

Трансплантология: иммунологические маркеры

29

Клиническая практика трансплантации	328
Инфекционные осложнения	329
HLA-типирование	331

NEW

сокращения раздела:

РТПХ – реакция трансплантат против
хозяина

Попытки замещения больных органов трансплантатом здоровой ткани осуществляются в медицине давно, но очень часто не дают успеха, поскольку организм стремится отторгнуть ткань, пересаженную от другого человека. Отторжение трансплантата характеризуется иммунологической специфичностью и может происходить по типу вторичного иммунного ответа; оно обусловлено активностью лимфоцитов и сопровождается образованием антител, специфичных к антигенам трансплантата. Основная роль в раннем остром отторжении трансплантата, протекающем по типу первичного иммунного ответа, принадлежит CD8⁺ лимфоцитам (цитотоксическим Т-клеткам). Сверхострое отторжение, протекающее в течение нескольких минут, вызывают ранее синтезированные антитела. Хроническое или позднее отторжение обусловлено секрецией провоспалительных цитокинов макрофагами в сосудистой стенке. Острая форма характеризуется тяжелыми поражениями кожи, печени и кишечника, тогда как хроническая форма по своим проявлениям сходна со склеродермией. Причиной развивающегося атеросклероза может быть также отложение антител к антигенам донора или иммунных комплексов.

Клиническая практика трансплантации

Трансплантаты роговицы и хрящей лишены сосудов и сравнительно хорошо приживаются после пересадки. Трансплантация почки дает отличные результаты, хотя, как правило, требует постоянного применения иммуносупрессивной терапии. Высокая доля успешных пересадок отмечается при трансплантации сердца, печени и (в несколько меньшей степени) легкого. Трансплантация костного мозга в случаях иммунодефицитов и апластической анемии дает наилучший результат при использовании в качестве доноров совместимых сибсов; осложнения при пересадке аллогенного костного мозга связаны с тем, что трудно исключить возникновение реакции трансплантат против хозяина (РТПХ).

В клинической практике возможно использование некоторых маркеров, по уровню которых судят о начинающейся инфильтрации (отторжении) пересаженной ткани.

Кальпротектин (MRP8, S100A8/A9)

MRP8 и MRP14 – белки, высоко экспрессируемые нейтрофилами в стадии покоя, кератиноцитами, инфильтрованной тканью, макрофагами, эпителиальными клетками при активном воспалительном процессе. Фагоциты экспрессируют как MRP8 так и MRP14. Два белка формируют Са-зависимые гомо- или гетерокомплексы, разные по составу. Помимо антибактериальной активности и участия в транспорте жирных кислот, MRP8/14 является сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов и моноцитов.

Подтверждено, что MRP8/14 – ранний и высоко специфичный маркер острого отторжения почечно-го трансплантата. Так как биопсия почки, которая все еще остается стандартным методом в диагностике острого отторжения, не может выполняться ежедневно, а анализ цитокинов не коррелирует воспроизводимо с процессами отторжения, надежный, чувствительный и специфичный ранний маркер острого отторжения до последнего времени отсутствовал. После трансплантации почки уровень MRP8/14 в сыворотке растет при взаимодействии инфильтрующих лимфоцитов с эндотелиальными клетками и при начинающейся инфильтрации ими пересаженной ткани. Это происходит приблизительно за 5 дней до деструктивного снижения функциональных параметров органа.

Кроме того, MRP8/14 – повсеместно встречающийся воспалительный маркер, что предполагает большое разнообразие возможного использования его как в дифференциальной диагностике (например, при воспалительных заболеваниях кишечника), так и при мониторинге эффективности терапии (множественный склероз).

Неоптерин

Неоптерин является промежуточным продуктом в синтезе биоптерина, участвующего в активации лимфоцитов. Неоптерин впервые был обнаружен в личинках пчел, в рабочих пчелах и в маточном молочке. Химическая структура неоптерина была определена путем сравнения со вновь синтезированным веществом – 2-амино-4-гидрокси-6-(D-эритро-1',2',3'-тригидроксипропил)-птеридином.

