

# Imuninė sensitizacija po dirbtinės širdies prijungimo

## Immune sensitization after artificial heart support device implantation

Radvilė Malickaite<sup>1,2</sup>, Aldona Stanevičienė<sup>2</sup>, Kęstutis Ručinskas<sup>1,2</sup>, Laimutė Jurgauskienė<sup>1,2</sup>, Saulius Miniauskas<sup>1,2</sup>, Vytautas Sirvydis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Vilniaus universiteto Širdies ir kraujagyslių ligų klinikos Širdies chirurgijos centras, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius*

<sup>2</sup> *Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos, Santariškių g. 2, LT-08661 Vilnius*

*El. paštas: radvile.malickaite@santa.lt*

<sup>1</sup> *Vilnius University Clinic of Cardiovascular Diseases, Cardiac Surgery Centre, Santariškių str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania*

<sup>2</sup> *Vilnius University Hospital „Santariškių klinikos“, Santariškių str. 2, LT-08661 Vilnius, Lithuania*

*E-mail: radvile.malickaite@santa.lt*

---

### Tikslas

Įvertinti Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Širdies chirurgijos centre atliekamos dirbtinės širdies implantavimo procedūros įtaką imuninei širdies laukiančių recipientų būklei ir palyginti gautus rezultatus su kitų centrų duomenimis.

### Ligoniai ir metodai

Ištirta aštuonių potencialių širdies recipientų, kurių kraujotaka buvo palaikoma dirbtinės širdies skilvelio (DŠS), imuninių rodiklių dinamika: prieš DŠS implantavimą ir praėjus ne mažiau kaip vienam mėnesiui po operacijos. Nustatytas periferinio kraujo imunokompetentinių ląstelių CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ir CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> skaičius, Apo-1/FAS (CD95) ekspresija CD4<sup>+</sup> ir CD8<sup>+</sup> limfocitų paviršiuje, viduląstelinė aktyvi kaspazė-3 ir sensitizacija HLA antigenams.

### Rezultatai

Po DŠS prijungimo atsiranda limfocitų T helperių (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) skaičiaus trūkumas, ryškesnis pacientų, kuriems implantuotas išorinis dirbtinis skilvelis. Numanomas ląstelių praradimo mechanizmas yra apoptozės indukcija. Nepaisant ilgalaikio DŠS prijungimo ir pakartotinių kraujo produktų perpylimų (lentelė), antikūnai prieš HLA sistemos antigenus daugumai pacientų nesigamino: sensitizacija nustatyta tik dviem iš aštuonių pacientų (gavusių santykiškai daugiau kraujo produktų).

### Išvada

Sensitizacija apsunkina pacientų gydymą, ypač vengtini kraujo produktai. Patartina naudoti leukofiltruotus kraujo produktus.

**Pagrindiniai žodžiai:** dirbtiniai širdies skilveliai, imunologinė sensitizacija, apoptozė

### Objective

This study was designed to characterize alterations in the immune system of patients who received artificial heart (AH) placement therapy for end-stage heart failure as a bridge to heart transplantation at the Vilnius University Cardiac Surgery Centre.

## Patients and methods

Immunological studies were performed in 8 pts awaiting cardiac transplantation with AH assist (7 of them were transplanted after 75–1050 days of support). Immunological indices before AH placement and after one month of mechanical assistance (period free from infection) were compared. Fluorochrome-labeled Mabs were used for immunophenotypic analysis of circulating T cells and apoptotic activity evaluation. Antibodies against HLA class I molecules were detected by a standard microlymphocytotoxic test.

## Results

AH recipients showed relative lymphopenia, reduction in CD4 T cell counts, a decreased CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> ratio. Six of the eight recipients with long-term support did not produce HLA antibodies despite receiving blood products during support.

## Conclusion

In conclusion, these results suggest that reduction in CD4<sup>+</sup> T cell levels accompanying AH support may increase the prevalence of infectious complications and HLA sensitization.

