

HLA systém, jeho struktura a funkce

***HLA (Human Leukocyte Antigens) =
Hlavní histokompatibilní systém
člověka***

Historie

- 1930 – 1940- MHC geny nejdříve rozpoznány u myši na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myši
- 50. léta- charakterizováno několik geneticky podmíněných antigenů zodpovědných za rejekci alogenních tumorů i normální alogenní tkáně
- 60. – 70. léta - již známy 3 lokusy HLA-A, -B, -C, MHC geny se účastní v imunitní odpovědi
- 1972- k produkci protilátek B lymfocyty nutná T- buněčná aktivita a také účast HLA molekul
- 1974- fenomén HLA restrikce (T lymfocyty rozpoznávají cizorodý antigen pouze v komplexu s HLA molekulami I. nebo II. třídy
- 80. léta- objev antigenů lokusů HLA-DR, -DQ, -DP
- došlo k poznání hlavní funkce MHC molekul v imunitní odpovědi
- 90. léta- objev tzv. neklasických antigenů lokusů HLA-E, -F, -G, -H, -J, -K, -X

Struktura HLA systému

- Nejkomplexnější a nejpolymorfnější systém, každý člověk nese unikátní sestavu HLA alel, výjimka – monozygotní dvojčata
- lokalizace na krátkém raménku 6. chromozomu (4100 kb, více než 200 genů), geny uspořádány do 3 oblastí: **HLA I., II., III. třída**

HLA I. třída zahrnuje geny:

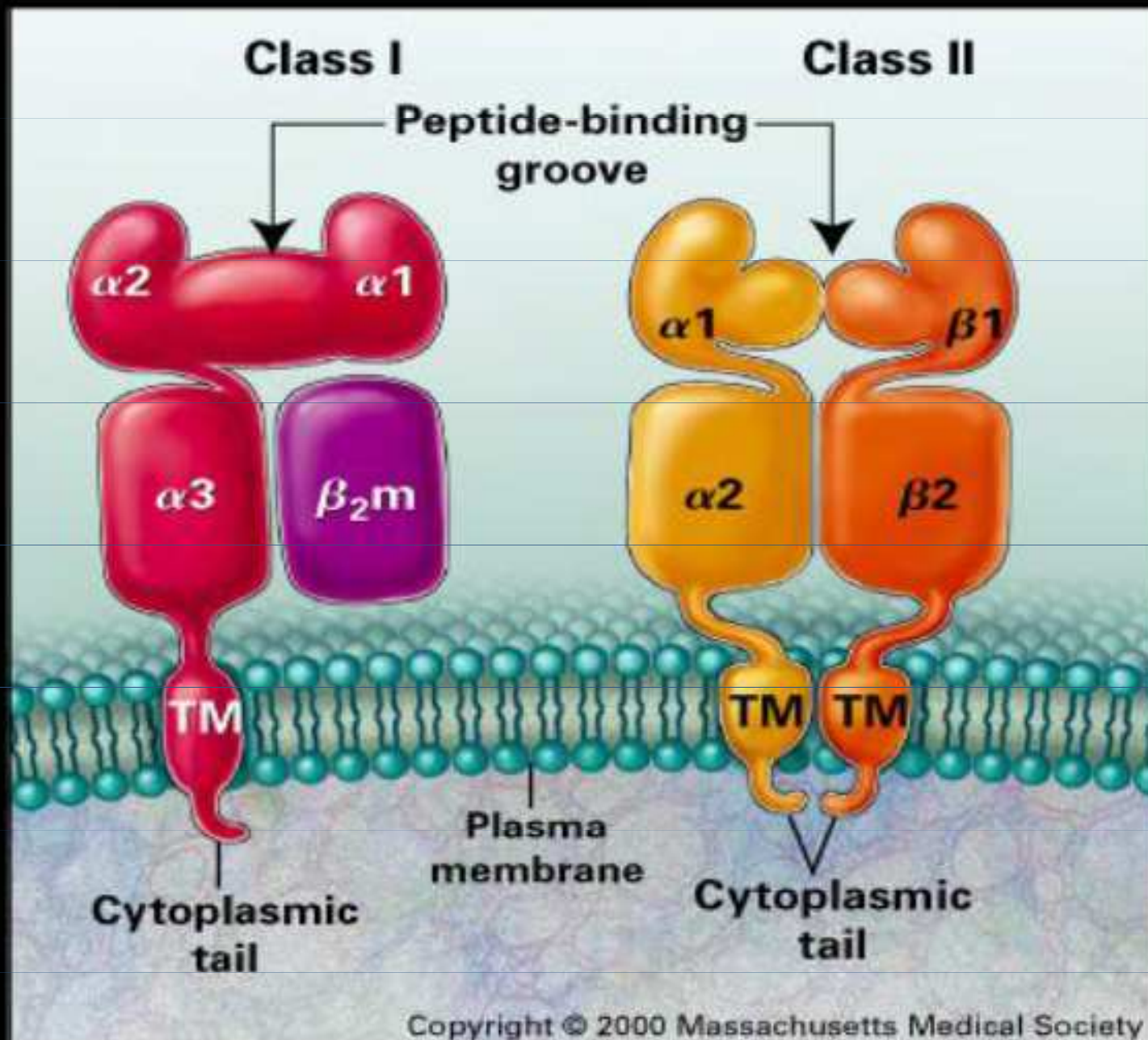
- –**A**, –**B**, –**C** pro těžký řetězec α **molekul HLA-A, -B, -C**, jejich produkty glykoproteiny jsou exprimovány na povrchu všech jaderných buněk (transplantační, klasické)
- neklasické geny **HLA-E, -F, -G** (glykoproteiny - omezený výskyt)
- geny **MICA, MICB** (MHC Class I Chain-related) - strukturou podobné HLA molekulám I. třídy, výskyt - endoteliální bb., ne na lymfocytech
- pseudogeny a geny s neznámou funkcí

HLA II. třída zahrnuje geny:

- -DRA, -DRB, -DQA, DQB, -DPA, -DPB pro $-\alpha$ a $-\beta$ řetězec HLA molekul – DR, -DQ, -DP, jejich produkty glykoproteiny jsou exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk
- geny -DM, -DO, nejsou exprimovány na buněčné membráně (endozomy, odstranění li a naložení cizorodého peptidu na HLA molekulu II. třídy)
- geny LMP2, LMP7 (**Large Multifunction Protease**), kódují proteiny, které štěpí cizorodé částice na menší peptidy
- geny TAP1, TAP2 (**Transporters Associated with antigen Processing**) zahrnuty do procesu transportu peptidů do ER a naložení peptidů na syntetizující se HLA molekulu I. třídy

HLA III. třída zahrnuje:

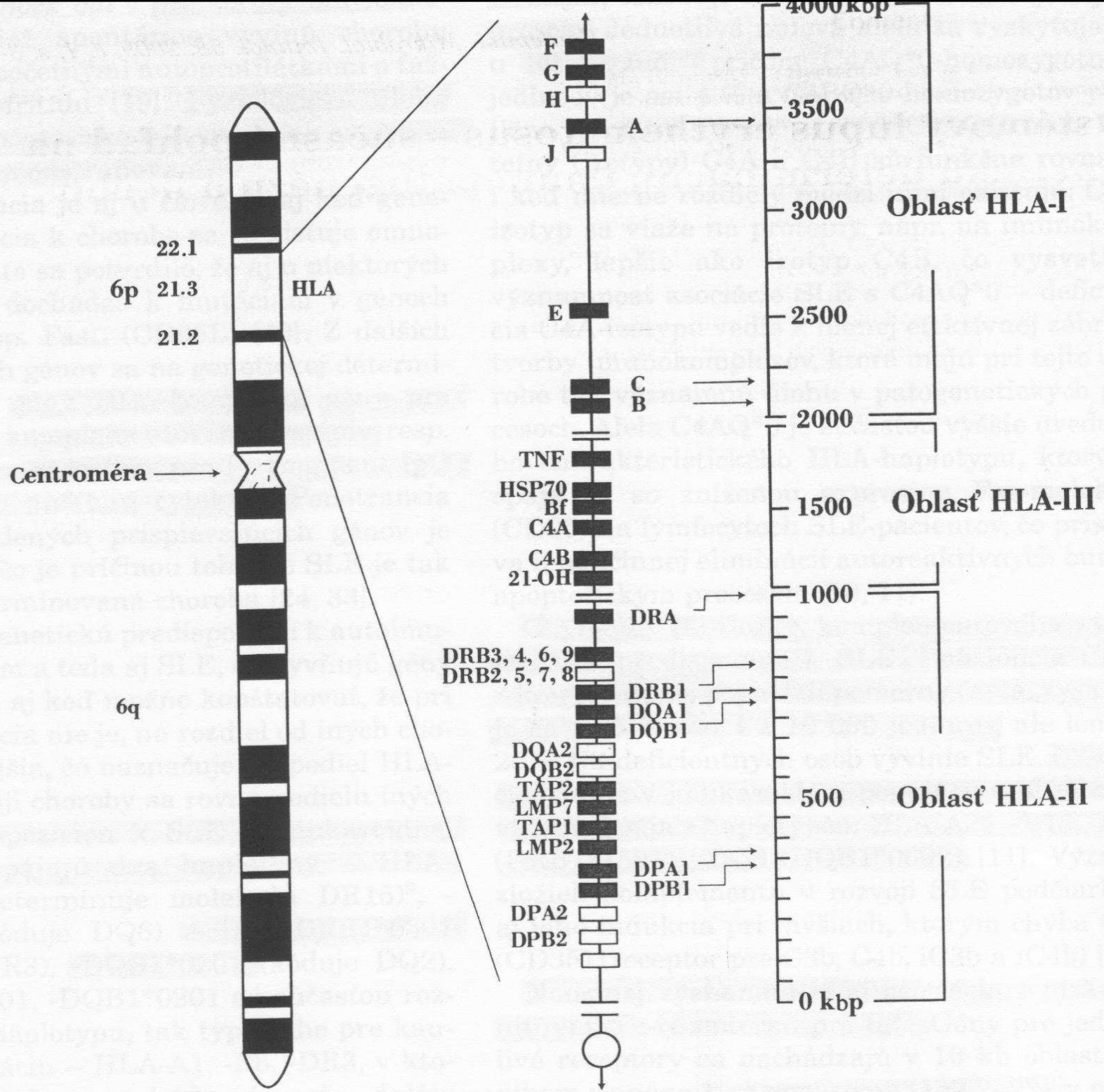
- geny kódující strukturálně a funkčně odlišné proteiny než HLA I. a II. tř.
- složky komplementu C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70



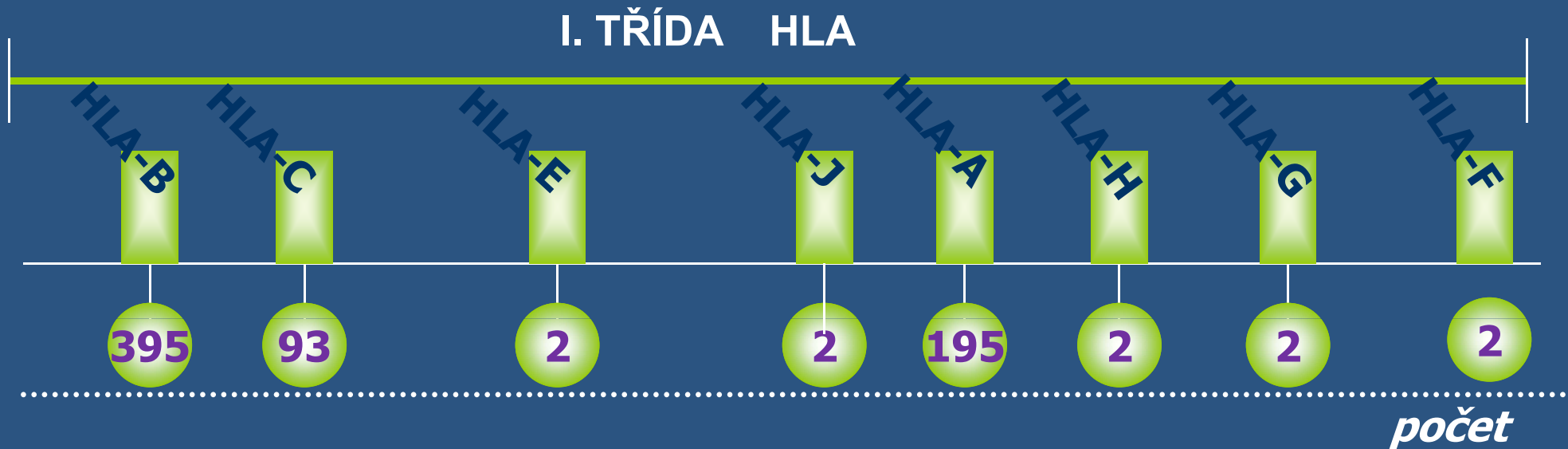
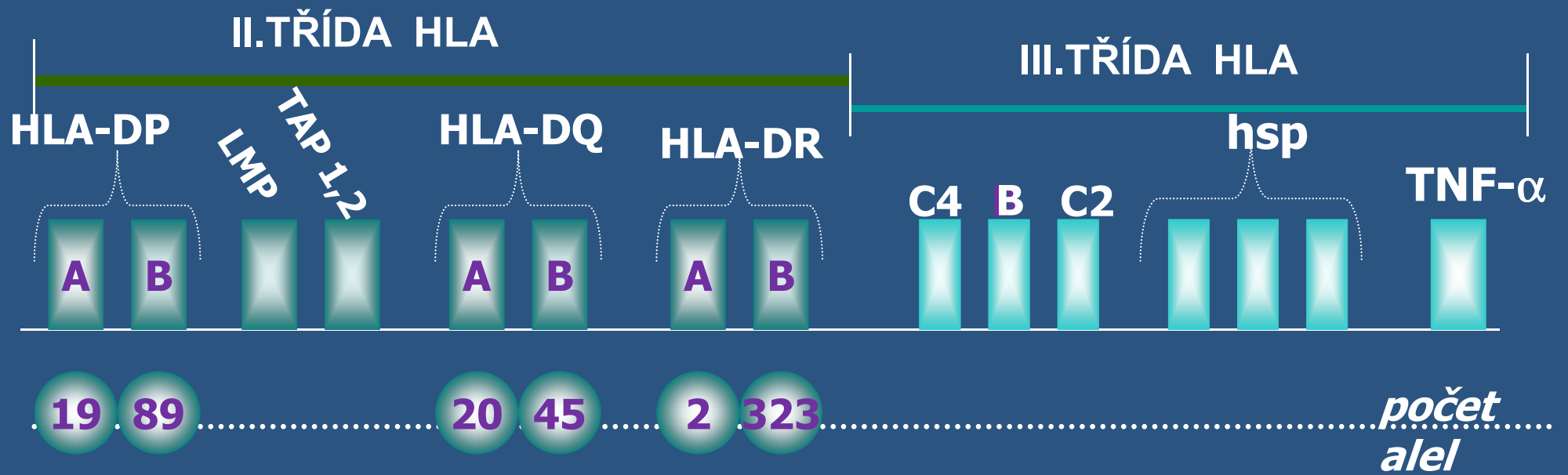
Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



