

Význam HLA typizace, HLA antigeny

Geny lokusů jsou umístěné na krátkém rameni 6. chromozomu

HLA I.: A,B,C, geny kódují MHC I.

HLAII.: DP, DQ, DR geny kódují MHC II.

HLA III.: geny, které kódují proteiny účastníci se imunitní odpovědi

Vyšetření HLA-antigenů

- Stanovení HLA fenotypu vyšetřovaného jedince - **HLA typizace**. Dvě úrovně:
- Historicky starší **sérologická typizace** definuje MHC glykoproteiny, tj molekuly HLA exprimované na buněčných membránách.
- Novější **molekulárně genetická typizace** určuje HLA alely, tj sekvence nukleotidů kódující HLA antigeny.
- Metody molekulární genetiky - **DNA-typizační techniky**, přesnější než metody sérologické, precizní, rychlé, nízká cena – postupné prosazení v rutinní HLA typizace. Např. v případě sérologicky určeného antigenu HLA-DR4 se může pomocí DNA typizace odhalit jednu z dvacetišesti alel, které sérologické specifitě DR4 odpovídají.
- V současnosti již nahradily sérologickou typizaci **HLA II. třídy** (HLA-DR, DQ, DP) a v dohledné době pravděpodobně specializované přejdou na DNA techniky také při typizaci **HLA I. třídy**. (HLA-A, B, C).

- Sérologická typizace - soubor diagnostických protilátek (antisér), reakce s jednotlivými HLA antigeny, popř. se skupinami antigenů. Sestava anti-HLA protilátek (tzv. **typizační panel**) musí obsahovat takový počet protilátek, aby se mohly **jednoznačně určit jednotlivé sérologické specifity**.
- Tak např. panel olomoucké HLA laboratoře k typizaci HLA I. třídy obsahuje přes 50 protilátek k určení 14 HLA-A antigenů, přes 100 protilátek k určení 29 HLA-B antigenů a asi 15 protilátek k určení 10 HLA-C antigenů.
- Počet protilátek je vždy vyšší než počet antigenních specifit, protože některé protilátky jsou polyspecifické, tj. reagují s více antigenními specifitami. Protilátky pocházejí od **aloimunizovaných** dárců. Vesměs ze sér odebíraných matkám, u kterých došlo v důsledku opakovaných těhotenství k imunizaci HLA-antigeny svého partnera. Při sestavování panelů se využívá také protilátek monoklonálních.

Sérologická typizace HLA antigenů
tj určení molekul HLA antigenů exprimovaných na lymfocytech
pomocí lymfocytotoxického testu

Laboratorní postup:

- Pacientovi se odebere 10ml venózní krve do zkumavky s heparinem
- odeslána do laboratoře k izolaci lymfocytů, živé lymfocyty se přikapou do 60-ti jamkových destiček s předkapanou anti-HLA protilátkou
- V případě shody mezi protilátkou a antigenem přítomným na lymfocytární membráně se Ab na testované buňce naváže, nepřítomnost Ab - k vazbě nedojde.
- Vazba se zviditelní přidáním do všech jamek **králičího komplementu - usmrcení pouze buněk s navázanou Ab (pozitivní reakce)**, ostatní buňky zůstávají intaktní (**negativní**). **Pozitivní i negativní reakce hodnotíme mikroskopicky po vitálním barvení buněk (zviditelní živé buňky na úkor usmrcených).**
- vzhledem k časté polyspecifitě protilátek je k vyhodnocení potřeba zkušeností s reaktivitou panelových Ab.
- V některých laboratořích používají **průtokového cytometru** k určení jednotlivého antigenu (např. HLA-B27) v rámci diferenciální diagnostiky.

- panelová sestava DNA diagnostik (oligonukleotidy nebo PCR primerové páry komplementární k nukleotidovým sekvencím jednotlivých alel, resp. skupin alel). Počet používaných typizačních oligonukleotidů od několika desítek do stovek v závislosti na HLA-lokusu a na požadované přesnosti rozlišení **a) na úrovni jednotlivých alel (vysoké)** nebo **b) na úrovni skupin alel** zhruba odpovídajících sérologickým specifitám (**nízké**).
- př. komerční kit fy. Dynal obsahuje 24 primerových párů k rozlišení 44 HLA-DR alel, resp. skupin alel, oxfordská metoda používaná v olomoucké laboratoři k typizaci HLA I.třídy obsahuje 103 primerových párů.

