

## 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 matek, 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

**tzj 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)

transplantace ledvin

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 (102 center)
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:**

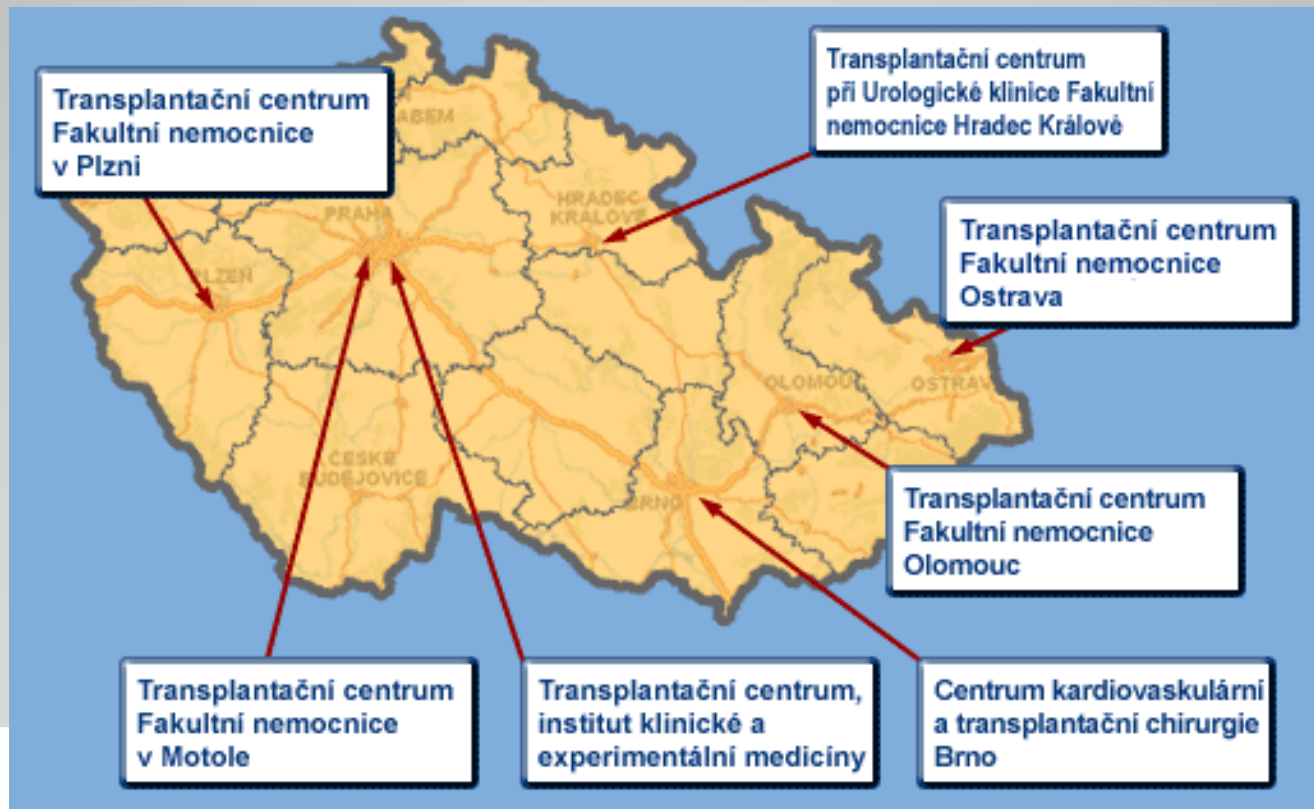
- **a)** Kompatibilita v ABO systému **b)** HLA kompatibilita **c)** urgentnost indikace **d)** doba čekání na transplantaci

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**), přidá se králičí komplement - hodnocení přežitých buněk
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 **7 transplantačních center** provádějící transplantace ledvin sdružené v organizaci „český transplant“, která provádí i jiné transplantace.



