

Современные лабораторные технологии в трансплантологии

Зав. кафедрой
клинической лабораторной диагностики,
аллергологии и иммунологии ГомГМУ
профессор Новикова И.А.





Can you imagine?

Can you imagine?

Can you imagine?



Transplantation and Immunology

В основе отторжения - иммунные механизмы

(P. Medavar, 1945)

Создание и совершенствование иммунодепрессантов

Радиация, азатиоприн, преднизолон

Циклоспорин А (1978)

Такролимус, микофенолаты, МАТ

Разработка технологий иммунологического тестирования

Открытие генов гистосовместимости (1950)

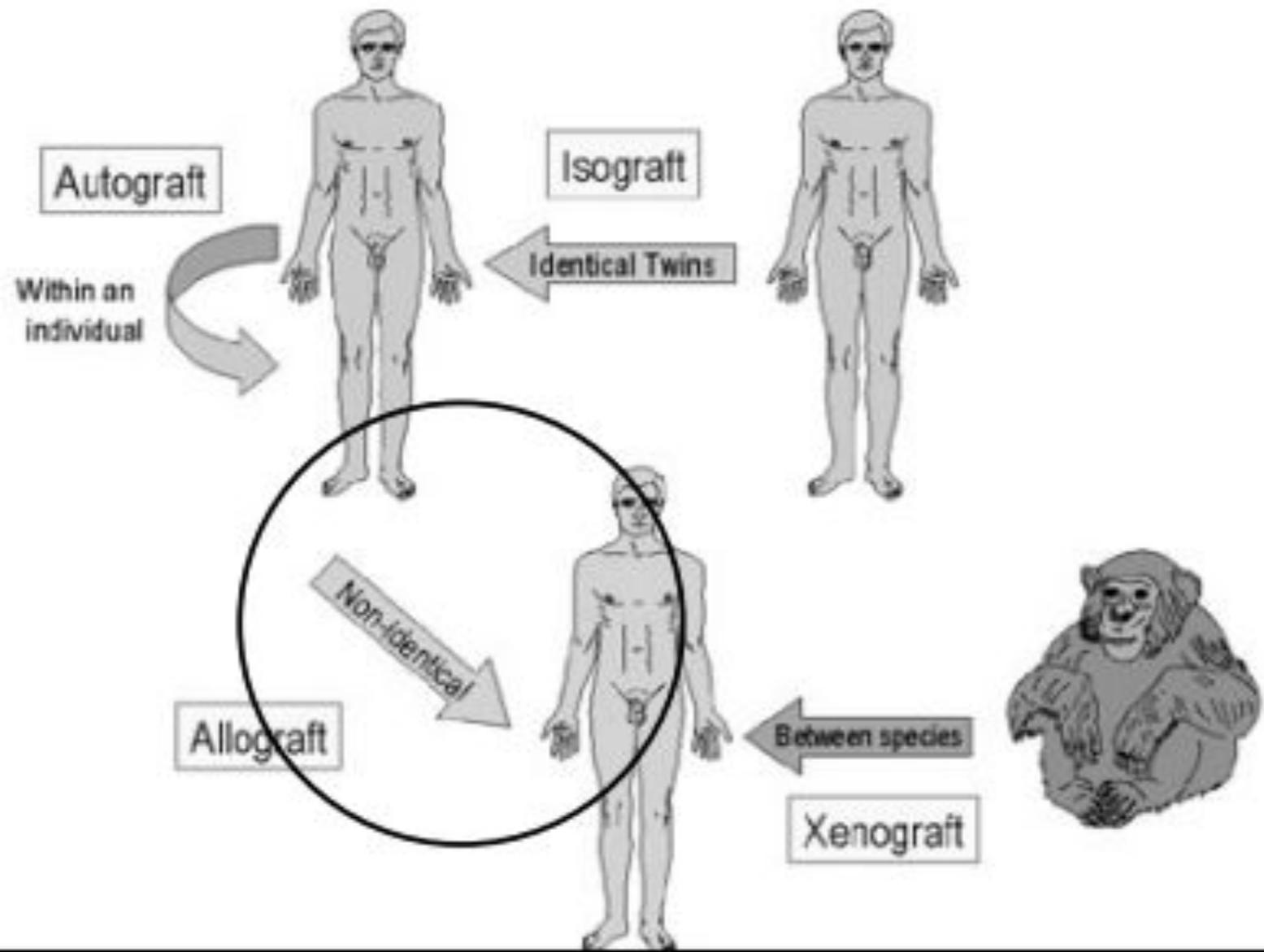
Применение тканевого типирования

Определение реактивных АТ, cross-match тестов

Классификация трансплантатов

- **Аутологичный** трансплантат – аутотрансплантация (в пределах организма)
- **Синергичный** трансплантат – изотрансплантация (от генетически идентичного организма)
- **Аллогенный** трансплантат – аллотрансплантация (от генетически различающегося индивидуума в пределах вида)
- **Ксеногенный** трансплантат – ксенотрансплантация, гетерологичная трансплантация (от другого вида)





Источники трансплантатов

• **Доноры**

Преимущества:

- Лучше краткосрочные и долгосрочные результаты
- Более раннее восстановление функций органа
- Возможность применения менее агрессивного супрессивного режима
- Больше времени персоналу для подготовки к операции

Недостатки:

- Ограниченный выбор органов
- Психологический стресс донора
- Оперативная летальность донора (~1/2000)
- Послеоперационные осложнения (~ 2%)
- Отдаленные последствия (умеренная гипертензия и протеинурия)
- Риск травматического повреждения второй почки
- Риск скрытопротекающей почечной патологии

• **Трупный материал**



Проблемы в трансплантации