Molekulárně-genetická typizace HLA-antigenů

tj. určení nukleotidových sekvencí HLA alel pomocí PCR amplifikace se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)

Laboratorní postup:

- Pacientovi se odebere 10ml krve do zkumavky s EDTA.
- z krve se extrahuje DNA, jako substrát v řadě PCR reakcí, z nichž každá **obsahuje primerový pár specifický k sekvenci určité HLA-alely.**
- **pozitivní reakce** - vyšetřovaná DNA obsahuje sekvenci příslušné alely, primery se k ní naváží po celé své délce, PCR amplifikace, vznik PCR produktu
- **negativní reakce** - daná alela ve vyšetřované DNA není přítomna, k vazbě primerů a následné amplifikaci nedojde
- Pozitivní a negativní reakce se hodnotí nejčastěji elektroforézou PCR produktů: elektroforetický gel obsahuje barvivo etidium-bromid, vmezeření do DNA; po ozáření UV světlem barvivo zviditelní svítící proužky na gelu.
- HLA alely vyšetřovaného pacienta určíme podle toho, se kterými PCR primery jeho DNA pozitivně reagovala

Význam HLA typizace pro transplantace

Vyšetření poskytuje podklady k výběru optimálního páru dárce-příjemce

A) transplantace ledvin

B) transplantace kostní dřeně (TDK)

je podstatná kompatibilita v lokusech HLA-A, B, HLA-DR (MHC II.)
Př.odlišnost v jediné antigenní specifitě HLA-DR negativně ovlivňuje přežívání štěpu

Postup:

1. u všech čekatelů, tj pacientů chronického dialyzačního programu je dopředu vyšetřen HLA fenotyp
2. ten je evidován v pražském centru na tzv **čekací listině**.
3. v sérech čekatelů jsou každé 3 měsíce vyšetřovány Ab proti HLA antigenům (ty se objevují u nemocných často u opakovaných transfuzí, např. v důsledku těhotenství či opakované transplantace).
4. vyšetřovaná séra čekatelů jsou distribuována do regionálních laboratoří k provedení cross-match (křížová zkouška) při vlastním výběru optimálního páru

- **V případě výskytu dárce:**

1. Spádová HLA laboratoř okamžitě vyšetří HLA fenotyp dárce a sdělí jej centru.

2. Centrum zadá fenotyp dárce do počítače k provedení výběru **50** potenciálních příjemců, vyhovující **výběrovým kritériím:**

- **a)** Kompatibilita v ABO systému **b)** HLA kompatibilita **c)** urgentnost indikace **d)** doba čekání na transplantaci

Jména čekatelů sdělí centrum spádové HLA laboratoři, která provede **cross-match** příjemců.

Cílem je zjistit: 1. zda čekatelé nemají Ab proti HLA antigenům dárce 2. zkouška: séra vybraných čekatelů se inkubují s lymfocyty dárce, jsou –li Ab v séru přítomny, naváží se Ag lymfocytů dárce (**pozitivní reakce**) 3. pozitivní výsledek křížové reakce transplantaci kontraindikuje 4. jména pozitivních čekatelů jsou nahlášena do centra a ze seznamu vyloučena 5. v konečném rozhodnutí se zohledňuje vzdálenost místa odběru k místu transplantace 6. dva definitivně vybraní jedinci jsou uvědoměni a převezeni do transplantačních center.

V ČR je současně **6 transplantačních center** provádějící transplantace ledvin sdružené v organizaci „český transplant“, která provádí i jiné transplantace.

- **B) Imunologické vyšetření před transplantací kostní dřeně**
- TDK je indikována u stavů
- **1. s primárně nebo sekundárně porušenou funkcí kostní dřeně** (u pacientů s malignitami-lymfomy, akutní leukémie, některé solidní nádory).
- **2. transplantace umožňuje terapii poškozených hematopoetických buněk vyvolaného vysokodávkovanou chemoterapií**
- **3. při terapii primárních poruch kostní dřeně** (při těžkých imunodeficitech)
- **4. při léčbě jiných sekundárních poruch kostní dřeně** (aplastická anémie, stavy po ozáření)
- **5. u thesaurismós (hromadení gangliosidu)**

Specifita TKD:

Dárcovská dřeň obsahující mnoho imunokompetentních buněk, je transplantována pacientovi, jehož IS je vážně narušen primárním onemocněním. **Vždy dárcovské T lymfocyty pronikají do příjemcova organismu, který není schopen je eliminovat a vyvíjí se reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)** se závažnými důsledky. Zasažení organismu je tím vyšší, čím více se buňky dárce a příjemce liší ve své HLA výbavě. Z toho důvodu se musí dodržet co nejvyšší stupeň kompatibility, **tj shodu ve všech HLA I. A II. třídě**. (ideální mezi jednovaječnými dvojčaty nebo HLA identickými sourozenci). Hledání dárce se soustřeďuje nejdříve na nejbližší příbuzné

a) příbuzenské TKD b) nepříbuzenské TKD

- **Příbuzenské TKD**

- Z praxe pravděpodobnost výskytu HLA identického sourozence je 25%, neboť geny pro všechny HLA antigeny jsou přítomny na jediném 6. chromozomu. Pokud nemocný nemá HLA identického sourozence transplantace probíhá s menší pravděpodobností úspěchu **a) u rodičů** **b) od haploidentických sourozenců** (jeden HLA haplotyp je identický, druhý odlišný).

