

TKIVNA SKLADNOST

Matjaž Jeras

Zavod RS za transfuzijsko medicino

Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana



SV. KOZMA IN DAMJAN: ČUDEŽ ČRNE NOGE



IMUNOGENETIKA IN TRANSPLANTACIJSKA IMUNOLOGIJA

- *poznavanje in obvladovanje mehanizmov alogenskega imunskega odziva*
- *ugotavljanje stopnje tkivne skladnosti med darovalcem in prejemnikom presadka na fenotipskem in funkcijskem nivoju.*
- *ugotavljanje stopnje in antigenske specifičnosti protitelesne alosenzibilizacije pred in po transplantaciji.*
- *načrtovanje imunosupresije in spremljanje imunskega odziva po presaditvi.*
- *uvajanje različnih načinov vzpostavljanja dolgotrajne imunske tolerance oziroma neodzivnosti prejemnika na aloantigene darovalca (imunomodulacija).*
- *raziskovanje in prikrojevanje imunskih mehanizmov pri ksenotransplantaciji .*

ALOREAKTIVNOST & ALOSENZIBILIZACIJA

- *Aloreaktivnost je imunski odziv na tuje tkivo, ki ga pri človeku sproži in po klonski namnožitvi usmerja kar 1 - 10 % vseh limfocitov T.*
- *Aloenzibilizacija je posledica aloreaktivnosti, npr. po transfuzijah, presaditvah tkiv in organov, razvije pa se lahko tudi med nosečnostjo; opredeljuje jo prisotnost specifičnih efektorskih (tako po aktivaciji delujočih) in spominskih imunskih celic, kakor tudi alospecifičnih protiteles.*

ALOREAKTIVNOST & ALOSENZIBILIZACIJA

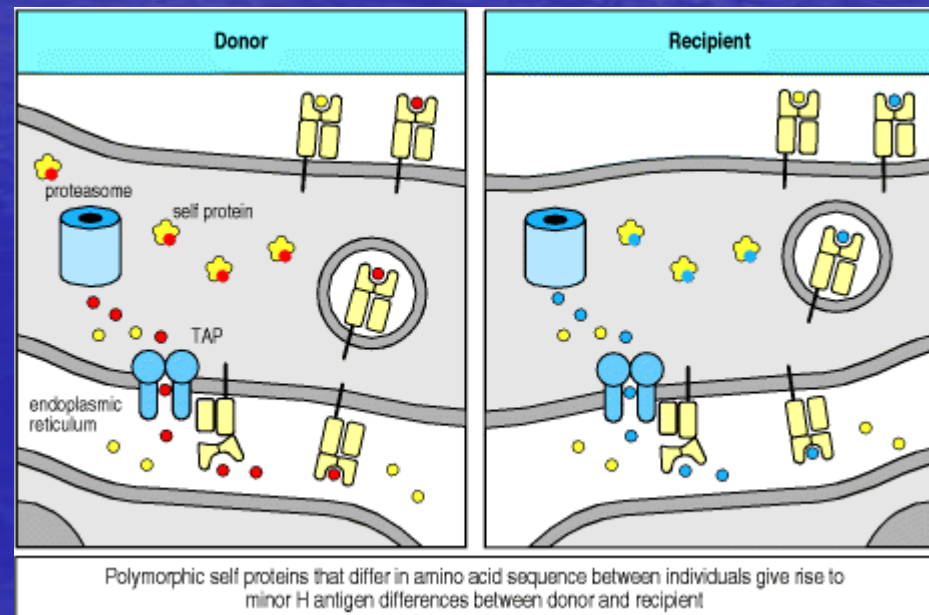
- Pogojuje ju izjemna raznolikost molekul MHC (pri človeku HLA) in raznovrstnost klonsko porazdeljenih TCR ($\sim 10^{18}$ - α/β ; Ig $\sim 10^{14}$), izraženih na limfocitih T ($CD4^+$ in $CD8^+$).*
- Oblikuje ju vrsta profesionalnih antigene predstavljajočih celic (APC), ki poleg predstavitve aloantigenov zagotavljajo tudi nujno potrebne kostimulatorne signale in topne dejavnike za celični (limfociti T) in protitelesni (limfociti B) aloimunski odziv.*
- njun obseg je individualno opredeljen.*

TRANSPLANTACIJSKI ANTIGENI – TKIVNA SKLADNOST

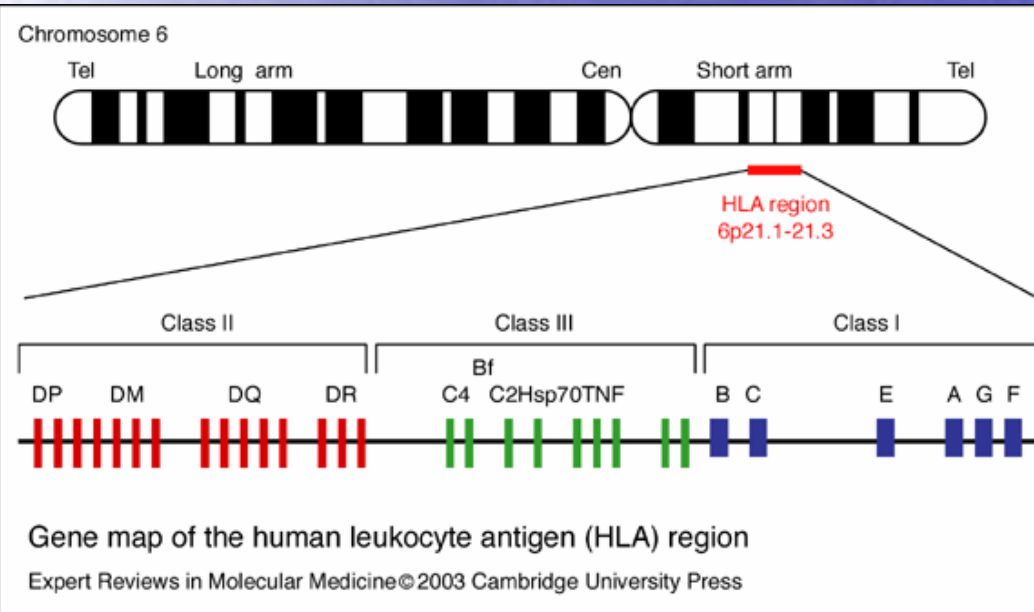
	Transplantacija organov	Transplantacija KMC	Transfuzija krvi
Krvne skupine	+++	(-)	+++
Molekule MHC	++	+++	(+)
MiHA	(+)	++	-

Kriteriji za najustrežnejšega darovalca so torej pri različnih vrstah transplantacij različni.

MiHA	Kromosom
HA-1	19
HA-2	6
HA-8	9
HB-1	5
HY-A1	Y
HY-A2	Y
HY-B7	Y
HY-B8	Y
HY-B60	Y
HY-DQ5	Y



LOKACIJA GENOV IN STRUKTURA MOLEKUL HLA



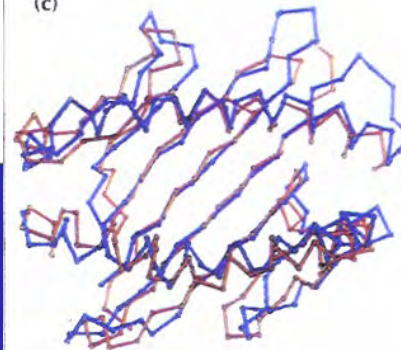
(a) HLA-Aw68 (class I)



(b) HLA-DR1 (class II)



(c)

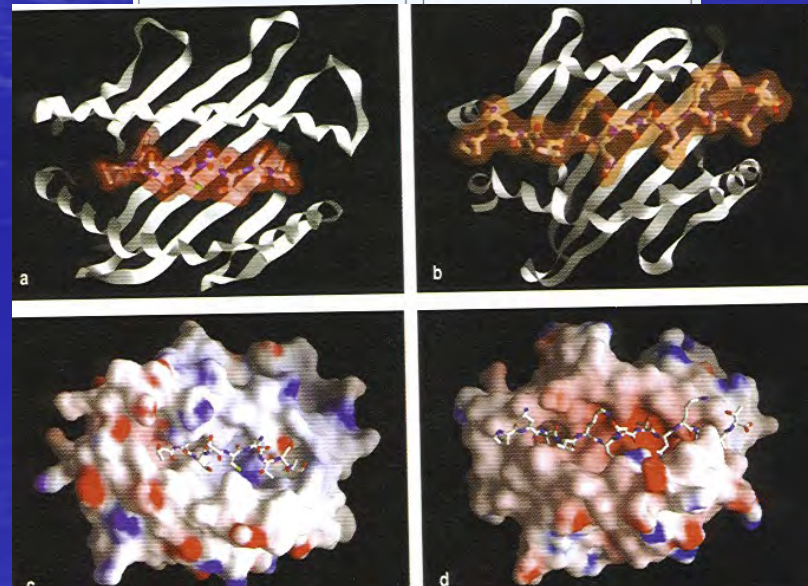
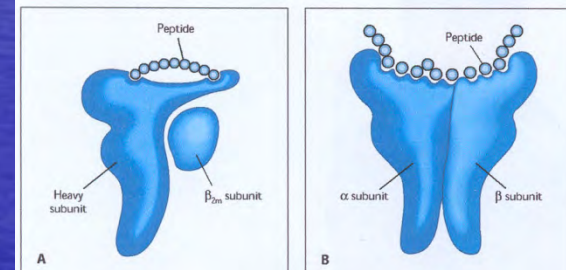
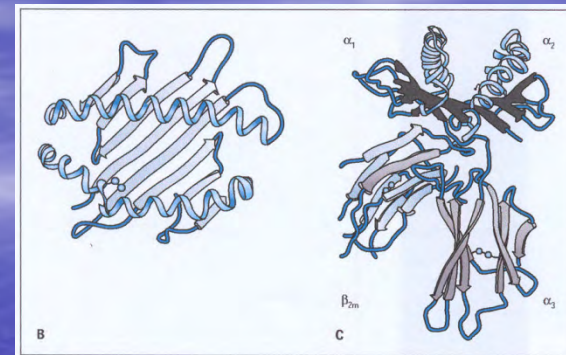


(d)

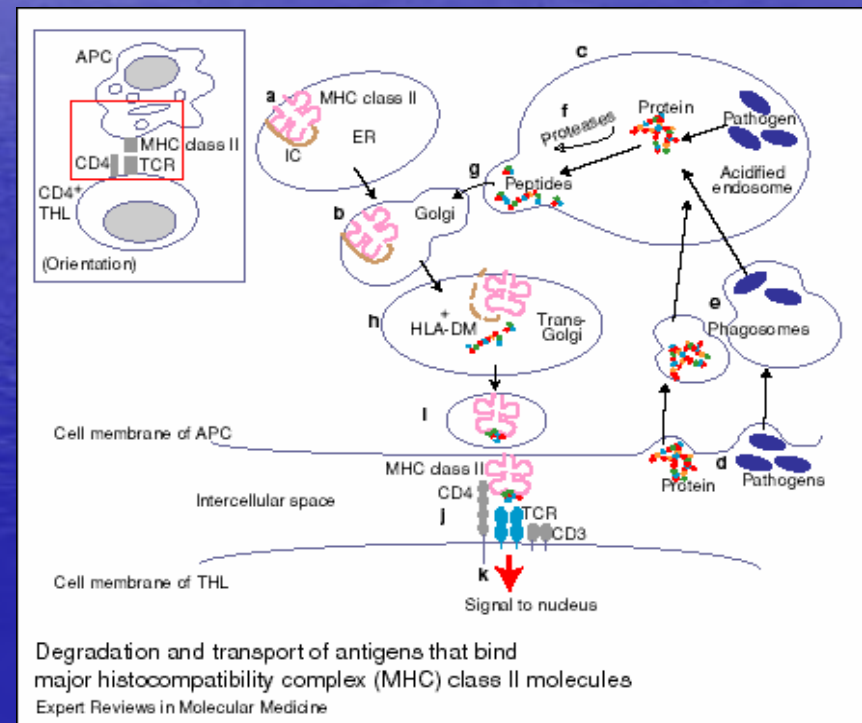
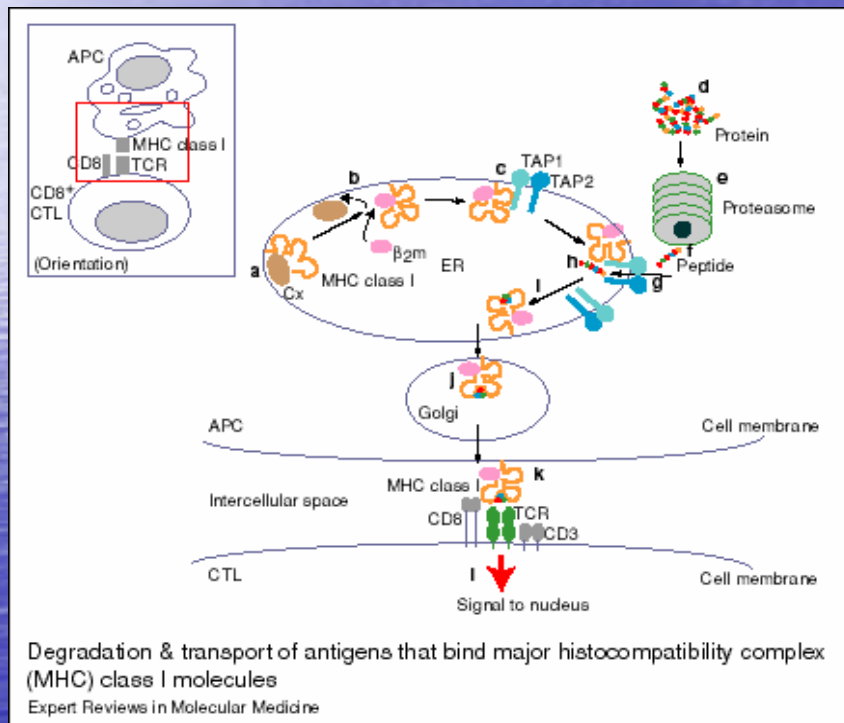


MOLEKULE HLA RAZREDOV I IN II

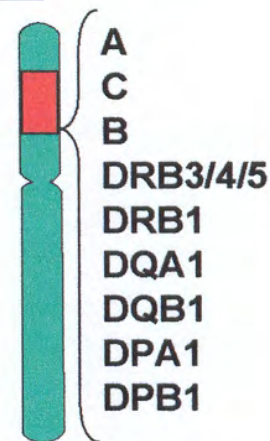
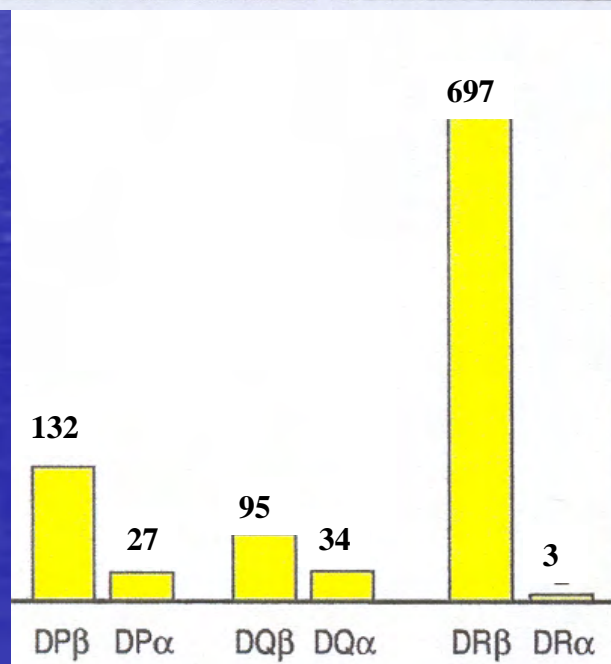
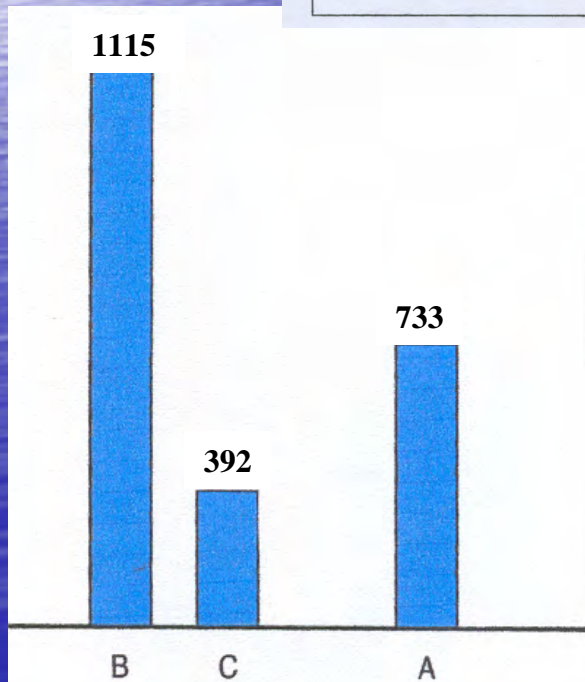
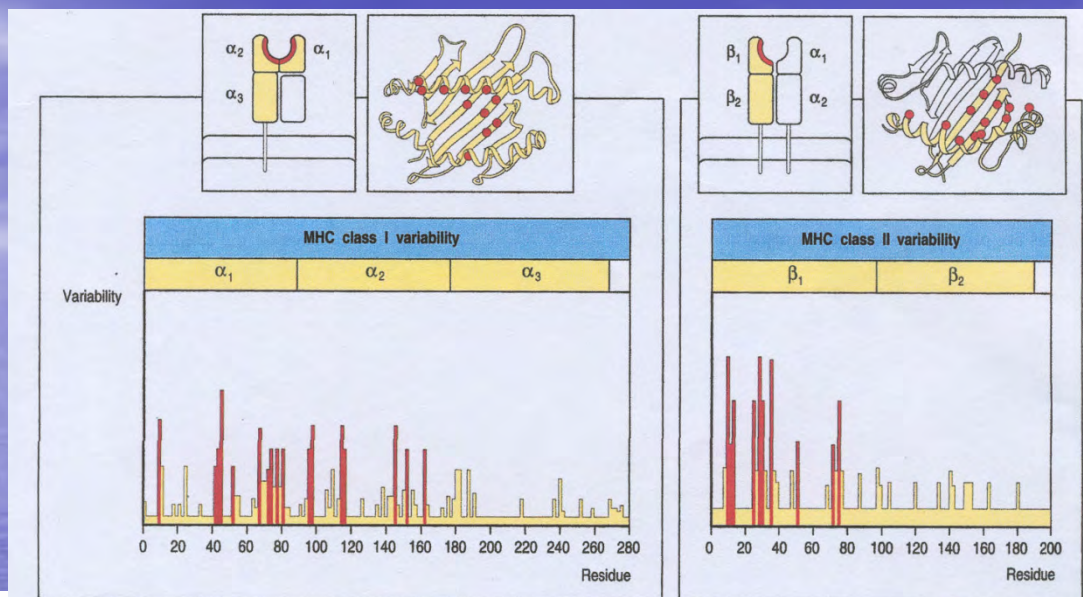
- *Antigeni HLA razreda I : A, B in C – vežejo in predstavljajo znotrajcelične antigene (peptidi od 9 – 10 ak).*
- *Antigeni HLA razreda II: DR, DQ in DP – vežejo in predstavljajo zunajcelične antigene (peptidi od 18 – 21 ak).*
- *Oboji so močni aloantigeni.*



PREDSTAVLJANJE ANTIGENSKIH PEPTIDOV ZNOTRAJ MOLEKUL HLA



RAZNOLIKOST MOLEKUL HLA



Frekvenca rekombinacij v področju MHC: 2 - 2.5 %

WHO NOMENKLATURA HLA

Nomenklatura	Pomeni
HLA	področje HLA in oznaka za HLA gene, antigene
HLA-DRB1	lokus HLA
HLA-DRB1*13	skupina alelov, ki kodirajo antigen DR13
HLA-DRB1*1301	specifični alel HLA
HLA-DRB1*1301N	nični alel
HLA-DRB1*130102	alel s sinonimno mutacijo (na nivoju proteina)
HLA-DRB1*13010102	alel z mutacijo izven kodirajočega področja
HLA-DRB1*13010102N	nični alel z mutacijo izven kodirajočega področja

RAZLIČNI NIVOJI TIPIZACIJE HLA

Serologija/antigenški nivo	DNK tipizacija /alelski nivo
A2	A*0201 A*0205 ...
B7	B*0702 B*0703 ...
DR4	DRB1*0401 DRB1*0402 ...