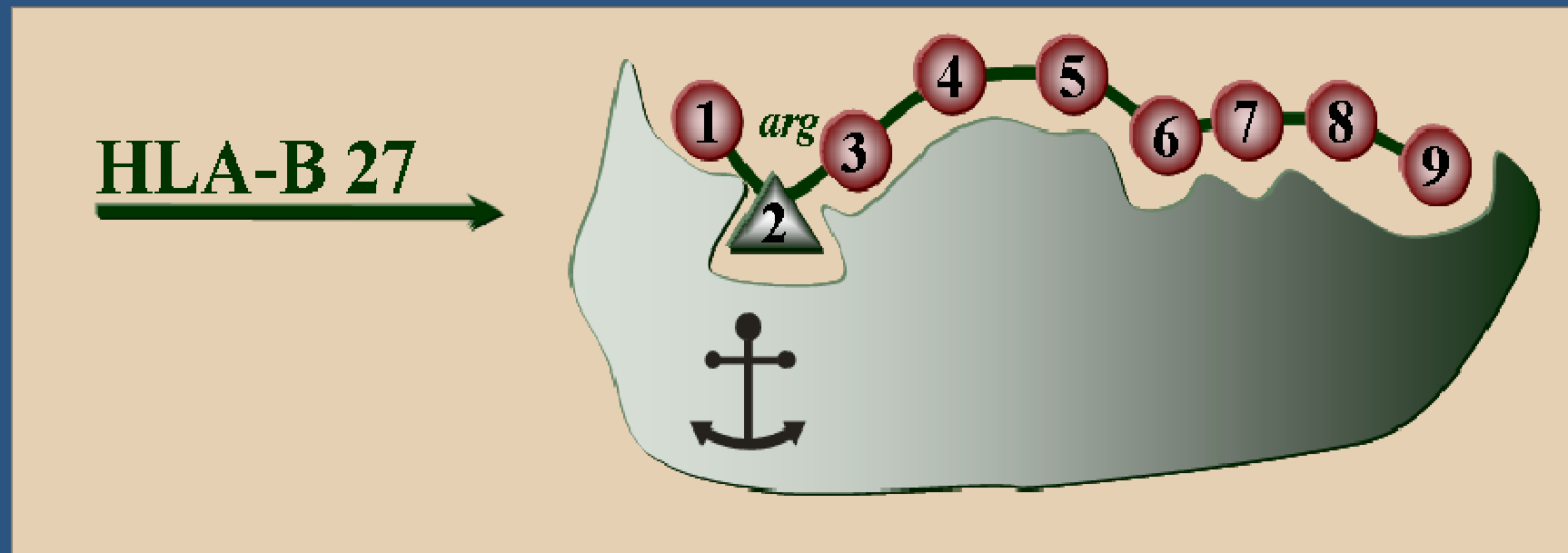
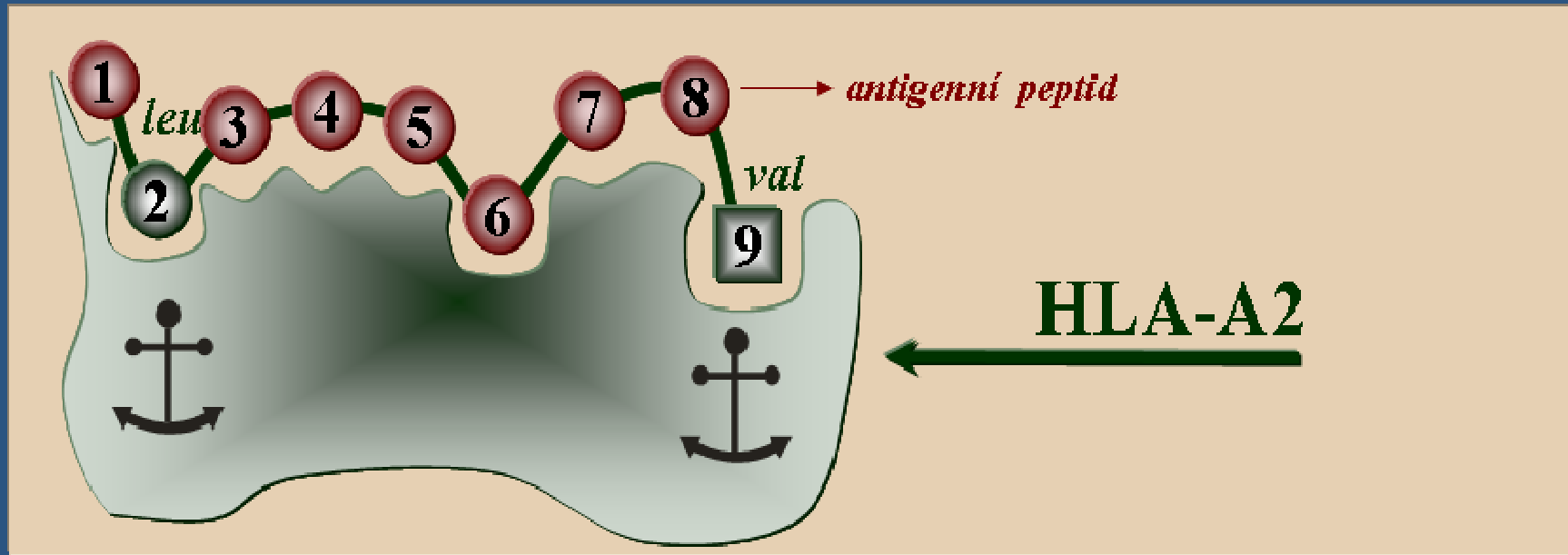
The New England Journal of Medicine



GENOVÁ ORGANIZACE HLA SYSTÉMU, POLYMORFIE



VAZBA ANTIGENNÍCH PEPTIDŮ NA MOLEKULY HLA I



Funkce HLA systému

- Hlavní fyziologickou funkcí HLA molekul je předkládat cizorodé antigeny nebo jejich fragmenty buňkám imunitního systému, především T lymfocytům
- Tato prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy - primární role imunitního systému je rozpoznat a eliminovat nebezpečné cizí agens, tzn., že imunitní systém musí rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny.
- HLA restrikce - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají komplex sestávající se z cizího antigenního peptidu vázaného v peptidovém žlábků HLA molekuly.
- 2 způsoby prezentace cizorodých antigenů T lymfocytům:
 - endogenní (HLA I. tř.)
 - exogenní (HLA II. tř.)

