

СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГОСТРОЇ РЕАКЦІЇ ВІДТОРГНЕННЯ НИРКОВОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА

Винахід відноситься до медицини, а саме до клінічної трансплантології, і може бути використаний в лабораторній діагностиці посттрансплантаційних ускладнень у реципієнтів.

Основним посттрансплантаційним ускладненням післяопераційного періоду є відторгнення трансплантата, що виникає як наслідок генетичних відмінностей між донором та реципієнтом. У механізмі імунологічної адаптації алогенного органу в організмі реципієнта особливе значення мають Т-лімфоцити-хелпери, які продукують цитокіни. Так, Т-лімфоцити-хелпери I типу продукують такі цитокіни, як інтерлейкін-2 і гама-інтерферон (γ -інтерферон), який є головним у механізмах розвитку гострої реакції відторгнення та здійснює хелперну функцію у формуванні клітинного імунітету.

Плейотропним цитокіном, який виконує одну з основних ролей у нормальному функціонуванні імунної системи, є γ -інтерферон із численними імуномодуляторними ефектами, які включають також і стимуляцію експресії антигенів тканинної сумісності класів I та II. Крім того, γ -інтерферон необоротньо впливає на трансформовані клітини і посилює цитотоксичні реакції опосередковані Т-лімфоцитами і NK-клітинами (природними кілерами). Такі теоретичні аспекти є основою діагностики розвитку реакції відторгнення ниркового трансплантата для підвищення ефективності методу лікування пацієнтів з термінальною стадією хронічної ниркової недостатності.

Відомий спосіб діагностики гострої реакції трансплантат проти хазяїна [1], що включає серійне дослідження концентрації цитокіна, який продукується Т-лімфоцитами-хелперами I типу - інтерлейкін-2 - у сироватці крові реципієнтів після трансплантації кісткового мозку. У цих хворих розвитку гострої реакції трансплантат проти хазяїна передував підйом рівня інтерлейкіна-2 у 67%

випадках. Рівень інтерлейкіна-2 залежав від тяжкості реакції трансплантат проти хазяїна і при успішному лікуванні мав тенденцію до нормалізації.

Недоліком способу є незначний відсоток показників реакції трансплантата проти хазяїна при дослідженні в динаміці інтерлейкін-2-продукуючої спроможності Т-лімфоцитів-хелперів I типу, що мало місце у пацієнтів при пересадці кісткового мозку.

Відомий також спосіб визначення ролі домінуючої інфільтрації Т-лімфоцитів-хелперів I типу в нирковому трансплантаті при гострому кризі його відторгнення [2], що взятий нами за прототип, який полягає в дослідженні продукції Т-лімфоцитами-хелперами I типу γ -інтерферону і Т-лімфоцитів-хелперами II типу інтерлейкінів-4 та -5 у великих серіях клонів Т-клітин, отриманих за біопсією з ниркових трансплантатів. Виявлено, що при гострому кризі відторгнення ниркового трансплантата збільшується кількість і активуються алоспецифічні і неспецифічні клітини-ефектори Т-лімфоцитів-хелперів I типу, що дають основу високому продукуванню γ -інтерферону та інфільтрації трансплантата.

Недоліком способу є одержання досліджуваного матеріалу інвазивним методом, тобто за допомогою біопсії ниркових трансплантатів хворих, що пов'язане з можливим розвитком інфекційних ускладнень, складністю і трудомісткістю відбору та обробці матеріалу для аналізу, більшою витратою часу.

В основу винаходу поставлена задача удосконалення способу діагностики гострої реакції відторгнення ниркового алотрансплантата шляхом імуноферментного дослідження γ -інтерферон-продукуючої функції Т-лімфоцитів периферичної крові реципієнтів, що дозволить зменшити розвиток ускладнень та трудомісткість відбору матеріалу для аналізу у пацієнтів і забезпечить своєчасність встановлення діагнозу і вибору тактики імуносупресивної терапії, а також підвищить якість надання допомоги реципієнтам аlogenного органу.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб діагностики гострої реакції відторгнення ниркового алотрансплантата включає визначення рівня продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитами, згідно з винаходом досліджують спонтанну продукцію γ -інтерферону Т-лімфоцитами-хелперами периферичної крові реципієнтів і при зростанні її рівня втричі порівняно з доопераційним рівнем, діагностують необоротний криз відторгнення трансплантата,

