

УДК: 616.61-07-089.843:57.083.3:612.017.1

Р.О. Зограб'ян, В.П. Закордонець, А.І. Малик., С.Є. Харченко, В.М. Торак, В.Є. Баран, С.М. Бочарніков, О.В. Закрутько, О.С.Вороняк, Н.М. Полончук.

ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова» НАМН України, м. Київ

### **Методи діагностики та елімінації анти А та анти В антитіл при АВ 0 не сумісній трансплантації нирки.**

Трансплантація АВ0-не сумісного органу може призвести до опосередкованого анти-А/В антитілами надгострого або гострого відторгнення. Важливим фактором виживання трансплантата за таких умов стає ефективно видалення цих антитіл (особливо IgG) з кровообігу реципієнта [19]. Точне визначення титру групових антитіл системи АВ0 у реципієнта дозволяє підібрати схему його підготовки до АВ0-неумісної трансплантації. [30, 31].

Антитіла системи АВ0 –  $\alpha$  і  $\beta$  є нормальними (природними) у людини. Вони відносяться до повних антитіл – аглютининів, які добре реагують в сольовому середовищі. Існує метод рекомендований Наказом МОЗ України №164 від 05.07.1999 р. визначення повних імунних антитіл системи АВ0 за допомогою реакції сольової аглютинації. Для дослідження використовують сироватку реципієнта (не менше 1 мл.), яку розводять 0,9% розчином NaCl відповідно (1:4; 1:8; 1:16 і т.д. до 1:8000) і 3% стандартні еритроцити (А і В). Після 60 хв. інкубації проводять оцінку результатів (візуально чи під мікроскопом) за найбільшим розведенням сироватки в якій є аглютинація стандартних еритроцитів. Цей метод не потребує дороговартісного обладнання, але потребує великої затрати часу та схильний до суб'єктивних коливань. Результати методу залежать від правильного забору матеріалу і дотримання максимальної точності при розведенні сироватки реципієнта [14, 29],

Також існує мікротипуюча гелева технологія, в якій використовується комбінація методів аглютинації та гель-фільтрації. Реакції проводять в пластикових діагностичних картках «ID-гелева система», колонки яких містять спеціальний гель, в який додають еритроцити і розведену сироватку реципієнта.

Для визначення титру природних антитіл використовують 200 – 400 мкл сироватки крові. Готують її розведення. Далі в кожному колонку нейтральної гелевої картки додають 50 мкл 0,8% стандартних еритроцитів і 25 мкл одного з розведень сироватки. Інкують 20-25 хв. при  $t$  21-23° і далі центрифугують. Визначають титр досліджуваних антитіл по граничному розведенню, при якому виявляється аглютинація в товщі колонки гелевої карти [31]. Цей метод точніше за попередній, для дослідження використовується менше часу і менша кількість сироватки, він є більш наглядним, а результати можуть зберігатися тривалий час для порівняння з результатами подальших досліджень, що не є можливим в методиці визначення титру антитіл в сольовому розчині [30]. До недоліків методу можна віднести його більшу вартість.

Існують також методи визначення титру анти-А/В антитіл: за допомогою протокової цитометрії, ферментного імуноаналізу та інші, але вони більш складні та коштовні.

### **Основні методи елімінації анти-А/В антитіл**

Після точного визначення титру групових антитіл наступною задачею є передопераційне видалення анти-А / В антитіл до безпечного рівня і підтримку цього рівня протягом, принаймні, раннього післяопераційного періоду. Для вирішення цього завдання застосовується цілий ряд методів терапевтичного аферезу.

Плазмаферез на сьогоднішній день використовує більшість центрів для видалення анти-А / В антитіл при проведенні АВО-не сумісних трансплантацій. Процедура передбачає поділ крові реципієнта на клітинні елементи, які повертаються реципієнту, і плазму, яка видаляється. Заміщення вилученої плазми можна проводити свіжозамороженою плазмою (СЗП), яка не містить антитіл, які потрібно видалити. Як правило, використовується плазма донорів з АВ (IV) групою крові, також в залежності від комбінації груп крові донора і реципієнта можливо використовувати плазму відмінною від АВ (IV) групи крові. Також можуть бути використані колоїдні розчини, наприклад, розчин людського альбуміну і кристалоїдні розчини, наприклад фізіологічний розчин.