**Key words:** heart-assist devices, immune, sensitization, apoptosis

## Įvadas

Širdies persodinimas yra veiksmingas gydymo būdas, gelbstintis ligonių, kurie serga sunkiausiomis širdies ligomis, gyvybę. Organų donorų stoka yra opi problema visame pasaulyje. Sunkios būklės pacientams, kurių galimybė sulaukti širdies persodinimo taikant vien farmakologines priemones dėl donoro organų trūkumo yra labai ribota, mechaninės ilgalaikės asistuojančios kraujotakos sistemos – dirbtinių širdies skilvelių (DŠS) implantacija tampa tiltu į širdies persodinimą.

Pirmą kartą pasaulyje DŠS, kaip tiltas į transplantaciją, JAV Teksaso širdies institute panaudota D. Cooley 1969 metais, o Vilniaus universiteto Širdies chirurgijos centre – 1999 metais [1–3]. Nors klinikinė nauda neabejotina, implantuotas svetimkūnis kelia pavojų būsimai transplantacijai: ilgalaikė biomedžiagos ir recipiento imuninės sistemos sąveika lemia didėjančių komplikacijų dažnį, iš jų sensitizaciją žmogaus leukocitų antigenams (angl. *Human Leukocyte Antigens*, HLA). Manoma, kad viena iš sensitizacijos priežasčių – kartotiniai kraujo produktų perpylimai kraujotakos palaikymo laikotarpiu [4], DŠS mechaninis ir cheminis poveikis ligonio audiniams ir imuninei sistemai [5].

Sensitizacija HLA, kaip kraujo perpylimų, neštumų ir transplantacijų padarinys, yra žinoma nuo 1954–1958 metų. Dirbtinės širdies implantavimas tapo nauja sensitizacijos priežastimi; dėl santykinio naujumo šios sensitizacijos mechanizmas ir klinikinė reikšmė nėra iki galo ištirta.

Šio darbo tikslas – įvertinti Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikų Širdies chirurgijos centre atliekamų dirbtinės širdies implantacijos procedūrų įtaką imuninei recipientų būklei ir palyginti tyrimų rezultatus su kitų centrų duomenimis.

## Ligoniai ir metodai

Išoriniai dirbtiniai širdies skilveliai Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikose naudojami nuo 1999 metų,

nuolatinės srovės implantuojami vidiniai dirbtiniai skilveliai – nuo 2003 metų. Ištyrėme aštuonių potencialių širdies recipientų, kurių kraujotaka buvo palaikoma DŠS, imunitinių rodiklių kitimą. Operacijos atliktos laikotarpiu nuo 1999 metų rugsėjo iki 2006 metų birželio. Pacientų amžius DŠS implantavimo metu buvo nuo 19 iki 62 metų. Septyniems iš jų praėjus 75–1097 dienoms po DŠS prijungimo persodinta širdis, vienas pacientas širdies transplantacijos laukia (300 d.). Nė vienas iš tirtų pacientų nebuvo sensitizuotas prieš DŠS prijungimą, daugumai jų implantavimo metu ir vėliau reikėjo perpilti kraujo preparatų transfuzijos. Tirtų ligonių apibūdinimas pateikiamas lentelėje.

