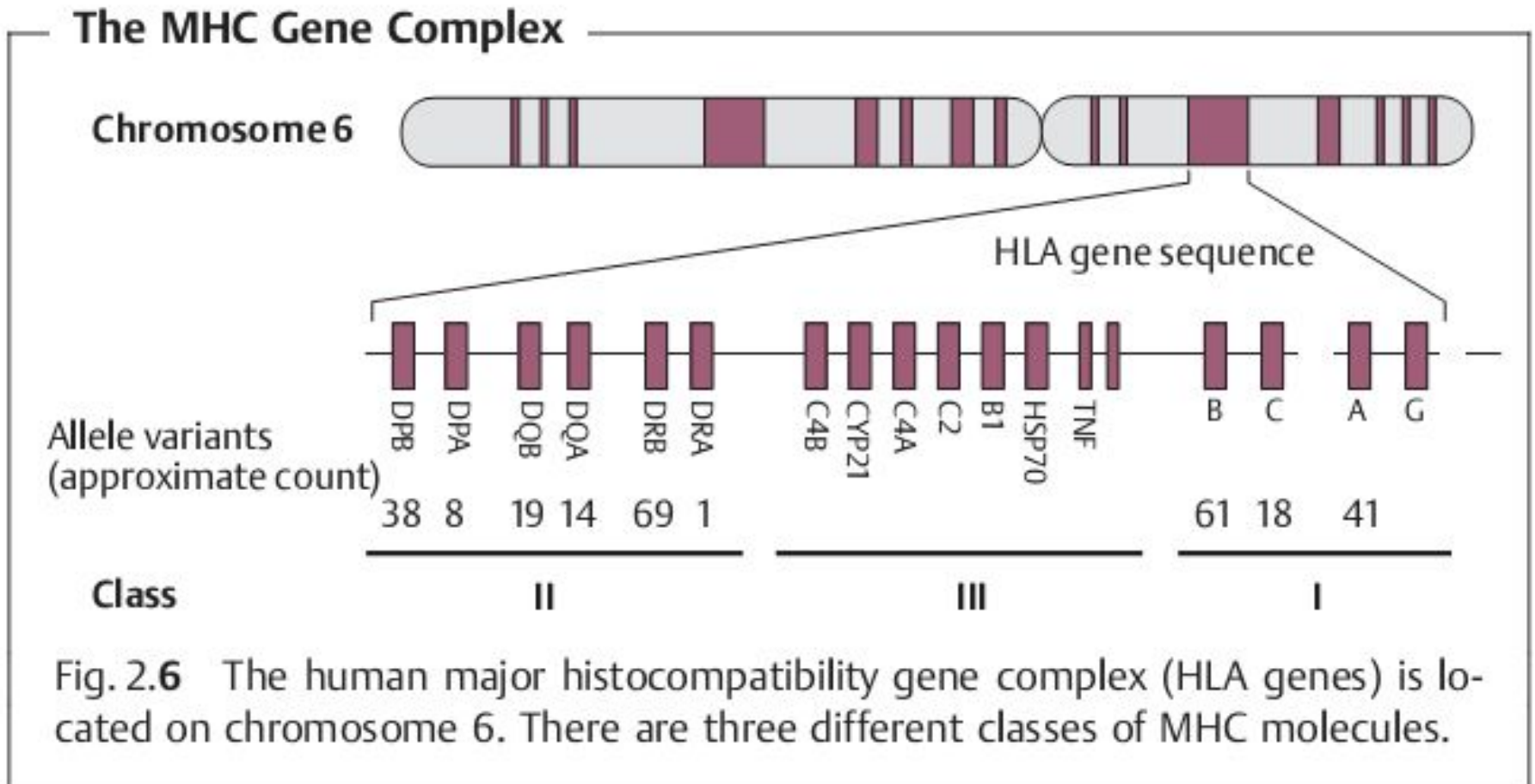


Трансплантационный иммунитет

- **Под этим термином понимают, иммунную реакцию на трансплантацию чужеродных тканей (алло- и ксенотрансплантацию), которая обычно завершается отторжением всех тканей.**

HLA- антигены



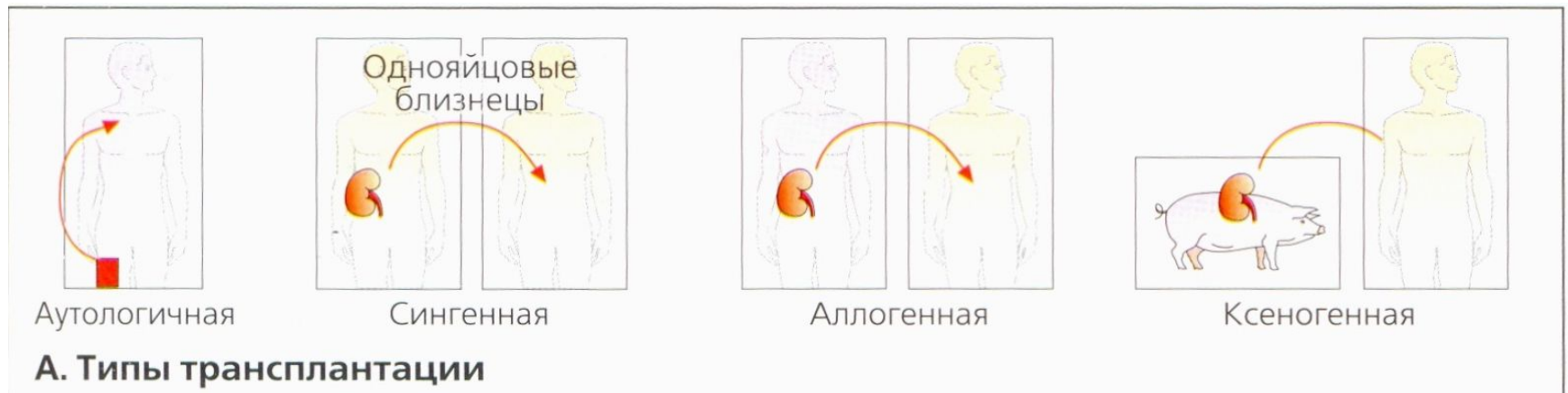
HLA- антигены

- Молекулы (МНС класса I экспрессирует большинство ядерных клеток (у некоторых видов также эритроциты и тромбоциты).
- Экспрессия молекул МНС класса II ограничена антигенпрезентирующими клетками Экспрессия молекул МНС класса II ограничена антигенпрезентирующими клетками (дендритные клетки Экспрессия молекул МНС класса II ограничена антигенпрезентирующими клетками

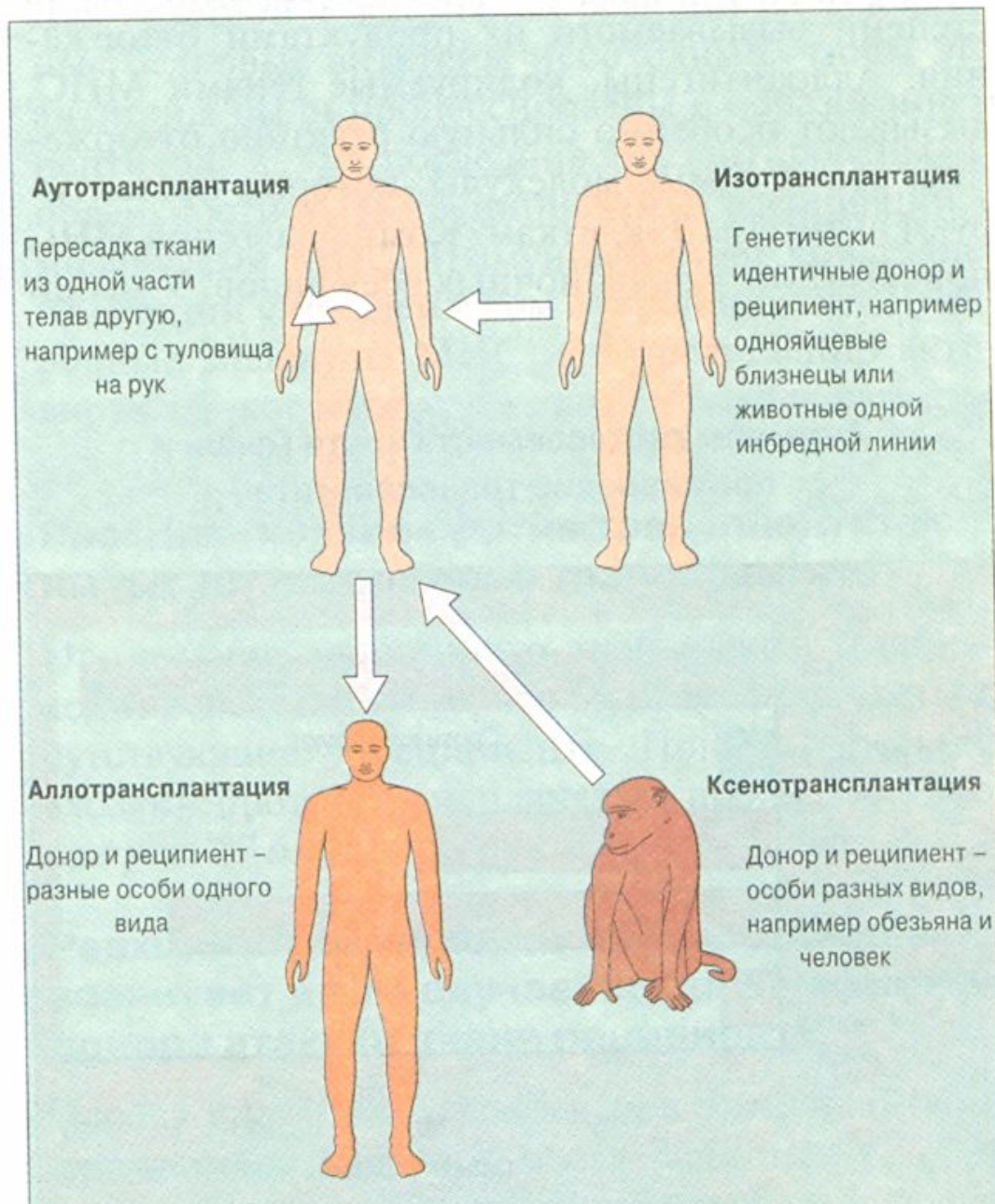
HLA- антигены

- Экспрессию антигенов МНС регулируют цитокины Экспрессию антигенов МНС регулируют цитокины - интерферон-гамма Экспрессию антигенов МНС регулируют цитокины - интерферон-гамма и фактор некроза опухолей.
- Оба эти агента служат мощными индукторами экспрессии МНС клетками многих типов, которые до этой активации экспрессируют

Типы трансплантации



Генетические барьеры, препятствующие приживлению трансплантата



Генетические законы трансплантации

- **1. Трансплантация внутри одной инбредной линии (сингенная трансплантация) всегда успешна: между донором и реципиентом отсутствуют генетические и антигенные различия.**

Генетические законы трансплантации

- **2. Трансплантация между особями разных инбредных линий (аллогенная трансплантация) терпит неудачу:** между донором и реципиентом имеются различия по комплексу МНС и по контролируемым им молекулам (антигенам) гистосовместимости. В результате у реципиента развивается иммунный ответ на чужеродные антигены донора, что приводит к отторжению трансплантата.

Генетические законы трансплантации

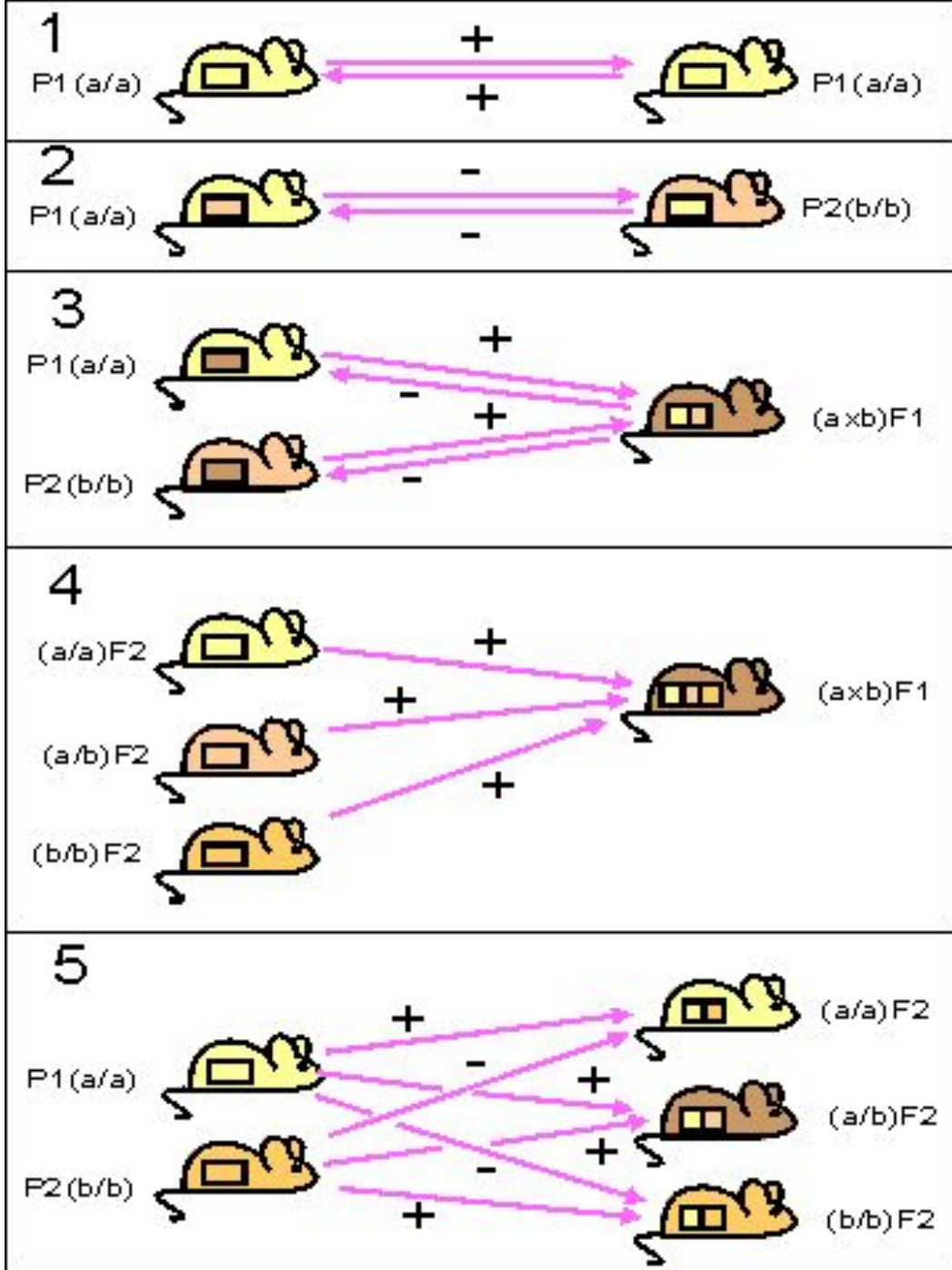
- 3. Трансплантаты родительских линий $P1$ или $P2$ приживаются у гибридов первого поколения $(P1 \times P2)F1$. Поскольку антигены гистосовместимости наследуются по кодоминантному типу, гибриды $F1$ имеют полный набор антигенов обоих родителей. Трансплантаты родителей не несут чужеродной информации для гибрида $F1$, и в результате трансплантат приживается. В то же время трансплантат гибрида $F1$ отторгается у мышей родительских линий, так как реципиенты ($P1$ или $P2$) реагируют на антигены второго родителя ($P2$ или $P1$), представленные у гибрида $F1$.

Генетические законы трансплантации

- **4. Трансплантаты гибридов второго поколения F_2 приживаются у гибридов F_1 . У гибридов F_2 происходит расщепление признака по антигенам гистосовместимости на гомозиготы У гибридов F_2 происходит расщепление признака по антигенам гистосовместимости на гомозиготы и гетерозиготы, и они не имеют каких-либо антигенов, которые не были бы представлены у F_1 . В итоге наблюдается приживление трансплантатов.**

Генетические законы трансплантации

- **5. Трансплантаты родительских линий P1 и P2 приживаются у одних особей F2, но отторгаются у других.** Поскольку гибриды F2 включают как гомозиготы, так и гетерозиготы, трансплантация ткани одного из гомозиготных родителей на гомозиготную особь F2, имеющую иной генотип, приводит к отторжению трансплантата.
- Аналогичные отношения существуют и при пересадке родительских трансплантатов на гибрид возвратного скрещивания.



