Senzibilacija na antigene sustava HLA

Vidović, Antonija

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:824409

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonija Vidović

SENZIBILIZACIJA NA ANTIGENE SUSTAVA HLA

Završni rad

Split, 2015. god.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Antonija Vidović

SENZIBILIZACIJA NA ANTIGENE SUSTAVA HLA

SENSITIZATION TO ANTIGENS OF THE HLA SYSTEM

Završni rad/ Bachelor thesis

Mentor:

dr.sc. Esma Čečuk Jeličić

Split, 2015. god.

Popis kratica

CM- *engl. Cross Match*; test križne reakcije

CDC- *engl. Complement Dependent Cytotoxicity*; metoda citotoksičnosti ovisne o komplementu

CREG - *engl. Cross Reactivity Group*; križna reaktivnost

DSA- *Donor Specific Antibodies*; donor specifična antitijela

ELISA- *engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; imunoenzimski test visoke osjetljivosti i selektivnosti

HLA- humani leukocitni antigeni

MAP- *engl. Microsphere Assay Platform*; metoda mikrosfera obloženih specifičnim antigenima HLA

MIC- *engl. MHC class I-related chain*;

MHC- *engl.Major Histocompatibility Complex*; glavni sustav tkivne snošljivosti

PRA- *engl. Panel Reactive Antibodies*; panel reaktivnih antitijela

TAP- *engl. Transporter associated with Antigen Processing*; kodira transportere peptida

Sadržaj

1. UVOD 5

1.1. Sustav HLA 7

1.1.2. Geni HLA razreda I 9

1.1.3. Geni HLA razreda II 10

1.2. Antigeni sustava HLA 11

1.2.1. Antigeni HLA razreda I 12

1.2.2. Antigeni HLA razreda II 13

1.3. Antitijela HLA 15

2. CILJ RADA 18

3. MATERIJALI I METODE 19

3.1. Materijali 19

3.2. Metode 19

3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT) 21

3.2.3. Izvođenje križne probe metodom CDC 23

4. REZULTATI 25

5. RASPRAVA 32

6. ZAKLJUČCI 34

7. LITERATURA 35

8. SAŽETAK 37

9. SUMMARY 39

10. ŽIVOTOPIS 41

1. UVOD

Glavni sustav tkivne snošljivosti (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) je najsloženiji poznati genetički sustav odgovoran za sintezu specifičnih antigena na površini gotovo svih stanica organizma. Kod čovjeka je ovaj složeni sustav otkriven 1954. god. na kraćem kraku kromosoma 6 kada je nobelovac Jean Dausset kod 90% politransfundiranih bolesnika otkrio antitijela ovog sustava koja su nastala kao odgovor primatelja na strane molekule (aloantigene) davatelja. Kod čovjeka glavni sustav tkivne snošljivosti nazvan je sustav HLA (engl. Human Leukocyte Antigen).

Kontrola sinteze tkivnih antigena, regulacija i imunološko prepoznavanje stranih antigena, nadziranje, međudjelovanje i suradnja s drugim limfoidnim stanicama tijekom imunološke reakcije, nadziranje izvršnog dijela reakcije protiv stranih antigena te sudjelovanje u proizvodnji specifičnih protutijela su uloge sustava HLA u ljudskom organizmu. Upravo zbog brojnih i važnih funkcija sustav HLA ima značajnu ulogu u transplantacijskoj imunologiji kako kod transplantacije solidnih organa (bubreg, jetra, srce, gušterača), tako i kod transplantacije krvotvornih matičnih stanica. [(1)]

Proizvodnja antitijela HLA je odgovor organizma na unos stranih antigena HLA koji u organizam mogu dospjeti trudnoćama, transfuzijama ili transplantacijama. Antitijela HLA imaju središnju ulogu u preživljavanju transplantiranog organa i odgovorna su za njegovo odbacivanje. Prisutnost antitijela HLA u serumima bolesnika na listi čekanja za transplantaciju organa ili kod višerotkinja izražava se kao postotak panel reaktivnih protutijela (engl. Panel Reactive Antibodies, PRA %), odnosno stupanj senzibilizacije HLA.

Bolesnicima koji čekaju na transplantaciju solidnog organa (bubreg, srce, jetra, gušterača), u sklopu predtransplantacijske imunološke obrade određuju se geni HLA i antitijela HLA dok se prije same transplantacije izvodi križna proba (engl. cross match, CM) da bi se utvrdilo postojanje antitijela HLA koja su uperena protiv davateljevih antigena HLA, tzv. davatelj specifična antitijela (engl. Donor Specific Antibodies, DSA). Test križne probe u najvećem broju laboratorija izvodi se metodom citotoksičnosti ovisne o komplementu (engl. Complement Dependent Cytotoxicity,

CDC). Posljednjih godina razvijaju se nove, mnogo osjetljivije metode kojima se mogu otkriti i ona antitijela HLA koja nije moguće otkriti metodom CDC. Takve tehnike su metoda antiglobulin-CDC, ELISA, (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), protočna citometrija i metoda Luminex xMAP tehnologija (engl. Microsphere Assay Platform, metoda mikrosfera obloženih specifičnim antigenima HLA). Metoda Luminex, koja se temelji na mikrokuglicama obloženim specifičnim antigenima HLA, omogućava nam najprecizniju analizu specifičnosti antitijela HLA kod senzibiliziranih bolesnika.

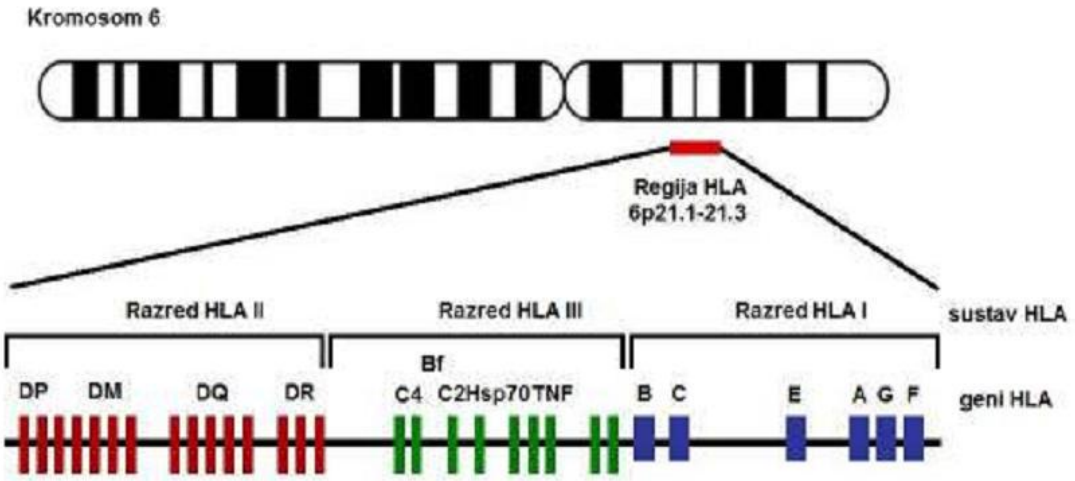
U transplantacijskoj medicini dva su osnovna imunološka čimbenika i to su podudarnost u genima HLA između primatelja i davatelja organa te prisutnost citotoksičnih antitijela HLA u serumu primatelja organa. Ti čimbenici imaju važnu ulogu u toleranciji presatka i mogu biti prognostički vrlo važni. Pozitivan test križne probe (ukazuje na nazočnost DSA) predstavlja zapreku za transplantaciju bubrega i srca.[(2)]

1.1. Sustav HLA

Sustav HLA (Humani Leukocitni Antigeni) naziv je za glavni kompleks tkivne srodnosti u čovjeka. Smješten je na kraćem kraku kromosoma 6, odsječak 6p21.3 i kodira sintezu proteina koji predočavaju antigene imunološki kompententnim stanicama. (Slika 1.)

