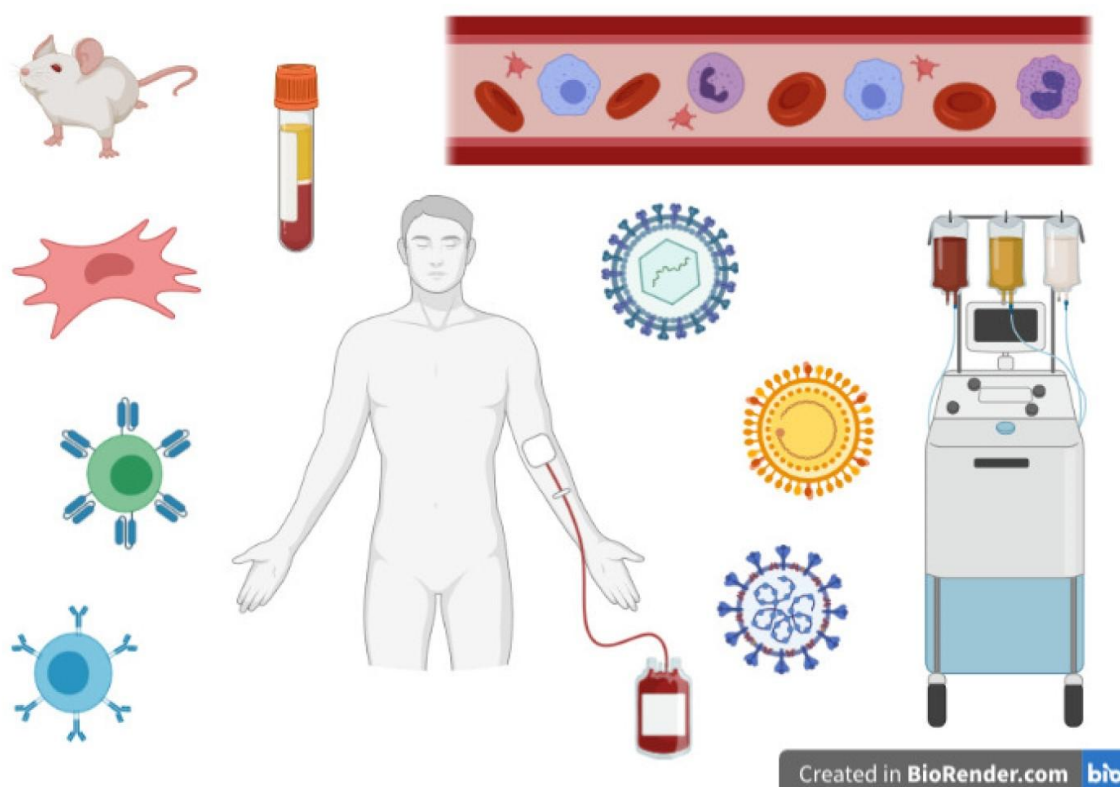




Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Blood Transfusion Centre of Slovenia

Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020

Zbornik prispevkov



Ljubljana, 29. maj 2020



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Blood Transfusion Centre of Slovenia

Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020

Zbornik prispevkov

Ljubljana, 29. maj 2020

Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020

Zbornik prispevkov

Ljubljana, 29. maj 2020

Uredniški odbor: Uroš Rajčević, Valerija Kovač, Snežna Levičnik Stezinar

Lektor: Marko Janša, Jezikovna zadruga Soglasnik

Naslovnica in oblikovanje: Valerija Kovač

Izdajatelj in založnik: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Šlajmerjeva 6, 1000 Ljubljana, 2020.

Elektronska izdaja. Zbornik dostopen na povezavi:

<http://www.ztm.si/raziskave-razvoj-izobrazevanje/strokovna-javnost/>

Organizacijski odbor dogodka: Uroš Rajčević, Valerija Kovač, Snežna Levičnik Stezinar

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID=22347267

ISBN 978-961-6596-21-3 (pdf)

RAZISKOVALNI dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020: Zbornik prispevkov, Ljubljana, 29. 5. 2020; [uredniški odbor: Uroš Rajčević, Valerija Kovač, Snežna Levičnik Stezinar]. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 2020

1. Gl. stv. nasl. 2. Rajčević, Uroš 3. Kovač, Valerija

Kazalo

Kazalo	i
Program dogodka Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020	1
Predgovor	5
Publikacije Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v 2019.	6
Nazivi po Pravilniku o raziskovalnih nazivih	7
TRANSPOSE – projekt Evropske unije za varovanje zdravja darovalcev....	8
Molekularna biotehnologija: od dinamike bioloških sistemov do aplikacij (ARRS P4-0176)	9
Slovenski genomski projekt (ARRS V3-1911)	10
Razvoj agonistov receptorja NOD2 ter dualnih agonističnih konjugatov NOD2/TLR7 kot novih adjuvansov za cepiva (ARRS J3-9256)	11
Vloga imunoproteasoma pri oblikovanju imunskega odziva, posredovanega s trombociti (ARRS J3-1745)	12
Izboljšanje terapevtskih vrednosti celic naravnih ubijalk z modulacijo cistatina F (ARRS J4-1776)	13
Zaznavanje in dokazovanje majhnega bremena DNA virusa hepatitisa B v vzorcih krvi z visoko občutljivimi molekularnimi tehnikami	14
Incidenca okužbe in prekuženost z virusom hepatitisa E med krvodajalci v Sloveniji	15
Razvoj testa za določanje koncentracije IgG v plazmi krvodajalcev, vključenih v program plazmaferez.....	17
Razvoj metode za pridobivanje mezenhimskih matičnih celic iz popkovine za zagon alogenske banke	18
Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa I.....	19
Razvoj in optimizacija produkta zunajtelesne fototerapije z ojačano imunosupresivno komponento	20
Zdravljenje poškodbe hrbtenjače z mezenhimskimi matičnimi celicami ..	21
Določanje himerizma pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic	23
Določitev sekretorskega statusa in genotipa sistema Lewis iz vzorca krvi z metodo PCR v realnem času	25

Analiza koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov, izoliranih iz krvne plazme, pri zdravi slovenski populaciji	26
Prevalenca okužb z virusom SARS-CoV-2 med slovenskimi krvodajalci ..	27
Razvoj testa za določanje prisotnosti protiteles proti virusu SARS-CoV-2 v vzorcih plazme	28
Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa II (CRISPR/Cas9)	29
Razvoj testov za določanje Ag-specifičnega T-celičnega odziva in za določanje stopnje citotoksičnosti efektorskih celic CD8+	30
Slovenska biobanka zdravih kontrol – opredelitev zahtev	31
Pomen tipizacije HLA-DPB1 pri izbiri sorodnega skladnega in haploidnega darovalca krvotvornih matičnih celic	33
Laboratorijska diagnostika trombocitopenije, izzvane s heparinom, v Sloveniji	34
Zbiranje krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi pri otrocih s solidnimi tumorji in majhno telesno težo	35
Optimizacija postopka za pripravo človeških monoklonskih protiteles iz periferne krvi dajalcev na modelu hepatitisa B.....	36
Imunski in degenerativni procesi v niši krvotvornih matičnih celic pri staranju.....	37
Presaditev kostnega mozga pri predkliničnem modelu	39

Program dogodka Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020

Sklop 1: Razvojno-raziskovalna dejavnost na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino – splošni del

Moderatorica: prim. Snežna Levičnik Stezinar

Termin	Naziv	Nosilec
8:00	Uvod	prim. Snežna Levičnik Stezinar
8:10	Publikacije Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v 2019	dr. Valerija Kovač
8:20	Nazivi po Pravilniku o raziskovalnih nazivih	doc. dr. Uroš Rajčević
8:30	Razprava	

Sklop 2: Projekti in programi zunanjih naročnikov

Moderator: doc. dr. Uroš Rajčević

Termin	Naziv	Nosilec
8:40	Človeške matične celice – napredno zdravljenje s celicami II (ARRS P3-0371)	prof. dr. Primož Rožman
8:50	TRANSDOSE – projekt Evropske unije za varovanje zdravja dajalcev	Polonca Mali
9:00	Molekularna biotehnologija, od dinamike bioloških sistemov do aplikacij (ARRS P4-0176)	doc. dr. Uroš Rajčević
9:10	Slovenski genomski projekt (ARRS V3-1911)	doc. dr. Uroš Rajčević
9:20	Razvoj agonistov receptorja NOD2 ter dualnih agonističnih konjugatov NOD2/TLR7 kot novih adjuvansov za cepiva (ARRS J3-9256)	izr. prof. dr. Urban Švajger
9:30	Vloga imunoproteasoma pri oblikovanju imunskega odziva, posredovanega s trombociti (ARRS J3-1745)	izr. prof. dr. Urban Švajger
9:40	Izboljšanje imunoterapevtske vrednosti NK-celic z modulacijo cistatina F (ARRS J4-1776)	izr. prof. dr. Urban Švajger
9:50	Razprava	
10:00	Odmor	

Sklop 3: Interni projekti Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2019

Moderatorica: dr. Valerija Kovač

Termin	Naziv	Nosilec
10:10	Zaznavanje in dokazovanje majhnega bremena DNA virusa hepatitisa B z visoko občutljivimi molekularnimi tehnikami	prim. Snežna Levičnik Stezinar; Petra Jovanović
10:20	Incidenca okužbe in prekuženost z virusom hepatitisa E med krvodajalci v Sloveniji	Polona Nograšek
10:30	Razvoj testa za določanje koncentracije IgG v plazmi krvodajalcev, vključenih v program plazmaferez	mag. Maja Černilec
10:40	Razvoj metode za pridobivanje mezenhimskih matičnih celic iz popkovine za zagon alogenske banke	dr. Katrina Hartman
10:50	Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa I	doc. dr. Uroš Rajčević
11:00	Razvoj in optimizacija produkta zunajtelesne fototerapije z ojačano imunosupresivno komponento	izr. prof. dr. Urban Švajger
11:10	Pilotna študija terapije možganske kapi s CD 34+/CD 133+ mezenhimskimi matičnimi celicami z namenom vpeljave nove terapevtske storitve	izr. prof. dr. Urban Švajger
11:20	Transplantacija kostnega mozga pri heterohronem mišjem modelu	prof. dr. Primož Rožman
11:30	Določanje himerizma pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic	dr. Tadeja Dovč Drnovšek
11:40	Določitev sekretorskega statusa in genotipa sistema Lewis iz vzorca krvi z metodo PCR v realnem času	dr. Tadeja Dovč Drnovšek
11:50	Razprava	
12:00	Odmor	

Sklop 4: Predlogi internih projektov Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino za leto 2020