Законы трансплантации

Генетические законы трансплантации

- Показаны направления трансплантации кожных лоскутов у различных инбредных гомозиготных линий (a/a или b/b) их гибридов F1(a*b) и F2, полученных от скрещивания родителей P1(a/a) и P2(b/b) и гибридов.
- 1 - трансплантация внутри одной инбредной линии всегда успешна.
- 2 - трансплантация между разными инбредными линиями не имеет успеха.
- 3 - трансплантаты родительских линий P1 или P2 приживаются у гибрида первого поколения (P1*P2)F1.
- 4 - трансплантаты гибридов второго поколения F2 и последующих поколений приживаются у гибридов первого поколения F1.
- 5 - трансплантаты родительских линий P1 и P2 приживаются у одних особей F2, но отторгаются у других.

Условия для проведения трансплантации

- 1) Наличие разветвленной сети центров по трансплантологии, задача которых - сбор информации о потенциальных донорах и состоянии здоровья пациентов, ожидающих хирургического вмешательства; проведение HLA- типирования как донора, так и пациента; организация максимально быстрой доставки органа в клинику.
- 2) Организация специализированных клиник по трансплантации со штатом квалифицированных хирургов.
- 3) Постоперационный контроль состояния хирургического больного. Среди прочих терапевтических мер, применяемых к таким больным, постопреационный контроль включает обязательное использование иммуносупрессивной терапии. Наиболее эффективными в данном случае являются стероиды, циклоспорин А и FR-506 и азатиоприн.

Условия совместимости

- Оценка совместимости донора и реципиента по антигенам HLA.
- Для оценки совместимости реципиента с предлагаемым донором **определяют антигены HLA**, исключают сенсibilизацию реципиента антигенами HLA, проводят пробу на индивидуальную совместимость.
- Помимо этого подбирают донора, совпадающего с реципиентом по антигенам системы **ABO** Помимо этого подбирают донора, совпадающего с реципиентом по антигенам системы **ABO** . Это особенно важно при **трансплантации почки**

Подбор донора

- Вероятность найти полностью совместимого донора составляет от 1:1000 до 1:1000000 в зависимости от распространенности того или иного антигена HLA. Вероятность подбора полностью совместимого донора среди родных братьев и сестер составляет 1:4, так как гены HLA наследуются по законам Менделя.
- Если отцовские гаплотипы HLA обозначить буквами a и b, а материнские - c и d, у потомства возможны 4 комбинации гаплотипов. При этом вероятность совпадения и вероятность полного несовпадения генотипов HLA детей и родителей составляет 25%, а вероятность совпадения одного из гаплотипов - 50%.
- Типирование антигенов HLA у родственников реципиента проводят для подбора донора, совместимого с реципиентом по одному или обоим гаплотипам.

Подбор донора

- При совместимости донора и реципиента по антигенам HLA отторжение трансплантата можно предотвратить с помощью минимальной иммуносупрессивной терапии.
- Типирование трупного материала по антигенам HLA проводят для подбора органов и тканей, совместимых по 3 антигенам: HLA-A, HLA-B и HLA-DR. Совпадение по этим антигенам не указывает на идентичность гаплотипов донора и реципиента, а лишь свидетельствует об идентичности аллелей данных генов.
- Найти донора, полностью совместимого с реципиентом по антигенам HLA, среди людей, не являющимися его родственниками, почти невозможно, поэтому доноров чаще подбирают среди братьев и сестер реципиента.

Аутологичная трансплантация костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток

- **Многие опухолевые заболевания, особенно лейкозы и лимфомы, могут быть излечены с помощью высокодозовой химиотерапии и радиотерапии. Лимитирующим фактором такого метода лечения является токсичность, связанная с необратимыми повреждениями кроветворного костного мозга (миелоабляция).**
- **Для восстановления системы кроветворения достаточно введения реципиенту 700-800 мл костного мозга от здорового донора (аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ)).**
- **Функцию костного мозга можно также восстановить, вводя пациенту аутологичный костный мозг, взятый у него непосредственно перед терапией (аутологичная ТКМ).**

Получение стволовых клеток

- Отбор костного мозга пациента осуществляется при повторных пункциях из гребня подвздошной кости, проводимых под общим наркозом.
- За восстановление кроветворной функции в пунктате ответственны **CD34** стволовые клетки. Они присутствуют в костном мозге и циркулируют в периферической крови.
- Они могут быть отобраны **методом лейкофереза** селективного центрифугирования крови, при котором отбирают одноядерные клетки (стволовые).
- От 8 до 15 л крови постоянно пропускают через сепаратор на протяжении 2-5 ч. и получают около 350 мл крови, обогащенной стволовыми клетками, которые замораживают до дальнейшего использования.
- Минимальное количество CD34 клеток, необходимое для успешного восстановления гемopoэтической системы, составляет 2×10^6 CD34 клеток/кг массы тела.

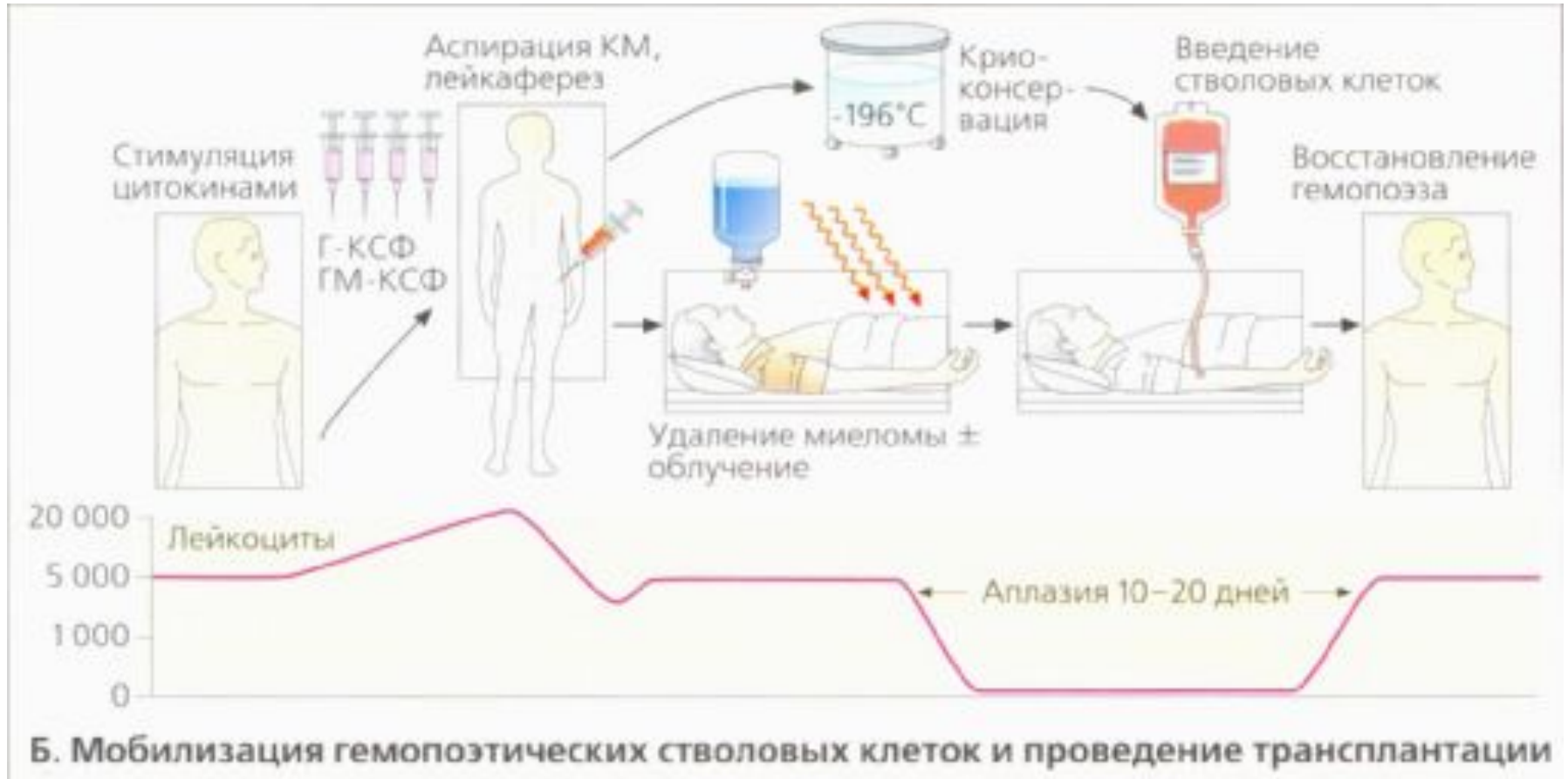
Получение стволовых клеток



Мобилизация стволовых клеток

- **Содержание CD34 стволовых клеток в периферической крови низкое, но его можно повысить, вводя рекомбинантные гемопоэтические факторы роста (Г-КСФ или ГМ-КСФ).**
- **Затем осуществляют отбор костного мозга или лейкоферез.**
- **Отобранные клетки хранят в замороженном виде.**
- **Высокодозовая химио/радиотерапия приводит к аплазии костного мозга (снижению числа эритроцитов, гранулоцитов и тромбоцитов), которая без переливания стволовых клеток была бы необратимой. Период аплазии длится не более 10-15 дней;**
- **при завершении курса химиотерапии пациенту вводят хранившиеся в замороженном виде стволовые клетки. В результате происходит полное восстановление гемопоэза.**

Мобилизация стволовых клеток



Показания к трансплантации

1. Усиление эффекта химиотерапии

- Острый лейкоз
- Болезнь Ходжкина
- Неходжкинская лимфома
- Рак молочной железы
- Опухоли из клеток зародышевого центра

Показания к трансплантации

2. Генная и экспериментальная терапия

- Иммунодефициты
- Гемофилия
- Иммунная терапия рака
- Генетическая модификация
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Очистка аутотрансплантата

- При аутологичной трансплантации существует риск загрязнения трансплантата опухолевыми клетками. Трансплантируемый материал подвергают процедуре очистки. Поскольку антиген CD34 не экспрессируется на поверхности клеток солидных опухолей, можно провести **позитивную селекцию CD34 клеток**.
- В присутствии биотинилированных анти-CD34 антител CD34 клетки связываются на колонке с авидином, а затем отделяются. Чистота полученных таким способом CD34 клеток составляет около 90%.
- Дальнейшая очистка осуществляется путем **негативной селекции**. Для этой процедуры используют железные шарики, покрытые антителами против опухолевых антигенов. Клетки, несущие опухолевые антигены, удаляют в магнитном поле.

Очистка аутотрансплантата



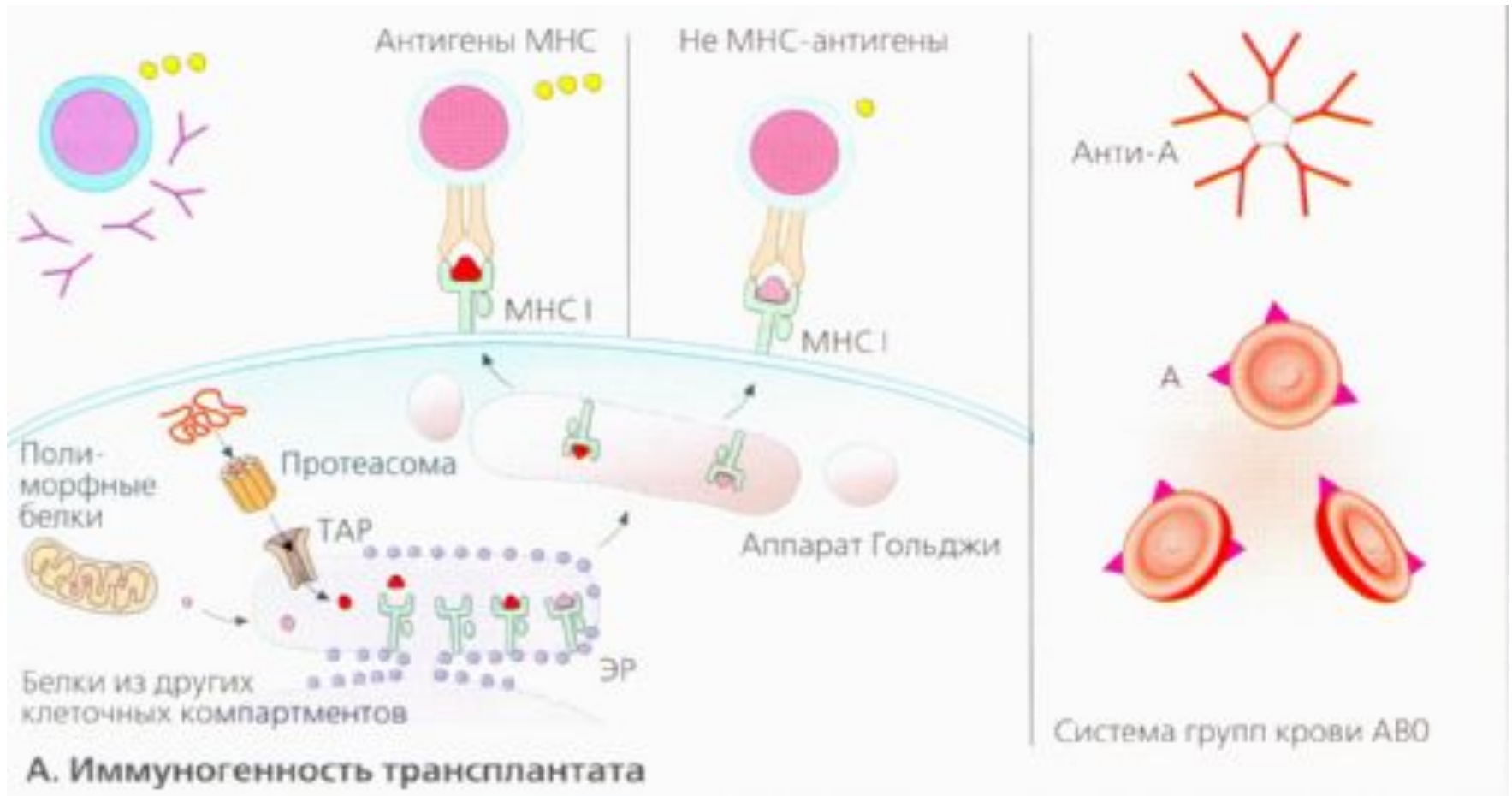
Г. Очистка аутотрансплантата

Иммуногенность трансплантата

Молекулы МНС I и представляемые ими пептиды.

- Пептидные фрагменты, происходящие от цитоплазматических белков, образуются в ферментативном комплексе (протеасоме), и доставляются транспортными белками ТАР в ЭР, где они связываются с молекулами МНС I.
- Узнавание лимфоцитами реципиента пептида, связанного с МНС I, запускает действие клеточного и гуморального иммунитета.
- Пептиды, происходящие из других клеточных компартментов, также транспортируются в ЭР, связываются с молекулами МНС I и презентуются на поверхности клетки. Не МНС антигены вызывают гораздо более слабый иммунный ответ и активируют лишь ограниченное число Т-клеточных клонов.
- Восприятие реципиентом антигенов групп крови трансплантата как чужеродных. Система АВО может вызвать реакции сверхострого отторжения.