Nepříbuzenské TKD

Se uplatňuje pro větší část nemocných

Vyhledávají se dárce s identickým HLA fenotypem ve velkém souboru dobrovolných dárců (tzv. registru).

1.Centrální registr dárců KD Plzeň, 2.národní registr dárců KD Praha, 19 tisíc dárců. Vzhledem k velkému

polymorfismu HLA systému zřídka (v 1/5 případů) se najdou identičtí jedinci na národní úrovni.

Národní registry se spojují na evropské i světové úrovni (**4 miliony registr. dárců**).

- **Druhy transplantací:**

- **a)** plná kostní dřeň
- **b)** pluripotentní kmenové buňky (CD34+), které lze získat z dřeně nebo periferní krve, vzhledem k prevence GvHD je výhodné transplantovat vlastní autologní (CD34+) tj. buňky odebrané pacientovi s malignitami ještě před nasazením vysokodávkované chemoterapie.
- **c)** zkouší se i transplantace z pupečnickové krve.

HLA typizace pacientů

- **1.** Vyšetření HLA antigenů pacienta se provádí jednak v rámci vytypování vhodného páru dárce – příjemce při orgánových transplantacích
- **2.** jako pomocné vyšetření při podezření na některé choroby asociované s výskytem typických HLA – antigenů.

Význam HLA typizace pro transplantaci, předtransplantační vyšetření

- kompatibilita mezi dárce a příjemcem

orgánové transplantace

transplantace ledvin

- kompatibilita v lokusech HLA-A, B a zejména HLA-DR
- již odlišnost dárce od příjemce v jediné antigenní specifitě HLA-DR negativně ovlivňuje přežívání štěpu

transplantace srdce a plic a jater

HLA kompatibilita méně významná vzhledem k minimální expresi HLA antigenů na buňkách těchto tkání

transplantace rohovkové tkáně

na HLA kompatibilitu se nebere vůbec ohled

alogenní transplantace kostní dřeně

- nutná kompatibilita na úrovni molekulárně geneticky definovaných alel (HLA-A, B)
- kromě shody v HLA-DR důležitá shoda alel také v dalších lokusech DQ

Význam vyšetření HLA pro diagnostiku chorob

- **Podstata:**

- s některými onemocněními se vyskytují určité HLA antigeny častěji, než v běžné populaci
- lidé s určitými HLA antigeny mají zvýšené riziko vzniku některých chorob
- choroby, v jejichž etiologii hraje důležitou roli imunitní systém, zejména autoimunitní onemocnění
- choroby, u nichž zatím žádnou významnější etiopatogenetickou vazbu k imunitnímu systému neznáme (maniodepresivní choroba, narkolepsie idiopatická skolióza a další)

- **Mechanismus vzniku:**

- snad souvisí se schopností některých HLA antigenů různě účinně předkládat určité antigeny imunokompetentním buňkám imunitního systému

- **Jako relativní riziko označujeme:**

- V případě asociací chorob s HLA antigeny je rizikovým faktorem přítomnost některého HLA antigenu
- **Klinicky nejvýznamnější asociace (relativní riziko 87):**
- mezi revmatickým onemocněním ankylozující spondylitidou (Bechtěrevova choroba) a antigenem HLA-B27
- **další revmatické choroby vázané na Ag HLA B-27:**
- Reiterův syndrom, konjunktivitida, artritida s relativním rizikem 37.

| Choroba | HLA antigen | riziko |
|----------------------------|-------------|--------|
| Ankylozující spondylitis | B27 | 87 |
| • Reiterův syndrom | B27 | 37 |
| • Psoriatická artritida | B27 | 12 |
| • Revmatoidní artritida | DR4 | 6 |
| • Dermatitis herpetiformis | DR3 | 56 |
| • Pemfigus vulgaris | DR4 | 14 |
| • Myasthenia gravis | B8 | 5 |
| • Celiakie | DR3 | 19 |
| • Goodpastureův syndrom | DR2 | 13 |

- Tesaurismosa – Thesaurismosis-**gangliosidóza**- onemocnění endokrinního systému, přílišná metabolizace vedoucí k selhání jater, dochází k nahromadění urč. látek
- dochází k **hromadění gangliosidů GM2** (spojení tuk-cukr) v buňkách mozku, ukládání **gangliosidů GM3 a GM4** do CNS je provázeno ukládáním i zvýšením koncentrace s **hromaděním** sfingomyelinu ve vnitřních orgánech, ale bez postižení CNS, inhibiční působení **gangliosidů** na žírné buňky.