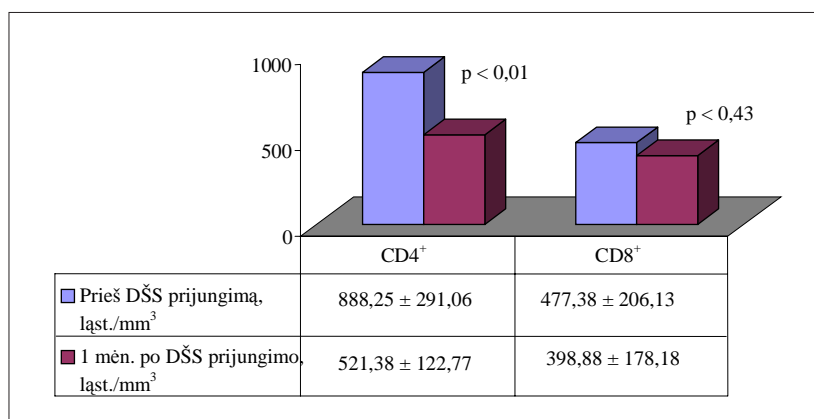
Prieš DŠS implantavimą ir praėjus ne mažiau kaip vienam mėnesiui po operacijos (kai nelieka operacijos, kaip antrinį imunodeficitą lemiančio veiksnio įtakos imuninei sistemai) tirtas periferinio kraujo imunokompetentinių ląstelių CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> ir CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> skaičius, vieno iš apoptozę sukeliančių signalų perdavimo receptorių Apo-1/FAS (CD95) ekspresija CD4<sup>+</sup> ir CD8<sup>+</sup> limfocitų paviršiuje, viduląstelinė aktyvi kaspazė-3 ir sensitizacija HLA antigenams. Paviršiniai ir vidiniai limfocitų žymenys nustatyti tiesioginės imunofluorescencijos metodu lazeriniu tėkmės citometru „FACSCalibur“, naudojant monokloninius antikūnus (*Becton Dickinson*). Antikūnai prieš HLA I klasės molekules ištirti standartiniu mikrolimfocitotoksiniu metodu naudojant 30–40-ties negiminingų asmenų limfocitų panelę (rinkinį). Tyrimo rezultatai vertinti teigiamai, kai recipientų serumas reagavo su ne mažiau kaip 10% limfocitų pavyzdžių (PRA > 10%). Siekiant ištirti kokios klasės antikūnai yra produkuojami, serumas veiktas 0,01 moliariniu ditiotreitolo (DTT) tirpalu – po inkubacijos su DTT išliekantys komplementą sujungiantys antikūnai yra IgG klasės.

## Rezultatai

Imunologinių rodiklių pokyčiai po DŠS prijungimo vertinti lyginant šių ligonių imunokompetentinių ląstelių skai-

Lentelė. Tirtų ligonių apibūdinimas

DŠS tipas	Amžius metais	Kraujo perpylimai (vnt.)	DŠS funkcionavimo trukmė (d.) iki Tx	Sensitizacija prieš DŠS %	Sensitizacija po DŠS %
Išorinis	30,5 ± 12,2	8,0 ± 9,8	392,25 ± 476,44	0	0
Vidinis	48,3 ± 10,1	24,3 ± 17,9	498,75 ± 250,16	0	33



Pav. Imunokompetentinių ląstelių skaičiaus įvertinimas prijungus DŠS (n = 8)

čiaus vidurkius periferiniame kraujyje prieš DŠS prijungimą ir praėjus ne mažiau kaip mėnesiui po mechaninės kraujotakos prijungimo operacijos (periodas be infekcijos požymių). Iš lentelėje pateiktų duomenų aiškėja, kad minėtu laikotarpiu statistiškai patikimai sumažėjo absoliutus limfocitų T helperių (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) skaičius, tačiau citotoksinių ląstelių (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) skaičius liko stabilus visų pacientų: prieš operaciją septynių iš aštuonių pacientų T limfocitų helperių skaičius neviršijo amžiaus normos ribų, o po operacijos tokiam pat skaičiui pacientų nustatytas jų trūkumas. Pacientų, kuriems buvo jungti išoriniai DŠS, CD4<sup>+</sup> limfocitų skaičius kraujyje sumažėjo nuo 945 ± 371 ląst./mm<sup>3</sup> iki 612 ± 107 ląst./mm<sup>3</sup> (p < 0,003), o vidinių DŠS recipientams nuo 831 ± 227 ląst./mm<sup>3</sup> iki 430 ± 40,6 ląst./mm<sup>3</sup> (p < 0,03). Ištyrus ląstelių apoptozės indukcijos rodiklius nustatyta, kad beveik pusė CD4<sup>+</sup> limfocitų (46,33 ± 11,16%) ekspresavo apoptozei būdingą žymenį CD95, o CD8<sup>+</sup> limfocitų paviršiuje jo ekspresija nustatyta tik 32,00 ± 4,36%, viduląstelinės aktyvios kaspazės-3 – 14,78 ± 4,07%. Nė vienas tyrimo grupės pacientas nebuvo sensitizuotas prieš DŠS prijungimą. Nepaisant ilgalaikio DŠS prijungimo ir kartotinių kraujo produktų perpylimų (lentelė), antikūnai prieš HLA sistemos antigenus daugumai pacientų nesigamina: sen-

