

ИММУНОЛОГИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ РАЗВИТИЯ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА



Зыблева С.В.,
ученый секретарь
ГУ РНПЦ РМиЭЧ, к.м.н.

АКТУАЛЬНОСТЬ

- ◎ Трансплантация органов, тканей и клеток - это замена реципиенту путем хирургической операции пораженного, изношенного органа, части его или ткани, полностью утративших способность выполнять свои функции согласно Постановления Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 29 августа 2012 года № 134 «О некоторых вопросах трансплантации органов и тканей человека».
- ◎ Одной из главных причин потери трансплантата является реакция отторжения донорского органа.

○ Несмотря на достижения современной иммунологии проблема развития ранней дисфункции донорского органа является важной клинической проблемой, встречающейся в 6-78,4% случаев [1]. Потеря функционирования трансплантата и возврат к диализу является основной причиной летальности реципиентов. Оценка скорости клубочковой фильтрации, наличие протеинурии, уровень креатинина, мочевины, электролитов крови, NGAL в настоящее время используются для определения развития ранней дисфункции трансплантата [2].

1. Практическое использование экстракорпоральной мембранной оксигенации в донорстве органов для трансплантации / М. Г. Минина [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2012. - Т. 14, № - С. 27-35.

2. Dynamic variation of kidney injury molecule-1 mRNA and protein expression in blood and urine of renal transplant recipients: a cohort study / S. S. Keshavarz [et al] // Clin Exp Nephrol. - 2019. - Vol. 23, № 10. - P. 1235-1249.

- Тем не менее, некоторые авторы указывают на запоздалую оценку состояния функционирования трансплантата в послеоперационном периоде на основании биохимических показателей крови и мочи, в связи с уже возникшим повреждением почечной ткани [3]. Таким образом, разработка новых методик ранней диагностики дисфункции почечного трансплантата имеет научно-практический интерес [4, 5].

3. Knoll, G. A. Proteinuria in kidney transplant recipients: prevalence, prognosis, and evidence-based management / G. A. Knoll // *Am. J. Kidney Dis.* - 2009. - Vol. 54, № 6. - P. 1131-114

4. Claire, E. D. Genetic predictors of long-term graft function in kidney and pancreas transplant patients / E. D. Claire, J. S. Matthew // *Briefings in Functional Genomics.* - 2017. - Vol. 16, № 4. - P. 228-237.

5. Неинвазивная диагностика позднего клеточного отторжения трансплантата почки / А. В. Носик [и др.] // *Хирургия. Восточная Европа.* - 2019. - Т. 8, № 3. - С. 368-37

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Определить иммунологические критерии прогнозирования развития дисфункции трансплантата почки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- В исследование были включены 118 реципиентов почечного аллотрансплантата с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (тХБП), которые поступили для трансплантации аллогенной почки в ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ») Гомель, Республика Беларусь.

- В исследовании участвовало 74 (62,7%) мужчины и 44 (37,3%) женщины.
- Возраст в изучаемой группе был от 19 до 71 лет, средний возраст составил $46,5 \pm 1,16$; 47,5 [37,0; 55,0] лет.
- Отрицательный результат прямой перекрестной пробы (cross-match), наблюдался в 100% случаев.

- Все пациенты получали иммуносупрессивную терапию согласно клиническим протоколам трансплантации почки (Приложение 1 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6).
- Индукционная иммуносупрессия во всех случаях проводилась базиликсимабам 20 мл.
- Базисная иммуносупрессивная терапия включала циклоспорин или такролимус, азатиоприн, метипреднизолон.

- Изучено 118 образцов лимфоцитарной взвеси, полученной путем забора донорских парааортальных лимфатических узлов во время операции по подготовке почечного трансплантата к пересадке (операция «Back table»).
- В стерильных условиях лимфатические узлы нарезали на небольшие фрагменты, помещали их в стерильные пробирки с физиологическим раствором, гомогенизировали и центрифугировали.

- ⦿ В пробирки для проточного цитометра вносили 100 мкл лимфоцитарной взвеси и добавляли моноклональные антитела, меченные различными флуорохромами, согласно панели исследования. Образцы перемешивали на вортексе и инкубировали 20 минут в темноте при комнатной температуре.
- ⦿ После инкубации в пробирки вносили по 100 мкл лизирующего раствора, содержащего 3,4% формальдегида.
- ⦿ Тщательно перемешанные на вортексе образцы инкубировали 10 минут в темноте при комнатной температуре.