- Недостаточность органов
- Отторжение
 - иммунная система хозяина обнаруживает чужеродные АГ трансплантата
 - запуск атаки, приводящей к отторжению трансплантата



Клинические фазы отторжения

1. **Сверхострое** отторжение (минуты-часы)
 - Предсуществующие АТ к антигенам донора (стенки сосудов, клетки крови) → фиксация на эндотелии → активация комплемента и системы свертывания → окклюзия сосудов и гибель трансплантата.
2. **Острое** отторжение (первые 4 недели)
 - Различия по HLA (на фоне недостаточной иммуносупрессии!) → активация клеточных механизмов (CD4, CD8, НК, макрофаги), индукция синтеза специфических АТ → деструкция трансплантата.
3. **Хроническое** отторжение (месяцы-годы)
 - Хронический иммунный процесс? → смешанные гуморальные и клеточные механизмы.

Предотвращение посттрансплантационных реакций

- Иммуносупрессия
- Подбор оптимальных доноров трансплантатов



Иммуносупрессивная терапия

- Аллогенная трансплантация всегда требует иммуносупрессивной терапии!
- Назначается на этапе подготовки пациента, в ранний период после пересадки, а затем в зависимости от состояния пациента (постоянный клинико-лабораторный мониторинг!)
- Большинство препаратов обладают неспецифическим действием.
- Основные побочные проявления

Инфекции

Злокачественные опухоли

Угнетение костного мозга

Иммunosuppressивные препараты

Стандартные препараты

- Стероиды (преднизолон)
- Азатиоприн /Imuran/
- Циклофосфамид
- Метотрексат

Новые препараты:

- Циклоспорин А
- FK506 - такролимус /PROGRAF/
- Сиролимус
- CELLCEPT (micophenolate mofetil)

Моноклональные антитела:

- Anti CD3
- Anti-TAC (anti-IL2 receptor) - даклизумаб
- Anti-CD4
- Anti-CD52 (Campath)
- Anti-LFA1 + anti-ICAM-1 (в эксперименте)
- Anti-cytokine (IL-2, TNF α , IFN γ)