Перевагами плазмаферезу є те, що крім анти-А/В антитіл у потенційного реципієнта видаляються також інші донор-специфічні антитіла, наприклад, анти-HLA, і знижується в крові вміст білків системи комплементу, які приймають участь в пошкодженні трансплантата. Це особливо важно при трансплантації нирки сесибілізованим реципієнтам [15]. Але є і недоліки методу. У зв'язку з тим, що при проведенні плазмаферезу видаляються не тільки анти-А/В антитіла, а й інші білкові молекули, що містяться в плазмі, завдання адекватного заповнення цих втрат стоїть особливо гостро. При використанні донорської СЗП можливі алергічні реакції аж до анафілаксії, крім того, існує хоч і не високий, але цілком реальний ризик передачі інфекцій. Спроби відмови або мінімізації використання СЗП можуть нести в собі ризик кровотеч або тромбозів, так як не відбувається адекватного поповнення факторів згортання крові. Крім того, при проведенні будь-яких екстракорпоральних процедур спостерігається зниження числа тромбоцитів, що є ще одним фактором ризику розвитку кровотечі [7, 8, 11]. Проте в даний час вважається, що плазмаобмін до, під час та після хірургічних втручань є ефективною та безпечною процедурою [34, 35].

Для вирішення проблем і зниження ризиків, які пов'язані з проведенням плазмаферезу, в Японії був розроблений метод видалення імуноглобулінів, який отримав назву каскадний плазмаферез або double-filtration plasmapheresis (DFPP) [1, 20]. Цей метод дозволяє селективно видаляти тільки ту частину плазми пацієнта, що містить імуноглобуліни. *Переваги методу*

Так як плазмові фактори згортання крові, а також молекули альбуміну мають більшу у порівнянні з імуноглобулінами молекулярну вагу, то процедура не супроводжується значною їх втратою, отже, обсяг СЗП і альбуміну необхідний для заміщення значно менше, ніж при плазмаферезі. У зв'язку з цим може оброблятися істотно більший обсяг плазми - до 10 літрів за один сеанс [10]. З технічного боку, проведення каскадного плазмаферезу важче, в порівнянні зі звичайним плазмаферезом, так потрібна установка додаткового фільтру і використання додаткових магістралей. Деякі автори відзначають, що при проведенні кількох сеансів каскадного плазмаферезу протягом невеликого

проміжку часу у пацієнтів спостерігалось значиме зниження концентрації фактора XIII і фібриногену, що може зажадати інфузії СЗП або кріопреципітату [9, 13].

Higgins і співавт. вважають основною перешкодою до збільшення обсягу плазми оброблюваної протягом однієї процедури розвиток у пацієнтів гемодинамічних порушень [10]. Причиною таких порушень, швидше за все, є втрати альбуміну і, внаслідок цього, порушення транспорту води в організмі пацієнта [29].

Імуноадсорбція з протеїном А (А-ІА) і Іg-імуноадсорбція (ІgІА) - методи терапевтичного аферезу призначені для селективного видалення з плазми пацієнта імуноглобулінів. Процедура видалення імуноглобулінів полягає в пропусненні плазми пацієнта через спеціальний фільтр, або як прийнято говорити, сорбційну колонку. Сорбційна колонка являє собою матрикс (наприклад, сефароза, скляні або силіконові кульки), на якому розташовані молекули здатні зв'язувати імуноглобуліни.

У колонці для А-ІА на матриксі іммобілізований протеїн А - білок виділяється з клітинної стінки *Staphylococcus aureus*. При проходженні плазми пацієнта через колонку, Fc-фрагмент ІgG ковалентно зв'язується з протеїном А, таким чином з плазми видаляються імуноглобуліни класу G. При цьому найбільш ефективно видаляються підкласи ІgG1, ІgG2 і ІgG4. Плазма очищена від імуноглобулінів повертається пацієнту. При проходженні через колонку для А-ІА одного об'єму циркулюючої плазми видаляється близько 90% імуноглобулінів класу G і приблизно 55% імуноглобулінів класів M і A. При цьому не спостерігається значного зниження рівня фібриногену [4,5]. Колонка для Іg-імуноадсорбції на своєму матриксі містить поліклональні антитіла до імуноглобуліну людини. Механізм і ефективність елімінації імуноглобулінів такі ж як при проведенні А-ІА [15, 26].