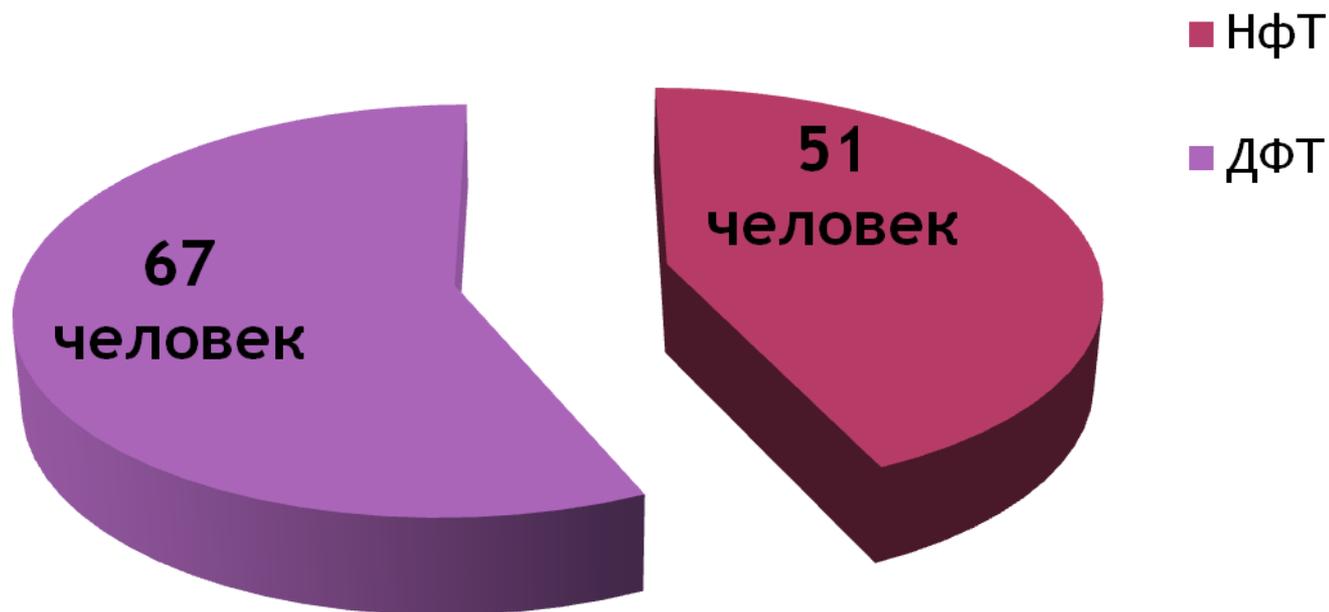
- В пробирки вносили по 1 мл дистиллированной воды. Образцы перемешивали на вортексе и инкубировали 10 минут при комнатной температуре без доступа света, затем исследовали на проточном цитофлуориметре с определением количества T-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы HLA-DR (CD3⁺HLA-DR⁺ клетки) (Пат. РБ 21799, опубл. 04.30.2018).



- Все пациенты были разделены на две группы с немедленной функцией трансплантата (НФТ) и дисфункцией почечного трансплантата (ДФТ). При уровне креатинина на 7-е сутки выше 300 мкмоль/л и отсутствии показаний для проведения диализа функция считалась немедленной (НФТ), при концентрации креатинина равной или превышающей 300 мкмоль/л, а также при возникновении необходимости в диализе на первой неделе после трансплантации состояние классифицировалось как дисфункция почечного трансплантата (ДФТ)*.

*Cantaluppi V., Dellepiane S., Tamagnone M. et al. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Is an Early and Accurate Biomarker of Graft Function and Tissue Regeneration in Kidney Transplantation from Extended Criteria Donors. PLoS ONE. 2015;10(6):1-19. DOI: [10.1371/journal.pone.0129279](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129279).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ



Креатинин на 7-е сутки

516,0 [360,0; 707,0] нг/мл

156,0 [118,0; 200,0] нг/мл

Mann-Whitney U-test $p < 0,00001$, $z = 8,54$

Содержание субпопуляций лимфоцитов в полученной из лимфатических узлов донора лимфоцитарной взвеси