PŮVOD PEPTIDŮ

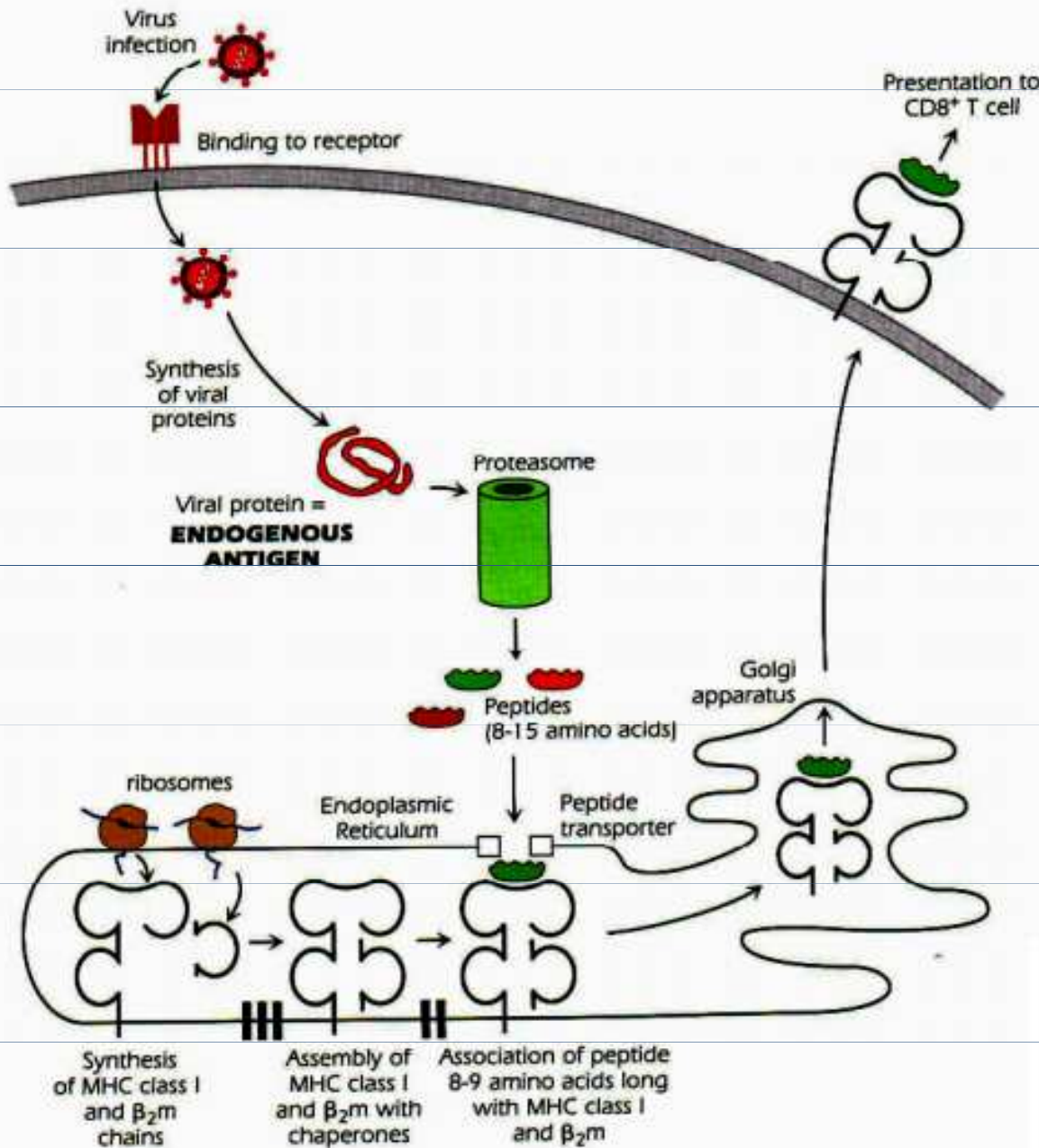
Odkud pocházejí cizorodé antigeny rozpoznávané T lymfocyty:

- replikace v cytosolu buňky (viry, některé bakterie)
- Ciz. proteiny produkované buňkou - **endogenní zdroj**
- ciz. peptid + HLA I + CD8+ (Tc lymfocyty) - zabití napadených buněk

- proteiny buňkou pohlčené - **exogenní zdroj** (bakterie, paraziti)
- vesikulární systém buňky (transportní váček)
- ciz. peptid + HLA II + CD4+ (Th lymfocyty)
- aktivace zánětlivé a protilátkové odpovědi
- CD4+ Th1 - zánětlivé - aktivace makrofágů k zabití patogenu
- CD4+ Th2 - protilátková odpověď, aktivace B buněk k produkci protilátek



Peptidy prezentované HLA I



1. Syntéza virových proteinů na ribosomech
2. Ubiquitin – označení proteinu
3. Proteasom – rozštěpení
4. TAP1/TAP2 – transport peptidů do endoplasmatického retikula
5. Naložení na molekulu HLA I a transport na povrch buňky

