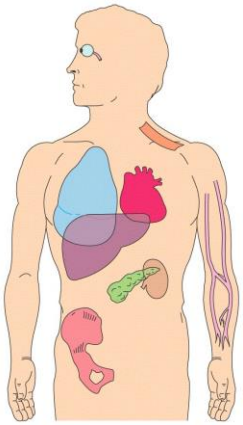


# پیوند
# Transplantation

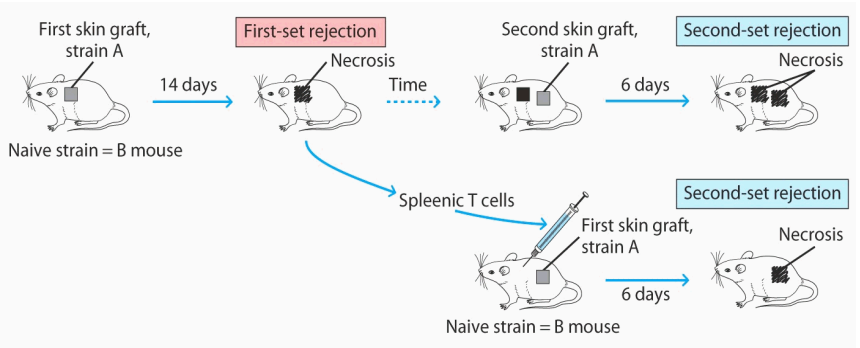
## چند اصطلاح

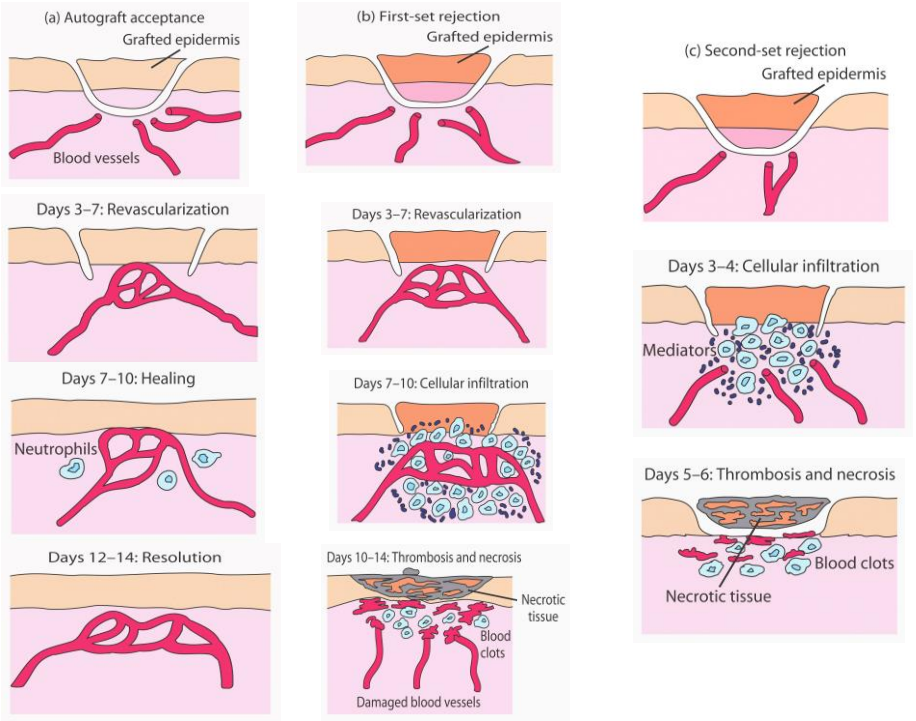
- **انتقال سلول، بافت یا عضو از بدن یک فرد به فرد دیگر**

- **دهندهٔ عضو** Donor
- **دریافت کننده یا گیرندهٔ عضو**Recipient
- **وازنش یا رد پیوند**Graft Rejection
- **اتوگرافت**Autologous transplantation
- **ایزوگرافت**Syngenic transplantation
- **آلوگرافت**Allogenic transplantation
- **زنوگرافت**Xenogenic transplantation

# پیوند چه ربطی به سیستم ایمنی دارد؟

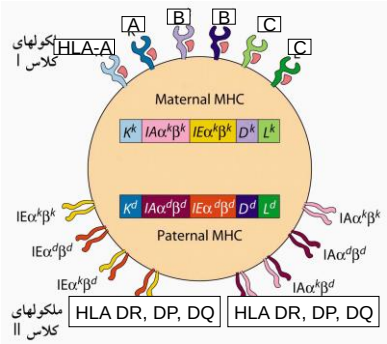
- در محل بافت تخریب شده، ارتشاح لنفوسیت‌ها و سایر سلول‌های ایمنی دیده می‌شود
- در بافت پیوند از موش نژاد ب به موش نژاد الف موجب رد پیوند می‌شود (رد نوبت اول).
- تکرار پیوند از از موش نژاد ب به الف موجب رد سریع‌تر پیوند می‌شود (رد نوبت دوم) .
- پیوند از موش نژاد ج به موش نژاد الف موجب رد پیوند نوبت اول می‌شود.
- پدیدهٔ رد پیوند دارای ویژگی و خاطره است.

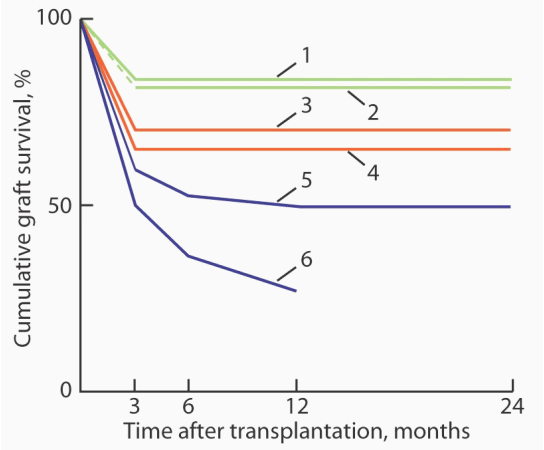


## اگر سیستم ایمنی موجب رد پیوند می‌شود چه آنتی‌ژن‌هایی اهمیت دارند؟

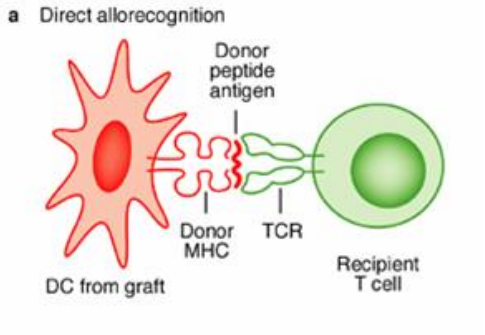
- **مهمترین آنتی‌ژن‌ها :آنتی‌ژن‌های اصلی سازگاری نسجی یا** MHC
  - **پلی‌مورفیسم**
  - **هم‌قدرت**
- **آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی و آنتی‌ژن‌های فرعی سازگاری نسجی** Minor Histocompatibility Antigens



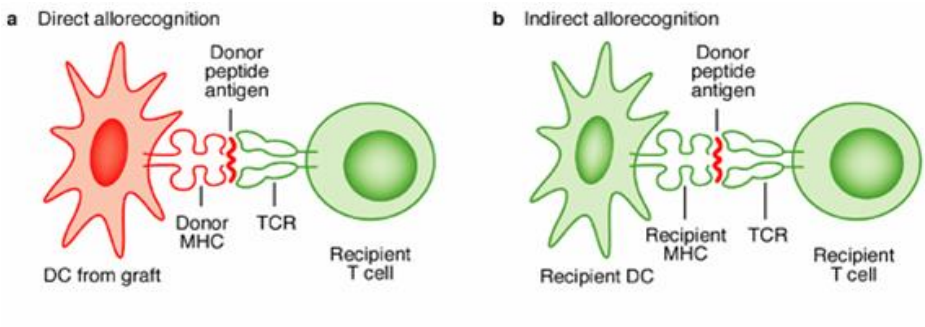



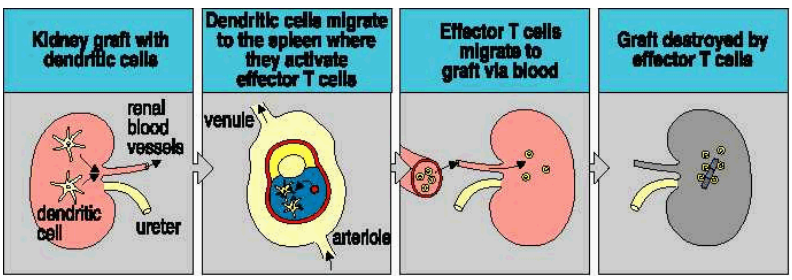

| Curve no. | HLA mismatches (no.) Class I | Class II |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 1 or 2 | 0 |
| 3 | 3 or 4 | 0 |
| 4 | 0 | 1 or 2 |
| 5 | 1 or 2 | 1 or 2 |
| 6 | 3 or 4 | 1 or 2 |