Подбор оптимальных доноров

- Соответствие по антигенам АВ0
- Максимальное соответствие реципиенту по HLA (тканевое типирование)
- Минимальная сенсбилизация потенциального реципиента (панель реактивных антител). У всех реципиентов на «листе ожидания» должны быть сведения о проценте и специфичности PRA.
- Отсутствие реакции донор-реципиент в тестах перекрестной антигенной совместимости (cross-match)



Совместимость по АВО

Permissible Transplants are

DONOR GROUP	RECIPIENT GROUP
O	O, A, B, AB
A	A, AB
B	B, AB
AB	AB



Тестирование ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

- Типирование HLA у донора и реципиента
- Выявление у реципиента аллосенсибилизации к HLA-антигенам (панель реактивных антител)
- Тест на совместимость донора и реципиента (crossmatch)

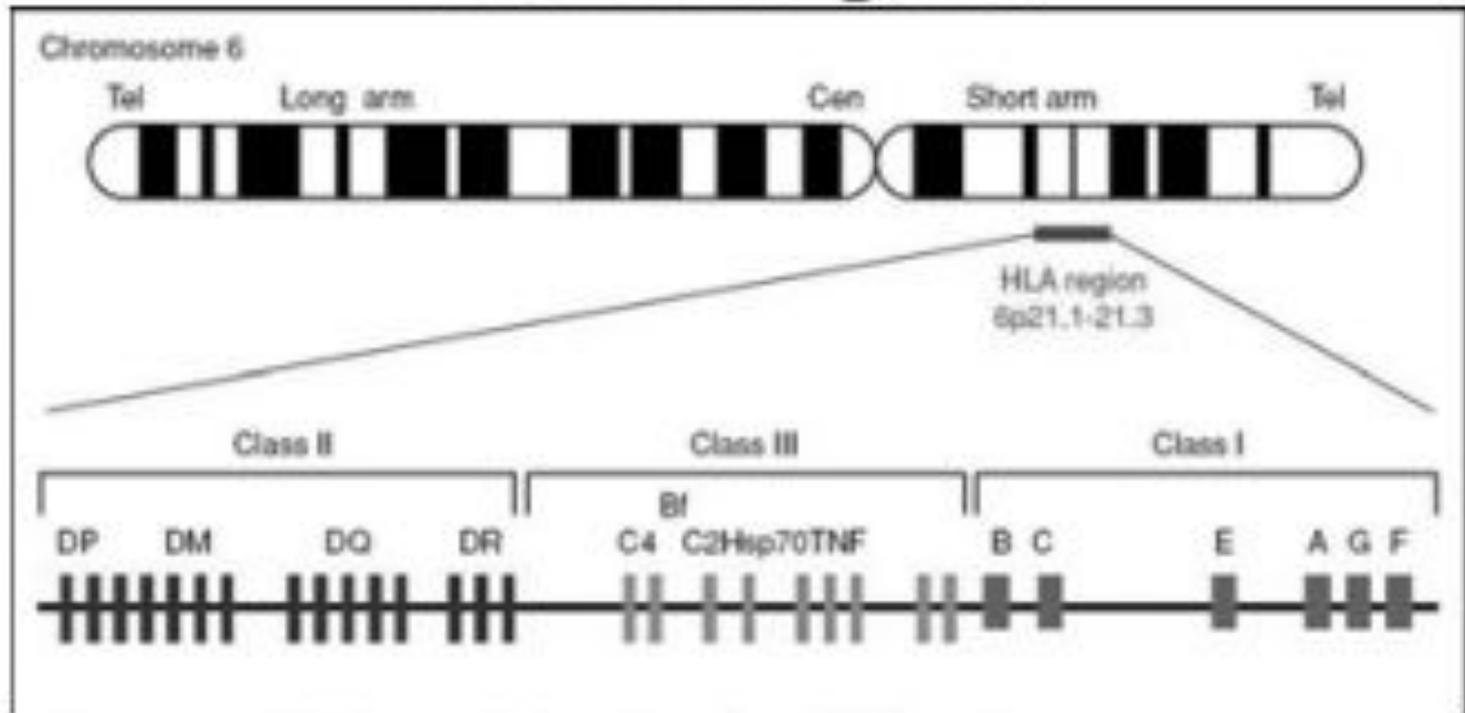
Главный комплекс ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