Измерение содержания неоптерина позволяет определить общее состояние иммунной системы и взаимодействия в популяции моноцитов/макрофагов. В трансплантологии клиническое значение определения неоптерина обусловлено возможностью с его помощью не только диагностировать, но и прогнозировать развитие у реципиентов иммунопатологических осложнений в виде реакции отторжения и инфекции. Повышение уровня неоптерина сопровождает реакцию отторжения, причем в ряде случаев увеличение содержания неоптерина предшествует появлению клинических проявлений. Стабильно нормальный уровень неоптерина является показателем того, что развитие иммунологического конфликта маловероятно. Повышение концентрации неоптерина не позволяет различить острую реакцию отторжения и присоединение инфекции. Сочетание тестов на неоптерин и С-реактивный белок позволяет повысить эффективность лабораторного мониторинга больных после трансплантации сердца, дополнительно к использованию инвазивного метода эндомикардиальной биопсии.

С-реактивный белок (СРБ)

СРБ – один из самых чувствительных и ранних индикаторов воспаления, вызванного бактериальными инфекциями и иммунопатологическими заболеваниями. В трансплантологии при гладком течении послеоперационного периода наблюдается повышение концентрации СРБ с пиком на 2-3 день и последующим постепенным его снижением. Развитие инфекционных осложнений вызывает рост концентрации СРБ. Реакция отторжения трансплантата не дает однозначных результатов. Отторжение аллотрансплантатов сердца и печени не сопровождается заметным повышением уровня СРБ, тогда как отторжение почечного трансплантата сопровождается значительным ростом его уровня за 2 дня до появления первых клинических признаков. После пересадки костного мозга нередко возникает РТПХ, также приводящая к увеличению содержания СРБ в плазме, хотя в любом из этих случаев увеличение концентрации СРБ менее значительно, нежели при инфекционных осложнениях.