# این آنتی‌ژن‌ها چطور عرضه می‌شوند؟

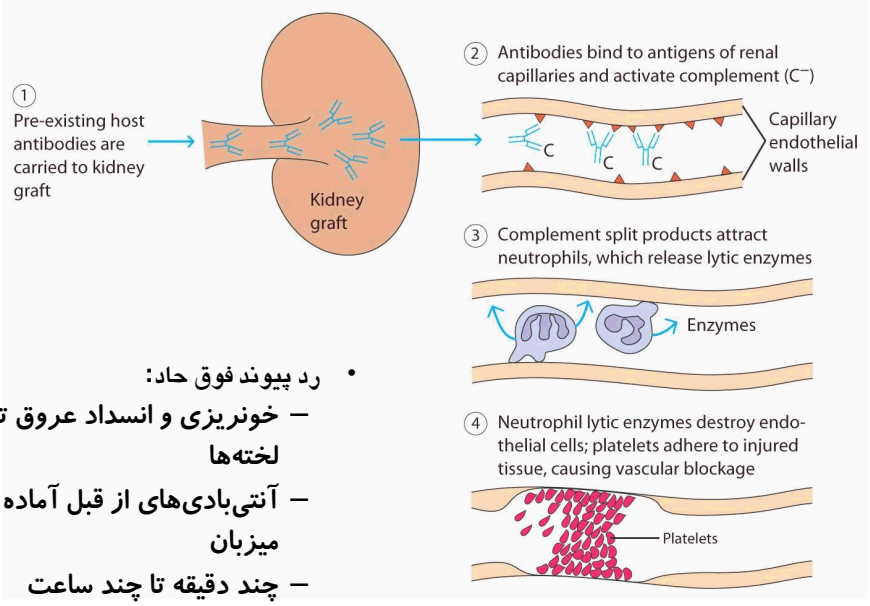



- **عرضهٔ مستقیم**
  - **درصد بالایی از لنفوسیت‌ها فعال می‌شوند (۲٪)**
  - **تفاوت‌ها بیشتر است**
  - **دانسیتهٔ بالاتری دارند**
  - **سلول‌های T خاطره‌ای نیز می‌توانند پاسخ بدهند**
- **عرضهٔ غیر مستقیم**

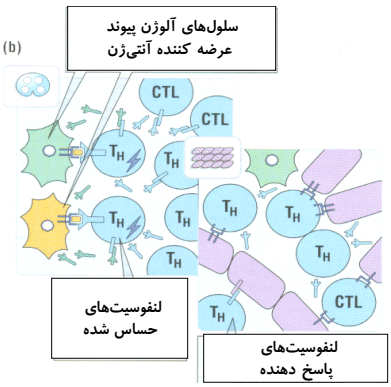


# انواع رد پیوند بر اساس مشاهدات پاتولوژیک




- رد پیوند فوق حاد:
  - خونریزی و انسداد عروق توسط لخته‌ها
  - آنتی‌بادی‌های از قبل آماده در میزبان
  - چند دقیقه تا چند ساعت



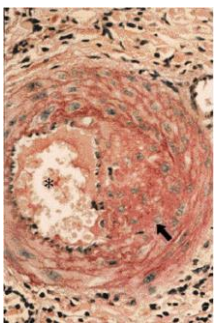

- رد پیوند حاد:
  - آسیب با واسطهٔ سلول‌های T ، ماکروفاژها و آنتی‌بادی
  - نکروز و التهاب در جدارهٔ عروق کوچک
  - چند هفته تا چند ماه

رد پیوند مزمن:

فیبروز و از دست رفتن ساختمان طبیعی اندام

تکثیر عضلات صاف و انسداد سرخرگی، ارتریواسکلروز پیوندی (احتمالا تحت اثر سایتوکاین‌های پاسخ DTH )

6ماه تا چند سال



تعیین گروه خونی
کراس مچ
تعیین HLA
MLRیک‌طرفه

برای جلوگیری از رد پیوند باید بیشترین سازگاری بین آنتی‌ژن‌های MHC دهنده و دریافت کنندهٔ پیوند وجود داشته باشد.

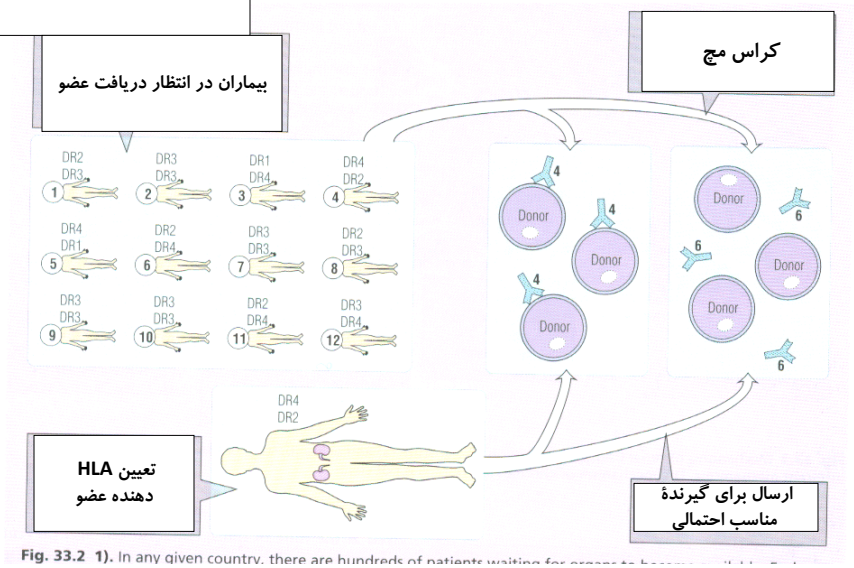
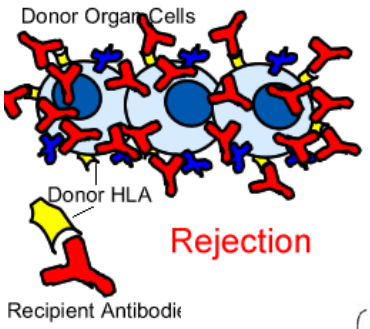
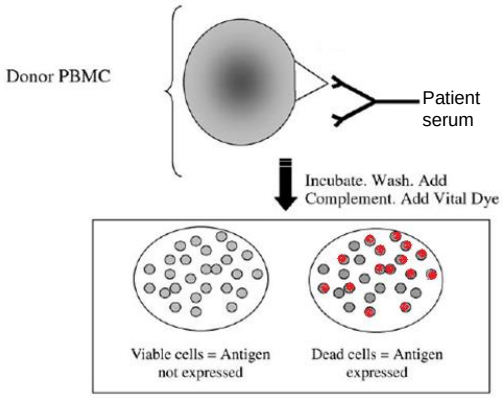



Fig. 33.2 1). In any given country, there are hundreds of patients waiting for organs to become available

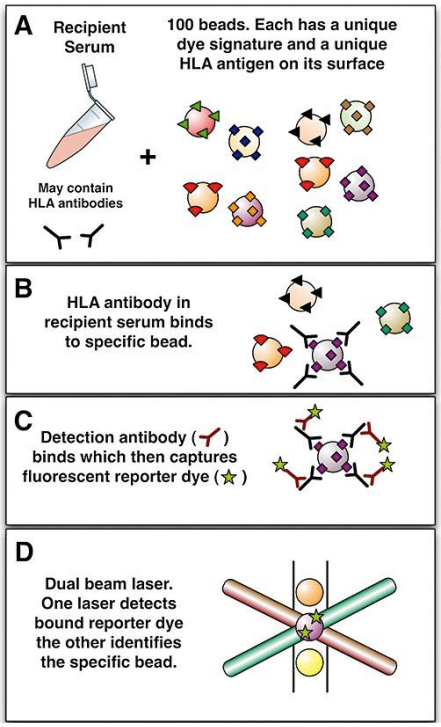



# CROSSMATCH

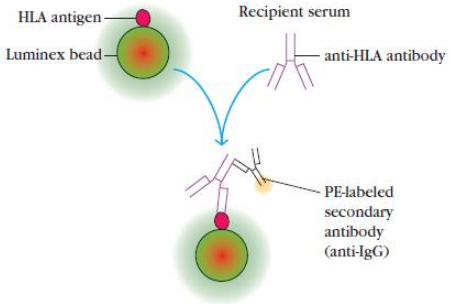
- **کراس مچ بین سرم بیمار و لنفوسیتهای اهداکننده برای تشخیص وجود آنتی‌بادیهای اختصاصی در سرم بیمار (بررسی وجود آنتی بادی ضد-HLA)**
  - **اکثر آزمایشگاهها آنتی بادی ضد HLA نوع یک**