Иммуногенность трансплантата



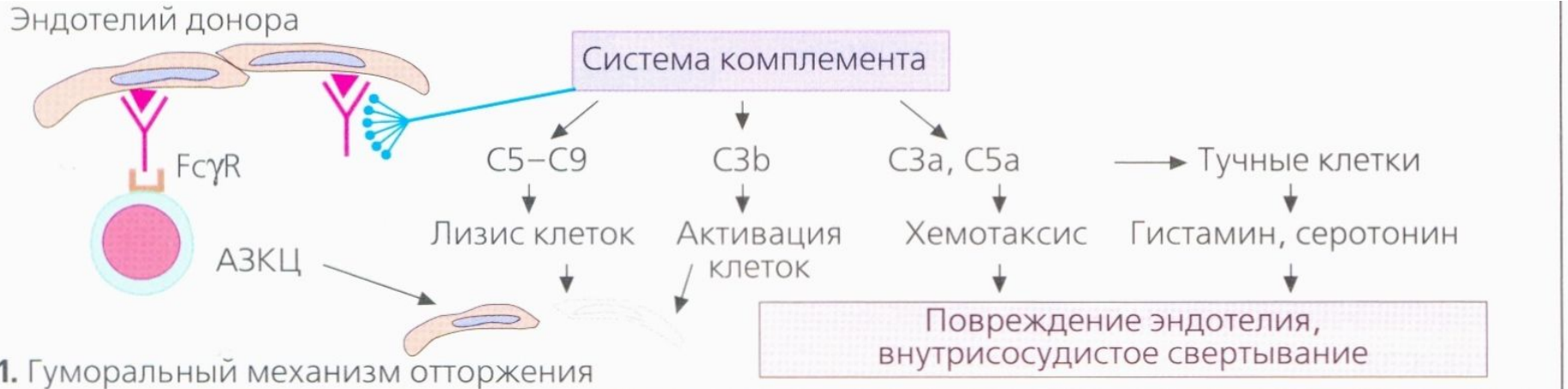
Отторжение трансплантата

- Отторжение трансплантата - это иммунологическая реакция: она высокоспецифична, осуществляется лимфоцитами Отторжение трансплантата - это иммунологическая реакция: она высокоспецифична, осуществляется лимфоцитами, вторичный ответ более интенсивен, чем первичный, через очень короткое время наблюдается инфильтрация трансплантата полиморфноядерными гранулоцитами и лимфоидными и плазматическими клетками.
- Уже через несколько дней можно наблюдать тромбоз сосудов и гибель клеток трансплантата.
- Происходит также образование

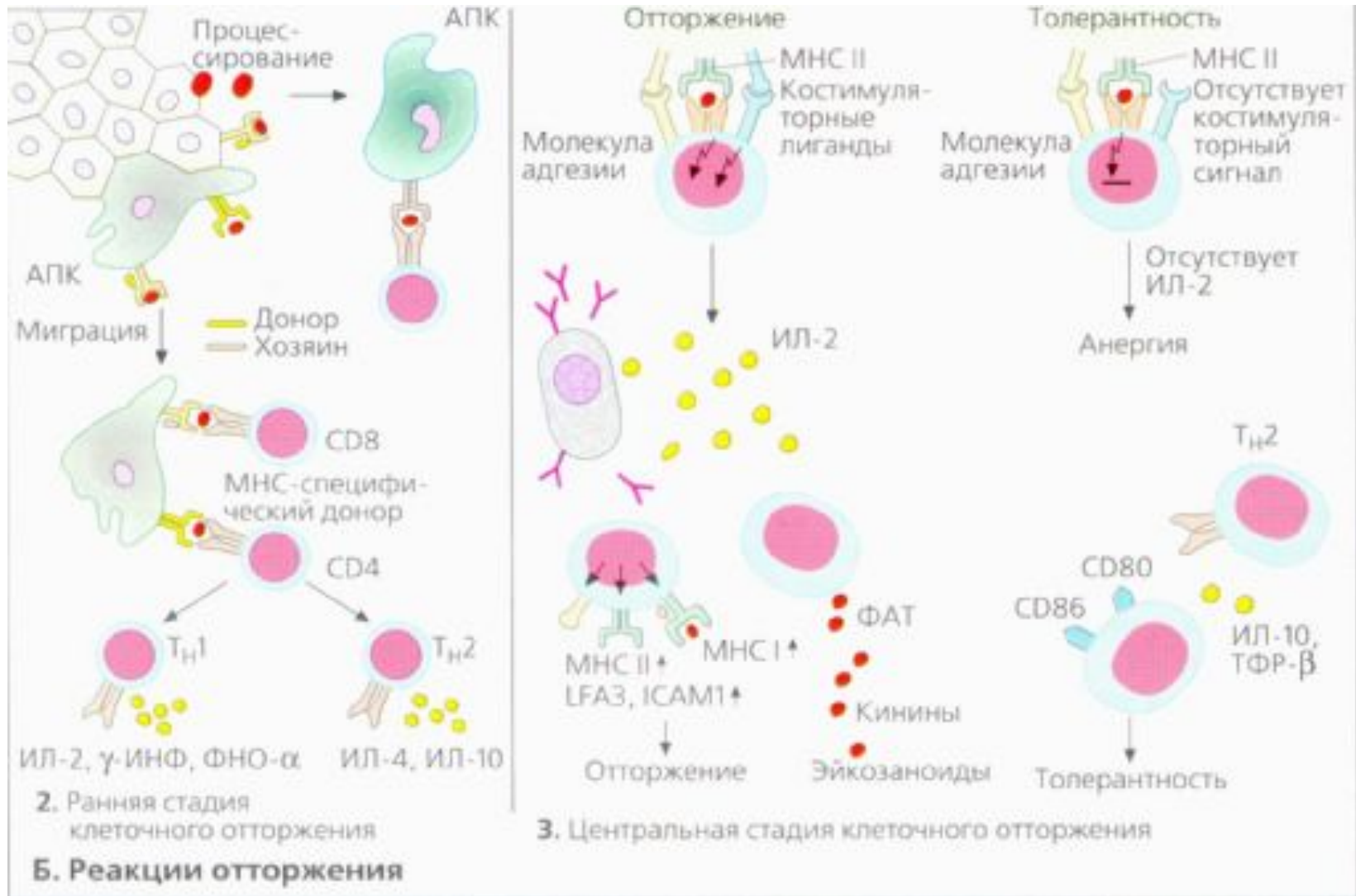
Отторжение трансплантата

- Основными эффекторами являются **цитотоксические TCD8⁺ лимфоциты** и **TCD4⁺ лимфоциты**. Последние привлекают в зону отторжения трансплантата **макрофаги**.
- Распознавание трансплантационных антигенов происходит либо непосредственно на клетках трансплантата, либо в ближайшей (региональной) лимфоидной ткани, куда поступает отрывающийся от клеточной поверхности антиген.

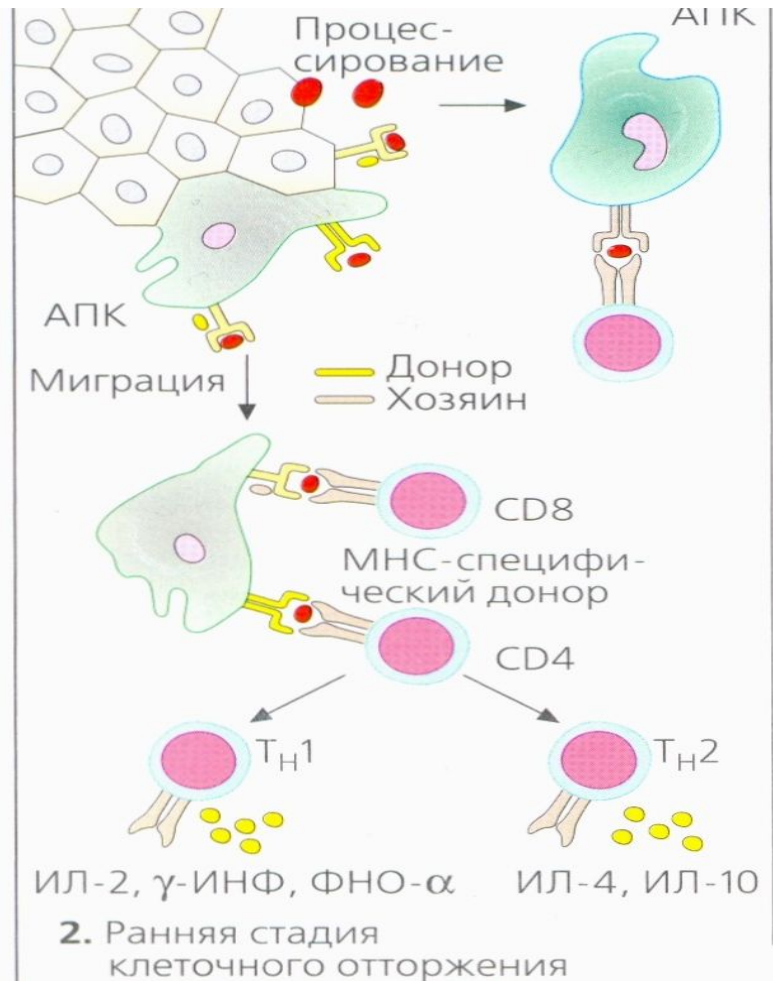
Гуморальный механизм отторжения



Реакции отторжения

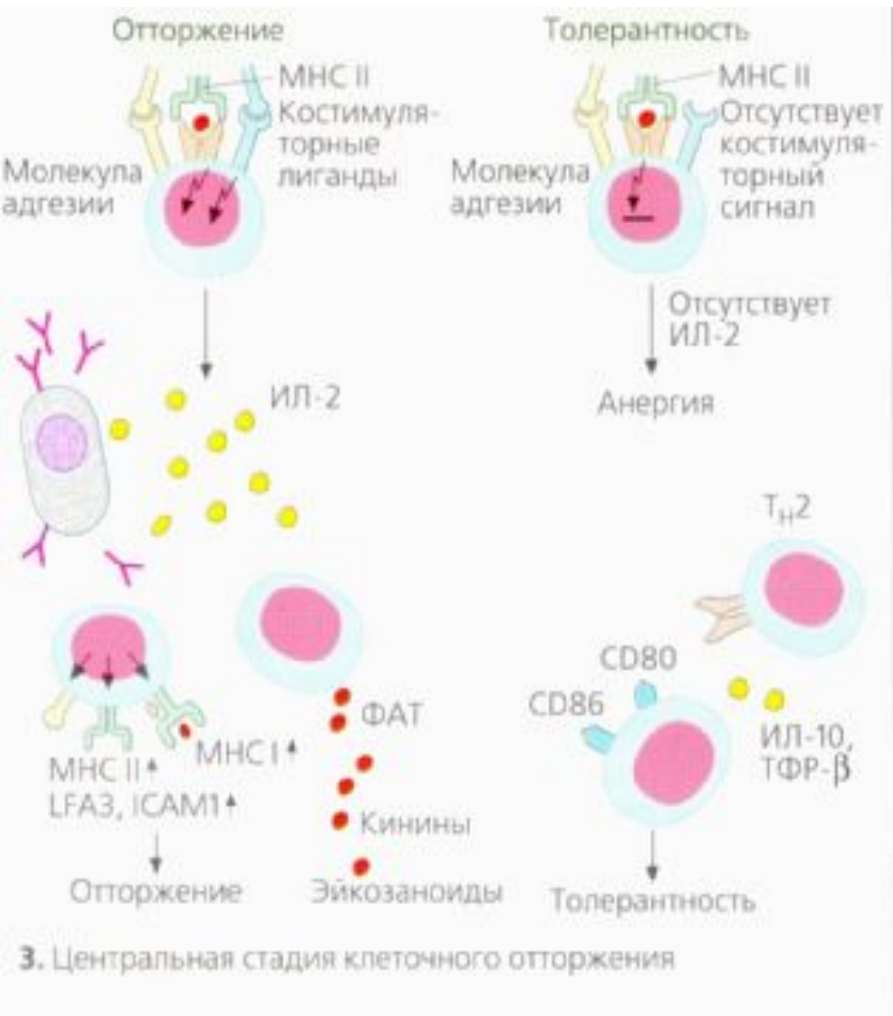


Реакции отторжения



- Профессиональные АПК мигрируют и напрямую активируют Т-клетки хозяина, которые становятся специфичными к молекулам МНС трансплантата.
- АГ трансплантата могут подвергаться фагоцитозу и процессироваться АПК хозяина.
- Презентация на собственных МНС активирует только Т-клетки, которые не узнают молекулы МНС трансплантата.

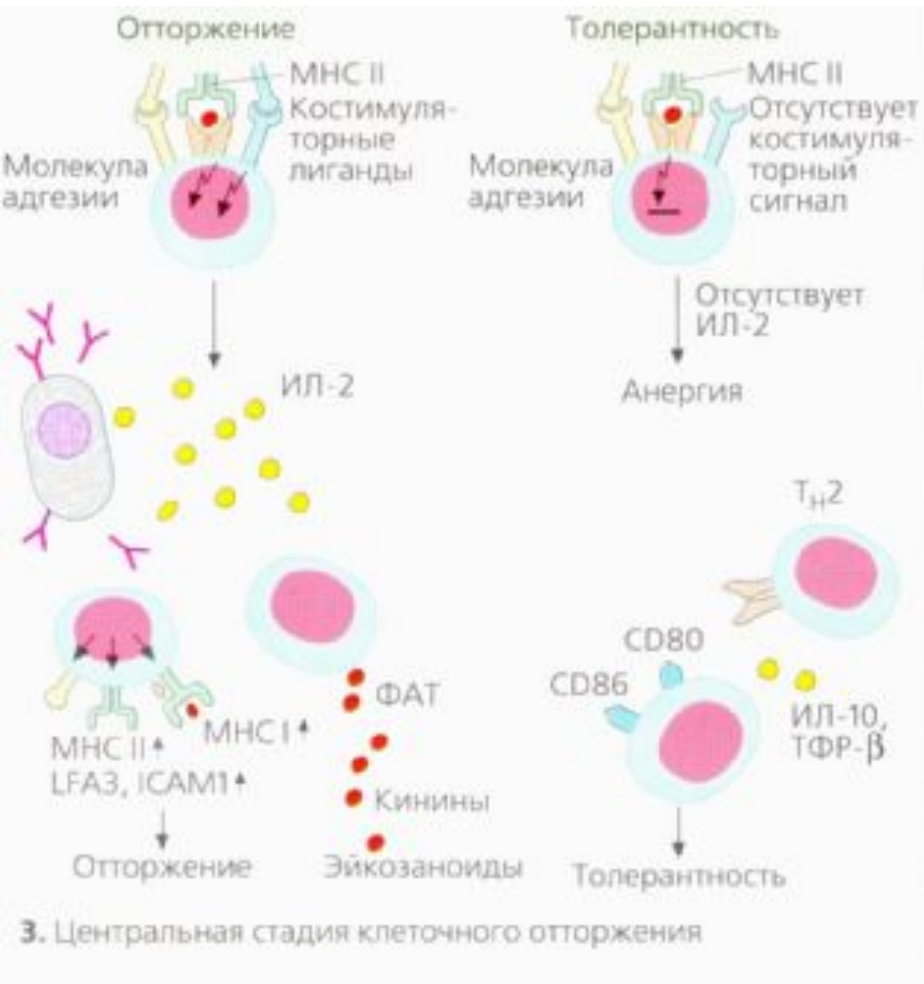
Реакции отторжения



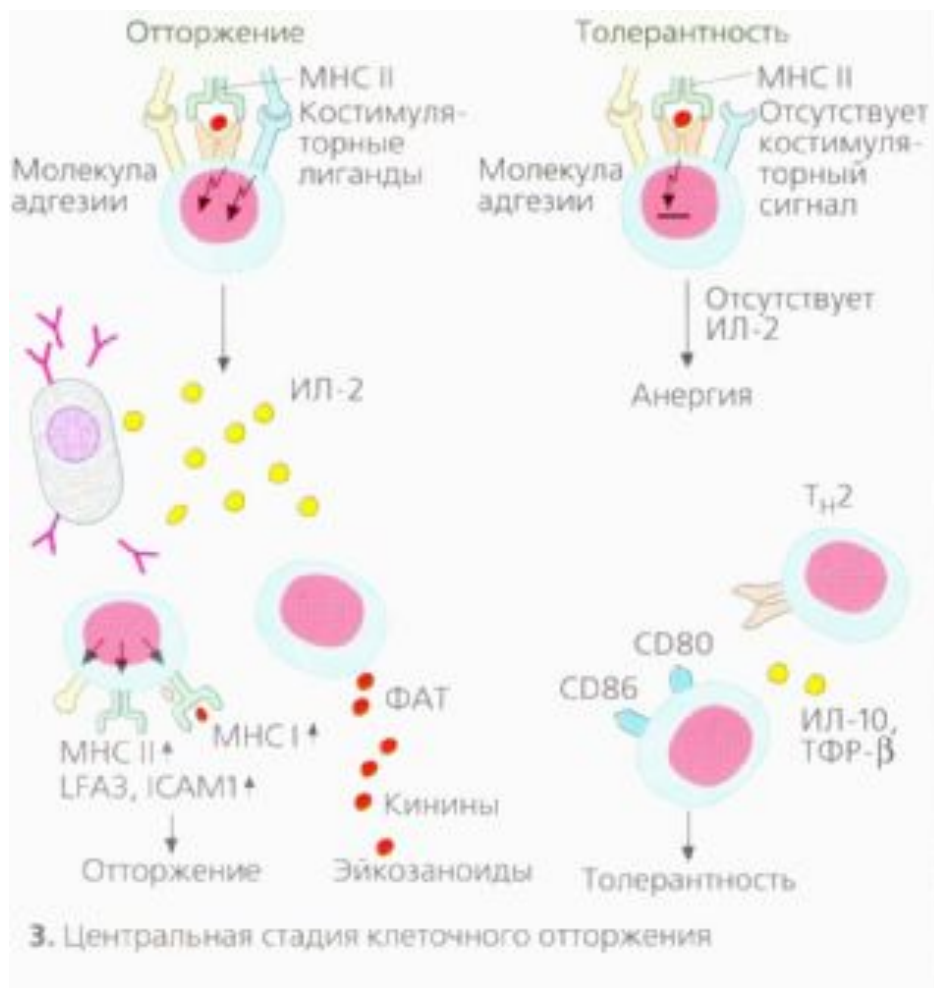
- Активированные Т-клетки инфильтруют околосоудистые ткани и участки вокруг АПК. Задействована популяция клеток Th1 - типа.
- Высвобождение цитокинов оказывает прямое токсическое действие на окружающие ткани.
- Цитокины индуцируют привлечение Т- и В-клеток, макрофагов и гранулоцитов. Активированные эффекторные клетки выделяют прокоагуляционные факторы, **кинины и эйкозаноиды**.
- Под воздействием цитокинов происходит **усиление экспрессии молекул адгезии и МНС** в окружающих тканях.