S obzirom na različite genske porodice, humana MHC regija podijeljena je u tri razreda koji zauzimaju oko 7.6 Mb (Mega baza):

- geni HLA razreda I smješteni su telomerično
- geni HLA razreda II nalaze se centromerično
- geni HLA razreda III smješteni su između njih. [3]



1. Smještaj regije HLA na kromosomu 6

Izvor: WEB [14]

Međusobni raspored lokusa određen je na osnovi učestalosti crossing overa među njima. Učestalost rekombinacija nešto je veća u oogenezi (1.1%) nego u spermatogenezi (0.7%) i u skladu je s udaljenostima pojedinih lokusa HLA. Tako je između lokusa A i B određena učestalost crossing overa od 1%, između lokusa B i C oko 0.2%, između lokusa B i DR oko 0.94%, te između lokusa A i C 0.8%. Na osnovi tih podataka može se, krećući se od centromere zaključiti, sljedeći raspored lokusa: DP...DR...B...C...A...G.

Geni HLA smješteni na jednom kromosomu tvore haplotip HLA. Stapanjem roditeljskih gameta dijete nasljeđuje po jedan haplotip od svakog roditelja, te ne može imati više od 2 alela za pojedini lokus HLA. Dva haplotipa čine genotip HLA. Brojnim populacijskim istraživanjima nađen je znatno manji broj haplotipova od teoretskog broja mogućih haplotipova. Taj rezultat je posljedica pojave koja se javlja između alela dvaju ili više usko vezanih lokusa sustava HLA, a naziva se neravnoteža udruživanja alela ili linkage disequilibrium.

Osnovna je karakteristika neravnoteže udruživanja alela da se različiti aleli dvaju ili više vezanih lokusa javljaju na istom haplotipu češće nego što bi se to moglo očekivati na osnovi njihove genetske frekvencije.

Najčešće spominjani primjer udruživanja alela u populacijama bijele rase je haplotip HLA-A*01:01-C*07:01-B*08:02-DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01(serološki ekvivalent: HLA-A1-Cw7-B8-DR3-DQ2), tzv. haplotip „super B8“.

Pojava neravnoteže udruživanja može se pripisati selekcijskoj prednosti pojedinih haplotipova, odnosno neravnoteži razdiobe pojedinih gena u populaciji uslijed miješanja populacija i migracija.

Neravnoteža udruživanja najveća je između alela HLA-B i HLA-C lokusa, a razlog tomu je što navedeni lokusi imaju najmanju učestalost crossing overa budući da su na kromosomu smješteni blizu jedan drugog. (2)

Geni razreda I i II sustava HLA predstavljaju jedan od najpolimorfnijih genskih sustava istraživanih u čovjeka. Do danas je otkriveno preko 7500 alela HLA pri čemu približno ¾ otpada na alele HLA razreda I. Jedno od objašnjenja za ovaj veliki polimorfizam može biti da se sustav HLA razvijao brže od ostalih genetskih sustava ili je pak posljedica prirodne selekcije temeljene na stvaranju alela HLA koji stvaraju preduvjet za otpornost na različite uzročnike bolesti. Posljedica velikog polimorfizma je sposobnost prepoznavanja bilo kojeg antigena koji se može pojaviti u organizmu. Pozitivna prirodna selekcija omogućila je razvoj i očuvanje polimorfizma sustava HLA. Nastajanje novih alela HLA može biti posljedica konverzije gena (zamjena alela različitih, ali homolognih lokusa), točkastih mutacija (zamjena jednog nukleotida unutar pojedinog alela) i rekombinacija između alela. (1)

Geni HLA razreda I i II odgovorni su za sintezu antigena HLA, dok su geni HLA razreda III odgovorni za sintezu komponenti komplementa. U regiji se nalazi više od 252 gena ali samo 28% ovih gena ima neku funkciju u imunom sustavu. Geni HLA se nasljeđuju kodominantno. [4]

Određivanje antigena/gena HLA koristi se kao identifikacijska slika pojedinca ili cijele populacije. Učestalost pojedinih antigena/gena HLA u populacijama je različita i na temelju tih podataka mogu se izvoditi različiti antropološki zaključci o seobama tijekom povijesti ili miješanju populacija. Određivanje učestalosti pojedinih alela unutar populacija značajno je za antropološke studije jer ukazuje na miješanje pojedinih populacija, izoliranost, kao i njihove migracije.

Budući da je sustav HLA kod čovjeka izrazito polimorfan, antigeni/geni HLA odlikuju se visokom specifičnošću za svakog pojedinca. Upravo je ovo svojstvo omogućilo da se metode određivanja antigena/gena HLA dugi niz godina svrstaju u metode isključivanja očinstva kao i u identifikaciji osoba u sudskoj medicini.

Sustav HLA ima brojne i važne funkcije u organizmu pa je istraživanje ovog sustava našlo brojne primjene u medicini (dijagnostika bolesti, transfuzija, transplantacija), antropologiji (populacijska istraživanja) i u sudskoj medicini.

Standardizacijom seroloških tehnika za određivanje antigena HLA razreda I započinje i istraživanje povezanosti gena HLA i bolesti. Nagli razvoj na ovom području dogodio se kada je 1973. god. otkrivena povezanost između antigena HLA-B27 i ankilozantnog spondilitisa. [5]

1.1.2. Geni HLA razreda I

Regiju HLA razreda I sačinjava nekoliko gena HLA kojima je osnovna zadaća kodiranje teškog α lanca molekula HLA razreda I: HLA-A, -B, -C, -E, -F i -G. Ovi geni spadaju u funkcionalne gene. Prva skupina funkcionalnih gena obuhvaća klasične gene HLA razreda I koji pokazuju veliku raznolikost i odgovorni su za sintezu transplantacijskih antigena (HLA-A, -B, -C). Njihova je odlika velika raznolikost, a

najveća je pronađena u regiji vezanja stranog peptida koju sastavljaju α1 i α2 domene. Geni HLA-E, -F i -G su neklasični geni HLA razreda I i pokazuju znatno manju raznolikost u usporedbi s klasičnim antigenima HLA razreda I. Treća skupina obuhvaća gene ili dijelove gena (najvjerojatnije pseudogeni u koje spadaju geni lokusa HLA-H, -J, -K i –L). [(2)]

Gen HLA razreda I sastoji se od 8 egzona koji kodiraju teški lanac molekule HLA razreda I. Egzon 1 kodira vodeći peptid, egzon 2 kodira α1 domenu, egzon 3 kodira α2 domenu, a egzon 4 kodira α3 domenu koje se nalaze u izvanstaničnom prostoru. Egzon 5 kodira transmembransku regiju, a egzoni 6 i 7 kodiraju citoplazmatsku regiju. Završni dio molekule, netranslatirajući 3' kraj kodira egzon 8. Najpolimorfniji dio molekule HLA razreda I kodiraju egzoni 2 i 3. Egzoni gena razreda I sustava HLA sastoje se od 1089-1101 nukleotida, a teški lanci su sastavljeni od 362-366 aminokiselina. Unutar regija HLA pronađena su još 2 tipa gena koja ne nose oznaku HLA već su to „non"-HLA geni. Tu se ubrajaju geni za 2 podjedinice transportnih proteina-TAP koji prenose peptide u endoplazmatski retikulum.

U regiji HLA razreda I nalazi se i porodica MIC gena (engl. MHC class I-related chain), sa sličnim sekvencama kao što ih imaju geni HLA razreda I. Poznato je 5 MIC gena: MICA, MICB koji su funkcionalni geni i MICC, MICD, MICE koji su pseudogeni . Geni MICA i MICB sastoje se od 6 egzona. Zastupljenost njihovih molekula je slaba i ograničena samo na epitelne stanice. [(6)]

1.1.3. Geni HLA razreda II

Geni HLA razreda II se prema svojoj funkciji dijele u tri skupine. Prvu skupinu čine geni koji kodiraju α ili β lanac molekula HLA razreda II, drugu skupina se sastoji od pseudogena koji sliče genima za kodiranje lanaca α ili β dok su treća skupina geni koji kodiraju druge produkte uključene u razgradnju i prezentaciju antigena uz posredovanje antigena HLA razreda I. Geni TAP1 i TAP2 koji kodiraju transportere peptida i gen za sintezu tapsaina koji omogućava prijenos peptida do molekule HLA razreda I se svrstavaju u posljednju skupinu. [(2)]

Gen HLA razreda II ima 5 egzona za α lanac i 6 egzona za β lanac. Egzon 1 kod α lanca kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 kodira α1 domenu, egzon 3 kodira α2 domenu, egzon 4 transmembranski i citoplazmatski dio, a egzon 5 kodira 3' netranslatirajuću regiju α lanca. Kod β lanca egzon 1 kodira početnu sekvencu peptida, egzon 2 β1 domenu, egzon 3 β2 domenu, egzon 4 kodira transmembranski dio, egzon 5 citoplazmatski dio, a egzon 6 kodira 3' netranslatirajuću regiju.