Zpracování exogenních cizorodých molekul a jejich prezentace HLA II

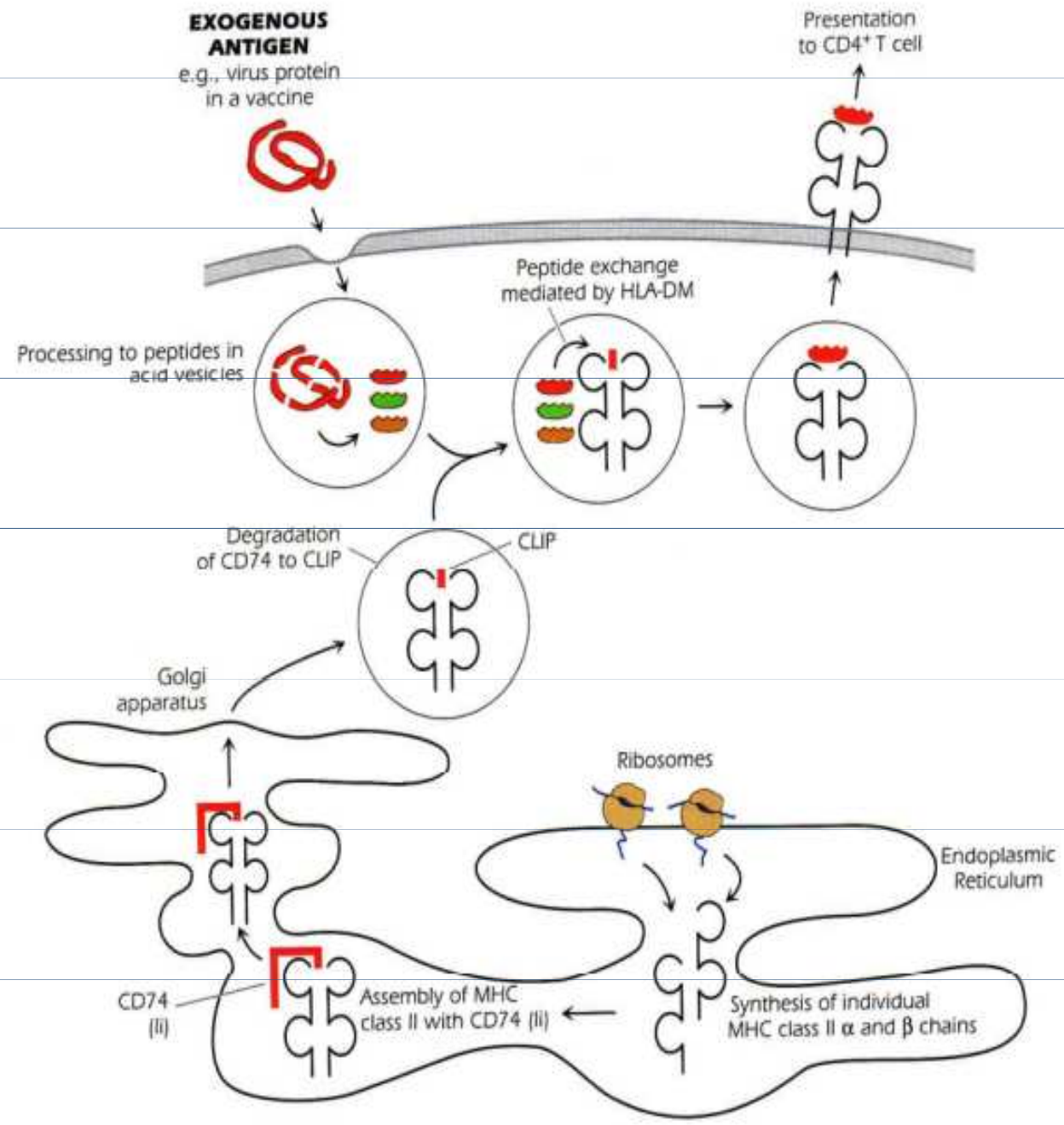
EXOGENNÍ ANTIGEN

Vesikuly s kyselým prostředím
ENDOSOMY
LYSOSOMY

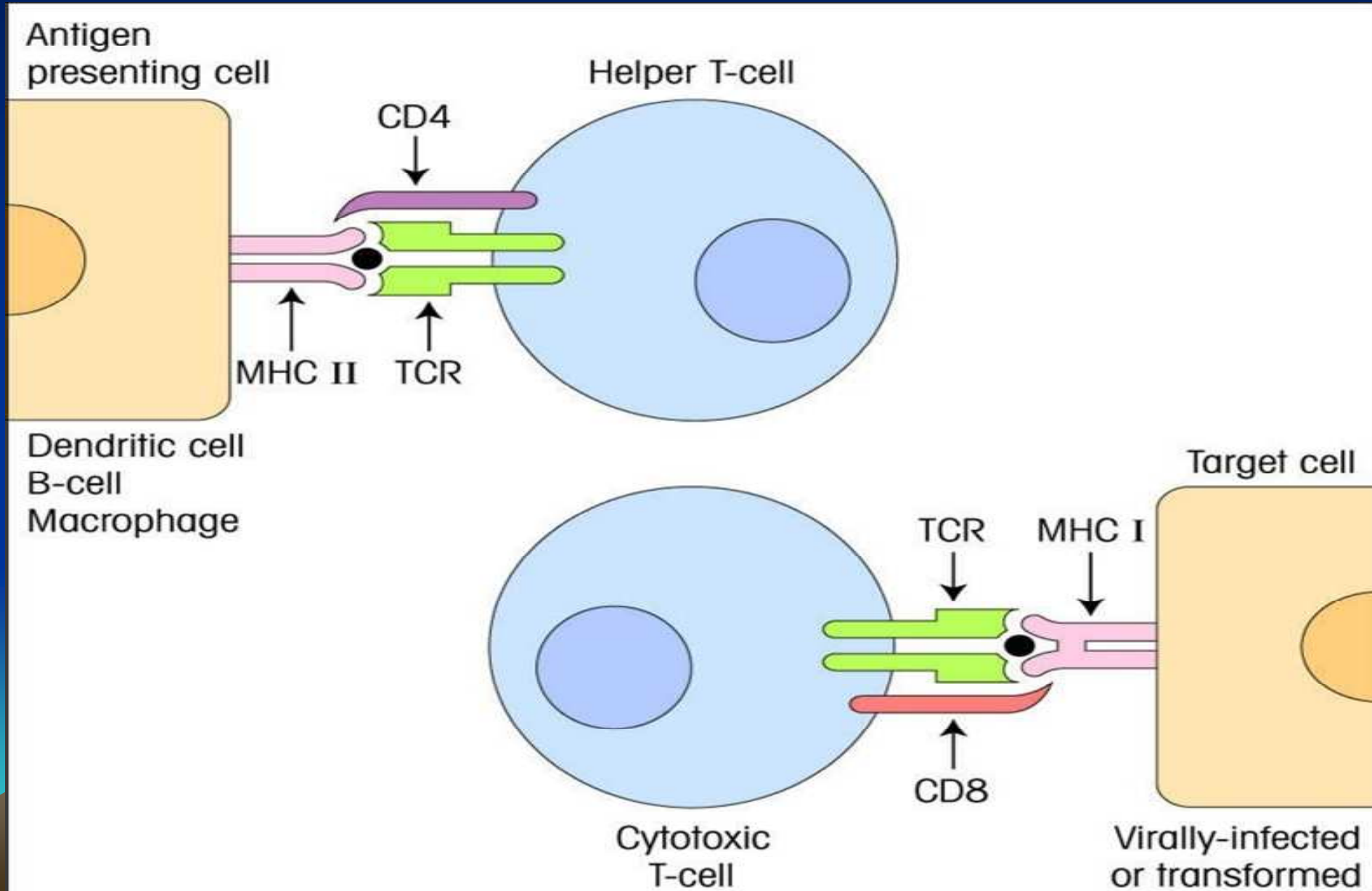
Proteolytické štěpení
(katepsiny, endopeptidáza)

MHC II

ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM
 α a β řetězec MHC II + invarianční řetězec (Ii, CD74) (zabraňuje obsazení vazebných míst vlastními peptidy) \Rightarrow CLIP (CLass II associated Invariant Chain Peptide) \Rightarrow HLA-DM \Rightarrow odstranění Ii a záměna za antigenní fragment



Rozpoznání antigenu – HLA restrikce



ochrana fetálního allograftu

Plod v těle matky je vlastně cizí štěp, polovina genetické výbavy pochází od otce.

Klasické HLA produkty I. třídy –A, -B, nejsou exprimovány na buňkách trofoblastu → T lymfocyty jsou k plodu ignorantní. Naopak na trofoblastu jsou syntetizovány molekuly HLA-G, (-E) → NK inhibice.

Závěr: Neklasické HLA-G, (-E) molekuly hrají speciální biologickou roli = ochrana vyvíjejícího se fetu před mateřskými T a NK buňkami, hrají roli při potlačení imunitní odpovědi matky proti plodu

HLA molekuly jsou ligandy pro receptory NK buněk

HLA molekuly aktivují nebo blokují aktivitu NK buněk přes **aktivační a inhibiční receptory** (KIR-killer immunoglobuline-like receptor)

NK buňky rozeznávají také neklasické HLA-E a –G molekuly

úloha HLA molekul v transplantologii

HLA molekuly jsou silné aloantigeny indukující rejekci štěpu

Trophoblast

Fetal Side

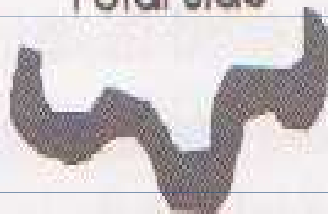


A. Normal HLA Tissue Distribution



T Cell
Activation

Fetal Side



B. No HLA Class I Molecules



NK Cell
Activation

Fetal Side



C. Specialized HLA Class I (HLA-E, -G)



No T or NK Cell
Activation

Exprese a distribuce HLA molekul

- produkty genů HLA I. tř. - nalezeny na všech jaderných buňkách
- HLA geny exprimovány kodominantně – oba geny (alely) každého HLA lokusu se vyjádří syntézou polypeptidového řetězce HLA produktu)
- na mladých červených krvinkách – atypický antigenní systém Bga, Bgb, Bgc (reziduální HLA antigeny)
- plazma – solubilní HLA antigeny
- produkty genů HLA II. tř. – omezená distribuce: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, Langherhansovy buňky kůže, některé endoteliální buňky
- exprese HLA antigenů I. a II. třídy může být zvýšena během zánětu, ale také může být indukována na určitých buňkách, na kterých se normálně neexprimují (myocyty, hepatocyty).