Označuje skupino alelov, ki jo določimo z gensko tipizacijo
Na nizkem nivoju ločljivosti

DEFINICIJA UJEMANJA HLA

Bolnik z alelsko specifičnostjo A*2301

Nivo ujemanja	Darovalec
Alelsko	A*2301
Gensko na nivoju nizke ločljivosti	A*23
Serološko antigensko (podskupina)	A23(9)
Serološko antigensko (nadskupina)	A9
Serološko antigensko neujemanje	A2

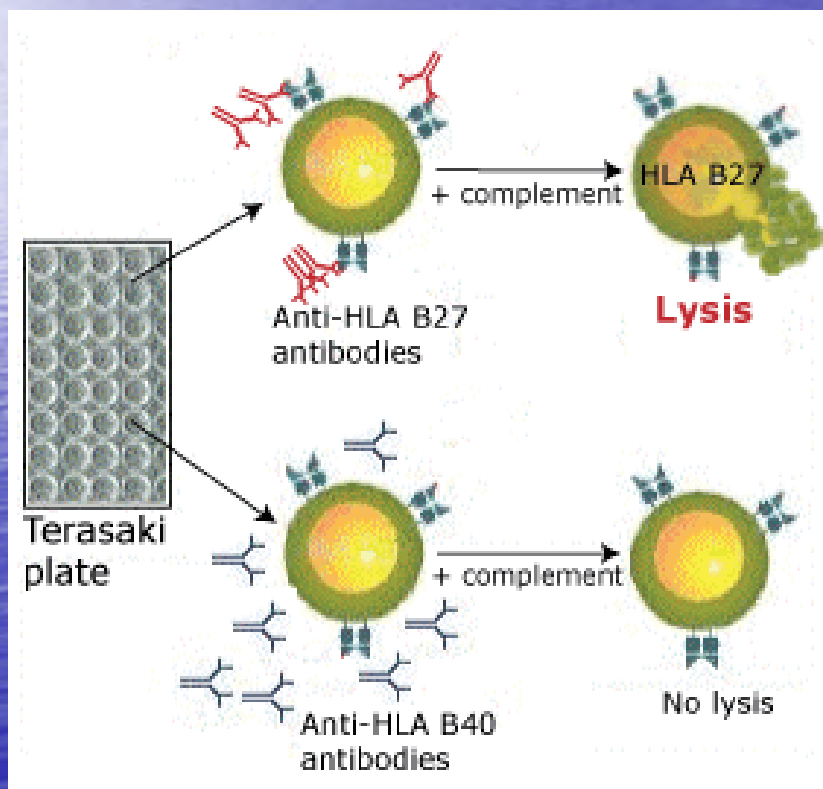
Potencialno alelsko ujemanje

Antigensko in alelsko neujemanje

UGOTAVLJANJE TKIVNE SKLADNOSTI: TIPIZACIJA HLA

- *Mikrolimfocitotoksična reakcija: določanje molekul HLA razreda I na površini MNC, izoliranih iz periferne krvi, z uporabo zbirke poliklonskih in monoklonskih protiteles ter kunčjega seruma kot vira komplementa.*
- *PCR-SSP, PCR-SSO: z uporabo genomske DNA in verižne reakcije s polimerazo, ob prisotnosti specifičnih začetnih oligonukleotidnih verig ter dodatnih oligonukleotidnih sond (SSO), določamo genske zapise za skupinske (generične) in posamezne (alelske) specifičnosti, ki kodirajo molekule razredov I in II HLA.*
- *PCR-SBT: sekvenciranje alelskih zapisov s pomočjo fluorescenčno označenih dideoksi nukleotidov ali ddNTP-jev (nimajo hidroksilne skupine na 3' koncu).*

SEROLOŠKA TIPIZACIJA HLA – MIKROLIMFOCITOTOKSIČNA REAKCIJA



HLA SPECIFICITIES

A	B	B	C	DR	DQ	DP
A1	B5	B51(5)	Cw1	DR1	DQ1	DPw1
A2	B7	B5102	Cw2	DR103	DQ2	DPw2
A203	B703	B5103	Cw3	DR2	DQ3	DPw3
A210	B8	B52(5)	Cw4	DR3	DQ4	DPw4
A3	B12	B53	Cw5	DR4	DQ5(1)	DPw5
A9	B13	B54(22)	Cw6	DR5	DQ6(1)	DPw6
A10	B14	B55(22)	Cw7	DR6	DQ7(3)	
A11	B15	B56(22)	Cw8	DR7	DQ8(3)	
A19	B16	B57(17)	Cw9(w3)	DR8	DQ9(3)	
A23(9)	B17	B58(17)	Cw10(w3)	DR9		
A24(9)	B18	B59		DR10		
A2403	B21	B60(40)		DR11(5)		
A25(10)	B22	B61(40)		DR12(5)		
A26(10)	B27	B62(15)		DR13(6)		
A28	B2708	B63(15)		DR14(6)		
A29(19)	B35	B64(14)		DR1403		
A30(19)	B37	B65(14)		DR1404		
A31(19)	B38(16)	B67		DR15(2)		
A32(19)	B39(16)	B70		DR16(2)		
A33(19)	B3901	B71(70)		DR17(3)		
A34(10)	B3902	B72(70)		DR18(3)		
A36	B40	B73		DR51		
A43	B4005	B75(15)		DR52		
A66(10)	B41	B76(15)		DR53		
A68(28)	B42	B77(15)				
A69(28)	B44(12)	B7801				
A74(19)	B45(12)	B81				
A80	B46	Bw4				
	B47	Bw6				
	B48					
	B49(21)					
	B50(21)					

Antigens listed in parentheses are the broad antigens, antigens followed by broad antigens in parentheses are the antigen splits.



Biotest

Worksheet – Lymphotype HLA-ABC 144/1 Italia

2 x 72 WELL TRAY WITH PRE-IDROPPED ANTI-HLA-ABC REAGENTS

For use in the microlymphocytotoxicity test (see directions) – Subject to change

1150302

Last Name _____ First Name _____ Born _____ Specimen No. _____ Complement Lot No. _____

Result _____ Test Date _____ By _____

Tray Lymphotype HLA-ABC 144/1 Italia

ROW	1						2						3						4						5						6					
COLUMN	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	C	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A
REACTION																																				
HLA-ABC SPECIFICITY	Neg. Ctr.	Pos. Ctr.	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2	A3	A3	A23	A23	A24	A23	A23	A25	A25	A26	A6	A25	A34	A11	A11	A11	A68	A68	A29	A29	A30	A30	A31	A31	A30	A31
ID-NUMBER	111100	1110701	6391	6617	5027	2467	6575	6757	2138 ^o	6534	2807 ^o	6619	6050	6684	1084	6412 ^o	6543	6431	6642	2682	651R	6718	2604	6348	2515	6164	6638	6634	2968 ^o	6312	6720	2430	2516	6283	6281	2495
ROW	7						8						9						10						11						12					
COLUMN	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	C	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A
REACTION																																				
HLA-ABC SPECIFICITY	A32	A33	A33	A74	A74	B51	B51	B52	B52	B51	B51	B7	B7	B7	B8	B8	B8	B44	B44	B45	B5	B44	B13	B13	B64	B65	B64	B64	B62	B62	B62	B62	B62	B38	B39	B39
ID-NUMBER	6635	6536	2780 ^o	2937 ^o	6240	6177	2931	6196	2837 ^o	6510	6483	6676	6651	6033	6496	6537 ^o	6112	6721	6607	5080	6314	5045	5072	2642	2942 ^o	6216	6449	6201	6770	6727	6817	2615	2850	6430	2782	6222

Specificities and splits:

- A9 (23, 24, 2403)
- A10 (25, 26, 34, 66)
- A19 (29, 30, 31, 32, 33, 74)
- A28 (68, 69)
- B5 (51, 52)
- B12 (44, 45)
- B14 (64, 65)
- B15 (62, 63, 75, 76, 77)
- B16 (38, 39)
- B17 (57, 58)
- B21 (49, 50)
- B22 (54, 55, 56)
- B40 (60, 61)
- B70 (71, 72, 70)
- Cw3 (w9, w10)
- B67 = B39 creg
- B78 = B5 creg
- B81 = BDT (B7 creg)

Codes:

- A1 = anti-HLA-A1
- ID = Identification
- wk = weak reaction
- e = extra reaction
- excl. = exclusive
- o = monoclonal reagent
- ↓ = carry over possible

Caution:

HLA cross reactions
creg = crossreactive group

Art. No.: 823 045

Lot No.: 143 0702

Exp. Date: Aug. 0'3



Worksheet – Lymphotype HLA-ABC 144/2 Italia

2 x 72 WELL TRAY WITH PRE-DROPPED ANTI-HLA-ABC REAGENTS

For use in the microlymphocytotoxicity test (see directions) – Subject to change

Tray Lymphotype HLA-ABC 144/2 Italia

ROW	■ 1 →						■ 2 →						■ 3 →						■ 4 →						■ 5 →						■ 6 →					
	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A
REACTION	Neg. Ctrl.	Pos. Ctrl.	B38	B57	B57	B57	B57	B57	B18	B18	B18	B49	B49	B49	B49	B54	B55	B56	B55	B54	B27	B27	B27	B27	B35	B35	B35	B35	B53	B53	B37	B37	B60	B60	B60	B60
HLA-ABC SPECIFICITY			39 67			58	58	58	63					50	50				56 42 67	55 56	excl. 2708	excl. 2708	47	47 13 excl. 2708	50	53	53	53	51 78	52 18			48	48	48	48
ID-NUMBER	111100	1110701	6652	6647	2975	6121	6501 ↓	6690	4060	6576	6628	6394	6608	6741	6692	6478	6136	2972	3000	6552	6303	6626	2157	6278	6170	6360	6673	6691	6245	6506 ↓	6754	6422	2036	6746	2693	6773

ROW	■ 7 →						■ 8 →						■ 9 →						■ 10 →						■ 11 →						■ 12 →					
	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A	A	B	C	D	E	F	F	E	D	C	B	A
REACTION	B60	B60	B41	B41	B41	B42	B46	B71	B72	B70	B70	B70	B48	B73	B73	Cw1	Cw1	Cw2	Cw2	Cw3	Cw3	Cw4	Cw4	Cw5	Cw5	Cw6	Cw6	Cw7	Cw7	Cw8	Cw8	Cw17	Bw4	Bw4	Bw6	Bw6
HLA-ABC SPECIFICITY	61 13 47	61 13 48			42			27 38	75 wk62	12 21 62	21 62 21	35 62														wk4	4					B41	A9	A9 25 32	Bw6	Bw6
ID-NUMBER	6705	6150	6209	6441	6413	6591	6782	2606 ↓	6593 °	6636	2941 °	6566 °	6455	2407	2654	6425	4003 ↓	6610	6664	6724	6347	6576	6687	6247	6452	6680	6013	4657	4013	3085	6262	5036	6656	6747	6748	6722

Specificities and splits:

- | | | | |
|------------------------------|--------------------------|------------------|---------------------|
| A9 (23, 24, 2403) | B5 (51, 52) | B17 (57, 58) | Cw3 (w9, w10) |
| A10 (25, 26, 34, 66) | B12 (44, 45) | B21 (49, 50) | |
| A19 (29, 30, 31, 32, 33, 74) | B14 (64, 65) | B22 (54, 55, 56) | B67 = B39 creg |
| A28 (68, 69) | B15 (62, 63, 75, 76, 77) | B40 (60, 61) | B78 = B5 creg |
| | B16 (38, 39) | B70 (71, 72, 70) | B81 = BDT (B7 creg) |

Codes:

- A1 = anti-HLA-A1
- ID = Identification
- wk = weak reaction
- e • = extra reaction
- excl. = exclusive
- o = monoclonal reagent
- ↓ = carry over possible

Caution:

HLA cross reactions
creg = crossreactive group

Art. No.: 823 045

Lot No.: 143 0792

Exp. Date: Aug. 03

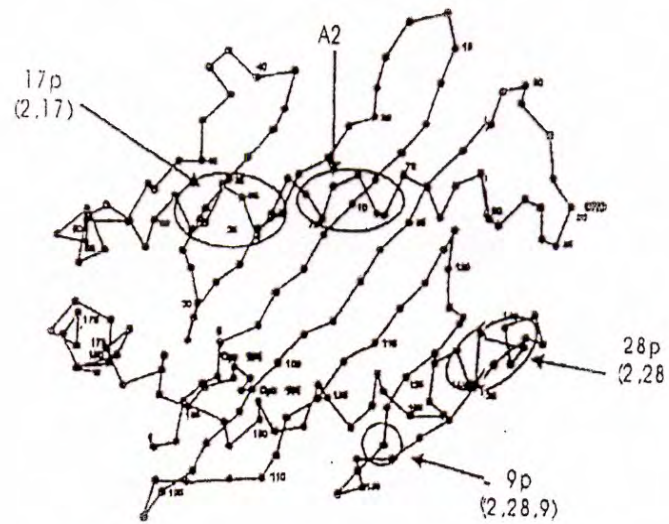


Figure 8.2 shows the probable sites of epitopes of the HLA-A2 molecule. 9p, 17p, and 28p are public epitopes of the 2 CREG.

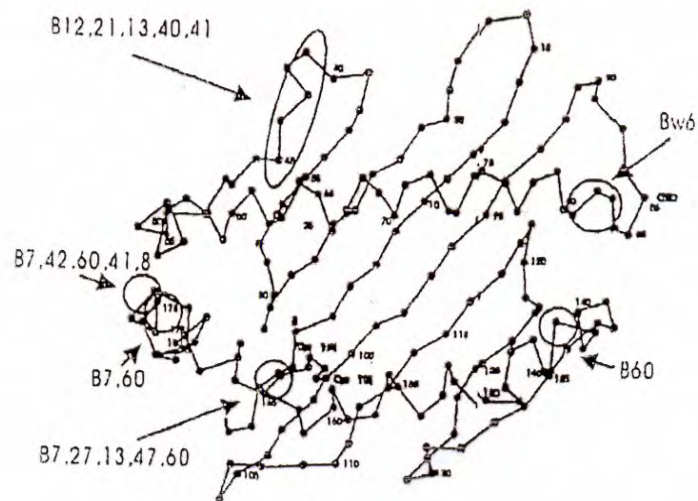
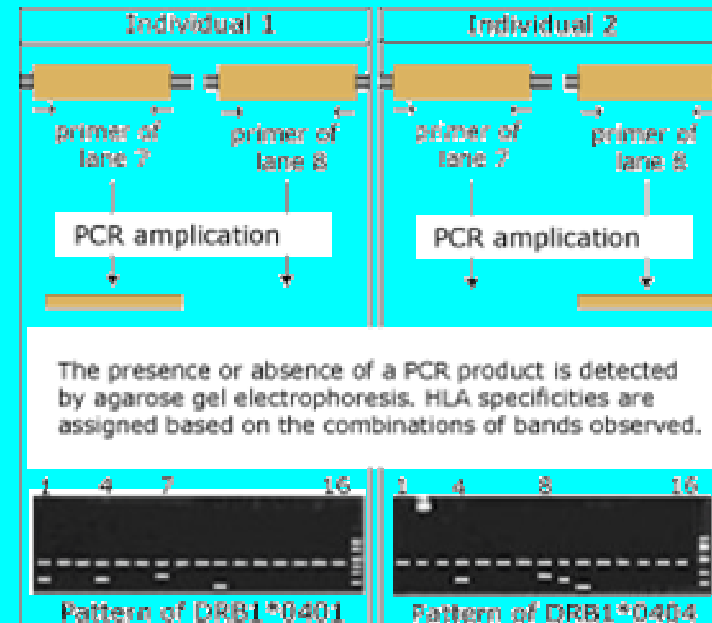
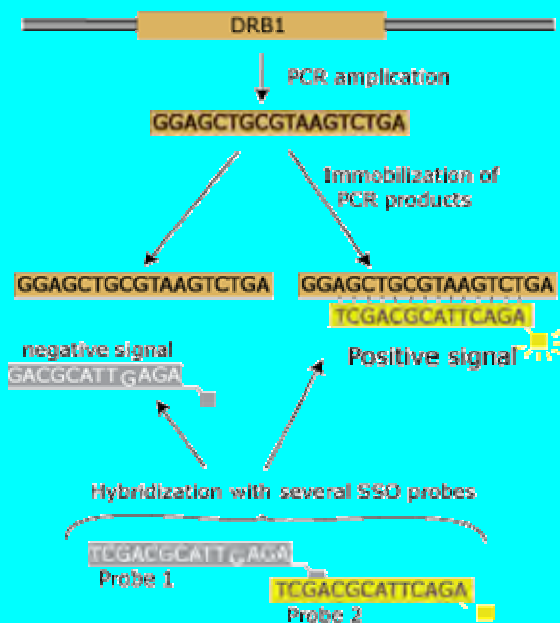
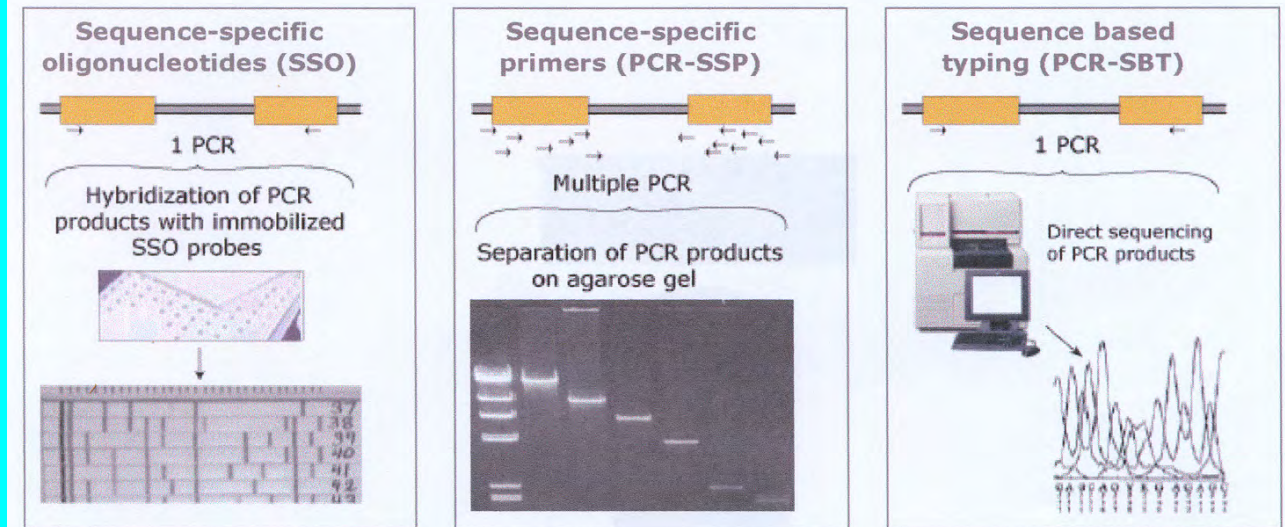