Спосіб діагностики гострої реакції відторгнення ниркового алотрансплантата виконують таким чином: із гепаринізованої крові виділяють мононуклеари в градієнті щільності фікол-верографін ($\rho=1078$), клітини відмивають двічі в середовищі 199 і ресуспендують у середовищі RPMI-1640, що містить 10% інактивованої ембріональної телячої сироватки, 2 мл L-глутаміну, 40 мкг/мл гентаміцину, 5×10^{-5} М2-меркаптоетанолу, потім культивують у середовищі RPMI-1640 в концентрації $1,5 \times 10^6$ кл/мл протягом 24 годин при температурі 37° С. Рівень γ -інтерферону визначають із використанням тест системи "Biotrak" фірми "Amersham Pharmacia Biotech, UK Limited" імуноферментним методом відповідно до протоколу процедури аналізу:

— готують ряд стандартних розчинів із концентраціями 1000 пг/мл, 400 пг/мл, 160 пг/мл, 64 пг/мл, 25,6 пг/мл і 0 пг/мл для побудови каліброваного графіка. Це досягається розчиненням у флаконі ліофілізованого рекомбінантного людського γ -інтерферону стандартним розчинником у співвідношенні 1: 2,5, а потім пипетуванням добавляють по 160 мкл до вже наявним 240 мкл розчинника в кожній пробірці;

— у мікропланшету, осередки якої покриті антитілами проти людського γ -інтерферону, вносять у дублях спочатку стандартні розчини, потім досліджувані зразки супернатантів реципієнтів;

— додають по 50 мкл біотинілізоване моноклональне анти- γ -інтерферон антитіло в стандартні та досліджувані лунки, накривають плашку кришечкою і інкубують протягом 2 годин при кімнатній температурі (20-25°С);

— аспіриують вміст лунок і промивають 2-3 рази осередку з використанням промивателя плашок;

— додають у кожную лунку по 100 мкл попередньо розведеного стрептавідіна-HRP кон'югата, накривають кришечкою мікропланшету і інкубують вміст протягом 30 хв. при кімнатній температурі;

— повторюють аспірацію та промивку лунок, додають у кожную лунку по 100 мкл хромоген-субстрат пероксидази і інкубують 30 хв. при кімнатній температурі, після чого зупиняють реакцію внесенням 100 мкл стоп-розчину в кожную лунку;

— вимірювання продукції γ -інтерферону проводять на автоматичному спектрофотометрі "Stat Fax 303" (США) при 450 нм.

Результати розраховують шляхом інтерполяції з калібровочної кривої, побудова якої здійснюється за результатами вимірів стандартів у тому ж аналізі, що і зразків.

Практичне використання способу, що пропонується, приводимо на прикладах обстеження реципієнтів, що знаходилися на лікуванні у відділі трансплантації нирки Інституту урології та нефрології АМН України.

Приклад 1. Хв-й Г-ко В.В., 20 років, і.х. № 277. Потрапив до відділення 28.01.98 р. з діагнозом: хронічний гломерулонефрит, хронічна ниркова недостатність термінальна стадія пролонгована гемодіалізом. Хворів з 1995 року, коли уперше були виявлені підйоми артеріального тиску. Пацієнту 29.01.98 р. сформована артеріо-венозна фістула, розпочаті сеанси програмного гемодіалізу, як етап підготовки до трансплантації аlogenної нирки. З 20.02.98 року був включений у лист чекання.