Moderatorica: doc. dr. Elvira Maličev

Termin	Naziv	Nosilec
12:30	Analiza koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov, izoliranih iz krvne plazme, pri zdravi slovenski populaciji	Ivica Marić
12:35	Prevalenca okužb z virusom SARS-CoV-2 med slovenskimi krvodajalci	Klara Železnik
12:40	Razvoj testa za določanje prisotnosti protiteles proti virusu SARS-CoV-2 v vzorcih plazme	dr. Valerija Kovač
12:45	Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa II (CRISPR/Cas9)	doc. dr. Uroš Rajčević
12:50	Razvoj testov za določanje Ag-specifičnega T-celičnega odziva in za določanje stopnje citotoksičnosti efektorskih celic CD 8+	izr. prof. dr. Urban Švajger
12:55	Slovenska biobanka zdravih kontrol – opredelitev zahtev	mag. Maja Černilec
13:00	Pomen tipizacije lokusa HLA-DPB1 pri izbiri sorodnega in haploidentičnega darovalca krvotvornih matičnih celic	dr. Sendi Montanič, dr. Blanka Vidan-Jeras
13:05	Razprava	
13:30	Odmor	

Sklop 5: Podiplomski projekti in teme

Moderator: Primož Požnenel

Termin	Naziv	Nosilec
13:40	Laboratorijska diagnostika trombocitopenije, izzvane s heparinom, v Sloveniji	Klara Železnik
13:45	Analiza koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov, izoliranih iz krvne plazme, pri zdravi slovenski populaciji	Ivica Marić
13:45	Zbiranje krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi pri otrocih s solidnimi tumorji in majhno telesno težo	Ana Milojković

13:50	Primerjava kratkega in dolgega protokola maturacije dendritičnih celic	Primož Poženeš
13:55	Optimizacija postopka za pripravo človeških monoklonskih protiteles iz periferne krvi dajalcev na modelu hepatitisa B	Sandra Omejec
14:00	Imunski in degenerativni procesi v niši krvotvornih matičnih celic pri staranju	Patrik Milić
14:05	Presaditev kostnega mozga pri predkliničnem modelu	Mojca Justin
14:10	Razprava	
14:30	Zaključek	

Predgovor

Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) se zavedamo potenciala in razsežnosti razvojno-raziskovalne dejavnosti. Poleg preskrbe s krvjo in njenimi komponentami, diagnostičnih storitev, terapevtskih storitev in zdravil iz krvi skrbimo za razvoj transfuzijske in transplantacijske medicine ter naprednega zdravljenja. V okviru razvojno-raziskovalne dejavnosti, ki prej našteje dejavnosti ključno podpira, na strokovnem in znanstvenem področju izvajamo mednarodne in nacionalne raziskovalne programe in projekte, interne projekte ter univerzitetne raziskovalne naloge bolonjskega magistrskega in doktorskega študija.

Zbornik povzetkov predavanj *Raziskovalni dan Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino 2020* predstavlja vpogled v obseg razvojno-raziskovalne dejavnosti ZTM v letu 2019 ter projekcijo dela za leto 2020. Predavanja pokrivajo pet področij. Prvi sklop predstavlja splošno stanje razvojno-raziskovalne dejavnosti na ZTM. V drugem so predstavljeni zunanji programi in projekti, pri katerih raziskovalci ZTM sodelujemo. Tretji in četrti sklop pokrivata področje internih projektov (ki jih financira ZTM). V petem sklopu pa so predstavljena dela podiplomskih študentov.

V zborniku so zbrani povzetki aktivnosti in dosežki razvojno-raziskovalne dejavnosti na ZTM v letu 2019, ki segajo na področja razvoja in uvajanja novih metod in tehnik diagnostike ter zdravljenja. Razvojno-raziskovalna dejavnost na ZTM je pomemben steber, ki je nujen za razvoj vseh primarnih dejavnosti Zavoda ter skrbi za to, da je ZTM tako v nacionalnem kot mednarodnem okolju predstavljen kot strokovno in znanstveno uspešna organizacija. Razvojno-raziskovalna dejavnost je hkrati nujna tudi za pridobitev in vzdrževanje naziva terciarne ustanove.

Valerija Kovač in Uroš Rajčević

Publikacije Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v 2019

Valerija Kovač

Na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) je zaposlenih 45 raziskovalcev, ki opravljajo raziskovalno delo s področij mikrobiologije, imunologije in biotehnologije. Podatki o publiciranju raziskovalcev so zbrani v podatkovni bazi SICRIS (<https://www.sicris.si>), kjer je ZTM glede na evidenco Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) evidentiran pod številko 0311.

Leta 2019 so objavili 11 izvirnih znanstvenih člankov, 5 preglednih znanstvenih člankov, 4 strokovne članke, 1 objavljen znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanja), 2 objavljena strokovna prispevka na konferenci, 10 objavljenih povzetkov znanstvenega prispevka na konferenci, 1 strokovno monografijo in 2 učbenika z recenzijo. Raziskovalci so imeli leta 2019 dva aktivna patenta. Leta 2019 so se 4 raziskovalci kot poročevalci ali vabljeni predavatelji udeležili konferenc, kjer ni bilo natisa. Pet oseb sodeluje v uredniškem odboru pri slovenskih in tujih revijah. Raziskovalci so bili leta 2019 mentorji pri 6 magistrskih delih (bolonjski študij), 1 specialističnem delu in 2 diplomskih delih (bolonjski študij) ter somentorji pri 2 doktorskih disertacijah (stari in bolonjski študij), 3 magistrskih delih, 1 specialističnem delu in 1 diplomskem delu (višješolski študij).

Glede na bibliografske kazalnike uspešnosti so raziskovalci ZTM leta 2019 zbrali 713,48 točke znanstvene uspešnosti in 125,91 točke strokovne uspešnosti. V primerjavi z letom 2018 so v letu 2019 skupno zbrali manj točk bibliografske uspešnosti ter za 50 % povečali število mentorstev oziroma somentorstev. Trend upadanja bibliografske uspešnosti je značilen že nekaj let in sovпада s padajočim trendom števila projektov ARRS, ki jih na ZTM izvajamo.

Nazivi po Pravilniku o raziskovalnih nazivih

Uroš Rajčević

Raziskovalne nazive v uporabi pri Agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) obravnava Pravilnik o raziskovalnih nazivih (neuradno prečiščeno besedilo št. 4), v veljavi do 22. 6. 2017. Pravilnik predpisuje pogoje, kvalitativne in kvantitativne kazalnike ter merila in postopek za izvolitev raziskovalcev v raziskovalne nazive v raziskovalnih organizacijah (v nadaljnjem besedilu: RO), spremljanje in nadziranje izpolnjevanja pogojev za izvolitev raziskovalcev v raziskovalni naziv. Pravilnik loči tri skupine raziskovalnih nazivov: znanstveni nazivi, strokovno-raziskovalni nazivi in razvojni nazivi. Znanstveni nazivi so: asistent, asistent z magisterijem znanosti, asistent z doktoratom, znanstveni sodelavec, višji znanstveni sodelavec in znanstveni svetnik. Strokovno-raziskovalni nazivi so: asistent, višji asistent, višji strokovno-raziskovalni asistent, strokovno-raziskovalni sodelavec, višji strokovno-raziskovalni sodelavec in strokovno-raziskovalni svetnik. Razvojni nazivi so: razvijalec, višji razvijalec, samostojni razvijalec, razvojni sodelavec, višji razvojni sodelavec in razvojni svetnik. Nazivi na univerzi so enakovredni tistim, ki veljajo v raziskovalni dejavnosti: asistent, predavatelj, višji predavatelj = asistent; docent, znanstveni sodelavec = znanstveni sodelavec; izredni profesor, višji znanstveni sodelavec = višji znanstveni sodelavec; redni profesor, znanstveni svetnik = znanstveni svetnik. Univerza pri imenovanjih v nazive upošteva Zakon o visokem šolstvu (Uradni list RS, št. 119/06) po merilih za volitve v nazive visokošolskih učiteljev, znanstvenih delavcev ter sodelavcev.

TRANSPOSE – projekt Evropske unije za varovanje zdravja darovalcev

Polonca Mali, Primož Požnenel, Urška Dolinar

Projekt TRANSPOSE (TRANSfusion and transplantation PrOtection and SElection of donors), ki traja od septembra 2017 do marca 2020, je v 2,5 leta sodelovanja združil 24 partnerjev iz 15 evropskih držav. Finančno so projekt podprli iz zdravstvenih programov Evropske unije, ki so namenjeni za spodbujanje sodelovanja med evropskimi partnerji, odločevalci, raziskovalci in profesionalci na področju darovanja. Več kot 5 milijonov bolnikov na leto prejme transfuzijo ali transplantacijo substanc človeškega izvira (substances of human origin – SOHO): krvnih pripravkov, celic in tkiv, organov in spolnih celic zaradi asistirane reproduktivne tehnologije. Take oblike zdravljenja so odvisne od darovanja 13 milijonov darovalcev v Evropi. Namen projekta TRANSPOSE je bil poenotenje in harmonizacija postopkov in praks na področju izbora ter zaščite zdravja darovalcev za večjo varnost tako darovalcev kot prejemnikov ne glede na nacionalnost ali vrsto darovanja.

Dejavnosti v projektu so bile usmerjene v pregled in analizo postopkov izbora in ukrepov za zaščito različnih darovalcev v Evropi. Številni predlogi pogojev za darovanje tako imenovanih meril za izbor darovalcev zdaj temeljijo na novi metodologiji, ki upošteva tako oceno tveganja iz znanih podatkov v literaturi (evidence based) kot tudi oceno tveganja strokovnjakov, ki delujejo v postopkih izbora darovalcev. Na podlagi dobrih praks sodelujočih je rezultat tega projekta tudi predlog enotnega standardiziranega medicinskega vprašalnika za darovalce. S tem projekt podpira usmeritev k varovanju zdravja darovalcev in prejemnikov ter dvig varnosti pri transfuzijskih in transplantacijskih dejavnostih.

