

УДК 616.61—089.843—092:612.017:576.8.097

Г. Н. Дранник, Л. А. Мигаль, Н. М. Петрунь, Г. А. Белицкая

РЕАКЦИЯ ОТТОРЖЕНИЯ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ И ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В ПОСТТРАНСПЛАНТАЦИОННОМ ПЕРИОДЕ

Несмотря на значительные успехи, достигнутые клинической трансплантологией в области пересадки почки, некоторые важнейшие вопросы, связанные с этой проблемой, остаются нерешенными и требуют дальнейших клинических и экспериментальных исследований. Наибольшую трудность представляет своевременная диагностика криза отторжения пересаженной почки. Большинство методов, используемых для этой цели, основаны на применении иммунологических тестов, так как реакция отторжения трансплантата, согласно современным представлениям, является следствием иммунологического конфликта между донором и реципиентом. Однако отторжение почки не ограничивается только иммунологическими проявлениями. В патогенезе реакции отторжения почки, как было показано в последние годы, большая роль принадлежит нарушениям процессов внутрипочечной гемокоагуляции [12]. Кроме того, определенный интерес представляет изучение показателей активности ряда ферментов в динамике посттрансплантационного периода. Подобное комплексное исследование расширит наши представления о патогенетических механизмах отторжения почки и даст возможность изучить информативность различных тестов в диагностике реакции отторжения трансплантата. Особо следует отметить, что пересадки почек в эксперименте, выполненные в условиях предварительно индуцированного гломерулонефрита, являются более адекватными, чем те, которые осуществлялись на интактных животных, так как позволяют учитывать влияние на реакцию отторжения патологического фона.

Методика исследований

Опыты проведены на 12 беспородных собаках весом от 15 до 25 кг. Индукцию гломерулонефрита осуществляли по [4]: Аллотрансплантацию почки производили на сосуды шеи. В качестве иммунодепрессанта использовали козий противособачий антилимфоцитарный глобулин (АЛГ). Введение АЛГ начинали за три—пять дней до пересадки почки и продолжали ежедневно на протяжении первой недели после операции. Начиная со второй недели, АЛГ вводили дважды в неделю. Через месяц после пересадки иммунодепрессант вводили один раз в неделю. В случае развития криза отторжения, дозу АЛГ увеличивали. Препарат вводили внутримышечно, из расчета 20—30 мг/кг.

Для оценки функции почки в динамике опыта определяли содержание мочевины и креатинина в крови. Состояние гуморального иммунитета изучали при помощи реакции связывания комплемента на холоду с почечным антигеном и лимфоцитотоксического теста. Активность клеточного иммунитета оценивали с помощью теста ингибции миграции лейкоцитов (ИМП) в присутствии почечного и лимфоцитарного антигенов. Нормальными показателями миграции лейкоцитов считали показатели, укладывающиеся в интервал 0,8—1,3. Продукты распада фибрин/фибриногена (ПРФ) в

моче определяли двумя методами: иммунохимическим [19] (антисыворотку к собачьему фибрину получали по [17]) и биохимическим [1].

В плазме крови подопытных животных определяли активность трансаминазы [5], глутаминазы I (обеих ее форм — фосфатзависимой и фосфатнезависимой — ФЗГ и ФНГ) и активность системы глутаминазы II или пируват — зависимой [8]. Активность трансаминазы выражали в условных единицах (полученные данные умножали на 10, в качестве субстратов использовали L-канаванин и L-орнитин). Количество аргинина определяли с помощью реакции Сакагучи в модификации Фарбижевского с соавт. [14].

Результаты исследований и их обсуждение

Контрольные исследования, проведенные у собак до начала индуцирования гломерулонефрита, не выявили патологических изменений со стороны почек и иммунной системы организма. На высоте развития хронической почечной недостаточности отмечались резкое снижение функции почек, а также иммунопатологические и ферментативные нарушения (см. таблицу). Анализ результатов показал, что средняя продолжительность функционирования аллогенной почки в условиях применения АЛГ составляла $43,6 \pm 12,2$ дней (от 25 до 175). Отметим, что из 12 собак отторжение наступило у восьми, две — погибли от кровотечения из анастомозов при хорошо функционирующем трансплантате; две собаки были забиты для патоморфологических исследований.