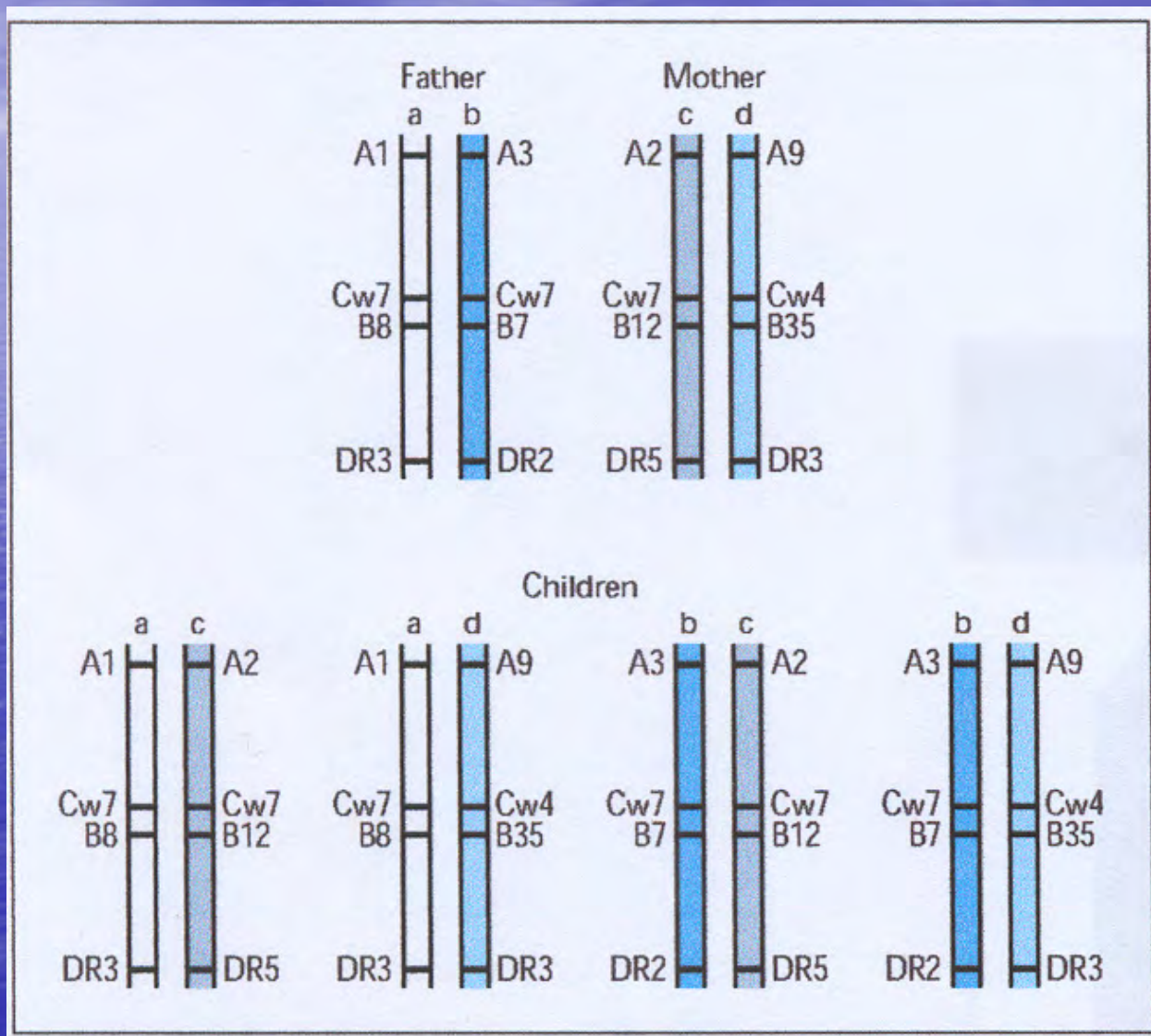
Figure 8.3 shows probable sites of epitopes of the HLA-B60 molecule. 12p is a public epitope in the 12 CREG. 7p, 22p, 27p and 60p are public epitopes of the 7 CREG.

HLA typing by molecular techniques

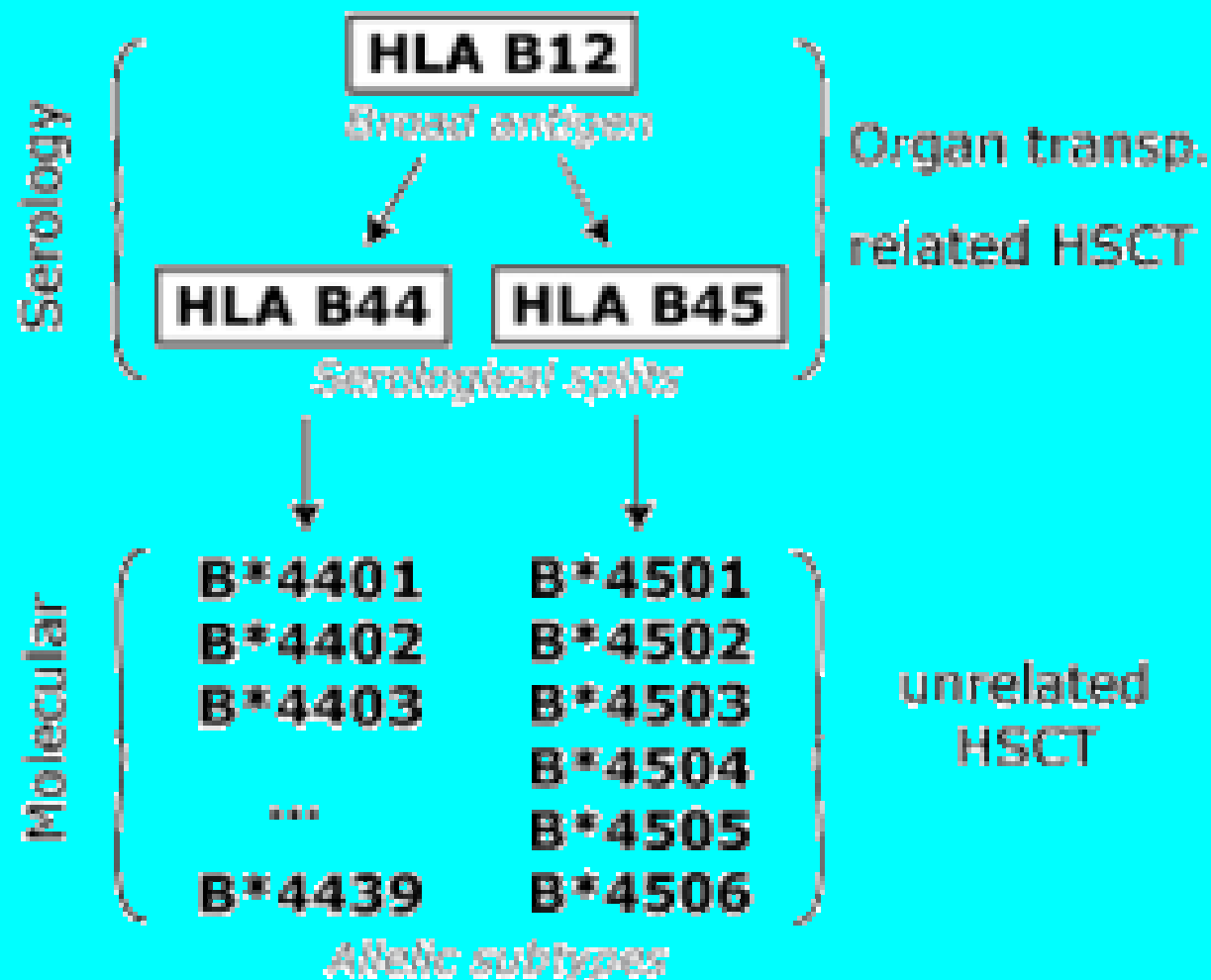
Molecular polymerase chain reaction (PCR) based HLA typing techniques allow the determination of DNA sequence variations, either by hybridisation with sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSO), or by a combination of sequence specific primers (PCR-SSP), or by direct sequencing (PCR-SBT) of PCR product.



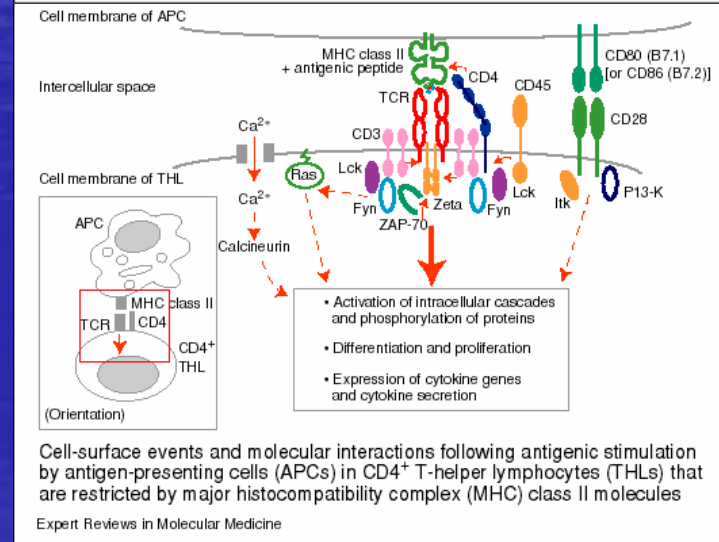
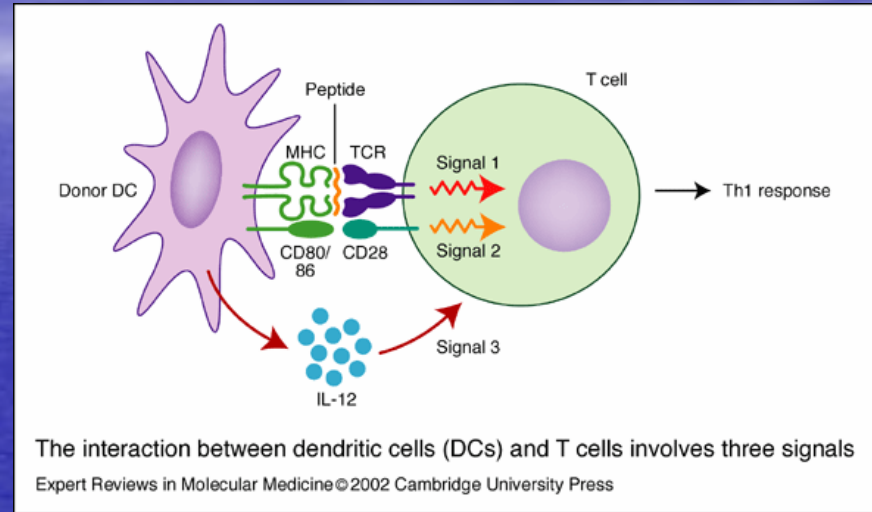
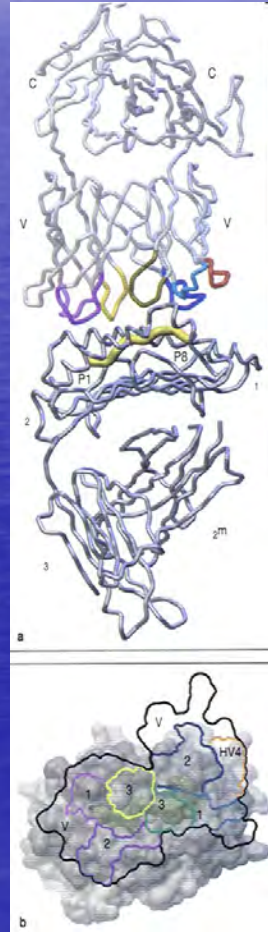
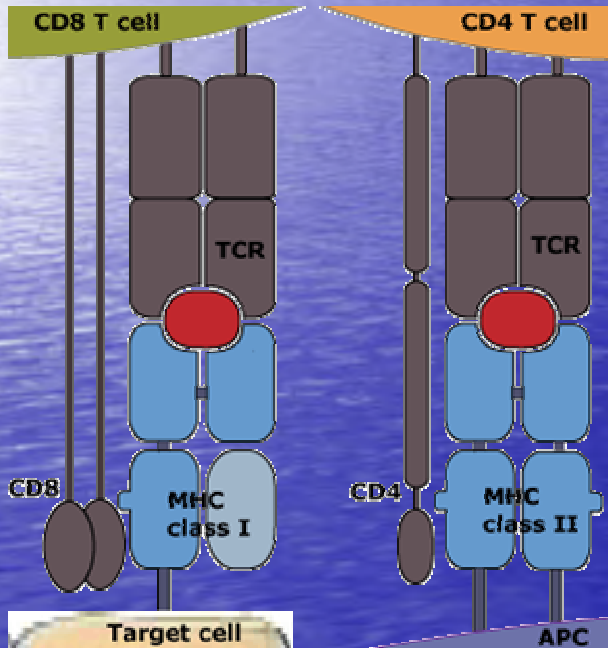
DEDOVANJE HAPLOTIPOV HLA



RAZLIČNI NIVOJI TIPIZACIJ ZA RAZLIČNE VRSTE TRANSPLANTACIJ

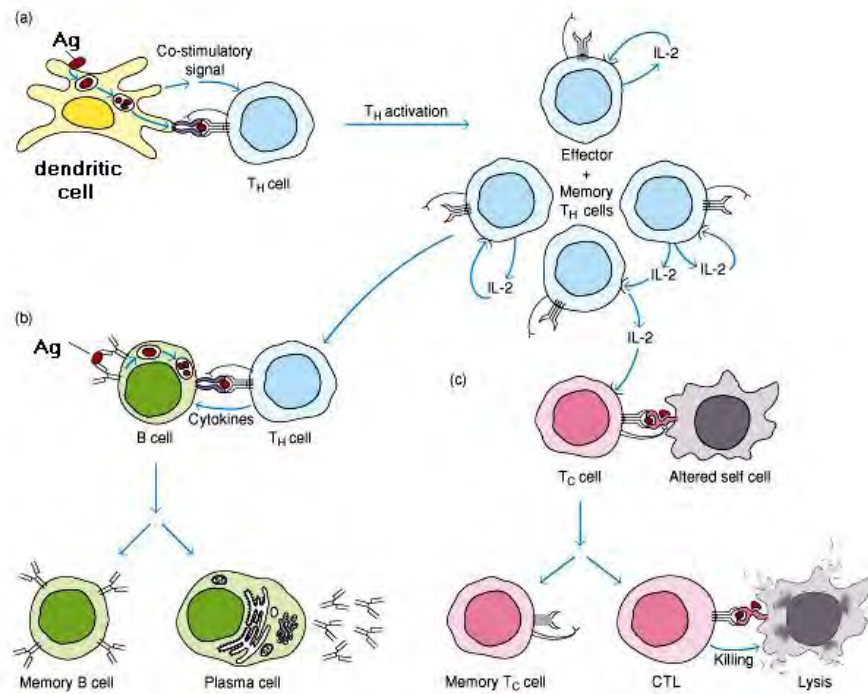


ANTIGENSKO PREPOZNAVANJE IN CELIČNI IMUNSKI ODZIV



OSREDNJA VLOGA APC IN CELIC T POMAGALK V IMUNSKEM ODZIVU

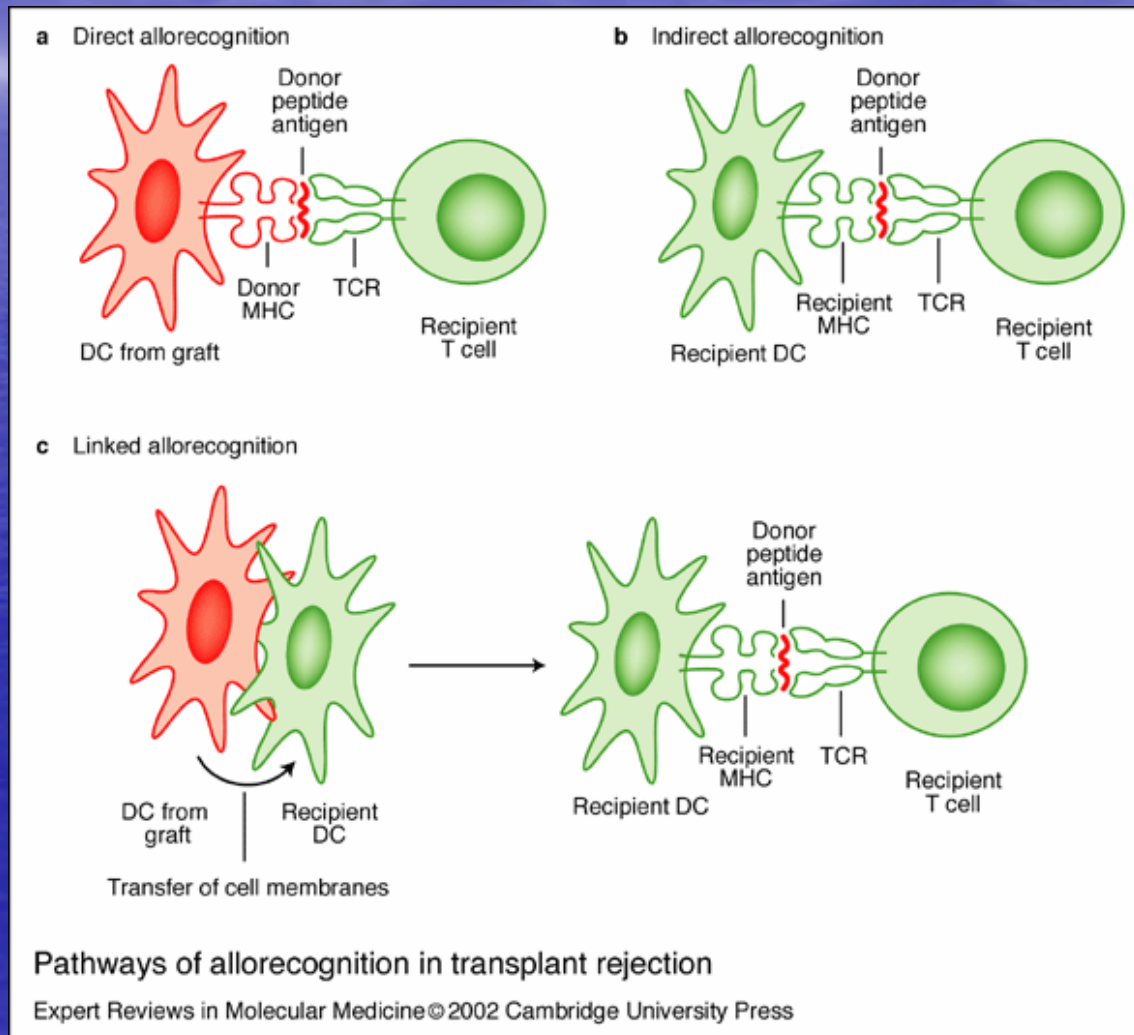
Dendritične celice sprožijo imunski odziv tako, da predelajo antigene v peptide in jih nato, vezane v molekule HLA, predstavljajo limfocitom T.



NEPOSREDNO IN POSREDNO PREPOZNAVANJE ALOANTIGENOV

● Neposredno: limfociti T prejemnika prepoznavajo tuje molekule MHC, izražene na APC darovalca, potem ko le-te prispejo v limfne vozle (direkten napad na presadek; akutna zavrnitev).

