

Прикладные аспекты иммунологии

ИММУНОХИМИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ

к.х.н., доцент кафедры
микробиологии
Герловский Денис Олегович

Минск, 2014

Имунопатологии в экспериментах *in vivo*, исследование патогенеза и этиологии иммунопатологических заболеваний

В нормально функционирующем организме иммунные реакции должны быть (подобно кровяному давлению) адекватными (нормальными) - их неоправданное повышение или понижение приводит к патологическому состоянию организма (т. е. и выше плохо, и ниже плохо).

Неадекватные повышения иммунных реакций (гипериммунный ответ) называются аллергии.

Неадекватные понижения иммунных реакций (иммунного ответа) называются иммунодефицитные состояния (иммунодефициты).

Грубые иммунодефициты позволяют длительно функционировать на человеке различным видам патогенной бактериальной и вирусной микрофлоры, в т.ч. хламидийной, герпетической, Эпштейн-Барр, энтеровирусной, цитомегаловирусной, вирусам гепатита В и С, вирусам папилломы человека и другим внутриклеточным инфекциям, что ведёт не только к дальнейшему осложнению состояния, но и вызывает риск появления онкологических изменений, особенно, если у ближайших родственников больного уже отмечались случаи онкологии. В частности, в современной медицине длительно протекающие заболевания герпесом, Эпштейн-Барр, ЦМВ, хламидиозом, гепатитом В и С, папилломавирусом и некоторые другие рассматриваются как предраковые состояния.

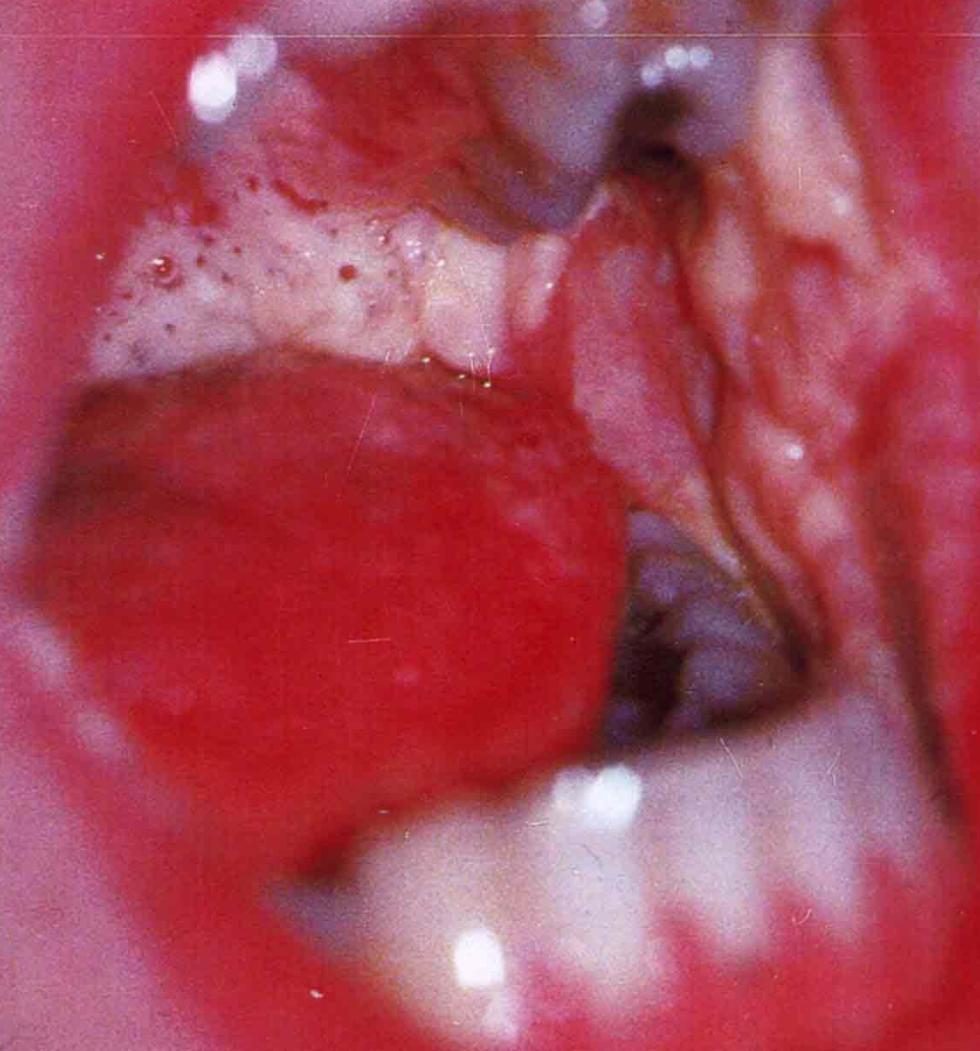
18-летняя девушка из Уганды, незадолго перед смертью. У нее был рак кожи - Саркома Капоши. Это один из видов рака кожи, который появился только после распространения болезни СПИДа.



Очень грубые формы иммунодефицитов называются СПИД (англ. AIDS). При СПИДе большое количество различной патогенной микрофлоры (ВИЧ-инфекции), в обычном состоянии людям вообще неприсущей, получает возможность функционировать в организме больного. При заболевании СПИДом первичен именно иммунодефицит, т.е. патологически изменённое состояние самого организма, а функционирование ВИЧ-инфекции является уже следствием этого состояния. В процессе своей жизнедеятельности в организме больного, ВИЧ-инфекция вызывает дальнейшее усугубление тяжести иммунопатологического состояния и, в большинстве случаев, приводит к возникновению у больного СПИДом и онкологических заболеваний.

Важно отметить, что практически всегда иммунные реакции нарушаются разнонаправленно. Когда одни из них неадекватно понижаются, другие неадекватно повышаются, что называется дисбалансом иммунной системы. Поэтому у аллергиков почти всегда наблюдаются и признаки иммунодефицитного состояния - или хронические воспалительные процессы, или склонность к частым ОРВИ и др., а у пациентов с иммунодефицитными состояниями присутствует в какой-либо форме и симптоматика аллергии. Следует помнить, что при всяком длительно протекающем воспалительном процессе обязательно происходит местная аллергизация тканей. И в этом еще одна опасность осложнений, которую несут хронические воспалительные процессы. В частности, хронические или частые бронхиты могут спровоцировать возникновение бронхоспазмов, бронхиальной астмы.

