системы HLA (локусов A и B)

Определение антигенов I класса системы HLA (локусов A и B) проводят методом серологического типирования в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (ЛЦТТ).

Для проведения ЛЦТТ из периферической крови обследуемого лица выделяют лимфоциты по методу Woym (1974). Жизнеспособность выделенных клеток должна быть не менее 90%.

#### Проведение ЛЦТТ

В каждую лунку микропланшета с анти-HLA-сыворотками вносят по 1,0 мкл взвеси выделенных лимфоцитов в концентрации  $2 \times 10^6$ /мл. Инкубируют планшеты при температуре 22°C в течение 30 минут. По окончании инкубации в каждую лунку вносят по 5,0 мкл кроличьего комплемента и продолжают инкубировать при тех же температурных условиях в течение 60 минут.

Для дифференциации живых (интактных) и погибших лимфоцитов в каждую лунку вносят по 2,0 мкл 5% раствора эозина и через 2-5 минут фиксируют результат, добавив в каждую лунку 5,0 мкл 40% формальдегида (pH 7,2). Учет реакции производят при помощи светового инвертированного микроскопа не ранее, чем через 30 минут после фиксации (для осаждения клеток в лунке планшет). Результат реакции оценивают в баллах, по 8-балльной системе, соответственно количеству погибших клеток (Таблица 1).

## Молекулярное типирование генов системы HLA

Использование молекулярного типирования, основанного на анализе ДНК, дает возможность точной идентификации всего многообразия генов системы HLA. Этот метод отличается высокой чувствительностью, специфичностью, небольшими временными затратами для получения результата. Молекулярное типирование позволяет выявлять как группы аллелей генов HLA, соответствующих серологически определяемым специфичностям – низкоразрешающее (базовое) типирование, так и идентифицировать отдельные аллели – высокоразрешающее типирование.

Для проведения этого исследования необходимо:

- выделить геномную ДНК
- провести полимеразную цепную реакцию
- осуществить детекцию и визуализацию полученных результатов.

### Выделение ДНК

Существует несколько методов выделения геномной ДНК. Большинство из них включает депротеинизацию, экстракцию в органических растворителях и спиртовую преципитацию. Для применения метода молекулярного типирования HLA-генов первоначально необходимо выделить геномную ДНК в достаточном количестве и с чистотой, пригодной для полимеразной цепной реакции (OD 260\280 равно 1,6-1,8). ДНК может быть выделена из ядерных клеток человека. Конечная концентрация ДНК должна быть приблизительно 50 нг\мкл. Не рекомендуется использование гепаринизированной крови. Выделение ДНК осуществляется в отдельном помещении в боксе с использованием одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим дозаторам. Процедура выделения выполняется в строгом соответствии с инструкцией, прилагаемой к каждому набору. ДНК может быть выделена из ядерных клеток человека любым подходящим методом.

ДНК может храниться при -20\*С и ниже в течение длительного периода времени (> 1 года) без разрушения. Хранение ДНК при 4\*С в течение длительного периода времени будет приводить к деградации и росту неспецифической амплификации

### Полимеразная цепная реакция

Молекулярное типирование генов HLA может проводиться разными методами, наиболее широко в настоящее время в лабораториях используются SSP и SSOP методы. Оба метода, и SSP, и SSOP могут использоваться как для низкоразрешающего

(базового), так и для высокоразрешающего молекулярного типирования генов системы HLA локусов A\*, B\*, DRB1\*, DQB\*. В данной технологии использовался метод SSP с применением реагентов для HLA-генотипирования фирмы «ПРОТРАНС», Германия). Постановка полимеразной цепной реакции должна проводиться в строгом соответствии с инструкцией, прилагаемой к набору реагентов.

#### Детекция полученных результатов

При использовании метода SSP детекцию результатов осуществляют посредством электрофореза в агарозном геле. Успешная амплификация приводит к образованию фрагмента ДНК определенной длины, который выглядит в ультрафиолетовом свете в геле, окрашенном этидиум бромидом, как светящаяся полоса. Детекцию ПЦР - продукта, гибридизированного с олигонуклеотидами, при использовании SSOP метода проводят визуально: положительный результат выглядит как преципитат синего цвета на соответствующих линиях нейлоновой мембраны.