● Posredno: prejemnikove APC privzamejo in predelajo alogenske proteine, običajno molekule MHC darovalca ter nastale peptide, vezane na lastne molekule HLA, ponujajo v prepoznavo lastnim limfocitom T (vnetna reakcija; humoralna alosenzibilizacija).



ALOGENSKA PRESADITEV ORGANOV (LEDVICA)

- Skladnost v krvnih skupinah med darovalcem in prejemnikom presadka.*
- Stopnja skladnosti v molekulah HLA: DR > B > A.*
- Negativni navzkrižni preizkus in odsotnost nedovoljenih neujemanj v molekulah HLA (alosenzibilizacija prejemnika).*
- Imunski zapleti po transplantaciji: hiperakutna, akutna in kronična zavrnitev presadka.*
- Imunosupresija: potrebuje jo vsak prejemnik alogenskega presadka.*

UGOTAVLJANJE PROTITELESNE ALOSENZIBILIZACIJE NA MOLEKULE MHC

- presejalni testi: serume bolnikov, uvrščenih v čakalne spiske za presaditev organov nesorodnih umrlih oseb dodajamo k zbirki dobro tipiziranih (HLA) mononuklearnih celic (MNC); ugotavljamo splošni odstotek reaktivnosti posameznega seruma (PRA) ter specifičnost protitelesne alosenzibilizacije zoper posamezne molekule HLA razreda I - prepovedana neujemanja.*
- novejša tehnika: pretočna citometrija in ELISA; v obeh primerih namesto MNC uporabljamo na trdno osnovo pripete prečiščene naravne ali rekombinantne molekule HLA.*
- navzkrižni preizkusi pred presaditvijo: uporabimo serume na osnovi tkivne skladnosti izbranih bolnikov ter MNC darovalca.*

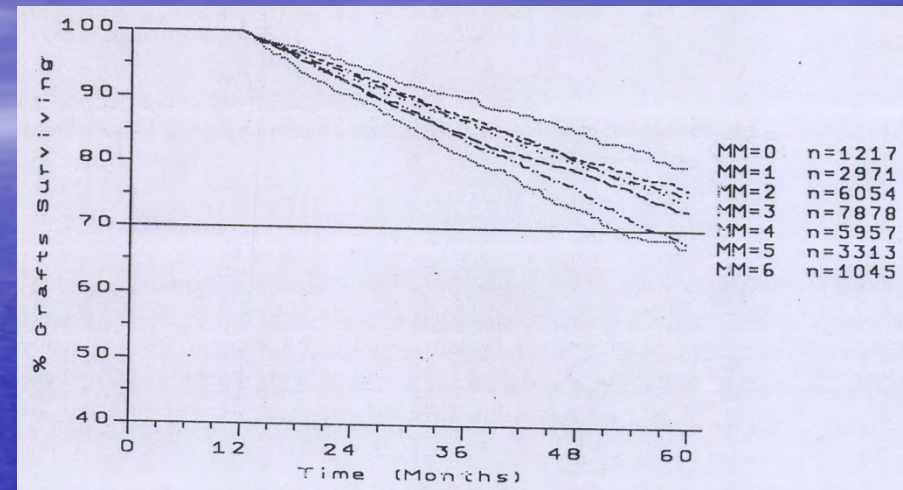
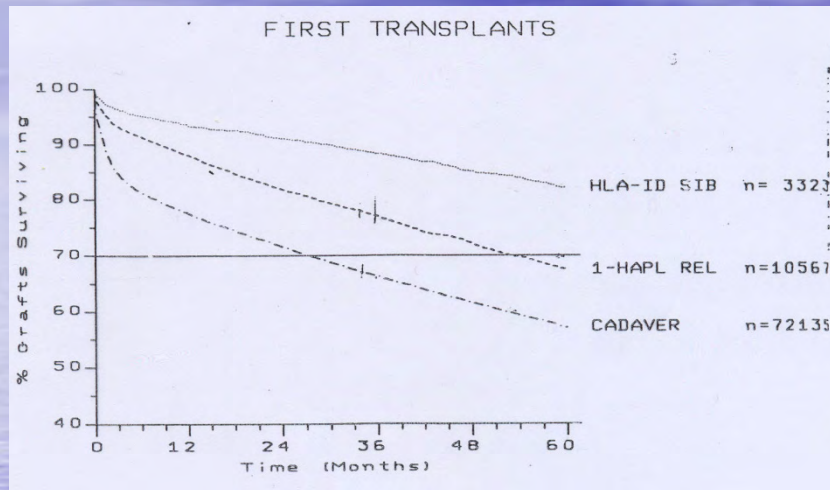
RAZLIČNE OBLIKE ZAVRAČNJA PRESADKOV

- *Hiperakutna: prisotnost specifičnih protiteles (HLA, ABO) in aktivacija komplementa po njihovi vezavi na žilni endotelij presajenega organa – hitra konstrikcija žil, žilni edem, krvni strdki ali vaskulitis, nekroza.*
- *Akutna celična: zaostale darovalčeve APC (predvsem DC) aktivirajo prejemnikove limfocite T, ki nato napadejo žilni endotelij presadka; sledi lahko njihova migracija skozi žilno steno in napad na parenhimske celice ter sprožitev mehanizmov reakcije zapoznele preobčutljivosti (DTH); v potek DTH so vpleteni predvsem $M\phi$, pa tudi nevtrofilci, eozinofilci, limfociti B in celice NK; pomembno je sproščanje določenih citokinov in pa morebitne virusne infekcije, ki lahko poškodujejo tkivo.*
- *Kronična: počasna celična in protitelesna aloreaktivnost, najverjetneje perzistenten potek DTH (aktivirani prejemnikovi $M\phi$ izločajo mezenhimske rastne dejavnike); ishemijske - reperfuzijske poškodbe tkiva, virusne infekcije in nefrotoksično delovanje CsA. Značilnosti: vaskulopatija, glomerularna fibroza in atrofija, lahko tudi zamašitev določenih žil zaradi proliferacije celic gladkega mišičja v intimi arterij - progresivna izguba ledvične funkcije.*

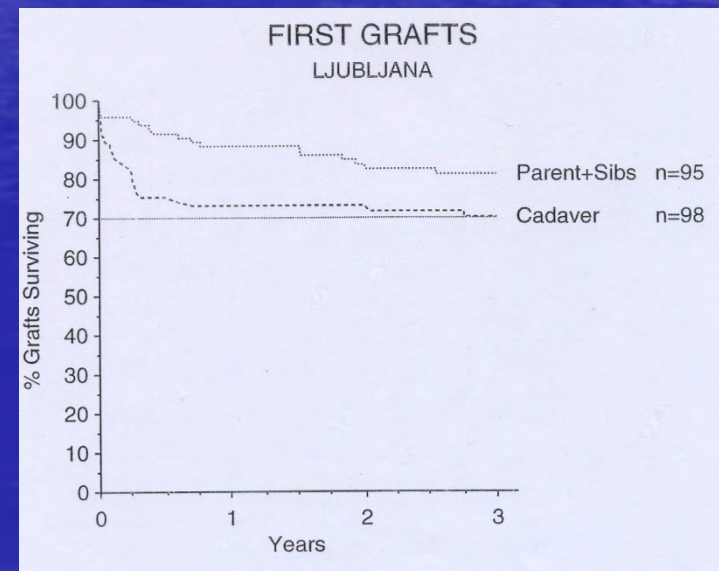
STANJA, KI OLAJŠUJEJO NASTANEK ZAVRNITVENIH REAKCIJ

- *Možgaska smrt darovalca: sistemsko sproščanje hormonov, ki lahko aktivirajo gene za citokine, adhezijske molekule in vnetne aktivatorje v organih (ledvica).*
- *Umetna ventilacija in/ali pljučna infekcija darovalca: povečano izražanje adhezijskih molekul na žilnem endoteliju ter molekul HLA-DR na epiteliju proksimalnih tubulov.*
- *Hladna ishemija: encimi, ki povzročajo nastanek reaktivnih kisikovih spojin, posledično se poveča izražanje adhezijskih molekul na endoteliju ledvičnih žil in proksimalnih tubulov; poveča se tudi proizvodnja tkivnega dejavnika v endotelijskih celicah – pro-trombotično in pro-vnetno okolje.*
- *Vse omenjene spremembe olajšajo izražanje endotelina-1 na žilnem in na endoteliju tubulov – povečano tveganje za nastanek akutne in kronične zavrnitve presadka.*

DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA USPEŠNOST PRESAJANJA LEDVIC



- Čas hladne ishemije.
- Tkivna skladnost.
- Obseg protitelesne alosenzibilizacije (% PRA).
- Čakalna doba na presaditev.
- Imunosupresija.

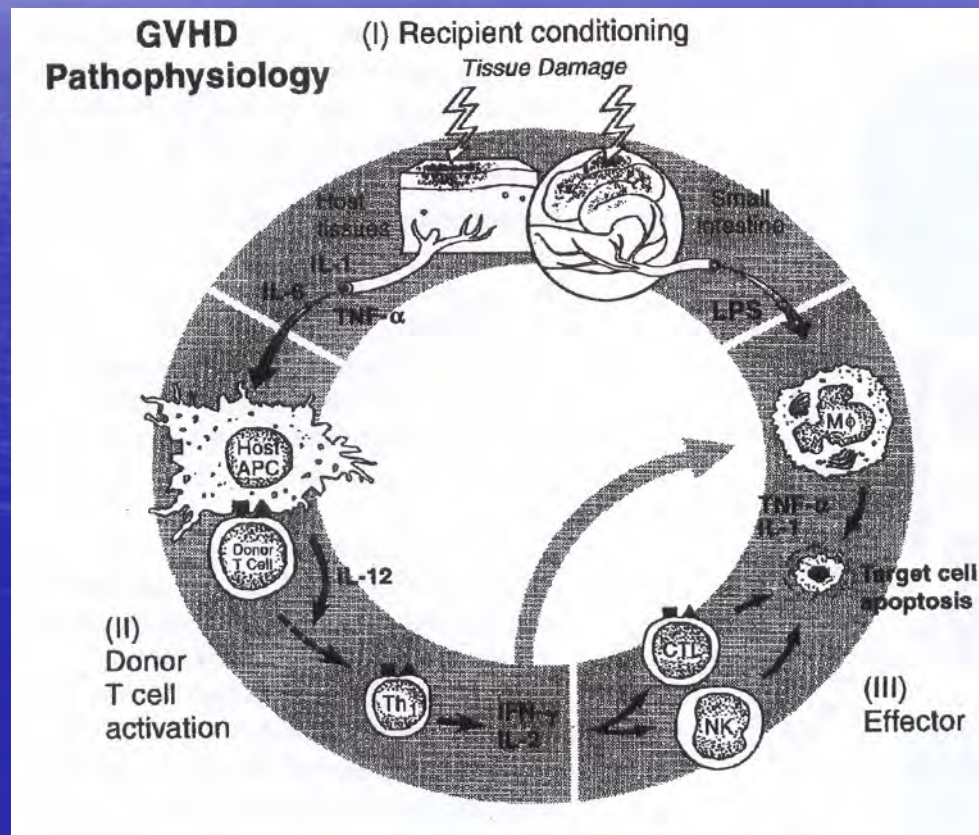


MOŽNI DAROVALCI KOSTNEGA MOZGA OZIROMA KMC

- Tkivno (HLA) popolnoma (genotipsko) skladni ožji sorodniki (bratje, sestre): ~ 25 - 30 %.
- Zelo redko fenotipsko tkivno skladni (HLA) sorodniki (starši, bratranci, sestrične).
- Včasih haploidentični (HLA) sorodniki (določena neujemanja)
- Nesorodni prostovoljni darovalci (registri) – čim boljše ujemanje v alelih HLA z bolnikom: 10/10 (HLA- A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*).
- Popkovnična kri kot alternativni vir KMC (možnost uporabe ne povsem tkivno skladnih presadkov)

AKUTNA BOLEZEN PRESADKA ZOPER GOSTITELJA (aGvHD)

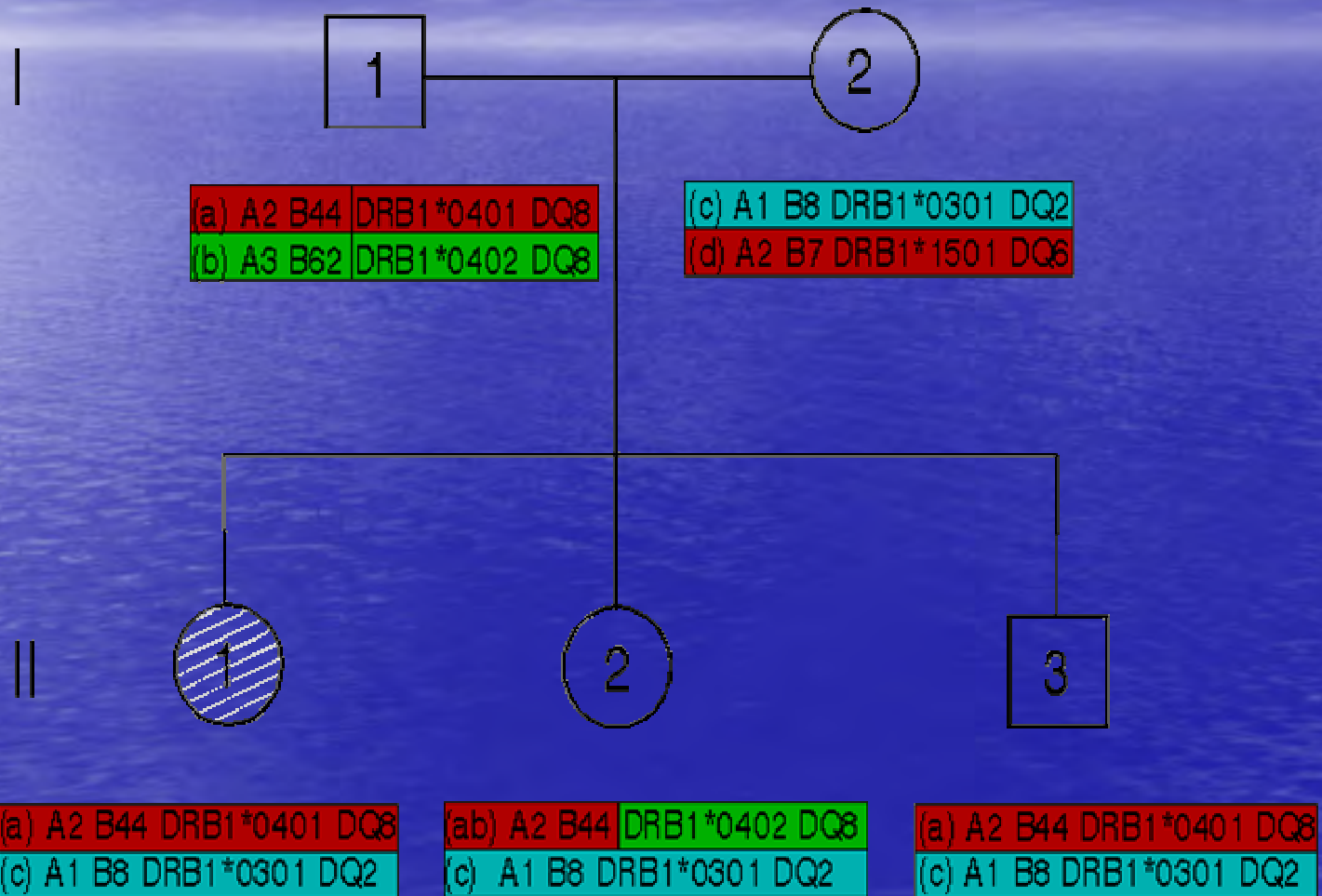
- aGvHD je še vedno poglavitni toksični efekt presaditve KMC. Pojavi se v prvih 100 dneh po posegu in je lahko blage narave (I-II), lahko pa tudi življenjsko nevarna za bolnika (III-IV).
- Začetek aGvHD sprožita poškodba prejemnikovih tkiv in aktivacija njegovih imunskih celic (MΦ) po kondicioniranju.
- Sledi aktivacija darovalčevih imunskih celic (limfociti T) – efektorjev, ki napadejo prejemnikovo tkivo.
- Simptomi: kožni izpuščaji – vnetje (najprej dlani in podplati); vnetje ustne sluznice; krči, navzeja in diareja (vnetje želodčne in črevesne sluznice); zlatenica (prizadetost jeter).



KRONIČNA BOLEZEN PRESADKA ZOPER GOSTITELJA (cGvHD)

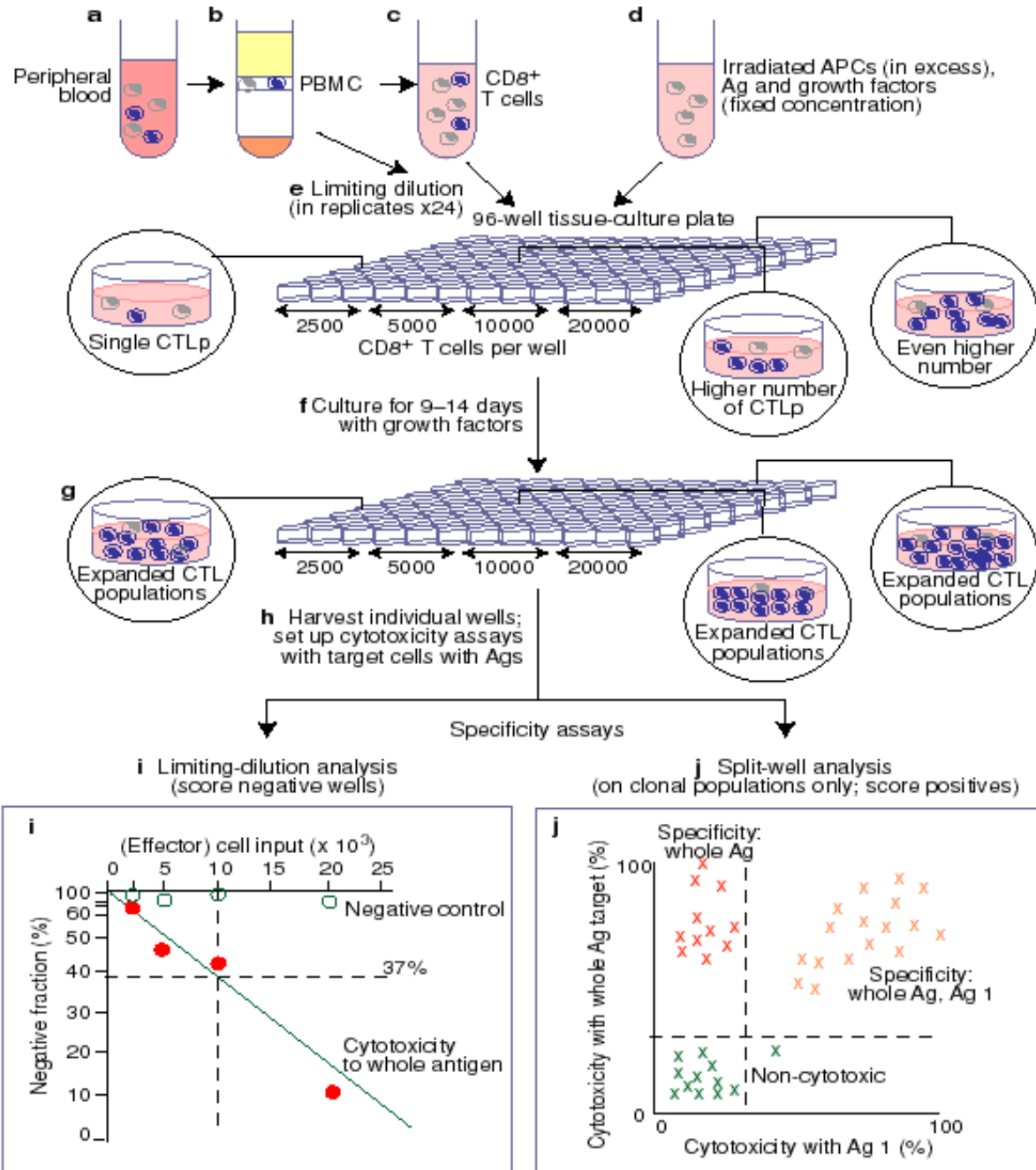
- cGvHD se lahko pojavi kadarkoli v ali po obdobju 3 mesecev po presaditvi KMC. Pogosteje zbolijo tisti bolniki, ki so preboleli aGvHD. Gre za bolezen, ki lahko poteka v blagi ali pa celo življenje ogrožajoči obliki. Je lahko zelo dolgotrajna. Včasih je cGvHD težko prepoznati, pomembno pa je, da jo začnemo zdraviti čim prej.
- cGvHD lahko pri transplantiranih bolnikih sproži tudi sončna opekline, zato morajo biti ustrezno zaščiteni.
- Najpogostejši simptomi cGvHD so: kožni izpuščaji ali spremembe barve in teksture kože; suhe oziroma vzdražene oči; bolečina, suhost ali občutljivost v ustih. Manj pogosto pa se pojavljajo: tanjšanje las; krhkost, lomljivost ali pa spremenjena struktura nohtov; suha ali pretirano občutljiva vaginalna sluznica; slabost, bruhanje, diareja, izguba apetita ali pa nepojasnjena izguba telesne teže.
- Pri napredovanih oblikah cGvHD lahko postane koža trda in napeta, določeni sklepi pa otrdeli in neiztegljivi.
- Zdravljenje: kortikosteroidi + ciklosporin.

