План:

Антигены и типирование тканей

Механизмы трансплантационного иммунитета

Виды трансплантации

Пересадка органов

Клеточная трансплантация

Стволовые клетки

Антигены HLA и  типирование тканей

Новейшие достижения в  области трансплантологии позволяют  все шире использовать трансплантацию органов и тканей для лечения  разных заболеваний. В последнее  время наряду с трансплантацией  костного мозга, почки, печени и сердца стали применять трансплантацию тонкой кишки, доли и сегментов печени, легкого, костей, поджелудочной железы и клеток панкреатических островков, а также других органов и тканей. Для трансплантации используются как  трупные, так и полученные от живых  доноров органы и ткани. Чаще донорами служат родственники реципиента. После  трансплантации в организме реципиента развивается иммунный ответ на многочисленные антигены трансплантата. Исключение составляют случаи, когда донор и реципиент -- однояйцовые близнецы. Наиболее изученные антигены человека, с которым связан иммунный ответ на трансплантат, -- это антигены HLA (иногда их называют трансплантационными антигенами).

А. Главный комплекс гистосовместимости человека был открыт в 1952 г. при изучении антигенов лейкоцитов. Антигены HLA представляют собой гликопротеиды, находящиеся на поверхности клеток и кодируемые группой тесно сцепленных генов 6-й хромосомы. Выделяют 2 класса антигенов HLA. К классу I относятся антигены A, B и C, а к классу II -- антигены DR, DP и DQ. Антигены класса I присутствуют на поверхности всех ядросодержащих клеток и тромбоцитов, антигены класса II -- на поверхности B-лимфоцитов, активированных T-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и дендритных клеток. Гены HLA обозначаются так же, как антигены HLA, но название гена пишется курсивом, а антигена -- обычным шрифтом. Названия генов и антигенов HLA состоят из одной или нескольких букв и цифр, например A3, B45, DR15, DQ4. Буква обозначает ген, а цифра аллель этого гена, при этом цифровые обозначения присваиваются по мере открытия новых аллелей. Гены HLA обладают высоким полиморфизмом. Серологическими методами (см. гл. 17, п. II.А.1) определено более 100 антигенов HLA (см. табл. 17.1). С помощью молекулярно-генетических методов ежегодно открываются новые аллели генов HLA. Антигены HLA играют важнейшую роль в регуляции иммунного ответа на чужеродные антигены и сами являются сильными антигенами.

Б. Механизмы трансплантационного иммунитета. Иммунный ответ на трансплантат обусловлен в первую очередь распознаванием антигенов HLA донора лимфоцитами реципиента. Это вызывает активацию T-хелперов, которые, в свою очередь, стимулируют пролиферацию B-лимфоцитов и цитотоксических T-лимфоцитов. Антитела к чужеродным антигенам HLA могут присутствовать в сыворотке реципиента и до трансплантации. Их выявление свидетельствует о предшествующей иммунизации антигенами HLA. Она возможна при переливании цельной крови и во время беременности. Выявление в сыворотке реципиента антител к антигенам HLA донора свидетельствует о высоком риске сверхострого отторжения трансплантата. Оно обусловлено образованием комплексов, состоящих из антигенов трансплантата и антител реципиента, которые активируют свертывание крови и приводят к тромбозу сосудов трансплантата. Поскольку отторжение трансплантата вызывают чужеродные антигены HLA, лучший способ его профилактики -- подбор донора, совместимого с реципиентом по антигенам HLA. Если реципиент уже иммунизирован антигенами HLA, донор должен быть полностью совместим с реципиентом.

В. Подбор донора. Подобрать донора, полностью совместимого с реципиентом по антигенам HLA, очень сложно, поскольку число комбинаций, составленных более чем из 100 антигенов этого семейства, чрезвычайно велико. Вероятность найти полностью совместимого донора составляет от 1:1000 до 1:1 000 000 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.

Трансплантология  развивается на основе хирургии, анестезиологии и реанимации, иммунологии, фармакологии, наиболее современных методов диагностики. Благодаря этим достижениям, получили развитие научные методы, позволившие значительно повысить степень биологической совместимости донора и реципиента при трансплантации органов.

     В соответствии с мировой практикой, источником получения донорских  органов, прежде всего, являются умершие, у которых констатирована смерть головного мозга.

     Донорские органы удаляются из организма умершего в процессе сложного хирургического вмешательства, подразумевающего получение  максимально возможного числа трупных  органов, пригодных для пересадки ожидающим трансплантации пациентам (мультиорганное изъятие). В составе мультиорганного изъятия получают сердце, легкие, печень, поджелудочную железу, кишечник, почки. Распределение донорских органов осуществляется региональным центром координации органного донорства в соответствии с общим листом ожидания всех функционирующих в регионе трансплантационных центров на основании показателей индивидуальной совместимости.