sitizacija nustatyta tik dviem iš aštuonių pacientų. Pažymėtina, kad abu sensitizuoti pacientai produkavo IgM klasės antikūnus.

## Diskusija

Palyginus imunologinius rodiklius prieš ir po DŠS prijungimo operacijos (periodas be infekcijos apraiškų) visų ligonių nustatyta ta pati imunokompetentinių ląstelių kiekybinio kitimo tendencija – limfopeniją T helperių (CD4<sup>+</sup>) skaičiaus sąskaita. H. J. Ankersmit ir kt. (1999) taip pat nustatė reliatyvią limfopeniją ir sumažėjusi CD4<sup>+</sup> ląstelių kiekį po kairiojo skilvelio prijungimo, palyginti su NYHA IV klasės ligonių, gydomų vaistais, kontroline grupe. Be šių limfocitų populiacijos pokyčių būna padidėjusi T ląstelių (ypač pirmo tipo T helperių) apoptozė ir padidėjęs tirpaus CD95 lygis serume [4]. Autorių nuomone, sumažėjęs T ląstelių skaičius yra CD95 nulemtos apoptozės rezultatas. Tai ne tik padidina šių ligonių polinkį infekcijai, bet ir dėl imunoreguliacinių pokyčių sudaro sąlygas B limfocitų aktyvacijai ir antikūnų produkcijai [5]. Kartu su dažnesniu kraujo komponentų transfuzijų poreikiu toks imunoreguliacinis sutrikimas lemia pacientų sensitizaciją HLA antigenams.

Recipientų serume cirkuliuojantys antikūnai prieš HLA antigenus yra vienas iš ryškiausių ankstyvo transplantato atmetimo (per pirmas 24–48 val.) rizikos veiksnių [6]. Literatūroje pateikiami duomenys apie potencialių recipientų sensitizaciją po DŠS prijungimo yra labai skirtingi – nuo sensitizacijos, siekiančios 66% pacientų po DŠS implantacijos, palyginti su 6% sensitizacija pacientų, laukiančių širdies persodinimo be pagalbinės kraujotakos [7], iki skirtumo tarp grupių, siekiančio 20% *vs* 5% [8].