HIVc 3



Будучи свойствами, зависящими от состояния организма, иммунные реакции никогда (!) не нарушаются сами по себе, изолированно, вне зависимости от функционирования организма в целом. Нарушения иммунных реакций всегда следуют за метаболическими изменениями в организме, возникшими из-за нарушений функций отдельных органов или целых систем организма, в частности, из-за нарушения функции почек, печени, желез эндокринной системы (чаще щитовидной и поджелудочной), регуляторной функции головного мозга и многих других.

Наличие иммунной дисфункции — это всегда свидетельство наличия у пациента серьезных системных нарушений. Поэтому результаты объективной диагностики (клинико-лабораторной и аппаратной), являющейся первым и необходимым этапом лечебного процесса, должны дать ответы на два основных вопроса:

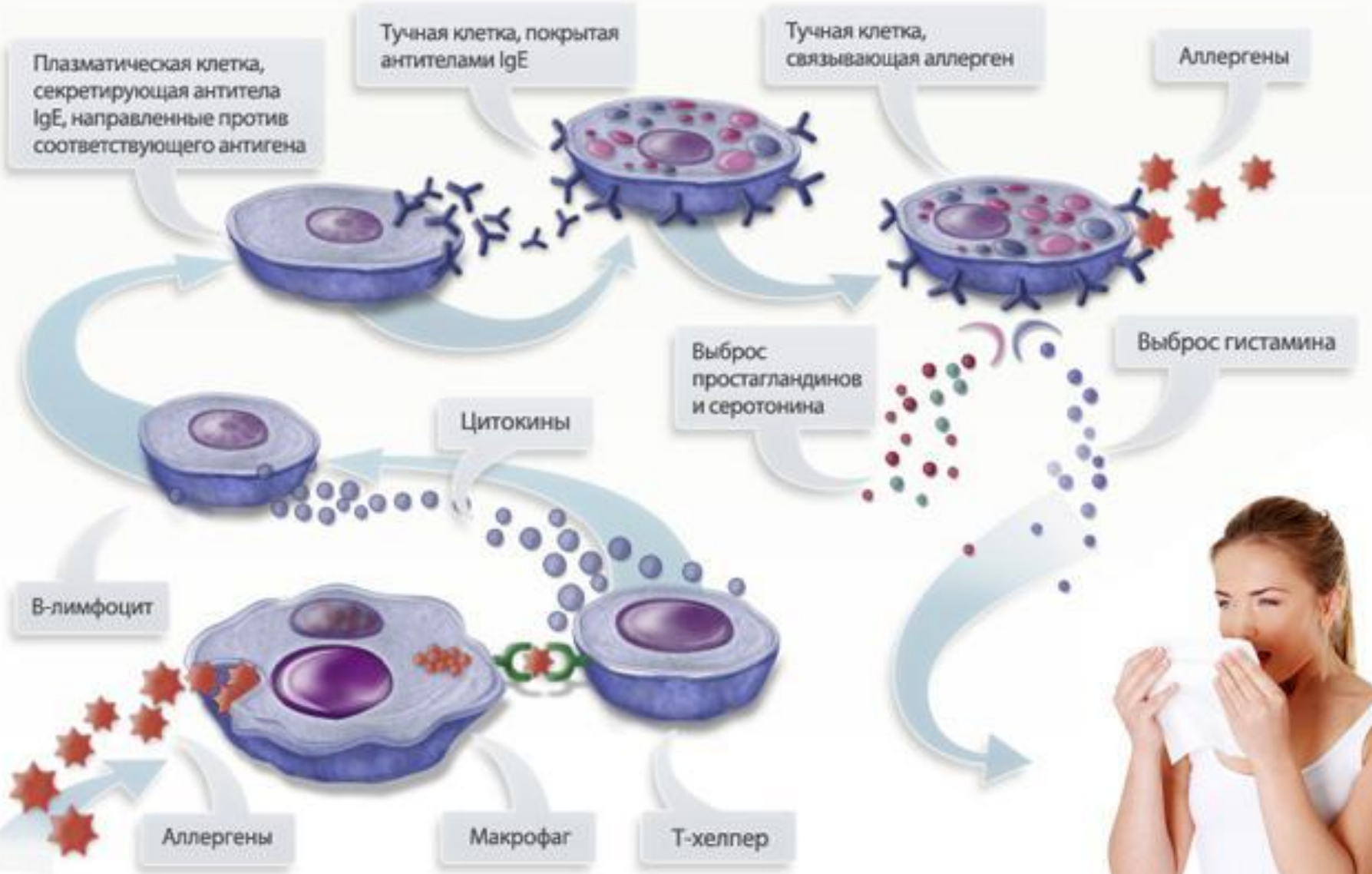
какие иммунные реакции пациента в какой степени нарушены?

и, самое главное, в результате чего они нарушены?

Главное в лечении иммунопатологических состояний (иммунодефицитов и аллергий) — это компенсация причин иммунных нарушений у пациента. Пока будут сохраняться основания для иммунных нарушений, в той или иной форме будут сохраняться и сами иммунные нарушения (состояние неизбежно будет меняться, практически вне зависимости от полученного неадекватного лечения, по принципу, то лучше, то хуже, то почти прошло, то опять обострение, с общей направленностью к усугублению тяжести заболевания). И только когда будут компенсированы причины, т.е. не будет оснований для иммунных нарушений, стойко исчезнут и сами нарушения.

Поэтому, попытки аллергика выявить, что является для него аллергенами, и в дальнейшем избегать этих веществ, приводят только к временному чисто внешнему облегчению симптоматики.

Патологически измененное состояние организма при этом в полной мере сохраняется и, чаще всего, усугубляется в дальнейшем, что проявляется и в постепенном расширении спектра аллергенов, и во все большем обострении аллергических реакций, и в появлении новых, не отмечавшихся ранее, заболеваний.



ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ

Идея пересадки органов была продиктована перспективой замены больного органа здоровым. Впервые в мире трансплантация органа (почки) была проведена профессором Ю. Вороным в 1935 г. в Харькове (вернее, им была осуществлена подсадка донорской почки на бедренные сосуды женщины, отравившейся сулемой).

Существуют следующие виды трансплантации:

- 1) **Ауто трансплантация** — пересадка собственных тканей;
- 2) **Алло трансплантация** — пересадка органов и тканей в пределах одного и того же биологического вида;
- 3) **Ксено трансплантация** — пересадка органов и тканей в пределах разных биологических видов;
- 4) **Изотрансплантация** — пересадка между идентичными близнецами или между генетически идентичными животными.

Субъект, которому пересаживают трансплантат, является реципиентом, а тот, от которого забирают орган или ткань — донором.