А-ІА і Іg-ІА володіють усіма перевагами каскадного плазмаферезу, при цьому втрати факторів згортання практично зведені до нуля. Потреби в заміщенні втрат білка, як правило, не виникає, навіть в тому випадку коли проводяться кілька сеансів протягом короткого проміжку часу. Однак у

порівнянні з плазмаферезом і каскадним плазмаферезом дані методики мають обмежену здатність видаляти імуноглобуліни класу М і IgG3. На сьогоднішній день не цілком ясна роль імуноглобулінів даних класів в розвитку антитіло-опосередкованого відторгнення при АВО-несумісної трансплантації нирки [26]. Однак, в 2007 році Tyden і співавт. повідомили про результати кількох АВО-несумісних трансплантацій нирки з використанням А-ІА для передопераційної підготовки. У одного пацієнта з трьох в післяопераційному періоді розвинулося гостре антитіло-опосередковане відторгнення, яке автори пов'язують з недостатньою ефективністю процедур А-ІА в передопераційному періоді [24].

Використання методів напівселективної імуноадсорбції пов'язане з додатковими витратами на придбання колонок і витратних матеріалів. За оцінками Tyden і співавт. [24] і Schwenger і співавт. [17] ці витрати становлять 10 000 - 12 000 доларів США на одного пацієнта при порівнянні з плазмаферезом.

Перші повідомлення про експериментальне застосування антиген-специфічної імуноадсорбції з'явилися в 1970-х роках [22, 23]. У 1979 році Terman і співавт. повідомили про успішне лікування пацієнта на системний червоний вовчак з допомогою специфічної імуноадсорбції антитіл до ДНК [21]. Трохи пізніше Bensingер і співавтори опублікували результати першого дослідження застосування імуноадсорбції для видалення анти-А/В антитіл для підготовки пацієнтів до АВО-несумісної трансплантації кісткового мозку. Імуносорбентами були синтетичні А або В антигени іммобілізовані на кремнієвому матриксі [6]. Ця система реалізується під назвою Synisorb / Biosorb і активно застосовувалася у всьому світі для проведення несумісних по групі крові трансплантацій [2, 3, 17, 19]. Однак на початку 1990-х років через часті побічні ефекти (тромбоцитопенія, алергічні реакції, утруднення дихання, болі в грудях і спині, шлунково-кишкові кровотечі та навіть раптові смерті) [3, 20] виробництво цих імуносорбційних колонок було зупинено.

У 2001 році стала доступною для клінічного використання нова система антиген-специфічної імуноадсорбції анти-А/В антитіл (Glycosorb АВО, Glycorex Transplantation АВ, Lund, Sweden). Імуносорбційна колонка являє

собою іммобілізовані на сефарозному матриксі термінальні трисахариди антигену А або антигену В [12]. Перша АВО-несумісна трансплантація з використанням системи Glycosorb була виконана у вересні 2001 року в Karolinska University Hospital, Стокгольм, Швеція [25].

До переваг даного методу видалення циркулюючих анти групових антитіл слід віднести високу ефективність, відсутність потреби в компенсації втрат білка свіжозамороженої плазмою або альбуміном. Варто відзначити, що висока вартість і неможливість повторного використання імуносорбційної колонки істотно обмежує застосування даної технології. У зв'язку з цим, в останні роки дослідження спрямовані на створення колонок багаторазового застосування. Таки колонки у 2011 році почала випускати науково-виробнича фірма Покард (Москва, Росія) під назвою «АВО Адсопак». Після проведення процедури сорбційна здатність колоки відновлюється регенеруючими розчинами 1 та 2, після чого консервується та може зберігатися при 4<sup>0</sup>С до наступного використання. Ефективність та безпечність виробу була доведена стійким зниженням титру анти-А/В антитіл та відсутністю серйозних ускладнень в багатьох спостереженнях (34).

Ще один спосіб зменшення витрат на елімінацію анти-А/В антитіл – зменшення кількості процедур за рахунок пролонгації сеансів імуносорбції до 8 часів, та збільшення об'єму обробленої плазми до 18 літрів, поєднання імуносорбції з гемодіалізом (Ростаинг-ссилки).

Таким чином, елімінація анти-А/В антитіл є важливим компонентом підготовки реципієнта до АВО-несумісної трансплантації. Запропоновано декілька методів досягнення цієї мети, кожен з них має свої переваги та недоліки. Подальші дослідження допоможуть розробити алгоритм вибору такого підхода, який дозволить досягти оптимального результату при мінімумі витрат.