Regija HLA razreda II se dijeli na 5 subregija, a najviše istražene su: DR, DQ i DP.

Subregija HLA-DP sastoji se od dva funkcionalna gena HLA-DPA1 i HLA-DPB1 te dva pseudogena HLA-DPA2 i HLA-DPB2.

Subregija HLA-DQ ima dva funkcionalna gena HLA-DQA1 i HLA-DQB1 te tri pseudogena HLA-DQA2, HLA-DQB2 i HLA-DQB3.

Subregija HLA-DR je najsloženija od 5 subregija. Ima aktivni gen HLA-DRA1 i veći broj gena HLA-DRB od kojih su aktivni HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 i -DRB5, dok su psudogeni HLA-DRB2, -DRB6, -DRB7, -DRB8 i -DRB9. Svi ljudi ih nemaju u istom broju jer postoji 5 glavnih haplotipova HLA-DRB. [7]

1.2. Antigeni sustava HLA

Molekule ili antigeni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC) su membranski biljezi prema kojima se razlikuju jedni unutar iste vrste. Po kemijskom sastavu spadaju u transmembranske glikoproteine. Nalaze se na svim stanicama s jezgrom i trombocitima. Vrlo malo ovih antigena nalazimo na spermatozoidima, oocitama, stanicama placente i središnjem živčanom sustavu (imunološki privilegirana tkiva). Geni HLA razreda II kodiraju sintezu molekula HLA razreda II koje su nazočne samo na nekim stanicama (limfocitima B, aktiviranim limfocitima T, monocitima, makrofagima, epitelnim i endotelnim stanicama).

Glavna uloga molekule HLA je razlikovati vlastito od stranog, prezentirati strane peptide imunokompetentnim stanicama i pokrenuti imunološku reakciju (velik značaj u

reakciji odbacivanja transplantata). Ako dođe do greške u ekspresiji molekule HLA, rezultat je patološko stanje ili autoimunološka bolest. Molekule HLA uključene su u regulaciju upalnog procesa, sudjeluju u odgovoru na virusne infekcije i prepoznavanju tumorskih stanica.

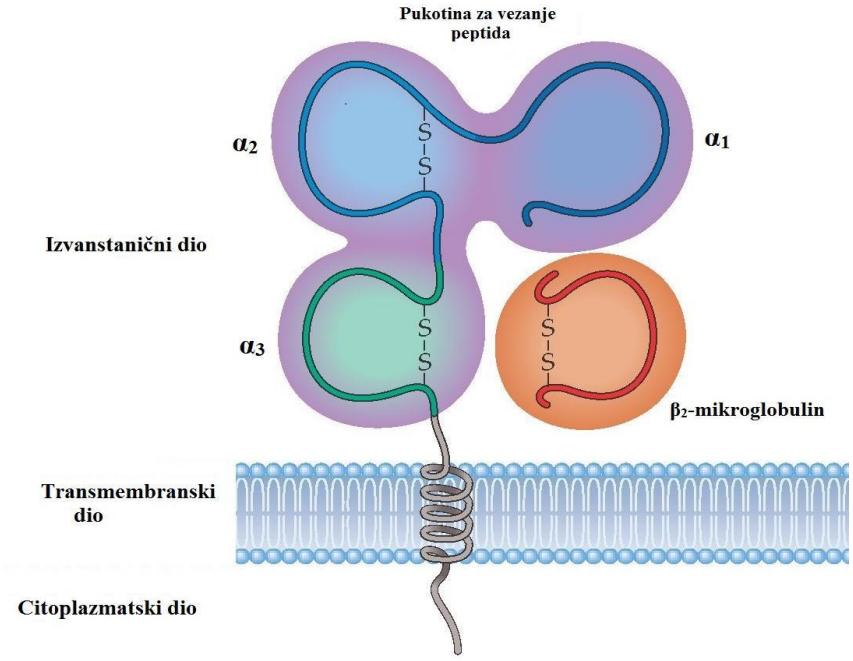
Molekula HLA građena je od dva dijela: dijela koji određuje privatnu specifičnost i dijela koji određuje „opću“ specifičnost. Molekule HLA razlikuju se jedna od druge u slijedu aminokiselina, različitosti u trodimenzionalnoj strukturi kao i građi veznih mjesta za različite peptide. Na površini stanice u stranoj jedinki, molekule HLA se ponašaju kao antigen koji pokreće humoralni odgovor u organizam i na taj način dolazi do stvaranja specifičnih antitijela. [1]

1.2.1. Antigeni HLA razreda I

Antigeni HLA razreda I građeni su od dva polipeptidna lanca vezanih nekovalentnim vezama. To su teški ili α lanac, kodiran genima HLA razreda I (-A, -B i -C) i laki ili β lanac, kodiran genom na 15. kromosomu. Kristalografskom analizom građe HLA razreda I utvrđene su 4 različite regije: regija vezanja peptida, regija nalik imunoglobulinima, transmembranska regija i citoplazmatska regija.
N-terminalni kraj alfa 1 i alfa 2 domene alfa lanca čine sekundarnu strukturu, tzv. beta nabranu ploču sastavljenu od 8 nabora, i imaju izgled alfa uzvojnice te zajedno tvore pukotinu približne veličine 25Åx10Åx11Å.

Vanstanični dio α lanca tvore regija vezanja peptida i regija slična imunoglobulinima i to je N-terminalni kraj lanca. Ima tri domene: α1, α2 i α3 domenu, a svaka od njih ima otprilike 90 aminokiselina. N-terminalni krajevi α1 i α2 domene tvore β-nabranu ploču od osam nabora, dok njihovi karboksilni krajevi tvore strukturu α-uzvojnice. Ploča i uzvojnica zajedno čine pukotinu za vezanje peptida unutar antigena HLA razreda I, a veličina peptida koji se tu može vezati je 9-11 aminokiselina. Domene α1 i α2 pokazuju veliku raznolikost u slijedu parova baza, a domena α3 manju raznovrsnost u slijedu parova baza te je vezno mjesto za molekulu CD8 (koreceptor za citotoksični limfocit T). Domena α3 veže domenu α2 i dio α lanca koji prolazi kroz staničnu membranu. Ona

ujedno svojom građom nalikuje na konstantnu domenu imunoglobulina, kao i β2-mikroglobulin te im je struktura slična petlji kod imunoglobulina.



Slika 2. Molekula HLA razreda I s pukotinom za vezanje peptida i β2-mikroglobulinom
Izvor: WEB [15]

Transmembranska regija je otprilike 25 hidrofobnih aminokiselina koje se nastavljaju na α3 domenu i u strukturi α-uzvojnice prolaze kroz staničnu membranu učvršćujući tako antigen HLA razreda I.