Уже через сутки после пересадки почки концентрация мочевины в крови снизилась в среднем на 42, а креатинина — на 49% по сравнению с дооперационным периодом. В дальнейшем эти показатели продолжали уменьшаться, не достигая, однако, нормальных величин.

При анализе иммунологических данных было обнаружено, что иммунодепрессивная терапия, начатая до пересадки почки, привела к нормализации ИМЛ у собак с гломерулонефритом. Однако в посттрансплантационном периоде у животных отмечались случаи усиления ИМЛ, что расценивалось нами как признак угрожающего криза отторжения (см. рисунок). В качестве примера приводим график, отражающий динамику изученных показателей у собаки № 4. Отметим, что ИМЛ усиливалась под влиянием как почечного, так и лимфоцитарного антигенов. Усиление ответа на почечный антиген связано, по-видимому, с наличием у собак до пересадки иммунопатологического компонента. Появление сенсibilизации к лимфоцитарному антигену носит характер *de novo* и объясняется развитием иммунологической реакции на трансплантационные антигены донора. Можно предположить, что эти два процесса принимают участие в патогенезе отторжения, действуя синергично. Усиление ИМЛ предшествовало ухудшению функции трансплантата (см. рисунок а, б, д). В некоторой степени это касается и изменений в активности трансаминазы (см. рисунок, г). Усиление иммунодепрессивной терапии в двух случаях привело к временному

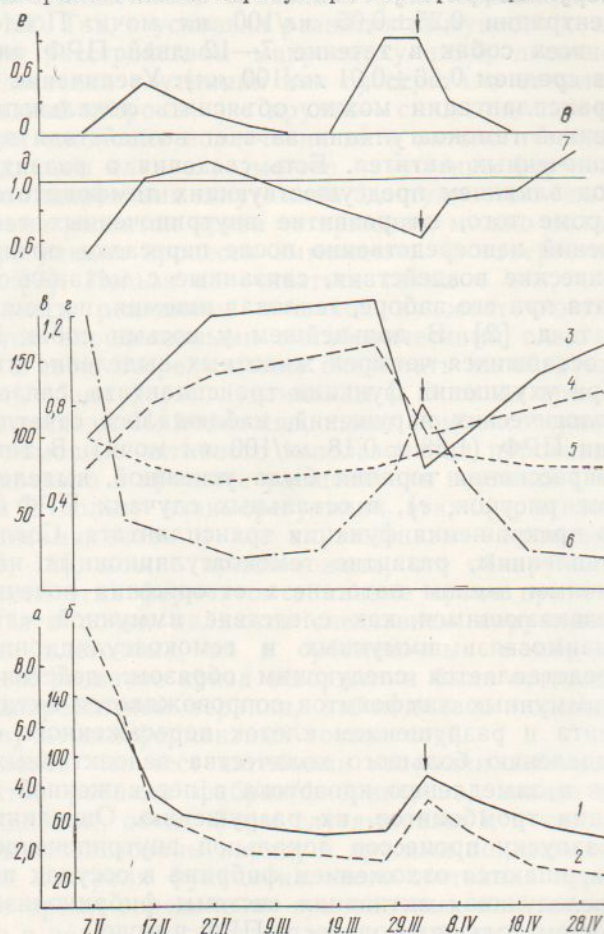
Иммунологические и биохимические показатели у собак в норме и при

Исследуемый по- казатель	Мочевина	Креатинин	Протеинурия в % n=8	Трансаминаза в усл. ед. n=8
	мг % n=12			
Норма	35,3±3,5	0,95±0,11	0	0
ХПН	149,9±12,1	7,44±0,31	8,2±1,7	1,05±0,03
p<	0,001	0,001	0,001	0,001

купированию криза отторжения. Что касается гуморальных антител, то сразу же после пересадки они не были обнаружены. Однако к концу 2 нед в некоторых случаях их удавалось выявить (как противопочечные, так и лимфоцитотоксические). Титры их были невысокими, а появление в циркуляции крови носило нерегулярный характер. Особо отметим, что гуморальные антитела непосредственно перед ухудшением функции трансплантата не выявлялись. Напротив, их появление, как правило, регистрировали после ухудшения функции пересаженной почки. Тем не менее, сам

Изменения содержания мочевины (1), креатинина (2), активности ФЗГ (3), ФНГ (4), глутаминазы II (5), трансамидиназы (6), степени ингибции миграции лейкоцитов (7), содержания ПРФ в моче (8) у собаки № 4 до и после аллотрансплантации почки.