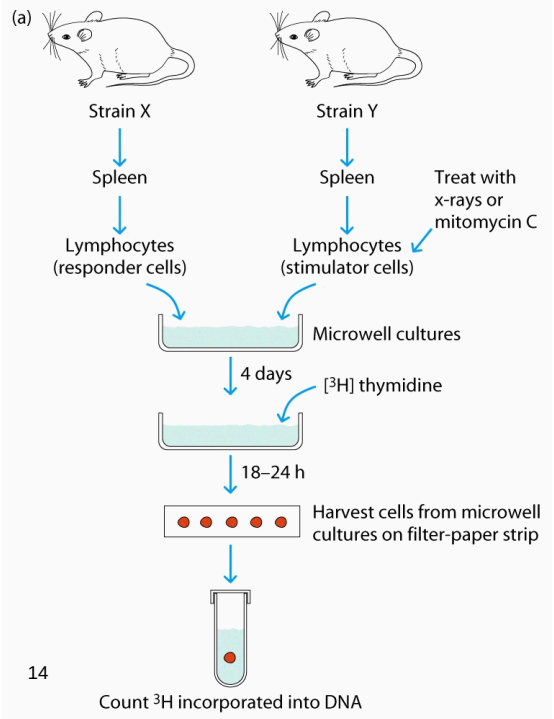

12




**The Luminex cross-matching assay**



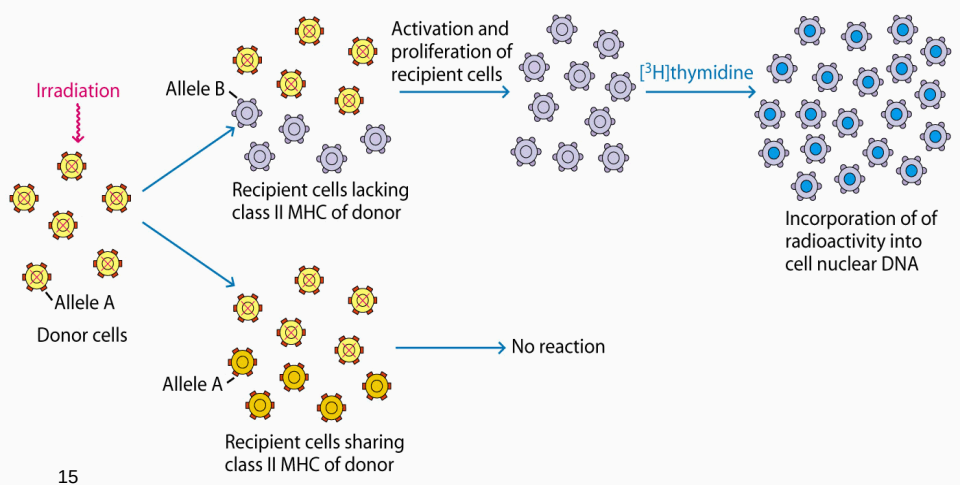

**virtual crossmatch**



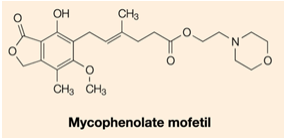

14

# MLR
# Mixed leukocyte reaction

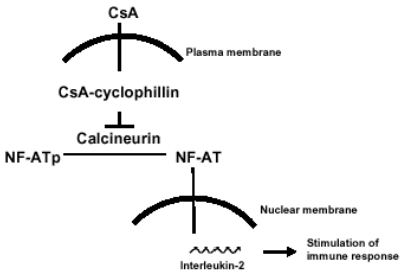
# واکنش مختلط لنفوسیتی یک‌طرفه

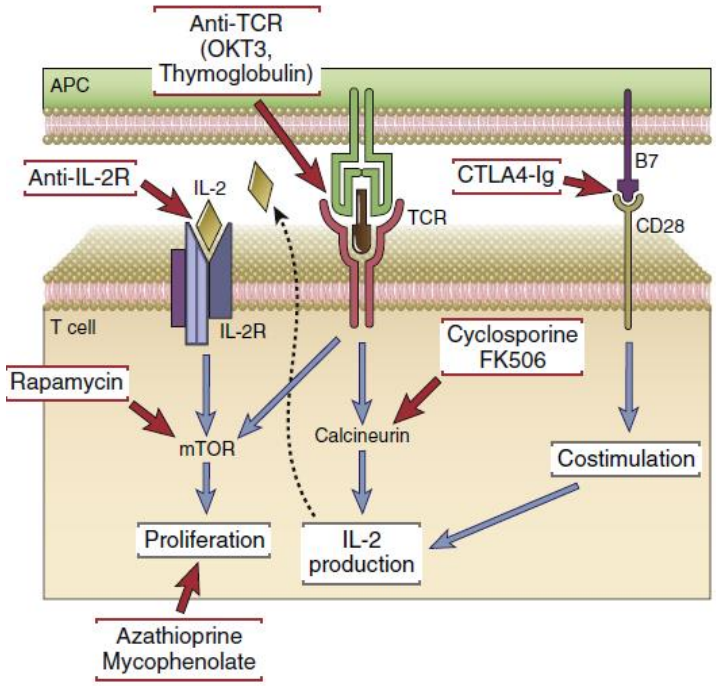


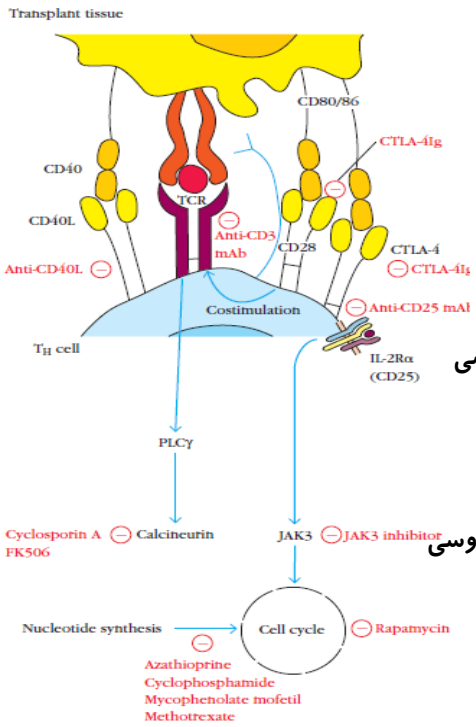

## اگر سازگاری کامل امکان‌پذیر نبود چه باید کرد؟




- **داروهای سرکوبگر ایمنی**
  - **داروهای ضد تکثیر**
    - سیکلوفسفامید، ازاتیوپرین (مهارکننده‌های میتوز)
    - موفتیل مایکوفنولات (مهار اینوزین منوفسفات دهیدروکسی‌ژناز ویژهٔ لنفوسیت‌ها)
  - **ضدالتهاب**
    - کورتیکواستروئیدها
  - **مهارکننده‌های سیستم ایمنی**
    - سایکلوسپورین
    - FK506
    - راپامایسین
- **ایمونوتراپی**