Citoplazmatska regija je hidrofilni dio α lanca sa otprilike 30 aminokiselina koje su smještene u citoplazmi i predstavljaju karboksilni kraj teškog lanca. [2] [8]

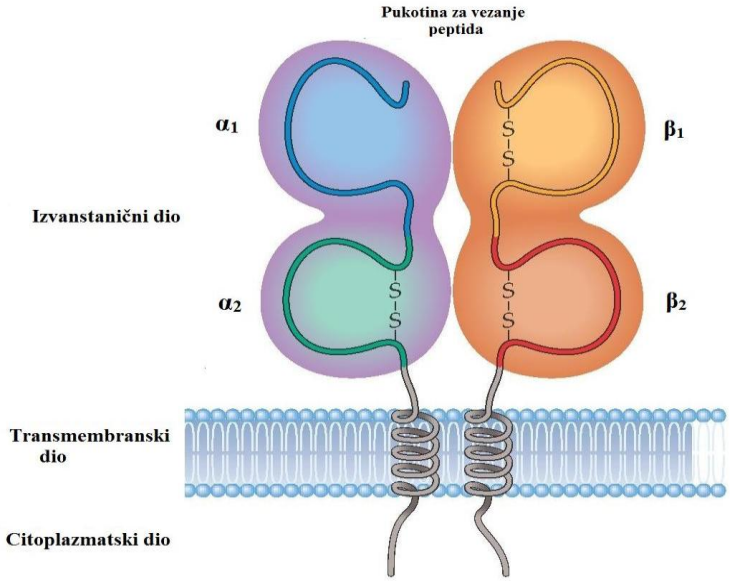
1.2.2. Antigeni HLA razreda II

Antigen HLA razreda II je glikoprotein građen od dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca α i β koji prolaze kroz staničnu membranu u citoplazmu. Oba lanca imaju oligosaharidnu skupinu blizu N-terminalnog, vanstaničnog kraja i karboksilnu

skupinu na unutarstaničnom dijelu. Antigenu HLA razreda II se ⅔ lanca nalazi van stanice.

Antigen HLA razreda II također ima 4 regije: regiju za vezivanje peptida, regiju nalik imunoglobulinima, transmembransku regiju i citoplazmatsku regiju.

Vanstanični dijelovi lanaca α i β imaju po dvije domene: α1 i α2 te β1 i β2. Svaka od ovih domena ima oko 90 aminokiselina. Pukotina antigena HLA razreda II je strukturno slična pukotini antigena HLA razreda I te je na krajevima ograđena domenama α1 i β1. N-terminalni kraj ovih domena ima pukotinu za vezanje peptida veličine 10-30 aminokiselina. Krajevi pukotina su otvoreni pa vezani peptid viri iz pukotine. Domene α2 i β2 imaju disulfidnu vezu koja tvori petlju sličnu petlji imunoglobulina pa zato antigen HLA razreda II ima regiju nalik imunoglobulinima.



Slika 4. Molekula HLA razreda II s pukotinom za vezanje peptida

Izvor: WEB [15]

Petlja u domeni β2 antigena HLA razreda II je vezno mjesto za koreceptorsku molekulu CD4 limfocita T. Karboksilni krajevi domena α2 i β2 nastavljaju se u transmembransku regiju sa otprilike 25 hidrofobnih aminokiselina. Na transmembransku regiju se nadovezuju hidrofilni citoplazmatski krajevi. [2] [8]

1.3. Antitijela HLA

Antitijela su produkti plazma stanica nastalih aktivacijom B limfocita. Ulazak imunogena u organizam dovodi do aktiviranja čitavog niza imunoloških događanja koji rezultiraju staničnim ili humoralnim imunološkim odgovorom. Antitijela su glikoproteinske molekule koje su zovu imunoglobulini. Kodirani su imunoglobulinskim genima koji su organizirani u 3 multigenske obitelji na 3 odvojena kromosoma: dvije obitelji gena za lake lance (engl. light chain, L): κ (kapa) na kromosomu 2 i λ (lambda) na kromosomu 22 i obitelj gena za teške lance (heavy chain, H) na kromosomu 14. Postoji 5 različitih teških lanaca: α, δ, ε, γ i μ i upravo o tome koji teški lanac sadrži molekula imunoglobulina, razlikujemo 5 razreda molekula:

1. IgA (α teški lanac)
2. IgD (δ teški lanac)
3. IgE (ε teški lanac)
4. IgG (γ teški lanac)
5. IgM (μ teški lanac)

Osnovnu jedinicu građe antitijela čine dva para istovrsnih polipeptidnih lanaca koji se razlikuju po broju aminokiselina. Laki lanci su sastavljeni od oko 220, a teški od 440 aminokiselina. Svaki od ovih lanaca ima po dvije varijabilne regije (V_H i V_L) i jednu konstantnu (C) regiju. Varijabilne regije teškog i lakog lanca međusobno su nekovalentno povezane i čine utor specifičan za vezanje specifičnog antigena. Varijabilna regija teškog lanca dijeli se u tri područja: varijabilno (V), područje raznolikosti (D) i područje za povezivanje (J). Laki lanci imaju samo varijabilno područje (V) i područje za povezivanje (J), a nemaju područje raznolikosti (D). Konstantna regija lakog (C_L) i konstantne regije teškog lanca (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) nemaju ulogu u vezivanju antigena već djeluju na poticanje fagocitoze, uključuju sustav komplementa i upravljaju transportom imunoglobulina do mjesta djelovanja.

Varijabilne domene lakog i teškog lanca V_H i V_L sadrže po tri hipervarijabilne regije koje determiniraju specifičnost vezanja antitijela za određeni antigen. [(2)]

Antitijela HLA uglavnom su citotoksična antitijela koja se stvaraju kao rezultat humoralnog imunološkog odgovora na aloantigenu stimulaciju (senzibilizaciju).

Postoji više putova senzibilizacije na antigene HLA: trudnoća, transfuzija pune krvi, transplantacija ili namjerno izazvana senzibilizacija. Ovisno o vrsti i prirodi imunogena, određuje se specifičnost i sadržaj antitijela u serumu. Serumi mogu biti monospecifični ako sadrže samo 1 vrstu antitijela HLA ili mogu sadržavati više različitih antitijela HLA nastala kao odgovor na više različitih antigena HLA pa u tom slučaju serum može biti mono, -bi, -oligo ili polispecifičan. Jedini prirodan način aloimunizacije jest trudnoća kad se majka tijekom trudnoće senzibilizira na produkte gena koje je dijete naslijedilo od biološkog oca. Ukoliko se trudnica senzibilizira na antigene, produkte gena HLA-A, -B ili -Cw, stvaraju se anti T+B limfocitotoksična protutijela HLA, dok senzibilizacija na antigene HLA razreda II rezultira stvaranjem anti B limfocitotoksičnih antitijela HLA. Majka se može senzibilizirati na antigene produkte gena cijelog haplotipa koje je dijete stvorilo od oca, a mogu se stvoriti i antitijela uperena protiv antigena HLA cijele križno reaktivne skupine kojoj pripada imunogen. S brojem trudnoća senzibilizacija raste pa su višerotkinje češće senzibilizirane od prvorotkinja. [(9)]

Transfuzija je čest oblik senzibilizacije na antigene HLA. Transfuzija predstavlja jedan oblik alogene transplantacije i zato kod osoba koje su primale ABO podudarne, ali nepodudarne HLA tranfuzije, dolazi do senzibilizacije na HLA antigene. Jedna od posljedica nepodudarnih HLA transfuzija je febrilna posttransfuzijska reakcija koja se očituje povišenom temperaturom i drhtavicom, a nastaje kao psljedica razaranja leukocita anti-HLA protutijelima. Anti-HLA protutijela često nastaju kod kod bolesnika na hemodijalizi koji su zbog anemija podvrgnuti učestalim transfuzijama. Da bi se ta posljedica transfuzije izbjegla, potrebno je ovim bolesnicima davati filtriranu krv sa smanjenim brojem leukocita. Primjenom fitriranih krvnih pripravaka znatno rijeđe dolazi do imunizacije na HLA antigene, a time i do febrilnih posttransfuzijskih reakcija.[(10)]

Transplantacija tkiva i organa još je jedan način aloimunizacije na antigene HLA. Ukoliko davatelj i primatelj transplantata nisu podudarni u antigenima sustava HLA, može doći i do odbacivanja presađenog tkiva ili organa kao posljedica citotoksičnih antitijela HLA na transplantacijske antigene davateljevih tkiva ili organa. [(11)]

Stvaranje specifičnih antitijela HLA u organizmu može se izazvati i planiranom imunizacijom, unošenjem leukocita u organizam, a koristi se u terapeutske svrhe.