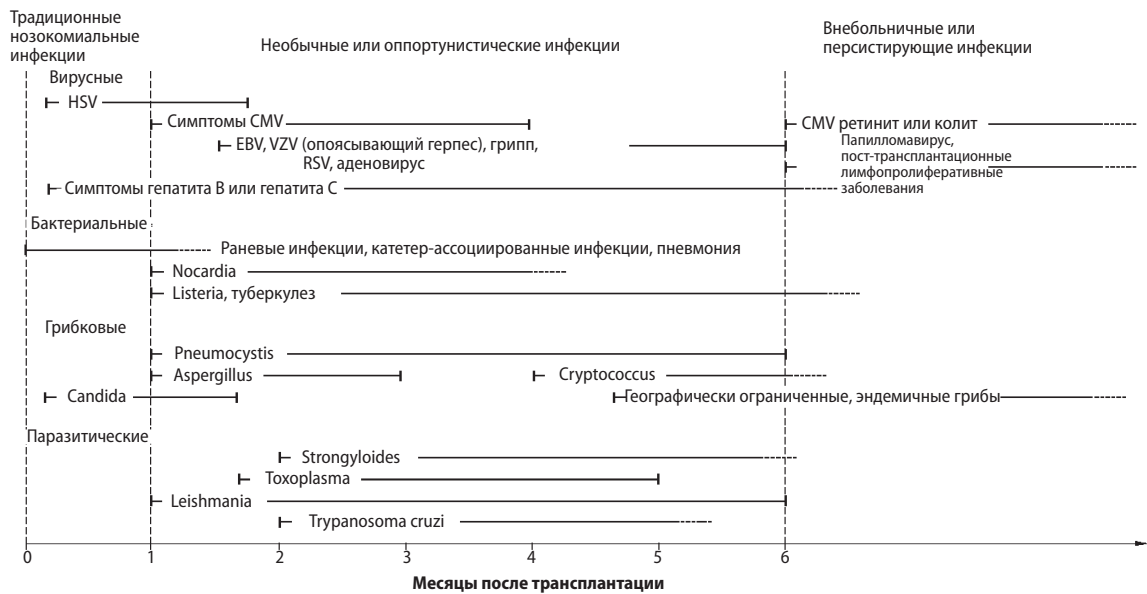
Гомоцистеин

Болезнь коронарных артерий пересаженного сердца – форма быстро прогрессирующего коронарного синдрома, характеризующаяся дисфункцией эндотелия и множественными очагами гиперплазии интимы.* Измерение уровня гомоцистеина рекомендуется включить в протокол обследования пациентов с застойной сердечной недостаточностью, ожидающих трансплантацию сердца, а также реципиентов в отдаленные сроки после трансплантации сердца с интервалом в 3-6 мес. В течение первого года после трансплантации сердца у всех реципиентов обнаруживается умеренная, либо средняя гипергомоцистеинемия, которая имеет преходящий характер. В течение этого периода может происходить повреждение сосудов пересаженного сердца. Чтобы этого избежать, всем реципиентам в течение первого года после трансплантации сердца целесообразно проведение терапии, направленной на снижение гомоцистеина, а также проведение мониторинга эффективности лечения. После трансплантации почки уровень гомоцистеина также повышается, и этот уровень превышает уровень гомоцистеина у больных с почечной недостаточностью.

Инфекционные осложнения

Риск инфекций у реципиентов трансплантаций определяется, в основном, двумя факторами: интенсивностью воздействия потенциальных патогенов (в больничных и внебольничных условиях) и комплексом факторов, которые вносят свой вклад в воспри-

• см. также: раздел «Маркеры дисфункции эндотелия», стр. 49



Обычная последовательность инфекций после трансплантологии органов (По Fishman, Rubin, 1998)

имчивость пациента к инфекциям: К числу последних можно отнести:

- Иммуносупрессивная терапия: доза, продолжительность и последовательность
- Иммунодефицит: аутоиммунные заболевания, функциональный иммунный дефицит
- Целостность слизисто-кожного барьера
- Нежизнеспособные ткани, накопление жидкости
- Нейтропения, лимфопения
- Метаболические условия: уремия, нарушение питания, диабет, алкоголизм и цирроз
- Инфицирование иммуноактивными вирусами: CMV, EBV, HCV, HBV, HIV

Иммуносупрессивные программы, используемые при всех формах трансплантации органов имеют сходство. Поэтому обычно наблюдается похожий порядок развития различных инфекций после трансплантации (рис.).

Претрансплантационный скрининг предназначен для того, чтобы предотвратить тяжелые пост-трансплантационные инфекции, путем либо исключения донора, либо выявления необходимости специфической антимикробной терапии после трансплантации. Особую важность при этом имеет тестирование на HBV, HCV, HIV. Так, показано, что эффективность передачи HBV или HIV от инфицированного донора составляет 100%. Риск передачи HCV при пересадке непеченочного трансплантата от донора, позитивного на анти-HCV, составляет около 50%; а от донора, чья кровь содержит РНК HCV – 100%. Доноры и реципиенты трансплантаций также подвергаются серологическим исследованиям на предмет выявления других латентных инфекций,

которые могут передаваться с трансплантатом: CMV, EBV, *Toxoplasma gondii*, сифилис и пр. Особую опасность представляет посттрансплантационный туберкулез (в среднем, частота в мире около 0,8%), поэтому целесообразны исследования, позволяющие выявить риск реактивации заболевания, которая может последовать за трансплантацией. Пациенты, серонегативные в отношении VZV перед трансплантацией должны обязательно подвергаться специальным профилактическим мероприятиям для предотвращения заражения после проведения трансплантации.

К инфекциям чрезвычайной важности у реципиентов относятся CMV, EBV, HHV6, HHV8, B19V, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Aspergillus fumigatus* и др. •

Белки, связывающие жирные кислоты (FABP)

FABP является одним из цитоплазматических компонентов, вовлеченных в метаболизм жирных кислот. Не так давно было показано, что этот белок является новым многообещающим маркером для быстрого и чувствительного выявления миокардиального повреждения вследствие ишемии. FABP относительно небольшие (15 кДа) внутриклеточные белки, постоянно экспрессируются в тканях с активным метаболизмом жирных кислот – в сердце (H-FABP), печени (L-FABP), кишечнике (I-FABP) и мозге (B-FABP). Целый ряд исследований убедительно подтвердил возможность использования H-FABP в качестве маркера миокардиального повреждения. Предварительные результаты показали, что