| typ buňky, tkáň | exprese | |
|---------------------------------|---------|--------|
| | HLA I | HLA II |
| BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU | | |
| dendritické buňky | +++ | + |
| makrofágy | +++ | ++ |
| T lymfocyty | +++ | + |
| B lymfocyty | +++ | +++ |
| JINÉ JADERNÉ BUŇKY | | |
| neutrofilní granulocyty | +++ | - |
| eosinofilní granulocyty | +++ | - |
| epitelové buňky | +++ | - |
| hepatocyty | + | - |
| nervové buňky | + | - |
| buňky ledvin | + | - |
| NEJADERNÉ BUŇKY | | |
| trombocyty | ++ | - |
| erytrocyty | - | - |

Tab.1.: Odlišnosti v expresi molekul HLA I. a II. třídy na různých buněčných typech
(J. Krejsek a O. Kopecký, Klinická imunologie, str. 125, 2004)

Srovnání vlastností a funkce HLA I a HLA II

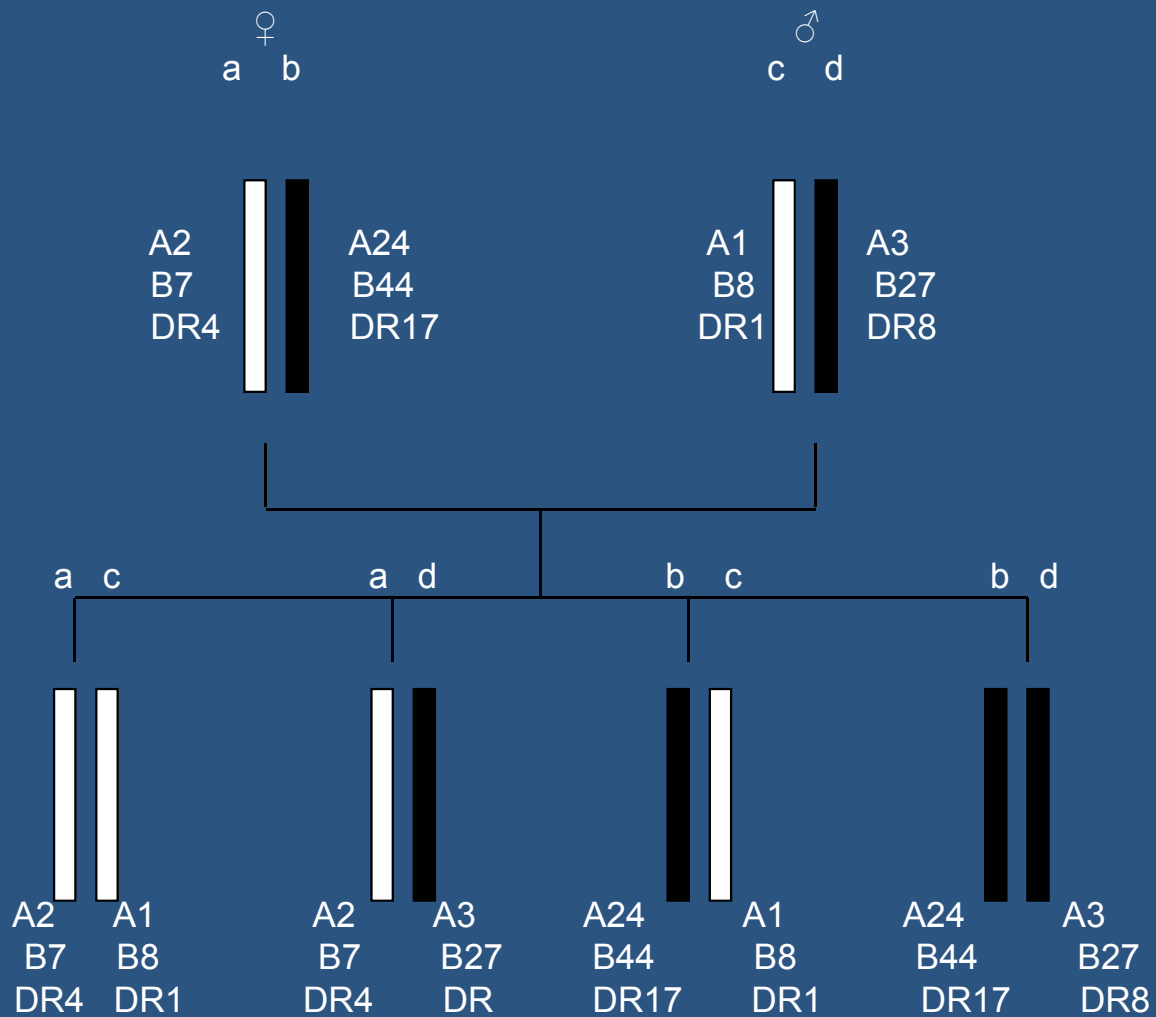
| Charakteristika | HLA I | HLA II |
|------------------------|--|--|
| Struktura | α řetězec + $\beta 2m$ | α a β řetězce |
| Domény | $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$ + $\beta 2m$ | $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\beta 1$, $\beta 2$ |
| Buněčná exprese | téměř všechny jad.buňky | APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy) |
| Peptidy vázající místo | uzavřené, váže 8-9 amk tvořené doménami $\alpha 1$ a $\alpha 2$ | otevřené, váže 12-17amk tvořené doménami $\alpha 1$ a $\beta 1$ |
| Peptidy | endogenní antigeny | exogenní antigeny |
| Peptidy prezentované | CD8+T buňkám | CD4+T buňkám |