Križna reaktivnost (engl. Cross Reactivity Group, CREG) je sposobnost da jedno antitijelo HLA reagira s nekoliko različitih antigena HLA. Imunizacijom na antigene HLA mogu nastati antitijela koja nisu upravljena protiv samo jednog antigena, koji je izazvao njihovo stvaranje, već su upravljena i protiv drugih antigena HLA koji imaju zajedničke determinante s antigenom HLA koji je izazvao njihovo starenje. Većina seruma u kojima se otkrivaju antitijela HLA su polispecifični, dok su monospecifični ili bipecifični serumi rjeđi. [12]

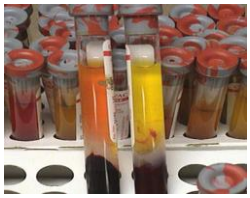
2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost antitijela na tkivne antigene sustava HLA kod pacijenata koji su primali transfuziju, a za posljedicu su imali povišenu temperaturu i tresavicu. Također smo ispitivali prisutnost/odsutnost anti HLA antitijela kod trudnice (višerotkinje).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

U Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split dostavljeni su nam uzorci seruma triju pacijenata koji su pokazivali znakove posttransfuzijskih reakcija. Uzorci serumi dvaju pacijenata su dostavljeni s Klinike za ortopediju KBC-a Split dok je treći uzorak seruma pripadao trudnici.



Slika.5. Uzorak seruma bolesnika
Izvor: WEB [16]

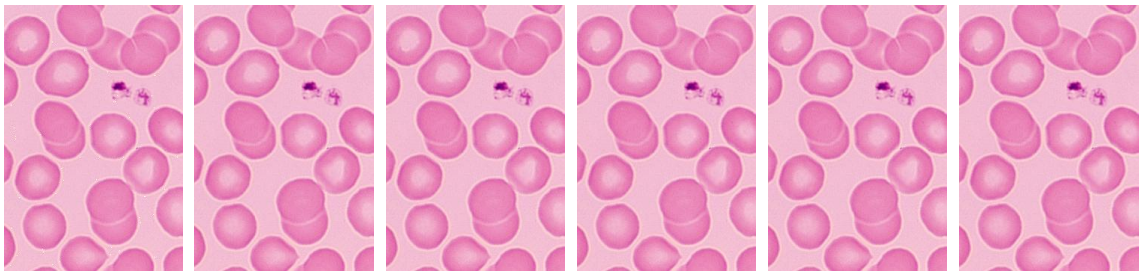
3.2. Metode

Za utvrđivanje panel reaktivnih antitijela (%PRA) koristili smo test mikrolimfocitotoksičnosti.

U svrhu utvrđivanja prisutnosti/odsutnosti anti HLA antitijela kod naših ispitanika koristili smo panel limfocita koji čini zbirku limfocita od 30 osoba koje su tipizirane, a to znači da su im određeni antigeni sustava HLA primjenom serološke metode (MLCT).

Tablica 1. Panel limfocita

MATIČNI BROJ	**ANTIGENI SUSTAVA HLA LOKUSA HLA-A,-B**			
	HLA-A	**HLA-A**	**HLA-B**	**HLA-B**
01	1	25	8	18
02	2	32	35	8
03	2	11	57	35
04	2	24	49	35
05	68	31	53	39
06	31	33	13	27
07	2	11	13	35
08	1	32	51	57
09	2	31	27	41
10	2	68	62	35
11	3	68	27	35
12	25	26	56	-
13	2	3	7	8
14	2	28	51	65
15	3	23	7	35
16	2	26	35	37
17	1	24	8	37
18	23	24	58	50
19	2	32	50	8
20	2	32	62	61
21	29	74	35	18
22	1	25	7	37
23	1	3	57	47
24	2	3	35	39
25	24	68	44	35
26	24	26	35	61
27	30	32	39	70
28	2	66	64	62
29	2	-	18	61
30	24	32	18	35



A1,A11; B8,B18 A11,A32; B44,B51 A1,A2; B7,B49 A32,A68;B18,B37 A24,A25; B18,B38 A33,A68,B58,B41

Slika.6. Limfociti prethodno HLA tipiziranih doborovoljnih darivatelja krvi (N=30)

Izvor: WEB

3.2.1. Test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT)

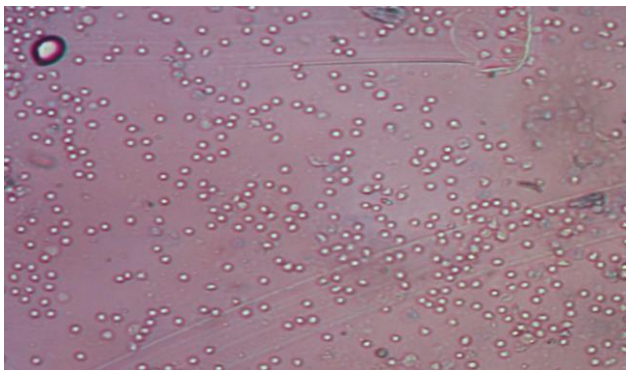
Test mikrolimfocitotoksičnosti (engl. mikrolymphocytotoxic test, MLCT) ili metoda CDC (engl. complement dependent cytotoxicity, CDC), citotoksičnost ovisna o komplementu koristi se za određivanje antitijela HLA, ali i za određivanje antigena HLA te je jednostavna i reproducibilna metoda serološka metoda. Kad se određuju antitijela HLA, koriste se stanice s poznatim antigenima HLA, a kad se određuju antigeni HLA, koriste se serumi anti-HLA za koje je poznato koja antitijela HLA sadrže. [12]



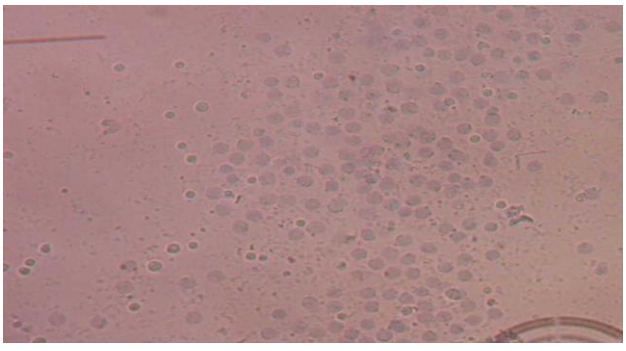
Slika 7. Serološki test mikrolimfocitotoksičnosti ovisne o komplementu

Izvor: WEB

Specifična reakcija antigena HLA na membranama limfocita i protutijela HLA prisutnih u serumu je osnova testa mikrolimfocitotoksičnosti. Uzima se uzorak seruma bolesnika u heparinizirani epruvetu pa se se krv razrjeđuje u omjer 1:1 s fiziološkom otopinom. Zatim se limfociti odvajaju separacijom na gradijentu gustoće. Nakon što se odvoji točna koncentracija limfocita, stavljaju se u Terasakijeve pločice u kojima su serumi anti-HLA. Nakon pola sata inkubacije, dodaje se komplement kunića što aktivira kaskadu komponenti komplementa i vodi do oštećenja membrane limfocita i njegove lize. Još se inkubira sat vremena te se Terasakijeve pločice istresaju i dodaje se tripansko modrilo (boja).



Slika 8. Negativna reakcija u testu CDC (*engl*. complement dependent cytotoxicity)
Izvor: WEB



Slika 9. Pozitivna reakcija u testu CDC (*engl*. complement dependent cytotoxicity)
Izvor: WEB

Ako serum ne sadrži antitijela HLA protiv staničnih antigena, nema aktivacije komplementa i stanice su neoštećene i neobojene. Rezultati CDC testa očitavaju se svjetlosnim mikroskopom pa se prema skali od 1-4, bilježi broj mrtvih stanica. Najslabija reakcija, broj 1 je do 20% mrtvih stanica, dok je broj 4 najjača reakcija, više od 80% mrtvih stanica.

Terasakijeva pločica ima točno raspoređene serume bolesnika, zato što moramo znati s koliko stanica panela (stanice 30-50 nesrodnih osoba) je reagirao pojedini serum kad radimo kompjutersku analizu.
Pločice sa serumima čuvaju se na temperaturi od -20°C sve do izvođenja samog testa. Svaki serum ispituje se na panelu limfocita. Limfociti T+B su izolirani iz krvi nesrodnih osoba kojima su određeni antigeni HLA te oni čine panel ili zbirku limfocita. Odabir osoba za panel se radi tako što se uzimaju uzorci s najčešćim genima prisutnim u hrvatskoj populaciji.