Индукция анергии

- Иммуномодулирующие процессы, приводящие к длительной толерантности, сложны и не до конца изучены.
- Если не приходит второй сигнал от ко-стимулирующего лиганда, передаваемый посредством CD28, то активация наивных Т-клеток останется неполной.
- Такое состояние, называемое **анергией**, характеризуется отсутствием ИЛ-2 и деструктивных Т-клеточных реакций.

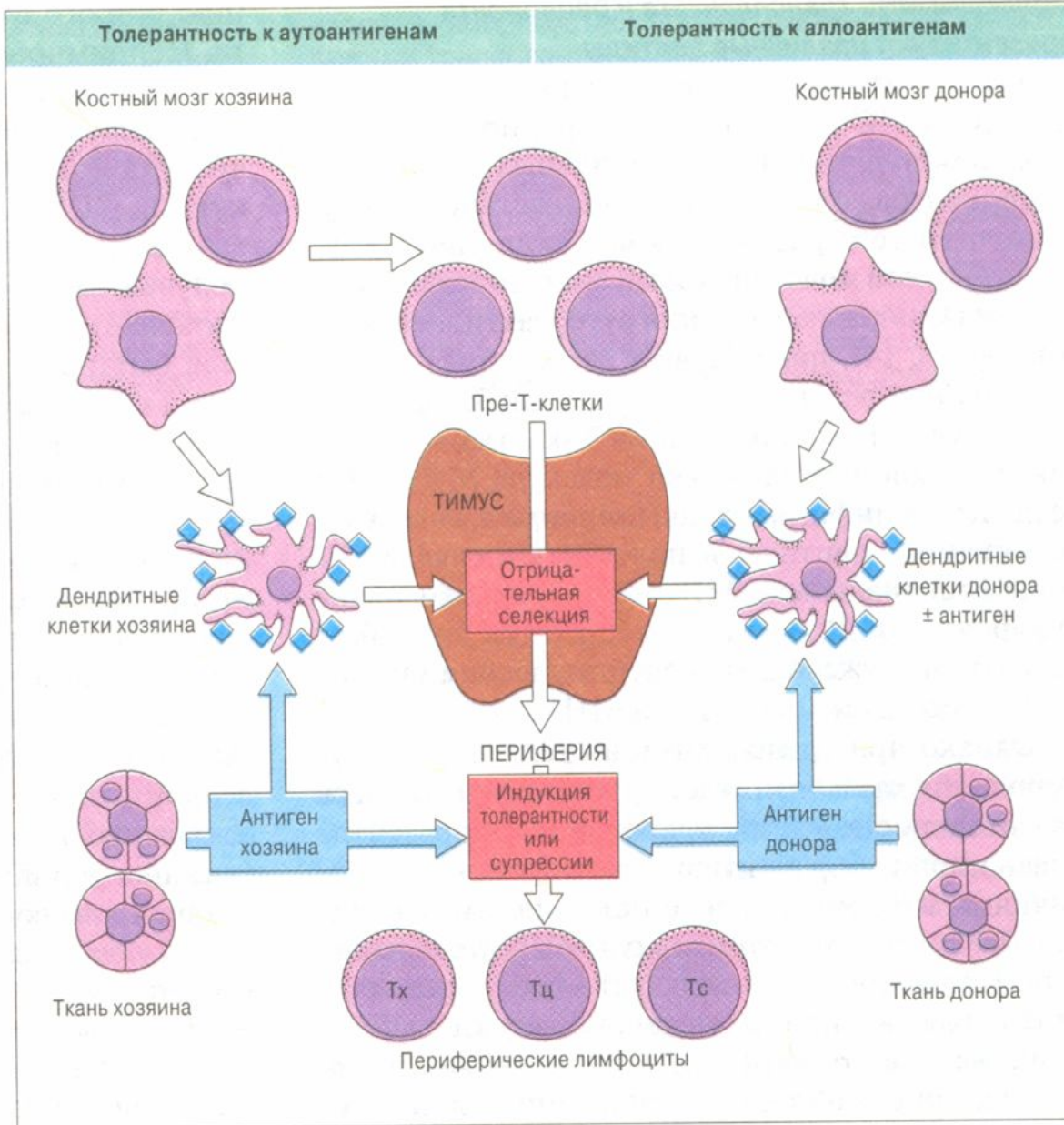


Индукция толерантности



- В условиях толерантности аллогенные трансплантаты часто инфильтруются Th2-клетками, что, возможно, ингибирует действие Th1-клеток. Их цитокины ИЛ-10 и ТФР-β снижают уровень экспрессии ко-стимуляторных лигандов CD80 и CD86.

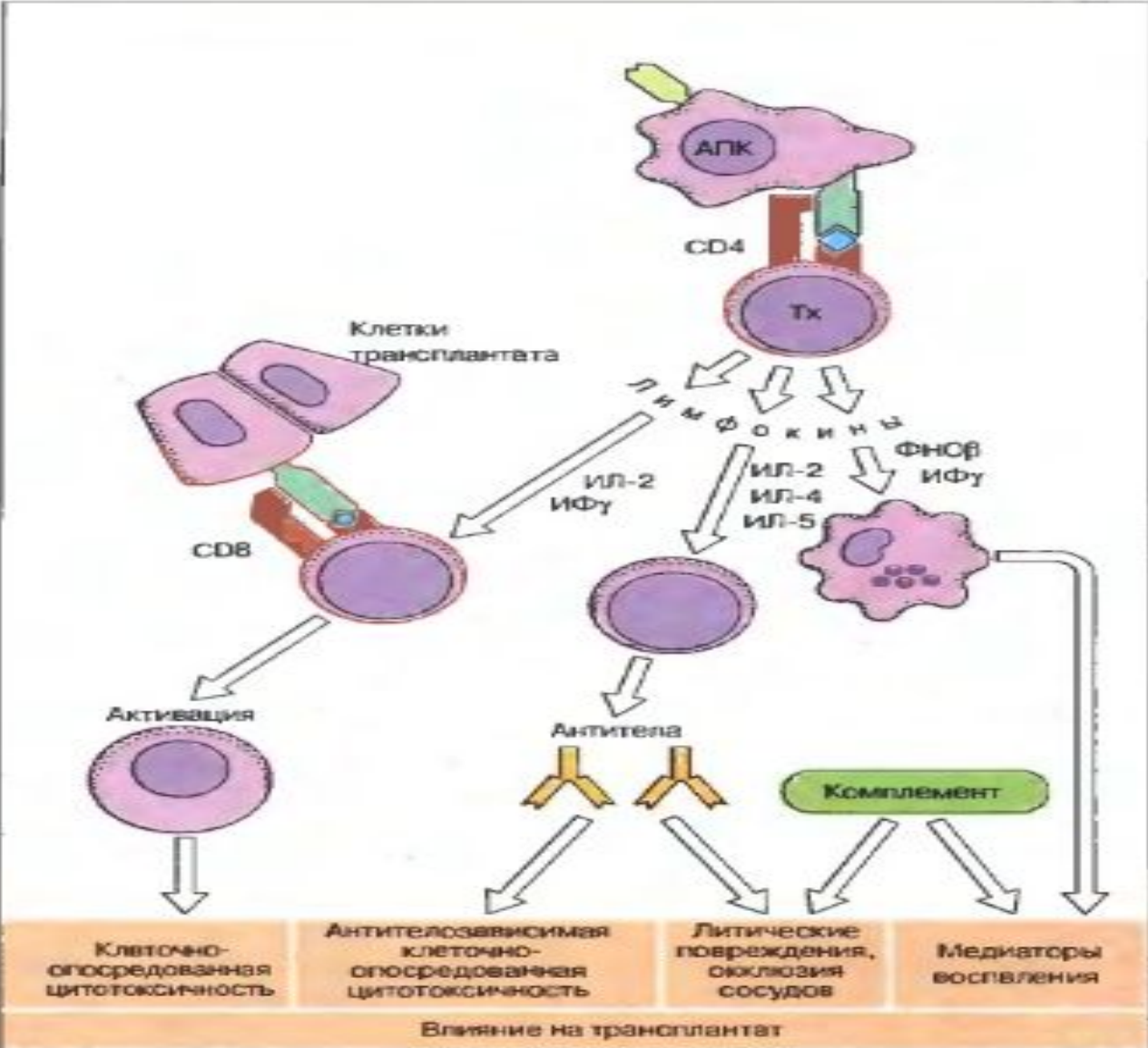
Индукция толерантности в тимусе и на периферии

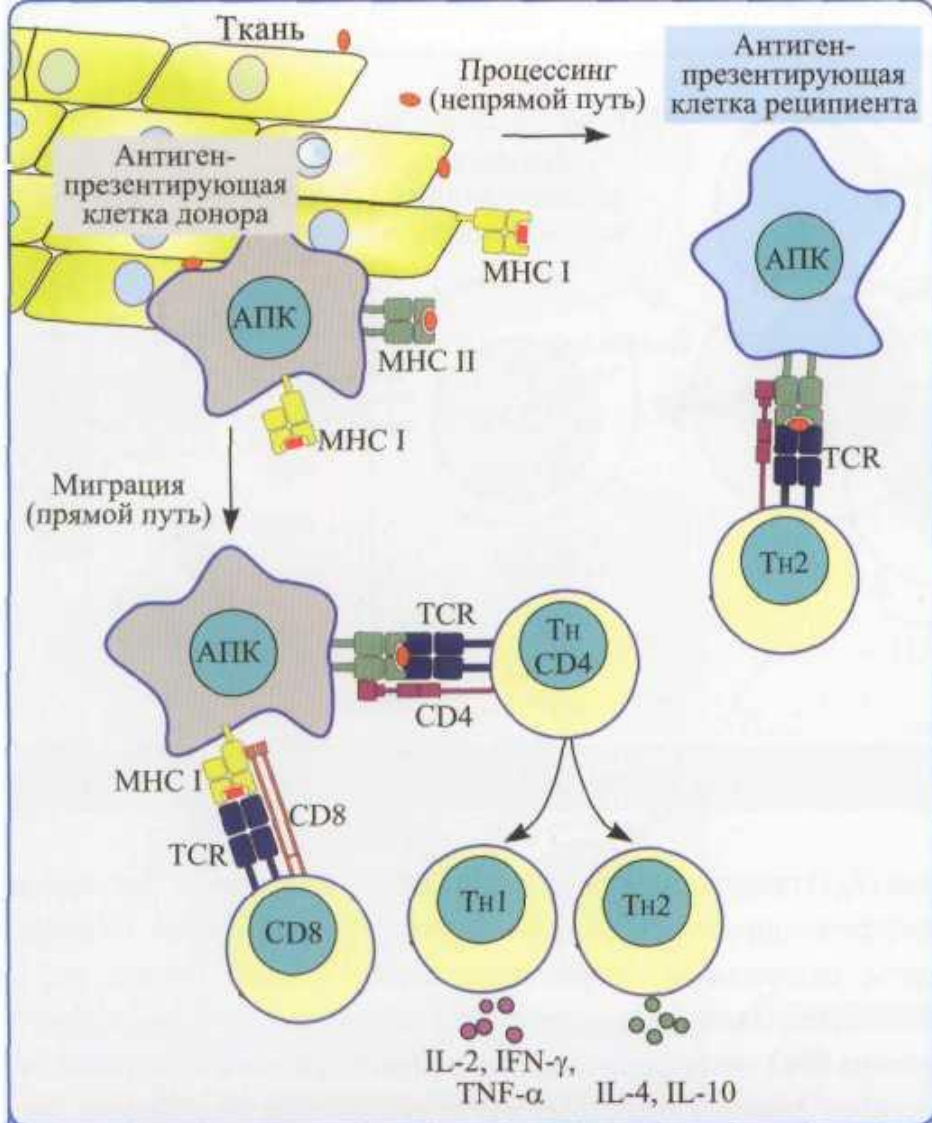


Отторжение трансплантата

- Распознавание чужеродных антигенов МНС происходит одним из трех способов:
 - 1) непосредственное **распознавание молекул МНС донора Т-клетками**; форма распознавания, при которой не образуется комплекс чужеродного пептида с молекулами I или II классов МНС; около 10% Т-клеток из общей популяции Т-лимфоцитов способно к такому распознаванию;
 - 2) **распознавание Т-клеточными рецепторами донорского пептида, комплексированного с молекулами МНС того же донора**;
 - 3) классическая форма **распознавания донорского пептида, комплексированного с молекулами МНС реципиента**.

Иммунологические компоненты отторжения





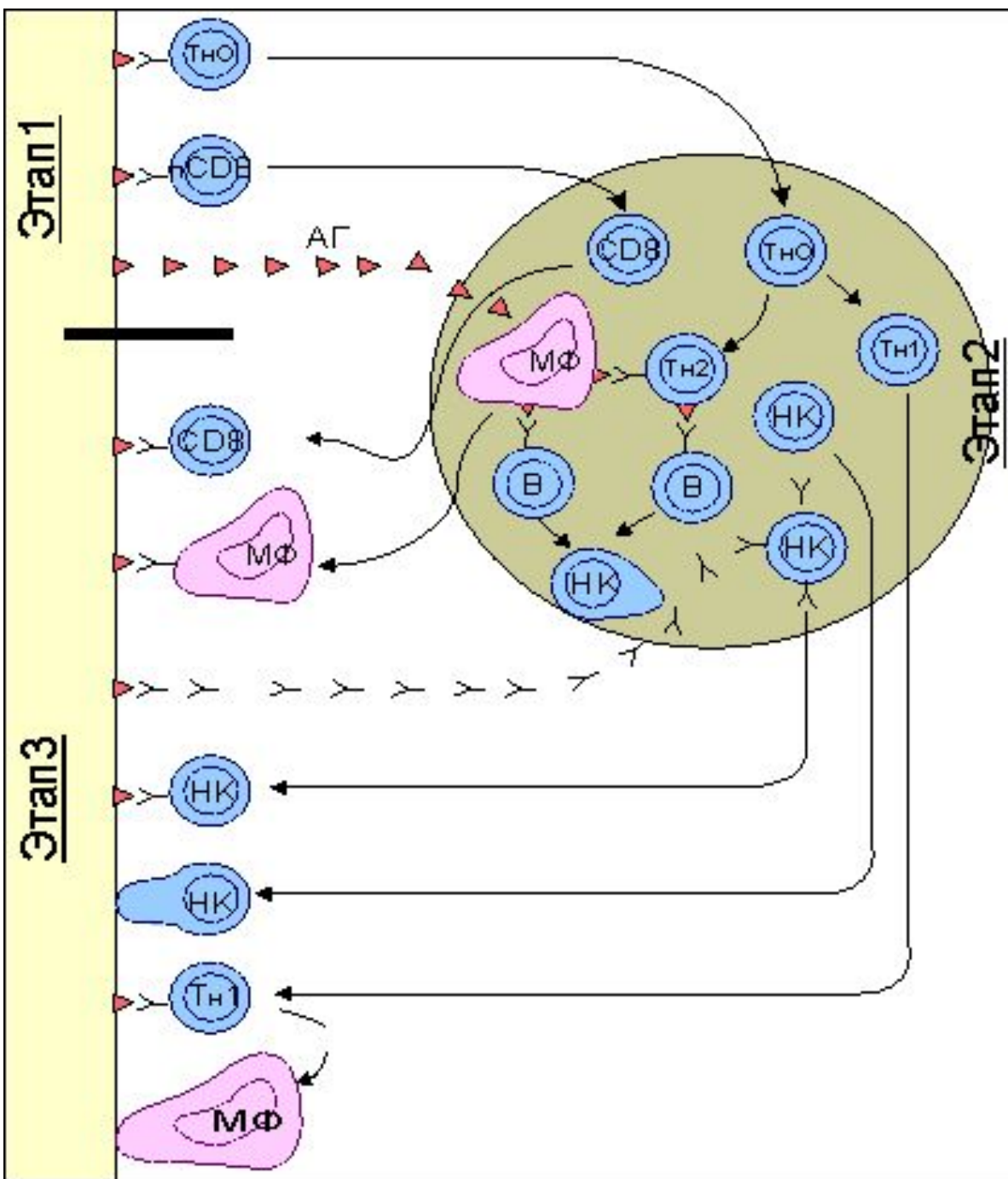
Трансплантационный иммунитет

Рис. 7.38. Трансплантационный иммунитет. Слева — прямое распознавание аллоантигенов, а справа — не прямое. Антигенпрезентирующие клетки (АПК) донора мигрируют в лимфатический узел, стимулируя аллореактивные Т-лимфоциты реципиента; АПК реципиента процессируют и представляют антигены донора Т-лимфоцитам реципиента