Показатель	Me [LQ25; UQ75]	
CD3 ⁺ , %	51,30 [40,8; 67,9]	
CD19 ⁺ , %	47,30 [29,4; 52,4]	
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ л/у, %	НФТ	ДФТ
	14,1 [7,4;19,5]	35,9 [23,7;50,70]
	p=0,0003	

При корреляционном анализе выявлена обратная связь функции почечного трансплантата на 7-е сутки с уровнем CD3⁺HLA-DR⁺ клеток в составе лимфоцитарной взвеси

($r_{\text{Spearman Rank Order Correlations}} = -0,62, p = 0,00005$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЛОГИСТИЧЕСКОЙ РЕГРЕССИИ

	В	Стд.ошиб бка	Знч.	Exp(B)	95% Дов. интервал для EXP(B)	
					Нижняя	Верхняя
CD3⁺HLA- DR⁺	0,079	0,031	0,012	1,082	1,017	1,151
Константа	-1,620	0,784	0,039	0,198		

ВЕРОЯТНОСТЬ РАЗВИТИЯ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

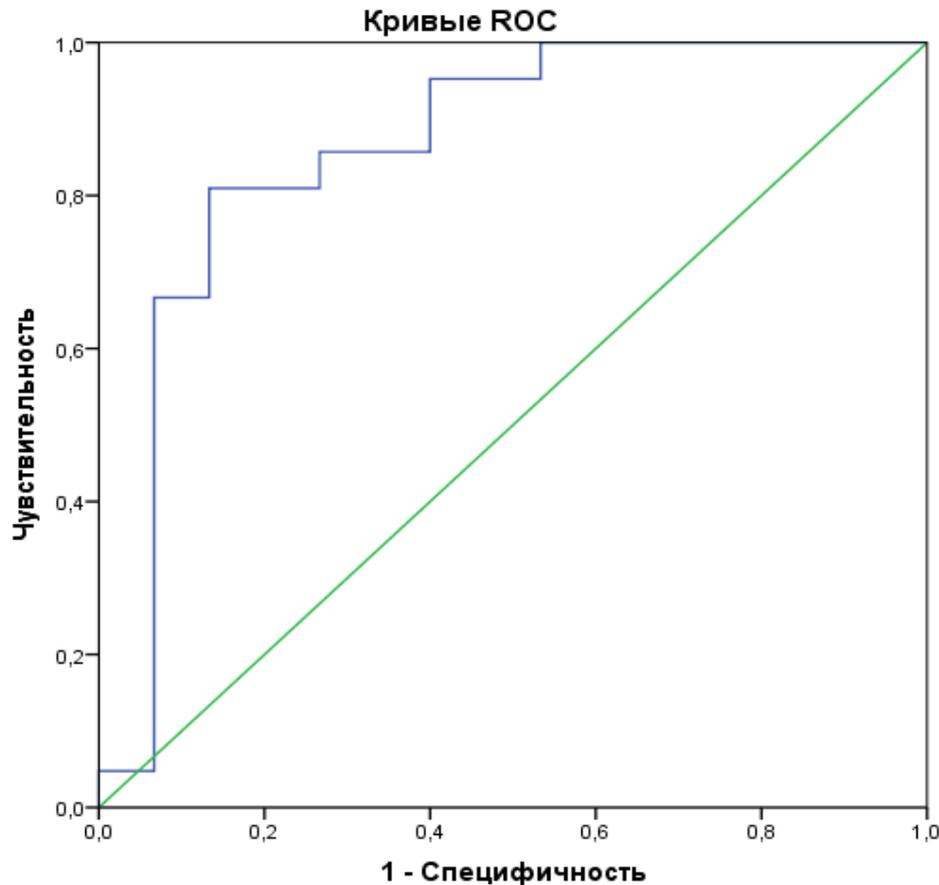
$$P = 1 / (1 + \text{Exp}(-1,62 + 0,079 * X))$$

- ⊙ X-уровень CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов в лимфоцитарной взвеси
- ⊙ P = вероятность развития дисфункции почечного трансплантата.