## Список використаної літератури

1. *Agishi T., Kaneko I., Hasuo Y. [et al.]* Double filtration plasmapheresis // *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* - 1980: Vol. 26. - p. 406-11.
2. *Alexandre G. P., Squifflet J. P., De Bruyere M. [et al.]* Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts // *Transplant Proc.* - 1987. - 6: Vol. 19. - p. 4538-42.
3. *Bannett A. D., McAlack R. F., Raja R. [et al.]* Experiences with known ABO-mismatched renal transplants // *Transplant Proc.* - 1987. - 6: Vol. 19. - p. 4543-6.
4. *Belak M., Borberg H., Jimenez C. [et al.]* Technical and clinical experience with protein A immunoabsorption columns // *Transfus Sci.* - 1994. - 4: Vol. 15. - p. 419-22.
5. *Belak M., Widder R. A., Brunner R. [et al.]* Immunoabsorption with protein A sepharose or silica // *Lancet.* - 1994. - 8900: Vol. 343. - p. 792-3.
6. *Bensinger W. I., Baker D. A., Buckner C. D. [et al.]* Immunoabsorption for removal of A and B blood-group antibodies // *N Engl J Med.* - 1981. - 3: Vol. 304. - p. 160-2.
7. *Chirnside A., Urbaniak S. J., Prowse C. V. [et al.]* Coagulation abnormalities following intensive plasma exchange on the cell separator. II. Effects on factors I, II, V, VII, VIII, IX, X and antithrombin III // *Br J Haematol.* - 1981. - 4: Vol. 48. - p. 627-34.
8. *Domen R. E., Kennedy M. S., Jones L. L. [et al.]* Hemostatic imbalances produced by plasma exchange // *Transfusion.* - 1984. - 4: Vol. 24. - p. 336-9.
9. *Hanafusa N., Kondo Y., Suzuki M. [et al.]* Double filtration plasmapheresis can decrease factor XIII Activity // *Ther Apher Dial.* - 2007. - 3: Vol. 11. - p. 165-70.
10. *Higgins R., Lowe D., Hathaway M. [et al.]* Double filtration plasmapheresis in antibody-incompatible kidney transplantation // *Ther Apher Dial.* - 2010. - 4: Vol. 14. - p. 392-9.
11. *Huestis D. W.* Risks and safety practices in hemapheresis procedures // *Arch Pathol Lab Med.* - 1989. - 3: Vol. 113. - p. 273-8.

12. *Kumlien G., Ullstrom L., Losvall A. [et al.]* Clinical experience with a new apheresis filter that specifically depletes ABO blood group antibodies // *Transfusion.* - 2006. - 9: Vol. 46. - p. 1568-75.
13. *Lin S. M., Yeh J. H., Lee C. C. [et al.]* Clearance of fibrinogen and von Willebrand factor in serial double-filtration plasmapheresis // *J Clin Apher.* - 2003. - 2: Vol. 18. - p. 67-70.
14. *Park E.S., Jo K.I., Shin J.W. [et al.]* Comparison of Total and IgG ABO Antibody Titers in Healthy Individuals by Using Tube and Column Agglutination Techniques // *Ann Lab Med.* – 2014. – 3: – Vol. 34. – p. 223-229.
15. *Pierson R. N., 3rd, Loyd J. E., Goodwin A. [et al.]* Successful management of an ABO-mismatched lung allograft using antigen-specific immunoadsorption, complement inhibition, and immunomodulatory therapy // *Transplantation.* - 2002. - 1: Vol. 74. - p. 79-84.
16. *Rabitsch W., Knobl P., Greinix H. [et al.]* Removal of persisting isohaemagglutinins with Ig-Therasorb immunoadsorption after major ABO-incompatible non-myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation // *Nephrol Dial Transplant.* - 2003. - 11: Vol. 18. - p. 2405-8.
17. *Rydberg L., Nyberg G., Attman P. O. [et al.]* Characterization of the anti-A antibody binding in an ABO-incompatible living donor renal transplantation // *Nephrol Dial Transplant.* - 1994. - 8: Vol. 9. - p. 1162-5.
18. *Schwenger V., Morath C.* Immunoadsorption in nephrology and kidney transplantation // *Nephrol Dial Transplant.* - 2010. - 8: Vol. 25. - p. 2407-13.
19. *Sugiyama K., Hyodo Y., Aikawa A.* Evaluation of blood group antibodies in ABO-incompatible livingdonor kidney transplantation // *Int J of Urol.* – 2015. – 10: Vol. – 22. – p. 931-936
20. *Takahashi K.* Accommodation in ABO-incompatible kidney transplantation: why do kidney grafts survive? // *Transplant Proc.* - 2004. - 2 Suppl: Vol. 36. - p. 193S-196S.
21. *Tanabe K.* Double-filtration plasmapheresis // *Transplantation.* - 2007. - 12 Suppl: Vol. 84. - p. S30-2.