При застосуванні способу діагностики гострої реакції відторгнення ниркового алотрансплантата шляхом визначення γ -інтерферон-продукуючої функції лімфоцитів периферичної крові у хворого виявлено рівень спонтанної продукції γ -інтерферону 17,6 пг/мл. Пересадка трупної нирки на клубові судини справа виконана пацієнту 08.11.98 р. Ранній післяопераційний період, з 08.11. до 30.11.98 р. характеризувався відновленням діурезу - 3,4 л у добу, а

азотовидільна функція відповідала субуремічному рівню. Хворому проводилася базисна імуносупресивна терапія: сандімун 400 мг у добу, азатіопрін 125 мг у добу і преднізолон 25 мг у добу. 05.12.98 р. зменшився діурез. У цей же день у пацієнта визначено значне зростання спонтанної продукції γ -інтерферону, яка склала 94,8 пг/мл. Сонографічне дослідження трансплантату було без особливостей. 07.12.98 р. у хворого спостерігався підйом температури до 37,7°C, мала місце інтоксикація, яка обумовлена уремією. Трансплантат пальпаторно збільшений, тугий, що було підтверджено ультразвуковим обстеженням. У зв'язку з розвитком гострої реакції відторгнення, хворому початі болюсні введення солюмедрола в дозі 250 мг. Протягом наступного тижня проводилося інтенсивне лікування реакції відторгнення з успішним ефектом. 30.12.98 р. хворий був виписаний із задовільно функціонуючим трансплантатом.

Приклад 2. Хв-а Ш-ко О.А., 18 років, і.х. № 2572. Потрапила до відділення 21.10.97 року з діагнозом: зморщені обидві нирки, сечокам'яна хвороба, рецидивні конкременти обох нирок, термінальна стадія хронічної ниркової недостатності. Хворіє з дитинства, оперована з приводу хронічної ниркової недостатності з обох боків, в анамнезі відзначалося багатократне загострення пієлонефриту. 22.10.97 року сформована артеріо-венозна фістула і почата гемодіалізна терапія 3 рази на тиждень. 18.11.97 р. виконана лівостороння нефректомія з приводу зморщеної нирки, сечокам'яної хвороби, хронічного калькульозного пієлонефриту. Хвора була внесена до листа чекання.

Запропонованим способом 04.03.98 р. визначений рівень спонтанної продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитів периферичної крові пацієнтки, який склав 24,3 пг/мл. 28.03.98 р. виконані одночасно правостороння нефректомія справа і трансплантація алогенної трупної нирки справа. У першу добу після операції надавалася стандартна імуносупресивна терапія. Водовидільна функція трансплантата була відновлена і становила 3500 мл. 31.03.98 р. пальпаторно визначався трансплантат підвищеної тужності. Лабораторні дані: креатинін - 0,365 ммоль/л, сечовина - 18,3 ммоль/л, K^+ - 4,1 ммоль/л, Ht - 33, Hb - 74 г/л, лейкоцити - $12,75 \cdot 10^6$ /л. Рівень спонтанної продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитів

периферичної крові значно зріс і складав 111,7 пг/мл. На підставі цих даних стан хворої клінічно розцінений як реакція відторгнення трансплантата, їй введена ударна доза метилпреднізолону - 250 мг. Щодня проводилася пульс-терапія, однак, 15.04.98 р. діурез знизився до 300 мл; зросла азотемія, трансплантат збільшився, тугої консистенції, що підтверджено ультразвуковим дослідженням. 16.04.98 р. у хворої мала місце макрогематурія і 17.04.98 р. хворий виконана трансплантатектомія у зв'язку з розривом органа. Хвора переведена знову на гемодіалізну терапію, а з листопада 1998 року є потенційним реципієнтом для повторної трансплантації нирки.

Використання способу діагностики гострого кризу відторгнення трансплантата показало, що рівень спонтанної продукції γ -інтерферону зріс з 24,3 пг/мл до 111,7 пг/мл. Підвищення спонтанної продукції γ -інтерферону у 4,6 рази асоціювалося з розвитком необоротної реакції відторгнення з наступною трансплантатектомією.

У процесі апробації запропонованого способу діагностики гострого кризу відторгнення ниркового трансплантата, нами були обстежені 14 реципієнтів, яким була зроблена трансплантація донорської нирки в зв'язку з термінальною стадією хронічної ниркової недостатності. Рівень γ -інтерферону вивчали у реципієнтів в динаміці: до трансплантації донорської нирки, у першу добу після оперативного втручання, у період розвитку гострої реакції відторгнення на тлі ударних доз імуносупресивної терапії, а також напередодні виписки з клініки. Контрольну групу склали 22 здорових донора.