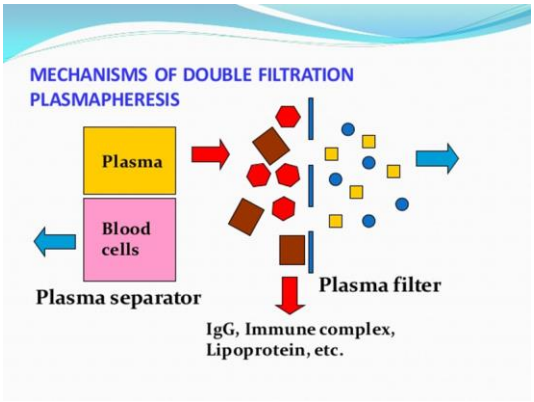


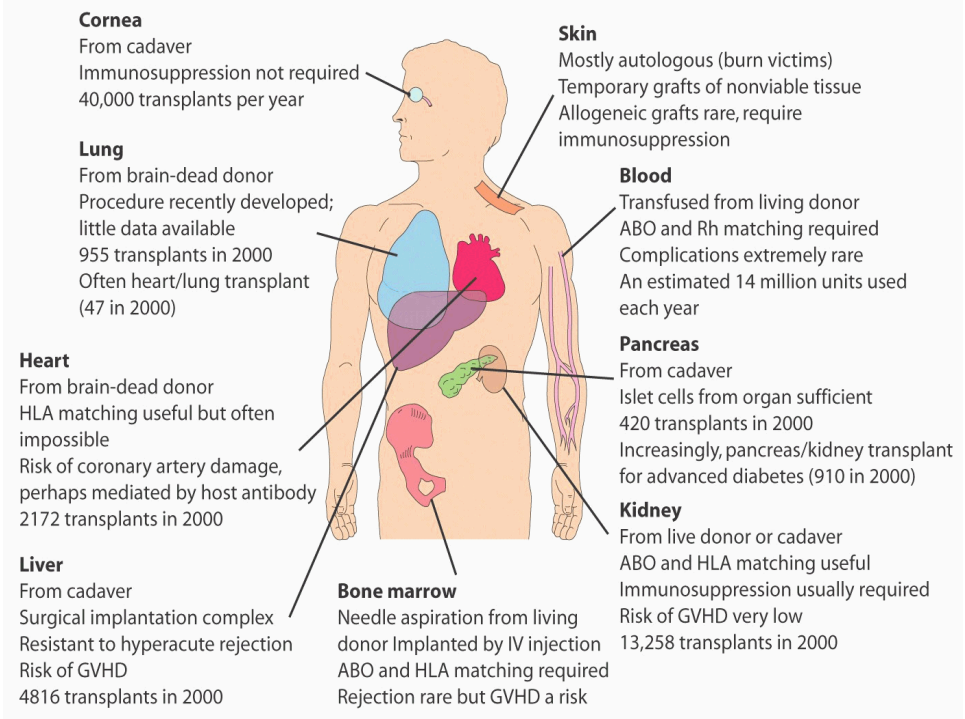



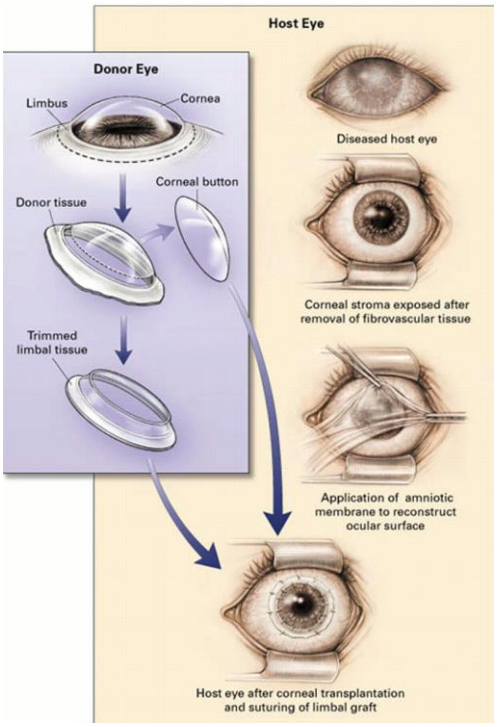

# ایمونوتراپی

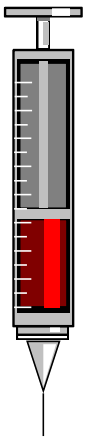
- آنتی‌بادی ضد لنفوسیتT
  - آنتی‌بادی ضد CD3
    - انهدام
    - بی‌پاسخی
  - آنتی‌بادی ضد CD25
- محدودیت: پاسخ بر علیه آنتی‌بادی موشی
- پلاسمافرز و مهار تولید آنتی بادی
- انتقال خون مکرر
- اشعه‌دهی طحال و گره‌های لنفی
- افزایش وقوع بدخیمی و عفوت‌های ویروسی
- تولرانس

- پلاسمافرز و مهار تولید آنتی بادی
- انتقال خون مکرر
- اشعه‌دهی طحال و گره‌های لنفی
- افزایش وقوع بدخیمی و عفوت‌های ویروسی
- تولرانس



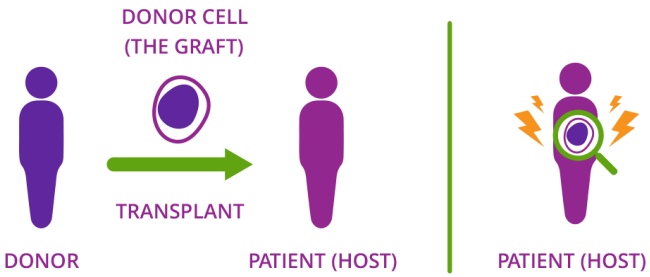





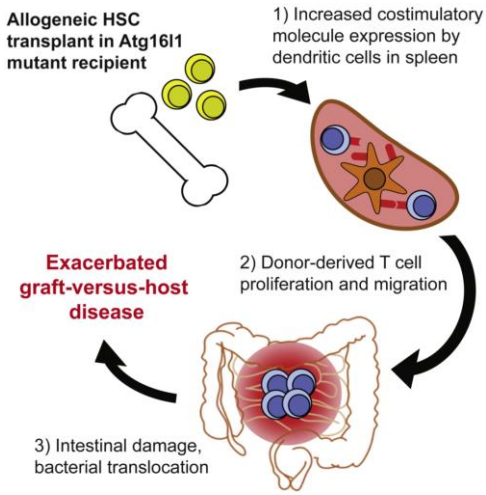



## پیوند مغز استخوان

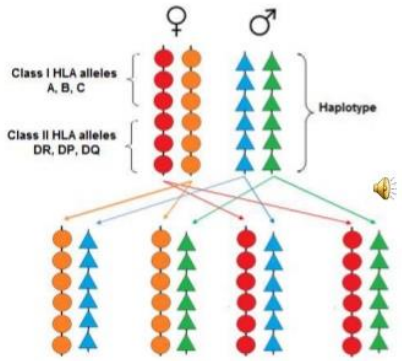
- در نقص‌های ایمنی و انواع لوسمی‌ها (اتولوگ) کاربرد دارد
- سرکوب ایمنی دریافت‌کنندهٔ پیوند قبل از پیوند لازم است
- تخلیهٔ جایگاه‌های موجود در مغز استخوان برای لانه‌گزینی سلول بنیادی لازم است
- پدیدهٔ پیوند علیه میزبان به دلیل پاسخ سلول‌های بافت پیوندی به آنتی‌ژن‌های میزبان روی می‌دهد

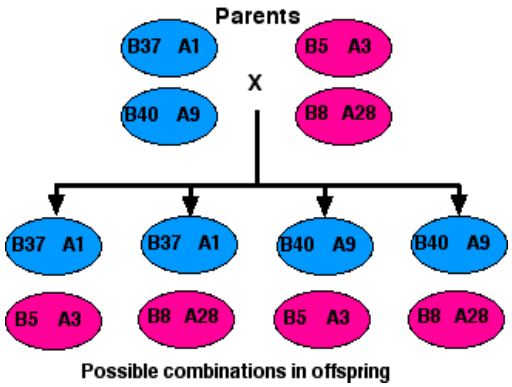


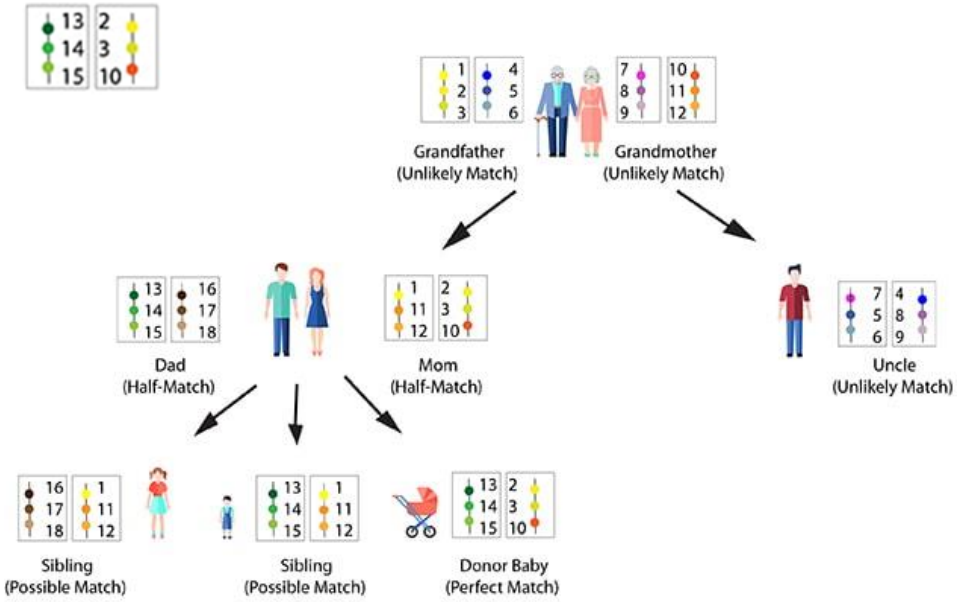
# پیوند علیه میزبان
# Graft versus Host Disease - GVHD