Šiame straipsnyje pateikiama aštuonių potencialių širdies recipientų, kuriems Vilniaus universiteto Širdies chirurgijos centre buvo prijungta DŠS, imunologinių tyrimų duomenys. Tirtų ligonių kraujotakos palaikymo trukmė nuo 75 iki 1050 dienų, pagal implantavimo pobūdį buvo jungti du DŠS – išoriniai ir vidiniai skilveliai. Klivlando klinikos duomenimis [9], sensitizacija priklauso nuo paciento lyties (moterims dažnesnė negu vyrams), amžiaus (dažnesnė jauniems pacientams), presensitizacijos ir eritrocitų transfuzijų, o nuo DŠS tipo sensitizacija nepriklauso. Kitų autorių duomenimis, sensitizacija priklauso nuo taikomo DŠS tipo [10] – pulsuojančios srovės mechaninės kraujotakos palaikymo įrenginių įtaka imuninei sistemai didesnė negu nuolatinės tėkmės (DeBakey VAD). Mūsų pristatoma pacientų grupė nėra pakankamai didelė, kad būtų galima daryti išvadas apie skirtingą dviejų taikytų skilvelių modelių ir imuninės sistemos sąveiką. Be to, pacientams, kuriems jungti išoriniai skilveliai, reikėjo daugiau kraujo komponentų transfuzijų. Literatūros duomenimis, yra tiesioginė kraujo produktų, ypač trombocitų masės, transfuzijos ir sensitizacijos lygio korekcija [11], tik kraujo produktų paruošimas taikant leukocitų depleciją apsaugo pacientus nuo sensitizacijos (taikant leukocitų depleciją sensitizacija yra 2,9%, jos netaikant – 13,9%). Kita vertus, net griežtas protokolų laikymasis, vengiant ląstelių kraujo komponentų transfuzijų, neapsaugo pacientų nuo alosensitizacijos [7]. Šviežiaai šaldytoje plazmoje taip pat yra HLA antigenų, be to, pacientai jau gali būti sensitizuoti prieš tai buvusių operacijų metu [12]. Vieno tyrimo duomenimis, po DŠS implantavimo gali susiformuoti ne alo-, bet autosensitizacija kraujo baltymams, pavyzdžiui, albuminui [13].

Išsivysčius HLA sensitizacijai taikomas gydymas plazmoferezėmis; šis gydymo būdas yra susijęs su nepageidaujamos dažnomis infekcinėmis komplikacijomis [6]. Alternatyvus tokių pacientų gydymas intraveniniais

imunoglobulinais yra saugesnis, palyginti su plazmofereze [6], bet dėl didelių imunoglobulinų dozių, būtinų antikūnų prieš HLA antigenus produkcijai slopinti (2–3 g/kg nuo vieno iki trijų mėnesių priklausimai nuo atsako), toks pacientų paruošimas yra ypač brangus, be to, susijęs su tokia rizika – imuninių kompleksų liga, karščiavimas, grįžtamasis inkstų funkcijos nepakankamumas.

Dėl pacientų sensitizacijos prijungus palaikomąją mechaninę kraujotaką padidėja transplantato atmetimo reakcijų dažnis. Be to, antikūnai lemia mišraus humoralinio ir ląstelinio atmetimo mechanizmą, kuriam reikia intensyvesnės imunosupresinės terapijos. Klivlando klinikos duomenimis [8], 20% pacientų po DŠS implantavimo buvo sensitizuoti (*vs* 5% laukiančių transplantacijos be pagalbinės kraujotakos) ir sunkaus atmetimo epizodai buvo nustatyti atitinkamai 68% pirmos ir 39% antros grupės pacientų. Nors penkerių metų išgyvenimas tarp grupių reikšmingai nesiskyrė (90% *vs* 86%), bet mirties priežasčių analizė parodė, kad 75% pacientų, kuriems prieš persodinimą buvo jungta DŠS, mirė dėl infekcinių komplikacijų (sepsio), 18,8% – dėl atmetimo, 6,3% dėl išsivysčiusios piktybinės ligos, o 36,5% pacientų, kurie laukė persodinimo be palaikomosios mechaninės kraujotakos, mirė dėl atmetimo, 30,6% dėl išeminės transplantuoto organo kardiomiopatijos, 23,1% – dėl kvėpavimo ar multifunkcinio organų nepakankamumo. Autoriai nurodo, kad sensitizuotiems recipientams buvo taikoma agresyvesnė imunosupresija, t. y. plazmoferezė bei monokloniniai arba polikloniniai antikūnai (OKT3, ATG arba daclizumabas) prieš širdies persodinimą kaip desensitizuojamoji terapija ir persodinto organo atmetimo atveju. Nesensitizuotų pacientų transplantato atmetimas paprastai gydomas steroidais, rečiau – OKT3.