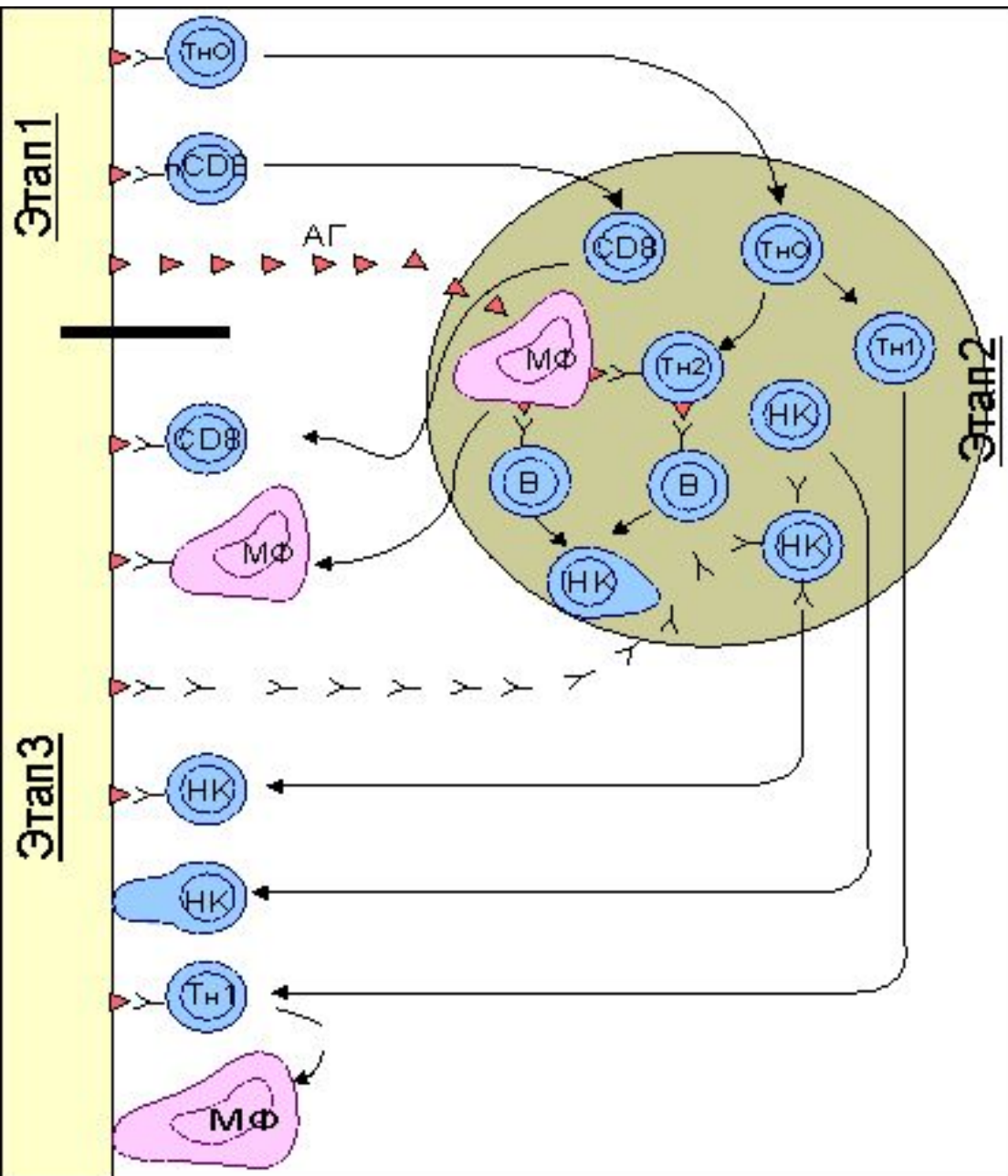
Реакция отторжения трансплантата

Реакция включает три этапа:

На **этапе I** происходит распознавание антигенов трансплантата предшественниками цитотоксических Т-лимфоцитов (ТCD8) и предшественниками хелперных и воспалительных Т-клеток (ТН0). После распознавания клетки мигрируют в ближайшую (региональную) лимфоидную ткань.

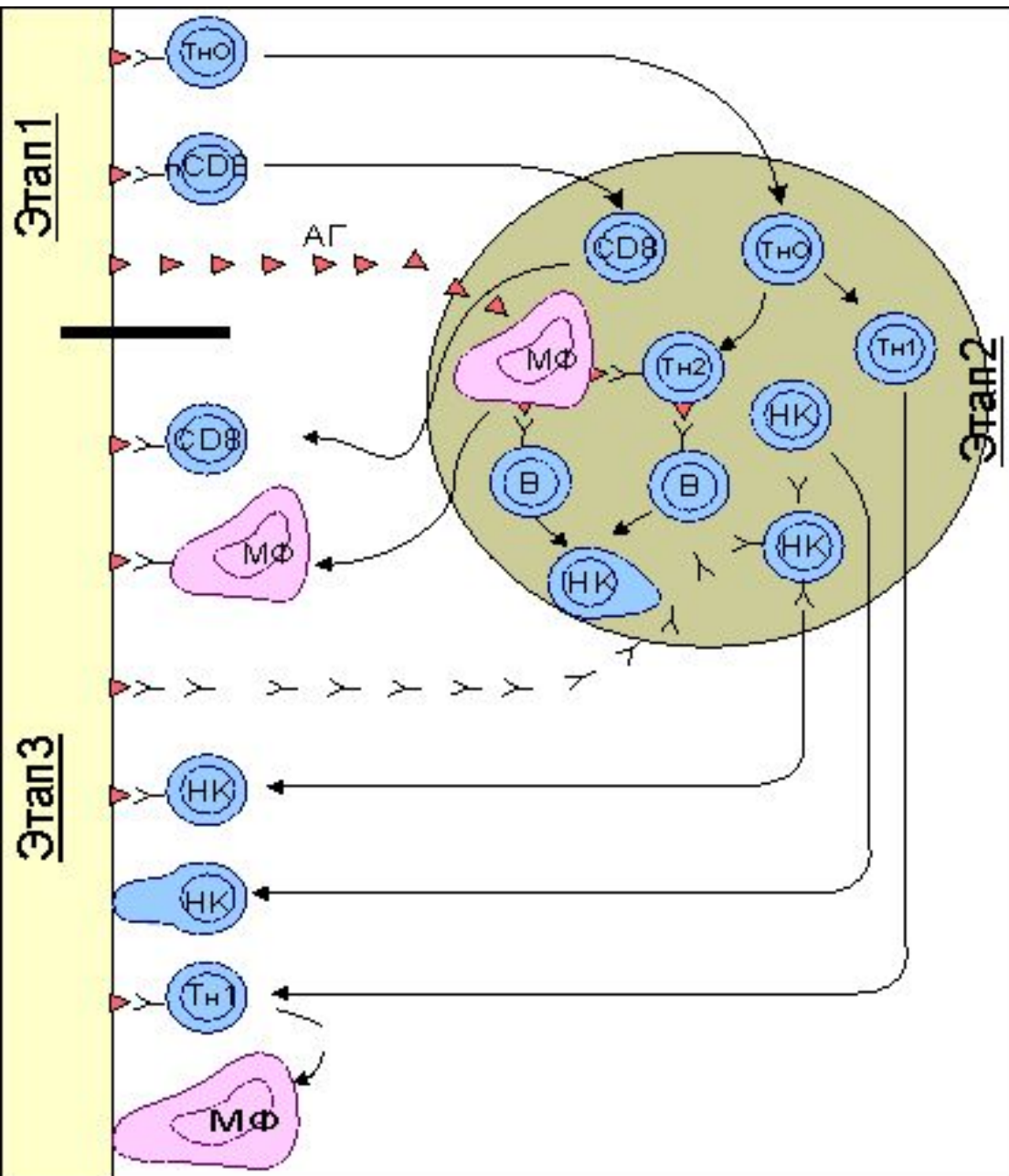


Реакция отторжения трансплантата



- В периферической лимфоидной ткани развиваются основные события, приводящие к формированию эффекторов реакции отторжения (этап II).
- ТCD8 трансформируются в эффекторные зрелые цитотоксические Т-клетки (CD8).
- Свободные трансплантационные антигены, поступающие в лимфоидную ткань, захватываются АПК (макрофаги - МФ) и подключают к ответу как ТН1-, так и ТН2-клетки.

Реакция отторжения трансплантата

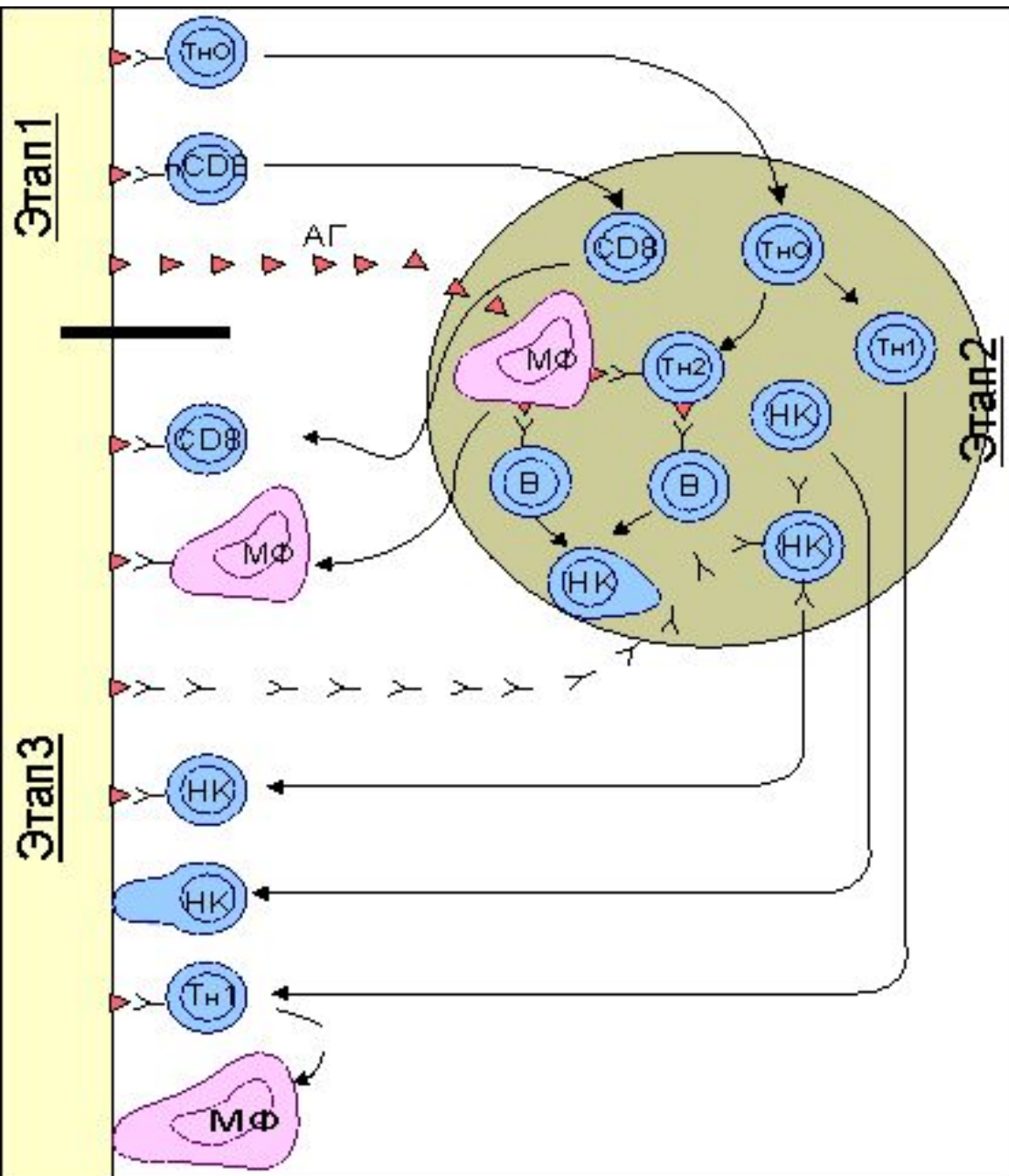


• При совместном участии АПК, В-клеток и Th2 формируется гуморальный иммунный ответ, являющийся дополнительным звеном отторжения.

• Происходит сорбция секретируемых антител на поверхности натуральных киллеров (НК), а также активация макрофагов либо под воздействием цитокинов Т-клеток, либо в результате сорбции антител.

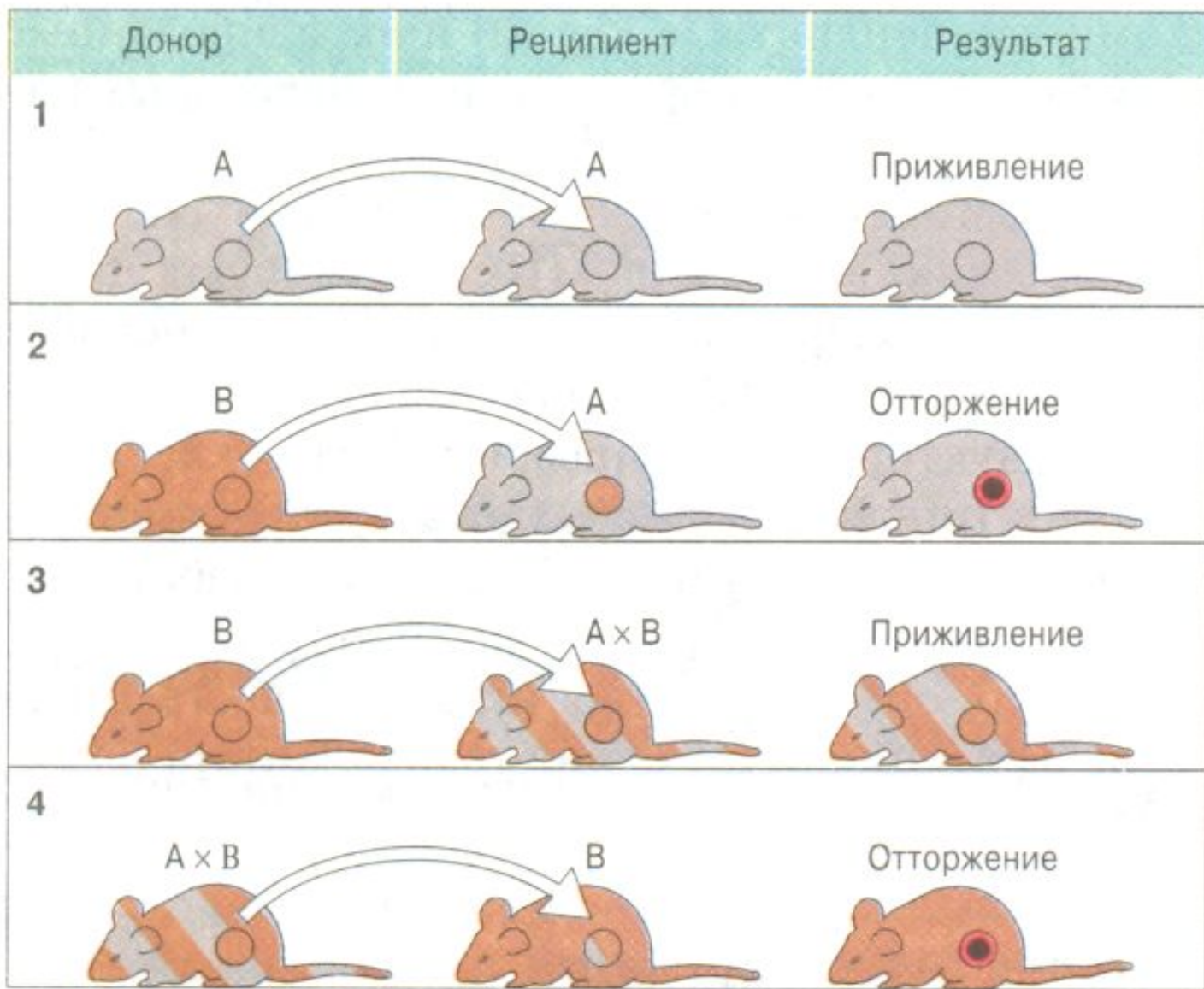
Активируются также и НК-клетки под воздействием цитокинов Т-лимфоцитов.

Реакция отторжения трансплантата



- На **этапе III** развиваются реакции отторжения чужеродной ткани. Отторжение реализуется при участии зрелых CD8 Т-клеток, активированных Ig макрофагов, Ат при участии С, НК, Ig и активированными цитокинами.
- При участии Th1 в зону отторжения привлекаются макрофаги, обеспечивающие воспалительный компонент реакции отторжения.