GENOTIPIZACIJA DRUŽINSKIH ČLANOV



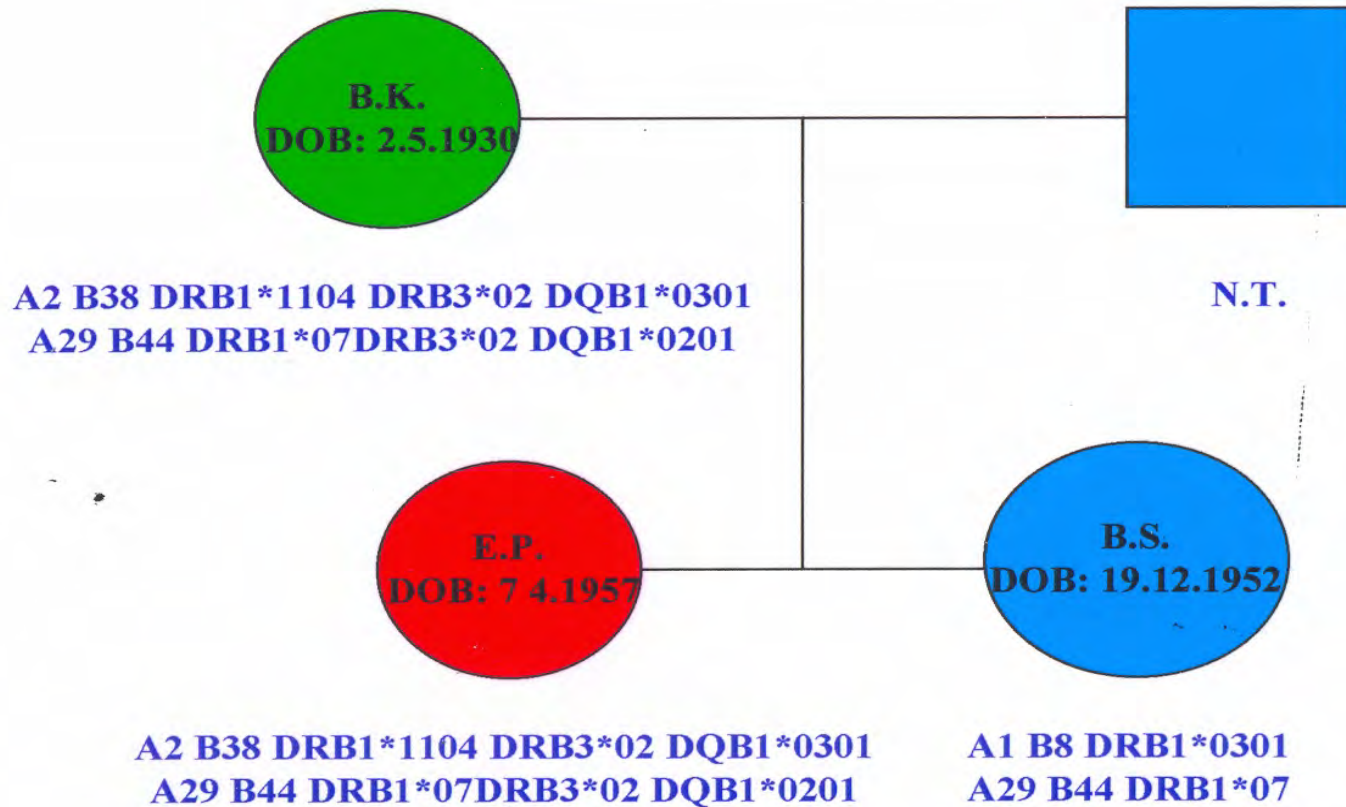
UGOTAVLJANJE TKIVNE SKLADNOSTI: FUNKCIJSKI TESTI

- *Enosmerna in dvosmerna reakcija v kulturi pomešanih limfocitov: preverjamo skladnost v antigenih HLA razreda II (proliferacija).*
- *Določanje frekvenc predhodnikov celic T pomagalk: vrednotimo aloreaktivnosti prejemnika in darovalca glede na razlike v molekulah HLA razreda II in celo v minor histokompatibilnostnih antigenih (količina IL-2).*
- *Določanje frekvenc predhodnikov citotoksičnih limfocitov T: preverjamo aloantigenski potencial razlik v molekulah HLA razreda I (citotoksičnost - ^{51}Cr).*
- *Analiza tetra- ali pentamerov: kvantitativno določamo specifične klone CD8+ limfocitov T (pretočna citometrija).*
- *Test ELISPOT: določamo število specifično reaktivnih CD4+ in CD8+ limfocitov T (sproščeni citokini – tehnika ELISA).*



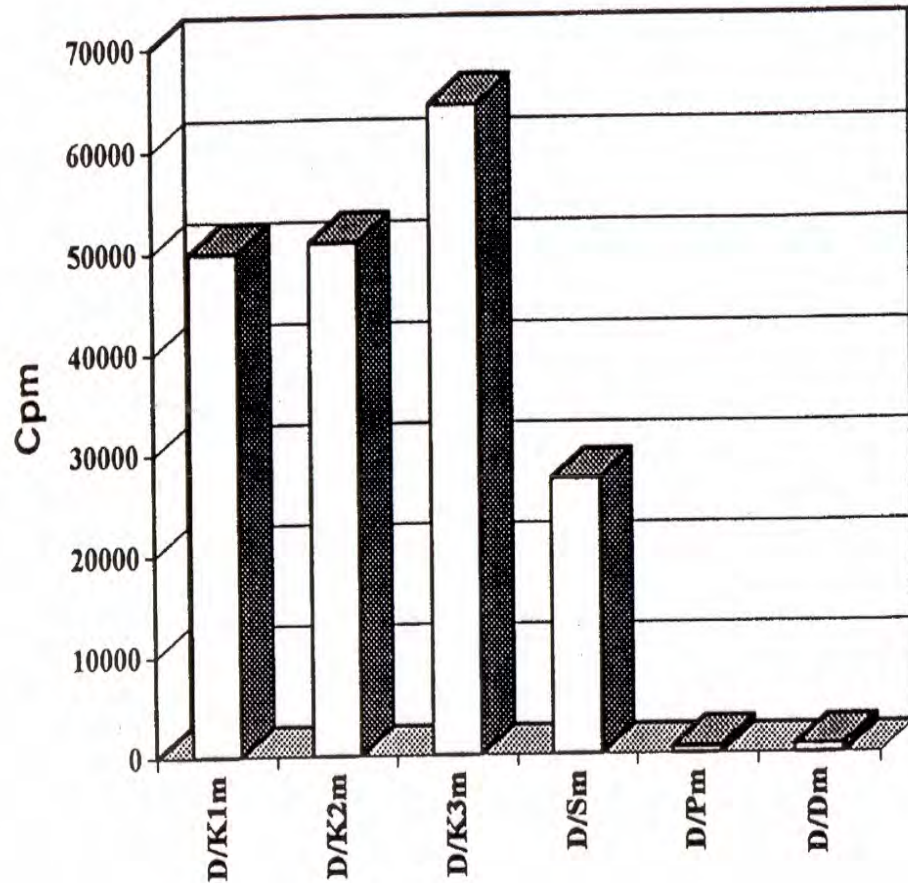
Limiting-dilution analysis and split-well analysis of human cytotoxic T lymphocytes (CTLs)

FAMILY KOT. - PER.

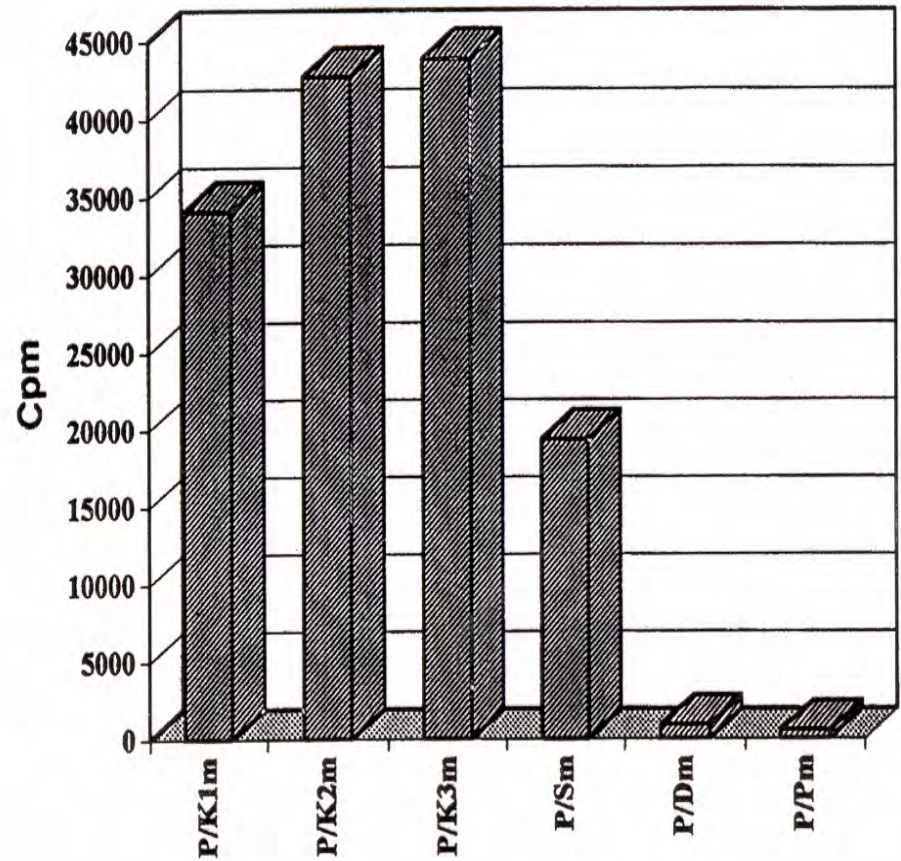


**DONOR - MOTHER: 62 YEARS OLD, DG: MULTIPLE SCLEROSIS
TRANSPLANTATION: 1.10.1992, NO aGvHD, LIMITED cGvHD**

PATIENT E.P.: MLC

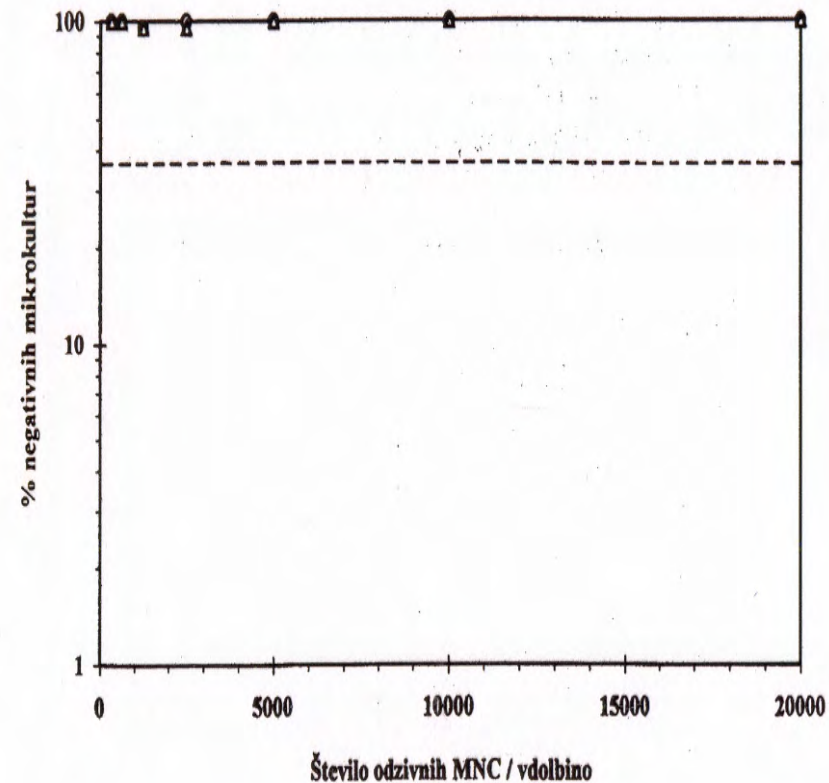


S.R.R. GvH: 0 %

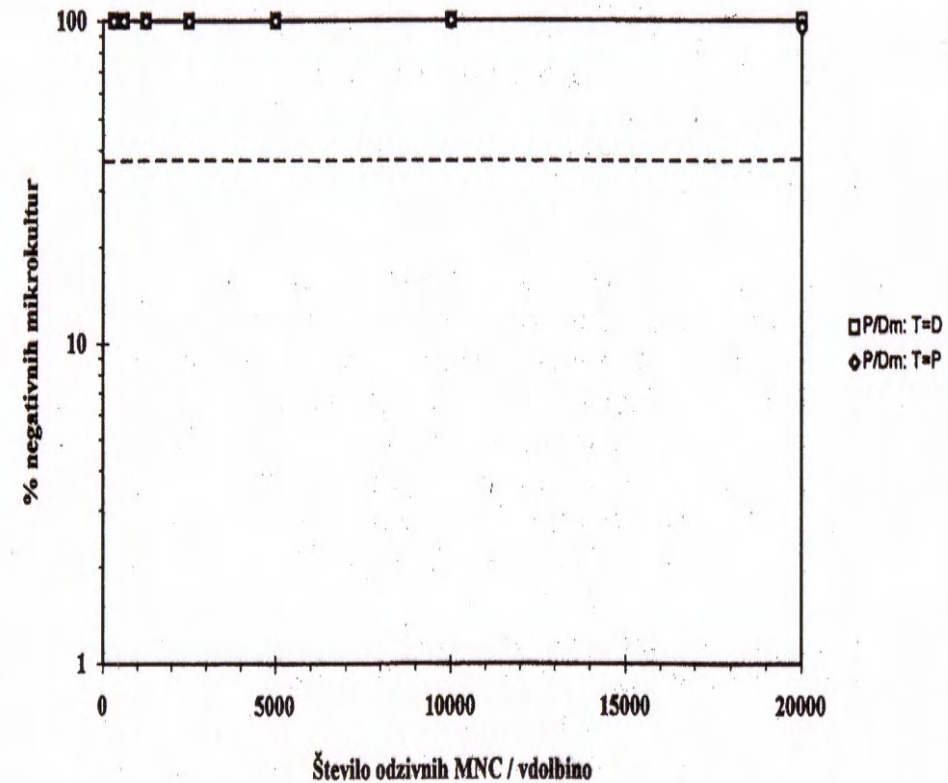


S.R.R. HvG: 1 %

PATIENT E.P.: CTLp

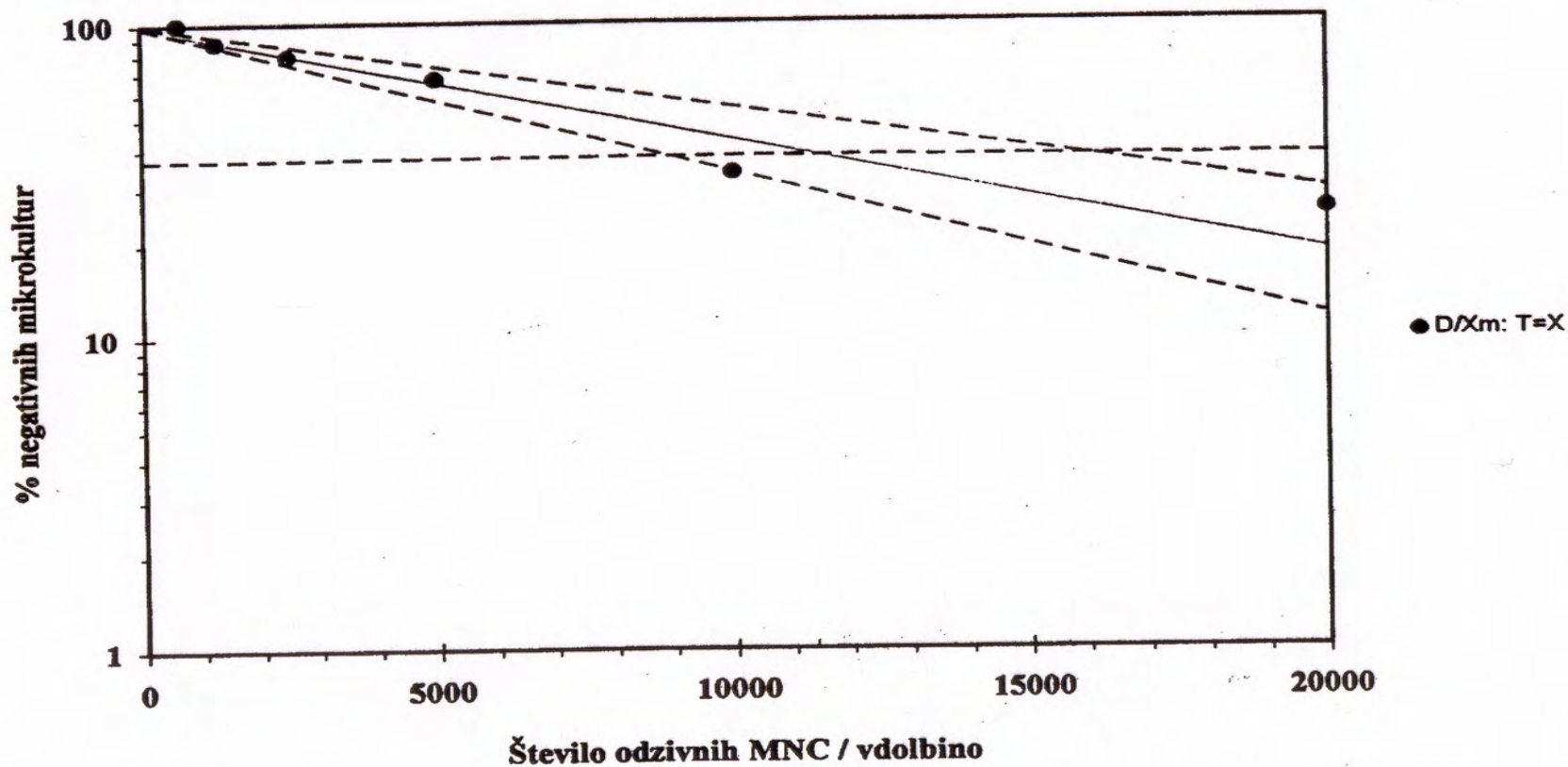


CTLp f GvH: 0



CTLp f HvG: 0

DONOR B.K.: CONTROL CTLp



88 CTLp / 10^6 MNC

TIPIZACIJA HLA NESORODNIH DAROVALCEV

HLA TYPING OF UNRELATED INDIVIDUALS

Haplotype			Haplotype		
A2	B7	DR15	A2	B44	DR11
0201	0701	1501	0201	4402	1101
0202	0702	1502	0202	4403	1102
0203	0703	1503	0203	4404	1103
0204	0704	1504	0204	4405	1104
0205	0705		0205	4406	1105
0206			0206		1106
0207			0207		1107
0208			0208		1108
0209			0209		1109
0210			0210		1110
0211			0211		1111
0212			0212		1112
0213			0213		1113
0214			0214		1114
0215			0215		1115
0216			0216		1116
0217			0217		1117
					1118
					1119