Več informacij najdete na spletni strani: www.transposeproject.eu

Molekularna biotehnologija: od dinamike bioloških sistemov do aplikacij (ARRS P4-0176)

Uroš Rajčević

Program Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) P4-0176 Molekularna biotehnologija: od dinamike bioloških sistemov do aplikacij izvajata raziskovalni organizaciji Kemijski inštitut (RO-0104) in Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (RO-0311). Program vodi prof. dr. Roman Jerala z Odseka za sintezno biologijo in imunologijo Kemijskega inštituta. Po klasifikaciji ARRS program izvaja raziskave s področja biotehnike/biotehnologije (4.06.00) in naravoslovja/biokemije ter molekularne biologije (1.05.00). Program se izvaja od 1. januarja 1999 in trenutno obsega 8,08 FTE ter vključuje 62 raziskovalcev, kar ga uvršča med največje raziskovalne programe, ki jih ARRS financira na področju ved o življenju. Na ZTM program vodi prof. dr. Vladka Čurin Šerbec s skupino Biomedicina (0311-004). ZTM poleg omenjenih področij program izvaja še na področjih medicine/mikrobiologije in imunologije (3.01.00) ter medicine/nevrobiologije (3.03.00). Program na ZTM obsega 1920 raziskovalnih ur, vanj pa je vključenih 6 raziskovalcev. Temeljni vsebinski poudarki programa so:

- a) načrtovanje bionanostruktur na osnovi bioloških makromolekul,
- b) načrtovanje regulacije delovanja celic, predvsem sesalskih,
- c) razumevanje mehanizmov naravnega imunskega odziva v boleznih ter
- d) kombinacija sintezne biologije in imunologije za pripravo novih načinov terapevtske intervencije in drugih možnosti uporabe na osnovi principov sintezne biologije.

Publikacije, dostopne prek spletnega vmesnika Sicris, v letu 2019 štejejo 124 bibliografskih vnosov z ocenama A1 = 6,49 in A3 = 20,03. Med najodmevnejšimi članki v revijah z visokim faktorjem vpliva so v zadnjih letih stalnica tudi članki v revijah Nature.

Slovenski genomski projekt (ARRS V3-1911)

Uroš Rajčević

Novembra 2019 smo na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino začeli izvajati projekt Slovenski genomski projekt (CRP). Na povabilo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (MF UL), smo se v konzorciju partnerjev junija 2019 prijavili na Javni razpis za izbiro raziskovalnih projektov Ciljnega raziskovalnega programa »CRP 2019« v letu 2019. Pri Ciljnem raziskovalnem programu gre za izbor in sofinanciranje raziskovalnih projektov, ki so podpora vladi in sektorjem udeležencev javnega razpisa v zvezi z določanjem razvojnih usmeritev in politike na posameznem področju javnega interesa, ki je nujna za izboljšanje konkurenčnosti in trajnostnega razvoja Slovenije. Konzorcij pod vodstvom MF UL se je prijavil na težišče 1 razpisa: Vključujoča, zdrava, varna in odgovorna družba, 1.1. tematski sklop: Zdravo in aktivno življenje, 1.1.12. naslov teme: Razvoj slovenskega genomskega projekta: človeški genom za zdravje. Na razpis se je poleg konzorcija pod vodstvom MF UL prijavil še konzorcij pod vodstvom Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani (UKC LJ), ki je pri končnem ocenjevanju dosegel 0,5 točke več kot prvi. Ministrstvo za zdravje je projekta zaradi podobnih ocen združilo pod vodstvom UKC LJ, z vodjo prof. dr. Borutom Peterlinom. Vrednost projekta je 300 tisoč evrov za obdobje 36 mesecev. Cilji projekta so:

- a) razvoj platforme za translacijo genomskega sekvenciranja za izboljšanje zdravja Slovencev,
- b) razvoj mreže ključnih deležnikov, ki vključujejo zdravstvene, izobraževalne in raziskovalne institucije ter predstavnike zainteresirane javnosti za razvoj slovenskega genomskega projekta,
- c) priprava izhodišč in zasnove slovenskega genomskega projekta (1000 slovenskih genomov),
- d) izvedba pilotskega projekta v okviru diagnostike redkih genetskih bolezni in v okviru prospektivne vključitve zdravih Slovencev ter
- e) razvoj izobraževalnih programov za ključne deležnike: laično javnost, medicinske delavce.

Projekt je razdeljen v pet delovnih sklopov, ki odražajo cilje.

Razvoj agonistov receptorja NOD2 ter dualnih agonističnih konjugatov NOD2/TLR7 kot novih adjuvansov za cepiva (ARRS J3-9256)

Urban Švajger

Projekt Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) J3-9256 poteka v sodelovanju s Fakulteto za farmacijo Univerze v Ljubljani pod vodstvom izr. prof. Žige Jakopina. Osredotoča se na iskanje inovativnih adjuvansov s končno formulacijo v liposomskih nanodelcih z namenom povečanja imunogenosti cepiv. Adjuvansi so pomemben del sodobnih cepiv in predstavljajo tisto komponento, ki poskrbi, da se celice imunskega sistema aktivirajo v zadostni meri in na pravi način. Omenjena aktivacija je ključna za razvoj ustreznega imunskega odziva in zlasti za razvoj imunološkega spomina.

Aktivacija imunskih celic poteka v veliki meri prek tako imenovanih receptorjev PRR (angl. pattern-recognition receptors), ki prepoznavajo »tuje« in »nevarne« signale, kot so molekularni vzorci patogenov (denimo lipopolisaharid, virusna RNA). Projekt je osredotočen na receptorja NOD2 in TLR7, oba člana družine receptorjev PRR. Za oba receptorja je znano, da jih lahko aktiviramo tudi s tako imenovanimi majhnimi molekulami, ki jih lahko razvijemo v laboratoriju. Za to se v prvem koraku uporablja računalniško modeliranje (*in silico*), kjer program rešeta ogromne količine kemijskih spojin glede na 3D-strukturo receptorja in išče najboljše kandidate, ki izkazujejo energetsko najučinkovitejšo vezavo. Na podlagi tako imenovane spojine vodnice v laboratorijih Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (FFA UL) oblikujejo in sintetizirajo derivate spojin, ki jim v naslednjem koraku preverijo aktivnost.

Zavod za transfuzijsko medicino bo sodeloval v zadnjem delu projekta, kjer bomo preverjali učinkovitost novih adjuvansov pri aktivaciji primarnih imunskih celic (vpliv na aktivacijo dendritičnih celic in posledična sposobnost aktivacije in polarizacije limfocitov T).

Vloga imunoproteasoma pri oblikovanju imunskega odziva, posredovanega s trombociti (ARRS J3-1745)

Urban Švajger

Zavod RS za transfuzijsko medicino pri projektu Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) J3-1745 deluje kot sodelujoča institucija. Glavna vodja projekta je doc. dr. Martina Gobec (Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani). Projekt je osredotočen na odkrivanje vloge imunoproteasoma pri delovanju trombocitov. Pri tem želimo spoznati, kako lahko imunoproteasom vpliva na imunosupresivno tumorsko okolje ter zlasti kako lahko z modulacijo imunoproteasoma vplivamo na pomembne celične interakcije med trombociti, tumorskimi celicami ter levkociti.

Imunoproteasom je pomemben celični aparat za degradacijo proteinov. Njegova vloga je pomembna pri številnih celičnih funkcijah, kot so njihov metabolizem, celični cikel ter celična diferenciacija. Pri tem igra tudi izrazito vlogo pri številnih imunskih funkcijah in vpliva na predstavitev antigenov, proliferacijo in preživetje limfocitov T ter na regulacijo proizvodnje citokinov.

Zadnje raziskave kažejo na pomembno vlogo trombocitov pri raku. Nedavno so pokazali, da lahko trombociti ključno vplivajo na imunski odgovor proti raku z različnimi mehanizmi, denimo z »zamaskiranjem« rakavih celic in regulacijo aktivacije limfocitov T. Obenem obstaja močan sum, da trombociti vsebujejo delujoč imunoproteasomski aparat. Inhibitorji imunoproteasoma, ki se že uporabljajo za zdravljenje določenih vrst raka, namreč v precejšnji meri vplivajo na funkcijo trombocitov, vendar pri tem ostaja vrsta neznank.

V omenjenem projektu želimo preveriti vpliv inhibicije imunoproteasoma v trombocitih, in kako to vpliva na njihov sekretom. Posledično bomo preučili vpliv različno induciranih sekretomov trombocitov na aktivacijo celic imunskega sistema. V zadnji fazi bomo preučili, kako inhibicija imunoproteasoma vpliva na kompleksno interakcijo med imunskimi celicami in rakom ter kakšno vlogo pri tem igrajo trombociti.

Izboljšanje terapevtskih vrednosti celic naravnih ubijalk z modulacijo cistatina F (ARRS J4-1776)

Urban Švajger

Vodja projekta Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS) J4-1776 je prof. dr. Janko Kos (Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani in Institut Jožef Stefan). Zavod RS za transfuzijsko medicino pri projektu deluje kot sodelujoča institucija. Projekt se osredotoča na tri ključne cilje, in sicer: doseči zmanjšano delovanje cistatina F (CysF) v celicah naravnih ubijalkah, prikazati posledično izboljšavo citotoksičnega potenciala celic NK ter dokazati izboljšan terapevtski potencial celic NK v predkliničnih modelih.

Cistatin F je pomemben inhibitor številnih proteaz, ki jih imenujemo katepsini, in kot tak pomemben regulator številnih celičnih funkcij. Pokazali smo že, da delovanje CysF pomembno korelira s stanjem anergije celic NK. V podobnem smislu lahko CysF zmanjša citotoksično aktivnost celične linije NK-92, kakor tudi primarnih človeških celic NK. Takšen način delovanja je izražal tudi pri preiskavah funkcije citotoksičnih limfocitov T, kjer je aktivnost CysF korelirala s poslabšanjem efektorske funkcije.

Celice NK (tudi citotoksični limfociti) ubijajo tarčne celice prek perforinskega/grancimskega sistema. To poteka tako, da ob srečanju s tarčo celico najprej izločijo protein perforin, ki v tarčni celici ustvari pore. V naslednjem koraku izločijo grancime, ki skozi nastale pore vstopijo v celico in v celici sprožijo aktivacijo kaspaznega sistema, kar vodi v celično smrt. Perforini in grancimi nastajajo iz predhodnih oblik proteinov, ki jih morajo najprej aktivirati različni katepsini (na primer Cat C, Cat H ali Cat L). CysF je močan endogeni inhibitor teh katepsinov in lahko s tem pomembno regulira aktivnost perforinskega/grancimskega sistema.

Še več, spoznavamo mehanizme, kjer lahko tarčne celice (na primer rakave celice) sproščajo CysF v okolje, ki ga pozneje privzamejo imunske celice. Cistatin F lahko torej deluje kot signalna molekula, s katero tumorji utišajo imunski sistem. Z zmanjšanjem aktivnosti CysF v celicah NK bi torej lahko ohranjali njihovo citotoksično aktivnost in izboljšali njihov terapevtski potencial.