**КАКИЕ ЧАСТИ
ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
ТЕЛА МОГУТ БЫТЬ
ПЕРЕСАЖЕНЫ
ОТ ДОНОРА**

Легкие

Печень

Кишки

Клетки
всех тканей
организма

Кости
и суставы

Связки

Кожа

Лицо
(первая подобная
операция была
сделана во Франции
в ноябре 2005 года)

Роговица глаза

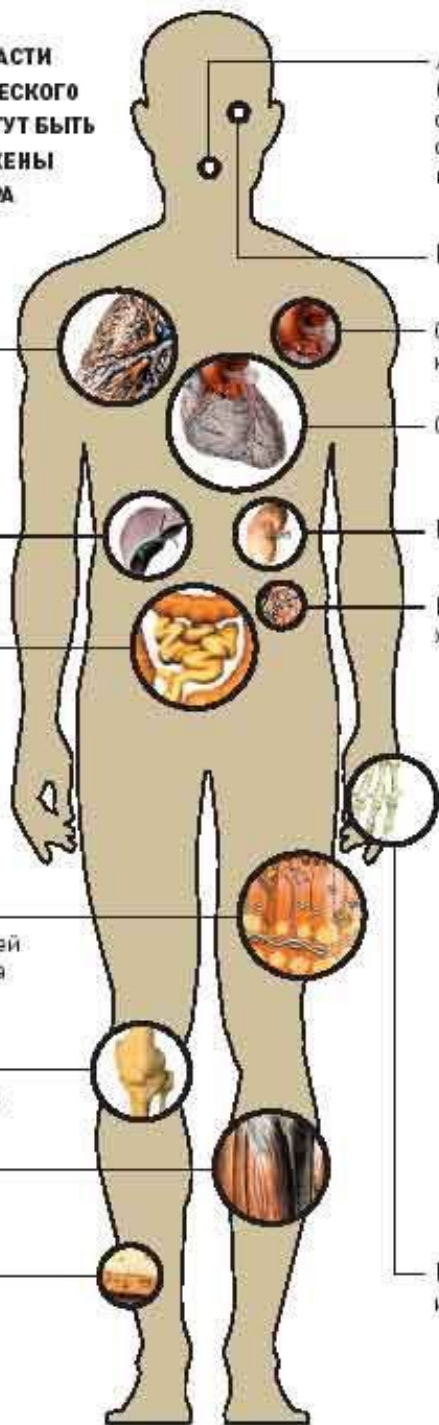
Сердечные
клапаны

Сердце

Почка

Поджелудочная
железа

Предплечье
и кисть руки



В связи с тем, что клетки донора несут на своей поверхности антигены, которые отличаются от антигенов реципиента, иммунная система последнего развивает иммунный ответ на трансплантат. В результате формируется реакция отторжения трансплантата.

Способом, который в большей или меньшей мере уменьшает реакцию отторжения, является селекция (подбор) пары донор — реципиент по антигенам гистосовместимости, которые у человека объединены в систему HLA (Human leucocyte antigens). Они также получили название трансплантационных антигенов. В практике трансплантационной иммунологии типирование, т. е. определение фенотипа HLA донора и реципиента, проводится чаще всего по антигенам локусов A, B, C, DR. На практике необходимо узнать, насколько донор отличается от реципиента по системе HLA. Селекция и предполагает подбор наиболее совместимых донора и реципиента.

Для оценки степени гистосовместимости был предложен индекс гистосовместимости. При одном идентичном у реципиента и донора антигене системы HLA индекс гистосовместимости составляет 25%, при двух — 50%, при трех — 75%, при четырех — 100%. При этом оценивают степень гистосовместимости по антигенам так называемых классических локусов HLA. Некоторые антигены системы HLA подобны по строению (последовательность аминокислотных остатков имеет определенную степень гомологии). Наличие таких подобных антигенов у донора может повысить степень гистосовместимости.

У человека комплекс МНС иногда называют **HLA** [от англ. **human leucocyte antigen**, **Аг лейкоцитов человека**]. В системе **HLA** известно более 100 Аг, сгруппированных в регионы HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-D, HLA-DR. Их образование контролирует **локус HLA**, состоящий из ряда сублокусов, расположенных в хромосоме 6. **Экспрессия Аг HLA** в различных органах сильно варьирует: она наиболее выражена на лимфоцитах и клетках кожи, меньше — в лёгких, печени, почках, кишках, сердце и сосудах, а в наименьших количествах такие Аг присутствуют на мембранах клеток ЦНС.

Оба класса принимают участие в иммунном ответе. Так, в формировании клеточной формы иммунного ответа принимают участие антигены HLA I класса, в частности при образовании цитотоксических Т-лимфоцитов — Т-киллеров. Антигены локуса DR играют важную роль в процессах распознавания Т-хелперами/индукторами чужеродных антигенов. Кроме того, выделяют и III класс антигенов.

Одним из клинически значимых стимулов, не относящихся к системе HLA, является семейство антигенов MICA (MHC class I related chain A), которые экспрессируются на эпителиальных клетках в ответ на стресс. Специфические антитела в сыворотке пациентов, которым выполнили трансплантацию, распознают антиген MICA, а следовательно MICA может быть молекулой-мишенью в процессах отторжения. Эти антигены могут участвовать в отторжении аллотрансплантата, активируя антителозависимые и клеточные иммунные механизмы.

Номенклатура HLA

HLA-A	HLA-B		HLA-C	HLA-D	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP
A1	B5	B51(5)	Cw1	Dw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B5102	Cw2	Dw2	DR2	DQ2	DPw2
A203	B703	B5103	Cw3	Dw3	DR3	DQ3	DPw3
A210	B8	B52(5)	Cw4	Dw4	DR4	DQ4	DPw4
A3	B12	B53	Cw5	Dw5	DR5	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B54(22)	Cw6	Dw6	DR6	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B55(22)	Cw7	Dw7	DR7	DQ7(3)	
A11	B15	B56(22)	Cw8	Dw8	DR8	DQ8(3)	
A19	B16	B57(17)	Cw9(w3)	Dw9	DR9	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B58(17)	Cw10(w3)	Dw10	DR10		
A24(9)	B18	B59		Dw11	DR11(5)		
A2403	D21	B60(40)		Dw12	DR12(5)		
A2510	B22	B61(40)		Dw13	DR13(6)		
A2610	B27	B62(15)		Dw14	DR14(6)		
A28	D35	B63(15)		Dw15	DR1403		
A29(19)	B37	B64(14)		Dw16	DR1404		
A30(19)	B38(16)	B65(14)		Dw17(w7)	DR15(2)		
A31(19)	B39(16)	B67		Dw18(w6)	DR16(2)		
A32(19)	B3901	B70		Dw19(w6)	DR17(3)		
A33(19)	B3902	B71(70)		Dw20	DR51		
A34(10)	B40	B72(70)		Dw21	DR52		
A36	B4005	B73		Dw22	DR53		
A43	B41	B75(15)		Dw23			
A66(10)	B42	B76(15)		Dw24			
A68(28)	B44(12)	B77(15)		Dw25			
A69(28)	B45(12)	B7801					
A74(19)	B46	Bw4					
	B47	Bw6					
	B48						
	B49(21)						
	B50(21)						