По горизонтали — время до и после аллотрансплантации почки; по вертикали: а — уровень креатинина (в мг%); б — концентрация мочевины (в мг%); в — активность ФЗГ, ФНГ и глутаминазы II (в мкг N-NH₃); г — активность трансамидиназы (в усл. ед.); д — индекс миграции лейкоцитов; е — содержание ПРФ в моче (в мг/100 мл). Стрелкой обозначен день, когда был диагностирован криз отторжения и была усилена иммунодепрессия.



факт появления антител говорит об участии в реакции отторжения В-системы иммунитета.

Как уже было отмечено, ПРФ определяли в моче двумя методами. Сравнение полученных результатов показало их полное совпадение. Это свидетельствует о том, что биохимический метод по чувст-

развитии хронической (почечной недостаточности (ХПН) ($M \pm m$)

Глутаминаза I		Глутаминаза II	Тест ингибции миграции лейкоцитов $n=12$	Противопочечные антитела ($\log_2$ титра) $n=12$
ФЗГ	ФНГ			
в мкг N-NH ₃ , $n=8$				
355,0 $\pm$ 17,5	232,0 $\pm$ 22,0	62,0 $\pm$ 7,4	1,08 $\pm$ 0,02	0
82,0 $\pm$ 7,4	105,0 $\pm$ 12,0	100,0 $\pm$ 14,0	0,57 $\pm$ 0,04	0—2,7 $\pm$ 0,3
0,001	0,001	0,05	0,001	

вительности не уступает иммунохимическому, а, учитывая сравнительную простоту и доступность его выполнения — предпочтительней его. При анализе полученных данных оказалось, что ПРФ в моче собак до индукции гломерулонефрита не обнаруживали. При развитии гломерулонефрита у семи из 12 собак ПРФ выявляли в среднем в концентрации $0,25 \pm 0,05$ мг/100 мл мочи. После трансплантации почки у всех собак в течение 7—12 дней ПРФ экскретировались с мочой (в среднем $0,66 \pm 0,01$ мг/100 мл). Увеличение ПРФ в моче собак после трансплантации можно объяснить локальным нарушением внутрипочечной гемокоагуляции за счет воздействия предсуществующих противопочечных антител. Есть сведения о развитии подобных нарушений под влиянием предсуществующих лимфоцитотоксических антител [11]. Кроме того, на развитие внутрипочечных гемокоагуляционных нарушений непосредственно после пересадки почки могут влиять неспецифические воздействия, связанные с механической травмой трансплантата при его заборе, тепловая ишемия, погрешности в консервировании и т. д. [2]. В дальнейшем у восьми собак ПРФ из мочи исчезали, у оставшихся четырех животных выделение их значительно снизилось. При ухудшении функции трансплантата, связанной с развитием иммунологических нарушений, наблюдалось отчетливое увеличение экскреции ПРФ ($1,68 \pm 0,18$ мг/100 мл мочи). В том случае, когда иммунодепрессивная терапия была успешной, выделение ПРФ прекращалось (см. рисунок, е), в остальных случаях ПРФ продолжали выделяться до прекращения функции трансплантата. Согласно современным представлениям, развитие гемокоагуляционных нарушений является вторичным звеном патогенеза отторжения почечного аллотрансплантата, развивающимся как следствие иммунной «атаки» на трансплантат. Взаимосвязь иммунных и гемокоагуляционных звеньев патогенеза представляется следующим образом: действие гуморальных антител и иммунных лимфоцитов сопровождается активацией системы комплемента и разрушением клеток пересаженного органа. Это приводит к выделению большого количества вазоактивных веществ, спазму сосудов и замедлению кровотока в пересаженной почке, повышению агрегации тромбоцитов, их разрушению. Описанные нарушения приводят к запуску процессов локальной внутрипочечной коагуляции, которые завершаются отложением фибрина в сосудах почечного трансплантата. Последующая активация системы фибринолиза сопровождается появлением больших количеств ПРФ в моче.