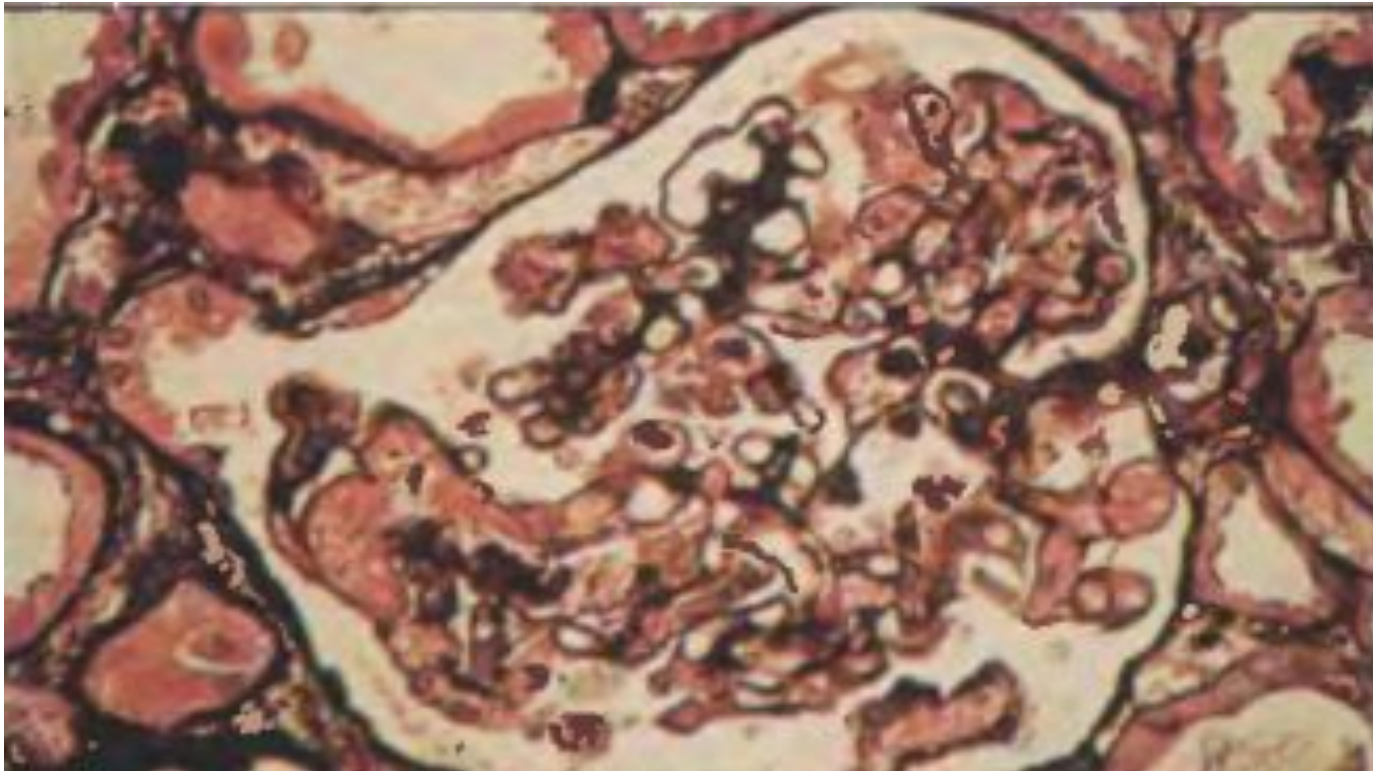
Реакция «хозяин против трансплантата»



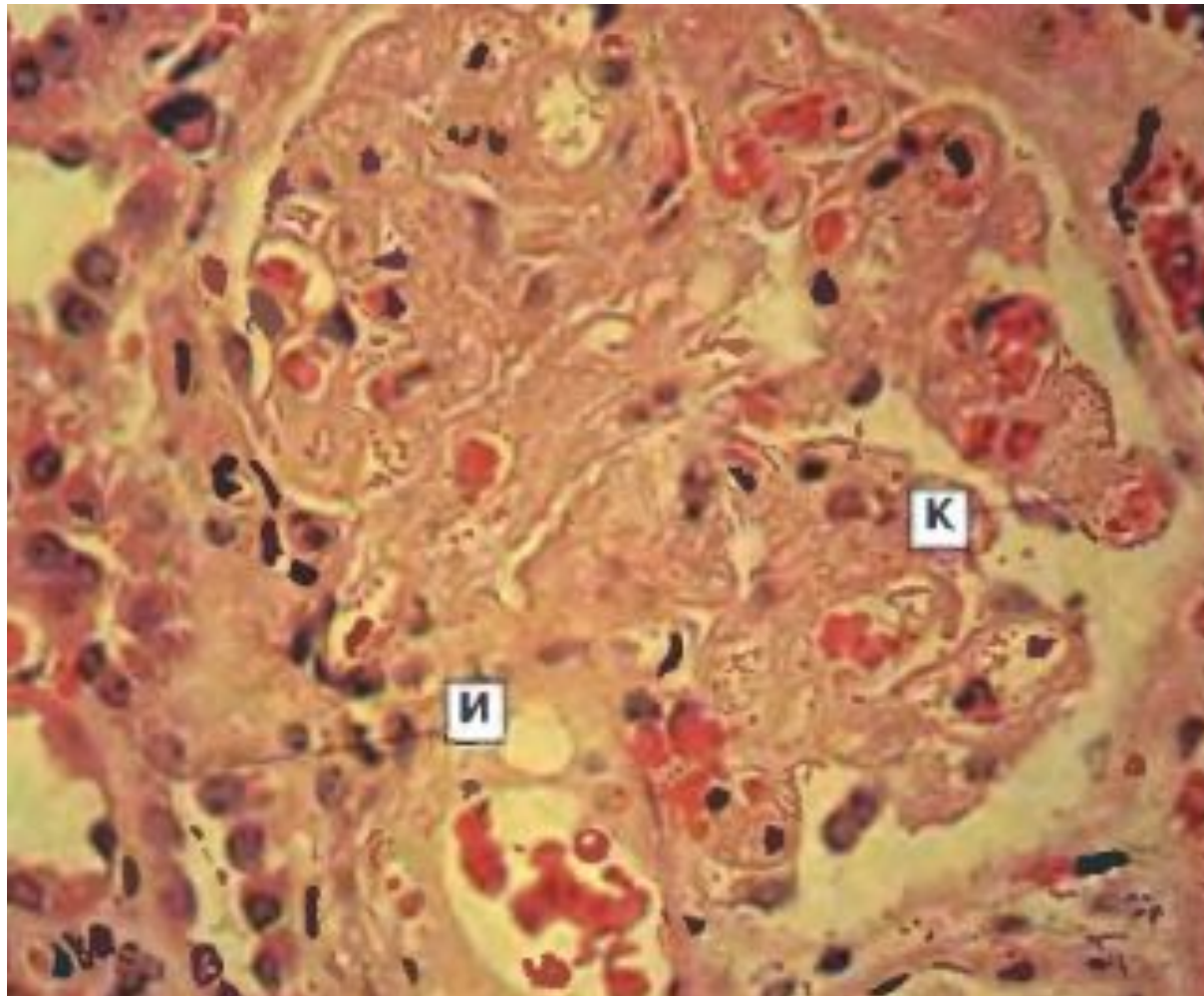
Вис 27.6

Динамика отторжения:

- **Сверхострое**- происходит уже через минуты, часы. Наблюдается у лиц имеющих Ат против трансплантата.

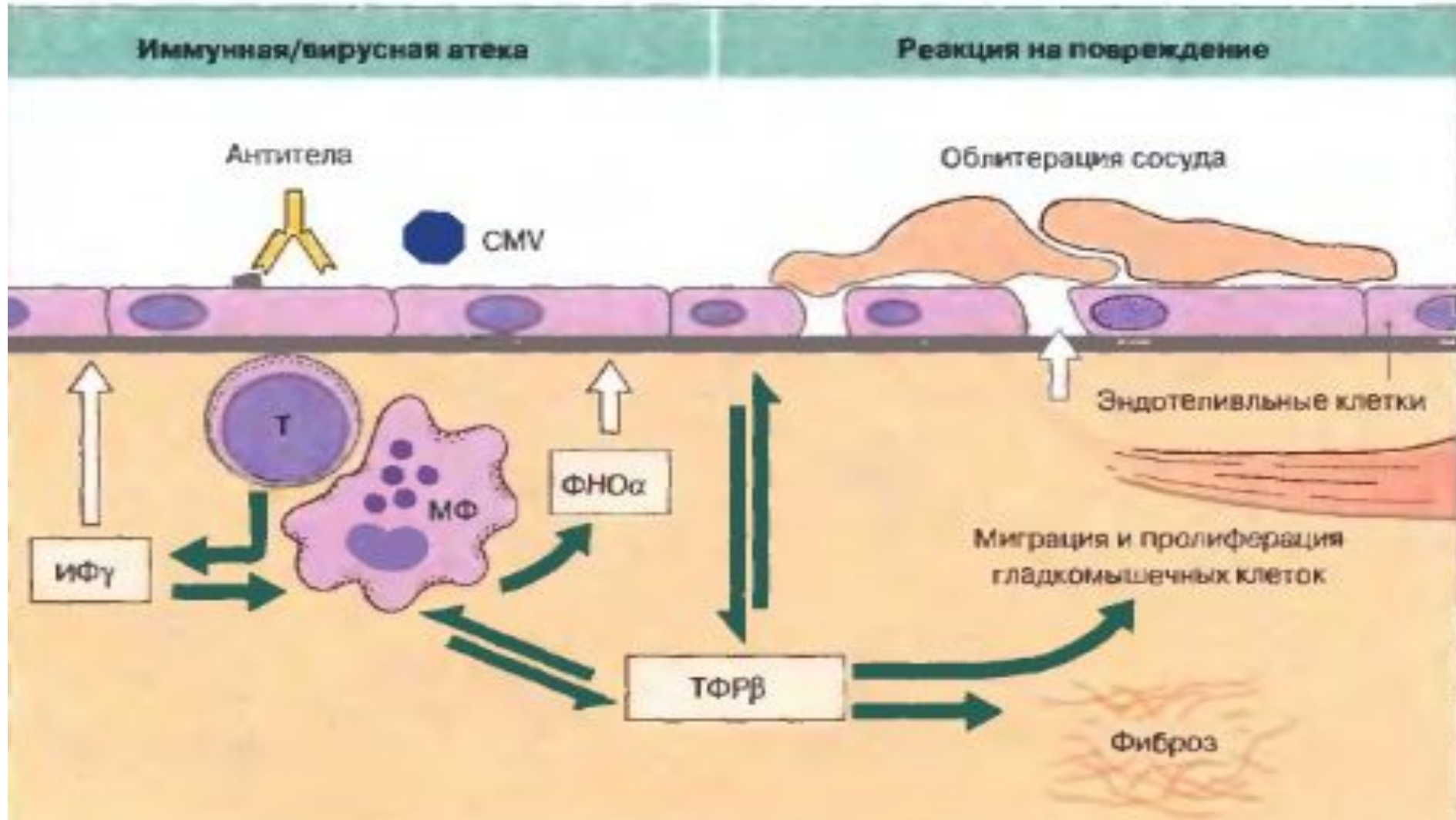


- **Острое**- спустя несколько суток, месяцев. За счёт первичной активации Т-клеток.



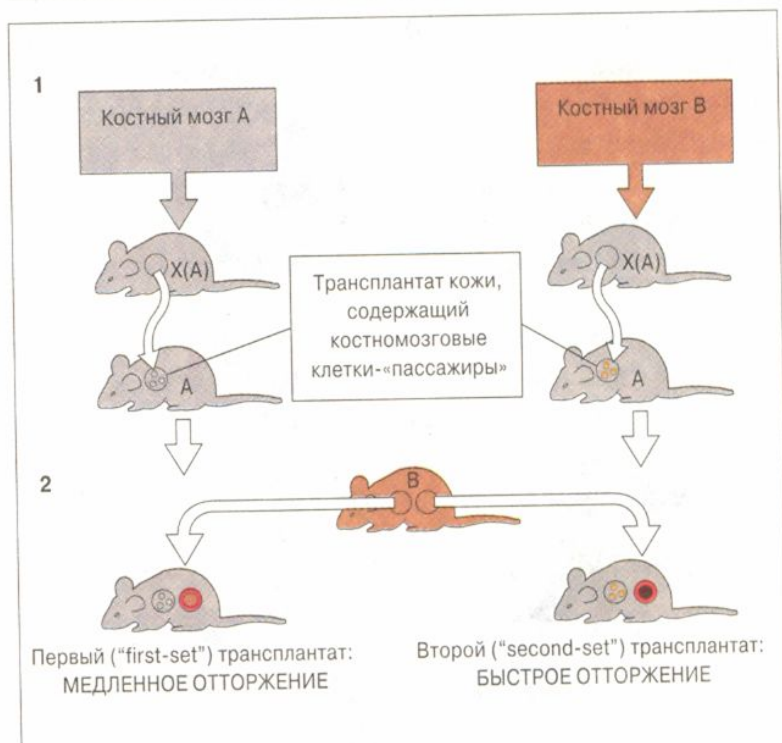
- **Хроническое** - месяцы, годы. Причины до конца неясны.

Иммунологические механизмы хронического отторжения трансплантата

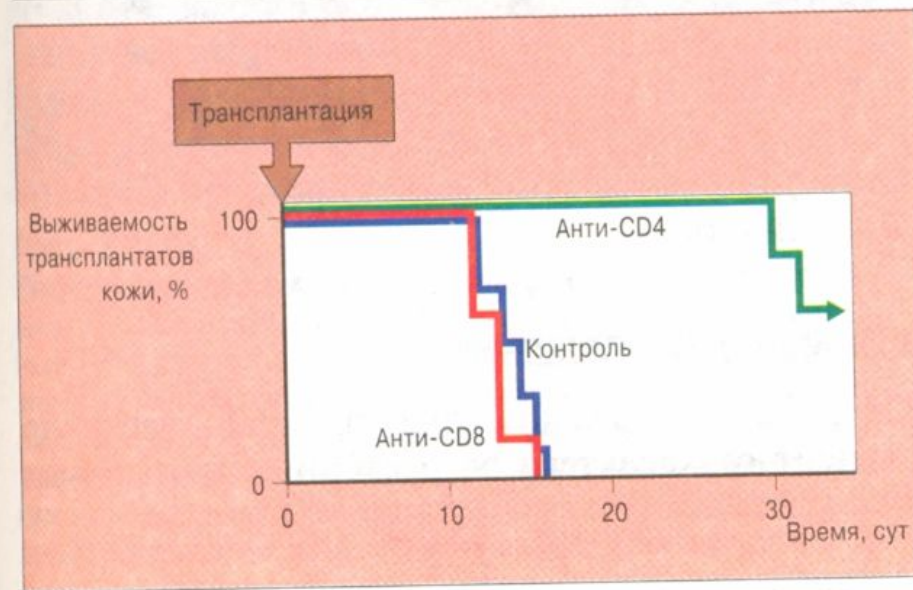


Реакция отторжения трансплантата

Роль клеток-«пассажиров» в деструкции трансплантата



Роль Т-клеток в отторжении трансплантата



Клетки костного мозга в 1-ом трансплантате в качестве клеток – «пассажиров», премировали реципиента к аллоантигенам B

Фазы РОТ (реакция отторжения трансплантата)

- **Лимфоидная инфильтрация**
- **Деструкция клеток трансплантата, иммунное воспаление, тромбоз кровеносных сосудов, нарушение питания трансплантата и его гибель.**
- **Острое отторжение**
- **Отсроченное отторжение**
- **Сверхострое отторжение или криз отторжения.**