#### Определение HLA-антител

Определение HLA-антител в сыворотках, полученных из крови потенциальных реципиентов почечного трансплантата, проводят 1 раз в 3 месяца. Если пациент получал гемотрансфузии образцы сывороток исследуют на наличие HLA-антител через 14 дней. Исследование проводят с помощью стандартного ЛЦТТ с использованием панели донорских лимфоцитов, выделенных из крови 60 доноров с установленным HLA-фенотипом. Клеточную панель подбирают таким образом, чтобы были максимально представлены все известные HLA-антигены.

#### Определение аутореактивных лимфоцитотоксических антител (IgM)

Известно, что в крови пациентов могут содержаться лимфоцитотоксические антитела класса IgM (антилимфоцитарные аутоантитела), не оказывающие влияния на приживление трансплантата в отличие от собственно HLA-антител класса IgG. IgM антитела обладают широкой реактивностью с собственными клетками пациента, а также с лимфоцитами большинства других индивидов и обычно не имеют клинического значения, так как не вызывают иммунологических реакций при трансфузии и трансплантации. Однако в лабораторных условиях они могут обуславливать положительные реакции при постановке перекрестной пробы на индивидуальную совместимость, что приводит к необоснованному отказу от проведения трансплантации от данного потенциального донора .

Модификация лимфоцитотоксического теста с помощью ДТТ используется для разрушения IgM антител, что позволяет выявить истинную сенсibilизацию, обусловленную антителами IgG класса. Присутствие IgM антител выявляют при помощи обработки сывороток сульфгидрильным раствором – дитиотреитолом (ДТТ), действие которого заключается в избирательном разрушении дисульфидных связей, поддерживающих структуру молекулы IgM. В образцы сывороток, содержащих HLA-антитела, добавляют 0,005M раствор ДТТ. Инкубируют при 37°C в течение 30 мин для инактивации всех IgM антител.

Затем сыворотки реципиентов исследуют в стандартном лимфоцитотоксическом тесте (в дубле), используя панель донорских лимфоцитов, выделенных из крови 60-ти доноров с установленным HLA-фенотипом. Кроме стандартных положительных и отрицательных контролей, в панели используют дополнительно положительный и отрицательный контроль с добавлением ДТТ для оценки клеточной жизнеспособности и подтверждения отсутствия инактивации IgG антител после обработки ДТТ.

Считывание результатов с помощью микроскопа осуществляют через 60 минут (после оседания лимфоцитов). Интерпретацию результатов проводят в соответствии со следующими параметрами:

если после обработки сыворотки ДТТ лимфоцитотоксический тест отрицателен, то, соответственно, сыворотка содержала IgM антитела;

если после обработки сыворотки ДТТ отмечается частичное уменьшение цитотоксической активности сыворотки, то, следовательно, реакция обусловлена как IgG, так и IgM антителами;

если после обработки сыворотки ДТТ цитотоксичность сохраняется, следовательно, реакция происходит исключительно за счет IgG антител.

Статистические методы включают в себя расчет и анализ следующих показателей: определение частоты встречаемости антигенов, определение достоверности различия частот HLA-антигенов и процент панель реактивных антител.

Частоту антигена (F) рассчитывали по отношению числа больных, в фенотипе которых есть данный антиген, к общему числу обследованных в данной группе (Зарецкая Ю.М., 1983):

$F=n/N$ , где n – число больных, в фенотипе которых есть данный антиген, а N – общее число обследованных больных.

Для определения достоверности различий частот HLA-антигенов и их сочетаний в сравниваемых группах потенциальных реципиентов почечного трансплантата использовался критерий  $\chi^2$  (Svejgaard A., 1994). Кроме того, учитывая, что HLA-система



является полиаллельной, при оценке достоверности различий в распределении признака велся расчет "p-корректированного" (Певницкий Л.А., 1988).

$P(\text{корр.}) = n * p (1 - p)^{-1}$ , где n - исследованное количество признаков.

Значения  $\chi^2$ , превышающие 3,841 (что соответствует  $P < 0,05$ ), рассматривали как показатель достоверной разницы между частотами в сравниваемых группах.