- Главный комплекс гистосовместимости (**MHC** major histocompatibility complex, у человека – **HLA** human leucocyte antigens) – это комплекс генов, которые сами по себе и через кодируемые ими продукты обеспечивают контроль иммунного ответа и реакции отторжения при трансплантации.
- У всех клеток конкретного человека система HLA тождественна и строго индивидуальна.

HLA «иммунный паспорт индивида»



The MHC genes



All antigens are not created equal



Transplantation and Immunogenetics



Распределение HLA - молекул

Ткань	HLA-I	HLA-II
Т-клетки	+++	+/-
В-клетки	+++	+++
Макрофаги	+++	++
Нейтрофилы	+++	-
Гепатоциты	+	-
Паренхима почек	+	-
Эпителий тимуса	+	+++
Мозг	+	-
Эритроциты	-	-

Тканевое типирование

Позволяет установить панель HLA-генов, присущих определенному организму (индивидуальный «паспорт»)

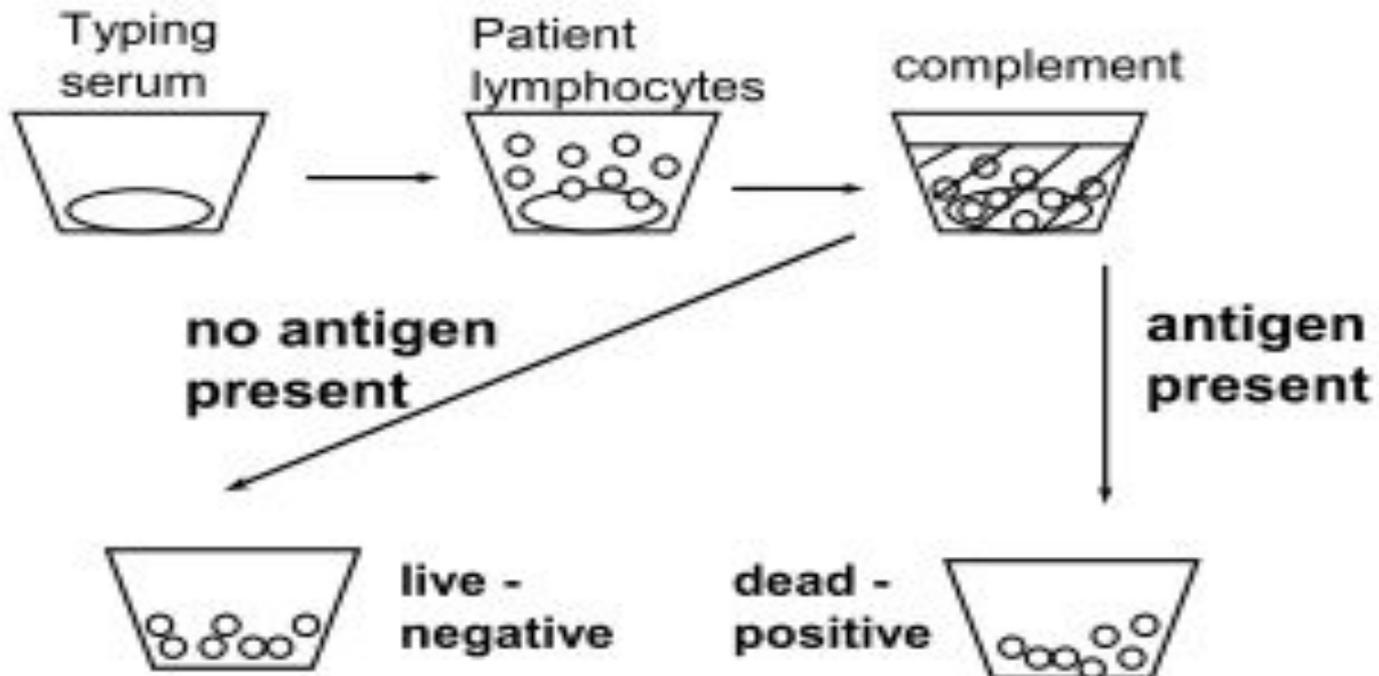
Методы:

- Микролимфоцитотоксический тест (CDC-тест)
- Анализ ДНК



CDC - Complement Dependent Cytotoxicity test

Serological Typing by CDC



Характеристика CDC - теста

Преимущества:

- Простота выполнения
- Скорость получения результата

Недостатки:

- Выявляют ограниченное количество HLA - антигенов
- Должны быть использованы живые лимфоциты обязательно в день взятия
- Тест не применим у пациентов с малым количеством лимфоцитов и подавленной лимфоцитарной активностью



Какие HLA имеют решающее значение в исходе трансплантации

- При трансплантации почки —
HLA-A > HLA-B > HLA-DR > HLA-C
- При трансплантации КМ —
HLA-DR > HLA-A > HLA-B > HLA-C



Тестиране ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

- Типирование HLA
- Скрининг на наличие у реципиента анти- HLA антител
- Тест на совместимость донора и реципиента (crossmatching)



Анти HLA - антитела

- Образуются при сенсбилизации:
 - переливание крови
 - беременность
 - предшествующие трансплантации
 - инфекции
- Обуславливают сверхострое отторжение
- Определение анти HLA – антител у потенциальных реципиентов абсолютно необходимо!



Антитела на Т и В-лимфоцитах и их клиническая значимость

Антитела	На Т-клетках	На В-клетках	Ассоциация с отторжением
Анти-HLA А, В, С	+++	++++	Да
Анти-HLA DR	-	++++	Да
Анти-эндотел. кл-ки	-	-	Да
Аутоантитела	+	++	Нет
Иммунные комплексы Fc-Р связыв.	-	++	Нет

Скрининг антител (панель реактивных антител)

- Позволяет определить степень аллосенсибилизации (% из панели реактивных АТ) у потенциального реципиента.
- Пациенты с высоким % PRA (80-100%) имеют высокую вероятность позитивной crossmatch (высокий риск ранней потери трансплантата).
- PRA = 0% не исключает реакций отторжения
- Рекомендуется проводить с периодичностью не менее 1 раз в 3 месяца у реципиентов на «листе ожидания».
- При трансплантации солидных органов результаты PRA более важны, чем совместимость по HLA

