

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum, Szemészeti Klinika (igazgató: Berta András)¹ és a Debreceni Regionális Vérellátó Központ (igazgató: Medgyessy Ildikó)² közleménye

A HLA-tipizálás technikája szaruhártya-átültetés esetén

TÓTH ENIKŐ,¹ STENSZKY VALÉRIA,² BERTA ANDRÁS,¹ MÓDIS LÁSZLÓ¹

Célkitűzés: Bevezetni és gyakorlattá tenni a donorok és recipiensek szöveti, HLA-antigénjeinek meghatározását a szaruhártya-átültetések kapcsán.

Betegek és módszerek: A Debreceni Szervkivételi Team munkacsoportjával együttműködve multiorgan donáció során a szaruhártyákat corneoscleralis excisióval távolítottuk el. A transzplantációs várólistán szereplő betegek és a donor corneák HLA-antigénjeit vizsgáltuk. A HLA-A, -B, -C antigének meghatározását szerológiai módszerrel végeztük, Terasaki-féle limfocitotoxicitási mikrotesztet használva. A HLA-DR, -DQ antigéneket DNS-módszerrel, PCR-DNS-SSP technikával határoztuk meg.

Eredmények: Jelen tanulmányban 30 multiorgan donor és ezzel párhuzamosan 54 recipiens HLA-tipizálását végeztük el. A betegek közül 50 a magas, 4 a normál rizikójú csoportba tartozott. A szaruhártya-átültetésekénél szerepet játszó HLA-A, -B, -DR lokuszokon lévő antigéneket figyelembe véve 23 tipizált beteg (15 nő és 8 férfi, átlagéletkor 59,13±10,7 év) kapott ismert szöveti antigenitású corneát.

Következtetések: A HLA-rendszer extrém polimorfizmusa miatt az azonos vagy közel azonos szövetek beültetésének esélye alacsonynak mondható. Ezért a tipizált betegek számának növelése szükséges.

Kulcsszavak: szaruhártya-átültetés, HLA-tipizálás, szerológiai módszerek, PCR

Technique of HLA-typing in corneal transplantation

Aims: To introduce and apply donor and recipients HLA tissue typing in everyday practice in corneal transplantation.

Patients and methods: In co-operation with the "Organ Harvesting Team of Debrecen" in situ corneoscleral excisions were performed during multiorgan donation. The HLA antigens of the patients on the corneal transplantation waiting list and donor corneas were examined. Serological methods were used to assess HLA-A, -B, -C loci antigens, using the Terasaki's lymphocytotoxicity microtest. The HLA-DR, -DQ antigens were determined by genetic methods using PCR DNA-SSP techniques.

Results: In this study HLA typing was performed in 30 multiorgan donors and in 54 recipients. Fifty patients belonged to the high-risk and 4 patients belonged to the low risk group. HLA-A, -B, -DR antigens play an important role in corneal transplantation, and 23 patients (15 women and 8 men, mean age 59.13±10.7 years) received HLA matched grafts.

Conclusions: Due to the extreme polymorphism of the HLA system and to the limited number of donor and recipient pairs, the possibility for good-matched grafts is rather low. For such reason increasing the number of HLA typed patients is necessary.

Key words: corneal transplantation, HLA matching, serology techniques, PCR

Egy évszázaddal az első sikeres keratoplastica után (1906) a transzplantátum túlélése szempontjából még ma is nagy probléma az immunreakció kialakulása, és az ezt követő rejekció. A keratoplastica prognózisa szempontjából a magas rizikójú csoportban átlagosan 70–75%-ban alakul ki immunológiai reakció, míg a normál rizikójú csoportban is eléri a 15–18%-ot.⁴ Amennyiben a beteg corneája több kvadránsban erezett, vagy ismételt keratoplasztikára kerül sor, az esetet a transzplantáció kimenetele szempontjából magas rizikójú (ún. „high-risk”) csoportba soroljuk.² Ebben a csoportban a kilökődés veszélye nagyobb, a graft túlélési ideje csökken, mivel a beteg szervezetében az erettség mértékével az immunreaktív sejtek száma szignifikánsan nő. Annak, hogy a recipiens szervezete részéről nagyobb fokú toleranciát érzünk el, biztosítva ezzel a donor cornea hosszabb túlélését, két fő eszköze van.

