

Методы определения сенсибилизации к HLA у реципиентов из «листа ожидания» на трансплантацию органов

Н.В. Боровкова, Н.В. Доронина, Н.А. Мушта

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва

Наталья Валерьевна Боровкова, e-mail: borovkovanv@yandex.ru

Проведен сравнительный анализ двух методов выявления сенсибилизации реципиентов к HLA – традиционного серологического метода, основанного на лимфоцитотоксическом тесте и метода мультиплексного анализа с детекцией результатов исследования на платформе Luminex.

Выявлены высокая чувствительность и информативность метода определения антител к HLA на платформе Luminex.

Ключевые слова: антитела к HLA, лимфоцитотоксический тест, мультиплексный анализ на платформе Luminex.

Methods to determine the sensitization to HLA in the recipients on the waiting list for organ transplantation

N.V. Borovkova, N.V. Doronina, N.A. Mushta

Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow

The comparative analysis of two methods of exposure of sensitization of recipients to HLA is conducted – traditional serum method, based on a lymphocytotoxicity test, and the method of multiplexed analysis with the detection of results using the Luminex platform.

A high sensitiveness and informing of method of antibodies determination to HLA using the Luminex platform is demonstrated.

Key words: antibodies to HLA, lymphocytotoxicity test, multiplexed analysis, the Luminex platform.

Введение

Антитела к HLA – это иммуноглобулины класса G, образование которых связано с предшествующей сенсибилизацией несовместимыми антигенами главного комплекса гистосовместимости в результате гемотрансфузий, прошлых трансплантаций, беременностей. Антитела к HLA обнаруживаются у 30–35 % пациентов из «листа ожидания» трансплантации органов [1, 2]. В последние годы в литературе появились сообщения об участии антител к MICA в развитии нарушений функции почечного аллотрансплантата. Гены MIC [3] (MHC class I-related chain A and B) располагаются в области HLA-B генов I класса на 6-й хромосоме. Реципиенты, сенсибилизированные к HLA, требуют более тщательного подбора донорских органов, а также применения активных методов десенсибилизации на этапах подготовки к трансплантации органа и в раннем послеоперационном периоде.

Исследователи отмечают, что донор-неспецифические антитела к HLA являются одним из факторов риска криза отторжения, дисфункции трансплантата в раннем послеоперационном периоде и оказывают влияние на выживаемость трансплантата в более позднем периоде [3–5].

Определение антител к HLA в сыворотке больного, которому планируется трансплантация органа, проводят при постановке в лист ожидания. В дальнейшем исследование существующих антител к HLA рекомендуется выполнять 1 раз в 3–6 мес.

Существуют разные методы выявления антител к HLA. В основе традиционного серологического метода лежит комплементозависимый лимфоцитотоксический тест. В последние годы широкое распространение получили методы мультиплексного анализа, с детекцией результатов с помощью ИФА или по технологии Luminex (x-MAP технология).

Целью настоящей работы является сравнительная оценка методов выявления сенсibilизации реципиентов к HLA.

Материалы и методы

Обследовано 20 сывороток крови реципиентов (10 мужчин и 10 женщин в возрасте от 25 до 56 лет), ожидающих трансплантацию почки в НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.

Для определения антител к HLA у пациентов серологическим методом, проводили лимфоцитотоксический тест с 30 – 60 образцами лимфоцитов доноров крови [6]. К сывороткам крови реципиентов добавляли лимфоциты доноров. Лимфоциты выделяли из крови с консервантом (ЭДТА) центрифугированием на градиенте Lympholyte-H. Количество выделенных лимфоцитов оценивали в камере Горяева. Лимфоцитотоксический тест (ЛЦТТ) проводили в плашках Терасаки. В плашку с образцами сыворотки реципиентов добавляли по 1 мкл лимфоцитов доноров. После 30 минутной инкубации при 37 °С в каждую лунку вносили 5 мкл комплемента кроличьего. Инкубировали при температуре 37 °С еще 60 мин. Затем лимфоциты окрашивали эозином и клетки фиксировали 20 % формалином. Через 30 мин в инвертированном микроскопе по окраске ядер (рис. 1) регистрировали количество погибших лимфоцитов. Результат исследования выражали в баллах в зависимости от относительного содержания погибших клеток (табл. 1).