Suspenzija limfocita B+T dodaje se na pločice sa serumima i inkubira 30 min. na sobnoj temperaturi da bi se mogao stvoriti kompleks antigen-antitijelo. Nakon toga dodaje se serum kunića i inkubira se 90 min. Pločice se istresaju, a potom se boje. Broj pozitivnih reakcija sa stanicama panela izražava se kao postotak panel reaktivnih antitijela (%PRA) govori nam da li su prisutna antitijela HLA u serumima primatelja organa (senzibilizacija na antigene sustava HLA). [13]

3.2.3. Izvođenje križne probe metodom CDC

Standardna križna proba (cross-match) se izvodi testom mikrolimfocitotoksičnosti te je ona zadnji test pred transplantaciju.

U nauljenu Terasakijevu pločicu, za svaki test, stavljamo AB serum, medij, pozitivnu kontrolu te serum ispitivane osobe. Ispitanik može biti primatelj transplantata ili neka druga potencijalno senzibilizirana osoba (u našem radu ispitanik je bila senzibilizirana trudnica).

Serum ispitivane osobe stavljamo u razrijeđenja s AB serumom. Količina seruma je 1 mikrolitar po jednoj rupici u Terasakijevoj pločici. Na pripremljenu i razlivenu Terasakijevu pločicu dodajemo podešenu suspenziju limfocita (davatelja transplantata ili, kao u našem slučaju, limfocite supruga trudnice).
Limfociti davatelja i serum primatelja se miješaju uz dodavanje komplementa. Ako nema antitijela anti-HLA u serumu primatelja, test je negativan i bolesnik može primiti donirani organ.

Negativna kontrola ne smije prijeći 10% (negativna reakcija), a postotak mrtvih stanica gdje je pozitivna kontrola treba biti veći od 80% (jačina reakcije 4). Ako su reakcije nerazrijeđenog i/ili razrijeđenog seruma jače od reakcija na negativnim kontrolama za barem 20%, križna proba je pozitivna i to je kontraindikacija za transplantaciju. [13]

4. REZULTATI

U Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split donešeni su serumi pacijenata koji su imali posttransfuzijske reakcije. Našim ispitanicima smo napravili screening seruma s ciljem određivanja prisutnosti HLA antitijela. U Terasakijeve pločice stavljeni su serumi svakog ispitanika ponaosob i dodani limfociti prethodno HLA tipiziranih dobrovoljnih darivatelja krvi koji su izabrani na način da njihovi antigeni HLA predstavljaju reprezentativni uzorak za populaciju stanovništva. Nakon izvođenja testa mikrolimfocitotoksičnosti (CDC metodom) analizom dobili smo sljedeće rezultate:

Tablica 2. Pacijent J.J

OBRAZAC ZA SKRINING SERUMA (HLA)													
Prezime i ime					Jurić Jure								
Datum ispitivanja					8.7.2015.								
	PK		AB serum		medij		1 µ		1 µ		½ µ		
1	1	8	31		61		91		121		151		A1,A25;B8,B18
2	2	8	32		62		92		122		152		A2,A32;B35,B8
3	3	8	33		63		93		123		153		A2,A11;B57,B35
4	4	8	34		64		94		124		154		A2,A24;B49,B35
5	5	8	35		65		95		125		155		A68,A31;B53,B39
6	6	8	36		66		96		126		156		A31,A33;B13,B27
7	7	8	37		67		97		127		157		A2,A11;B13,B35
8	8	8	38		68		98		128		158		A1,A32;B51,B57
9	9	8	39		69		99		129		159		A2,A31;B27,B41
10	10	8	40		70		100		130		160		A2,A68;B62,B35
11	11	8	41		71		101		131		161		A3,A68;B27,B25
12	12	8	42		72		102		132		162		A25,A26;B56
13	13	8	43		73		103		133		163		A2,A3;B7,B8
14	14	8	44		74		104		134		164		A2,A28;B51,B56
15	15	8	45		75		105		135		165		A3,A23;B7,B35
16	16	8	46		76		106		136		166		A2,A26;B35,B37
17	17	8	47		77		107		137		167		A1,A24;B8,B37
18	18	8	48		78		108		138		168		A23,A24;B58,B50
19	19	8	49		79		109		139		169		A2,A32;B50,B8
20	20	8	50		80		110		140		170		A2,A32;B62,B61
21	21	8	51		81		111		141		171		A29,A74;B35,B18
22	22	8	52		82		112		142		172		A1,A25;B7,B37
23	23	8	53		83		113		143		173		A1,A3;B57,B47
24	24	8	54		84		114		144		174		A2,A3;B35,B39
25	25	8	55		85		115		145		175		A24,A68;B44,B35
26	26	8	56		86		116		146		176		A24,A26;B35,B61
27	27	8	57		87		117		147		177		A30,A32;B39,B70
28	28	8	58		88		118		148		178		A2,A66;B64,B62
29	29	8	59		89		119		149		179		A2;B18,B61
30	30	8	60		90		120		150		180		A24,A32;B18,B35

*PK-pozitivna kontrola

Ispitanik je u Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split upućen s Klinike za ortopediju zbog posttransfuzijske reakcije. Iz tabličnog prikaza možemo vidjeti da nakon izvedenog testa (screening seruma) kod pacijenta nisu pronađena antitijela HLA, (PRA 0/30), što govori u prilog tome da se ne radi o senzibilizaciji na anti HLA antitijela.

Tablica 3. Pacijent M.M.

OBRAZAC ZA SKRINING SERUMA (HLA)													
Prezime i ime					Matić Mate								
Datum ispitivanja					8.7.2015.								
	PK		AB serum		medij		1 µ		1 µ		½ µ		
1	1	8	31		61		91	8	121	8	151	6	A1,A25;B8,B18
2	2	8	32		62		92	8	122	8	152	4	A2,A32;B35,B8
3	3	8	33		63		93	8	123	8	153	6	A2,A11;B57,B35
4	4	8	34		64		94	8	124	8	154	6	A2,A24;B49,B35
5	5	8	35		65		95	8	125	8	155	6	A68,A31;B53,B39
6	6	8	36		66		96	8	126	8	156	6	A31,A33;B13,B27
7	7	8	37		67		97	8	127	8	157	4	A2,A11;B13,B35
8	8	8	38		68		98	8	128	8	158	6	A1,A32;B51,B57
9	9	8	39		69		99	8	129	8	159	6	A2,A31;B27,B41
10	10	8	40		70		100	8	130	8	160	6	A2,A68;B62,B35
11	11	8	41		71		101	8	131	8	161	6	A3,A68;B27,B25
12	12	8	42		72		102	8	132	8	162	6	A25,A26;B56
13	13	8	43		73		103	8	133	8	163	6	A2,A3;B7,B8
14	14	8	44		74		104	8	134	8	164	4	A2,A28;B51,B56
15	15	8	45		75		105	8	135	8	165	6	A3,A23;B7,B35
16	16	8	46		76		106	8	136	8	166	6	A2,A26;B35,B37
17	17	8	47		77		107	8	137	8	167	6	A1,A24;B8,B37
18	18	8	48		78		108	8	138	8	168	4	A23,A24;B58,B50
19	19	8	49		79		109	8	139	8	169	6	A2,A32;B50,B8
20	20	8	50		80		110	8	140	8	170	6	A2,A32;B62,B61
21	21	8	51		81		111	8	141	8	171	6	A29,A74;B35,B18
22	22	8	52		82		112	8	142	8	172	6	A1,A25;B7,B37
23	23	8	53		83		113	8	143	8	173	6	A1,A3;B57,B47
24	24	8	54		84		114	8	144	8	174	4	A2,A3;B35,B39
25	25	8	55		85		115	8	145	8	175	6	A24,A68;B44,B35
26	26	8	56		86		116	8	146	8	176	6	A24,A26;B35,B61
27	27	8	57		87		117	8	147	8	177	6	A30,A32;B39,B70
28	28	8	58		88		118	8	148	8	178	6	A2,A66;B64,B62
29	29	8	59		89		119	8	149	8	179	6	A2;B18,B61
30	30	8	60		90		120	8	150	8	180	4	A24,A32;B18,B35

*PK-pozitivna kontrola

U Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split ispitanik je upućen s Klinike za ortopediju zbog posttransfuzijske reakcije.