Az egyik az immunsuppresszív terápia alkalmazása, amivel napjainkban sem tudjuk teljes mértékben elősegíteni az idegen szövet elfogadását, elnyomni a HLA (human leukocita A-lokus) transzplantációs antigének hatását. A megelőző transzplantációk, transzfúziók, terhességek, autoimmun betegségek eredményeként a betegek szervezetében HLA-antigének ellen képződött ellenanyagok jelenhetnek meg, amelyek heves immunválaszt válthatnak ki. Ez nagy dózisu immunsuppresszív kezelést tesz szükségessé, amelynek a szervezetre számos káros mellékhatása van.¹ Ráadásul, ezeknek a szereknek csak a beültetést követő első évben van meghatározó szerepük. A másik eszköz a rejekció megelőzésére, megakadályozására HLA-kompatibilis grafatok beültetésével biztosítható.^{7,18}

Célunk az volt, hogy a Debreceni Szembank tevékenységét szélesítve bevezessük a donorok és a recipiensek

HLA-antigénjeinek meghatározását, csökkentve ezáltal a transzplantátumok immunológiai rejekcióját és elősegítve a beültetett szaruhártya túlélését.

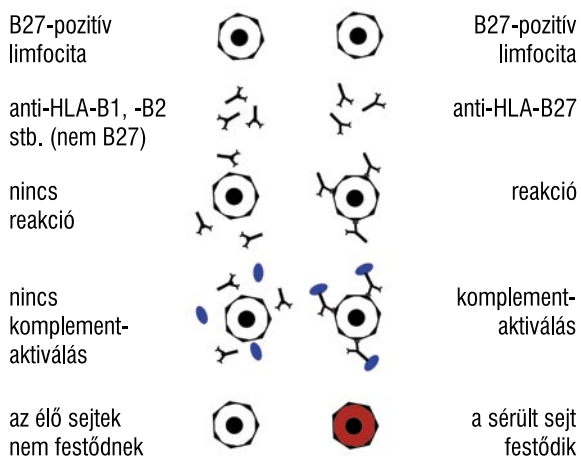
Betegek és módszerek

A Debreceni Cornea Bank és a regionális transzplantációs munkacsoport együttműködése

Első lépésként a hivatalos nevén Debreceni Szervkivételi Team (Hungarotransplant Kht.) munkacsoportjával vettük fel a kapcsolatot és alakítottunk ki együttműködést. Erre a feladatra, hasonlóan a vesedonációs munkacsoport szerveztségéhez, koordinátori pozíciót alakítottunk ki a Debreceni Cornea Bankban is. Megszerveztük a két koordinátor közötti szoros és állandó kommunikációt. Multiorgan donáció, illetve riadó esetén a Debreceni Szembank is értesítést kap és a két transzplantációs munkacsoport együtt vonul a helyszínre (legtöbbször egy mentőautóban).

Donorok és recipiensek HLA-típezálása

A multiorgan donációk során – európai uniós normák szerint is kötelezően – az általunk corneoscleralis excisióval eltávolított szaruhártyák¹⁰ HLA-antigénjeinek meghatározását a Debreceni Regionális Vérellátó Központ akkreditált HLA-Laboratóriumában végeztük. A HLA-A, -B, -C antigének meghatározása szerológiai, a HLA-DR antigének meghatározása molekuláris biológiai módszerekkel történt.



1. ábra. A HLA-A, -B, -C antigének meghatározásához használt szerológiai módszer elve.

A beteg véréből szeparált fehérvérsejteket a Terasaki-tálca mélyedéseibe helyezük, ahol már előzetesen definiált sorrendben a specifikus tipizáló savók panelje van. Amennyiben a beteg HLA-B antigén típusa 27-es és a tálca mélyedésében anti-HLA-B27-es típusú savó található, antigén-antitest reakció következtében károsodik a sejthártya. A sérült sejtmembránon keresztül beáramló festék a teszreakció pozitivitását mutatja, igazolva a beteg HLA-B27-es antigéntípusát (ábra jobb oldala). Amennyiben az ellenanyag típusa nem egyezik meg a beteg HLA-antigén-típusával, nem alakul ki antigén-antitest reakció, a sejthártya nem sérül, a sejt nem festődik, a teszreakció negatív (ábra bal oldala)

Vizsgálataink során a corneatranszplantációs várólistán szereplő betegek HLA-típezálását is elvégeztük, részben prospektív, részben retrospektív módon.