Таблица 1. Оценка результатов лимфоцитотоксического теста

Число погибших клеток, %	Балл	Результат
0 – 10	1	Отрицательный
11 – 20	2	Сомнительный
21 – 50	4	Слабоположительный
51 – 80	6	Положительный
81 – 100	8	Резко положительный

Наличие антител к HLA оценивали по коэффициенту серопозитивности, который представляет собой отношение числа образцов лимфоцитов, вызывающих реакцию от 2 до 8 баллов, к общему числу образцов в панели, выраженное в процентах. Коэффициент серопозитивности 20 % и более определяет высокий риск острого криза отторжения. Время, затраченное на проведения анализа, составляло 3 – 3,5 ч.

Для скрининга антител к HLA методом мультиплексного анализа с детекцией результатов исследования на платформе Luminex на территории РФ для клинического применения используются реактивы двух фирм One Lambda (США) и GenProbe (США). В исследовании использовались реактивы LABScreen (One Lambda). К 20 мкл сыворотки крови реципиентов добавляли 5 мкл микросфер. После инкубации в темноте в течение 30 мин и двукратной отмывки окрашивали частицы 100 мкл раствора фикоэритрина. Анализ полученных результатов проводили на проточном анализаторе Luminex 200 (рис. 2). Результаты исследования выражали в условных единицах (у.е.). По рекомендациям разработчиков содержание антител к HLA в норме не превышает 1,6 у.е. Время, затраченное на проведение анализа, составило 1,5 – 2 ч.

Результаты и обсуждение

У реципиентов традиционным серологическим методом оценивали коэффициент серопозитивности, который отражает риск сверхострого отторжения трансплантата, взятого от случайного донора. Чем этот коэффициент выше, тем сложнее подобрать совместимого донора. У 7 (35 %) из 20 обследованных реципиентов выявлено наличие антител с коэффициентом серопозитивности от 5 до 50 % (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициент серопозитивности (PRA) у реципиентов с антителами к HLA, выявленным серологическим методом

Коэффициент серопозитивности	Количество реципиентов
< 10	3
10 – 20	3
>20	1

Таблица 3. Скрининг антител к I и II классам HLA и MICA

Варианты выявления антител	Количество реципиентов
Только к I классу HLA	2
K I и II классам HLA	5
K I, II классам HLA и к MICA	3

Параллельно с лимфоцитотоксическим тестом в крови реципиентов определяли антитела к HLA мультиплексным методом с детекцией результатов на платформе Luminex. Выявлено, что у 10 из 20 обследованных реципиентов (50 %) антитела к HLA выявлены.

Таблица 4. Сравнительный анализ методов определения антител к HLA

Реципиенты	Антитела к HLA (Luminex)			Коэффициент серопозитивности (серологический метод)
	I класс	II класс	MICA	
R1	187,3	300,0	22,0	0
R2	163,0	0	0	0
R3	190,7	0	3,3	0
R4	118,0	282,7	31,0	15
R5	243,0	179,9	0	5
R6	235,2	0	0	0
R7	112,7	3,0	0	5
R8	132,6	108,2	1,9	20
R9	156,1	276,9	0	10
R10	52,5	72,3	0	50
R11	0	0	0	5