• **См. также:** раздел «Диагностика инфекций», стр. 242

по чувствительности, исключительной значимости и прогностической ценности H-FABP значительно превосходит стандартный ранний маркер миоглобин. В печени содержится только L-FABP, а в почках наблюдается ко-экспрессия H-FABP и L-FABP. Так же I-FABP и L-FABP обнаружены в кишечнике, а B-FABP и H-FABP – в мозге. Есть серьезные предпосылки для применения этих белков в качестве биохимических маркеров при отторжении печени, отборе жизнеспособных почек от доноров с остановкой сердца, воспалительных и ишемических заболеваниях кишечника, травматических повреждениях мозга и в предотвращении повреждения мышц у тренированных атлетов.

C4d

Циркулирующие аллоантитела в качестве первой мишени сталкиваются с трансплантированным эндотелием. Жизнеспособные клетки эндотелия могут быстро элиминировать связавшиеся антитела с поверхности посредством кеппинга, шеддинга или интернализации. C4d является продуктом компонента C4 комплемента (классический путь каскада), обычно активируемого при связывании антител со специфическими молекулами-мишенями. Определение C4d считается непрямым признаком антительного ответа против трансплантата. К настоящему моменту опубликовано множество работ, посвященных C4d-маркеру отторжения трансплантированных почек, сердца, печени и др.

ЗАО «Биохиммак» предлагает уникальный метод определения C4d в парафиновых средах.

Растворимый рецептор IL-2 (sIL-2R, CD25)

CD25 является высокоаффинным рецептором для IL-2 и состоит из субъединиц α (p55) и β (p70). Субъединица IL-2R β является постоянным компонентом мембран лимфоцитов, а субъединица IL-2R α экспрессируется при связывании с IL-2. Эта субъединица соответствует низкоаффинному рецептору IL-2, и увеличение ее количества указывает на активацию клеток. После активации часть субъединицы высвобождается из мембраны, превращаясь в растворимый рецептор IL-2 (sIL-2R) – циркулирующий маркер клеточной активации. Определение уровня sIL-2R позволяет детектировать и контролировать активацию Т-клеток после трансплантации органов (пересадки почек и др.). Измерение концентрации sIL-2R в сыворотке крови может быть использовано для постановки точного диагноза.

Антитела к Core-региону эндотоксина (EndoCab)

Эндотоксины считаются одной из основных причин развития воспалительного ответа. Последний включает в себя миокардиальную дисфункцию, повышенную потребность тканей в кислороде, активацию системы комплемента, коагулопатию и микроваскулярный тромбоз с последующей органной недостаточностью. Иммуитет к эндогенным эндотоксинам (антитела разных классов к эндотоксинам) появляется еще во внутриутробном периоде, благодаря переносу материнских антител. Впоследствии он усиливается в ходе постоянного контакта с эндотоксинами в течение жизни. Внутренний Core-регион эндотоксинов является высоко консервативным участком молекулы, который одинаков для всех грамотрицательных бактерий. Было показано, что после проведения хирургических операций наблюдается стойкое снижение содержания циркулирующих EndoCab по сравнению с преоперативным уровнем. Соответственно низкий преоперативный уровень EndoCab может указывать на большую вероятность развития послеоперационных осложнений и даже смертности.