HLA-A, -B, -C lokusz antigénjeinek meghatározása szerológiai módszerrel

Az antigének kimutatásához a Terasaki–McLeland-féle limfocitotoxicitási mikrotesztet használtuk (1. ábra).¹⁶

A módszer elve

A savóban lévő citotoxikus ellenanyag komplement jelenlétében károsítja a sejtuszpenzióban lévő limfocitákat. Az antigén-antitest reakció következtében károsodik a sejthártya, permeabilitása fokozódik, az ép sejtbe be nem jutó festékanyag számára átjárhatóvá válik, a sejt festődik. A sejtek pusztulásának jeleként fáziskontraszt inverz mikroszkóppal a sejt nagymértékű megduzzadása, a riboszómák eltűnése, a mitokondriumok fragmentációja is megfigyelhető.

A módszer alkalmazása

A Debreceni Szembank várólistáján szereplő betegektől 20 ml vért vettünk, ebből limfocitaszuspenziót készítettünk. Donorok HLA-típezálásánál lépből vagy nyirokcsomóból szeparált sejteket használtunk. Ebből mikropipettával a Terasaki-féle tálca (Biotest ABC 72, INNO-TRAIN ABC 72) 1 µl antitesttartalmú savójához 1 µl (3000/mm sejtszámú) szeparált T-limfocitát adtunk. Inkubálás után azok az antitestek kötődtek a sejtekhez, amelyek specifitása a sejteken kifejezésre juttatott HLA allotípusnak megfelelőek voltak. A keverékhez 5 µl nyúlkomplementet adtunk, inkubáltuk, eozin-Y-nal festettük, néhány perc elteltével formaldehiddel (pH 7,2) fixáltuk, majd az eredményt értékeltük. Minden alkalommal negatív és pozitív kontrollt is végeztünk.

A vizsgálat értékelése

A tálcat fáziskontraszt inverz mikroszkóp alá helyezve a károsodott, azaz a festett sejtek arányától függően meghatároztuk a pozitivitás 0–8-ig terjedő erősségét.

HLA-DR antigének meghatározása molekuláris biológiai (PCR) módszerrel

A HLA II. osztály antigénjeinek genetikai meghatározása előnyösebb, mint a szerológiai: gyorsabb (3–5 óra), pontosabb, jóval több altípust tudunk meghatározni, a reagensek standardizálhatók, és a vizsgálathoz nem szükségesek élő limfociták.^{5,6,18}

A PCR (polymerase chain reaction) elve

A PCR különösen érzékeny molekuláris genetikai módszer, amely speciális DNS-szekvenciák klónozás nélküli felsokszorozására alkalmas. Vizsgálataink során a PCR DNS-SSP (szekvensspecifikus primer) metodikát használtuk. Ismert szekvenciájú primerekkel, termotabil DNS-polimeráz segítségével többszörös ciklusban átlagosan 200–300 nukleotidból álló génszakaszt lehet szintetizálni. Mindegyik PCR-minta egy bizonyos HLA-specifitást vagy -specifitások egy csoportját tartalmazza. A primerekben a vizsgált eltérés a primer 3' végpontjára esik. Amennyiben a szekvencia a keresett allélnak megfelel, akkor létrejön a reakció, a génszakaszok amplifikálódnak. Amennyiben nem komplementerei egymásnak,

amplifikáció nincs. A felsokszorozott szakaszok agarózgélén megfuttatva, UV-fény alatt láthatóvá válnak: a megfelelő sávok jelenléte vagy hiánya megadja a keresett HLA-típust. Az eredmény jól dokumentálható, fényképezhető.¹³

Standard DNS-izolálás teljes vérből (pre-PCR terület)

EDTA-s kémsőbe 2–5 ml perifériás vért vettünk, majd lefagyasztottuk. A fagyasztott vérminta felolvasztását követően 300 µl teljes vért vittünk fel a DNS-t kötő oszlopra (Genra Generation Capture Column, Genra Systems Inc., Kanada). A DNS-tisztító és eluáló oldatok alkalmazásával, többszöri inkubálás és centrifugálás után az Eppendorf-cső alján összegyűlt oldat 5–15 µg DNS-t tartalmazott. Amennyiben a DNS-t közvetlenül a tisztítás után nem használtuk föl, a mintát –20 °C-on tároltuk.