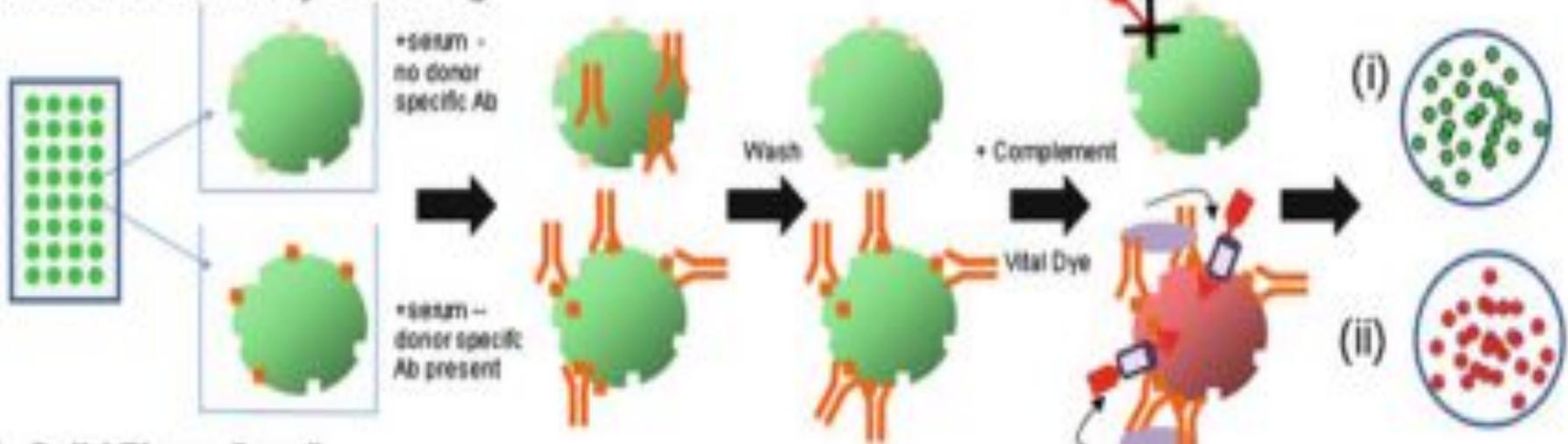


Методы тестирования предсуществующих АТ (PRA)

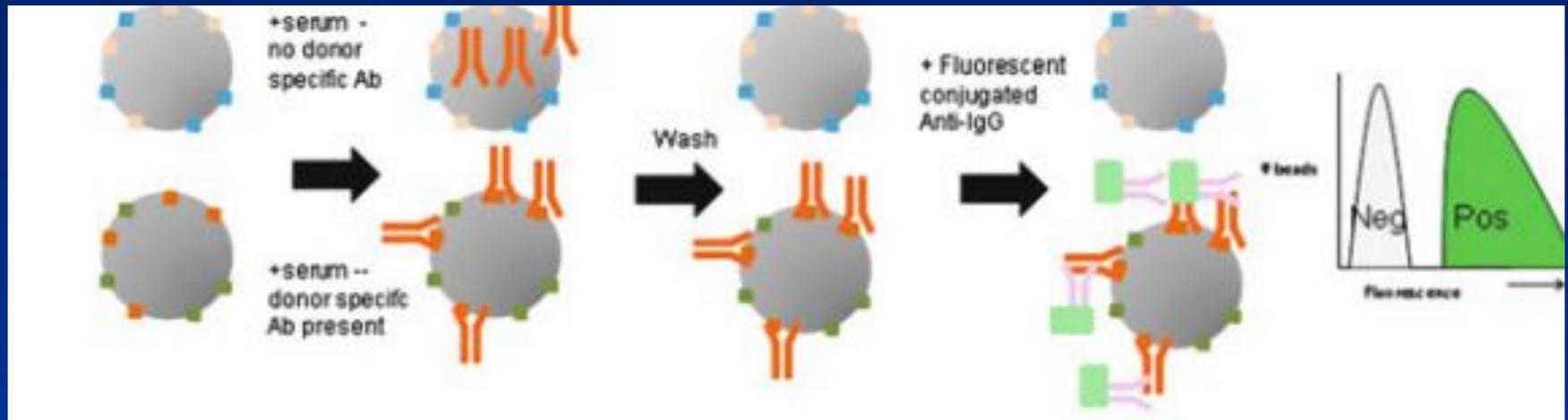
- **Микролимфоцитотоксический тест (CDC – тест)**
 - Недостатки: выявляет только комплемент-фиксирующие АТ
 - Ложноотрицательные результаты (при низкой плотности АТ на клетках)
 - Ложно-положительные результаты в результате наличия не-HLA-АТ
 - Высокая вариабельность (лейкоциты случайных волонтеров)
- **Иммунохимические твердофазные тесты (ELISA)**
 - Недостатки:
 - Ограниченное количество HLA
 - Неспособность выявлять не HLA -АТ
- **Проточная цитофлуориметрия (flow PRA)**