Zaznavanje in dokazovanje majhnega bremena DNA virusa hepatitisa B v vzorcih krvi z visoko občutljivimi molekularnimi tehnikami

Snežna Levičnik Stezinar, Petra Jovanovič, Klara Železnik

Projekt je usmerjen v ugotavljanje majhnega bremena virusa hepatitisa B (HBV) pri krvodajalcih ter vzpostavitvi dodatne občutljive metode za njegovo dokazovanje. Poleg rednega presejalnega testiranja bi vzorce krvodajalcev ZTM (odvzemi po celotni Sloveniji) dodatno testirali na protitelesa proti beljakovini sredice virusa hepatitisa B (anti-HBc). Pri reaktivnih vzorcih anti-HBc bi poleg rutinsko izvedenega molekularnega testiranja (NAT) izvedli še molekularno testiranje z občutljivejšo metodo (denimo nested PCR), katere protokol bi bilo treba še vzpostaviti. Pred tem bi vzorce koncentrirali iz večjega volumna plazme s pomočjo ultracentrifugiranja (izvedba v zunanji ustanovi). S tem bi povečali celokupno občutljivost dodatnega testiranja in pridobili podatek o preostalem tveganju prenosa okužbe HBV ob rutinskem izvajanju serološkega (HBsAg) in molekularnega presejalnega testiranja (HBV DNA).

V prvi fazi smo izvedli testiranje krvodajalcev na anti-HBc in pridobili vzorce plazme za izvedbo druge faze. Testirali smo 5706 krvodajalcev na protitelesa anti-HBc. Pridobili smo 73 (1,28 %) pozitivnih rezultatov anti-HBc. Od tega je imelo 36 pozitivnih vzorcev prisotnih manj kot 100 IE/mL protiteles anti-HBs. Te krvodajalce smo odklonili od nadaljnega darovanja krvi zaradi premajhne količine zaščitnih protiteles anti-HBs. V nadaljevanju raziskave bomo v teh 36 plazmah z ultracentrifugiranjem v zunanji ustanovi koncentrirali potencialno prisotno HBV DNA, ki jo bomo izolirali in namnožili z občutljivejšo metodo PCR.

Z raziskavo bomo pridobili aktualen vpogled v epidemiološko sliko seroprevalence anti-HBc pri krvodajalcih v Sloveniji, ki bo zelo pomemben pri strokovni odločitvi o uvedbi presejalnega testiranja na anti-HBc na nacionalni ravni. Vpeljava dodatne občutljive metode testiranja na HBV DNA bo razširila nabor metod testiranja in bo glavna metoda pri razreševanju sumov na hepatitis B, prenešen s transfuzijo, v postopkih hemovigilance.

Incidenca okužbe in prekuženost z virusom hepatitisa E med krvodajalci v Sloveniji

Snežna Levičnik Stezinar, Polona Nograšek

Hepatitis E je infekcijska bolezen, ki jo povzroča virus hepatitisa E (HEV). Krvodajalci so izpostavljeni kontaminirani hrani, s katero se okužijo s HEV, posledično pa so bolniki izpostavljeni kontaminiranim krvnim pripravkom. Nekaj prenosov je že bilo dokazanih z molekularno potrjeno identiteto virusa v dajalcu in prejemniku. V projektu smo na večjem številu krvodajalcev izvedli molekularno testiranje na HEV RNA (NAT), s čimer smo želeli dokazati aktivno okužbo v času odvzema. Na manjšem delu krvodajalcev, testiranih z NAT, smo izvedli tudi serološko testiranje na specifična protitelesa anti-HEV IgG, da bi ugotovili prekuženost slovenskih krvodajalcev s HEV.

Rezultati študije so nam dali vpogled v razširjenost okužbe s HEV, pridobili smo oceno tveganja za prenos HEV v Sloveniji glede na incidenco HEV RNA med asimptomatskimi krvodajalci, oceno vpliva uvedbe presejalnega testiranja na HEV RNA na varnost preskrbe s krvjo in povečanja stroškov. S študijo smo tudi validirali metodo.

Ob sprejemu smo krvodajalcu v seznanitev in podpis predali soglasje (od 21. januarja do 7. junija 2019). Če je krvodajalec soglasje podpisal, smo odvzemno epruveto označili s posebno etiketo. V laboratoriju smo preverili skladnost označenih epruvet in prevzetih soglasij in izvedli testiranje. Pridobljene rezultate smo interpretirali ter po potrebi ukrepali po algoritmu. Pri pozitivnih rezultatih z NAT je bilo ukrepanje sledeče: komponente krvi smo uničili, krvodajalca pa smo odklonili za 6 mesecev (šifra HEV) in mu poslali izvid, obvestilo ter mu svetovali nadaljnje postopanje. Izvedli smo tudi kontrolno testiranje HEV RNA-pozitivnih krvodajalcev čez 2 in 4 tedne oziroma po potrebi do izginotja HEV RNA in pojava protiteles IgM in/ali IgG. Akutno okužbo smo prijavili na Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ).

Pretestirali smo 9284 vzorcev krvi dajalcev, od tega smo pri petih dokazali HEV RNA (1 : 1858 oziroma 0,05 %).

Pretestirali smo tudi 1263 vzorcev krvi dajalcev, predhodno testiranih na HEV RNA, od tega smo pri 94 dokazali protitelesa anti-HEV IgG (prekuženost: 7,44 %). Pri bolnikih, pozitivnih na anti-HEV IgG, smo izvedli tudi testiranje na protitelesa anti-HEV IgM in jih dokazali pri 3 od 94 (3,19 % od 94 oziroma 0,24 % od 1263). Največjo prekuženost smo dokazali v starostnih skupini od 48 do 65 let.

Študijo smo začeli izvajati januarja 2019 in eksperimentalni del zaključili julija 2019. Dokazali smo 0,05-odstotno incidenco in 7,44-odstotno prevalenco. Sledi še statistična obdelava rezultatov in analiza v okviru magistrske naloge in objava izsledkov v strokovni reviji. Presejalno testiranje krvodajalcev na HEV RNA se bo uvedlo, če bodo to zahtevale strokovne smernice. S študijo smo pripravili podlago in možnost za takojšnjo uvedbo presejalnega testiranja, če bo tako odločeno. Treba bo le določiti pristop (selektivno ali univerzalno testiranje, testiranje posameznih vzorcev ali poolov) ter ovrednotiti stroške in njihov vpliv na ceno krvi.

Razvoj testa za določanje koncentracije IgG v plazmi krvodajalcev, vključenih v program plazmaferez

Maja Černilec, Melita Gracar, Marjana Šprohar, Valerija Kovač

Sveža zmrznjena plazma je »vhodni material« za pripravo zdravil iz krvi: faktorjev strjevanja krvi, imunoglobulinov, albuminov in drugih zdravil. Sveža zmrznjena plazma, ki je namenjena za frakcioniranje, mora ustrezati zahtevam standarda *European Pharmacopoeia*. Prav tako je v zadnji izdaji *EDQM Plasma Supply Management* priporočeno intenzivnejše spremljanje krvodajalcev, vključenih v program plazmaferez. Eden od kazalnikov spremljanja je določanje koncentracije IgG v serumu oziroma plazmi ob odvzemu. Nivo protiteles IgG naj bi določali ob vsakem petem odvzemu oziroma vsaj enkrat na leto, glede na rezultate pa naj bi določali tudi pogostost odvzemov. Pri koncentracijah, manjših kot 6,0 g/L, je predlagan odklon odvzema za najmanj tri tedne.

Kot cilj projekta smo si zadali razviti cenovno ugoden, preprost in uporaben test za določanje koncentracije IgG. Izbrali smo primerna lovilna in detekcijska protitelesa ter optimizirali končno redčitev vzorcev in način redčenja. Čas inkubacije posamezne stopnje pri izvedbi testa smo skrajšali na pol ure in s tem omogočili hitro izvedbo testa. Med razvojem testa smo pri vsakem izvedenem testu izračunali koncentracije IgG iz povprečja treh meritev posameznega vzorca z upoštevanjem korekcijskega faktorja (potreben zaradi drugačne sestave vzorca plazme od sestave kontrol), odmik povprečja od prave vrednosti ter standardni odmik. Preverili smo specifičnost, selektivnosti ter natančnost testa, z uporabo vzorcev z znano koncentracijo analita pa smo določili točnost rezultatov. Prav tako smo preverili stabilnost IgG v vzorcih.

Z izbrano kombinacijo protiteles določamo le IgG, in ne druga humana protitelesa. Povprečje rezultatov meritev je znotraj $\pm 5\%$ od prave vrednosti, tak je tudi relativni standardni odmik rezultatov več ponovitev istih vzorcev. Kljub visoki občutljivosti testa bomo rezultat zapisali na 0,1 g/L natančno. Rezultati so primerljivi s podatki komercialnega testa proizvajalca Invitrogen. Rezultati testiranja treh vzorcev zunanje sheme Riqas potrjujejo pravilnost odločitve o upoštevanju korekcijskega faktorja za izračun končne koncentracije IgG.

Test bomo izvajali dvakrat na teden, lahko pa tudi znotraj dveh tednov od odvzema. Na eno testno ploščo nanese do 20 vzorcev. Usposobljena oseba lahko naenkrat izvede testiranje in analizo dveh testnih plošč.

Razvoj metode za pridobivanje mezenhimskih matičnih celic iz popkovine za zagon alogenske banke

Katrina Hartman, Urban Švajger, Nataša Tešić

Mezenhimske matične oziroma stromalne celice se uporabljajo kot zdravila za napredno zdravljenje na več področjih. Pridobimo jih lahko iz različnih virov, kot so kostni mozeg, popkovnična kri, popkovina in maščobno tkivo. Predstavljeno delo je nadaljevanje projekta, ki smo ga začeli pred nekaj leti. Iz celic kostnega mozga smo nagojili in maja 2018 izdali prvi pripravek alogenskih mezenhimskih matičnih celic za bolnika.

Ker je celice kostnega mozga težko pridobiti, smo zdaj kot vir mezenhimskih matičnih celic izbrali popkovino. Popkovina je dostopna brez invazivnega postopka, darovalec pa ne utrpi škode. Celice, vzgojene iz popkovine, so mlajše, zato imajo več dobrih lastnosti: sposobnejše so samoobnavljanja, hitreje se podvojujejo, izločajo več rastnih dejavnikov, ne zapadejo v senescenco. Za primerjavo: pri novorojencu je na 10 tisoč celic kostnega mozga 1 mezenhimskih matičnih celic, pri najstniku na 100 tisoč (torej je mezenhimskih matičnih celic 10-krat manj), pri starostniku na 2 milijona (200-krat manj).

Iz popkovine pridobimo zelo veliko število celic že pri prvih precepljanjih. Iz njih lahko pripravimo več zamrznjenih enot mezenhimskih matičnih celic in jih shranimo (banka). Enote se med seboj ne razlikujejo, kar je velika prednost pri načrtovanju zdravljenja. Iz kostnega mozga na primer za zadostno število celic za bolnika potrebujemo več kot en mesec, medtem ko iz ene zamrznjene enote nagojimo celice za pripravek v manj kot tednu dni.