## TDK

### Imunologické vyšetření před transplantací kostní dřeně

- TDK je indikována u stavů
- **1. při terapii primárních poruch kostní dřeně** (při těžkých imunodeficitech)
- **2. s primárně nebo sekundárně porušenou funkcí kostní dřeně** (u pacientů s malignitami-lymfomy, akutní leukémie, některé solidní nádory). Aktuální stav: 450000 pacientů
- **3. pacienti s malignitami po poškození hematopoetických buněk vyvolané vysokodávkovanou chemoterapií**
- **4. při léčbě jiných sekundárních poruch kostní dřeně** (aplastická anémie, stavy po ozáření)
- **5. u thesaurismós** (hromadění gangliosidu)

## Specifita TDK:

Dárcovská dřeň obsahující mnoho imunokompetentních buněk, je transplantována pacientovi, jehož IS je vážně narušen 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,B) a II. Třídy (DQ, DR)**. (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 (25% šance)).

## 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, (17) 60 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 (27) milionů registr. dárců**).

- **Další 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.



# Další orgánové transplantace

## 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

# 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

## Krevní skupiny ABO a choroby

- **Hirszfeld, 1918**: „Existuje vztah mezi některými těžkými chorobami a krevními skupinami“
- Již v r. 1945 vyslovena hypotéza Ford, 1945: „Některé genotypy jsou odolnější vůči některým chorobám, jiné zase méně odolné.“
- Již v první polovině 60.let bylo známo **12** těžkých chorob, které vykazovaly spojení s krevními skupinami.
- **Forel a Helmbold, 1972**: Lidé s jistým typem krevní skupiny jsou buď odolní nebo naopak náchylní k některým infekčním chorobám: **lepra, TBC, lupus, černé neštovice, mor** apod. a k jistým chorobám parazitárním. Přitom je zřejmější, že lidé s krevní skupinou A jsou v jisté nevýhodě s krevní skupinou 0 nebo B.

- **Jörensén, 1974:** A sk. v porovnání s krevní skupinou 0, je nepoměrně častěji spojena s většinou **karcinomů, diabetes mellitus** atd. „V současných podmínkách v Evropě mají lidé s krevní skupinou 0 o 60%větší pravděpodobnost, že se dožijí 75 a více let, nežli se skupinou A.“

<u>Inf. choroby</u>	<u>Vnitřní choroby</u>
mor	karcinomy
černé neštovice	<u>diabetes mellitus</u>
Lues	<u>infarkt myokardu</u>
TBC	zlomenina krčku femuru
lepra	perniciózní anémie
	revmatická horečka
	onemocnění žlučníku, ledvin
	Vředová choroba dvanáctníku a žaludku
	Ischemická choroba
	<u>Asthma bronchiale</u>
	<u>atd</u>

- 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 ■

- Narkolepsie, též známá jako DMS (Syndrom Daniela Merricka) je chronická neurologická porucha, kdy mozek není schopen správně regulovat cyklus spánku a bdění. Nejedná se ani o depresi či jiné mentální onemocnění
- Reiterův syndrom je onemocnění, které je charakteristické společným výskytem zánětu kloubů, zánětu spojivek oka, zánětem močové trubice i kožními změnami. Objevuje se po jistých bakteriálních infekcích střeva a močových cest.

# Určování otcovství

- Genetický P- test 2450,-(3400,-)určování otcovství na netu, posudek pro soud
- Buňky sliznice dutiny ústní, izolace DNA
- Test na množství a kvalitu DNA
- Amplifikace DNA
- Zjištění typu alel pomocí primerů tzv. **fragmentační analýza**
- Amplifikace s 35cykly, fragmentační analýza –DNA se dělí podle velikosti, **metodou kapilární elektroforézy zjištění typů alel**, zn. **typu polymorfizmu**, pomocí různých druhů fluorescenčních barviv na vázaných na rozdělenou DNA, po ozáření světly různých vlnových délek na různé typy navázaných fluoroforů dochází k excitaci světla určité barvy, která se převádí na píky, poloha píku - typ alely