Повреждение трансплантата под влиянием иммунных и гемокоагуляционных механизмов влечет за собой ферментные нарушения. Так, при развитии криза отторжения отмечалось резкое повышение активности трансаминазы (см. рисунок, г) и не менее резкое снижение активности глутаминазы I (обеих ее форм), в то же время активность глутаминазы II имела даже некоторую тенденцию к увеличению (см. рисунок, в). Повышение активности трансаминазы в плазме крови можно объяснить нарушением целостности канальцевого аппарата нефрона, развившегося вследствие иммунного конфликта [3]. Известно, что основным местом локализации этого фермента являются проксимальные канальцы [20], при их разрушении трансаминаза освобождается и поступает в ток крови. Изменения же в активности глутаминдезамидирующих ферментов, наибольшее содержание которых было обнаружено также в канальцевых структурах нефрона [13], следует рассматривать как следствие расстройств канальцевых функций почки, в частности функции противодействия метаболическому ацидозу. Известно, что глутаминазы — это ферменты, ответственные за

синтез аммиака в почках. Снижение способности почек экскретировать аммоний во время развития реакции отторжения было отмечено рядом авторов [9, 10]. М. Я. Ратнер с соавт. [9] даже утверждают, что нарушение этой функции почек может быть иногда единственным проявлением криза отторжения. Попытаемся объяснить факт снижения в плазме крови и ФЗГ, и ФНГ. Так, в условиях развития иммунного конфликта, сопровождающего расстройством микроциркуляции, логично предположить снижение доставки глутамина как субстрата в канальцевые клетки почек — с одной стороны, а с другой — снижение синтеза глутамина в печени как следствие вовлечения её в патологический процесс [6]. То есть, в данном случае возможно нарушение ферментативной регуляции дезамидирования глутамина доступностью субстрата. Кроме того, во время развития криза отторжения, можно полагать, нарушается также регуляция процесса аммионогенеза «энергетическим статусом» клетки [7]. Нельзя не считаться также с тем, что криз отторжения, проявляясь рецидивом почечной недостаточности, непременно сопровождается определенными метаболическими сдвигами на уровне клетки, что в свою очередь может оказывать ингибирующее влияние на активность обеих форм глутаминазы I. В то же время усиление активности глутаминазы II, возможно, имеет компенсаторное значение, реализуемое с помощью активного использования пировиноградной кислоты как активатора в процессе расщепления глутамината — факт, свидетельствующий в пользу взаиморегуляции этих ферментов [15]. Учитывая, что трансамидиназа и все глутаминазы — митохондриальные ферменты [16, 18], можно предположить, что обнаруженные изменения в активности этих ферментов в плазме крови при отторжении аллотрансплантата почки являются следствием нарушения проницаемости не только клеточных, но и субклеточных мембран. У тех животных, у которых развитие криза отторжения было остановлено усилением иммунодепрессивной терапии, наблюдалась положительная динамика всех изучаемых ферментных показателей.

Заключая, можно сказать, что тест ингибиции миграции лейкоцитов, определение продуктов распада фибрин/фибриногена, показателей активности трансамидиназы, обеих форм глутаминазы I, а также глутаминазы II могут быть использованы наряду с другими показателями в качестве тестов для контроля функционального состояния пересаженной почки. В то же время определение гуморальных антител не может быть использовано в целях диагностики криза отторжения.

Патогенез отторжения аллогенной почки представляется весьма сложным. Он состоит из основного (иммунного), вспомогательного (гемокоагуляционного) и сопутствующего (ферментные нарушения) звеньев. По всей вероятности, на основании изучения последних двух звеньев можно лишь подтвердить развитие криза отторжения, предсказать же его развитие можно на основании своевременного распознавания усиления функции иммунной системы защиты. Это диктует необходимость разработки новых, более чувствительных методов, каковыми могут стать методы изучения цитохимического профиля лимфоцитов в динамике посттрансплантационного периода.

Литература

1. Белицер В. О., Варецька Т. В., Цинкаловська С. М., Царюк Л. А., Шевченко Л. І., Білецька Г. О., Єна Я. М. Визначення продуктів розщеплення фібриногену й фібрину за їх протизсідальною дією. — Укр. біохім. журн., 1976, 48, № 4, с. 521—532.
2. Биленко М. В. Ранние изменения в аллогенном почечном трансплантате в фазе ан-