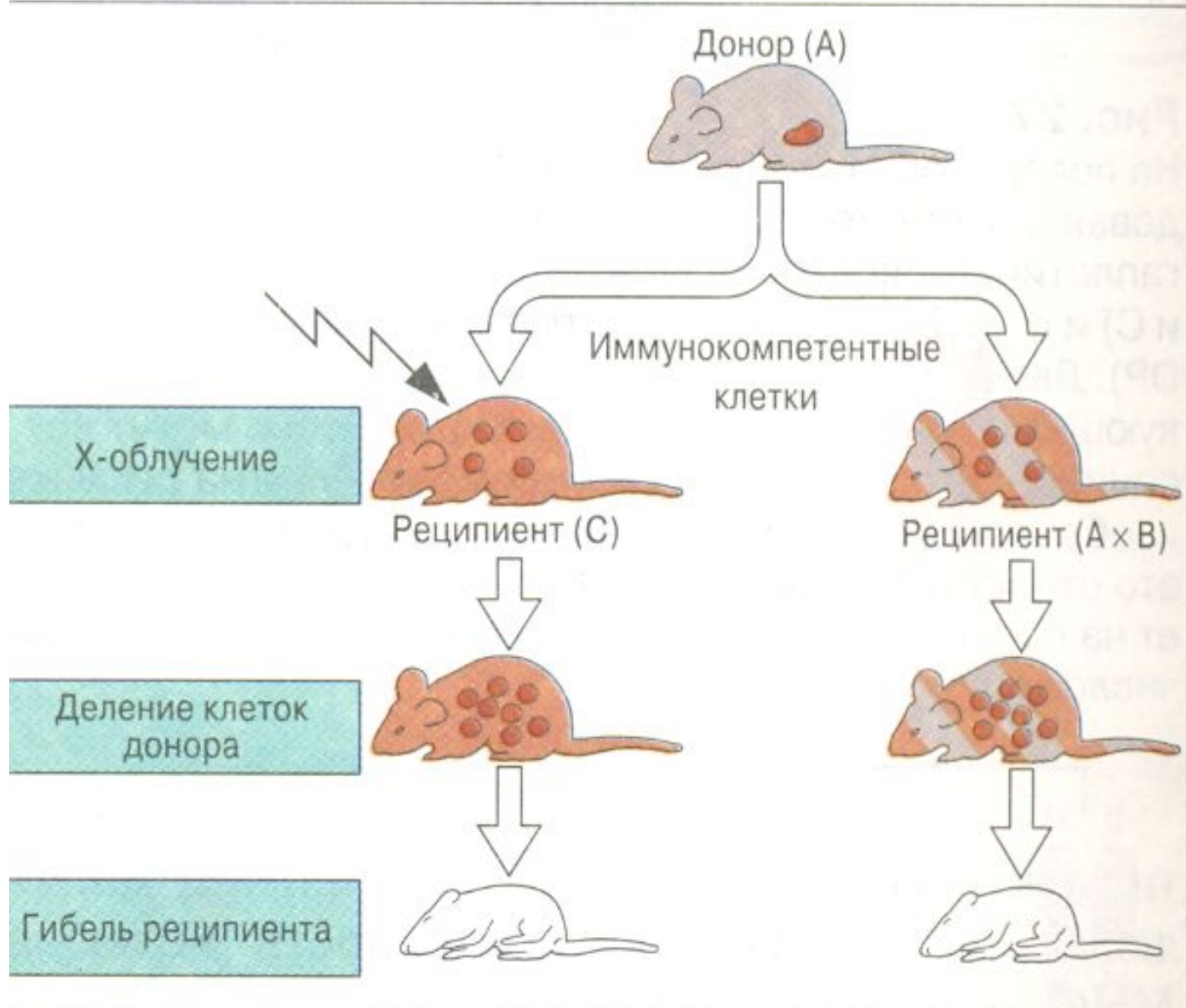
Трансплантационный иммунитет

- Антигены гистосовместимости HLA – антигены I класса (A,B,C)
- Реакция отторжения трансплантата (Т-цитотоксические киллеры и антитела)
- Ат-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
- Ат –опосредованный цитолиз трансплантата (гемагглютинины, гемолизины, лейкотоксины, цитотоксины)

Болезнь «трансплантат против хозяина»

- Донорские лимфоциты распознают чужеродные им антигены реципиента и запускают против них иммунный ответ, в котором участвуют лимфоциты CD4 и лимфоциты CD8. Донорские лимфоциты распознают чужеродные им антигены реципиента и запускают против них иммунный ответ, в котором участвуют лимфоциты CD4 , лимфоциты CD8 и НК-лимфоциты.
- Полагают, что при *острой реакции* "трансплантат против хозяина" активированные лимфоциты разрушают ткани, секретирова цитокины. "трансплантат против хозяина" активированные лимфоциты разрушают ткани, секретирова

Реакция «трансплантат против хозяина»



Болезнь «трансплантат против хозяина»

- *Тяжелая острая реакция "трансплантат против хозяина"* реакция "трансплантат против хозяина" сопровождается иммунодефицитом и склонностью к инфекциям.
- *Легкая **острая** реакция* "трансплантат против хозяина", как ни странно, приносит пользу - за счет реакции "трансплантат против опухоли".

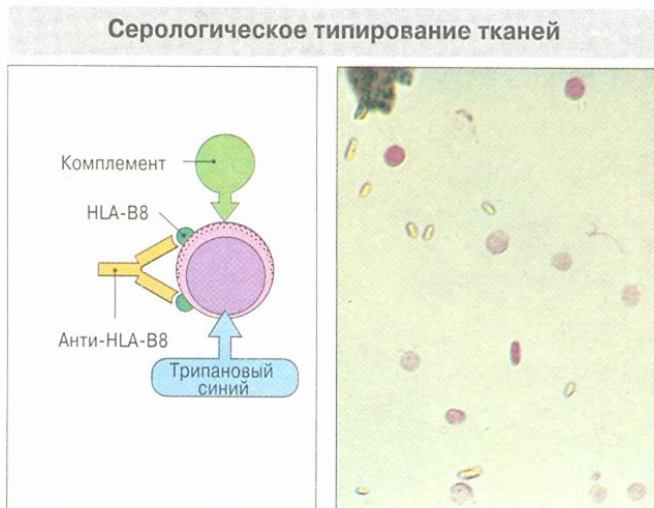
Болезнь «трансплантат против хозяина»

- **Хроническая реакция** "трансплантат против хозяина" развивается через 3 мес. и более после трансплантации и проявляется высыпаниями по типу красного плоского лишая на коже "трансплантат против хозяина" развивается через 3 мес. и более после трансплантации и проявляется высыпаниями по типу красного плоского лишая на коже, высыпаниями по типу красного плоского лишая на слизистой рта "трансплантат против хозяина" развивается через 3 мес. и более после трансплантации и проявляется высыпаниями по типу красного плоского

Болезнь «трансплантат против хозяина»

- Болезнь запускается Т-лимфоцитами донора, распознающими антигены малых комплексов гистосовместимости реципиента.
- Обнаруживаются аутореактивные донорские Т-лимфоциты, распознающие общие для донора и реципиента антигены.
- Активированные Т-лимфоциты Активированные Т-лимфоциты секретируют ряд цитокинов Активированные Т-лимфоциты секретируют ряд цитокинов, из которых важнейшим для развития болезни считается ИЛ-4 Активированные Т-лимфоциты секретируют ряд цитокинов, из которых важнейшим для развития болезни считается ИЛ-4. Болезнь лечится иммунодепрессантами.
- Наибольшую угрозу для жизни представляют оппортунистические инфекции Наибольшую угрозу для жизни представляют оппортунистические инфекции, связанные как с системными

Методы диагностики



- 1) **Серологические методы определения**
- Основной серологический метод типирования антигенов HLA - **лимфоцитотоксический тест**. Метод заключается в следующем:
 - К сывороткам против разных антигенов HLA добавляют по 2000 исследуемых лимфоцитов.
 - После инкубации добавляют комплемент (его источником может служить кроличья сыворотка).
 - Лимфоциты, несущие антиген, против которого направлена сыворотка, под действием комплемента разрушаются.
 - Затем к лимфоцитам добавляют краситель, который окрашивает только живые клетки. Результат оценивают по относительному числу погибших лимфоцитов.

Методы диагностики

- Недостатки серологических методов типирования антигенов HLA - для типирования антигенов класса I необходимо не менее 15 мл, а для типирования антигенов класса II - не менее 30 мл крови.
- Жизнеспособность выделенных лимфоцитов должна составлять не менее 80%. Загрязнение, длительное и неправильное хранение приводят к снижению качества сывороток и комплемента, используемых для исследования.
- Получение диагностических сывороток - трудоемкий и дорогостоящий процесс. Он сводится к исследованию большого количества проб сывороток от многорожавших женщин с помощью панелей лимфоцитов, типированных по антигенам HLA. Наименее доступны сыворотки к антигенам HLA класса II, особенно к антигенам HLA-DP.

Методы диагностики

- **2) Молекулярно-генетические методы определения**
- Эти методы основаны на исследовании **ДНК**. Они лишены недостатков серологических методов. Генетическое типирование стало возможным после расшифровки нуклеотидной последовательности генов HLA и выявления различий между аллелями этих генов. В настоящее время молекулярно-генетические методы используются только для типирования генов HLA класса II.
- Метод основан на способности бактериальных эндонуклеаз расщеплять ДНК в тех участках, в которых сосредоточены специфические для определенной эндонуклеазы последовательности нуклеотидов - **сайты рестрикции**. Сайты рестрикции для данной эндонуклеазы в разных аллелях одного гена располагаются на разном расстоянии друг от друга, поэтому длина рестрикционных фрагментов у разных аллелей разная. Применение эндонуклеаз позволило выявить полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК, подобный полиморфизму HLA, определяемому серологически.

Методы диагностики

- **Метод состоит в следующем. Фрагменты ДНК, полученные после ее обработки эндонуклеазами, разделяют с помощью электрофореза в геле. После этого их переносят на нитроцеллюлозную мембрану и инкубируют с мечеными фрагментами ДНК, комплементарными уникальным нуклеотидным последовательностям какого-либо аллеля гена HLA.**
- **Затем с помощью автордиографии выявляют фрагменты, с которыми связались меченые фрагменты ДНК, и их длину, которую вычисляют по длине пробега фрагментов ДНК в геле. По длине фрагментов судят о присутствии тех или иных аллелей HLA у исследуемого. Если у донора и реципиента выявляются фрагменты одинаковой длины, считается, что они несут один и тот же аллель HLA.**

Методы диагностики

- Недостатки метода:
- - большие затраты времени (обычно 2-3 нед.);
- - невозможность различить аллели, сайты рестрикции в которых расположены в одних и тех же участках;
- - большое количество клеток для исследования (для получения достаточного количества ДНК необходимо по крайней мере 10-15 млн. клеток);
- - отсутствие эндонуклеаз, специфичных для определенных аллелей.

Методы диагностики

- **Полимеразная цепная реакция** - метод, предназначенный для получения большого количества копий фрагментов ДНК с определенной нуклеотидной последовательностью. Основное достоинство метода - высокая чувствительность, он позволяет создать множество копий фрагмента ДНК при минимальном исходном ее количестве. Реакция включает следующие стадии:
 - - **денатурация ДНК с получением двух однонитевых фрагментов**;
 - - **гибридизация олигонуклеотидов с 5'-концевыми участками этих фрагментов**;
 - - **синтез** комплементарной последовательности нуклеотидов.
- Реакцию проводят циклично, последовательно повторяя все ее стадии до получения достаточного количества копий исходного фрагмента ДНК.

Полимеразная цепная реакция

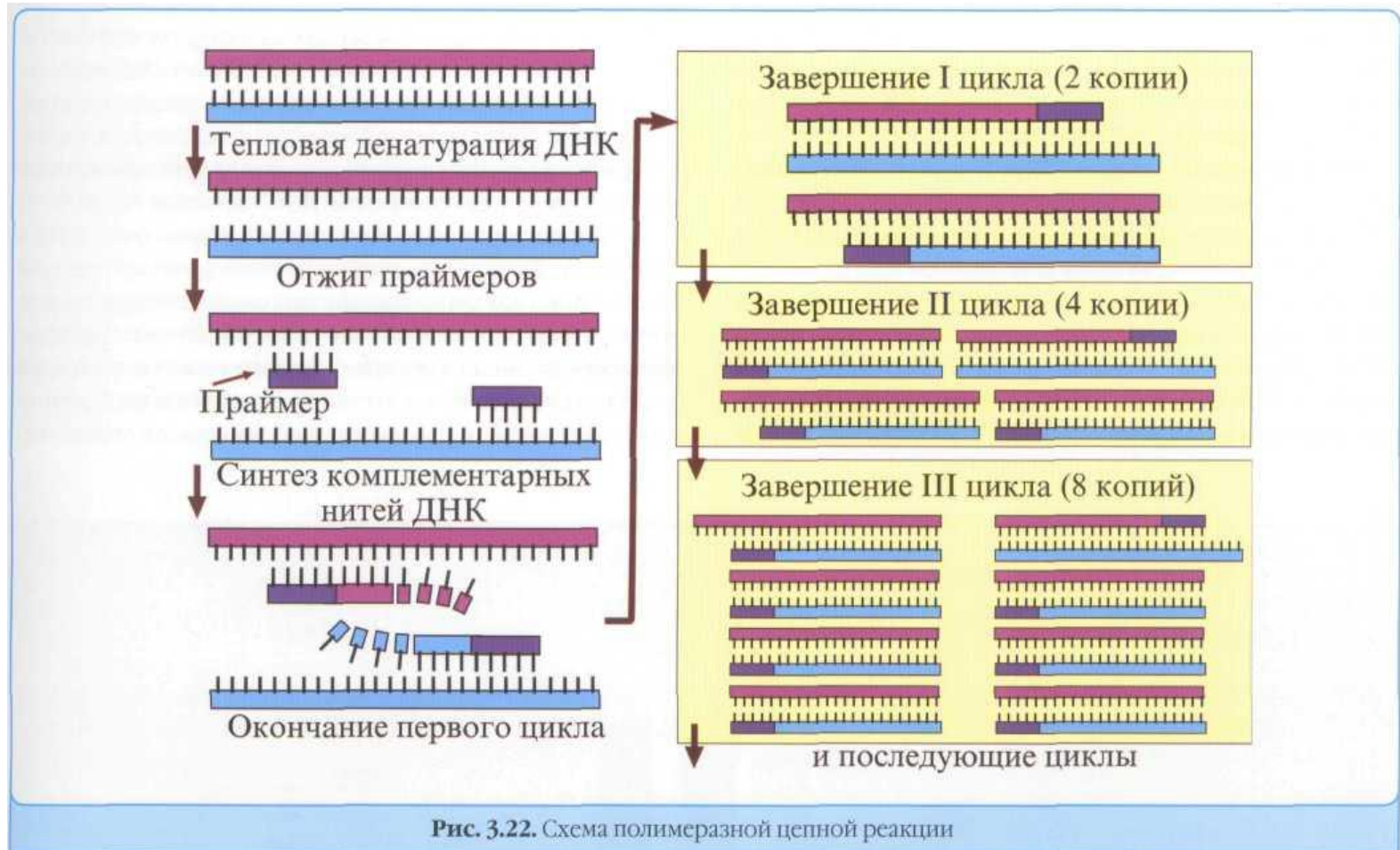


Рис. 3.22. Схема полимеразной цепной реакции

Методы диагностики

Клеточные методы определения

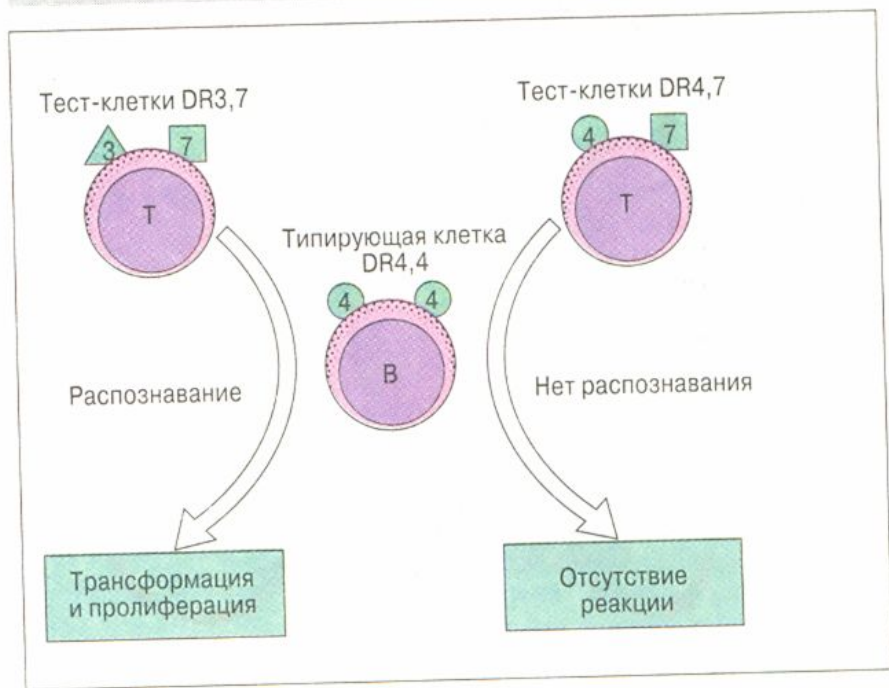
- После распознавания чужеродного антигена начинается пролиферация Т-лимфоцитов. Этот процесс можно воспроизвести *in vitro* в смешанной культуре лимфоцитов, состоящей из лимфоцитов донора и реципиента. Если донор и реципиент несут разные антигены HLA класса II, в смешанной культуре отмечается пролиферация.
- Чтобы оценить иммунный ответ лимфоцитов только одного из исследуемых (отвечающих клеток), лимфоциты другого (стимулирующие клетки) инактивируют облучением или митомицином.
- Смешанная культура лимфоцитов позволяет выявить различия по антигенам HLA, которые нельзя обнаружить серологическими методами, например различия по антигенам HLA-DP и HLA-DQ.

Методы диагностики

- **Смешанная культура лимфоцитов.** Равное количество лимфоцитов донора и реципиента смешивают и инкубируют в течение 5 суток при температуре 37°C, затем добавляют 3H-тимидин, который встраивается в ДНК пролиферирующих клеток. В присутствии 3H-тимидина лимфоциты инкубируют еще 1 сутки, после чего определяют радиоактивность отвечающих клеток.
- В качестве отрицательного контроля используются культуры, состоящие только из отвечающих клеток, в качестве положительного - культура отвечающих клеток, стимулированных смесью лимфоцитов от разных доноров.
- Если радиоактивность в смешанной культуре превышает радиоактивность в отрицательном контроле не более чем на 20% или составляет не более 20% от радиоактивности в положительном контроле, считают, что донор и реципиент совместимы по антигенам HLA класса II.