22. *Tanabe K., Tokumoto T., Ishida H. [et al.]* Excellent outcome of ABO-incompatible living kidney transplantation under pretransplantation immunosuppression with tacrolimus, mycophenolate mofetil, and steroid // *Transplant Proc.* - 2004. - 7: Vol. 36. - p. 2175-7.
23. *Terman D. S., Buffalo G., Mattioli C. [et al.]* Extracorporeal immunoadsorption: initial experience in human systemic lupus erythematosus // *Lancet.* - 1979. - 8147: Vol. 2. - p. 824-7.
24. *Terman D. S., Petty D., Harbeck R. [et al.]* Specific removal of DNA antibodies in vivo by extracorporeal circulation over DNA immobilized in collodion charcoal // *Clin Immunol Immunopathol.* - 1977. - 1: Vol. 8. - p. 90-6.
25. *Terman D. S., Tavel T., Petty D. [et al.]* Specific removal of antibody by extracorporeal circulation over antigen immobilized in collodion-charcoal // *Clin Exp Immunol.* - 1977. - 1: Vol. 28. - p. 180-8.
26. *Tyden G., Kumlien G., Efvergren M.* Present techniques for antibody removal // *Transplantation.* - 2007. - 12 Suppl: Vol. 84. - p. S27-9.
27. *Tyden G., Kumlien G., Fehrman I.* Successful ABO-incompatible kidney transplantations without splenectomy using antigen-specific immunoadsorption and rituximab // *Transplantation.* - 2003. - 4: Vol. 76. - p. 730-1.
28. *Wahrman M., Schiemann M., Marinova L. [et al.]* Anti-A/B antibody depletion by semiselective versus ABO blood group-specific immunoadsorption // *Nephrol Dial Transplant.* - 2012. - 5: Vol. 27. - p. 2122-9.
29. *Muramatsu M., Gonzalez Y.D., Cacciola R. [et al.]* ABO Incompatible Renal Transplants: Good or Bad? // *World J Transplant.* - 2014. - 1: Vol. 4. - p. 18-29.
30. Визначення груп крові за системою АВО, резус та імуних антитіл – Інструкція МОЗУ, Київського НДІ гематології та трансфузіології Львівського НДІ патології крові та трансфузійної медицини // Київ -1999 – с 1-47.
31. Лаповець Л.Є., Луцик Б.Д. Лабораторна імунологія.// Київ – 2004 . с 64-66.

- 32.Цирюльникова О.М., Готье С.В., Поронова А.К. « федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. Академика В.И. Шумакова» МЗРФ патент RU 2526820.
- 33.Матвеева М.А., Минеева Н. В., Климова К.Л., Волкова О.А.,// Гематология и трансфузиология 1989 №10.
34. Мойсюк Я.Г., Сушков А.И., Пулькова Н.В. и соавт. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011: - 4. – Том 13. – с. 6-18.
- 35.Kanellopoulou T., Kostelidou T. Literature review of apheresis procedures performed perioperatively in cardiac surgery for ASFA category indications // J Clin Apher. – 2018. - doi: 10.1002/jca.21676. [Epub ahead of print]
- 36.Roman P.E., DeVore A.D., Welsby I.J. Techniques and applications of perioperative therapeutic plasma exchange // Curr Opin Anaesthesiol. – 2014. - 1: - Vol. 27. - p. 57-64.

Інформація про авторів:

Зограбян Р.О. – [88rubenz@gmail.com](mailto:88rubenz@gmail.com)

Закордонєць В.П. [zakordonetsv@gmail.com](mailto:zakordonetsv@gmail.com)

Малик А.І. [andrimalyk@gmail.com](mailto:andrimalyk@gmail.com)

Баран В.Є [woldemari4s@gmail.com](mailto:woldemari4s@gmail.com)

Харченко С.Є. [kharchenko192@gmail.com](mailto:kharchenko192@gmail.com)

Бочарніков С.М. [sergey.bocharnikov75@gmail.com](mailto:sergey.bocharnikov75@gmail.com)

Полончук Н.М. [polonchuk22@gmail.com](mailto:polonchuk22@gmail.com)

Закрутько О.В. [zakrutkos@ukr.net](mailto:zakrutkos@ukr.net)

Вороняк О.С. [dr.voroniak@gmail.com](mailto:dr.voroniak@gmail.com)

Торак В.М.