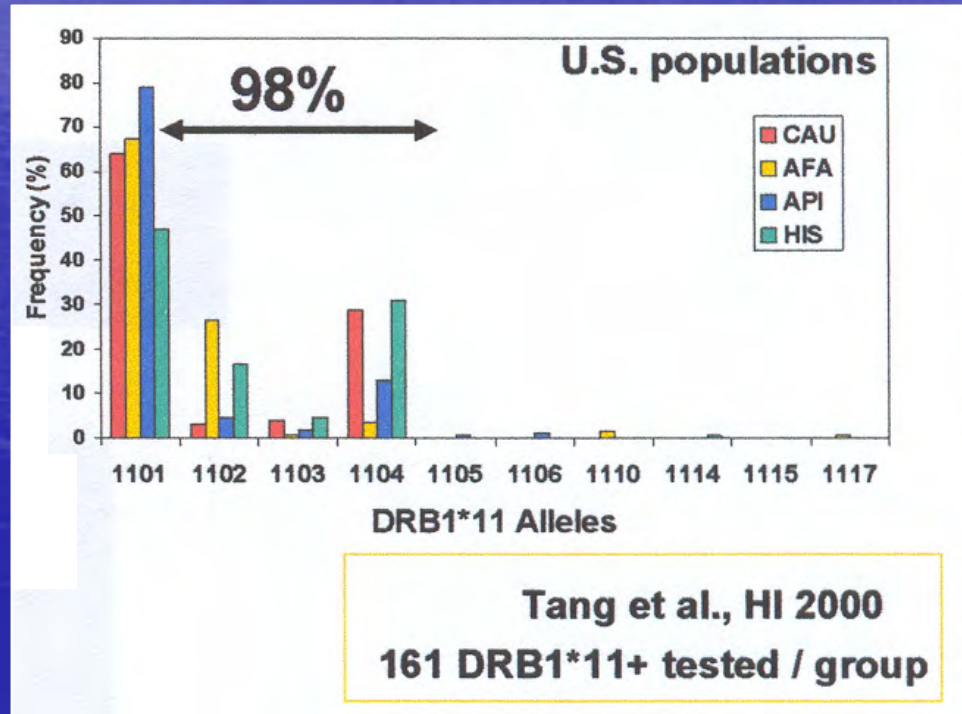
340 možnih kombinacij

1615 možnih kombinacij

[Nomenclature for factors of the HLA system, 1995.
Tissue Antigens 46: 1-18, 1995]

ALELI IN HAPLOTIPI HLA SO ETNIČNO SPECIFIČNI

● Posamezni aleli so pogostejši znotraj določene populacije, drugi pa zelo redki (pri iskanju nesorodnih darovalcev moramo upoštevati znane genske in haplotipske frekvence)



OPTIMALNA TKIVNA SKLADNOST PRI NESORODNI TRANSPL. KMC

- še vedno dileme (8/8, 10/10, 12/12) - vsekakor čimveč;
- studies evaluating survival regarding the influence of alleles within different HLA loci - lack of exclusive HLA-DQ and/or -DP impact on survival;
- odvisno tudi od starosti, vrste bolezni, vira KMC, krvnih skupin, itd.;

HLA Gene	Match
A	allele
B	allele
C	allele
DRB1	allele
DRB3/4/5	-
DQ(A1+B1)	(allele)
DP(A1+B1)	-

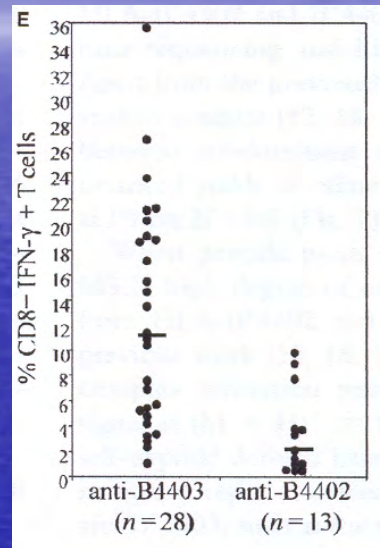
PRESAJANJE TKIVNO NESKLADNIH NESORODNIH KMC

- *Včasih za bolnike z redkimi aleli/haplotipi HLA, ki imajo slabe možnosti za to, da bi jim našli tkivno skladnega nesorodnega darovalca.*
- *Odvisno tudi od vrste in faze bolezni, starosti bolnika, transplantacijskega protokola, vira KMC, ...*
- *Ali so vsa neujemanja v molekulah HLA enakovredna (različni lokusi, antigeni, aleli)?*
- *Neujemanja vedno predstavljajo tveganje za nastanek GvHD, toda če jih skrbno izberemo in ovrednotimo je lahko presaditev KMC uspešna.*
- *Katera neujemanja so v resnici sprejemljiva? Funkcijski testi tkivne skladnosti!*
- *Presajanje popkovnične krvi je poseben primer (nezrele KMC in imunske celice v presadku).*

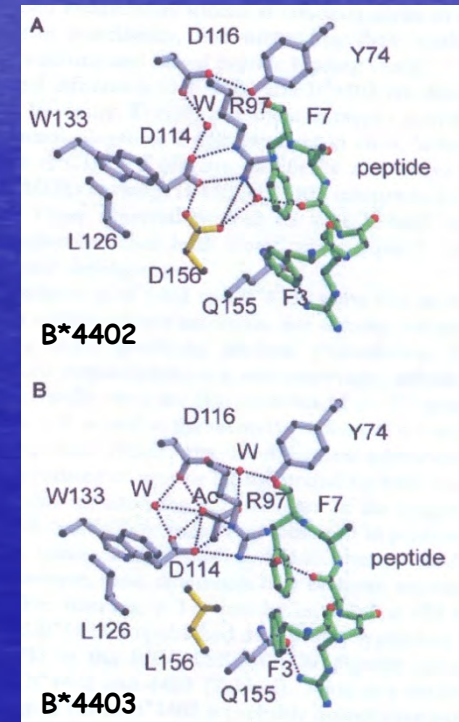
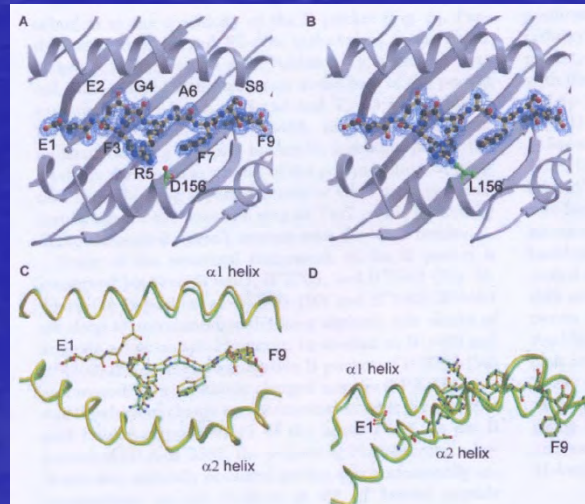
PRIMER VPLIVA ALELSKEGA NEUJEMANJA NA VEZAVO PEPTIDOV IN ALOREAKTIVNOST

- Edina razlika med B*4402 in B*4403: Asp156/Leu156
- Čprav imata oba alela > 95 % skupnega antigenskega peptidnega repertoarja, lahko B*4403 predstavlja različnejše peptide kot B*4402 – zato močnejša aloreaktivnost zoper B*4403
- Minimalna rzlika med obema aleloma spremeni tako peptidni repertoar kot tudi prepoznavanje s strani limfocitov T.

J Exp Med 2003; 198(5): 679-91



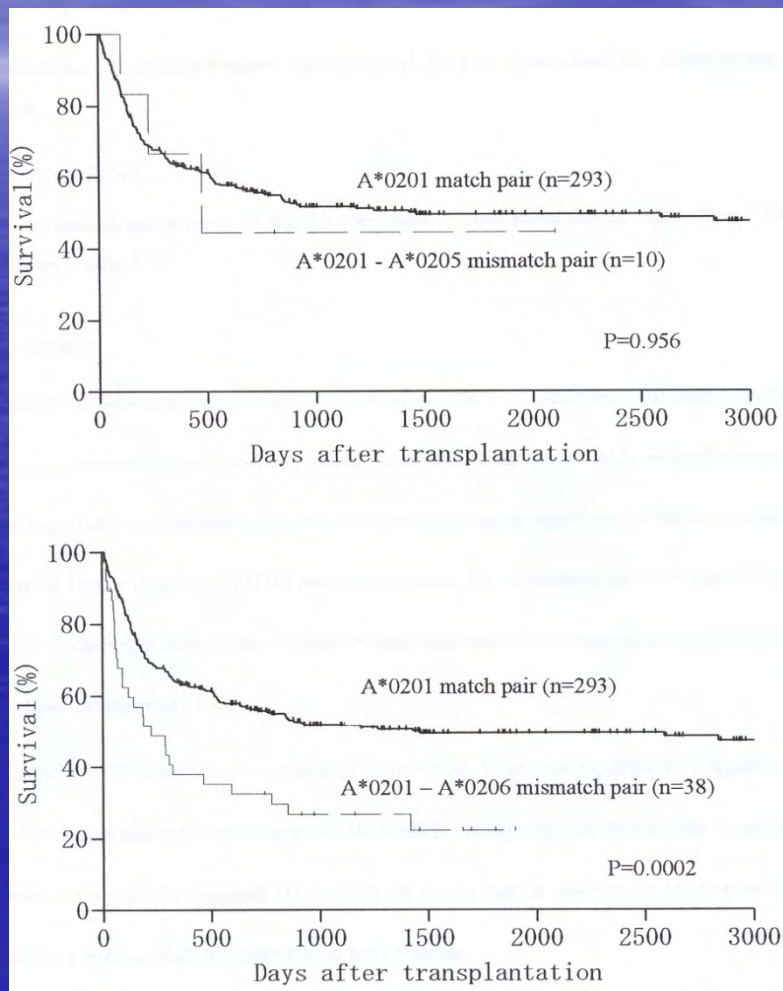
B*4402: Cw*0501 ali Cw*0704
 B*4403: Cw*0401, Cw*1403 ali Cw*1601

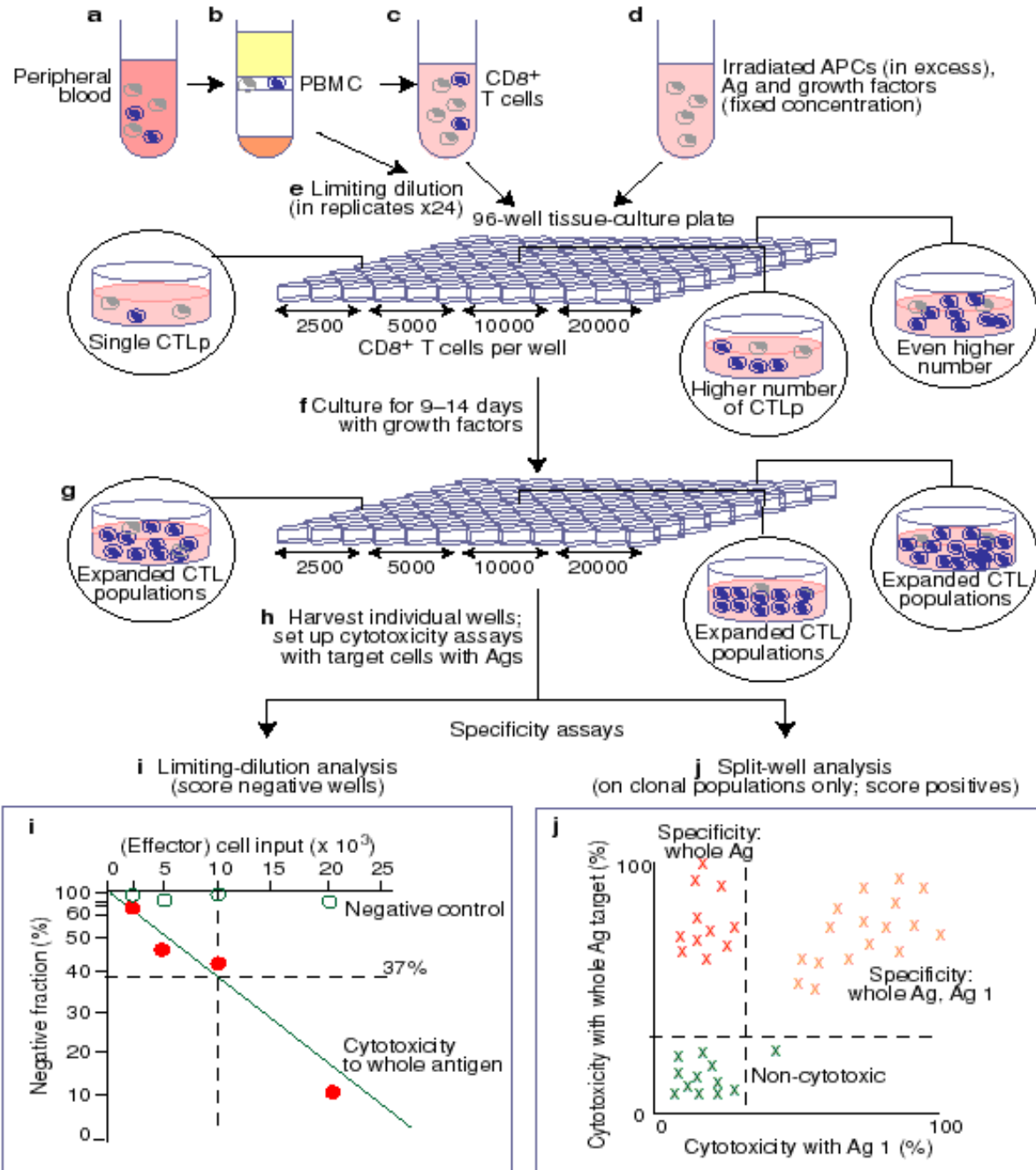


B44 alelsko skladni pari:
12 % neujezanje v lokusu C

ENO SAMO ALELSKO NEUJEMANJE LAHKO ODLOČILNO VPLIVA NA PREŽIVETJE BOLNIKA PO PRESADITVI NESORODNIH KMC

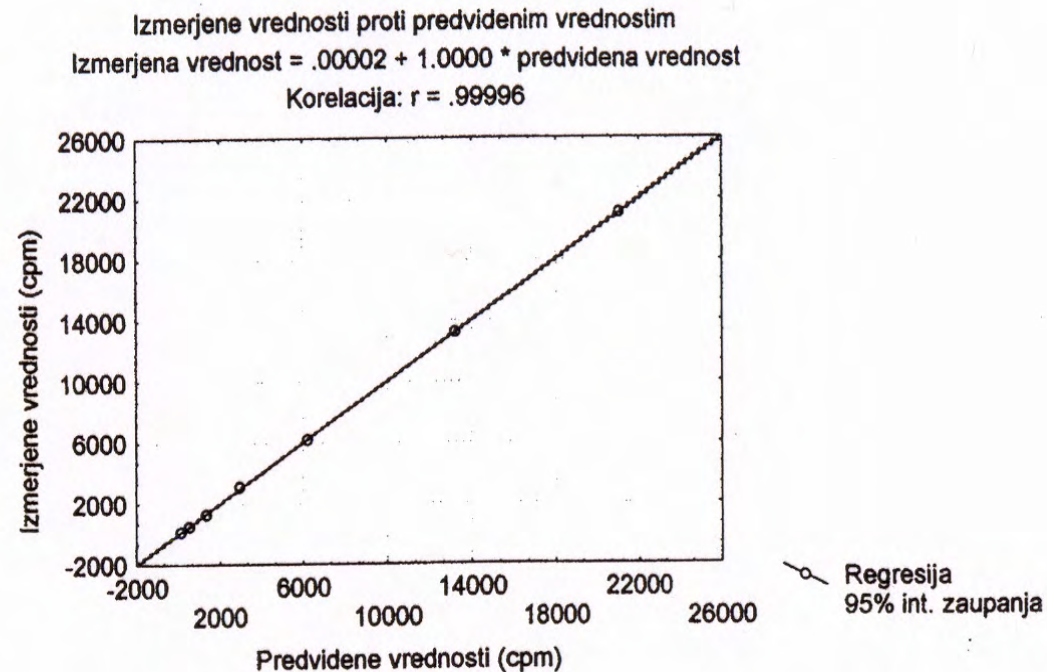
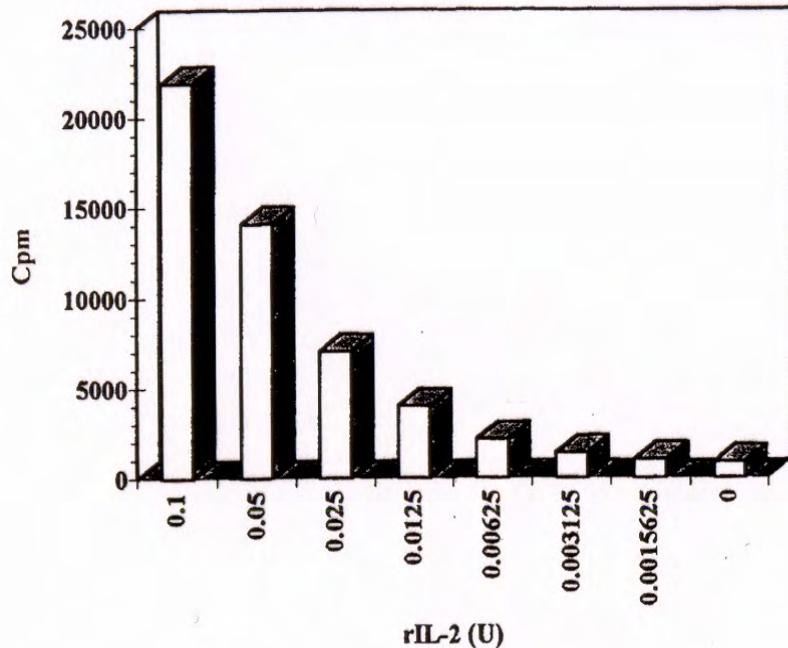
- *A*0201 in A*0205 pogosta, A*0206 pa redek med belci.*
- *Vpliv posameznega alelskega neujemanja na preživetje bolnikov s KML.*





Limiting-dilution analysis and split-well analysis of human cytotoxic T lymphocytes (CTLs)