PRA на основе микролимфоцитотоксического теста

Cell based Antibody Screening



PRA методом проточной цитометрии



Метод проточной цитофлуориметрии

Преимущества

- высокая чувствительность и специфичность
- Возможность проводить одновременно анализ Т- и В клеток.
- В перспективе отрицательный результат flow PRA отменяет необходимость crossmatch
- Используют для мониторинга сенсбилизации в посттрансплантационном периоде

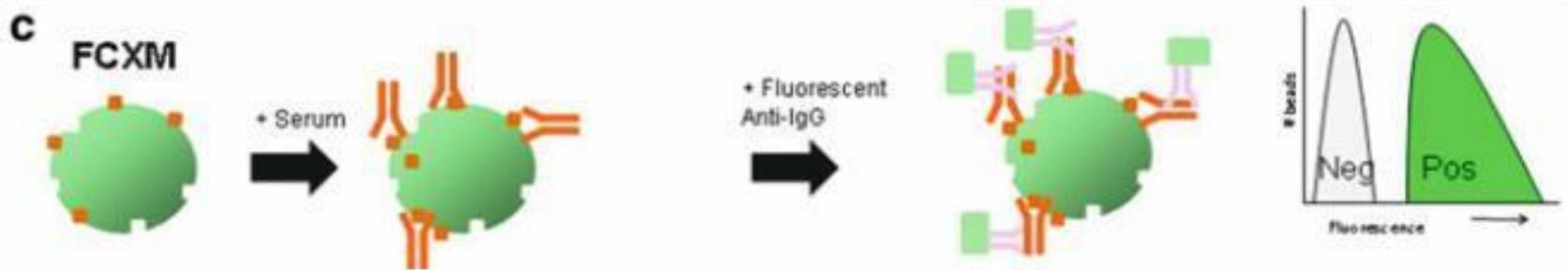
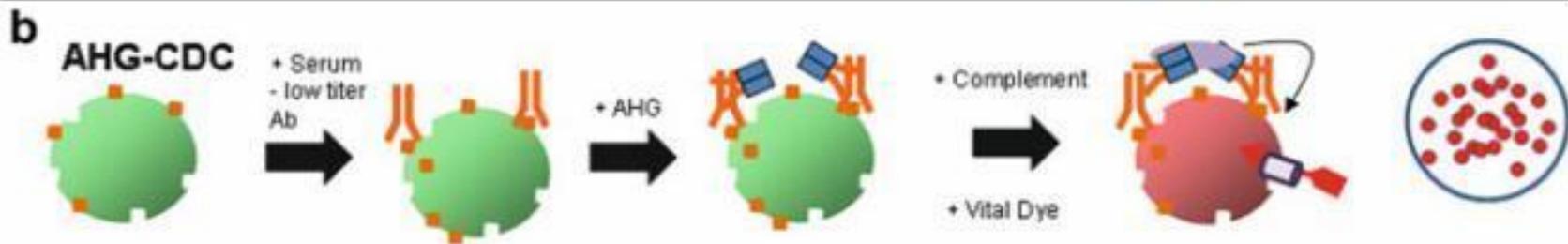