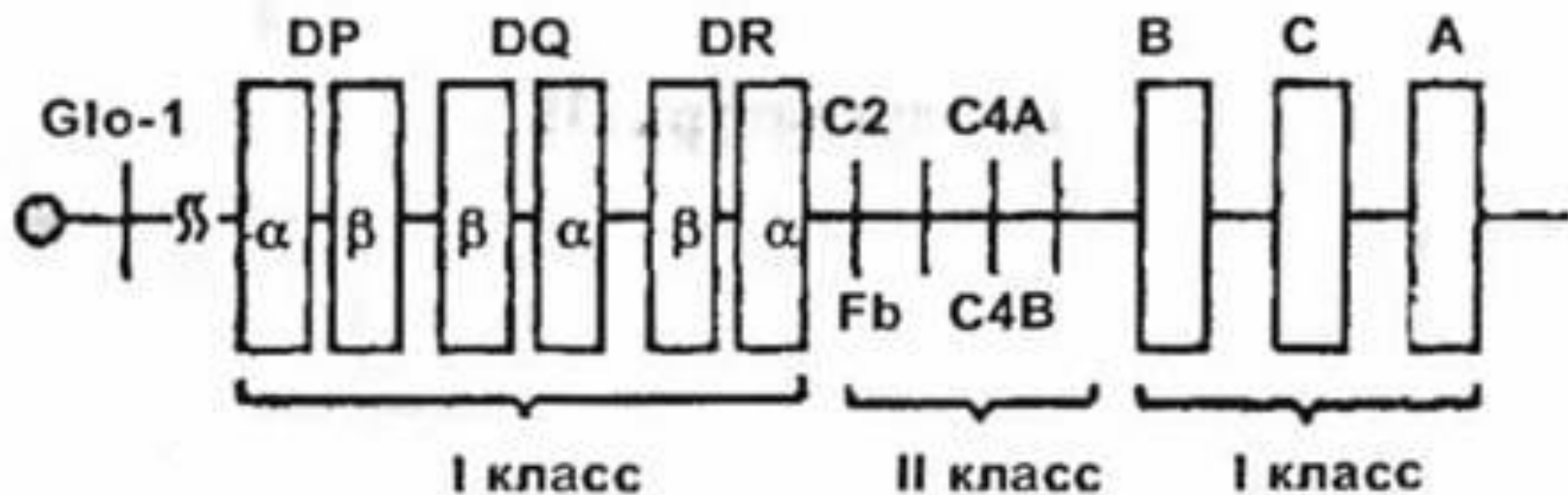


Рис. Генетическая карта главного комплекса гистосовместимости человека [Пухальский А. Л., 1998]