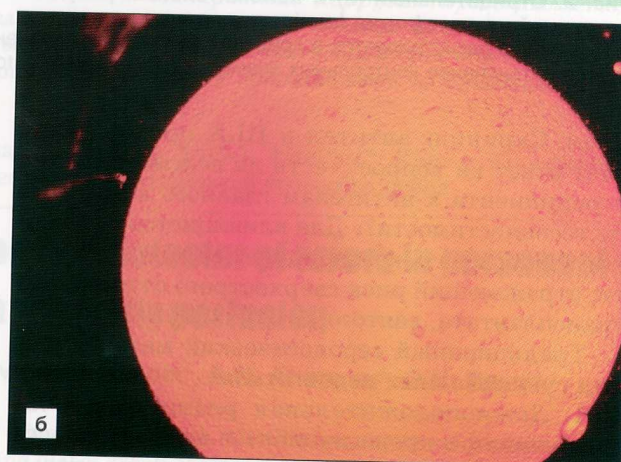
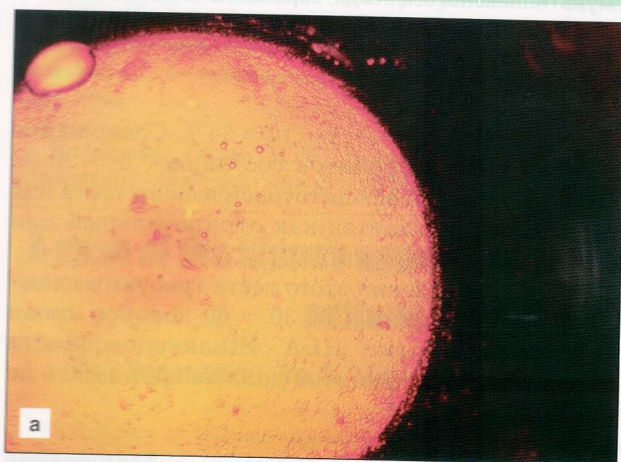


Рис. 1. Отрицательный (а) и положительный результат (б) лимфоцитотоксического теста

а – живые лимфоциты имеют хорошо выраженную округлую форму, слабо окрашенные раствором эозина; б – погибшие лимфоциты имеют неправильную форму, нечёткие очертания границы клетки, хорошо прокрашиваются раствором эозина

определяются антитела к антигенам главного комплекса гистосовместимости. Этот метод позволяет проводить скрининг антител к I, ко II классам HLA и к MICA (табл. 3).

Сравнительный анализ серологического и мультиплексного методов выявления антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости представлен в табл. 4. У 6 реципиентов антитела к HLA определялись как серологическим, так и мультиплексным методами. Следует отметить, что только у двух пациентов серологическим методом выявлены антитела с коэффициентом серопозитивности 20 и 50 %. В остальных случаях коэффициент серопозитивности не превышал 10 %, что не оказывало существенного влияния на подбор пары донор–реципиент. В тоже время по данным мультиплексного метода антитела к HLA у этих пациентов многократно

превышали пороговые значения (от 52,0 до 300,0 у.е. при 1,6 у.е. в норме), что требует применения десенсибилизирующей терапии на этапах подготовки к трансплантации и влияет на функцию трансплантата в послеоперационном периоде.

Таким образом, более точным методом определения антител к антигенам главного комплекса гистосовместимости является мультиплексный анализ, основанный на использовании xMAP-технологии (Luminex). Метод основан на использовании панели микросфер, имеющих различные спектральные характеристики и покрытых очищенными HLA антигенами. Это позволяет с максимальной точностью выявить антитела к известным кросс-реактивным группам антигенов I и II классов системы HLA и к MICA антигенам.