Уровень HLA-сенсibilизации больного определяют как процент панель-реактивных антител (%ПРА) при исследовании сывороточных образцов, выделенных из крови потенциальных реципиентов почечного трансплантата, рассчитывая отношение числа образцов лимфоцитов, вызывающих положительную реакцию, к общему числу образцов лимфоцитов в панели.

### ***Возможные осложнения и способы их устранения***

Возможные осложнения: получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов при выполнении исследования.

Меры по предотвращению:

1. Строгое соблюдение рекомендованных стандартной методикой значений pH для всех используемых реагентов, длительности и температурного режима теста.
2. Особого внимания требует соблюдение правил работы с комплементом: растворять лиофилизированный комплемент необходимо дистиллированной водой (pH 7,2-7,4) непосредственно перед использованием, держать в момент использования в тающем льду. Следует осторожно пипетировать раствор комплемента, избегая вспенивания, которое снижает его активность. Повторное замораживание комплемента для последующего использования недопустимо.

Возможные технические ошибки при постановке лимфоцитотоксического теста представлены в таблице 2.

### ***Эффективность использования новой медицинской технологии***

Обследовано 747 больных, пациентов с хронической почечной недостаточностью (ХПН), получавших трансфузии гемокомпонентов. Больные в течение различных сроков - от 1 года до 15 лет – находились на лечении в отделениях гемодиализа ЛПУ г. Санкт-Петербурга и являлись потенциальными реципиентами почечного трансплантата. Из обследованной группы 8,7% пациентов было в возрасте 5-25 лет, 71,8% в возрасте 26-55 лет и 19,5% - 56-70 лет, в том числе мужчин – 435, женщин – 312. По первичным патологическим состояниям, явившимся причиной ХПН, больные распределялись следующим образом: хронический гломерулонефрит - 81,7%, аномалии

развития почек – 9,4%, хронический пиелонефрит – 1,9%, диабетическая нефропатия – 1,7%, заболевания соединительной ткани и системные васкулиты - 1,5% и другие заболевания – 3,8%.

Все обследованные больные получали нефилтрованную эритроцитную массу (ЭМ) и свежезамороженную плазму (СЗП), при этом содержание лейкоцитов в переливаемых компонентах превышало  $1 \times 10^6$  клеток на трансфузию в каждой дозе эритроцитной массы и  $1 \times 10^4$  - в свежезамороженной плазме.

Популяционным контролем при определении HLA-антигенов I класса служила группа из 3238 доноров крови РосНИИГТ, представленная жителями Санкт-Петербурга в возрасте от 20 до 65 лет, для локуса DRB1\* - 346 человек.

Изучение частоты образования антител к HLA-антигенам у обследуемых больных показало, что у 283 человек (37,9%) в сыворотке присутствуют HLA-антитела, направленные к перекрестно-реагирующим группам антигенов, при этом чаще всего антитела направлены к самым распространенным из них: A2C (50%) и B7C (44,4%).

При анализе уровня HLA-сенсibilизации больные были распределены на 3 группы: низкосенсibilизированные (НС), индекс сенсibilизации которых составил менее 9%, среднесенсibilизированные (СС), индекс сенсibilизации которых был от 10% до 50%, и высокосенсibilизированные (ВС), с индексом сенсibilизации от 51 до 100%. При этом 43,1% пациентов имели низкий уровень сенсibilизации, 35,3% – средний, и 21,6% обследуемых оказались высокосенсibilизированными.

Анализ специфической направленности антител показал, что у 70,5% низкосенсibilизированных реципиентов специфичность антител является неопределяемой, так как встречаются лишь единичные реакции сывороток с клеточными образцами. Такие антитела обнаружены только среди низкосенсibilизированных больных. Больные со средним и высоким уровнем сенсibilизации значительно различались между собой: у среднесенсibilизированных пациентов большую часть антител (61%) составили моноспецифические антитела, а у высокосенсibilизированных больных, наоборот, только в 16,4% случаев антитела имеют моноспецифическую направленность, и в подавляющем большинстве (83,6%) являются полиспецифическими. А как известно, чем больше полиспецифических антител у больных, тем чаще могут возникать у них посттрансфузионные реакции (рис. 1).

Поскольку все обследуемые больные являлись потенциальными реципиентами почечного трансплантата, выявление HLA-антител у них особенно важно, так как эти антитела являются причиной острого и даже гиперострого отторжения трансплантата.