Dědičnost HLA systému

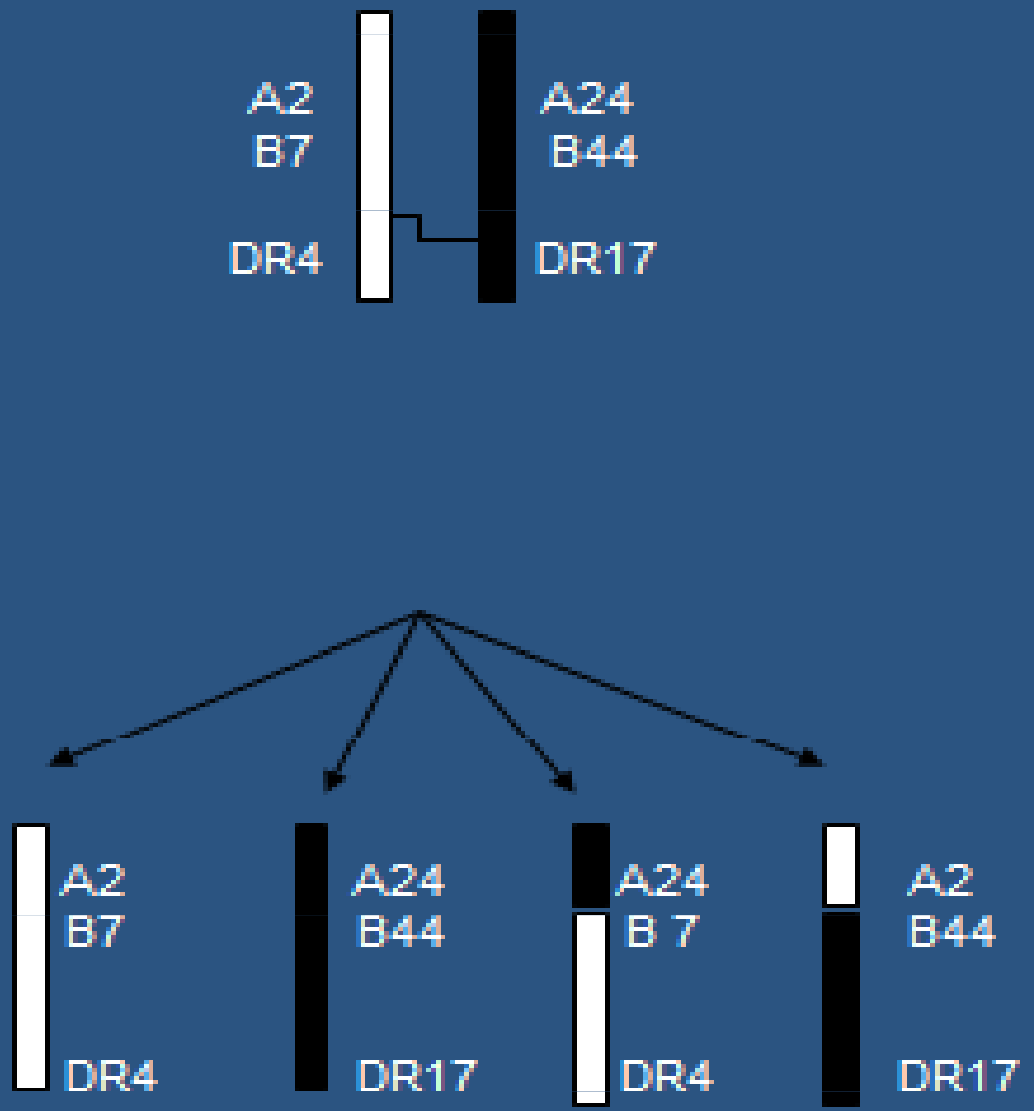
- geny vázané X geny volně kombinovatelné
- HLA geny jsou vázané → děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotyp
- někdy rekombinace (crossing-over během meiotického dělení) v HLA oblasti → výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → vznikají rekombinantní sestavy alel
- frekvence rekombinace je závislá na vzdálenosti mezi geny
- vazebná nerovnováha (linkage disequilibrium)
 - běžná v HLA systému
 - určité kombinace alel se vyskytují častěji, než by se očekávalo na základě jejich genové frekvence

Např. **HLA- A1 a HLA-B8** s genovými frekvencemi **0,16 a 0,1** v populaci. Očekávaná frekvence výskytu haplotypu **HLA –A1, B8** v populaci by měla být **$0,16 \times 0,1 \times 100\% = 1,6\%$** . V některých kavkazských populacích frekvence tohoto haplotypu zdaleka přesahuje očekávanou frekvenci (**8%**).

Evoluční základ vazebné nerovnováhy je spekulativní, určité kombinace HLA alel asi poskytují v některých populacích určitou selekční výhodu



Obr.4: Dědičnost HLA haplotypů



Obr.5: Vznik nerekombinantních a rekombinantních HLA haplotypů

HLA a choroby

- 1967 – první zprávy o asociaci HLA systému s onemocněním u člověka
- 1973 – objevena asociace HLA-B27 s ankylozující spondylitidou (m. Bechtěrev)
- následně byly studovány stovky onemocnění pro možnou asociaci onemocnění s HLA systémem, u více než 50ti onemocnění byla prokázána statisticky významná asociace

Rysy HLA asociovaných chorob

- choroby asociované s HLA antigeny jsou většinou nemaligní chronická onemocnění
- převážně autoimunitní onemocnění
- většina chorob je multifaktoriálních (geny+ environmentální složka)
- Spouštěčem onemocnění často environmentálním faktory (např. mikroorganismy, stres, ...)

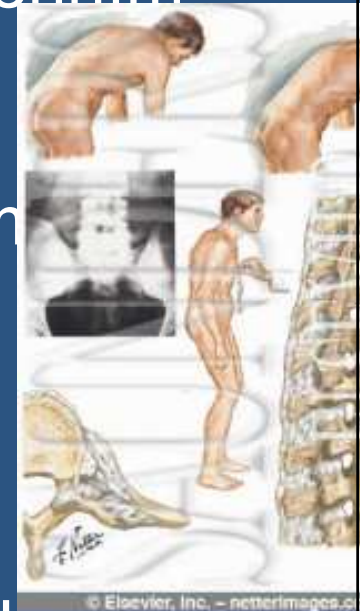
Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

| | | |
|--------------------------|--|------------|
| Birdshot retinopathy | -A29 | RR=200 |
| Ankylosing spondylitis | -B27 | 81,8 |
| Narcolepsy | -DQB1*06:02 | 100 |
| Psoriasis vulgaris | -B13, Cw6 | 4,5 7,2 |
| Celiac disease | - DQB1*02, *03:02 - DQA1*03:01, *05 | 13,3 |
| Type I diabetes mellitus | - DQB1*02, *03:02 - DQA1*03:01, *05 | 10 |
| Rheumatoid arthritis | - DR4 | 4 |

ANKYLOSING SPONDYLITIS (AS, M. BECHTĚREV)

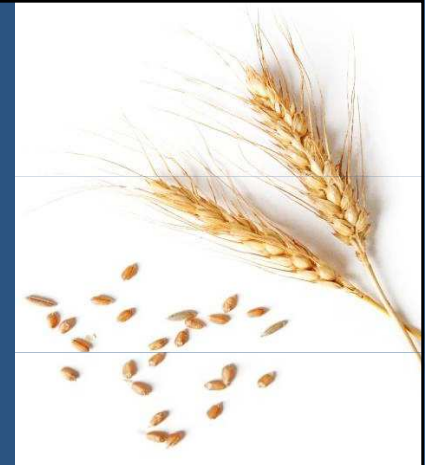
asociována s HLA-B27

- zánětlivá forma artritidy, postižení ve větší míře mladí muži
- zánět napadá kloubní spojení mezi pánví a páteří , nemoc se může postupně šířit nahoru a dolů ke kyčelním a kolenním kloubům.
- různý průběh onemocnění, může končit velmi vážnými deformitami
- průběh onemocnění dlouhodobý
- ostatní choroby asociované s HLA-B27 – Reiterova choroba (revmatické onem., často vyvolávají chlamydie, trojice obtíží: neinf.zánět kloubů, moč.trubice a spojivek)
 - Anterior uveitis (přední uveitida-zánět duhovky, řasnatého tělíska)