     Процедура мультиорганного изъятия органов  отработана мировой трансплантационной практикой. Холодовая перфузия органов консервирующим раствором производится непосредственно в организме умершего, после чего органы изымаются и помещаются в контейнеры, в которых транспортируются в трансплантационные центры. Окончательную подготовку донорских органов к имплантации производят непосредственно в операционной, где находится реципиент.

     Родственная трансплантация стала возможной  благодаря наличию парных органов (почек, легких) и анатомических особенностей некоторых непарных органов человека (печени, поджелудочной железы, тонкого кишечника). Идеологической основой операций у живого донора является сопряжение минимизации донорского риска и получение высококачественного трансплантата. Эти оперативные вмешательства имеют свои особенности: операция проводится у здорового человека; риск развития операционных осложнений влечет за собой угрозу для жизни и здоровья сразу двух людей – донора и реципиента.

     Вероятность возникновения криза отторжения родственного трансплантата весьма мала и может быть спровоцирована лишь самовольной отменой иммунодепрессантов.

     Слово трансплантология происходит от латинского «transplantare» - пересаживать. К началу 20го века создались предпосылки для  выполнения трансплантации органов. Были хорошо изучены анатомия, физиология и доказана возможность их выживания за пределами организма, решена проблема сшивания сосудов, вопросы асептики, антисептики и анестезии.

     Существуют  следующие виды трансплантации:

     Аллотрансплантация - пересадка органов и тканей от одного человека другому по принципу совместимости.

     Аутотрансплантация предполагает пересадку в пределах одного организма.

     Ксенотрансплантация - трансплантация органов, тканей и клеток животных человеку.

     Основными источниками донорских органов  могут быть: умершие, у которых  констатирована смерть мозга, доноры с констатированной биологической смертью, живые лица, состоящие с реципиентом в генетическом родстве Показания к трансплантации специфичны для  того или иного органа. Но противопоказания имеют определенную общность. Они  бывают абсолютные и относительные.

     К абсолютным противопоказаниям относят: не поддающиеся медикаментозному лечению нарушения функций жизненно важных органов; наличие инфекционных процессов, туберкулез, СПИД, онкологические заболевания вне органа, подлежащего трансплантации.

     Относительными  считаются противопоказания, которые  заведомо усложняют техническое выполнение операции.

     Во  избежание отторжения донорского органа в дальнейшем проводится пожизненная  иммуносупрессивная терапия. Выбор  схемы иммуноподавляющего лечения  зависит от качества донорского органа, совпадения по группе крови и тканевой совместимости. Параллельно должна проводиться профилактика осложнений, спровоцированных данной терапией.

     После трансплантации органа человека ждет длительный период реабилитации, придется отказаться от вредных привычек и  соблюдать режим труда и отдыха.

     ПЕРЕСАДКА ОРГАНОВ

     На  сегодняшний день пересадка органов  является методом выбора в лечении  терминальных стадий заболеваний почек, печени, поджелудочной железы, легких и др. В настоящее время в  мире выполняются тысячи пересадок  различных органов. Трансплантология набирает все большие обороты и превращается в одну из лидирующих областей медицины. С этим связана и проблема постоянно растущего дефицита донорских органов.

     Все больные, которые нуждаются в  пересадке, регистрируются в листе  ожидания. Пациенты, вошедшие в лист ожидания, называются потенциальными реципиентами. После внесения в лист ожидания за пациентом ведется постоянное динамическое наблюдение.

     В современной трансплантологии на первый план выходит пересадка органов  от живых родственных доноров. Являясь одним из эффективных способов увеличения количества донорских органов, в странах с развитой системой трупного донорства она позволяет существенно снизить смертность больных, находящихся в листе ожидания.

     Родственное донорство предполагает изъятие  одного из парных органов (почка) или части органа (печень, легкое) и пересадку ее реципиенту. При этом донор и реципиент должны совпадать по системе HLA, иметь сходную группу крови. Донор должен достичь 18 лет и быть относительно здоровым человеком. Поэтому перед операцией потенциальные доноры проходят тщательное обследование всех органов и систем. Операция может быть выполнена только при условии того, что орган сможет полностью выполнять свои функции. Это значительно повысит шансы на успех операции. Для успешного проведения крайне важен опыт и профессионализм хирургов, наличие специального оборудования. Взятие трансплантата у донора должно соответствовать принципам гуманизма и морали, и контролироваться «Законом о трансплантации органов и (или) тканей человека».

     Пересадка органов от живого донора имеет ряд  преимуществ, таких как отсутствие необходимости в длительном ожидании донорского органа, плановый характер операции. Отмечаются улучшенные непосредственные и отдаленные результаты, при этом назначаются более щадящие режимы иммуносупрессии, направленные на профилактику реакции «трансплантат против хозяина».