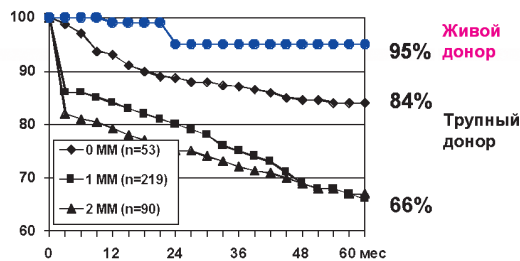
Гранзимы А и В

Гранзимы – это экзогенные сериновые протеиназы, которые высвобождаются из цитоплазматических гранул цитотоксических лимфоцитов (CTLs) и NK-клеток. Само название «гранзимы» происходит от словосочетания: гранулы + энзимы. Эти гранулы содержат наряду с гранзимами и другие белки, включая порообразующий белок – перфорин. После связывания CTL с клеткой-мишенью содержимое гранул высвобождается в межклеточное пространство, откуда, после воздействия перфорина через отверстие в мембране, гранзимы попадают в цитоплазму клетки-мишени. Гранзим В активирует внутриклеточный каскад активации каспаз, приводя в итоге к гибели клетки-мишени. Гранзим А тоже способен индуцировать апоптоз в клетках-мишенях, но вовлекаемые при этом молекулярные механизмы пока не ясны. Предполагается, что гранзимы участвуют в остром отторжении при трансплантации почки, т.к. в инфильтрирующих лимфоцитах отторгаемой почки их экспрессия повышена. Повышенный уровень растворимых гранзимов в плазме у пациентов с пересаженной почкой свидетельствует о системной вирусной инфекции, в частности, об инфицировании CMV.

HLA-типирование

Говоря сегодня о маркерах отторжения трансплантата, не стоит забывать о факторах, объективно влияющих на срок жизни пересаженного органа. К

ним в первую очередь относятся возраст донора, сопутствующие заболевания реципиента, продолжительность холодовой ишемии трансплантата, эффективность и переносимость иммуносупрессивной терапии и HLA-совместимость.



HLA-DR несовместимость и 5-летняя выживаемость трансплантата

ММ-степень несовпадения

ЗАО «БиоХимМак» предлагает реагенты и оборудование фирмы Dynal (Invitrogen Corporation), обеспечивающие типирование совместимых пар доноров и реципиентов как серологическими, так и молекулярно-генетическими SSP и SSO методами.

CD34

В настоящее время ежегодно проводятся тысячи аутологичных и аллогенных трансплантаций кроветворной ткани, и большинство из них – это трансплантации периферических стволовых клеток крови (ПСКК). Фракцию мононуклеарных клеток крови, обогащенную СКК, получают в ходе процедуры цитафереза, который при необходимости можно неоднократно повторять. Одной из самых серьезных проблем при трансплантации кроветворной ткани является вопрос качества трансплантата, т.е. способность кроветворных клеток полноценно восстановить кроветворение. Молекула CD34 является стадийноспецифичным антигеном, определяющим клетки ранних этапов дифференцировки. Суммарный пул CD34⁺ клеток определяет скорость восстановления кроветворения при трансплантации гемопоэтической ткани. Сочетания антител и дополнительных реагентов позволяют достаточно подробно охарактеризовать популяцию жизнеспособных гемопоэтических стволовых клеток, несмотря на ее относительную малочисленность.

- **см. также:** главу «Диагностика предсуществующих HLA антител», стр. 533
- **см. также:** главу «Проточная цитометрия», стр. 484
- **см. также:** Наборы для диагностики инфекционных заболеваний, стр. 242

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА***

Кат. №	Производитель	Наименование, количество/упаковка
EK-MRP8/14	Buhlmann	Кальпротектин (S100A8/A9), 96
B-MRP8/14	Buhlmann	Контроли к кальпротектину, 2 флакона
HK504	HBT	Антитела к Core региону эндотоксина (EndoCab), 96
RE59321	IBL	Неоптерин, 96
414-8880	Axis-Shield	Гомоцистеин, 96
7033	Biomerica	C-реактивный белок, 96
BMS212	Bender Medsystems	Растворимый рецептор IL-2 (CD25), 96
BMS2026	Bender MedSystems	Гранзим А, 96
BMS2027	Bender MedSystems	Гранзим В, 96
HK 332	HBT	Гранзим В, 96
194-0701	BioVendor	HLA-G, 96
HK401	HBT	Белок, связывающий жирные кислоты (Heart-FABP, FABP3), 96
HK404	HBT	Белок, связывающий жирные кислоты (Liver-FABP, FABP1), 192
BI-RC4d	Biomedica	Определение фрагмента компонента комплемента C4d (антитела), 250 мкл
BI-RC4d-FITC	Biomedica	Определение фрагмента компонента комплемента C4d (FITC-меченые антитела), 100 мкл