Polimeráz láncreakció

A teszt (Biotest HLA-DRB SSP tipizáló kit, Biotest AG., Németország) 24 PCR-reakcióból áll, amely tartalmaz egy negatív kontrollt is. A sikeres amplifikáció bizonyítékként belső kontrollok, a növekedési hormon egy 1050 bázispárnyi szakaszai szolgálnak.

Egy Eppendorf-csőbe összeállítottuk a „master mixet”, mely tartalmazta a PCR-koktét, a Taq polimerázt, desztillált vizet; ebből 10 µl-t mértünk a negatív kontroll helyére. Ezután hozzáadtuk a 60 µl oldatban lévő DNS-t, s az így kapott oldatból 10–10 µl-t a PCR-csővecskékbe pipettáztunk, majd a kít tetejét zártuk, és a DNS-t a primer mixekkel ütögetéssel elegyítettük. A kitéket Hybaid típusú Thermocycler készülékébe helyeztük. A láncreakció lényege a következő. A kettős szálú DNS denaturálódik (94 °C), majd a két komplementer oligonukleotid hibridizálódik az egyes DNS-szálakhoz úgy, hogy egyik az egyikhez, másik a másikhoz kötődjön. Stabilizálásukhoz elegyet le kell hűteni (61 °C), és az oligonukleotidokra nagy feleslegben van szükség. Majd dNTP és DNS-polimeráz segítségével (72 °C) új DNS-szálak szintetizálódnak. A ciklusok többször megismétlődnek.

Gélelektroforézis

A PCR-termékeket a készülékből kivéve agarózgélén megfuttattuk (25 percig, 136 mV-on, 65 A-en, sötét helyen), a festéshez etidium-bromidot használtunk.

Dokumentáció

Az elektroforézis befejeztével az eredményt UV-lámpa alatt értékeltük és polaroid gélkamerával fényképeztük (2. ábra).

Értékelés

A sikeres amplifikáció bizonyítékként kontrollcsíkot minden PCR-reakcióban láttunk, függetlenül attól, hogy volt vagy nem specifikus PCR-fragment. Pozitív volt az eredményünk, ha specifikus csík jelent meg a gélen. A kithoz tartozó reakciósema segítségével megadtuk a minta típusát, amit az eredménylapon feltüntettünk. A lap aljára rögzítettük a gélről készült fényképet. (A gélen tovaftott termékek méretbeli azonosítását a felmért molekulaszám-standard könnyítette meg. A negatív kontroll helyén semmit nem láttunk.)

Eredmények

A jelen tanulmányban 30 multiorgan donor HLA-tipizálását és az adatok feldolgozását végeztük el. A donorok átlagéletkora 43,9±7,6 év volt (16 nő és 14 férfi). Mint említettük, a szaruhártyák eltávolítása ilyen esetekben kizárólag *in situ* corneoscleralis excisióval történhet, követve az Európai Szembank Szövetség (European Eye Bank Association, EEBA) szabályait.^{3,11}

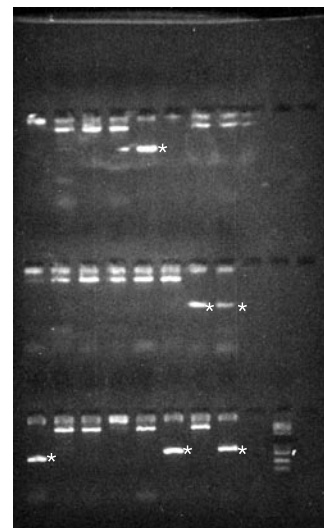
Ezzel párhuzamosan 54, transzplantációs várólistán szereplő beteg HLA-tipizálását is elvégeztük. A recipiensek közül – keratoplastica prognózisát tekintve – 50 a magas, 4 a normál rizikójú csoportba tartozott.

Munkánk során 23 olyan esetről tudunk beszámolni, ahol a HLA-tipizált beteg ismert szöveti antigenitású corneát kapott a transzplantáció során. A betegek átlagéletkora 59,13±10,7 év volt (15 nő, 8 férfi). A HLA-A, -B és -DR antigéneket figyelembe véve az egyezések mértéke a következő volt: 4 antigén egyezett 3 beteg, 3 antigén 1 beteg, 2 antigén 5 beteg, valamint 1 antigén 6 beteg esetében. A fennmaradó 8 betegnél, akik szintén ismert HLA-típusú szövetet kaptak, csak a kevésbé figyelembe vett HLA-Cw vagy -DQ antigéneknél volt egyezés.