     К настоящему времени годичная выживаемость трансплантатов после пересадки  различных органов благодаря  успешной профилактике, диагностике  и лечению ранних послеоперационных осложнений составляет примерно 90%.

     КЛЕТОЧНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ

     Является  неоспоримым тот факт, что в  современных тенденциях лечения  эндокринологических заболеваний  трансплантация клеток и тканей занимает достойное место. Становятся реальными  шансы на успех в лечении некогда обреченных больных.

     Большое значение приобретает пересадка  гормонально-активных клеток или фрагментов той или иной эндокринной железы для восстановления утраченной функции.

     Дело  в том, что продолжительная заместительная гормональная терапия откладывает свой отпечаток на всех органах и системах, ведет к нарушению метаболизма, различным физиологическим расстройствам. В этом случае трансплантат способен восстановить и поддерживать нормальный уровень гормонов в крови, при этом, не угнетая эндокринные железы. Для коррекции эндокринных нарушений возможна трансплантация отдельных гормонпродуцирующих клеток либо участков железы.

     В последние годы одним из вариантов  заместительной терапии при эндокринной  патологии можно считать клеточную  трансплантацию.

     Проводились экспериментальные и клинические  исследования по трансплантации надпочечниковых  желез, яичников, паращитовидной, щитовидной, поджелудочной желез. Наилучшие  результаты достигнуты при трансплантации клеток поджелудочной железы. Во время процедуры больным с сахарным диабетом первого типа пересаживаются клетки вырабатывающие инсулин. В связи с тем, что пересаживаются только клетки поджелудочной железы, операция носит малотравматичный характер. Под контролем ультразвука устанавливают катетер в воротную вену печени, через который в последующем и вводятся клетки. Трансплантат задерживается в печени, где начинает активно кровоснабжаться, и реагирует на колебания уровня глюкозы крови, при этом выделяя достаточное количество инсулина. Реакция на эти изменения появляется практически сразу и на протяжении первых нескольких недель их функция улучшается.

     При трансплантации клеток и тканей эндокринных  желез также остро стоит проблема отторжения. Сверхострое отторжение возникает не так часто, потому как нет сосудистого воссоединения между донорским органом и реципиентом. Но остается вероятность острого отторжения. Пусковым механизмом этой реакции является процесс распознавания трансплантата как чужеродного материала.

     Важнейшим компонентом послеоперационного лечения является назначение особенных комбинаций иммуносупрессивных препаратов. Пациенты, которым выполнена пересадка клеток островков поджелудочной железы, должны в течение всей последующей жизни получать данное лечение для предупреждения отторжения трансплантированных клеток.

     СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

     Острый  дефицит донорских органов, сложность  и высокая стоимость процесса трансплантации органов, высокий процент  послеоперационных осложнений - все  это обуславливает необходимость  развития новых биотехнологий, таких  как трансплантация клеток и тканей человека. Важно определить приоритетные направления для использования стволовых клеток.

     Основными показаниями к лечению стволовыми клетками являются различные злокачественные  заболевания крови. Также свое применение этот метод нашел в лечении  ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, заболеваний нервной системы, эндокринной патологии.

     В последние годы осуществляется активный научный поиск в направлении  трансплантации стволовых клеток.

Определение антигенов HLA реципиента

1. Серологические методы

Основной серологический метод типирования антигенов HLA -- лимфоцитотоксический тест. Метод заключается в следующем: 1) к сывороткам против разных антигенов HLA добавляют по 2000 исследуемых лимфоцитов; 2) после инкубации добавляют комплемент (его источником может служить кроличья сыворотка); 3) лимфоциты, несущие антиген, против которого направлена сыворотка, под действием комплемента разрушаются; 4) затем к лимфоцитам добавляют краситель, который окрашивает только живые клетки. Результат оценивают по относительному числу погибших лимфоцитов. В табл. 17.2 представлена шкала оценки лимфоцитотоксического теста, а в табл. 17.3 -- пример серологического типирования антигенов HLA. Резко положительный результат свидетельствует о том, что лимфоциты несут исследуемый антиген.

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. Особенно трудно получить сыворотки к редким антигенам HLA. При оценке результатов серологического типирования антигенов HLA необходимо учитывать, какая лаборатория его проводила и каково качество используемых сывороток. Наименее доступны сыворотки к антигенам HLA класса II, особенно к антигенам HLA-DP.

2. Молекулярно-генетические методы. Эти методы основаны на исследовании ДНК. Они лишены основных недостатков серологических методов. Генетическое типирование стало возможным после расшифровки нуклеотидной последовательности генов HLA и выявления различий между разными аллелями этих генов. В настоящее время молекулярно-генетические методы используются только для типирования генов HLA класса II.

Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. В целом последовательность нуклеотидов во всех аллелях одного гена HLA класса II однотипна, уникальны лишь замены нуклеотидов в тех областях, которые отвечают за синтез вариабельных участков. 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. Чаще всего одновременно используют несколько разных эндонуклеаз. Длину рестрикционных фрагментов оценивают методом гибридизации ДНК на твердой подложке. 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 авторадиографии 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. Недостатки метода: 1) большие затраты времени (обычно 2--3 нед); 2) невозможность различить аллели, сайты рестрикции в которых расположены в одних и тех же участках; 3) большое количество клеток для исследования (для получения достаточного количества ДНК необходимо по крайней мере 10--15 млн клеток); 4) отсутствие эндонуклеаз, специфичных для определенных аллелей.

Определение специфических олигонуклеотидных последовательностей лишено недостатков описанного выше метода. Аллели генов HLA иногда отличаются друг от друга лишь по одной паре нуклеотидов. Синтезированы одноцепочечные олигонуклеотидные зонды, состоящие из 19--24 нуклеотидов, полностью комплементарные уникальным последовательностям каждого известного аллеля гена HLA. Созданы также зонды, комплементарные общим для нескольких аллелей последовательностям. Таким образом, для определения неизвестного аллеля можно последовательно использовать серию зондов разной специфичности. Для гибридизации с олигонуклеотидными зондами можно использовать как рестрикционные фрагменты ДНК, полученные с помощью эндонуклеаз, так и фрагменты ДНК, полученные с помощью ПЦР.

ПЦР -- 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. Для проведения ПЦР необходимо синтезировать два олигонуклеотида, комплементарных 5'-концевым участкам цепей исследуемого фрагмента ДНК. Реакция включает следующие стадии: 1) денатурация ДНК с получением двух однонитевых фрагментов; 2) гибридизация олигонуклеотидов с 5'-концевыми участками этих фрагментов; 3) синтез комплементарной последовательности нуклеотидов. Реакцию проводят циклично, последовательно повторяя все ее стадии до получения достаточного количества копий исходного фрагмента ДНК. Количество копий ДНК увеличивается экспоненциально и после 20-го цикла реакции возрастает более чем в 1 000 000 раз. Полученные копии исследуют с помощью набора олигонуклеотидных зондов. Гибридизация зонда, который кодирует последовательность известного аллеля гена HLA, с исследуемым фрагментом ДНК свидетельствует о том, что в геноме исследуемого содержится данный аллель. Если гибридизации не происходит, данный аллель отсутствует. Отсутствие гибридизации со всеми олигонуклеотидными зондами не служит доказательством открытия нового аллеля, поскольку может быть обусловлен неполнотой использованного набора зондов. Разрабатывается молекулярно-генетическое типирование генов HLA класса I. Высокая точность и специфичность ПЦР позволяет с успехом использовать этот метод в других областях медицины, например в судебно-медицинской экспертизе. Разрабатываются и другие молекулярно-генетические методы типирования HLA.

3. Клеточные методы. После распознавания чужеродного антигена начинается пролиферация T-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.

Смешанная культура лимфоцитов. Равное количество лимфоцитов донора и реципиента смешивают и инкубируют в течение 5 сут при температуре 37°C, затем добавляют 3H-тимидин, который встраивается в ДНК пролиферирующих клеток. В присутствии 3H-тимидина лимфоциты инкубируют еще 1 сут, 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.

Для определения одновременно 3 антигенов HLA класса II (HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR) 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. Если гомозиготные стимулирующие  клетки не вызывают пролиферацию отвечающих клеток в смешанной культуре лимфоцитов, значит, отвечающие клетки несут те же антигены HLA класса II. Таким образом, смешанная культура лимфоцитов позволяет  оценить совместимость донора и  реципиента без анализа антигенов HLA (с применением стимулирующих  клеток неизвестного фенотипа) и определить одновременно 3 антигена HLA класса II (с  применением гомозиготных стимулирующих  клеток).

Реакция клеточной цитотоксичности. При совместном культивировании лимфоцитов реципиента (отвечающих клеток) и отличающихся от них по антигенам HLA класса II стимулирующих клеток среди отвечающих клеток появляются цитотоксические T-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 T-лимфоцитов или нет. Для этого готовится смешанная культура лимфоцитов, где отвечающими клетками служат лимфоциты реципиента, а стимулирующими -- инактивированные лимфоциты донора. После 6 сут инкубации в смешанной культуре лимфоцитов к отвечающим клеткам добавляют свежие клетки того же донора, меченные 51Cr. 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 содержание в ней 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 T-лимфоцитов свидетельствует об отторжении трансплантата.