Analizom dobivenih rezultata kod ispitanika pronađena su anti HLA antitijela (PRA 30/30) Ispitanik (serum ispitanika) je reagirao na sve tkivne antigene sustava HLA koje su imali naši dobrovoljni darivatelji limfocita (panel limfocita) kao posljedica davanja transfuzija pune krvi.

Tablica 4. Trudnica A.A.

OBRAZAC ZA SKRINING SERUMA (HLA)													
Prezime i ime					Anić Ana								
Datum ispitivanja					8.7.2015.								
	PK		AB serum		medij		1 µ		1 µ		½ µ		
1	1	8	31		61		91		121		151		A1,A25;B8,B18
2	2	8	32		62		92	8	122	8	152	8	**A2**,A32;B35,B8
3	3	8	33		63		93	8	123	8	153	8	**A2**,A11;B57,B35
4	4	8	34		64		94	8	124	8	154	8	**A2**,A24;B49,B35
5	5	8	35		65		95		125		155		A68,A31;B53,B39
6	6	8	36		66		96		126		156		A31,A33;B13,B27
7	7	8	37		67		97	8	127	8	157	8	**A2**,A11;B13,B35
8	8	8	38		68		98		128		158		A1,A32;B51,B57
9	9	8	39		69		99	8	129	8	159	8	**A2**,A31;B27,B41
10	10	8	40		70		100	8	130	8	160	8	**A2**,A68;B62,B35
11	11	8	41		71		101		131		161		A3,A68;B27,B25
12	12	8	42		72		102		132		162		A25,A26;B56
13	13	8	43		73		103	8	133	8	163	8	**A2**,A3;B7,B8
14	14	8	44		74		104	8	134	8	164	8	**A2**,A28;B51,B56
15	15	8	45		75		105		135		165		A3,A23;B7,B35
16	16	8	46		76		106	8	136	8	166	8	**A2**,A26;B35,B37
17	17	8	47		77		107		137		167		A1,A24;B8,B37
18	18	8	48		78		108		138		168		A23,A24;B58,B50
19	19	8	49		79		109	8	139	8	169	8	**A2**,A32;B50,B8
20	20	8	50		80		110	8	140	8	170	8	**A2**,A32;B62,B61
21	21	8	51		81		111		141		171		A29,A74;B35,B18
22	22	8	52		82		112		142		172		A1,A25;B7,B37
23	23	8	53		83		113		143		173		A1,A3;B57,B47
24	24	8	54		84		114	8	144	8	174	8	**A2**,A3;B35,B39
25	25	8	55		85		115		145		175		A24,A68;B44,B35
26	26	8	56		86		116		146		176		A24,A26;B35,B61
27	27	8	57		87		117		147		177		A30,A32;B39,B70
28	28	8	58		88		118	8	148	8	178	8	**A2**,A66;B64,B62
29	29	8	59		89		119	8	149	8	179	8	**A2**;B18,B61
30	30	8	60		90		120		150		180		A24,A32;B18,B35

*PK-pozitivna kontrola

Jedna od naših ispitanika bila je i trudnica (višerotkinja) koja je u Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu KBC-a Split došla na rutinsku kontrolu.

Kod seruma trudnice, screeningom seruma pronađena su anti HLA-A2 antitijela s obzirom da muž trudnice ima antigen HLA-A2. Najvjerojatnije je tijekom trudnoće došlo do senzibilizacije na ovaj imunogen, ovisno o naslijeđenom očevom haplotipu u djeteta.

Nakon screeninga seruma pozvan je i suprug trudnice te smo napravili i križnu probu . Test križne probe trudnice i njenog supruga bio je pozitivan što nam je potvrdilo specifičnost senzibilizacije na antigen HLA-A2 budući je tipizacija HLA supruga: HLA-A2,26;B8,27, dok je tipizacija HLA trudnice: HLA-A1,3;B14,39.

5. RASPRAVA

Polimorfizam sustava HLA vrlo je velik, a broj novootkrivenih alela raste svakim danom, posebice nakon uvođenja tehnika molekularne genetike u svrhu tipizacije tkiva. Proizvodnja antitijela HLA je odgovor organizma na unos stranih antigena HLA koji u organizam mogu dospjeti trudnoćama, transfuzijama ili transplantacijama. Središnju ulogu preživljavanja transplantiranog organa imaju antitijela HLA koja su i odgovorna za njegovo odbacivanje. Prisutnost antitijela HLA u serumima bolesnika na listi čekanja za transplantaciju organa ili kod višerotkinja izražava se kao postotak panel reaktivnih antitijela (engl. Panel Reactive Antibodies, PRA).

Osim učestalosti antigena HLA i nepodudarnosti HLA u preživljavanju transplantiranih bolesnika, pratimo nazočnost antitijela HLA kako prije same transplantacije, tako i nakon nje.

Serumi u kojima se prati nazočnost antitijela HLA mogu biti mono, bi-, oligo- ili polispecifični, ovisno o broju antigena s kojima reagiraju.

Jedini prirodan način aloimunizacije jest trudnoća kad se majka tijekom trudnoće senzibilizira na produkte antigena koje je naslijedilo od biološkog oca. Primigravida, odnosno žena s prvom trudnoćom koja nikad prije trudnoće nije bila izložena stranim antigenima sustava HLA, npr. putem transfuzije pune krvi ili transplantacijom, tijekom te trudnoće može biti izložena samo jednom stranom antigenu lokusa HLA-A i jednom stranom antigenu lokusa HLA-B.

Multigravida u sljedećim trudnoćama može biti izložena antigenima s drugog haplotipa djetetovog oca ili opet onim istim antigenima kao u prvoj trudnoći. Ukoliko je u prethodnoj trudnoći došlo do senzibilizacije, u sljedećoj se razvija sekundarni imunološki odgovor koji je brži i jači od primarnog.

Iz tablice br. 4. vidi se da je naša ispitanica (mulitgravida) senzibilizirana na tkivni antigen HLA-A2. Antitijela su nastala senzibilizacijom na antigen HLA-A2 koje je dijete naslijedilo od svog oca koji je imao tkivne antigene HLA-A2,26;B8,27 i bio je posve različit u tkivnim antigenima od naše ispitanice (HLA-A1,3;B14,39).

Transfuzije pune krvi leukocita ili trombocita su čest oblik senzibilizacije na antigene HLA. Transfuzija predstavlja jedan oblik alogene transplantacije i zato kod osoba koje su primile ABO podudarne ali HLA nepodudarne transfuzije krvi dolazi do senzibilizacije na aloantigene prisutne u krvi davatelja kao što smo imali kod našeg ispitanika prikazanog u tablici br. 3. Posljedica nepodudarnih HLA transfuzija je posttransfuzijska reakcija koja se očituje povišenom temperaturom i drhtavicom.

6. ZAKLJUČCI

1. Kontrola sinteze tkivnih antigena, regulacija imunološkog prepoznavanja stranih antigena, međudjelovanje i suradnja s drugim limfoidnim stanicama tijekom imunološke reakcije, nadziranje izvršnog dijela protiv stranih antigena te sudjelovanje u proizvodnji specifičnih antitijela su uloge sustava HLA u ljudskom organizmu.

2. Dva osnovna imunološka čimbenika važna u transplantacijskoj biologiji/medicini su podudarnost u genima HLA primatelja i davatelja organa te prisutnost citotoksičnih antitijela HLA u serumu primatelja organa.

3. Da bi se izbjegli negativni učinci transfuzija pune krvi, potrebno je davati filtriranu krv sa smanjenim brojem leukocita koji na svojim membranama sadrže antigene HLA ili samo pripravak deficitarnih stanica, npr. eritrocita koji na staničnim membranama nemaju antigene HLA.

4. Postoji više putova senzibilizacije na antigene HLA: trudnoća, transfuzija pune krvi i transplantacija. Ovisno o vrsti i prirodi imunogena, određuje se specifičnost i sadržaj antitijela u serumu.