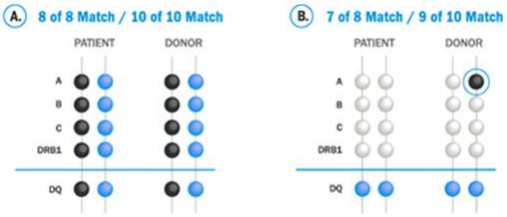

- **حاد**
  - نکروز سلول‌های اپی‌تلیال در پوست، کبد و دستگاه گوارش
- **مزمن**
  - فیبروز و اتروفی بافت‌های فوق
- **حذف لنفوسیت‌های T بالغ (کاهش لانه‌گزینی)**
- **داروهای سرکوبگر ایمنی (سلولهای NK)**



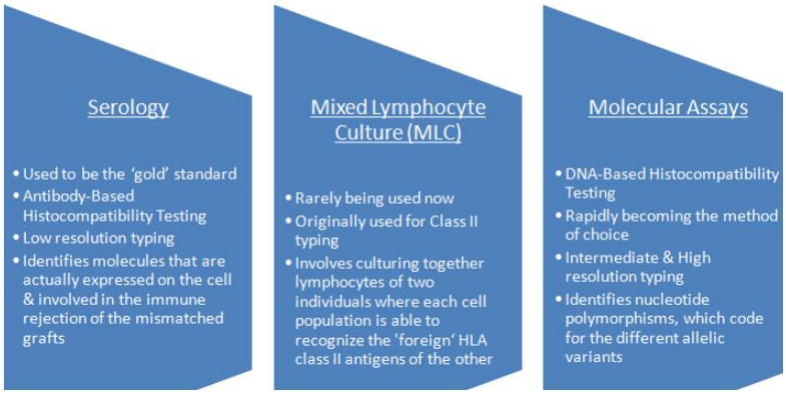



# CROSSMATCH
# HLA TYPING



# TYPING METHODS

- سرولوژی- روش رایج (تکنیک‌های ملکولی در حال گسترش)
- سلولی- به ندرت – برای نوع II
- ملکولی – در حال گسترش

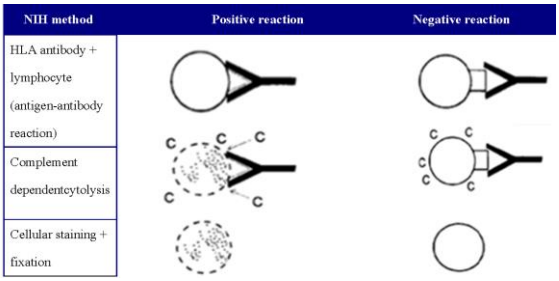



28

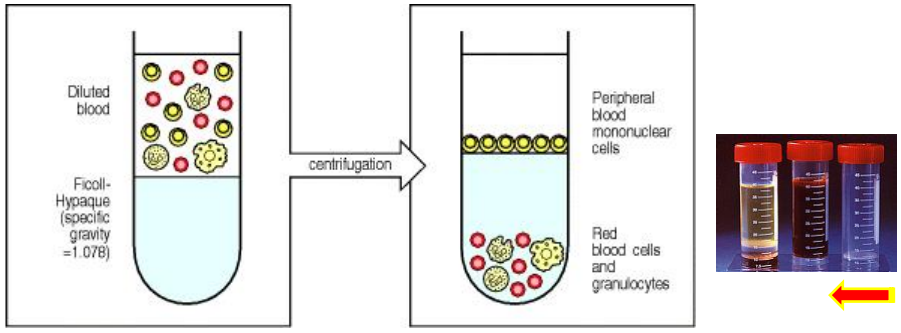
# SEROLOGY

- Complement Dependent Cytotoxicity (CDC)

- سایتوتوکسیسیته با کمک کمپلمان (میکرولنفوسایتوتوکسیسیته)
- جداکردن لنفوسیت‌های زنده خون محیطی معمولا بر اساس سانتریفوژ روی فایکول (1.077) یعنی بر اساس دانسیته
- سپس تست در ۳ مرحله

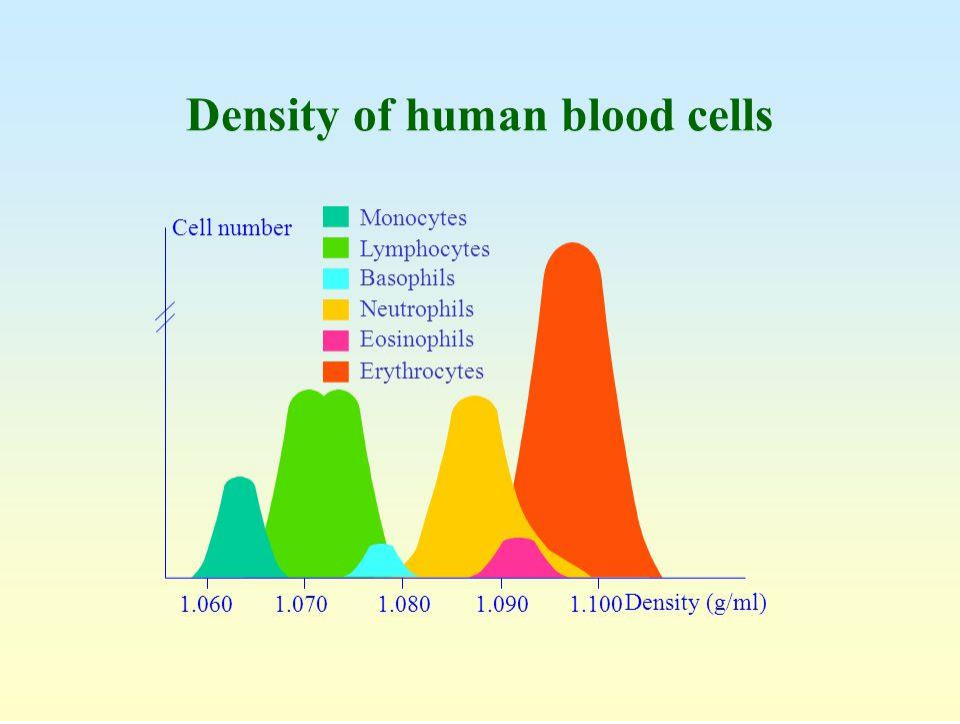



29




- خون (همراه با ماده ضد انعقاد) روی فایکول قرار می‌گیرد و سانتریفوژ می‌شود
- گلبول‌های قرمز و گرانولوسیتها به دلیل دانسیته بالاتر، از لایه فایکول عبور کرده انتهای لوله قرار می‌گیرند
- سلول‌های مونونوکلئر (لنفوسیت و مونوسیت) روی لایه فایکول قرار گرفته جدا می‌شوند

30



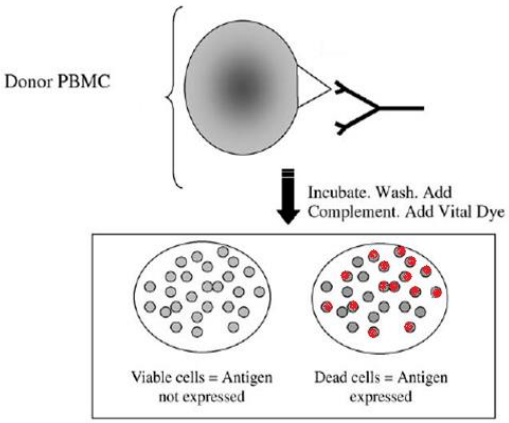
# Microlymphocytotoxic test

**پلیت با چاهکهای بسیار کم حجم ( Terasaki) ← میکرومیکرولنفوسایتوتوکسیسیته**

**مرحله یک – لنفوسیت‌های زنده با آنتی‌بادی اختصاصی HLA انکوبه میشود**

**اگر آنتی‌ژن اختصاصی (یع**

**آنتی‌بادی**




32

# Microlymphocytotoxic test

**مرحله دو- سرم خرگوش (منبع کمپلمان) اضافه میشود**

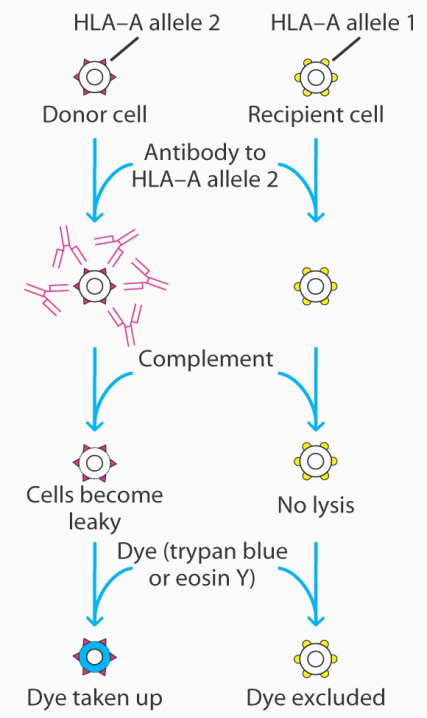
**اگر آنتی بادی به HLA سطح سلول متصل باشد ← کمپلمان فعال و غشاء سلول**