HTL_p FREQUENCY ANALYSIS



Step-wise linear regression with a break point:

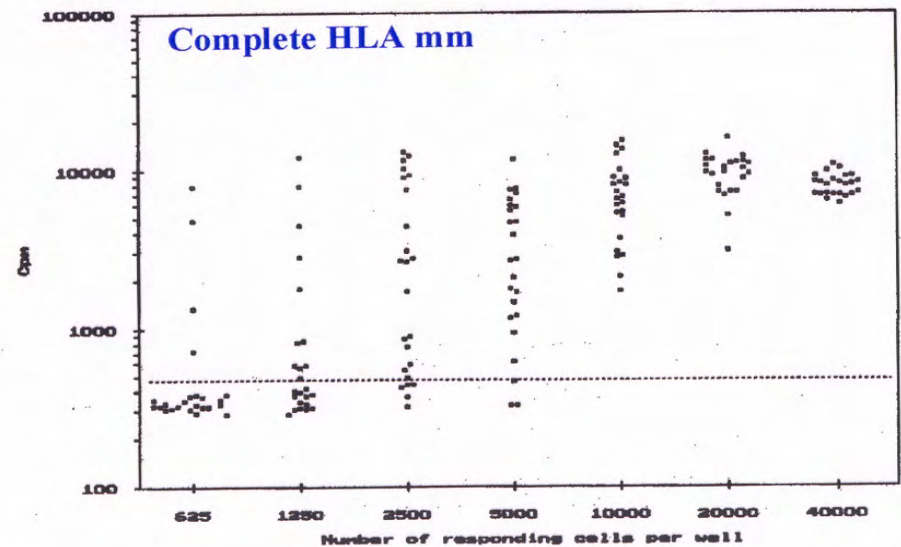
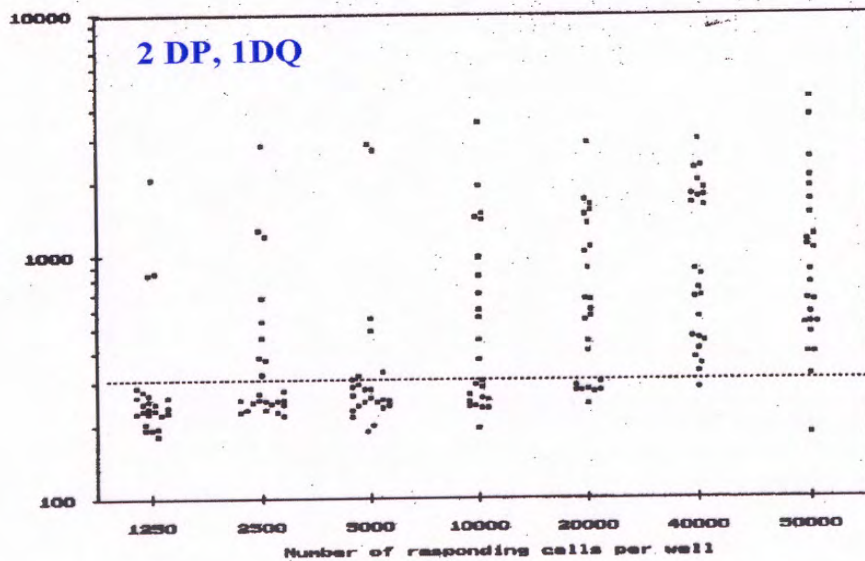
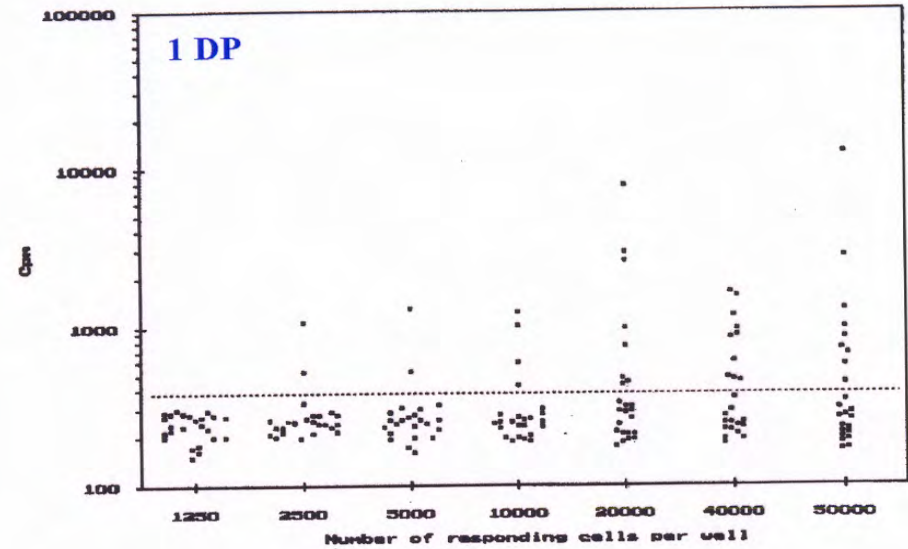
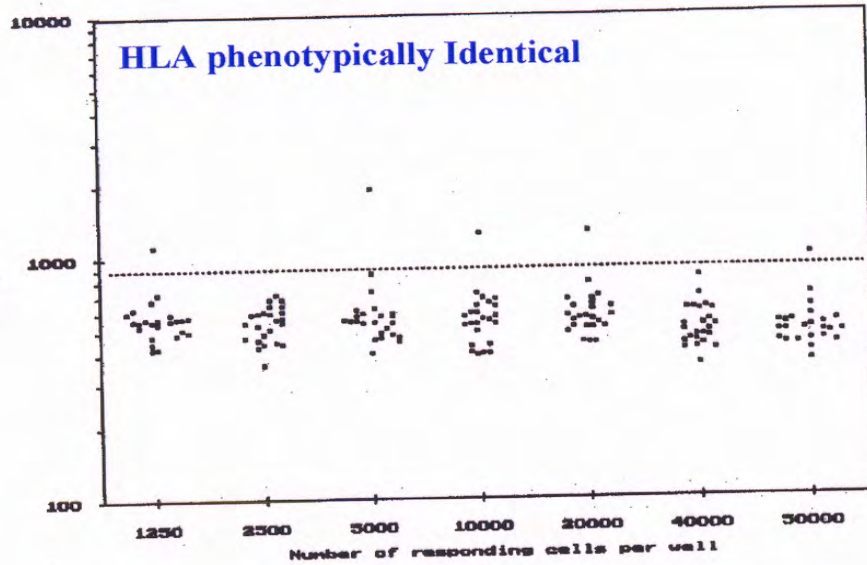
$$X_1 = (y + 274.9) / (259868.4)$$

$$X_2 = (y - 5414) / (156280)$$

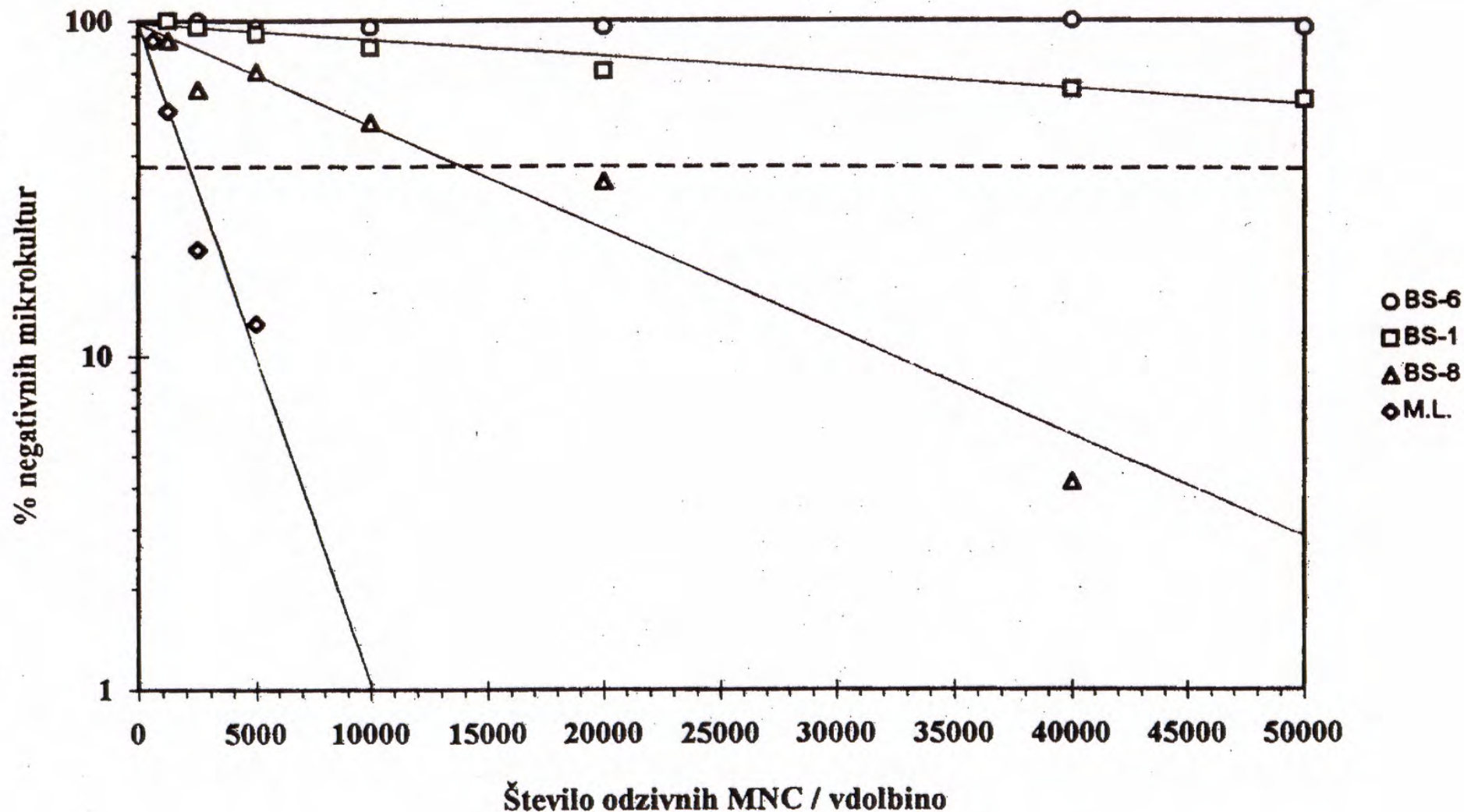
Break point: $y = 6498$

$$R = 0.9999$$

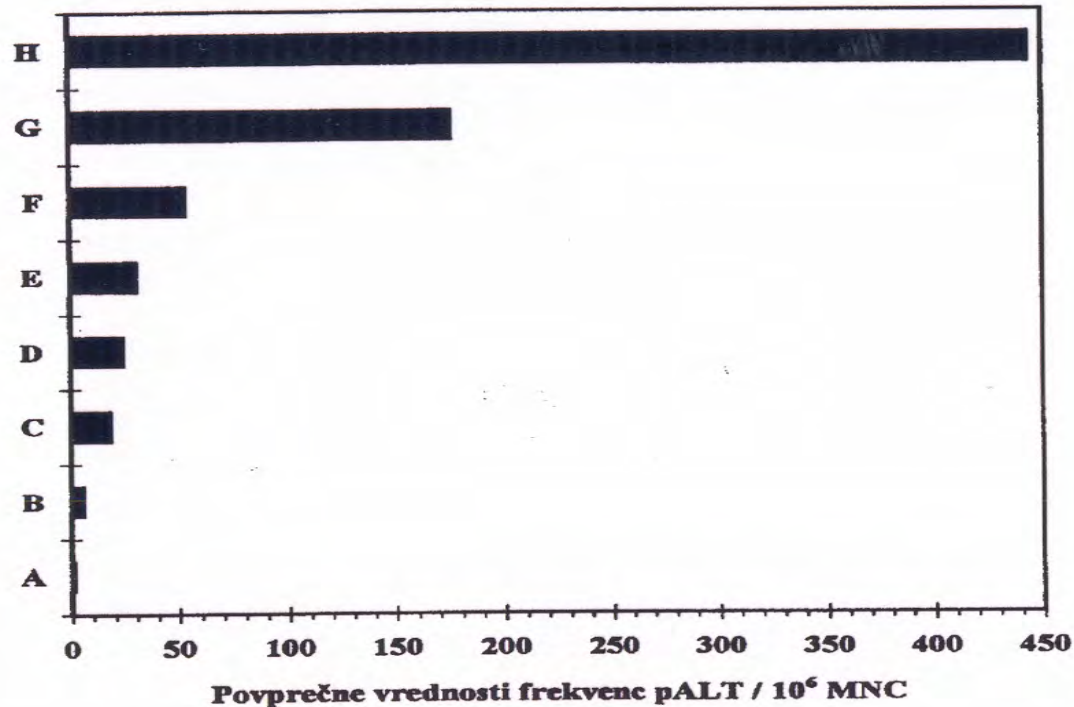
THE PERFORMANCE OF THE HTL_p FREQUENCY ANALYSIS