Важным моментом при решении вопроса о возможности проведения трансплантации являются результаты перекрестной пробы на индивидуальную совместимость – заключительного кросс-матча. При наличии положительного результата при проведении этой пробы трансплантация не осуществляется. При проведении пробы на индивидуальную совместимость у низкосенсибилизированных больных отрицательные результаты кросс-матча с клетками предполагаемых доноров составили в среднем 94,6%. При этом, если у реципиентов со средним уровнем сенсибилизации частота отрицательного кросс-матча достигала 76,1%, то для высокосенсибилизированных реципиентов подобрать донорский орган очень сложно, так как всего лишь у 31,4% реципиентов кросс-матч был отрицательным (рис 2).

При сравнении распределения специфичностей HLA I и II класса у реципиентов с различным уровнем сенсибилизации была установлена положительная ассоциация сенсибилизации с антигеном A25 (21,3% vs 10,3%  $\chi^2=23,83$ ) и геном HLA-DRB1\*03 (33,3% vs 15,0%  $\chi^2=52,98$ ) (рис. 3). Соответственно, эти специфичности можно рассматривать в качестве маркеров генетической предрасположенности к развитию сенсибилизации. Протективное значение в отношении развития сенсибилизации имеет ген HLA-DRB1\*01 (11,2% vs 30,2%  $\chi^2=54,71$ ), который в группе сенсибилизированных больных встречался значительно реже.

Анализ частоты встречаемости гаплотипа HLA-A1,B8,DRB1\*03, характерного для лиц с высоким иммунным ответом, показал, что самой высокой она была в группе высокосенсибилизированных пациентов (19,4% vs 3,5% в контроле,  $\chi^2=29,9$ ) (рис. 4). Это свидетельствует о значительном влиянии HLA-гаплотипа на антителообразование у больных, получающих гемоконпонентную терапию. Однако, как было показано выше, наибольшее влияние на частоту антителообразования к антигенам главного комплекса гистосовместимости имеет именно ген DRB1\*03 в данном гаплотипе.

При сопоставлении частоты сенсибилизации больных с числом гемотрансфузий, подтвердилось, что кратность гемотрансфузий является одним из наиболее существенных факторов, влияющих на развитие HLA-сенсибилизации: у больных с длительным сроком нахождения на гемодиализе, а, соответственно, с увеличением числа получаемых ими трансфузий гемоконпонентов, частота HLA-сенсибилизации увеличилась от 13,8% до 47,2% (табл. 3).

При сравнении числа сенсибилизированных среди женщин и мужчин, выявлено, что в целом у женщин уровень сенсибилизации незначительно выше, чем у мужчин: 40,4% vs 36,1%. Однако высокосенсибилизированные пациенты среди женщин встречаются почти в 3 раза чаще, чем среди мужчин: 32,5% vs 12,7% ( $\chi^2=16,21$ ,

$p < 0,001$ ), что связано, очевидно, с предшествующей сенсibilизацией женщин HLA-антигенами плода во время беременности.

Изучение частоты встречаемости IgG и IgM антител у потенциальных реципиентов почечного трансплантата, получающих ЭМ и СЗП, заготовленные стандартным способом, показало, что в 24,7% случаев в сыворотке крови потенциальных реципиентов почки присутствуют только IgM антитела, что позволяет продолжить поиск трансплантата, так как сенсibilизация, связанная с наличием IgM антител, не оказывает отрицательного воздействия на его приживление. У 31,2% больных были выявлены только IgG антитела, а у 44,1% смешанные IgM и IgG антитела (рис. 5).

При этом большинство больных с наличием только IgM антител (60,9%) являются низкосенсibilизированными, а остальные относятся к группе со средним и высоким уровнем сенсibilизации. Напротив, в группе больных с наличием только IgG антител более половины пациентов (55,2%) относятся к высокосенсibilизированным и меньшинство (20,7%) – к низкосенсibilизированным больным.