Pripravljeni so postopki za pridobitev in prenos popkovine na Zavod RS za transfuzijsko medicino za nasaditev tkiva popkovine in za spremljanje rasti nastajajoče celične kulture. Ustreznost potrjujemo z validacijo postopkov in kontrolo kakovosti. Tkivo popkovine testiramo na sterilnost in na prisotnost mikoplazem. Pridobljene celice vsake popkovine pregledamo na kariotip, pred izdajo pripravka ugotovimo število celic, živost in fenotip (CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD45⁺) ter sterilnost, občasno opravimo še preiskavo na endotoksine.

Z banko zamrznjenih enot mezenhimskih matičnih celic se lahko veliko hitreje odzivamo na potrebe klinike in smo bližje bolniku. Zato načrtujemo prijavo nove storitve na Javno agencijo za zdravila in medicinske pripomočke.

Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa I

Uroš Rajčević¹, Valerija Kovač¹, Tilen Komel¹ in Anja Golob Urbanc²

¹ ZTM, R&D; ²Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

Terapija z limfociti T, gensko spremenjenimi s himernimi antigenskimi receptorji (CAR-T), dosegla izreden uspeh v klinični praksi, zlasti v boju s hematološkimi oblikami raka, medtem ko pri zdravljenju solidnih oblik raka trenutno še ni tako uspešna. Poleg tega zaradi velike zapletenosti terapije CAR-T spremljajo pogosti in hudi stranski učinki, ki lahko v najhujših primerih vodijo tudi v smrt bolnika. S sprejemanjem ustreznih ukrepov so ti stranski učinki lahko nadzorovani in delno ublaženi. V Slovenijo terapija s CAR-T vstopa z registriranimi, komercialno dostopnimi zdravili, medtem ko na dostop do drugih oblik zdravljenja z adoptivnimi celičnimi terapijami še čakamo. Sočasno v Sloveniji na tem področju razvijamo lastno znanje in tehnologijo in upamo, da bodo novi, učinkoviti terapevtski pristopi te vrste čim prej dostopni tudi širšemu naboru bolnikov. Lastna zdravila CAR-T druge in tretje generacije razvijamo v translacijskem trojčku Kemijski inštitut, Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino in Univerzitetni klinični center Ljubljana. Usmerjena so proti različnim antigenom ter vključena v različne vektorje. Efektorske celice, gensko spremenjene s CAR, lahko namnožimo v pogojih dobre laboratorijske prakse in preverimo njihovo funkcionalnost *in vitro*, njihov fenotip pa spremljamo z različnimi metodami.

Razvoj in optimizacija produkta zunajtelesne fototerapije z ojačano imunosupresivno komponento

Urban Švajger, Nataša Tešić, Katrina Hartman, Katerina Jazbec

Zunajtelesna fototerapija je celična imunoterapija, ki jo izvajamo na Oddelku za terapevtske storitve od leta 2012. V postopku celokupne levkocite bolnika (pridobljene z afereznim postopkom) izpostavimo procesu tako imenovane fotoaktivacije, v katerem nanje učinkujemo z 8-metoksipsoralenom ter UVA-svetlobo. Glavni učinek fotoaktivacije je, da v celicah imunskega sistema sproži proces blage apoptoze. Ker takšna neagresivna celična apoptoza posreduje številne signale, ki mirijo imunski sistem, je ta mehanizem sprejet kot glavni način imunomodulacije pri zunajtelesni fototerapiji.

Že nekaj časa je znano, da proces fotoaktivacije ne prizadene vseh celic v enaki meri. Prav tako vsi tipi imunskih celic niso enako občutljivi na učinke fotoaktivacije. Pri tem izstopajo monociti, ki so na to delovanje še posebej odporni. Pri njih se torej apoptoza kaže pozneje oziroma do nje ne pride. Dodatno lahko fotoaktivacija pri monocitih sproži celo proces aktivacije in diferenciacije. Pri tem lahko nastanejo provnetne celične komponente, ki bi v teoriji lahko nasprotovale primarnemu namenu uporabe zunajtelesne fototerapije za takšne indikacije, kot je zdravljenje bolezni presadka proti gostitelju (angl. GvHD).

V internem projektu smo želeli doseči modulacijo procesa zunajtelesne fototerapije. Glavni namen je bil, da v zelo kratkem času pred fotoaktivacijo levkocite izpostavimo takšnim pogojem, ki bi pozneje preprečili nastanek vnetne komponente v pripravku. Ker so tako drastične spremembe v biologiji celic v tako kratkem času izredno težavne, smo preverili in zaostriili številne pogoje v kulturah *ex vivo*. Po rešetanju številnih bioloških molekul in farmakoloških imunosupresivov smo spoznali, da lahko cilj dosežemo z uporabo izjemno velikih doz kortikosteroidov ob sočasni rabi rapamicina (Sirolimus).

S tako optimizacijo procesa smo dosegli, da fotoaktivacija, kakor tudi izpostavitve monocitov močnim imunogenom, nista vodila v razvoj vnetne celične komponente. Monociti so po aktivaciji izločali občutno manj citokinov akutne faze vnetja (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α). Njihov fenotip je nakazoval tolerogeno aktivacijsko stano z majhnim izražanjem kostimulacijskih molekul (CD40, CD80, CD86). Zelo pomemben del optimizacije pa je bil način, s katerim smo ohranili vse glavne lastnosti klasičnega postopka ECP, torej ohranitev blagega apoptotičnega učinka.

Zdravljenje poškodbe hrbtenjače z mezenhimskimi matičnimi celicami

Urban Švajger, Marko Jug, Fajko Bajrović, Samo Zver, Matjaž Sever, Katrina Hartman

Poškodba hrbtenjače je nepričakovan in katastrofalen dogodek, ki povzroča trajno invalidnost in zaznamuje tako bolnika kot njegovo socialno okolje. Mehanska sila povzroči tako imenovano primarno poškodbo, na katero ne moremo vplivati. Temu sledi vrsta dogodkov – ishemija, lipidna peroksidacija, elektrolitsko neravnovesje, ekscitotoksičnost, številni imunski procesi in apoptoza. To imenujemo sekundarna poškodba hrbtenice, ki pomembno vpliva na nevrološki izid.

Mezenhimske matične celice so pomemben celično terapevtski produkt, ki smo ga razvili na Oddelku za terapevtske storitve in ga za klinično rabo rutinsko izdelujemo od leta 2018. Zaradi svojih izrazitih imunomodulatornih ter regenerativnih lastnosti so zanimiv terapevtski kandidat za eksperimentalno zdravljenje poškodb hrbtenjače. Sodelovanje s Kliničnim oddelkom za travmatologijo je pri tem ključno, saj so eni redkih, ki izvajajo tako imenovano ultra hitro kirurško dekompresijo po poškodbi hrbtenjače, kar omogoča širše časovno okno zdravljenja in lahko potencialno izboljša regenerativni potencial tovrstnih terapij.

V preliminarni študiji smo zdravili 33 let starega bolnika s kompletno PH po dislokaciji vratne hrbtenice na nivoju C3–C4 zaradi nesreče pri skoku v vodo na glavo. Pacient je bil urgentno operiran s 360-stopinjsko dekompresijo in instrumentirano fuzijo. Načrtovali smo zdravljenje z mezenhimskih matičnih celic v dveh načinih aplikacije. V prvi je pacient prejel 150×10^6 celic po intravenski poti. Pri tem smo del celic označili s 600 MBq ^{99m}Tc -eksametazima (HMPAO). Po aplikaciji smo izvedli planarno slikanje celotnega telesa in hibridno (SPECT/CT) slikanje glave in vratu z namenom sledenja celične migracije. Slikanje smo izvajali po 1, 4 in 20 urah. Po intravenski administraciji so se MMC razporedile v retikuloendotelijskem sistemu in pljučnem parenhimu. Retencija MMC na mestu poškodbe je bila zanemarljiva ne glede na časovni okvir slikanja.

Po intratekalnem vnosu smo pokazali, da pride do retencije MMC na nivoju administracije (L3) s počasno rostralno progresijo, kot je vidno na planarnem SPECT/CT-slikanju celega telesa. Hibridno SPECT/CT-slikanje je pokazalo intenzivno retencijo MMC na območju poškodbe hrbtenjače že eno uro po presaditvi celic. Signal retencije se je postopno povečal po 4

urah. Po 20 urah smo opazili razširjen signal po celotnem spinalnem kanalu kot posledica močnega signala ozadja.

Naši rezultati poudarjajo obstoj migracijskega signala, ki vodi transplantirane MMC na mesto poškodbe tri mesece po akutni PH. Naši rezultati prav tako predlagajo, da je intratekalen način aplikacije učinkovitejši kot intravenski v smislu učinkovite dostave celic na mesto poškodbe. Načrtujemo intervencijsko klinično študijo na 10 pacientih.

Določanje himerizma pri bolnikih po presaditvi krvotvornih matičnih celic

Tadeja Dovč Drnovšek, Ema Müller, Mojca Zupan, Primož Rožman

Presaditev krvotvornih matičnih celic (PKMC) omogoča zdravljenje številnih bolezni. Po opravljeni alogenski PKMC je prejemnik krvotvornih matičnih celic (KMC) hematološka hmera. S sledenjem himerizma po PKMC na nivoju DNA z metodo PCR v realnem času (qPCR) lahko zgodaj predvidimo zavrnitev presadka in z dodatnimi zgodnjimi ukrepi to preprečimo.

Z metodo qPCR lahko v vzorcu z dvema različnim izvoroma DNA zaznamo že 0,05 % DNA, ki se nahaja v manjšini. Prejemniku in darovalcu pred PKMC določimo prisotnost informativnih alelov (alelov, ki so prisotna v genomu enega posameznika in odsotna v genomu drugega). Po PKMC se nato v določenih časovnih obdobjih kvantitativno določi delež izbranih prejemnikovih informativnih alelov.

V sodelovanju s KO za hematologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana smo v študijo vključili 23 prejemnikov in njihovih darovalcev KMC. Za določitev informativnih označevalnikov smo iz vzorcev krvi darovalcev in prejemnikov pred presaditvijo osamili genomsko DNA (gDNA). Kvantitativno sledenje himerizma smo izvedli na vzorcih gDNA, ki smo jo osamili iz periferne venske krvi po PKMC. Informativne označevalce in delež himerizma smo določili s komercialnim setom KMRtype, KMRtrack, programsko opremo KMREngine (vse GenDx) ter napravo ViiA 7 in programsko opremo QuantStudio (vse Applied Biosystems).

Rezultate in oblike himerizma smo interpretirali glede na občutljivost metode. Izračunali smo absolutno in relativno spremembo deleža prejemnikove gDNA ter spremljali dinamiko himerizma. Rezultate smo primerjali s klinično sliko prejemnikov KMC.