Следует отметить, что метод требует оснащения лаборатории современным оборудова-

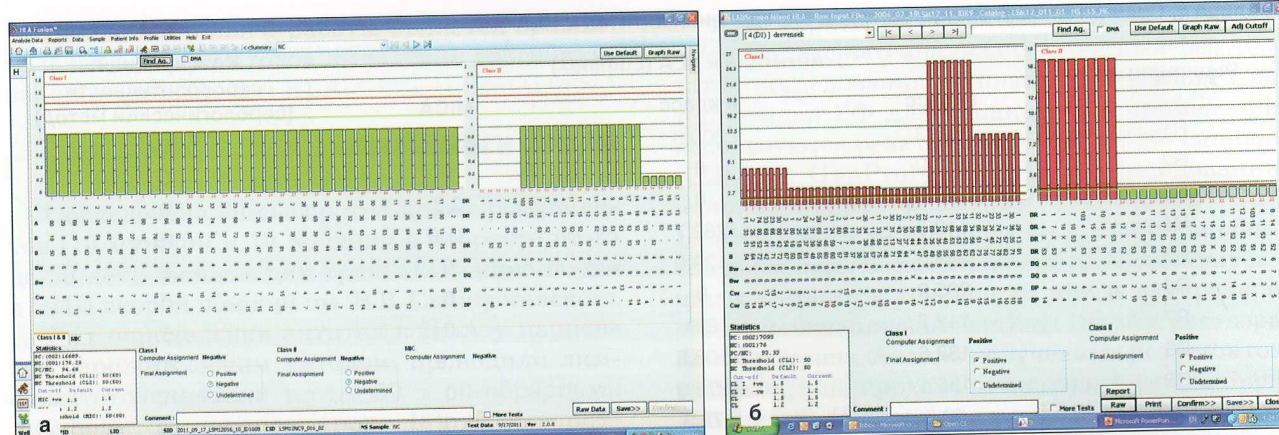


Рис. 2. Отрицательный (а) и положительный результат (б) мультиплексного метода скрининга антител к HLA с детекцией на платформе Lumindex
а – свечение регистрируется в пределах контрольных значений (линия cutoff) – зелёные столбики; б – свечение регистрируется интенсивнее контрольных значений (выше линии cutoff) – красные столбики

нием. Скрининг антител к HLA прежде всего дает ответ на вопрос: «есть ли сенсibilизация у реципиента к антигенам главного комплекса гистосовместимости?» Для клиницистов привычнее использовать коэффициент серопозитивности, отражающий риск сверхострого отторжения трансплантата, взятого от случайного донора.

Традиционный серологический метод имеет ряд существенных недостатков:

1. Ложноположительная реакция за счёт содержания в крови пациентов антител класса IgM (антилимфоцитарные антитела), не оказывающих влияния на приживление трансплантата в отличие от антител класса IgG.

2. Ложноотрицательная реакция обусловлена нормальным популяционным составом лимфоцитов периферической крови. В суспензии лимфоцитов доля Т-клеток, несущих HLA I класса, составляет 60 – 80 %, доля В-лимфоцитов,

несущих HLA II класса – 10 – 25 %. Содержанию погибших В-лимфоцитов составляет 5 – 20 % что по данным лимфоцитотоксического теста (см. табл. 1) расценивается как отрицательный или сомнительный результат.

3. Для проведения этого теста требуются лимфоциты, выделенные от 30 – 60 доноров кров с установленными HLA. Жизнеспособность выделенных лимфоцитов должна составлять не менее 80 %.

Заключение

Таким образом, при постановке в «лист ожидания» на трансплантацию органа и в посттрансплантационном периоде при определении антител к HLA следует отдавать предпочтение мультиплексному методу с детекцией результатов исследования на платформе Lumindex.

Литература

1. HLA and MICA antibodies: further evidence of their impact on graft loss two years after their detection / L.E. Morales-Buenrostro, R. Rodriguez-Romo, de Leo [et al.] // Clin. Transpl. – 2006. – P. 207–218.
2. Clinical and anti-HLA antibody profile of nine renal transplant recipients with failed grafts: donor specific and non-donor-specific antibody development / L.M. Rebellato, M. Ozawa, K.M. Verbanac [et al.] // Clin. Transpl. – 2006. – P. 24–253.
3. Detection of HLA and MICA antibodies before kidney graft failure / K. Mizutani, L. Shibata, M. Ozawa [et al.] // Clin. Transpl. – 2006. – P. 255–264.
4. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies detection in kidney transplanted patients / R. Bardi, B. Boujemaa, Ch. Kallala [et al.] // Tissue Antigens. – Vol. 77. – Is. 5. – 2011. – P. 443–444.
5. HLA-антитела и их значение при трансплантации почки / М.Ш. Хубути, Н.В. Боровкова, Р.В. Сторожев [и др.] // Трансплантология. – 2010. – № 3–4. – С. 32–36.
6. Zachary, A. ASHI Laboratory Manual / A. Zachary // American Society for Histocompatibility and Immunogenetics – 2 nd. – NY, 1990. – P. 307–320.