HLA класс I
Все ядродержащие
клетки

HLA класс II
В-клетки
Макрофаги

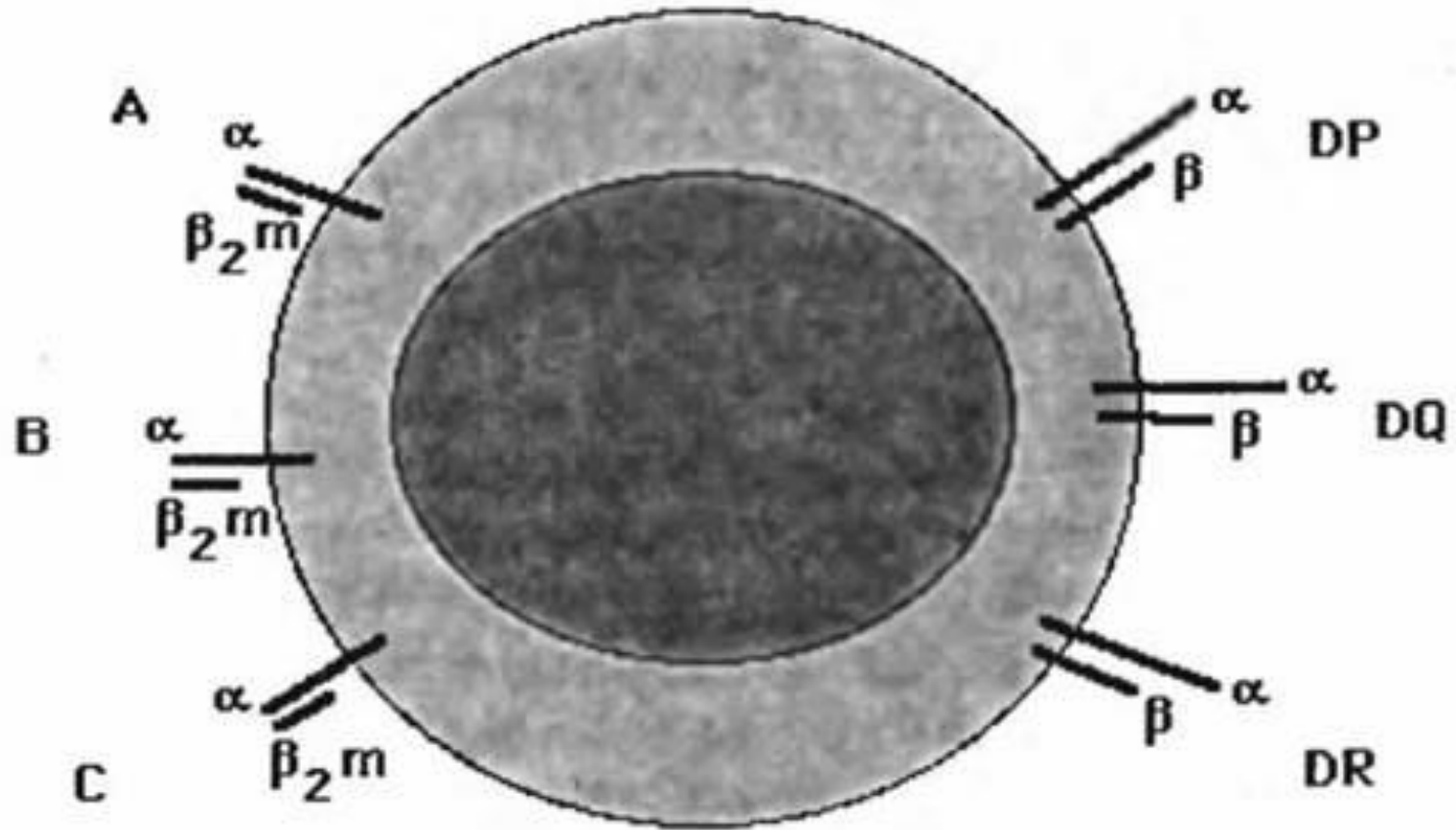


Рис. Схема системы HLA



Собственно селекция преследует подбор такой пары донор — реципиент, в которой донор наименьшим образом отличается от реципиента по антигенам системы HLA.

С целью выявления HLA-фенотипа проводится типирование лимфоцитов периферической крови донора и реципиента.

Для типирования лимфоцитов по антигенам I класса (HLA-A, B, C) используют лимфоцитотоксический тест в микромодификации Пауля Тerasаки. Ингредиентами являются анти-HLA активные сыворотки, которые составляют типизирующую панель, лимфоциты периферической крови субъекта, нормальная кроличья сыворотка (в качестве источника компонента).

Для выявления антигенов класса II (HLA — DR, DP, DQ) используют пролонгированный лимфоцитотоксический тест с суспензией клеток, обогащенных В-лимфоцитами, на поверхности которых представлены эти антигены. Как известно, в периферической крови человека содержится всего 5—20% В-клеток, чего для выполнения теста недостаточно. Существует метод получения суспензии лимфоцитов, обогащенной В-клетками, который основан на свойстве В-лимфоцитов прикрепляться к волокнам синтетической ваты.

Предсуществующие антитела. Согласно общеизвестному правилу, пересадка аллогенного органа категорически запрещена при наличии у реципиента предсуществующих антител к антигенам системы HLA донора. Предсуществующие антитела продуцируются вследствие сенсibilизации реципиента антигенами лимфоцитов периферической крови. Вообще предсуществующие антитела можно выявить приблизительно у трети человеческой популяции как результат переливания крови либо беременности. По своему действию они в основном являются лимфоцитотоксическими антителами.

Предсуществующие антитела, специфические к лимфоцитам конкретного донора, выявляют в обычном лимфоцитотоксическом тесте (лимфоциты донора и сыворотка реципиента). Реакция в таком исполнении получила название перекрестной пробы, или cross-match (кросс матч). Предсуществующие антитела являются фактором риска сверх острого (и в какой-то мере, острого) отторжения трансплантата и учитываются как негативный прогностический показатель.

Активность предсуществующих антител в перекрестной пробе обозначается цитотоксическим индексом, %. Традиционно учитывается цитотоксический индекс $> 5\%$, что означает 5 погибших лимфоцитов на 100 лимфоцитов в поле зрения.

Стандартный тест перекрестной совместимости по комплементзависимой цитотоксичности (cross-match)

Этот стандартный тест перекрестной совместимости основан на комплемент-опосредованной цитотоксичности. Оценка базовой перекрестной совместимости проводится с помощью препарата смеси лимфоцитов, полученных из периферической крови, селезенки или лимфатических узлов донора. Кроме того, проводится оценка перекрестной совместимости с помощью В- и Т-клеток донора с целью выявить антитела класса I и/или II реципиента к антигенам донора. В этой пробе проводят инкубацию сыворотки пациента с клетками донора, а затем добавляют комплемент. Если в сыворотке пациента содержится антитела, направленные против HLA-антигенов донора, то это вызовет лизис клеток, свидетельствуя о положительном результате пробы на перекрестную совместимость (положительный cross-match). Если антитела к антигенам донора отсутствуют, клетки остаются интактными, и проба на перекрестную совместимость отрицательна (отрицательный cross-match).

Оценка перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии

Анализ перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии – это более чувствительный метод по сравнению с цитотоксическими тестами перекрестной совместимости. Он позволяет определить специфические антитела IgG к HLA класса I и/или II донора. Он также выявляет не связывающие комплемент антитела, которые могут остаться незамеченными при цитотоксической пробе перекрестной совместимости, а также антитела в крайне низком титре. При проведении этой пробы сыворотку пациента инкубируют с лимфоцитами донора. Затем клетки окрашивают флуоресцентными красителями, которые выявляют человеческие антитела IgG на T- и B-клетках. Далее клетки анализируют на проточном цитометре на наличие антител к HLA-антигенам донора.

Оценка перекрестной совместимости с помощью проточной цитометрии плохо стандартизирована между разными лабораториями, поэтому интерпретировать полученные данные надо с осторожностью.

Оценка перекрестной совместимости с помощью Luminex

На первом этапе суммарные лимфоциты донора выделяют из образцов периферической крови стандартным методом с использованием градиента плотности (фиколла-верографина или лимфолита).

Полученные клетки лизируют, и затем полученный лизат, содержащий донорские HLA-антигены, инкубируют с микросферами, предварительно конъюгированными с антителами к HLA класса I или II. При добавлении сыворотки реципиента, находящиеся в ней антитела связываются с соответствующими антигенами донора (которые в свою очередь находятся в комплексе с микросферами). Добавление флуоресцентно-меченного конъюгата к анти-IgG позволяет визуализировать результат.

Данный тест способен не только зафиксировать положительную реакцию перекрестной пробы «cross-match» по I или II классу, но и отслеживать титр накопления антидонорских антител в посттрансплантационном периоде, что важно для прогноза риска отторжения трансплантата.

Возможны (и нередко) случаи отторжения трансплантата при отрицательной кросс матч, и, наоборот, при положительной кросс матч не всегда развивается острое отторжение трансплантата.

Первое исключение можно объяснить следующим обстоятельством:

- лимфоцитотоксический тест, с помощью которого производится перекрестная проба, недостаточно чувствительный и дает ложноотрицательные результаты;
- сенсibilизация реципиента сопровождается синтезом не активирующих систему комплемента антител, и поэтому они не могут быть выявлены в комплементарной реакции (в лимфоцитотоксическом тесте), однако в организме реципиента способны оказать разрушительное действие на трансплантат;
- сенсibilизация осуществляется с помощью иных антигенов (органных, а не HLA).