При изучении динамики содержания IgG и IgM антител в сыворотках больных мы установили, что в подавляющем большинстве случаев у реципиентов с наличием только IgM антител, сенсibilизация значительно снижалась в течение 3 месяцев при отсутствии сенсibilизирующих воздействий. В отличие от больных с IgM антителами у пациентов, у которых были выявлены только IgG антитела, в течение 6 месяцев в 76% случаев уровень ПРА не изменился, и только у 16% больных сенсibilизация снизилась при прекращении сенсibilизирующего воздействия гемокомпонентов.

Таким образом, среди сенсibilизированных пациентов выявлена группа больных с IgM-антителами, не оказывающими отрицательного влияния на выживаемость аллотрансплантата. Это позволяет считать таких пациентов лицами с отсутствием сенсibilизации к HLA-антигенам и продолжить подбор совместимого донора для этой категории больных. Анализ динамики содержания IgM антител показал, что в большинстве случаев сенсibilизация, обусловленная их наличием, имеет тенденцию к широким колебаниям, но, как правило, в большинстве случаев уменьшается и может исчезать в течение 1-3 месяцев.

На основании выявленных закономерностей образования аутоантител и изменения их содержания в динамике разработана схема обследования и мониторинга содержания антител у потенциальных реципиентов почечного трансплантата, которая позволит оптимизировать подбор аллотрансплантата (схема 1).

Обследование на наличие антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости в соответствии с разработанным алгоритмом позволяет определять IgM и IgG антитела у потенциальных реципиентов почечного трансплантата. Пациентам группы риска развития высокой степени сенсибилизации (женщины и больные с наличием в генотипе специфичностей A25 и DRB1\*03, гаплотипа A1,B8,DRB1\*03) следует назначать гемокомпонентную терапию только по жизненным показаниям, использовать лейкофильтрованные гемокомпоненты и подбирать доноров, совместимых по HLA-антигенам, особенно при трансфузии концентрата тромбоцитов. Потенциальным реципиентам почки из группы риска необходимо подбирать трансплантат, максимально совместимый по HLA-антигенам.

### **Список литературы**

1. Головкина Л.Л., Стремаухова А.Г., Кутьина Р.М., Зотиков Е.А. Подходы к выбору доноров больным с иммунологической рефрактерностью к трансфузиям тромбоцитов // Актуальные. вопросы гематологии и трансфузиологии: Мат. Рос. науч.-практ. конф. - СПб., 2000. - С. 241-242
2. Колосков А.В., Селиванов Е.А., Мосягин В.Б., Белашко Н.Н., Бройко О.Е., Зуйкова О.Н., Котиков Р.В., Пильник Л.Ю., Филиппова О.И. Применение карантинизированных криоконсервированных эритроцитов для лечения анемического синдрома при острой кровопотере // Материалы третьей республиканской научно- практической конференции «Актуальные вопросы организации экстренной медицинской помощи: проблемы кровотечений в экстренной медицине» - Ташкент, 2003. - С.408 - 409.
3. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Клиническая трансфузиология. // М.: ГЕОТАР-Медицина; 1998.
4. Хаитов Р.М. Геномика HLA: новые возможности молекулярной генетики человека в диагностике и терапии / Р.М. Хаитов, Л.П. Алексеев // Молекулярная медицина. - 2003. - №1. - с. 17 - 30.
5. Boym A. //Tussue Antigens. – 1974. – Vol.4. – P.269-274.
6. Dausset J., Snell D., Nathenson S. Histocompatibility. // Academic Press, 1976.
7. Dyer P., Middleton. Histocompatibility testing // Oxford Press, 1993
8. Opelz G., Terasaki P. Dominant effect of transfusions on kidney graft survival. // Transplantation., 1980, vol. 29, N2, p. 153
9. Opelz G. Collaborative Transplant Study. Non-HLA transplantation immunity revealed by cytotoxic antibodies // Lancet. – 2005. – Vol. 365, N 9470. – P.1570-1576/
10. Rodey G. HLA Beyond Tears. // Introduction to Human Histocompatibility, Second Edition. - De Novo, Inc., Durango, CO, 2000.
11. Roelen D., van Bree J., Witvliet M. et al. IgG antibodies against an HLA antigen are associated with activated cytotoxic T cells against this antigen, IgM are not // Transplantation. – 2004. – Vol.57, N 9. – P.1388-1392.