При $P > 0,5$ - вероятно развитие дисфункции почечного трансплантата.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА

$$P = 1 / (1 + \text{EXP}(-1,62 + 0,079 * X))$$

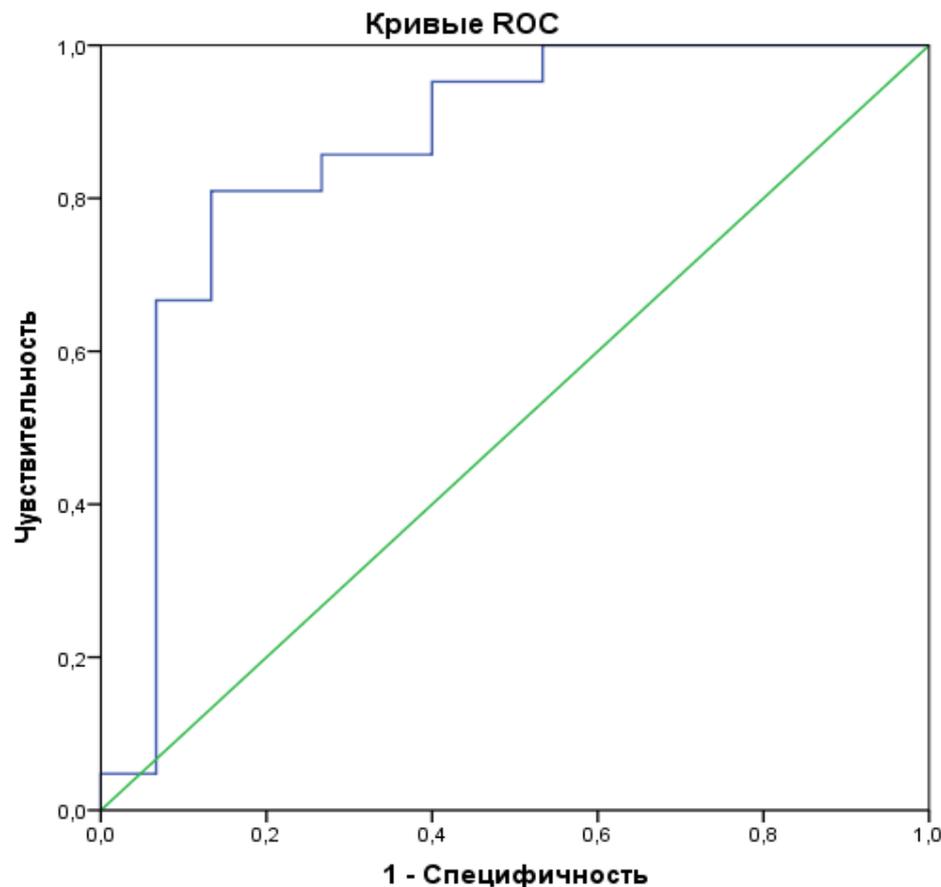


X-уровень $CD3^+HLA-DR^+$ лимфоцитов в лимфоцитарной взвеси
P = вероятность развития дисфункции почечного трансплантата.

При $P > 0,5$ - вероятно развитие дисфункции почечного трансплантата.

чувствительность **81%**
специфичность **86,7%**.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ МОДЕЛИ ПРОГНОЗИРОВАНИИ ФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА ПУТЕМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ CD3⁺HLA-DR⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ЛИМФОЦИТАРНОЙ ВЗВЕСИ ИЗ ЛИМФАТИЧЕСКОГО УЗЛА ДОНОРА



По результатам полученных предсказанных вероятностей для изучаемой выборки $p=0,5017$ соответствует уровню **20,7% CD3⁺HLA-DR⁺** лимфоцитов в лимфоцитарной взвеси.

чувствительность **81%**
специфичность **86,7%**.

- ⦿ Регионарный лимфоузел является одним из основных мест развития иммунного ответа. Притекающая лимфа приносит в лимфатический узел чужеродные антигены, что приводит к развитию в лимфатических узлах реакций иммунного ответа*.
- ⦿ Таким образом, в основе предложенного способа лежит количество активированных Т-лимфоцитов, несущих на себе основной, поздний маркер активации клеток - рецептор HLA-DR лимфоцитарной взвеси, полученной из лимфатического узла донорской почки.

ВЫВОДЫ

- Прогнозировать развитие дисфункции почечного трансплантата можно на основании определения уровня Т-лимфоцитов в лимфоцитарной взвеси, приготовленной из лимфотического узла донора.
- Уровень, превышающий 20,7% Т-лимфоцитов в смеси указывает на развитие дисфункции трансплантата с чувствительностью - 81,0%, специфичностью - 86,7%.

С ДНЕМ НАУКИ