- тигенного распознавания и при начальных признаках острого криза отторжения.— В кн.: Ранние проявления тканевой несовместимости. М., 1976, с. 15—16.
3. Горюнов В. Г. Определение функции трансплантированной почки.— В кн.: Материалы I Всесоюз. съезда нефрологов. Минск, 1974, с. 55—56.
 4. Дранник Г. Н., Соколов А. В., Петрунь Н. М., Мигаль Л. А., Мацуй В. И. Моделирование гломерулонефрита у собак.— Физиол. журн., 1978, № 4, с. 476—481.
 5. Мардашев С. Р., Карелин А. А. Определение трансаминазы в сыворотке крови и моче при поражении почек и поджелудочной железы.— В сб.: Методы исследования активности некоторых ферментов в клинике. М., 1967, с. 67—76.
 6. Маянский Д. Н. Первичные и вторичные изменения печени при трансплантационной болезни.— В кн.: Ранние проявления тканевой несовместимости. М., 1976, с. 168.
 7. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма.— М.: Мир, 1977.—407 с.
 8. Петрунь Н. М., Мигаль Л. А. Колориметрический метод определения трех типов глютаминаз в тканях и биологических жидкостях.— Лабор. дело, 1975, с. 352—353.
 9. Ратнер М. Я., Томила Н. А., Алексеева Л. П., Федорова Н. Д. О субклинических кризах отторжения почечного аллотрансплантата.— Вестник АМН СССР, 1973, № 8, с. 59—64.
 10. Томила Н. А., Федорова Н. Д., Бирюкова Л. С. Влияние иммунодепрессии на функцию почечного аллотрансплантата.— В кн.: Иммунодепрессия при трансплантации органов. М., 1973, с. 114—124.
 11. Busch G. J., Martins A. C. P., Hollenberg N. R. e. a. A primate model of hyperacute renal allograft rejection.— Amer. J. Path., 1975, 79, N 1, p. 31—56.
 12. Claes G., Svalander C., Bergentz S. E. The accumulation and distribution of platelets and fibrin in rejecting dog kidneys.— Acta chir. scand., 1973, 139, p. 91—96.
 13. Curthoys N. P., Sindel R. W., Lowry O. H. Rat kidney glutaminase isoenzymes.— In: Enzymes Glutamine Metabol. New-York, London, 1973, p. 259—275.
 14. Farbiszewski R., Worowski K., Rzezycki W. The application of a modified Sakaguchi's method for quantitative estimation of protein-bound arginine.— Chem. anal. (PRL), 1972, 17, N 1, p. 133—137.
 15. Fine A., Scott J., Bourke E. Studies on the glutamine aminotransferase w-amidase pathway in human kidney in vitro.— J. Lab. and Clin. Med., 1972, 80, N 4, p. 591—597.
 16. Kalra J., Bosnan J. T. The subcellular localisation of glutaminase isoenzymes in rat kidney cortex.— J. Biol. Chem., 1974, 249, N 10, (p. 3255—3260).
 17. Lervis J. H., Wilson J. H. Fibrinogen breakdown products.— Amer. J. Physiol., 1964, 207, N 5, p. 1053—1057.
 18. Magry E., Baldoni G., Crazi E. On the biosynthesis of creatine. Intramitochondrial localisation of transaminase from rat kidney. FEBS Lett., 1975, 55, N 1, p. 91—93.
 19. Merskey C., Lalezari P., Johnson A. J. A rapid, simple, sensitive method for measuring fibrinolytic split products in human serum.— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 131, N 3, p. 871—875.
 20. Methfessel J. Zur Organ- und Subzellularverteilung der Transaminase bei Mensch und Ratte.— Acta biol. et med. ger., 1976, 35, N 3—4, p. 309—315.

Лаборатория патологической физиологии
и лаборатория биохимии
Киевского института урологии

Поступила в редакцию
11.VII 1977 г.

G. N. Drannik, L. A. Migal', N. M. Petrun', G. A. Belitskaya

PATHOGENESIS OF REJECTION OF RENAL TRANSPLANT CORRELATION OF IMMUNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES IN DYNAMICS OF POSTTRANSPLANTATION PERIOD

Summary

The immunological and biochemical investigations indices were studied in dynamics of the posttransplantation period in dogs after renal transplantation with the preliminary induced chronic glomerulonephritis. It is shown that the degree of leukocytes migration, the products of fibrin/fibrinogen splitting in urine, the transaminase activity, glutaminase I activity (both forms — phosphate-dependent and phosphate-independent) and glutaminase II activity can be used as control tests of functional state of renal transplant. In authors's opinion it is difficult to determine pathogenesis of rejection crisis of the renal transplant which consists of basic (immune), auxiliary (hemocoagulation) and accompanying (enzyme disorders) links.

Research Institute of Urology, Kiev