Megbeszélés

A genetikai különbözőségből adódó immunbiológiai reakciót az 1940-es években végzett klasszikus bőrátültetési kísérleteivel *Medawar* mutatta ki.⁹ A kísérletek egyértelműen bizonyították, hogy a genetikailag közelálló egértörzsekben a bőrtranszplantátumok sokkal tovább maradnak meg, mint a genetikailag távolállóké.

A humán MHC-be (major hisztokompatibilitás komplex) a molekulák olyan polipeptideket kódolnak, melyek az egyedek individuális szöveti antigenitását biztosítják. A HLA komplex által meghatározott sejtfelületi antigéneket három osztályba soroljuk.⁸ Ezek olyan régiókat jelentenek,



2. ábra. Egy genetikai módszerrel végzett HLA-DR-tipizálás gélképe. A *-gal jelzett vonalak HLA-DR 13,16-os szöveti antigén pozitivitását jelzik

amelyek genetikai származásuk, funkciójuk, biokémiai tulajdonságaik, fenotipikus megnyilvánulásuk és hatásuk révén összetartoznak.

Az I. osztály antigénjeit a HLA-A, -B, -C lokusz génjei kódolják, s az MHC-régió centromertől távolabb eső részében helyezkednek el. A II. osztályt a centromer közelében elhelyezkedő HLA-D régió (DR, DQ, DP) allélikus génjei határozzák meg. Az I. és II. osztály között helyezkedik el a HLA III. osztály, a minor hisztokompatibilitás géncsoport. E sejtfelszíni glikoproteinek emberben a 6. kromoszóma rövid karján található, s a humán biológia legpolimorfabb rendszerét alkotják. A HLA-rendszer extrém polimorfizmusát az adja, hogy minden lokuszon több allél van. Jelenleg az A lokuszon 23, a B-n 49, a C-n 8, a DR-en 14, a DQ-n 3, a DP-n 6 antigénfeleség ismert.¹⁴

A veseátültetés, csontvelő-transzplantáció esetében a HLA-antigének hatása már jól ismert, bizonyított: a HLA-egyezés elősegíti a transzplantátum túlélését.¹⁵ A transzplantációs antigének szaruhártya-átültetésben betöltött szerepéről azonban még nem alakult ki egységes álláspont. Első nagy áttörésként 1974-ben *Newsome és társai* bebizonyították, hogy a corneában is vannak HLA-antigének, miután a cornea epithelsejteiből, keratocitákból és endothelsejtekből készült sejtkultúrákon kimutatták jelenlétüket.¹² Az eltérő eredmények okát nem is a HLA-antigének kevésbé fontos szerepével, hanem a kevésbé egységes vizsgálatokkal magyarázzák.¹⁷ Az ellentmondások okai lehetnek a nem precíz HLA-tipizálási metodikák, a kisszámú, nagy heterogenitású beteganyagból végzett vizsgálatok. Mindezek mellett eltérő posztoperatív immunszuppresszív terápiában részesülhetnek a betegek, ráadásul a fent említett különböző tanulmányokban a corneakonzerválás metodikája, illetve a corneaszövetek minőségi kontrollja sem volt egységes, megfelelő. A nagyszámú betegen végzett egységes vizsgálatokkal a tipizálás szükségessége egyértelművé tehető.^{2,17,18} A HLA-A, -B, -C antigének nagy biztonsággal meghatározhatók szerológiai módszerekkel is, a HLA-DR antigének azonosításához azonban a pontos és részletes eredményt adó genetikai vizsgálatok ajánlottak.¹⁸ Ahhoz, hogy a tipizálás eredménye nemzetközileg is elfogadható legyen, a vizsgálatokat ellenőrzött, akkreditált laboratóriumokban kell végezni.^{2,3,17,18}

Munkánk során bevezettük a HLA-tipizálás technikáját a Regionális Vérellátó Központ Immunológiai Laboratóriumával szoros együttműködve. A nemzetközi ajánlásoknak megfelelően a HLA I. osztályba tarozó antigéneket szerológiai, a II. osztályba tarozó antigéneket genetikai módszerekkel határozzuk meg. Létrehoztuk a Debreceni Szembank koordinátori pozícióját is; az azt betöltő személy folyamatos, szoros kapcsolatban áll a Debreceni Szervkivételi Team koordinátorával, biztosítva a Szembank folyamatos ellátását kiváló minőségű szaruhártya donorszövettel.