THE PERFORMANCE OF THE HTL_p FREQUENCY ANALYSIS

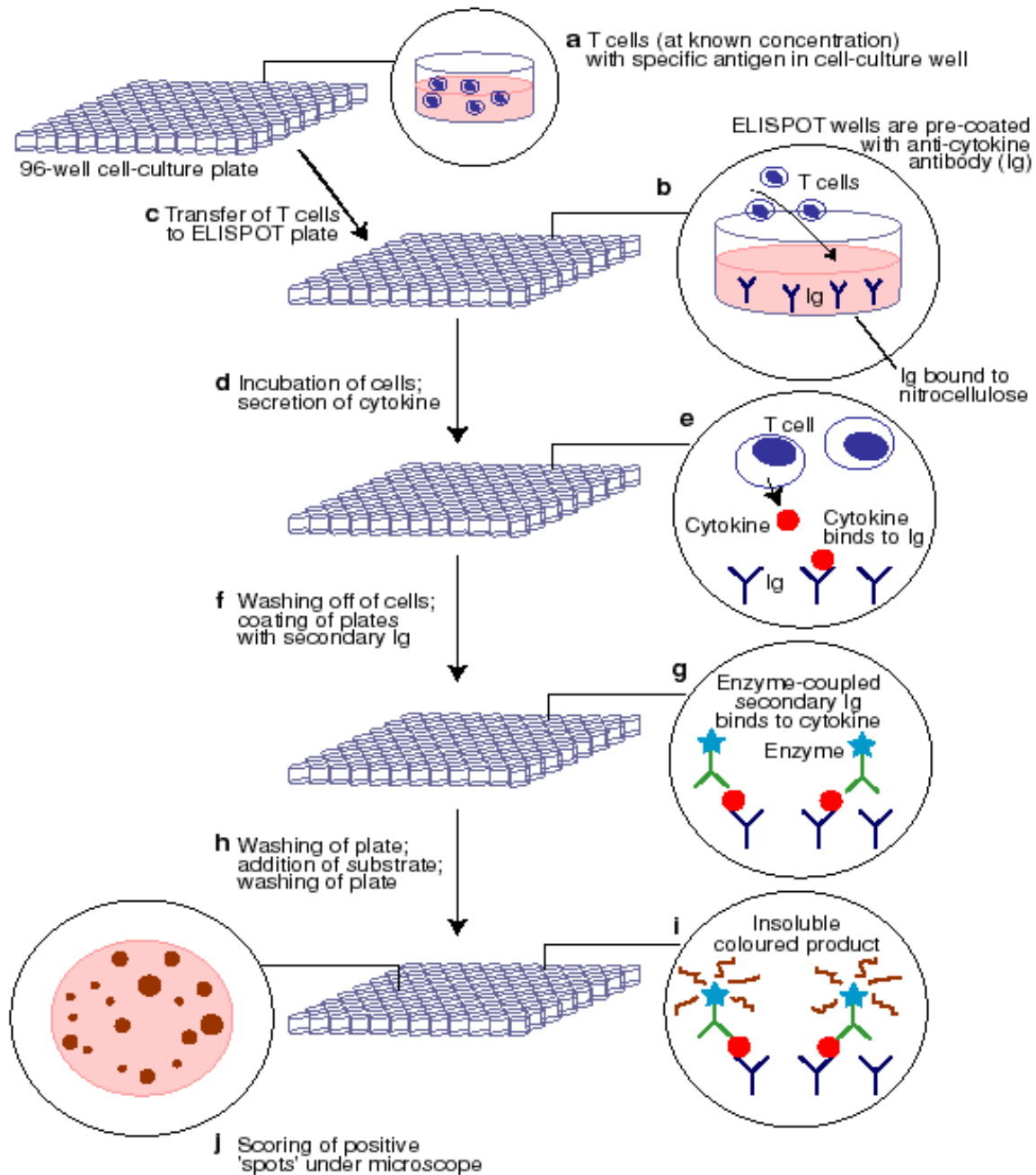


HTLp FREQUENCIES - HLA ALLOIMMUNE HIERARCHY

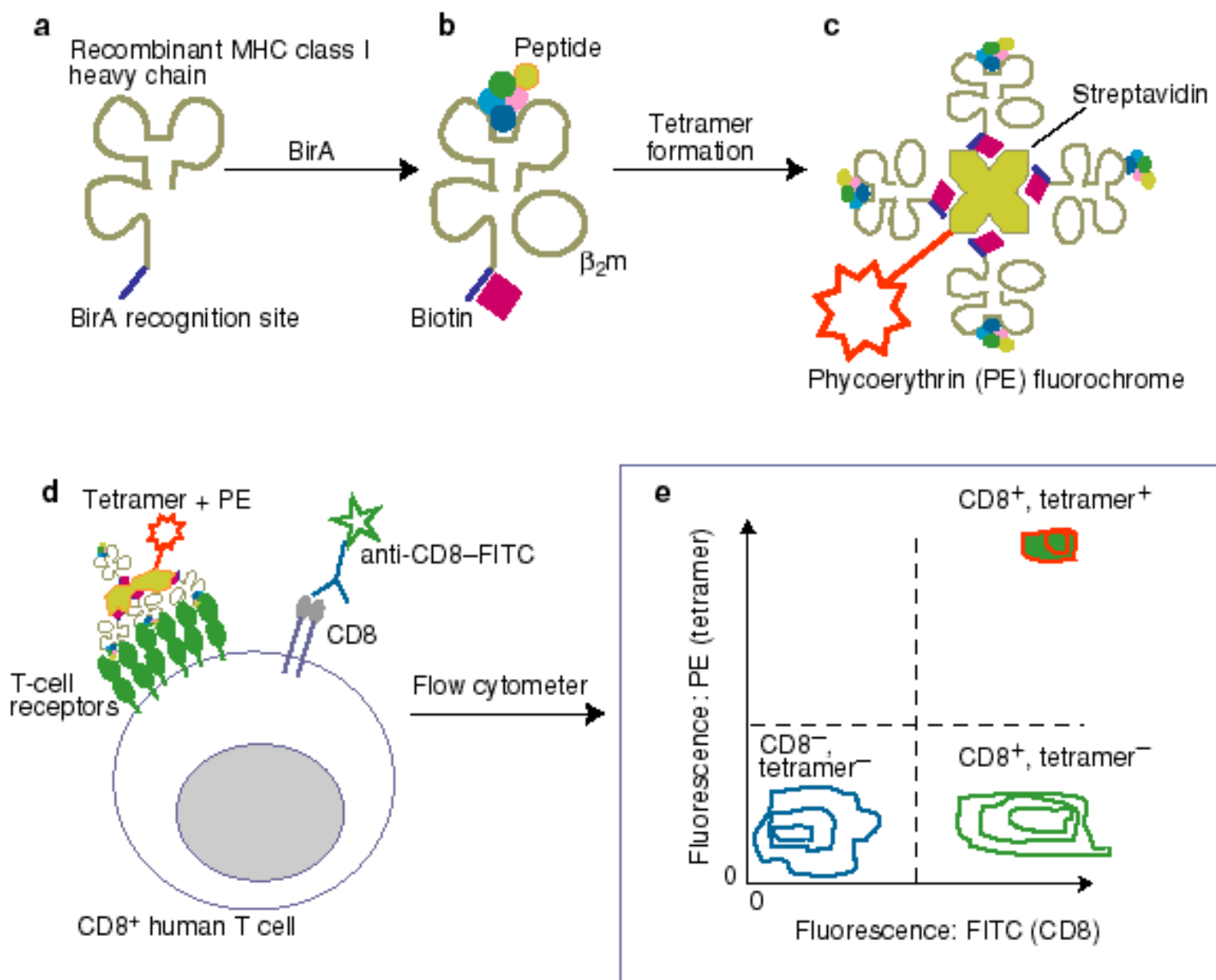


Razlike v molekulah HLA : **Število primerov (N) :** **Povprečne f pALT :**

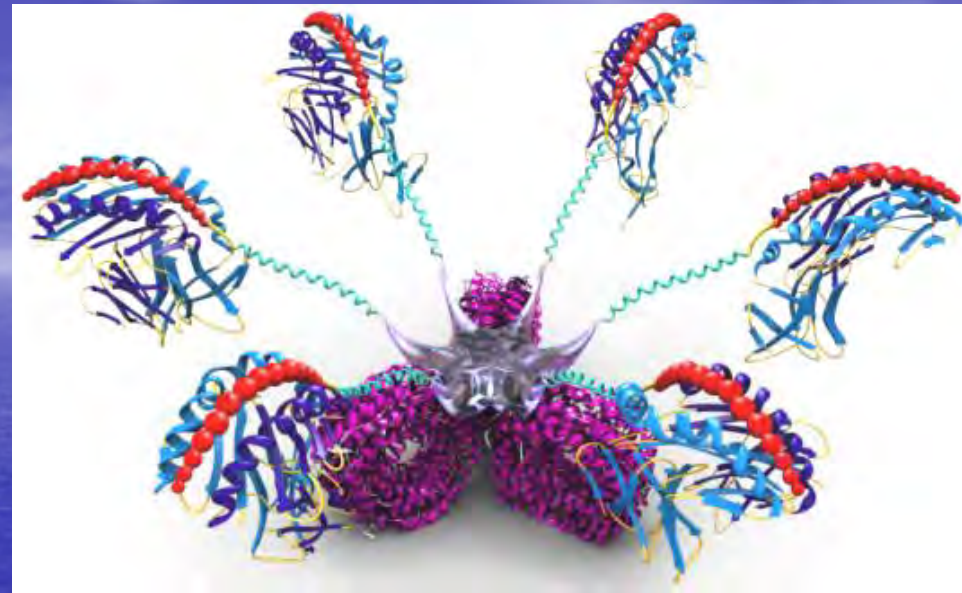
A: NIČ + KOMPATIB.	$2 + 2 = 4$	2
B: 1B + 2B	$1 + 2 = 3$	6
C: 1DQ + 1B, 1DQ	$3 + 2 = 5$	19
D: 1DP	29	25
E: 1B, 1DP + 1DP, 1DQ + + 1B, 1DP, 1DQ	$2 + 2 + 1 = 5$	31
F: 2DP + 2DP, 1DQ	$3 + 2 = 5$	54
G: 1B, 1DR + 1B, 1DR, 1DQ + + 1B, 1DR, 1DQ, 1DP	$1 + 4 + 2 = 7$	176
H: VSE	11	444



ELISPOT assay to quantify secretion of cytokines by T lymphocytes (T cells)

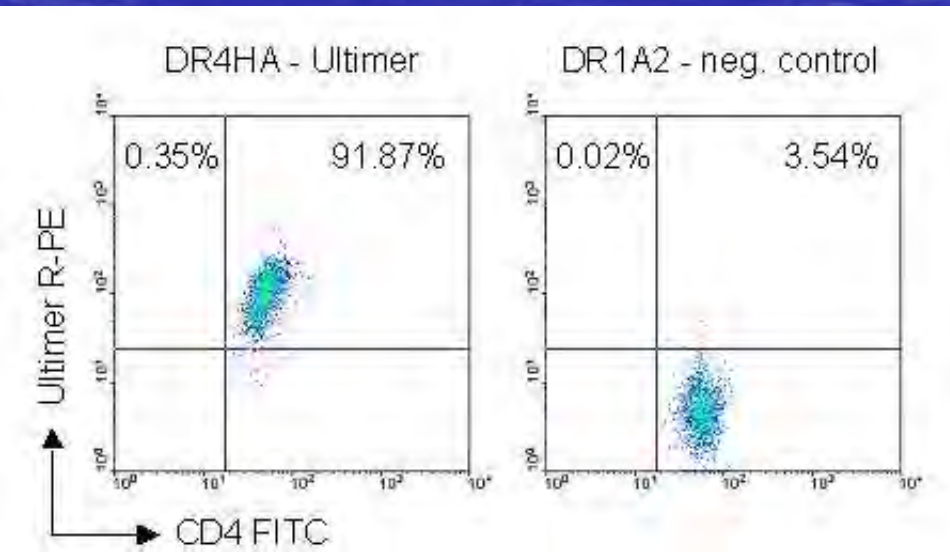
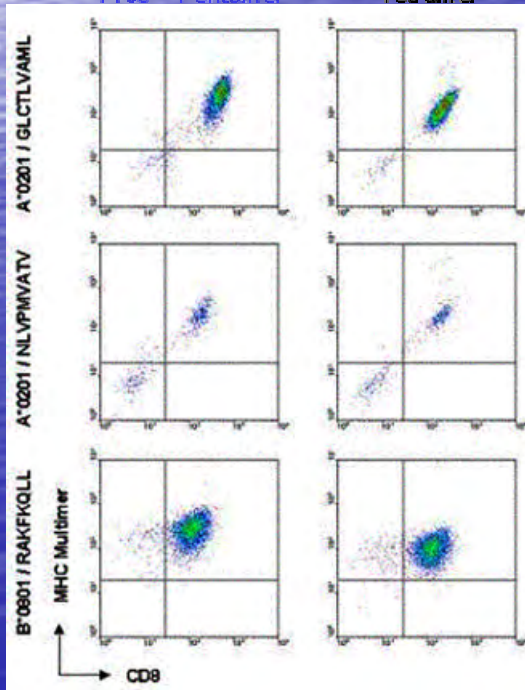


Tetramer analysis to detect T lymphocytes (T cells) that have specific T-cell receptors on their cell surface



Pro5™ Pentamer

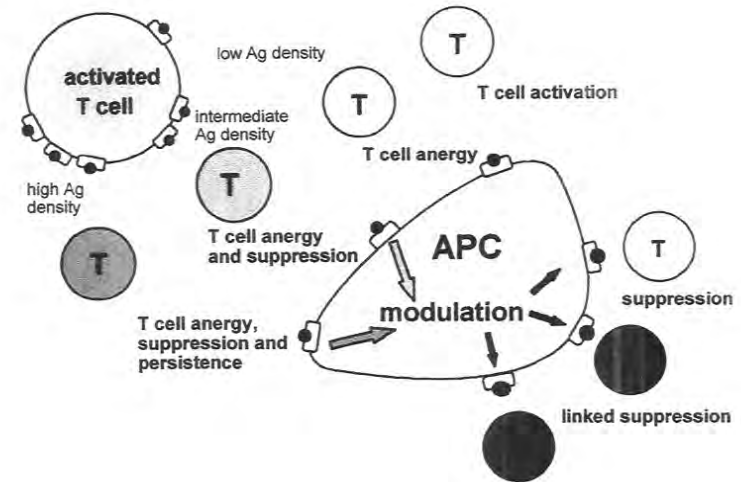
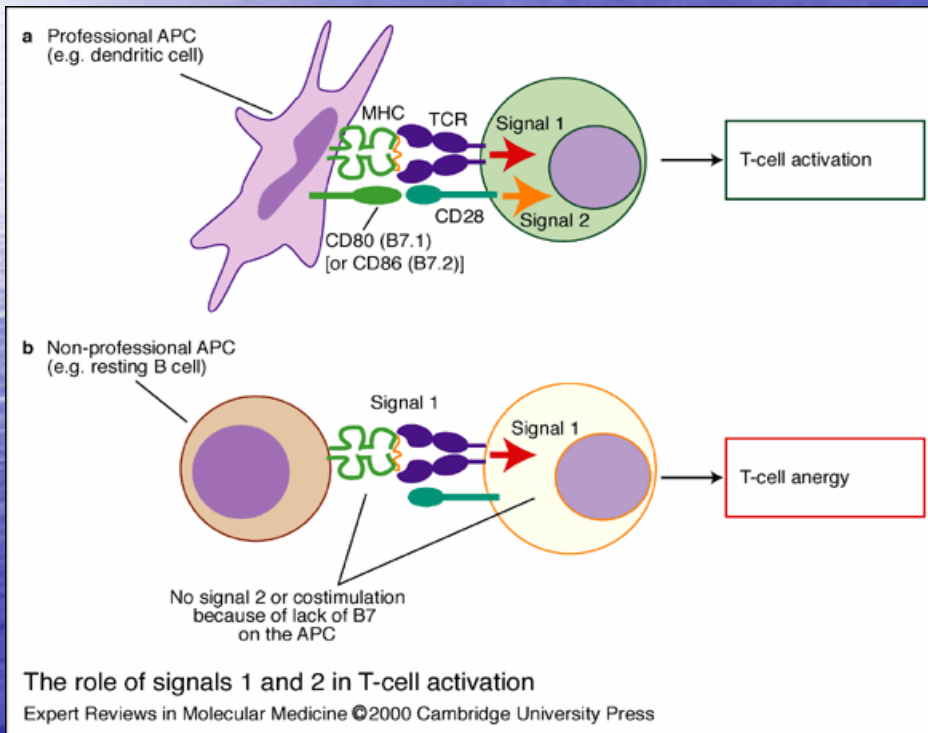
Tetramer



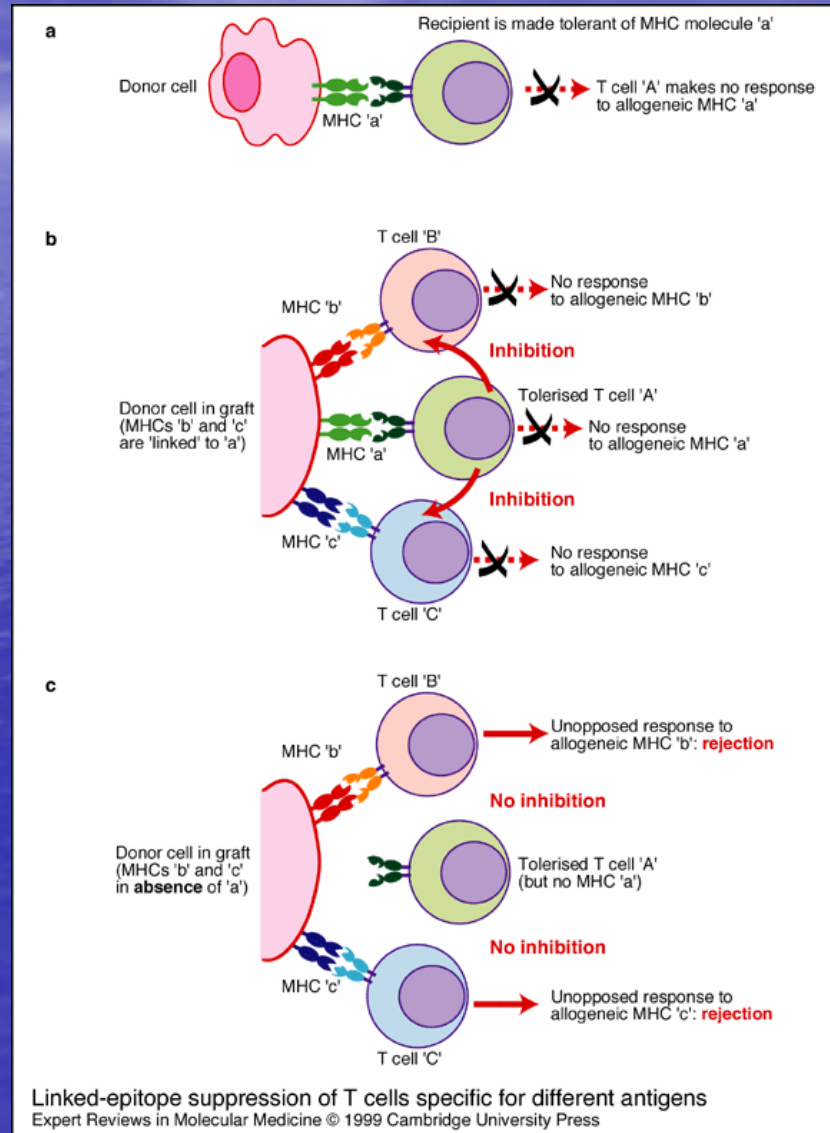
TRANSPLANTACIJSKA TOLERANCA IN ALOIMUNSKA NEODZIVNOSTI

- *osrednja (timus) in periferna toleranca (DC v tkivih in organih, jetrne sinusoidalne endotelijske celice ...) – delecijska, nedelecijska; ključna vloga mikrookolja s prisotnostjo topnih dejavnikov (npr. IL-10, prostaglandin E2, TGF- β).*
- *neodzivnost ali anergija: pomanjkanje ali odsotnost kostimulacijskih molekul (nezrele DC, neprofesionalne APC).*
- *nastanek in delovanje različnih vrst regulacijskih (supresorskih) limfocitov T: CD8+CD28- in CD4+CD25+.*
- *vpliv transfuzije krvi na aloimunski odziv: ujemanje v eni od molekul HLA-DR med krvodajalcem in prejemnikom vodi v toleranco (regulacijski limfociti T, ki zavirajo APC).*
- *nastanek in delovanje celičnih in protitelesnih idiotipskih mrež.*
- *uporaba spremenjenih peptidnih ligandov, ki so antagonisti ali delni agonisti pravih antigenskih agonistov (velika strukturna podobnost) – suboptimalna koncentracija antigenov).*
- *najperspektivnejša je manipulacija DC (gojenje in vitro, transfekcija genov): samovzdržujoča se povratna zanka, v kateri tolerogene (nezrele) DC inducirajo nastanek regulacijskih CD4+CD25+ limfocitov T, le-ti pa vplivajo na nastanek novih tolerogenih DC iz njihovih predhodnikov (navzkrižna toleranca).*

MEHANIZMI NASTANKA IN ŠIRJENJA CELIČNE NEODZIVNOSTI IN TOLERANCE

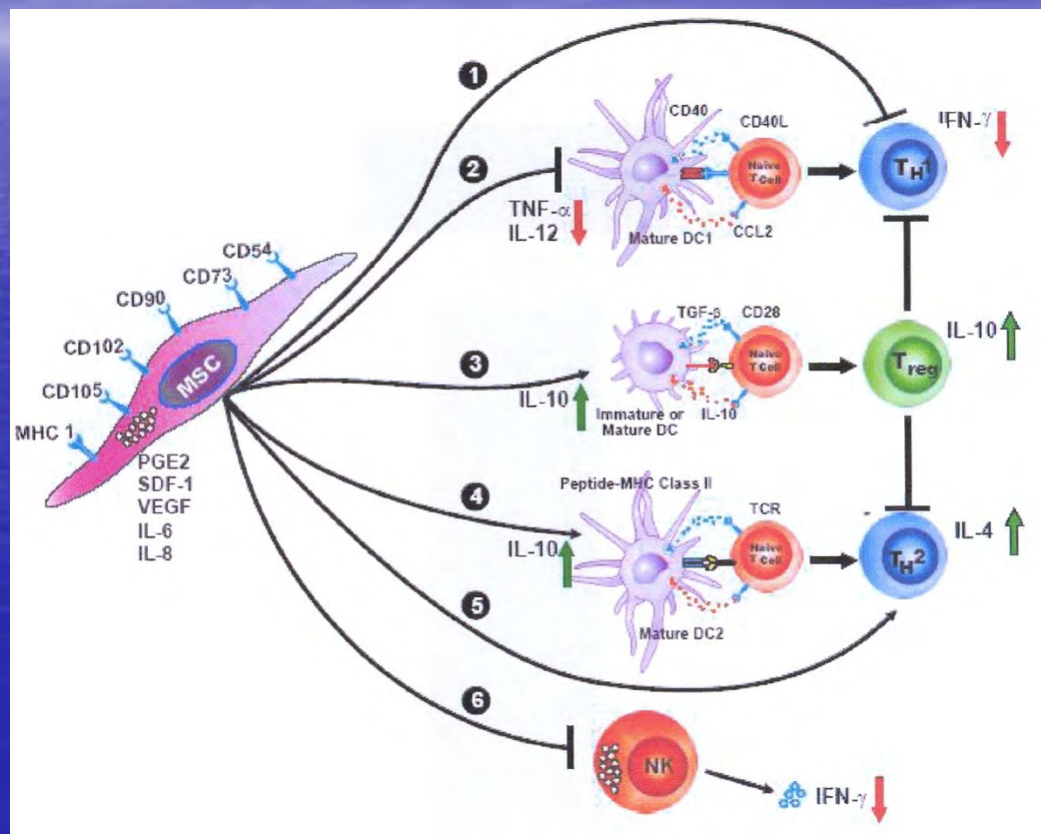


MEHANIZMI NASTANKA IN ŠIRJENJA CELIČNE NEODZIVNOSTI IN TOLERANCE



MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE KOT ZAVIRALKE ALOIMUNSKEGA ODZIVA

Mezenhimske matične celice (MSC), osamljene iz kostnega mozga ali popkovnične krvi oziroma iz popkovnice lahko namnožimo *in vitro* ter jih uporabimo kot supresivne modulatorje aloimunskih odzivov po presaditvi nesorodnih KMC.



ZAKLJUČEK

- *Prizadevanja za obvladovanje in prikrojevanje mehanizmov aloimunskega prepoznavanja in aloreaktivnosti: indukcija specifične tolerance na presajeno tkivo, npr. s tolerogenimi peptidi, z modulacijo imunskega odziva, s specifičnimi monoklonskimi protitelesi za blokado kostimulacijskih signalov (npr. anti-CD28 na limfocitih T).*
- *Prizadevanja za ločitev neželene aGvHD od zaželene GvM.*
- *Specifičnejša imunosupresija.*
- *Nove možnosti: ksenotransplantacija (transgenske živali, nevarnost prenosa živalskih retrovirusov, problemi zavračanja, etična in socialna vprašanja); tkivno inženirstvo (uporaba pluripotentnih matičnih in tkivno specifičnih progenitornih celic za regeneracijo okvarjenih tkiv in organov - izdelava živih tkivnih in organskih nadomestkov in vitro); terapevtsko kloniranje (etična in moralna vprašanja, varnost).*

ZAKLJUČEK

● *Nove možnosti:*
kxenotransplantacija (transgenske živali, nevarnost prenosa živalskih retrovirusov, problemi zavračanja, etična in socialna vprašanja);
tkivno inženirstvo (uporaba pluripotentnih matičnih in tkivno specifičnih progenitornih celic za regeneracijo okvarjenih tkiv in organov - izdelava živih tkivnih in organskih nadomestkov in vitro);
terapevtsko kloniranje (etična in moralna vprašanja, varnost).