### **Список сокращений:**

ДТТ – дитиотреитол  
КЗЛЦТТ – комплемент-зависимый лимфоцитотоксический тест  
ПРА – панель-реактивные антитела  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
СЗП – свежезамороженная плазма  
ЭМ – эритроцитная масса

Оценка результатов ЛЦТТ

% погибших клеток	Оценка реакции	Оценка в баллах
0%-10%	Отрицательная	1
11%-20%	Сомнительно-отрицательная	2
21%-50%	Слабо-положительная	4
51%-80%	Положительная	6
81%-100%	Сильно-положительная	8

Таблица 2

Причины ложно-положительных и ложно-отрицательных реакций при проведении ЛЦТТ

Причины реакций		
	ложно-положительных	ложно-отрицательных
1	Низкая жизнеспособность лимфоцитов	Неактивность комплемента
2	Примесь гранулоцитов	Несмешение клеток с антисыворотками
3	Несоблюдение рН при приготовлении реагентов	Несмешение реакционной смеси с комплементом
4	Увеличение температуры инкубации	Низкая температура при инкубации
5	Увеличение времени инкубации	Укорочение времени инкубации
6	Бактериальное или грибковое загрязнение реагентов	Сниженная экспрессия HLA антигенов на поверхностной мембране исследуемых лимфоцитов
7	Невнесение в лунки микропланшета формалина	Большая примесь тромбоцитов в исследуемой взвеси лимфоцитов

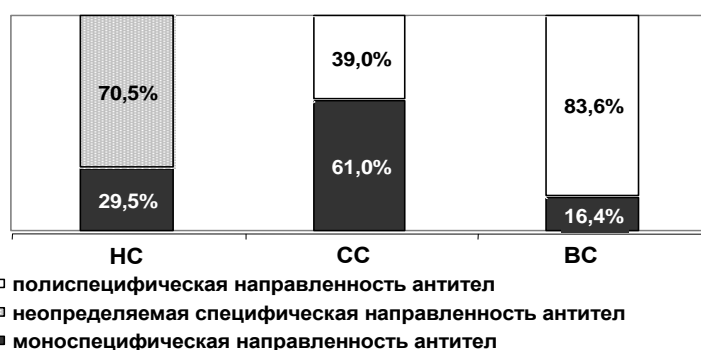
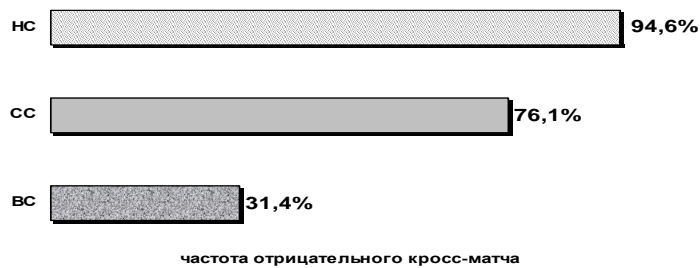
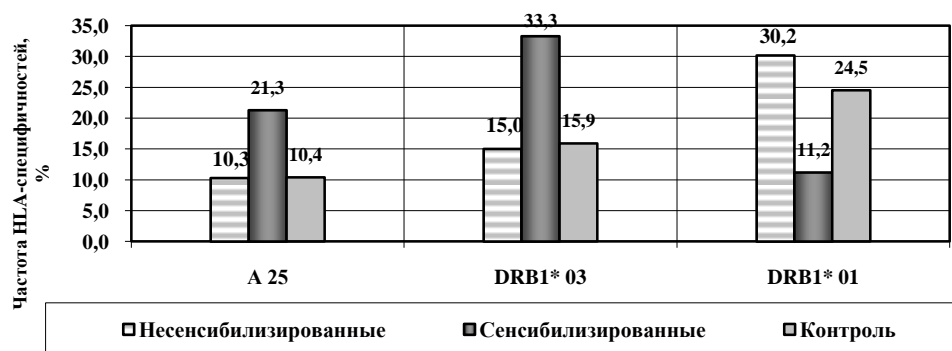


Рис 1. Направленность антител у больных с разным уровнем сенсибилизации.