A HLA-rendszer extrém polimorfizmusa miatt az azonos vagy közel azonos szövetek beültetésének esélye alacsonynak mondható. Ehhez a tipizált betegek számának növelése is szükséges. Látható, hogy a szembankok tevékenysége a corneák konzerválásán lényegesen túlmutat, az orvoslás területén dolgozó több munkacsoport együttműködése szükséges a transzplantációk eredményesebbé tételéhez.

Irodalom

1. *Algros M.P., Angonin R., Delbosc B., Cahn J.Y., Kantelip B.*: Danger of systemic cyclosporine for corneal graft. *Cornea* 2002; 21: 613-614.
2. *Beekhuis W.H., Bartels M., Doxiadis I.I.N., van Rij G.*: Degree of compatibility for HLA-A and -B affects outcome in high-risk corneal transplantation. In: Sundmacher R. (ed.): Adequate HLA matching in keratoplasty. Vol 36. Dev Ophthalmol Karger, Basel 2003; 12-21.
3. European Eye Bank Association, Directory, Eleventh edition, 2003.
4. *Hill J.C.*: Systemic cyclosporine in high-risk keratoplasty. Short-versus long-term therapy. *Ophthalmology* 1994; 101: 128-133.
5. *Hopkins K.A., Maguire M.G., Fink N.E., Bias W.B.*: Reproducibility of HLA-A, B, and DR typing using peripheral blood samples: results of retyping in the collaborative corneal transplantation studies. Collaborative Corneal Transplantation Studies Group (corrected). *Hum Immunol* 1992; 33: 122-128.
6. *Jenisch S., Westphal E., Zavazava N., Durr C., Duncker G., Nolle B., Muller-Ruchholtz W.*: DNA-based HLA class II postmortem typing: evaluation of different techniques for prospective corneal allografting. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233: 635-641.
7. *Khairuddin R., Wachtlin J., Hopfenmuller W., Hoffmann F.*: HLA-A, HLA-B and HLA-DR matching reduces the rate of corneal allograft rejection. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003; 241: 1020-1028.
8. *Klein J., Figueroa F., Nagy Z.A.*: Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. *Annu Rev Immunol* 1983; 1: 119-142.
9. *Medawar P.B.*: Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 1948; 29: 58-69.
10. *Módis L., Szalka A., Berta A., Takács L., Balázs K., Nagy A.*: A Debreceni Szembank. *Szemészet* 1995; 132: 141-143.
11. *Módis L., Boytha Zs., Berta A.*: A cornea konzerválás módszertani kérdései. *Szemészet* 2000; 137: 109-111.
12. *Newsome D.A., Takasugi M., Kenyon K.R., Stark W.F., Opelz G.*: Human corneal cells *in vitro*: morphology and histocompatibility (HLA) antigens of pure cell populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1974; 13: 23-32.
13. *Olerup O., Zetterquist H.*: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-235.
14. *Robinson J., Malik A., Parham P., Bodmer J.G., Marsh S.G.*: IMGT/HLA database – a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens* 2000; 55: 280-287.
15. *Stenszky V.*: HLA-antigének és szerepük a transzplantációban. *Orvosképzés* 1998; 5: 256-272.
16. *Terasaki P.I., McClelland J.D.*: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.
17. *Völker-Dieben H.J., Schreuder G.M., Claas F.H.J., Doxiadis I.I.N., Schipper R.F., Pels E., Persijn G.G., Smits J., D'Amaro J.*: Histocompatibility and corneal transplantation. In: Sundmacher R. (ed.): Adequate HLA matching in keratoplasty. Vol 36. Dev Ophthalmol Karger, Basel 2003; 22-41.

18. *Völker-Dieben H.J., Claas F., Schreuder G.M., Schipper R.F., Pels E., Persijn G.G., Smits J., D'Amaro J.*: Beneficial effect of HLA-DR matching on the survival of corneal allografts. *Transplantation* 2000; 70: 640-648.

Levelezési cím: Dr. Tóth Enikő
DEOEC Szemészeti Klinika
4012 Debrecen, Nagyerdei krt. 98.
E-mail: enitoth@jaguar.dote.hu