З 14 реципієнтів у десятих в післятрансплантаційному періоді клінічно та інструментальними методами констатовані 14 епізодів гострої реакції відторгнення ниркового трансплантата. У чотирьох реципієнтів трансплантат функціонував стабільно. Результати дослідження продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитами периферичної крові у пацієнтів до пересадки нирки і у період гострої реакції відторгнення ниркового трансплантата та в групі, яку склали здорові донори, надані в таблиці.

Таблиця

Результати дослідження продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитами периферичної крові у пацієнтів до пересадки нирки і у період гострої реакції відторгнення ниркового трансплантата

№ п/ п	Реципієнти	Спонтанна продукція γ -інтерферону, пг/мл		Наслідок гострої реакції відторгнення
		до пересадки нирки	гостра реакція відторгнення	
1	Г-ко	17,6	94,8	купована
2	Г-як	22,8	57	купована
3	Ш-ко	24,3	111,7	трансплантатектомія
4	М-ий	21,5		
	1-ый епізод		64,5	
	2-ой епізод		78,2	купована
5	Л-ук	18,4	18,0	купована
6	О-ко	20,2		
	1-ый епізод		60,9	
	2-ой епізод		83,5	купована
7	М-я	19,6	35,2	купована
8	Л-ва	18,5		
	1-ый епізод		55,5	
	2-ой епізод		80,2	
	3-ий епізод		74,0	купована
9	Б-ов	22,3	34,2	купована
10	Суб-на	19,0	135,5	летальний кінець
М + m Р		20,4 \pm 3,4 >0,05	65,2 \pm 30,3 <0,05	
Контрольна група (n=22) здорові донори		20,2 \pm 1,8	-	-

З таблиці видно, що у реципієнтів до трансплантації нирки рівень спонтанної продукції γ -інтерферону в середньому складав 20,4 \pm 3,4 пг/мл, що не відрізняється від контрольної групи. У зв'язку з тим, що γ -інтерферон є основним медіатором ефektorної ланки імунної відповіді на трансплантований орган, то реципієнти з показниками значно підвищеної продукції γ -інтерферону Т-лімфоцитами-хелперами І типу можуть входити у групу ризику розвитку необоротних гострих реакцій відторгнення трансплантата (№ 3 - трансплантатектомія і № 10 - летальний кінець внаслідок розриву трансплантата). У 10 реципієнтів мали місце 14 випадків розвитку гострої реакції

відторгнення в різні терміни після трансплантації. У період імунного конфлікту пацієнтам було призначено ударні дози метипреда - 250 мг/кг на добу.

Після трансплантації в період гострої реакції відторгнення у реципієнтів спонтанна продукція γ -інтерферону Т-лімфоцитами-хелперами 1 типу в середньому складала $65,2 \pm 30,3$ пг/мл та перевищувала доопераційний рівень у 3,2 рази. Зростання спонтанної продукції γ -інтерферону, незважаючи на ударні дози імуносупресивних препаратів, є свідченням активації Т-лімфоцитів-хелперів I типу, які відповідають за розвиток "клітинного" типу імунної відповіді на алотрансплантат, винятком є показники реципієнта № 5 (див. таблицю). У реципієнтів, рівень спонтанної продукції γ -інтерферону яких склав більше 100 пг/мл, розвивалася необоротна реакція відторгнення.

Таким чином, спосіб діагностики гострої реакції відторгнення ниркового алотрансплантата є точним, надійним та безпечним для хворого, витрачає небагато часу. Використання запропонованого способу дозволяє у реципієнтів за декілька днів до клінічної картини гострої реакції відторгнення трансплантату своєчасно діагностувати розвиток гострого кризу, що дозволяє адекватно виробляти тактику ведення пацієнтів у післяопераційному періоді. Діагностична ефективність способу складає 93%.

Джерела інформації, прийняті до уваги при експертизі:

1. Serum concentration of the soluble interleukin-2 receptor for monitoring acute graft-versus-host disease / Miyamoto T., Akashi K., Hayashi S. et al. // Bone Marrow Transplant.- 1996.- Vol.17, № 2.- P.185-190.

2. Predominant Th1 cell infiltration in acute rejection episodes of human kidney grafts / Mario M. D'Elios, R. Josien, M. Manghetti, A. Amedei et all. // Kidney International.- 1997.- Vol.51.- P.1876-1884.