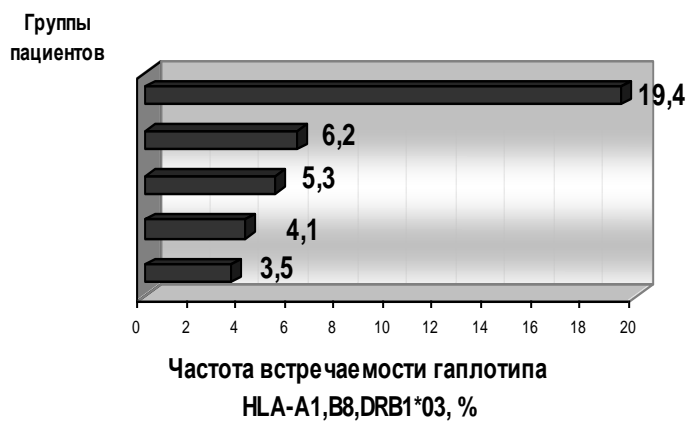


**Рис 2. Частота отрицательного кросс-матча у больных с разным уровнем HLA-сенсibilизации.**



**Рис 3. Связь HLA-фенотипа с развитием сенсibilизации у больных.**





несенсибилизированные  
контроль

Рис. 4. Частота встречаемости гаплотипа HLA-A1, B8, DRB1\*03 среди больных с различным уровнем сенсибилизации

Таблица 3.  
Распределение больных по уровню сенсибилизации к HLA-антигенам в зависимости от длительности нахождения на гемодиализе.

Время нахождения на гемодиализе	Больные с HLA-антителами n / %	Больные без HLA-антител n / %	Всего, n
1-2 года	4/13,8	25/86,2	29
3-5 лет	25/37,8	41/62,1	66
6-8 лет	17/47,2	19/52,8	36

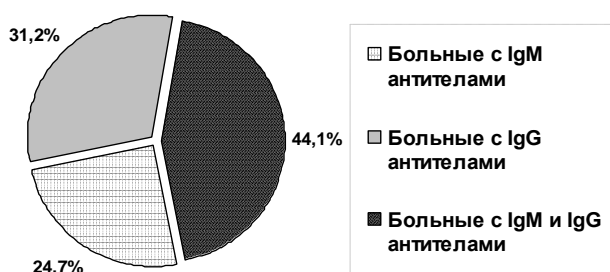
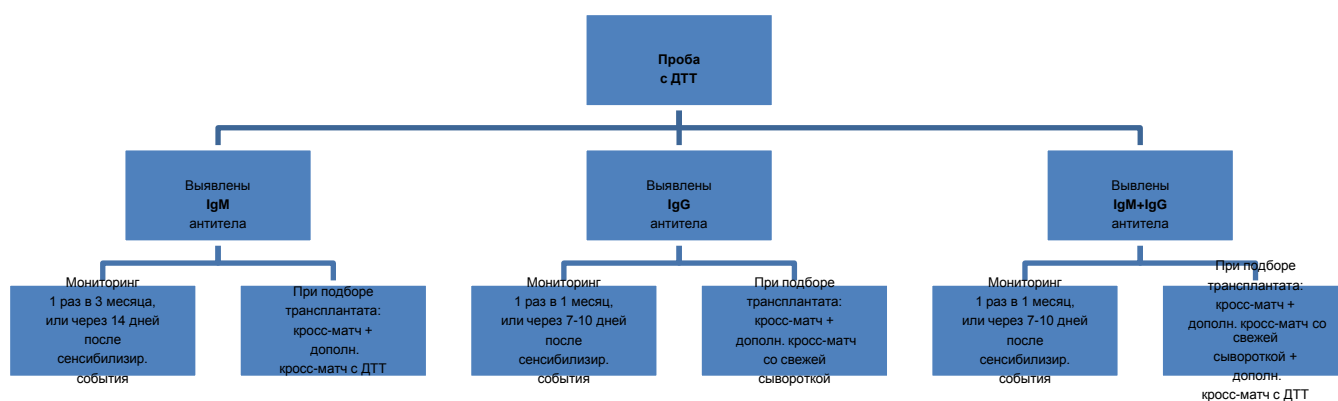


Рис. 5. Распределение IgG и IgM антител среди потенциальных реципиентов почечного трансплантата.

Схема 1



↓ ↓

Профилактические мероприятия для предупреждения сенсибилизации в до- и посттрансплантационный периоды и при подборе тарнсплантата