Методы диагностики

Типирование тканей при помощи реакции смешанной культуры лимфоцитов



- Для определения одновременно 3 антигенов HLA класса II (HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP) с помощью смешанной культуры лимфоцитов в качестве стимулирующих клеток используют лимфоциты, несущие известные антигены HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR от гомозиготных по ним доноров.
- Обычно эти доноры рождаются от близкородственных браков.

Тест стимуляции лимфоцитов

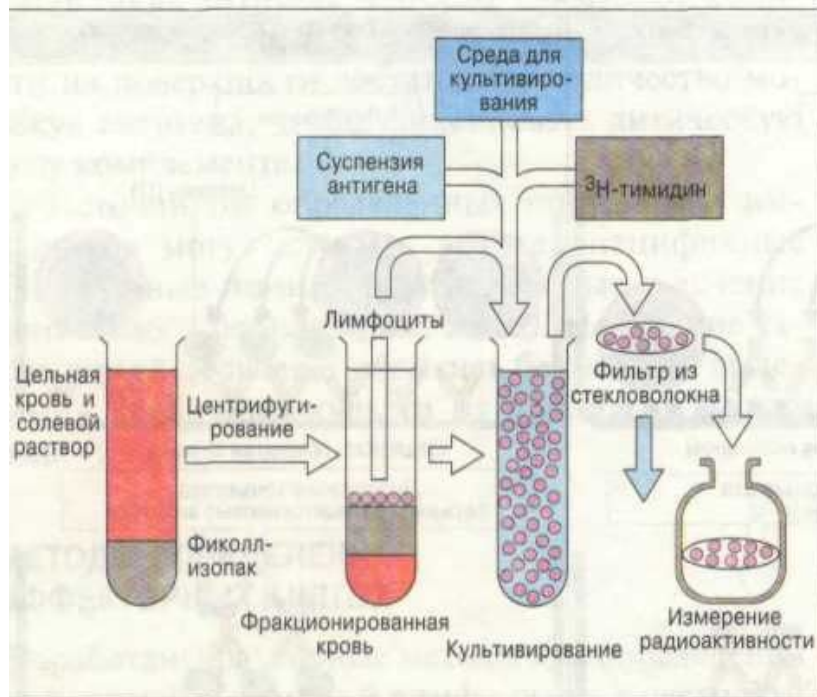


Рис. 29.25

При постановке реакции стимуляции лимфоцитов цельную кровь, разведенную соевым раствором, наслаивают на фиколл-изопак (плотность которого выше, чем у лимфоцитов, но меньше, чем у лейкоцитов) и центрифугируют (400 g). Таким образом отделяют лимфоциты от других клеток и компонентов сыворотки (см. рис. 29.19). Полученные клетки отмывают от загрязнений (включая антигены) и переносят в тест-пробирки со средой для культивирования, содержащей антиген. За 16 ч до сбора клеток в культуру добавляют ³H-тимидин. Собирают клетки на фильтрах – дисках из стекловолкна – и измеряют радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Высокий уровень радиоактивности свидетельствует о том, что клетки пролиферируют, т. е. отвечают на данный антиген. Эту реакцию используют также для анализа клеток лимфоидных тканей.

Методы диагностики

- ***Реакция клеточной цитотоксичности.*** При совместном культивировании лимфоцитов реципиента (ответающих клеток) и отличающихся от них по антигенам HLA класса II стимулирующих клеток среди ответающих клеток появляются цитотоксические Т-лимфоциты. Они способны разрушать клетки-мишени, несущие антигены, которые присутствуют на стимулирующих клетках.
- Изучение клеточной цитотоксичности в смешанной культуре лимфоцитов в ряде случаев позволяет предсказать, будет трансплантат стимулировать образование цитотоксических Т-лимфоцитов или нет.
- Для этого готовится смешанная культура лимфоцитов, где ответающими клетками служат лимфоциты реципиента, а стимулирующими - инактивированные лимфоциты донора.
- После 6 суток инкубации смешанной культуре лимфоцитов к ответающим клеткам добавляют свежие клетки того же донора, меченные ^{51}Cr .

Цитотоксический тест с высвобождением хрома

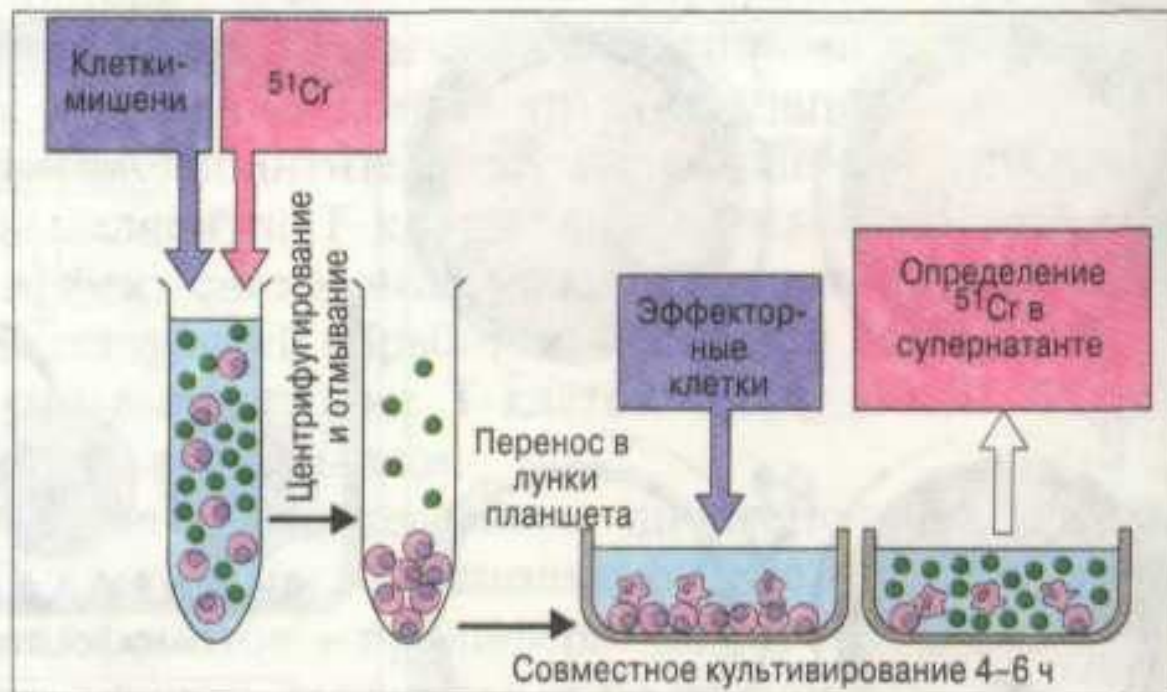


Рис. 29.26

Чтобы определить цитотоксичность эффекторных клеток, инкубируют клетки-мишени с изотопом ^{51}Cr , который проникает внутрь клеток и связывается с белками. По окончании инкубации удаляют свободный ^{51}Cr отмыванием, вносят клетки-мишени в лунки планшета и культивируют совместно с эффекторными клетками в течение 4–16 ч, после чего определяют в культуральной жидкости количество хрома, вышедшего в среду в результате лизирования клеток-мишеней эффекторными клетками.

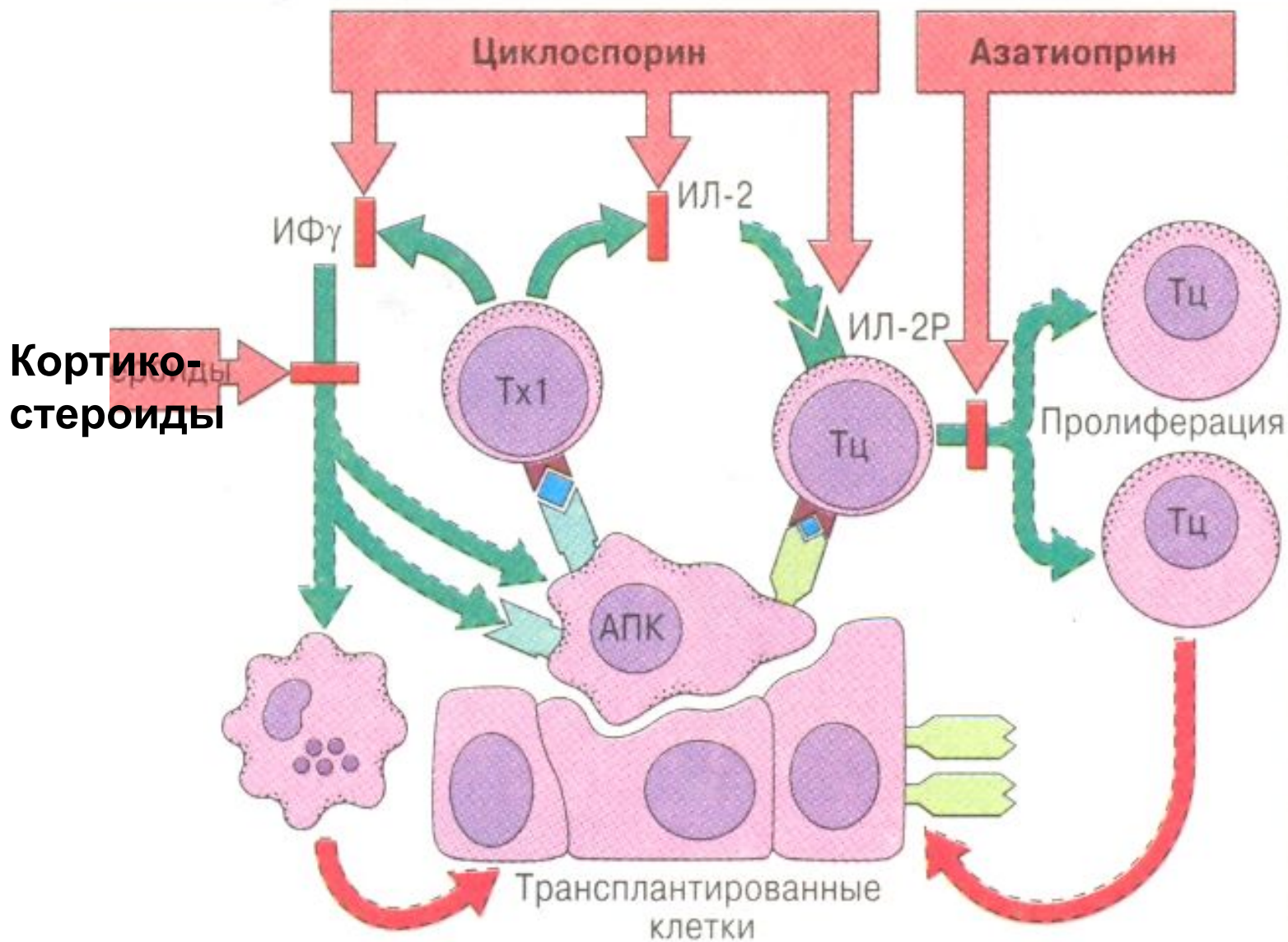
Методы диагностики

- Клетки реципиента и меченые клетки донора смешиваются в соотношениях 100:1, 50:1 и 10:1. После инкубации в течение 4 ч отбирают надосадочную жидкость и измеряют в ней содержание радиоактивной метки, вышедшей из разрушенных клеток донора.
- Отрицательным контролем служат меченые клетки донора.
- Метод можно использовать как до, так и после трансплантации. В последнем случае повышение активности цитотоксических Т-лимфоцитов свидетельствует об отторжении трансплантата.
- Основной недостаток методов, основанных на смешанной культуре лимфоцитов, - большие затраты времени (около недели). С помощью реакции клеточной цитотоксичности предсказать отторжение трансплантата можно далеко не во всех случаях, поэтому этот метод не получил широкого распространения.

Иммуносупрессивная терапия

- **Иммунодепрессивные препараты (иммуносупрессоры, иммунодепрессанты): азатиоприн, антилимфолин-Кр, батриден, кризанол, циклоспорин, ауранофин, глюкокортикоиды, микофеноловая кислота и др.**

Лекарственная иммуносупрессия



Иммуносупрессивная терапия

- **Циклоспорин** - один из новых, но уже нашедших широкое применение иммунодепрессантов. Его назначают до, во время и после трансплантации. Препарат **ингибирует синтез интерлейкина-2**, подавляя таким образом, **пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов**. В высоких дозах циклоспорин обладает нефротоксическим действием, а при длительном применении вызывает **пневмоклероз**.
- Несмотря на это, по сравнению с комбинацией **преднизолона** и **азатиоприна** циклоспорин снижает отторжение **трансплантированной почки** в течение 1-го года на 10-15%. Отторжение трансплантатов в течение 1-го года при применении циклоспорина составляет 10-20%. На отторжение трансплантата в более

Иммуносупрессивная терапия

- **Такролимус** Такролимус по механизму действия сходен с **циклоспорином**, не отличается от него по химическому строению. Такролимус **угнетает активацию и пролиферацию цитотоксических Т-лимфоцитов** за счет подавления продукции ИЛ-2 и ИФ- γ . Препарат эффективен в более низких дозах, чем циклоспорин, однако также обладает нефротоксическим действием, поэтому пока не получил широкого распространения. Такролимус высокоэффективен при остром и хроническом отторжении после **трансплантации печени**. Такролимус в большей степени, чем циклоспорин, отдалляет отторжение трансплантата и повышает выживаемость больных. Назначение такролимуса позволяет снизить дозу кортикостероидов, а иногда и полностью отменить их.

Иммуносупрессивная терапия

- Муромонаб-CD3 Муромонаб-CD3 - это препарат мышинных моноклональных антител к CD3 Муромонаб-CD3 - это препарат мышинных моноклональных антител к CD3 , тесно связанному с антигенраспознающим рецептором Т-лимфоцитов человека.
- После связывания с антителом CD3 на время **исчезает с поверхности Т-лимфоцитов**, что делает невозможной их активацию. Спустя некоторое время CD3 вновь появляется на поверхности Т-лимфоцитов, однако остается блокированным муромонабом-CD3.
- Препарат применяется при отторжении трансплантата в тех случаях, когда неэффективны кортикостероиды. Он значительно снижает число лимфоцитов CD3 в крови и подавляет реакцию отторжения трансплантата. Муромонаб-CD3 применяется как для профилактики, так и для лечения отторжения трансплантата.

Иммуносупрессивная терапия

- Муромонаб-CD3 Муромонаб-CD3 обладает серьезными побочными действиями: он может вызвать отек легких Муромонаб-CD3 обладает серьезными побочными действиями: он может вызвать отек легких и неврологические нарушения.
- У некоторых больных в сыворотке появляются антитела к препарату.
- Для оценки эффективности лечения измеряют число лимфоцитов CD3 в крови. Если трансплантат отторгается повторно, применение муромонаба-CD3 возобновляют только в отсутствии признаков иммунизации,

Иммуносупрессивная терапия

- Поликлональные антитела к лимфоцитам Поликлональные антитела к лимфоцитам, такие, как антилимфоцитарный иммуноглобулин Поликлональные антитела к лимфоцитам, такие, как антилимфоцитарный иммуноглобулин и антитимоцитарный иммуноглобулин, получают из сыворотки кроликов и других животных после иммунизации лимфоцитами или клетками тимуса человека.
- Механизм действия поликлональных антител заключается в разрушении лимфоцитов и снижении их числа в крови.
- Эти препараты применяются как с профилактической, так и с лечебной целью. Антилимфоцитарный и антитимоцитарный

Иммуносупрессивная терапия

- Возможны другие осложнения, например тромбоцитопения, связанные с присутствием в препаратах антител разной специфичности.
- Лечение данными препаратами может быть причиной ложноположительного результата лимфоцитотоксического теста.
- Поскольку экзогенные антитела затрудняют выявление собственных антител реципиента к антигенам донора, во время лечения антилимфоцитарным иммуноглобулином это исследование не проводят
- Активность антилимфоцитарного иммуноглобулина, как и других препаратов биологического происхождения, нестабильна.

Иммуносупрессивная терапия

- Важный компонент иммуносупрессивной терапии - глюкокортикоиды Важный компонент иммуносупрессивной терапии - глюкокортикоиды. Лучше использовать преднизолон Важный компонент иммуносупрессивной терапии - глюкокортикоиды. Лучше использовать преднизолон, потому что его побочные и терапевтические эффекты проще отслеживать, а в высоких дозах он эффективен при отторжении трансплантата. Из-за побочных эффектов глюкокортикоидов, особенно плохого заживления ран и повышенной восприимчивости к инфекциям, в раннем послеоперационном периоде дозу лучше снижать как можно быстрее.
- Действие глюкокортикоидов Действие глюкокортикоидов объясняется в основном подавлением продукции ИЛ-6 Действие глюкокортикоидов объясняется в основном