Положительные результаты пересадки аллогенного органа при положительной кросс матч, можно объяснить существованием двух видов предсуществующих антител; против молекул I класса (антигенов HLA-A, B, C) и II класса (антигенов HLA-DR, DP, DQ). Как известно, молекулы I класса системы HLA экспрессированы на всех клетках организма, следовательно и в аллотрансплантате, в том числе на так называемых лейкоцитах-пассажирах донорского происхождения. Высокие титры предсуществующих антител к HLA-A, B, C детерминантам всегда осуществляют цитотоксический эффект по механизму комплементзависимого лизиса, т. е. такие предсуществующие антитела агрессивны и разрушают трансплантат. Обычно они определяются при температуре 37°C в лимфоцитотоксическом тесте с Т-лимфоцитами, на которых представлены молекулы I класса, и называются тепловыми анти-Т-антителами. Антитела, направленные против молекул II класса главного комплекса гистосовместимости, не являются цитотоксическими. Их рассматривают как блокирующие антитела, которые экранируют (покрывают) DR-антигены на клетках трансплантата, предотвращая иммунологическое распознавание. Эти предсуществующие антитела определяются при температуре 8-10 °C в лимфоцитотоксическом тесте с В-лимфоцитами, на которых представлены молекулы II класса системы HLA и называются Холодовыми анти-В-антителами. Таким образом, перекрестную пробу необходимо проводить параллельно со взвесями лимфоцитов, обогащенных Т- и В-клетками при разных температурах согласно двум видам предсуществующих антител: Холодовых и тепловых.

Для более тщательной селекции пары донор – реципиент необходимо выявить пресенсибилизацию реципиента к антигенам донора, которые не относятся к HLA-системе, в особенности к антигенам клеток эндотелия сосудов. Наличие у реципиента антиэндотелиальных антител часто является причиной сверхострого либо ускоренного криза отторжения. Именно поэтому целесообразно выявление таких антител до пересадки. Для этой цели используется специальная панель типизирующих сывороток. Опасность, связанная с наличием антител против эндотелия сосудов аллогенной почки, обусловлена тем, что антигены сосудистого эндотелия, которые не относятся к HLA-системе, специфичны, высокоиммуногенны и способны индуцировать реакцию отторжения.

В рамках селекции пары донор – реципиент также исследуют исходный иммунный статус реципиента, который, как правило, влияет на течение посттрансплантационного периода. Для полной характеристики исходного иммунного статуса в обязательном порядке проводится иммунограмма. Из показателей системного иммунитета существенное значение имеет абсолютное количество Т-хелперов и Т-супрессоров/киллеров, а также их количественное соотношение – показатель ИРИ (иммуно-регуляторный индекс).

Итак, для селекции пары донор-реципиент необходимо определить:

- .Степень гистосовместимости, т.е. HLA-фенотип донора и реципиента;
- .Разнотемпературные предрасполагающие антитела у реципиента к антигенам системы HLA донора (анти-T и анти-B антитела);
- .Антиэндотелиальные антитела у реципиента к антигенам донора;
- .Исходный иммунный статус реципиента.

Аллоотрансплантат, наделенный чужеродными антигенными структурами, инициирует у реципиента иммунный ответ. В результате этого развивается реакция отторжения, которая в клинике именуется кризом отторжения.

Согласно клинической картине криза отторжения была предложена его классификация, которой соответствуют определенные иммунологические особенности.

Различают отторжение:

- сверхострое, которое развивается немедленно после подключения трансплантата к кровотоку реципиента;
- острое, развивающееся в течение первых трех недель после трансплантации;
- хроническое, наблюдающееся через несколько месяцев либо лет.

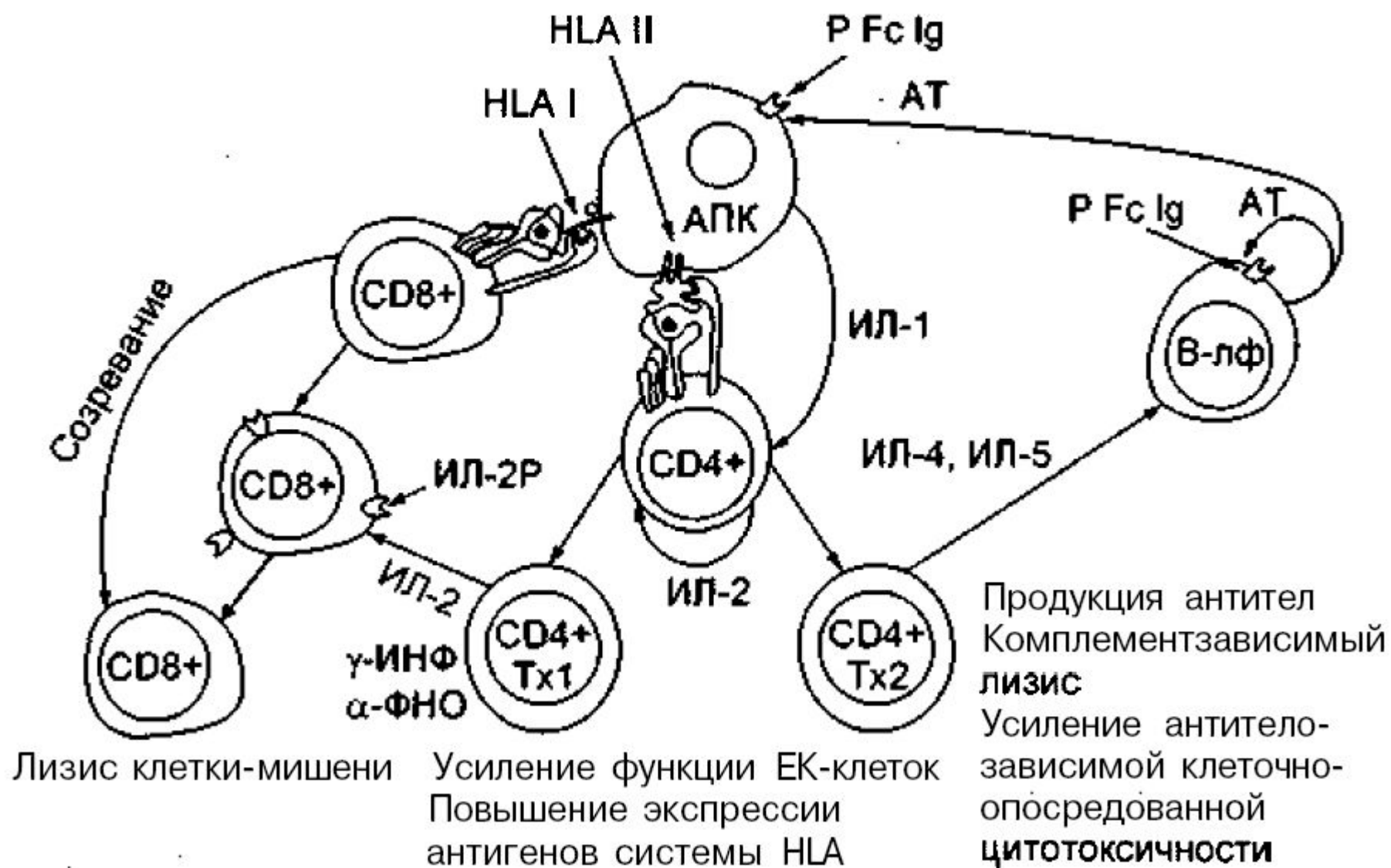
Механизм сверхострого отторжения обусловлен пресенсибилизацией реципиента к антигенам системы HLA донора, т. е. связан с наличием у реципиента предсуществующих антител. Как уже отмечалось, материальным субстратом пресенсибилизации являются антигены системы HLA, которые индуцируют у реципиента гуморальный иммунный ответ еще до трансплантации вследствие гемотрансфузий, беременности либо лечения программным гемодиализом. Функция аллогенной почки (выделение мочи) при немедленном кризе отторжения прекращается в первые минуты или часы после пересадки. Доказательством того, что предсуществующие антитела являются причиной сверхострого криза отторжения, есть факт их исчезновения из периферического кровообращения реципиента сразу же после подключения трансплантата к кровотоку. Эти антитела фиксируются в пересаженной почке, о чем свидетельствуют результаты иммунофлюоресценции и электронной микроскопии.