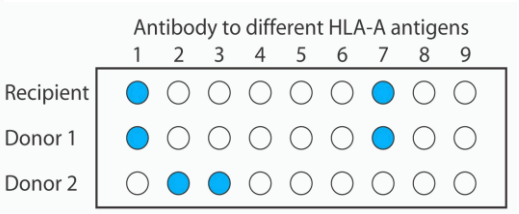
**تخریب و نفوذپذیر**

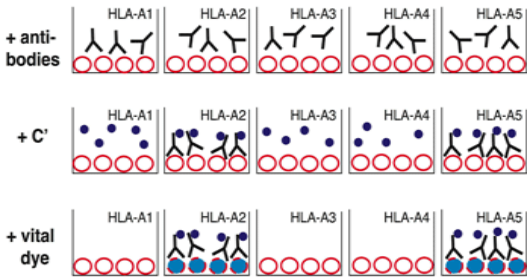
**مرحله سه- اضافه کردن رنگ (ائوزین یا تریپان بلو) یا رنگ فلورسان مثل اتیدیوم برماید ← ورود به سلول آسیب دیده ← بعد از ۱۰ دقیقه شمارش با میکروسکپ معمولی یا فلورسان**

- Ethidium Bromide –Trypan Blue –Eosin

33




34

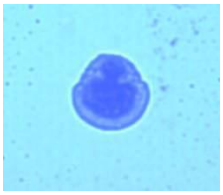
# Microlymphocytotoxicity test

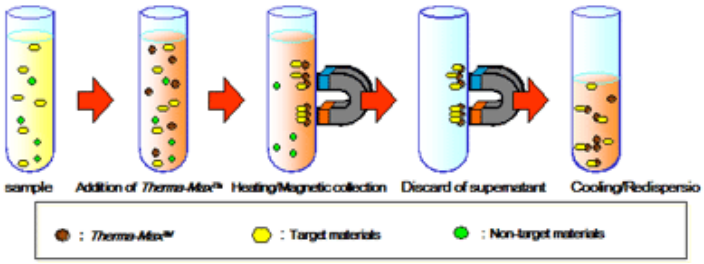
- برای HLA نوع یک هم لنفوسیت T و هم B قابل استفاده
- برای تعیین سرولوژیک HLA نوع دو لنفوسیت B (در خون اکثرا T بالای ۸۰٪)
- متدهائی برای حذف T یا جدا کردن B (انتخاب منفی و مثبت)
- روشهای قدیمی‌تر: رزت با گلبول قرمز گوسفند (و نورامینیداز) موجب حذف T، nylon wool برای چسبیدن B

- روش جداسازی با ذرات مغناطیسی (مگنت بید)
- ذرات کروی پلی استیرنی – هسته با قابلیت مغناطیسی –رویه پوشیده از آنتی‌بادی ضد HLA نوع دو

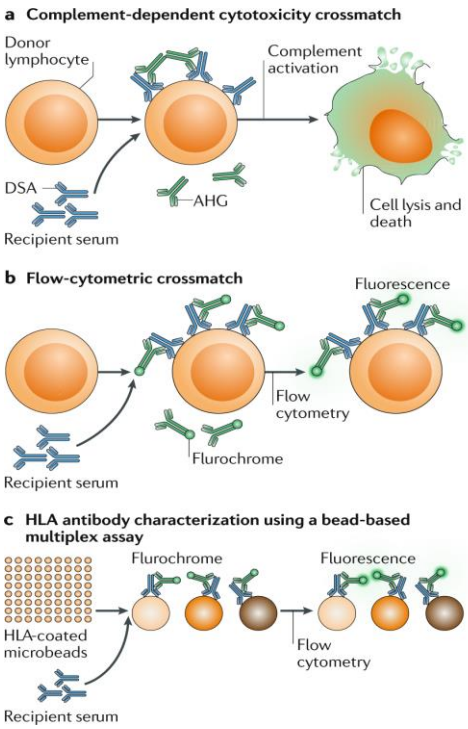
35

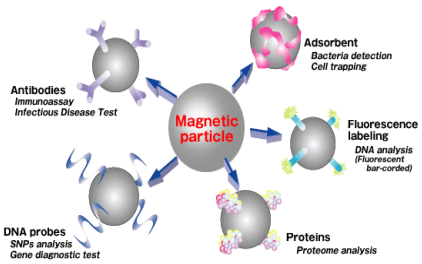
6 Tube Magnetic Separation Rack
Cell Signaling




sample
Addition of Therma-Max®
Heating/Magnetic collection
Discard of supernatant
Cooling/Redispersio
: Therma-Max®
: Target materials
: Non-target materials

36


a Complement-dependent cytotoxicity crossmatch
Donor lymphocyte
Complement activation
DSA
AHG
Cell lysis and death
Recipient serum
b Flow-cytometric crossmatch
Fluorescence
Flow cytometry
Flurochrome
Recipient serum
c HLA antibody characterization using a bead-based multiplex assay
Flurochrome
Fluorescence
HLA-coated microbeads
Flow cytometry
Recipient serum

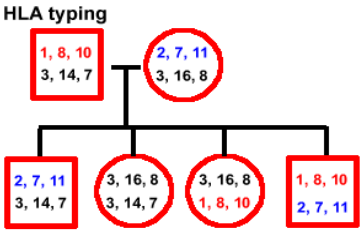

Adsorbent
Bacteria detection
Cell trapping
Antibodies
Immunoassay
Infectious Disease Test
Magnetic particle
Fluorescence labeling
DNA analysis
(Fluorescent bar-corded)
DNA probes
SNPs analysis
Gene diagnostic test
Proteins
Proteome analysis

# Serological HLA Typing Methods

- نیازمند مجموعه‌ای از آنتی سرم‌های شناخته شده برای تعیین نوع HLA
- منابع بالقوه تهیه آنتی سرم‌های فوق
  - زنان حامله (آنتی‌بادی علیه HLA موجود بر سلول‌های جنینی)
  - بیماران بعد از رد پیوند کلیه (آنتی‌بادی علیه HLA موجود بر پیوند)
  - بیماران با چند بار انتقال خون (آنتی‌بادی علیه HLA موجود بر سلول‌های خون اهدائی)
  - داوطلب
- تست لنفوسایتوتوکسیسیته
  - وقتی یک HLA معلوم می‌شود که واکنش با آنتی‌بادی اختصاصی، حداقل موجب ۵۰٪ لیز شود.



- محسنات:
  - انجام آسان و کم هزینه از نظر تجهیزات
  - زمان حدود ۳ ساعت
  - تفسیر ساده اگر آنتی‌سرم‌ها خوب و قابل اعتماد باشند
- معایب:
  - نیاز به خون نسبتا زیاد
  - نیاز به سلول زنده
  - دشواری پیدا کردن آنتی‌سرم خوب برای آنتی‌ژن‌های کمیاب‌تر




MHC typing by lympho-cytotoxity

DP02. A lymphocyto-toxicity test with anti-MHC antibodies gives the following results. Deduce the genotype of genes A and B.
Genotype:

| Specificity | Cytotoxicity | Specificity | Cytotoxicity |
|---|---|---|---|
| A1, A11 | 10% | B7, B27 | 85% |
| A2 | 8% | B7, B45 | 95% |
| A2, A28 | 90% | B8, B27 | 10% |
| A3 | 80% | B27, B44,B45 | 75% |
| A3, A10,A11 | 95% | B44 | 85% |
| A10, A11 | 5% | B45 | 5% |

DP03. A lymphocyto-toxicity test with anti-MHC antibodies gives the following results. Deduce the genotype of genes A and B.
Genotype:

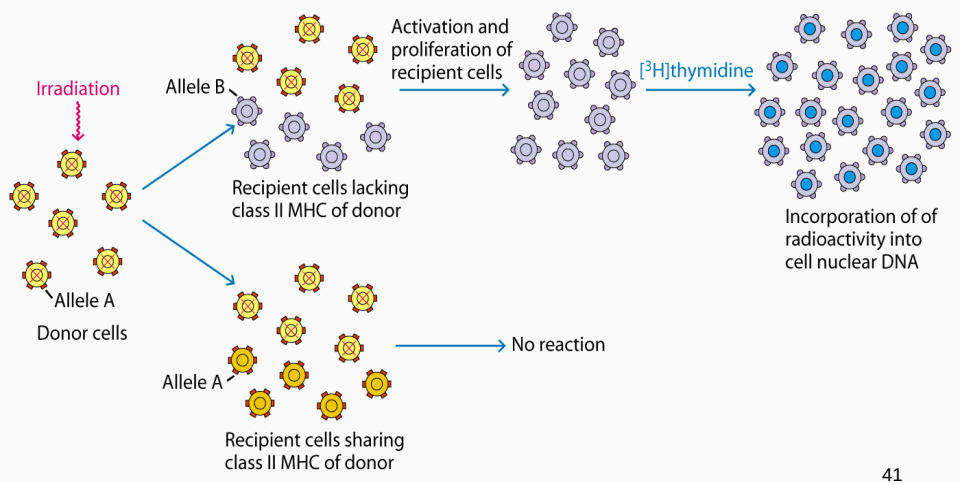
| Specificity | Cytotoxicity | Specificity | Cytotoxicity |
|---|---|---|---|
| A1, A11 | 75% | B7, B27 | 80% |
| A2 | 15% | B7, B45 | 95% |
| A2, A28 | 10% | B8, B27 | 10% |
| A3 | 5% | B27, B44,B45 | 5% |
| A3, A10,A11 | 95% | B44 | 10% |
| A10, A11 | 80% | B45 | 75% |

# Cellular typing

- در حال حاضر در آزمایشگاه‌ها استفاده رایج ندارد
- مجموعه‌ای از سلول‌های هوموزیگوت برای تعیین الل لازم است
- روش‌های کشت سلول زمان‌بر و پرکار است و احتمالا نیاز به مواد رادیواکتیو
- کشت مختلط لنفوسیتی (MLC–mixed lymphocyte culture) برای تعیین HLA نوع دو

40

## واکنش مختلط لنفوسیتی یک‌طرفه




41

# Molecular Methods

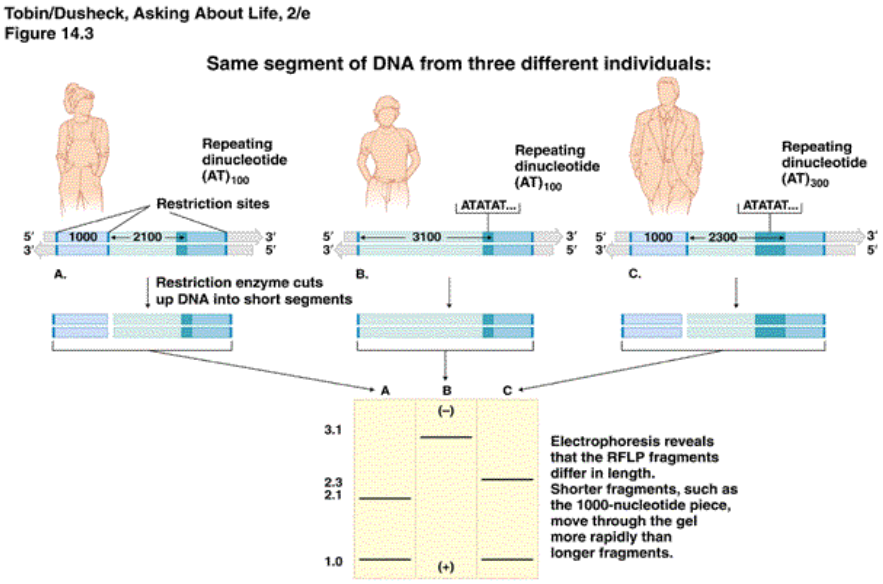
- **از حدود ۱۹۸۷و معرفی تکنیک ساترن بلات**
- **یافتن** RFLP(restriction fragment length polymorphisms) **در انواع شناخته شده** DR/DQ **(سرولوژیک) یا** Dw **(سلولی)**
- **حدود ۱۹۹۲معرفی تکنیک** PCR (polymerase chain reaction)
  - **در حال حاضر در اکثر تکنیک‌های رایج**

42

## Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

- **بر اساس وجود جایگاه‌های برش ویژه اندونوکلئازهای خاص (انزیم‌های محدودالاثر) در الل**
- **برش متفاوت ← قطعات** DNA **متفاوت روی ژل الکتروفورز**
- **برای تعیین نوع** HLA **استفاده از پروب نشاندار اختصاصی هر الل**
  - **انتقال قطعات** DNA **از ژل به کاغذ نیتروسلولز یا غشاء نایلونی**
- **تفاوت مهم: روش سرولوژیک داده‌های فنوتیپی**
- **افزایش تعداد الل‌ها: ناتوانی** RFLP **برای شناسائی همه (نیاز به انزیم‌های محدودالاثر مناسب یا اختصاصی الل)**

43



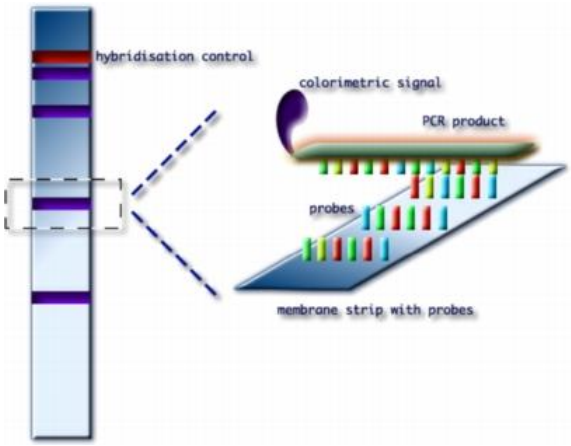

44

Copyright © 2001 by Harcourt, Inc. All rights reserved.

# PCR Based Methods

- **استفاده از** PCR **برای تکثیر یک قطعه از** DNA **با پرایمر الیگونوکلئوتیدی**
- **انتقال محصول به غشاء و هیبرید کردن با پروب‌های نشاندار الیگونوکلئوتیدی اختصاصی سکانس الل و مشاهده باندهای نشاندار**
- **نام روش:** PCR- sequence specific oligohybridisation (SSO)
- **افزایش تعداد پروبها با معرفی الل‌های جدید ← پیچیدگی و پرحجم شدن روش**
- PCR- reverse SSO **برای تسهیل کار**
- **اتصال پروب‌های اختصاصی توالی‌ها به یک غشاء و بعد هیبرید کردن نمونه (همان محصول اختصاصی ژن** PCR**) روی آن**

45



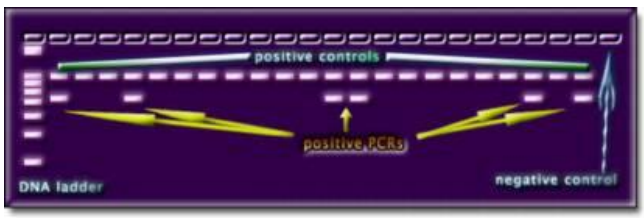

# Principle of PCR-SSO

- Allele specific probes are bound on the membrane strip
- HLA locus specific PCR is performed and incubated with the strips
- PCR product is hybridized to the corresponding probes
- a colorimetric signal is bound to the reaction depicting the allele specificity on the strip

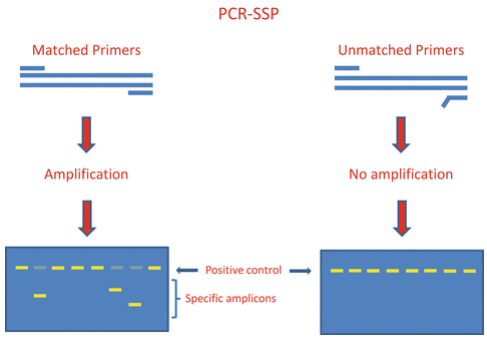
46

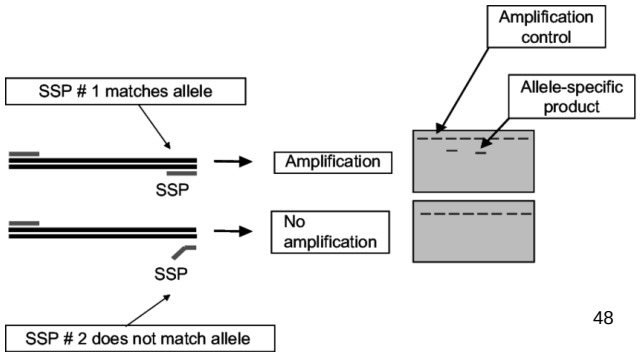
# PCR SSP (Sequence Specific Priming)