Najpomembnejše ugotovitve študije so bile, da:

- a) je nabor informativnih označevalnikov primeren za slovensko populacijo prejemnikov KMC;
- b) ima komercialni test visoko občutljivost;
- c) je vzorce krvi bolnikom pred PKMC zaradi večje količine in boljše kakovosti gDNA treba vzeti pred kondicioniranjem;
- d) da smo uspešno opravili zunanjo kontrolo kakovosti;

e) da je kinetika himerizma zelo pomembna.

Končni sklep je, da je testni sistem primeren za sledenje himerizma po presaditvi alogenskih KMC pri slovenski populaciji prejemnikov KMC. Test smo uvedli v rutinsko diagnostiko.

Določitev sekretorskega statusa in genotipa sistema Lewis iz vzorca krvi z metodo PCR v realnem času

Tadeja Dovč Drnovšek, Helena Poplašen, Matjaž Urbajs, Vladka Čurin Šerbec

Krvnoskupinski antigeni (Ag) so običajno produkt eritroidnih celic z izjemo Ag Lewis (Le), ki se na membrano veže iz plazme. Ag so lahko prisotni tudi v sekretornih izločkih in jih lahko povezujemo s številnimi boleznimi.

Zapis za fukoziltransferazi, ki sta ključni za sintezo Ag Le, nosita gena *FUT2* in *FUT3*. *FUT2* določa tudi sekretorski status posameznika, katerega določitev na serološki način iz sline je zahteven postopek. Pri tem si lahko pomagamo tudi z določitvijo fenotipa Le, vendar v primeru Le (a-b-) ne moremo sklepati na sekretorski status. Določitev Le včasih ni mogoče izvesti s serološkimi metodami.

Z določitvijo prisotnosti alelov genov *FUT2* in *FUT3* iz DNA lahko sklepamo na sekretorski status in fenotip Le.

Najpogostejša mutacija v *FUT2*, ki določa sekretorski status v kavkaški populaciji je mutacija 428G > A. Alel Se je odgovoren za sekretorski status, alel se pa za nesekretorski. Primerjava rezultatov pripravljenih reakcij PCR v realnem času (qPCR) z rezultati poznanih genotipov in serološko določenimi statusi sekretorstva je pokazala 100-odstotno pravilno napoved sekretorskega statusa. Od 183 testiranih krvodajalcev je imelo 55 % genotip Se/Se, 15 % se/se in 30 % Se/se, torej je bilo 85 % preiskovancev sekretorjev in 15 % nesekretorjev. Metoda se je izkazala kot primerna za pravilno napoved sekretorskega statusa.

Prisotnost alelov Le/le gena *FUT3* smo z reakcijami qPCR za določili na polimorfizmih 59T > G, 202T > C, 314C > T, 508G > A in 1067T > A, ki so najpogosteje prisotni v kavkaški populaciji. Številne mutacije, ki so v svoji homozigotni obliki ali v kombinaciji na enem haplotipu odgovorne za Le-negativen fenotip, otežujejo pripravo ustreznih reakcij qPCR. Rezultate smo primerjali s poznanim fenotipom Le kontrolne skupine. Reakcije qPCR za mutacije 59T > G, 314C > T, 508G > A in 1067T > A so bile ustrezne, reakcija qPCR za 202T > C pa ni bila dovolj specifična in rezultati niso bili skladni z znanim fenotipom. Metoda se ni izkazala kot primerna za rutinsko določanje fenotipa Le in jo je treba nadgraditi.

Analiza koncentracije in velikosti zunajceličnih veziklov, izoliranih iz krvne plazme, pri zdravi slovenski populaciji

Ivica Marić, Metka Lenassi

Zunajcelični vezikli so del kompleksne celične komunikacijske poti, ki jih sproščajo vse do zdaj proučevane celice (*in vivo* ali *in vitro*). V telesnih tekočinah se kopičijo do visokih koncentracij in so zelo heterogena populacija membranskih veziklov. Zunajcelične vezikle glede na velikost in mesto nastanka razdelimo v tri podskupine: eksosomi, mikrovezikli in apoptotska telesa. Eksosomi so veliki 30 do 100 nm, primerljivi z velikostjo virusa, in nastanejo znotrajcelično z brstenjem membrane v notranjosti poznih endosomov. Z zlitjem s celično membrano se sprostijo v medcelični prostor. Mikrovezikli so veliki 100 do 1000 nm (v plazmi navadno med 100 in 400 nm), primerljivi z velikostjo bakterije, nastanejo pa z brstenjem celične membrane in se neposredno sproščajo v medcelični prostor. Apoptotska telesa so velika 1000 do 5000 nm in nastanejo, ko celica vstopi v proces apoptoze. Ker mesto nastanka veziklov težko določimo, se ZV pogosto deli le glede na velikost na majhne (premer manj kot 200 nm) in velike (premer več kot 200 nm).

Zunajcelični vezikli se sproščajo v normalnih in patoloških razmerah. Vsi so obdani s fosfolipidnim dvoslojem in vsebujejo različne značilne molekule, kot so lipidi, proteini in nukleinske kisline (mikroRNA, DNA). Biofizikalne lastnosti in specifična molekularna sestava zunajceličnih veziklov so raznolike in odvisne od načina nastanka, tipa ter funkcije celice izvora in tega, ali je celica vpletena v patološki proces. Z analizo koncentracije, velikosti in molekularne sestave sproščenih veziklov lahko tako spremljamo dogajanje v telesu. Posledično so zunajcelični vezikli proučevani kot bioznačevalniki nekaterih obolenj in njihova analiza je potencialno orodje pri diagnostiki, spremljanju napredka zdravljenja ali pa kot napoved poteka bolezni. Glede na to, da zunajcelične vezikle najdemo v vseh telesnih tekočinah, je analiza veziklov potencialno neinvazivna alternativa diagnostiki obolenj (tekočinska biopsija), kot je biopsija ali punkcija tkiva. Zaradi svoje majhnosti so zunajcelični vezikli potencialno uporabni tudi kot terapevtsko orodje namesto celic. V celico, tkivo ali na splošno v telo lahko z zunajcelične vezikle dostavimo zdravilo, rastne faktorje, citokine, RNA ali katerokoli drugo molekulo, ki sproži želeni učinek (denimo angiogeneza, regeneracija tkiva, imunomodulacija).

Prevalenca okužb z virusom SARS-CoV-2 med slovenskimi krvodajalci

Klara Železnik, Urška Rahne Potokar, Sonja Vuletić, Petra Jovanovič

Večina bolnikov okužbo s SARS-CoV-2 preboli v blagi obliki, možen pa je tudi asimptomatski potek. Po okužbi s SARS-CoV-2 se pri okuženem pojavijo protitelesa, za katera trenutno še ne vemo, ali tudi ščitijo pred ponovno okužbo.

Namen raziskave je z določanjem prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2, s komercialnim testom z zahtevanimi certifikati, pridobiti podatke o prevalenci prekuženosti med slovenskimi krvodajalci, torej med zdravo populacijo v starosti od 18 do 65 let. S tem bi dobili podatek o pogostosti prebolelih asimptomatskih okužb, kakšna je prevalenca prekuženosti glede na regijo in starostno skupino.

V raziskavo bomo vključili krvodajalce, ki tudi sicer izpolnjujejo strokovne kriterije za odvzem krvi in ki bodo podali soglasje za sodelovanje v študiji. Predvidoma bomo testirali 10.500 vzorcev, in sicer kot presečno študijo (trikrat po 3500 vzorcev v razmiku 4 mesecev iz vnaprej določenih regij). Število vključenih vzorcev krvodajalcev iz posamezne regije bo odgovarjalo odstotku števila prebivalcev v regiji glede na celotno državo. Vzorce nekaterih naključnih krvodajalcev iz zajetih regij bomo v štirimesečnih intervalih lahko testirali trikrat zapored. Prisotnost protiteles z encimsko imunsko metodo bomo določali v preostanku vzorcev za presejalno testiranje krvodajalcev, ki jih sicer po uporabi zavržemo.

Predvidevamo, da bodo stroški reagentov za določitev protiteles proti SARS-CoV-2 med 60 in 80 tisoč evri. Ocenjujemo še za 12 tisoč evrov stroškov za tiskanje soglasij, izvidov in pošiljanje izvidov ter za okoli 2000 evrov stroškov za porabo dodatnega laboratorijskega materiala. Ker dodaten odvzem krvi ni potreben, ne bo dodatnih stroškov za material, ki ga potrebujemo za odvzem, transport vzorcev in osebje, ki bo vključeno v odvzem in testiranje krvi. Prav tako ne bo stroškov iskanja in pridobivanja prostovoljcev za sodelovanje v študiji. Za nakup reagentov za testiranje bomo skušali pridobiti državna in evropska sredstva ter donacije.

Razvoj testa za določanje prisotnosti protiteles proti virusu SARS-CoV-2 v vzorcih plazme

Valerija Kovač, Maja Černilec, Marjana Šprohar, Melita Gracar, Uroš Rajčević, Sandra Omejec, Vladka Čurin Šerbec

Decembra 2019 se je v mestu Wuhan v provinci Hubei pojavilo več oseb, obolelih za pljučnico. Bolezen se je bliskovito širila na tem območju, navkljub strogim zadrževalnim ukrepom pa se je hitro razširila tudi po vsem svetu. Raziskovalci so ugotovili, da pljučnico povzroča novi virus iz družine koronavirusov, soroden virusu SARS-CoV. Virus, ki povzroča nastanek bolezni COVID-19 so poimenovali SARS-CoV-2, Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization – WHO) pa je 11. marca 2020 razglasila pandemijo. Pojav pandemije COVID-19 je povzročil veliko škodo v javnem zdravstvu in globalnemu gospodarstvu. Posledice pandemije bi najverjetneje lahko zajezili z učinkovitim cepivom ali zdravilom proti bolezni COVID-19, a to na žalost še ni na voljo.

Kadar zanesljiva terapija ni dostopna, lahko za zdravljenje uporabimo konvalescentno plazmo oseb, ki so bolezen prebolele in proti virusu proizvedle protitelesa. Plazma oseb, ki so prebolele bolezen COVID-19, vsebuje protitelesa različnih razredov (IgG, IgM, IgA), ta pa lahko ob okužbi omilijo potek bolezni, osebam z imunskimi pomanjkljivostmi ali izpostavljenim osebam (medicinsko osebje, kronični bolniki, starostniki) pa zagotovijo pasivno zaščito. Ustrezno plazmo lahko identificiramo le ob testiranju s specifičnim in občutljivim testom. Kljub veliki poplavi dostopnih testov za določanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 v plazmi prebolevnikov na trgu trenutno ni dostopnega testa, ki bi zagotavljal zadovoljivo specifičnost in občutljivost testiranja, hkrati pa bi bil za uporabnike na voljo v zadostnih količinah. Da bi omogočili neomejeno možnost zanesljivega testiranja na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 v slovenski populaciji, bomo razvili poceni posredni encimskoimunski test (ELISA) za detekcijo protiteles proti virusu SARS-CoV-2. V testu bomo določali prisotnost *in titer* protiteles, ki se vežejo na različne regije »spike« proteina in potencialno preprečujejo vstop virusa SARS-CoV-2 v človekove epiteljske celice. Poleg razvoja testa bomo vpeljali domačo proizvodnjo izbranega antigena.

Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa II (CRISPR/Cas9)

Uroš Rajčević in Anja Golob Urbanc²

¹ ZTM, R&D; ² Kemijski inštitut, Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

V prvem projektu, ki se je ukvarjal z uvajanjem tehnologije himernih antigenskih receptorjev v limfocitih T (CAR-T) na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino - Uvajanje nove tehnologije za razvoj adoptivnih T-celičnih terapij na osnovi genskega prenosa I, smo dosegli naslednje cilje:

- a) s pomočjo originalnih konstruktov, ki jih pridobimo v sodelovanju z raziskovalci Odseka za sintezno biologijo in imunologijo Kemijskega inštituta, smo pridobili CAR-T iz celičnih linij in primarnih limfocitov T,
- b) seznanili smo se z delovanjem CAR-T proti različnim antigenom (predvsem CD19 in CD20),
- c) vzpostavili smo tehnologijo molekulskega kloniranja, s katero smo lahko oblikovali različne konstrukte CAR, jih vstavili v različne transgenske vektorje (predvsem transpozone in mRNA) ter jih analizirali,
- d) celice CAR-T smo uspešno namnožili v kulturi,
- e) med ekspanzijo smo celice spremljali s tehnologijo pretočne citometrije in
- f) vzpostavili smo *in vitro* funkcijske teste citotoksičnosti in stimulacije gensko spremenjenih limfocitov T.

V novem projektu želimo nadgraditi dosežke prvega z novimi metodami sintezne biologije – kloniranje po Gibsonu. Uvesti želimo sisteme varne transgeneze limfocitov T s tehnologijo CRISPR/Cas9 ter nove teste funkcionalnosti gensko spremenjenih limfocitov T (denimo teste citotoksičnosti in stimulacije), po možnosti *in vivo*.

Razvoj testov za določanje Ag-specifičnega T-celičnega odziva in za določanje stopnje citotoksičnosti efektorskih celic CD8+

Urban Švajger, Nataša Tešić, Katrina Hartman

Določanje Ag-specifične in citotoksične funkcije imunskih celic spada med ključne novodobne laboratorijske teste, ki so nepogrešljivi pri raziskavah na področju imunologije oziroma transfuzijske medicine, razvoju novih imunoterapevtskih storitev ter pri imunskem spremljanju bolnikov (immune monitoring). Razvoj storitev na področju celičnih imunoterapij v sklopu delovnega načrta Oddelka za terapevtske storitve bo v bližnji prihodnosti izkazoval nujne potrebe po tovrstnih testih. Prvi tak primer je načrtovan razvoj tehnologije CD19 CART na aparatu Prodigy, kjer je ena od zaželenih funkcijskih ocen končnega produkta sposobnost uničenja tarčnih celic CD19+ *in vitro*. Kombinacija obeh testov, tako določanja jakosti Ag-specifičnega odziva kot citotoksične sposobnosti, je ključna pri razvoju protitumorskih cepiv (na primer na osnovi dendritičnih celic).

Slovenska biobanka zdravih kontrol – opredelitev zahtev

Maja Černilec

Leta 2019 smo se prijavili na čezmejni projekt C3B (CrossBorderBioBanking) z namenom uskladiti administrativne podlage za biobančništvo na obeh straneh meje med Slovenijo in Italijo. V predlogu projekta je bilo poudarjeno poenoteno ustvarjanje biobank oziroma prenašanje že obstoječih sistemov biobank. Ker projekt C3B zaradi neustreznega financiranja žal ne bo izveden, bistvo vsebine projekta C3B (harmonizacija sistemov biobančništva, vključno s standardizacijo in poenotenjem postopkov, s poudarkom na usklajeni podatkovni bazi informacij, ki jih vsebujejo biobanke) prijavljamo kot interni projekt, v okviru katerega bi se na ZTM lotili analize zahtev za pripravo biobanke.

Interni projekt bo zajel pregled stanja arhivov vzorcev na ZTM in v Sloveniji. Iz že obstoječih arhivov bomo pridobili ideje o dobrih praksah in smernice za postavitve lastne biobanke. Prav tako bomo pregledali pogoje za vključitev v mrežo biobank BBMRI-ERIC (*Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure – European Research Infrastructure Consortium*, <https://www.bbMRI-eric.eu/>).

Pred fizično postavitvijo nacionalne biobanke zdravih oseb bomo opredelili naslednje zahteve: kaj želimo z lastno biobanko doseči, komu bo biobanka namenjena, kakšne so zahteve uporabnikov po količini vzorcev, kakšni bodo pogoji za dostop do vzorcev v biobanki, koga želimo vključiti v biobanko (starostna struktura, porazdelitev po regijah), katere vzorce želimo shraniti (plazma, DNA in podobno) in katere parametre bomo v vzorcih določali, ter količino, pogoje in čas hranjenja vzorcev ter baze podatkov. Dorekli bomo vsebino morebitnega vprašalnika krvodajalcev, uskladili vsebino privoljenja in poslali prošnjo na Komisijo RS za medicinsko etiko, ki bo vključevala tudi podatke, ki jih smemo posredovati uporabnikom biobanke.

Ob tem bomo preučili, s katero računalniško opremo bomo zajeli vse zbrane podatke, ter ocenili kapacitete, stroške zanjo in material, ki bo potrebna za pripravo biobanke.

Na osnovi opredelitve predhodnih točk bomo pripravili predloge protokolov izvajanja posameznih korakov za pripravo biobanke, v kateri bodo shranjeni standardizirani in dobro opredeljeni vzorci. Te protokole bomo uskladili s protokoli drugih biobank, kot je BBMRI-ERIC. Usklajenost protokolov bo v primeru postavitve nacionalne banke na ZTM dolgoročno

pripomogla k vključevanju nacionalne biobanke v svetovno mrežo biobank.

Pomen tipizacije HLA-DPB1 pri izbiri sorodnega skladnega in haploidentičnega darovalca krvotvornih matičnih celic

*Sendi Montanič, Sabina Kunilo Jamnik, Dolores Hrušovar, Veronika Dolšak,
Blanka Vidan-Jeras*

Neujemanja v tkivnih antigenih HLA med darovalcem (D) in prejemnikom krvotvornih matičnih celic (KMC) odločilno vplivajo na pojav bolezni presadka proti gostitelju (GvHD) ter na preživetje bolnika (B) po presaditvi. Idealni darovalec je monozigotni dvojček, temu sledi bolniku HLA identični sorojenec, naslednja izbira je nesorodni darovalec, ki ga iščemo v registru Svetovnega združenja darovalcev kostnega mozga (angl. World Marrow Donor Association). Z možnostjo uporabe učinkovite terapije po transplantaciji v svetu narašča število presaditev KMC sorodnih polovično skladnih oziroma haploidentičnih darovalcev. Za ugotavljanje tkivne skladnosti med bolnikom in sorodnim darovalcem zadostuje tipizacija lokusov HLA-A, B, DRB1 na nizki stopnji ločljivosti. V primerih, ko z družinsko analizo lahko določimo vzorec dedovanja, pri ujemanju v 6/6 antigenov par B/D obravnavamo kot skladen, pri ujemanju 3/6 pa kot haploidentičen. Kadar haplotipov ne moremo določiti, par B/D tipiziramo kot nesorodni osebi in določamo HLA-A, B, C, DRB1, DQB1 in DPB1 na visoki stopnji ločljivosti. Zaradi šibkega vezavnega neravnovesja med lokusoma HLA-DP (HLA-DPB1 in DPA1) in drugimi lokusi HLA je več kot 80 % nesorodnih parov B/D, ki so skladni v drugih lokusih HLA, neskladnih v HLA-DPB1. Študije pri nesorodnih parih B/D dokazujejo, da le neskladnosti v določenih epitopih HLA-DP vodijo do večjega tveganja za pojav bolezni presadka proti gostitelju (GvHD). Podatkov o neujemanjih v HLA-DP pri sorodnih parih B/D za zdaj nimamo. Študije kažejo, da skladnost v obeh haplotipih HLA-A, B, DRB1 pri sorodnih parih B/D vedno ne zagotavlja odsotnosti GvHD. S študijo želimo ugotoviti, kolikokrat se pri sorodnih parih B/D pojavi nedopustno neujemanje v epitopih HLA-DP. Če bi pritegnili tudi sodelavce KO za hematologijo na Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana, bi lahko opredelili vpliv teh neujemanj na GvHD. Potrditev povezave med tkivno skladnostjo na lokusu DPB1 in GvHD pri presaditvi KMC sorodnega darovalca, bi dodatno osvetlila vlogo HLA-DP pri presaditvi KMC ter vodila k vpeljavi tipizacije tega lokusa pri bolniku in njegovih družinskih članih v rutinski obravnavi.

Laboratorijska diagnostika trombocitopenije, izzvane s heparinom, v Sloveniji

Klara Železnik, Elvira Maličev

Laboratorijska diagnostika trombocitopenije, izzvane s heparinom (HIT), vključuje serološke presejalne preiskave za določanje prisotnosti protiteles antiheparin/PF4 (angl. *platelet factor 4*) v serumu in potrditvene preiskave, s katerimi ocenimo sposobnost teh protiteles, da so dejansko zmožna aktivirati trombocite. Serološke preiskave so komercialno dostopne, občutljive, a premalo specifične, zato je treba pozitiven rezultat potrditi s testom aktivacije trombocitov, za katerega potrebujemo sveže trombocite dajalcev. Ker komercialno dostopnih funkcijskih testov ni bilo na razpolago, smo na ZTM pred leti uvedli laboratorijski test, pri katerem aktiviranje testnih trombocitov 4 dajalcev po inkubaciji z bolnikovim serumom določamo s pretočnim citometrom. V tujini je poznanih več različnih pristopov za testiranje sposobnosti protiteles antiheparin/PF4, da aktivirajo testne trombocite. Večinoma gre tudi tam za »*hišne*« metode, ki jih laboratoriji še vedno izboljšujejo.