Механизм острого отторжения. В патогенезе острого криза отторжения, возникающего вследствие недостаточной иммуносупрессивной терапии, основная роль принадлежит клеточному звену иммунитета, хотя категорически отрицать участие гуморальных реакций нельзя. Патогенез острого криза отторжения основан на принципе иммунологического распознавания “чужого”. Начальный этап этого механизма – стадия распознавания чужеродного антигена, а конечный – взаимодействие клетки-эффектора, в данном случае, CD8+ Т-клетки (сенсibilизированного цитотоксического лимфоцита), с клеткой-мишенью и осуществление киллингового эффекта.

Иммунологическое распознавание антигена системы HLA донора происходит двумя путями: прямым и непрямым.

Прямое распознавание основано на том, что антигены донора в виде пептидов представляются для распознавания Т-лимфоцитам реципиента антигенпредставляющими клетками самого донора. Как правило, ими являются так называемые “лейкоциты-пассажиры”, имеющие фенотип дендритических клеток. Это лейкоциты, которые остались в донорской почке после ее изъятия из организма донора. Последние, как известно, несут молекулы HLA и I и II класса. Таким образом, создаются условия для стимуляции как Т-хелперов (CD4+ клеток), так и Т-киллеров (CD8+ клеток) лимфоцитов реципиента. Распознавание пептидов, представленных молекулами HLA II класса антигенпредставляющих клеток донора, осуществляется антигенраспознающим рецептором Т-хелпера реципиента. Распознавание донорских антигенов, представленных молекулами HLA I класса, экспрессированных на лимфоцитах-пассажирах, осуществляется антигенраспознающим рецептором Т-киллеров (CD8+ клеток) реципиента. Стимуляция этих лимфоцитов реципиента инициирует созревание специфических Т-клеток, т. е. клеточный иммунный ответ с реализацией острого криза отторжения на 1-й неделе после пересадки. Стимуляция Т-лимфоцитов-хелперов реципиента способствует развитию как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Таким образом, прямое распознавание донорских антигенов основано на том, что антигенраспознающим Т-лимфоцитам реципиента “предлагаются” уже готовые антигенные детерминанты донора донорскими же антигенпредставляющими клетками.

Механизмы отторжения трансплантата



Непрямое распознавание антигенов донора основано на общебиологическом принципе: процессинг донорских антигенов и презентация пептидов осуществляются антигенпредставляющими клетками реципиента. В данном случае также инициируется как клеточный, так и гуморальный ответ на антигены донора, однако иммунная реакция развивается более медленно и острый криз отторжения наблюдается на 2-й, либо на 3-й неделе после пересадки.

Чрезвычайно важным является тот факт, что в зависимости от типа стимулированных Т-хелперов инициируется либо клеточный, либо гуморальный иммунный ответ. Как уже упоминалось, существует два типа хелперов, Первые (Т-хелперы 1-го типа) помогают предшественникам Т-лимфоцитов-киллеров дифференцироваться в сенсibiliзированные Т-лимфоциты, а вторые (Т-хелперы 2-го типа) помогают В-клеткам дифференцироваться в плазмоциты. Данные морфологических исследований свидетельствуют, о том, что острый криз отторжения является результатом стимуляции, в основном, Т-хелперов 1-го типа, поскольку отторжение сопровождается клеточной иммунной реакцией.

Механизм хронического отторжения. Развитие хронического отторжения трансплантата возможно через несколько месяцев или даже лет после пересадки аллогенного органа, чаще всего вследствие недостаточной иммунодепрессивной терапии. В патогенезе хронического отторжения трансплантата в основном принимают участие гуморальные антитела к антигенам системы HLA донора. Наблюдается корреляция между уровнем гуморальных антител и развитием изменений сосудов с их облитерацией. В отличие от острого криза отторжения, для которого характерна интенсивная клеточная инфильтрация трансплантата, при хроническом отторжении она выражена слабо, а в инфильтрате преобладают плазмоциты и наблюдается фиброз интерстициальной ткани. От сверхострого хроническое отторжение трансплантата отличается отсутствием фибриновых тромбов в сосудах, несмотря на наличие антител. Объясняется это тем, что концентрация антител недостаточна для развития острой иммунной воспалительной реакции с образованием массивных фибриновых тромбов, как при сверхостром отторжении. Однако увеличение экскреции с мочой продуктов распада фибрина/фибриногена свидетельствует о том, что фибрин все же образуется, но сразу лизируется. Поэтому для хронического отторжения трансплантата характерно постепенное повреждение и облитерация просвета сосудов – артерий и артериол, а также клубочковых и канальцевых капилляров. Вялое течение хронического отторжения трансплантата и постепенное поражение сосудов сопровождается ухудшением функции трансплантата и замещением фиброзной тканью паренхимы почки.