## Išvados

1. Ypač sunkiems recipientams realiausia galimybė sulaukti donoro širdies – dirbtinių širdies skilvelių implantavimas.

2. Sensitizacija apsunkina pacientų gydymą, ypač vengtini kraujo produktai. Patartina naudoti leukofiltruotus kraujo produktus.

3. Remiantis pirmine DŠS prijungimo patirtimi ir imunologinių tyrimų rezultatais, manoma, kad helperių kiekio sumažėjimas prijungus DŠS gali lemti didesnę infekcinių komplikacijų tikimybę.

## LITERATŪRA

1. Miniauskas S, Rasimavičius G, Sirvydis V. Dirbtiniai širdies skilveliai (pirmoji patirtis). *Medicina* 2000; 36: 1283–1289.
2. Miniauskas S, Ručinskas K, Rasimavičius G, Sirvydis V. Pagalbinė kraujotaka (Vilniaus universiteto patirtis). *Medicina* 2004; 40 (pr.1): 61–65.
3. Stanaitienė Ž, Lapšytė V, Cicėnienė O, Malickaitė R. Potencialių širdies recipientų imuninės sistemos pokyčiai po dirbtinės širdies prijungimo. *Medicina* 2001; 37 (11): 1126–1129.
4. Ankersmit HJ, Edwards NM, Schuster M, John R, Kocher A, Rose EA, Oz M, Itescu S. Quantitative changes in T-cell populations after left ventricular assist device implantation. Relationship to T-cell apoptosis and soluble CD95. *Circulation* 1999; 100 (suppl II): II-211–215.
5. Itescu S, John R. Interactions between the recipient immune system and the left ventricular assist device surface: immunological and clinical implications. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S58–S65.
6. John R, Lietz K, Burke E, Ankersmit J, Mancini D, Suciu-Foca N et al. Intravenous immunoglobulin reduces anti-HLA alloreactivity and shortens waiting time to cardiac transplantation in highly sensitized left ventricular assist device recipients. *Circulation* 1999; 100: 229–238.
7. John R, Lietz K, Schuster M, Naka Y, Rao V, Mancini DM, Rose EA, Smith CR, Oz MC, Edwards NM, Itescu S. Immuno-logic sensitization in recipient of left ventricular assist device. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2003; 125: 578–591.
8. Gonzalez-Stawinski GV, Cook DJ, CHANG asy, Banbu-ry MK, Navia JI, Hoercher K, Lober Ch, Atik FA, Taylor DO, Yamani MH, Young JB, Starling RC. Ventricular assist devices and aggressive immunosuppression: looking beyond overall survival. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2006; 25: 613–618.
9. Kumpati GS, Cook DJ, Blackstone EH, Rajeswaran J, Abdo AS, Young JB, Starling RC, Smedira NG, McCarthy PM. HLA sensitization in ventricular assist device recipients: does type of device make a difference? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 127: 1800–1807.
10. Grinda J-M, Bricourt M-O, Amrein C, Salvi S, Guillemain R, Francois A, Guibourt P, Deloche A, Fabiani J-N. Human leukocyte antigen sensitization in ventricular assist device recipients: a lesser risk with the DeBakey axial pump. *Ann Thorac Surg* 2005; 80: 945–948.
11. Massad MG, Cook DJ, Schmitt SK, Smedira NG, McCarthy JF, Vargo RL, McCarthy PM. Factors influencing HLA sensitization in implantable LVAD recipients. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1120–1125.
12. Moazami N, Itescu S, Williams MR, Argenziano M, Weinberg A, Oz MC. Platelet transfusions are associated with the development of anti-major histocompatibility complex class I antibodies in patients with left ventricular assist support. *J. Heart Lung Transplant* 1998; 17: 876–880.
13. Newell H, Smith JD, Rogers P, Birks E, Danskin AJ, Fawson RE, Rose ML. Sensitization following LVAD implantation using leucodepleted blood is not due to HLA antibodies. *American Journal of Transplantation* 2006; 6(7): 1712–1717.