5. Jedini prirodan način aloimunizacije jest trudnoća kad se majka tijekom trudnoće senzibilizira na produkte antigena koje je dijete naslijedilo od biološkog oca.

7. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2004) Imunologija, Medicinska naklada, Zagreb, šesto izdanje.
2. Martinez N, Usporedba analize seruma i gena sustava HLA u senzibiliziranih trudnica (magistarski rad), 2000, PMF, Zagreb
3. Crnić Martinović M, Osnove glavnog sustava tkivne snošljivosti u čovjeka (predavanje), 2005, Rijeka : arhiva.medri.hr/katedre/Klinicko.../Marija%20Crnic%20M.doc
4. Zergollen Čupak Lj (1983) Humana genetika. Jumena, Zagreb
5. Marsh GES, Parham P, Barber LD, The HLA Facts Book, (2000) Academic Press, London
6. Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) Immunobiology 5, Garland Publishing
7. Grubić Z, Žunec R, Čečuk-Jeličić E, Kerhin-Brkljačić V, Kaštelan A, Polymorphism of HLA-A, -B, -DRB1, -DQA1 and –DQB1 haplotypes in a Croatian population. Eur J Immunogen 2000, 27: 47-51
8. Thorsby E, A short history of HLA,2009 : http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x/full
9. Brunetta Gavranić B, Bašić Jukić N, Ratković Gusić I, Martinez N, Ivančan V, Kes P:Priprema visoko HLA senzibilizirane trudnice za transplantaciju srca : Prvi slučaj u Republici Hrvatskoj, Acta Med Croatica, 2011; vol. 65, br.4 :294-388

10. Čečuk Jeličić E, Grgičević D, Grubić Z, Kaštelan A, Kerhin Brkljačić V, Skodlar J, Zagreb, Senzibilizacija na antigene sustava HLA u: Odabrana poglavlja iz transfuzijske medicine ; (1992); str. 39-50

11. Murphey CL, Forsthuber TG, Trends in HLA antibody screening and identification and their role in transplantation, Expert Rev Clin Immunol. 2008 May;4(3): 391-399

12. Žunec R, Grubić Z, Balen S, Važnost imunogenetike u transplantaciji organa, 2011, MEDIX, 92/93: 208-215

13. Ančić M, Maravić B , Radman M, Kovačić V, Metode otkrivanja antitijela na HLA antigene koji čekaju bubrežnu transplantaciju te kombiniranu transplantaciju gušterača-bubreg, Acta Med Croatica 2014; 68: 421-423

14. http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup009.gif

15. http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp4C9.jpg

16. https://www.google.hr/search?q=krvni+serum&espv=2&biw=1366&bih=599&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0CAYQ_AUoAWoVChMItq6V_5TnxwIVAoYsCh1Kuwi_

8. SAŽETAK

Uvod: Glavni sustav tkivne snošljivosti, (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC) je najsloženiji poznati genetički sustav odgovoran za sintezu specifičnih antigena na površini gotovo svih stanica organizma. Zbog brojnih i važnih funkcija sustav HLA ima značajnu ulogu u transplantacijskoj imunologiji kako kod transplantacije solidnih organa (bubreg, jetra, srce) tako i kod transplantacije krvotvornih matičnih stanica. Prozvodnja antitijela HLA je odgovor organizma na unos stranih antigena HLA koji u organizam mogu dospjetit trudnoćama, transfuzijama ili transplantacijama. Prisutnost antitijela HLA u serumima bolesnika na listi čekanja ili kod senzibiliziranih trudnica izražava se kao postotak panel reaktivnih antitijela (engl. Panel Reactive Antibodies, PRA %)

Cilj rada: Svrha rada bila je utvrditi prisutnost anti HLA antitijela u serumima pacijenata koji su primali transfuziju i za posljedicu imali posttransfuzijske reakcije kao i prisutnost anti HLA antitijela u serumu višerotkinje.

Materijali i metode: Uzorci dvojice ispitanika su u Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu, KBC-a Split došli s Klinike za ortopediju zbog posttransfuzijskih reakcija sa svrhom utvrđivanja prisutnosti/odsutnosti anti HLA antitijela u serumu. Treća ispitanica je bila trudnica(višerotkinja). Za prisustvo/odsustvo anti HLA antitijela koristili smo test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT), te test križne probe (engl.cross match, CM).

Rezultati: Nakon izvedenog testa mikrolimfocitotosičnosti kod jednog od naših ispitanika koji su u Laboratorij za tipizaciju tkiva, Centra za transfuzijsku medicinu došli s posttransfuzijskim reakcijama, utvrdili smo prisutnost anti HLA antitijela 30/30 (100 %). Pacijent je tijekom operacije primao punu krv što je rezultiralo ovako visokim % PRA. U serumu trudnice otkrili smo monospecifična antitijela anti HLA-A2 budući se trudnica tijekom trudnoće senzibilizirala na antigen HLA-A2 koje je dijete naslijedilo od oca.

Zaključak: Antitijela HLA imaju središnju ulogu u preživljavanju transplantiranog organa i odgovorna su za njegovo odbacivanje. Transfuzije pune krvi ili trombocita su čest oblik alogene transplantacije i zato kod osoba koje su primile ABO podudarne ali HLA nepodudarne transfuzije krvi dolazi do senzibilizacije na aloantigene prisutne u krvi davatelja. Da bi se ta posljedica transfuzije izbjegla, potrebno je izabrati najpodudarnijeg davatelja ili dati filtriranu krv sa smanjenim brojem leukocita.

Ključne riječi: sustav HLA, senzibilizacija, antigeni HLA, anti HLA antitijela

9. SUMMARY

Introduction: Major histocompatibility complex is the most complexed genetic system responsible for tissue antigen synthesis on the surface of almost every cell in the human organism. Because of numerous and important roles in our organism, HLA system is very important in transplant immunology and transplantation of solid organs (kidney, liver, heart) as well as in blood stem cell transplantation. HLA antibody production is the organism's response to foreign antigens who are brought into the organism by pregnancy, transfusion or transplantation. Presence of antibodies in patients serums who are on the waiting list or in sensitized pregnant women is expressed as percentage Panel Reactive Antibodies.

Objective: The purpose of this paper was to establish the presence of anti HLA antibodies in serums of patients who have recieved a blood transfusion and had a post-transfusion reaction and the presence of anti HLA antibodies in the serum of a pregnant woman (multiple births).

Materials and methods: Samples of two patients were delivered from the Orthopedic Clinic to establish whether there was anti HLA antibodies in their serums. The third examinee was a pregnant woman (multiple births). Microlymphocytotoxicity test was used to establish the presence of anti HLA antibodies as well as cross match test.

Results: After the microlymphocytotoxicity test, one of our patients from the Orthopedic Clinic was 100 % positive for the anti HLA antibodies. Patient was given a full blood transfusion during his operation which resulted in such a high percentage of PRA. Monospecific antibodies anti HLA-A2 were discovered in pregnant woman's serum because the child she is bearing has inherited his father's antigen, HLA-A2, and she has become sensitized to it.

Conclusion: HLA antibodies have a central role in keeping the transplanted organ alive and they are also responsible for its rejection. Full blood transfusions or platelets transfusions are a common form of allogenic transplantation so that is why persons who have recieved matching ABO transfusions but non-matching HLA transfusions become sensitized to alloantigens present in the donor's blood. To avoid negative result of

transfusions, a donor who is the most similar in HLA antigens to recipient should be chosen or the patient should be given a blood transfusion with decreased number of leukocytes.

Key words: HLA system, sensitation, HLA antigens, anti HLA antibodies

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI

Ime i prezime: Antonija Vidović

Datum rođenja: 21.9.1993

Adresa stanovanja: Put Kose 10, Seget Vranjica

Telefon: 021/ 894-451

Mobitel: 099 68 98 374

e-mail: antonija-vidovic@hotmail.com

OBRAZOVANJE

2000.-2008. Osnovna škola kralja Zvonimira, Seget Donji

2008.-2012. Srednja škola Ivana Lucića, Trogir

2012.-2015. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Jezici: engleski, njemački, španjolski, francuski