Кроме трансплантационных антигенов главного комплекса гистосовместимости существуют также минорные антигены гистосовместимости. Они представляют собой аллельные варианты белков и кодируются функциональными генами, локализуемыми вне HLA-региона.

При хорошей совместимости донора и реципиента отторжение может наступить из-за несовместимости по минорным антигенам, поскольку аллельные варианты белков являются источником эндогенных пептидов, которые могут презентироваться молекулами ГКГ I класса и распознаются CD8⁺ Т-лимфоцитами киллерами реципиента, приводя к реакции отторжения.

Проведение иммуносупрессивной терапии является обязательной процедурой во всех случаях аллотрансплантации, как при пересадке органа от HLA-совместимого донора-родственника, так и в случае пересадки органа от донора-неродственника, или трансплантации эмбрионального материала. Иммуносупрессивная терапия проводится как на этапе подготовки реципиента к трансплантации, так и в посттрансплантационный период. В предтрансплантационном периоде в зависимости от пересаживаемого органа и степени его совместимости с реципиентом могут быть использованы следующие способы: а) медикаментозная иммуносупрессия; б) радиоиммуносупрессия (облучение гамма-лучами регионарной лимфоидной ткани или тотальное облучение лимфоидной ткани); в) комбинированная иммуносупрессия с применением медикаментозных средств и радиовоздействия.

В посттрансплантационный период иммуносупрессивную терапию проводят с первого дня пересадки органа. Терапия направлена на подавление развития иммунных реакций на пересаженный орган и предупреждение острого отторжения трансплантата.

Следует заметить, что большинство разработанных к настоящему времени методов иммуносупрессии имеют недостаток, связанный с неспецифичностью их действия. Применяемые средства оказывают иммуносупрессивное действие не только на аллотрансплантационные реакции, но и подавляют общую иммунореактивность организма, что способно приводить к развитию инфекционных осложнений.

В иммуносупрессивной терапии наиболее часто применяют следующие препараты и средства:

1. Азатиоприн (имуран). Препарат угнетает клеточный иммунитет, подавляет функцию Т-лимфоцитов, снижает их пролиферативный потенциал за счет подавления в клетках синтеза нуклеиновых кислот. Назначают в дозе 2-5 мг/кг массы тела в день.

2. Циклофосфамид (циклофосфан). Препарат подавляет иммуно-реактивность клеток путем алкилирования ДНК, в результате чего становится невозможным деспирализация и репликация ядерных нуклеопротеидов и деление клеток. Препарат особенно активен в отношении быстроделющихся клеток. Назначают в дозе 1-3 мг/кг массы тела в сутки.

3. Метотрексат. Действует как антогонист фолиевой кислоты, блокирует синтез пуринов. Обычно назначают в дозе 7,5-25 мг 1 раз в неделю в три приема.

4. Преднизолон. Часто препарат применяют в комбинации с азатиоприном. Препарат обладает выраженным иммуносупрессивным и противовоспалительным действием. Для профилактики кризов отторжения преднизолон назначают сразу после пересадки органа в дозе 3-4 мг/кг массы тела в день до стабилизации клинического статуса реципиента, затем переходят на поддерживающую дозу.

5. Циклоспорин А, FK506. Оба препарата блокируют активацию покоящихся Т-лимфоцитов, ингибируют транскрипцию генов, кодирующих молекулу ИЛ-2 и высокоаффинный рецептор ИЛ-2. Блокируют продукцию иммунокомпетентными клетками цитокинов. Средняя суточная доза циклоспорина А составляет 5 мг/кг массы тела, FK506 – 1-1,5 мг/кг массы тела. Циклоспорин А обладает нефротоксическим и гепатотоксическим действием.

6. Рапамицин. Препарат подавляет реакции клеточного иммунитета, ингибирует активность клеток в G1 фазе клеточного цикла, подавляет продукцию цитокинов. Рапамицин и FK506 проявляют иммуносупрессирующую активность в десятки раз выше, чем циклоспорин А.

7. Антилимфоцитарная сыворотка (АЛС) или антилимфоцитарный глобулин (АЛГ), антитимоцитарная сыворотка.

Иммуносупрессивное действие сывороток проявляется в результате опсонизирующего и цитотоксического действия специфических антител на лимфоциты и Т-клетки. Применяют сыворотки для купирования кризов отторжения, как правило, в комплексе с азатиоприном, преднизолоном и другими препаратами. Возможны побочные действия препаратов: токсическое действие на тимус, аллергические реакции.

8. Моноклональные антитела против CD3 компонента ТКР Т-лимфоцитов (ОКТ-3) и рецептора ИЛ-2 (симулект). Оба препарата блокируют активацию Т-лимфоцитов. Первый препарат свое действие проявляет за счет блокирования рецептора, распознающего антиген, второй – за счет блокирования рецептора ИЛ-2 и подавления пролиферации Т-клеток и формирования зрелых Т-киллеров. В последние годы разработаны технологии получения химерных мышино-человеческих антител и человеческих моноклональных антител, которые, в силу своей высокой гомологии, не вызывают развития антииммунной реакции в организме реципиента.

Сейчас на стадии клинических испытаний находятся препараты, основой которых являются моноклональные антитела против ФНО α , ИНФ γ , ИЛ-2, молекул адгезии и костимулирующих молекул.

Электрофорез клеток

Находясь в суспензии, под действием постоянного электрического поля клетки мигрируют к аноду. Миграция становится возможной вследствие возникновения электрического потенциала на поверхности клеточных мембран при контакте со средой. Потенциал обусловлен особенностями структуры мембраны. Распределение ионов на мембране и ионизация функциональных групп белков приводит к образованию суммарного отрицательного заряда клеток. Различные типы клеток обладают неодинаковой электрофоретической подвижностью. Это особенность убывает в следующем порядке: эритроциты, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, макрофаги/моноциты. Различия в подвижности Т- и В-лимфоцитов обусловлены различием концентрации нейраминовой кислоты в клеточной мембране. Аналитический электрофорез клеток позволяет получить диаграмму частотного распределения клеток в суспензии по их подвижности. Для каждого органа существует характерная диаграмма с одним или несколькими пиками. Обычно при проведении электрофореза без носителя получают 15—20 фракции, но даже при наличии выраженных пиков имеется их заметное перекрывание. Если взять суспензию спленоцитов мыши, отбросить фракции клеток со средней подвижностью и объединить фракции с соответственно высокой и низкой подвижностью, то можно получить препараты Т- и В-лимфоцитов высокой степени чистоты.

Спасибо за внимание