Тестирование ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ

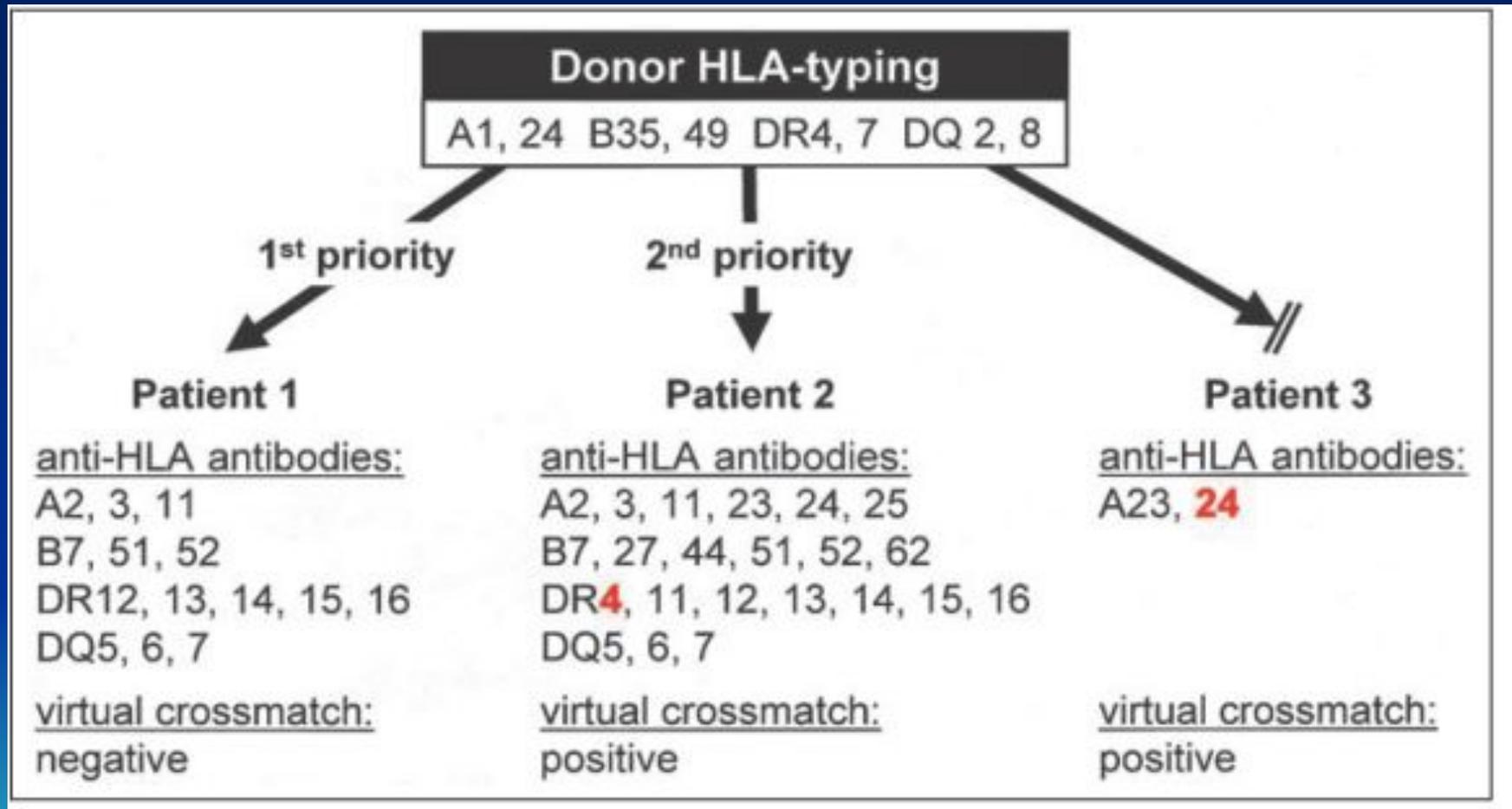
- Типирование HLA
- Скрининг на наличие у реципиента анти- HLA антител
- Тест на индивидуальную совместимость донора и реципиента (crossmatch)



Методы оценки степени несоответствия донор-реципиент (crossmatch)



Виртуальный crossmatch



Клиническое применение результатов crossmatch

- Положительная реакция CDC - предиктор сверхострого отторжения, трансплантация не целесообразна
- При отрицательном результате CDC, но положительном flow – трансплантация не целесообразна у пациентов высокого риска. Может быть проведена на фоне усиленной иммуносупрессии (при ограниченной возможности выбора трансплантата)
- Виртуальная crossmatch рассматривается как более чувствительная и специфичная для оценки трансплантационного риска



***БЛАГОДАРЮ
ЗА ВНИМАНИЕ !!!***