- **استفاده از پرایمرهای اختصاصی توالی ← تکثیر فقط در صورت وجود آن الل خاص** HLA
- **پرایمر کاملا سازگار در** PCR **با پرایمری با یک یا دو ناسازگاری متفاوت است**
- **نیاز به انواع پرایمرهای** PCR **ولی یک مرحله و مشاهده نتایج (ژل و اتیدیوم برماید) بدون نیاز به مرحله هیبرید کردن**
- **نیاز به کنترل مثبت**



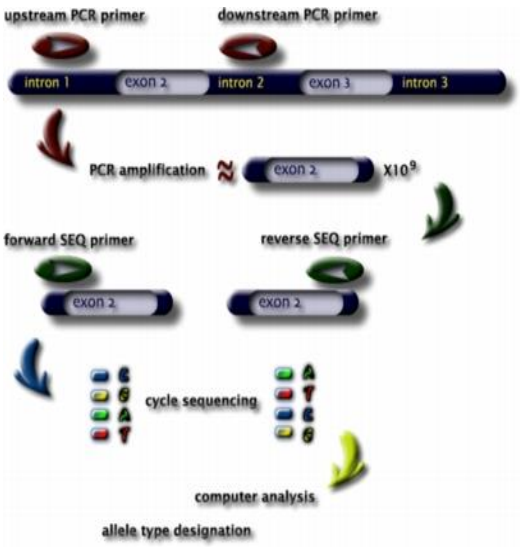

47



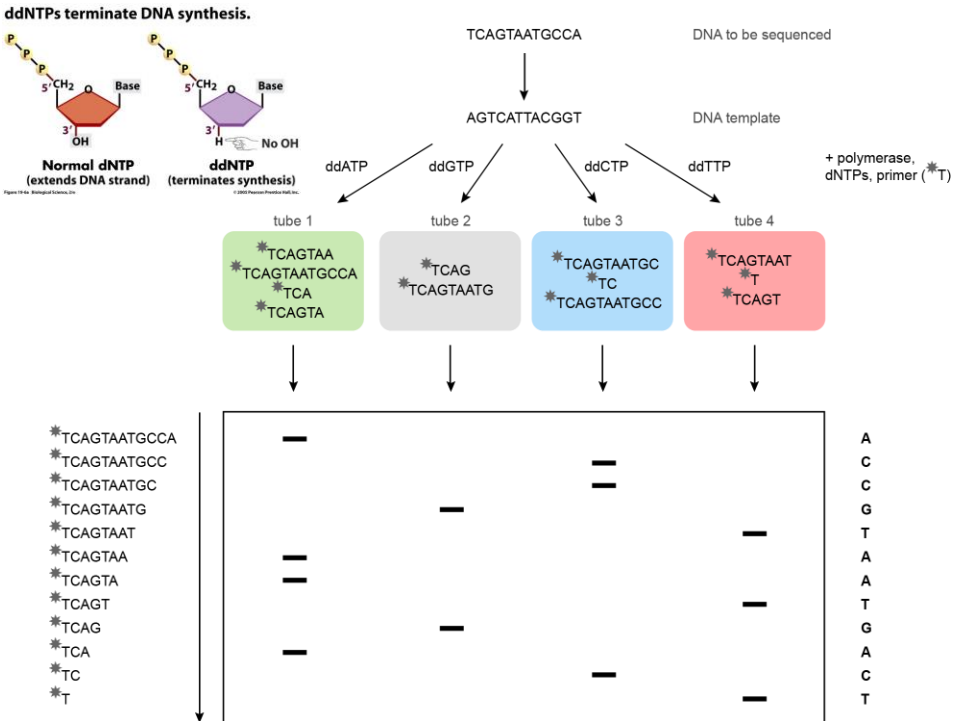

48

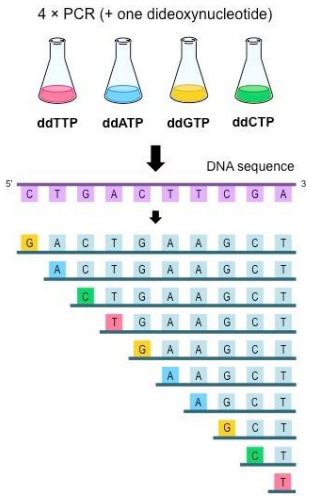
# Molecular Methods

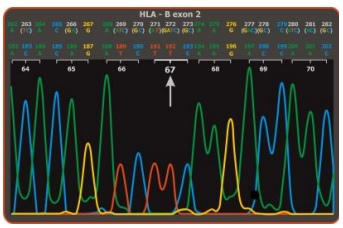


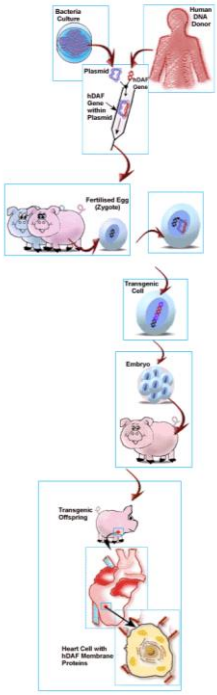

- Sequence Based Typing (SBT)
  - تعیین توالی DNA روی قطعه PCR مناسب مثلا ژن HLA DRB1
  - مقایسه با سکانس‌های ژن DRB1 در پایگاههای داده

49


ddNTPs terminate DNA synthesis.
Normal dNTP
(extends DNA strand)
ddNTP
(terminates synthesis)
No OH
TCAGTAATGCCA
DNA to be sequenced
AGTCATTACGGT
DNA template
ddATP
ddGTP
ddCTP
ddTTP
+ polymerase,
dNTPs, primer (*T)
tube 1
tube 2
tube 3
tube 4
*TCAGTAA
*TCAGTAATGCCA
*TCA
*TCAGTA
*TCAG
*TCAGTAATG
*TCAGTAATGC
*TC
*TCAGTAATGCC
*TCAGTAAT
*T
*TCAGT
*TCAGTAATGCCA
*TCAGTAATGCC
*TCAGTAATGC
*TCAGTAATG
*TCAGTAAT
*TCAGTAA
*TCAGTA
*TCAGT
*TCAG
*TCA
*TC
*T
A
C
C
G
T
A
A
T
G
A
C
T

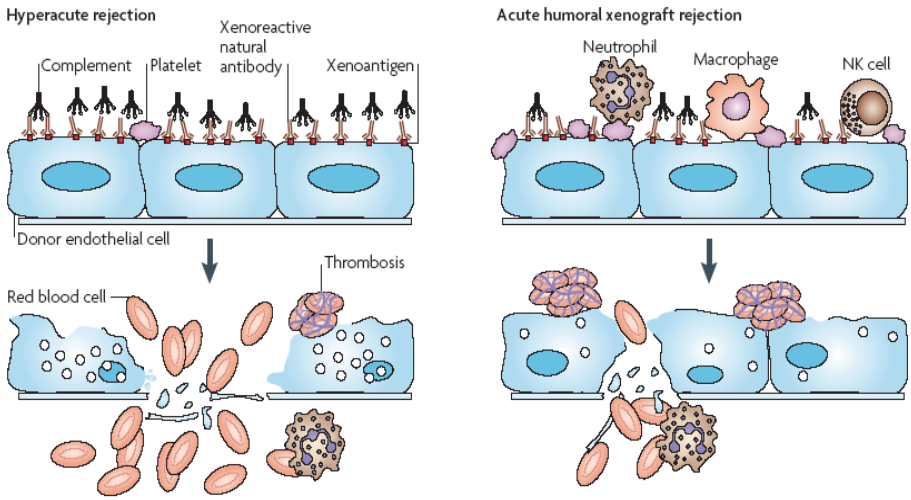

4 × PCR (+ one dideoxynucleotide)
ddTTP
ddATP
ddGTP
ddCTP
DNA sequence
5'
3'
C T G A C T T C G A


HLA - B exon 2
64
65
66
67
68
69
70



# پیوندهای زنوژن

- رد فوق حاد
  - بیان کربوهیدرات‌های سطحی متفاوت
  - حساسیت بیشتر به کمپلمان
- رد حاد عروقی
  - ترومبوز عروق و نکروز دیواره
- انتشار بیماری‌های با منشاء حیوانی در انسان




Hyperacute rejection (HAR) and Acute humoral xenograft rejection (AHXR) thrombosis and vasoconstriction