V okviru doktorske študije bomo naredili retrogradni pregled osnovnih demografskih, kliničnih in laboratorijskih podatkov bolnikov s sumom na HIT, ki smo jih na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM) obravnavali med letoma 2015 in 2020. Rezultate bomo nato primerjali s tujimi, saj analize teh podatkov na večjem številu slovenskih bolnikov še nimamo. V laboratorijskem delu naloge bomo skušali nadgraditi oziroma optimizirati potrditveni test na pretočnem citometru, s čimer bi skrajšali čas izvedbe testa ter zmanjšali verjetnost lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov. Vključili bomo serume bolnikov po zaključenem rutinskem testiranju. Na skupini vzorcev bomo izvedli funkcijski test z razširjenim panelom dajalcev trombocitov. Preverili bomo tudi, kako različni načini obdelave bolnikovega vzorca (inaktivacija trombina) in priprave testnih trombocitov (pranje trombocitov) vplivajo na rezultat funkcijskega testa. Za lažjo interpretacijo rezultatov pri uporabi panela testnih trombocitov bomo poiskali matematično formulo, ki bo zmanjšala vpliv variabilnosti dajalcev.

Zbiranje krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi pri otrocih s solidnimi tumorji in majhno telesno težo

Ana Milojković, Marko Cukjati, Janez Jazbec, Vladan Rajić

Kljub dolgoletnim izkušnjam z zbiranjem krvotvornih matičnih celic iz periferne krvi pri odraslih je afereza pri otrocih z majhno telesno težo še vedno izziv. Razlogi so vzpostavitev ustreznega venskega pristopa, majhen krvni volumen, hemodinamske in elektrolitske spremembe ter sodelovanje otroka. V naši študiji smo obdelali dejavnike, ki lahko vplivajo na učinkovitost zbiranja, s poudarkom na vplivu izpolnjevanja celičnega ločevalnika s krvjo.

Od decembra 2014 do februarja 2017 smo pri 9 otrocih, ki so tehtali manj kot 16 kg (razpon 5,8–16 kg), opravili 14 odvzemov perifernih krvotvornih matičnih celic. Postopke smo opravili na celičnem ločevalcu Spectra Optia[®], z uporabo programa CMNC.

Ker zunajtelesni krvni volumen (ECV) med odvzemom lahko presega tudi 50 % krvnega volumna otroka, smo ta podatek upoštevali v formuli za učinkovitost zbiranja (CE) ter dodatno razdelili otroke na dve skupini. Skupina otrok z zelo majhnim krvnim volumenom (VLBV), pri katerih ECV presega 50 % TBV, ter z majhnim krvnim volumenom (LBV), pri katerih ECV pomeni manj kot 50 % TBV.

Med postopkom ni bilo hudih neželenih učinkov. CE2 je bila 39,1 (28,8–49,4). Prilagojena učinkovitost zbiranja (mCE2) je bila 46,4 % (19,9–97,6). Razlika med njima ni bila statistično značilna ($p = 0,259$). CE2 je bila v značilni negativni korelaciji z odstotkom bolnikovega krvnega volumna v ECV ($r = -0,776$, $p = 0,003$). Srednja vrednost CE pri skupini VLBV je bila 26,2 (14,38–35,8), v skupini LBV pa je bila 48,4 (36,36–61,23). Razlika med njima je bila statistično značilna ($p = 0,03$).

Zbiranje perifernih krvotvornih matičnih celic pri otrocih z majhno telesno težo s programom CMNC na celičnem ločevalcu Spectra Optia je varno in učinkovito. Glede na naše rezultate menimo, da je zaradi optimiziranja postopka otroke, pri katerih odstotek krvnega volumna v zunajtelesnem krvnem obtoku presega 50 % celotnega krvnega volumna, treba obravnavati ločeno.

Optimizacija postopka za pripravo človeških monoklonskih protiteles iz periferne krvi dajalcev na modelu hepatitisa B

Sandra Omejec, Valerija Kovač, Maja Černilec, Melita Gracar, Marjana Šprohar, Vladka Čurin Šerbec

Človeška monoklonska protitelesa so pomembna skupina bioloških zdravil za zdravljenje širokega spektra bolezni. Priprava himernih in humaniziranih monoklonskih protiteles, ki so mišjega izvora, je preprostejša, vendar je njihova uporaba pri ljudeh omejena, saj so zaradi sestave in strukture imunogena. Z namenom zmanjšanja njihove imunogenosti so raziskave v zadnjih letih usmerjene k razvoju popolnoma človeških protiteles iz dostopnih, razpoložljivih človeških virov, saj je naravni imunski odziv bogat vir visoko specifičnih in nevtralizirajočih protiteles. Omenjena protitelesa lahko zaradi razvoja tehnologij pripravimo že iz ene same celice B. Zaradi majhnega števila imunokompetentnih celic v periferni krvi običajne metode za pripravo monoklonskih protiteles niso primerne. Postopek priprave rekombinantnega človeškega monoklonskega protitelesa iz posamične celice želimo postaviti na modelu hepatitisa B. V periferni krvi je približno teden po imunizaciji v krvi prisoten največji delež zrelih celic B, ki proizvajajo veliko količino visoko specifičnih protiteles za antigen. Iz periferne krvi darovalcev, ki so bili pred kratkim imunizirani proti virusu hepatitisa B, bomo osamili celice B, ki nosijo zapis za protitelo proti antigenu hepatitisa B (HBsAg). Z novimi tehnologijami rekombinantne DNA bomo iz osamljene celice pripravili rekombinantno človeško monoklonsko protitelo proti izbranemu antigenu. Namen doktorske raziskave je optimizirati in razviti preprost postopek za pripravo rekombinantnega monoklonskega protitelesa proti HBsAg. Postopek, ki bo prinesel najboljše rezultate, bomo v prihodnosti lahko uporabili za pripravo protiteles iz oseb, ki so bile imunizirane proti kateremukoli drugemu antigenu, denimo SARS-CoV-2, ki je trenutno velik izziv za svetovno znanstveno skupnost.

Imunski in degenerativni procesi v niši krvotvornih matičnih celic pri staranju

Patrik Milić, Mojca Justin, Urban Švajger, Primož Rožman

Niša krvotvornih matičnih celic je kompleksno mikrookolje v kostnem mozgu, saj je sestavljeno iz veliko različnih tipov celic. Njena osnovna naloga je uravnavanje delovanja krvotvornih matičnih celic. Nišo krvotvornih matičnih celic sestavljajo:

- a) krvotvorne matične celice in njene diferencirane potomke,
- b) mezenhimske matične/stromalne celice in njene diferencirane potomke in
- c) medceličnina.

Staranje vodi do sprememb vseh sestavnih delov niše krvotvornih matičnih celic. Stara niša je definirana predvsem z vidika staranja stromalne komponente niše, kjer je najbolj izrazita oziroma vpadljiva opažena sprememba večja količina adipocitov (maščobnih celic).

Med imunskimi celicami imajo zelo pomembno vlogo dendritične celice, ki so nujne za posredovanje specifičnih dražljajev pridobljenemu imunskemu sistemu. V kostnem mozgu nastanejo poleg drugih imunskih celic tudi nezrele dendritične celice, ki so sposobne privzemati antigene, jih predstaviti lokalnim naivnim limfocitom T ter jih posledično tudi aktivirati. Glede na to, da se dendritične celice razvijejo iz krvotvornih matičnih celic v niši krvotvornih matičnih celic in na tem mestu tudi opravljajo svojo funkcijo, je verjetno, da stara niša zaradi spremenjenega izločanja modulirajočih dejavnikov vpliva na njihovo diferenciacijo, zorenje in funkcionalnost.

Znanstveno vprašanje doktorskega dela pri tem je, kakšna je vloga adipocitov, za katere je znano, da izločajo nekatere dejavnike, ki bi lahko v stari niši krvotvornih matičnih celic negativno vplivali na imunsko homeostazo, nastalo iz mladih presajenih krvotvornih matičnih celic. V raziskavi bomo uporabili tri modele:

- a) model mlade in stare niše krvotvornih matičnih celic *in vitro* (modificirani Dexterjev model),
- b) model mladih in starih hipertrofičnih adipocitov, diferenciranih iz mezenhimskih matičnih celic, in
- c) model razvoja mladih dendritičnih celic.

Prva dva modela bosta služila za pridobitev topnih dejavnikov, ki bodo bili shranjeni v obliki supernatantov. Supernatante s topnimi dejavniki niše in adipocitov pa bomo dodajali dendritične celice in tako spremljali uspešnost diferenciacije in funkcionalnost.

Pričakujemo, da bodo supernatanti stare niše zavirali diferenciacijo, zorenje in funkcionalnost mladih dendritičnih celic. Prav tako pričakujemo, da bodo supernatanti starih adipocitov zavirali diferenciacijo, zorenje in funkcionalnost mladih dendritičnih celic.

Presaditev kostnega mozga pri predkliničnem modelu

Mojca Justin, Patrik Milić, Katerina Jazbec, Mojca Jež, Primož Rožman

Staranje je zapleten večfaktorski proces, ki prizadene vsa živa bitja. Definiran je kot postopna izguba funkcije organizma skozi čas, zaradi česar smo vse bolj ranljivi za širok nabor bolezni. Staranje prizadene vse organske sisteme, med njimi pa je najbolj izpostavljen evolucijsko najrazvitejši imunski sistem. Posledica okvar imunskega sistema je nastanek večine bolezni, povezanih s starostjo, kot so rak, avtoimunske bolezni, srčno-žilne bolezni, infekcije, pa tudi določene kognitivne okvare. Z izboljšanjem funkcije imunskega sistema posameznika bi lahko preprečili ali zamaknili nastanek omenjenih bolezni, povezanih s starostjo. Eden potencialnih terapevtskih postopkov je presaditev mladih krvotvornih matičnih celic, ki bi jih posamezniku odvzeli in shranili v njegovi mladosti ter mu jih presadili v njegovi starosti. S tem postopkom bi pri posamezniku lahko pomembno izboljšali njegov imunski sistem, posledično pa zmanjšali obolevnost in smrtnost. V našem raziskovalnem projektu presaditve izvajamo na mišjem modelu. Starim prejemnikom presajamo celice kostnega mozga mladih darovalcev. Presaditve KM se običajno izvajajo s predhodnim kondicioniranjem, ki uniči prejemnikov KM in tako izprazni nišo ter naredi prostor presajenim celicam. Ker želimo v naši raziskavi ohraniti prejemnikov kostni mozeg nepoškodovan, za izpraznitev niše uporabljamo novo molekulo CASIN, ki povzroči začasno mobilizacijo endogenih celic v periferno kri. Tako lahko dosežemo velik odstotek himerizma, obenem pa se izognemo neželenemu toksičnemu kondicioniranju. Pričakujemo, da bomo z uporabo molekule CASIN dosegli velik odstotek himerizma po presaditvi, ki bo povzročil ugodne spremembe imunskega sistema starih živali.