CELIAC DISEASE

- DRB1*03- DQA1*05:01- DQB1*02:01
-DRB1*07- DQA1*02:01- DQB1*02:02
-DRB1*04 -DQA1*03:01-DQB1*03:02



- geneticky podmíněné autoimunitní onemocnění
- intolerance na gluten (lepek), trávicí soustava pacienta není schopna trávit potraviny obsahující lepek
- chronický zánět sliznice tenkého střeva
- prevalence v ČR – 1 : 200-250
- pro vývoj onemocnění nutné 3 podmínky:
 1. genetické předpoklady
 2. konzumace stravy obsahující lepek
 3. spouštěč onemocnění (stres, trauma, virová infekce)
- dlouhodobé průjemy, únava, bolesti kostí, břicha, svalů, u dětí také problémy se zuby, růstem a vývojem
- jediná známá léčba – celoživotní dodržování bezlepkové diety

HLA nomenklatura

1. Sérologická definice HLA antigenů

- **antigeny základní** – např. A9, A10, B51, B40, Cw3, DR2, DQ3....
- **antigeny splitové** (subtypy) - sdílejí společné sérologicky definované epitopy

např. A10 → A25, 26, 34

B40 → B60, 61

Cw3 → Cw9, 10

DR2 → DR15, 16

DQ3 → DQ7, 8, 9

- **antigeny obecné** – DR51, DR52, DR53
- maximálně 2 číslicové znaky

V r. 1987 – 10th International Histocompatibility Workshop, přijata nomenklatura založená na následujících principech:

- **HLA** = Hlavní histokompatibilní komplex člověka
- **A, B, C, DR, DQ, DP**.....lokusy
- **číslo (A1, Cw3)** = označení specifity molekuly (antigenu)

2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

- molekulárně-genetická nomenklatura používá znaky dvou a vícemístné př. HLA-A*02, *31, B*08, *44, C*02, *12, DRB1*04, *13, DQB1*07, *08
- úroveň „**low resolution**“

HLA-A*01:01, *02:02, B*07:01, *35:01, C*02:02, *03:03, DRB1*04:01, *13:05, DQB1*03:04, *03:05

- úroveň „**high resolution**“

- Někdy více jak 4 znaky:

C*02:02:01, *02:02:02.....alely se liší v tiché nukleotidové substituci na úrovni DNA, ale ne v aminokyselinové sekvenci na úrovni polypeptidu (tichá mutace)

A*24:02:01:01 7. a 8. pozice – polymorfismus v nekódující oblasti

A*24:02:01:02L „ low expressed“ allele

B*51:11N „ null“ allele

- Duben 2010 – nová nomenklatura, k oddělování jednotlivých dvojčíslí v označení alel se budou používat dvojtečky.

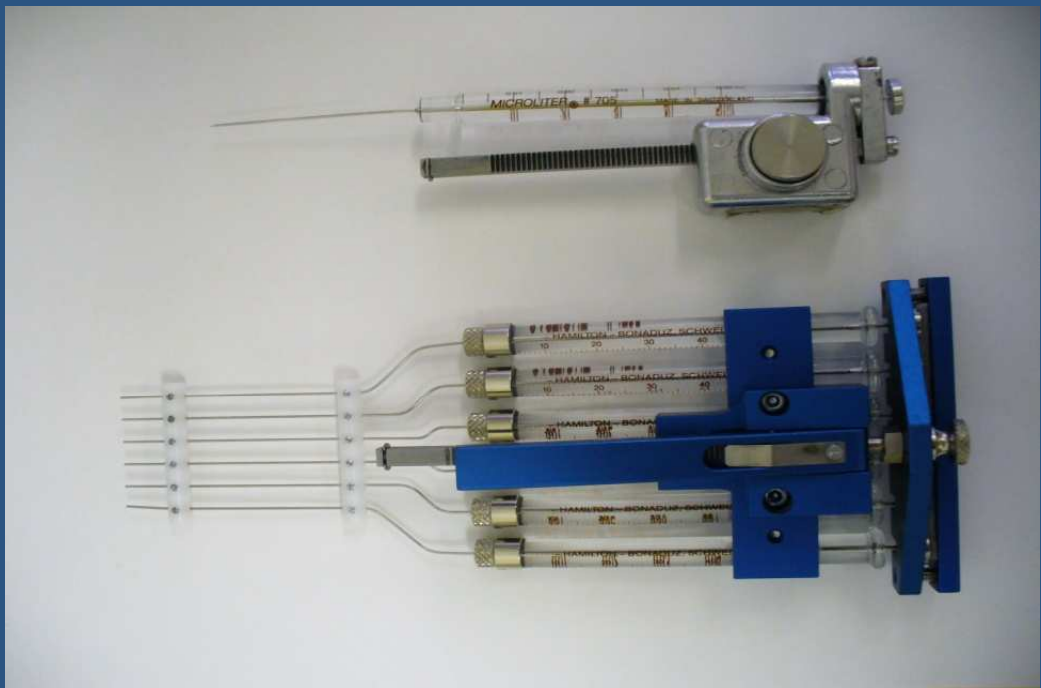
Např.: B*0808N→B*08:08N

A*9201→A*02:101

Lymfocytotoxický test - sérologická HLA typizace

- Izolace lymfocytů (krev, uzlina, slezina)
- Terasakiho desky s předkapanými anti-HLA séry (inkubace 30 minut)
- Přidání králičího komplementu (inkubace 60 minut)
- Barvení (trypanová modř, eozin)
- Mikroskopický odečet reakcí
- Hodnocení 0, 2, 4, 6, 8





Molekulárně-genetické metody HLA typizace

- PCR – SSP (sequence – specific priming)
- PCR – SSOP (sequence – specific oligonukleotide probes)
- SBT (sequence based typing)
- Real –Time PCR
- Micročipy
- NGS (next generation sequencing)

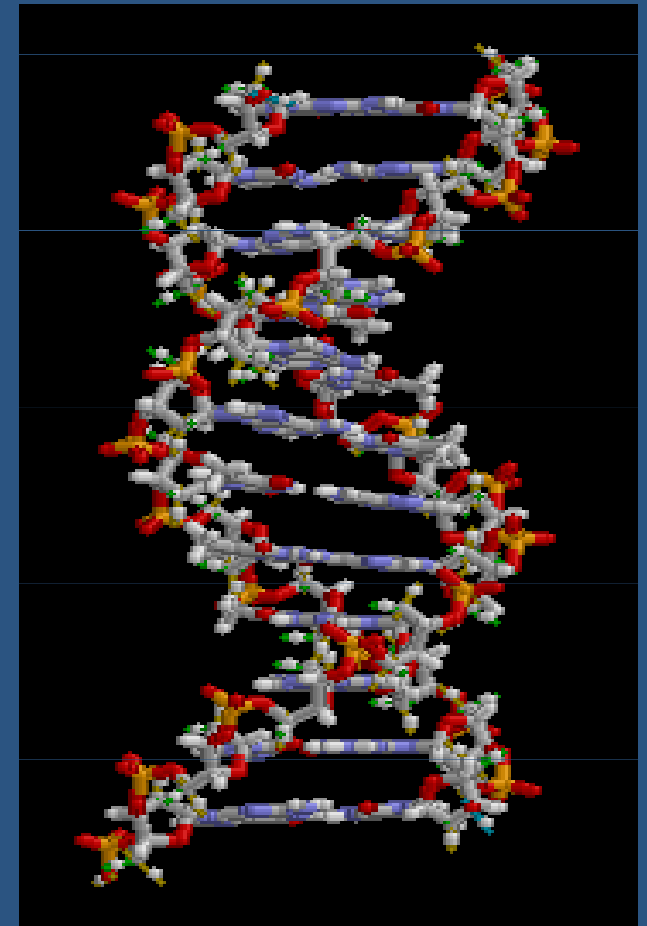
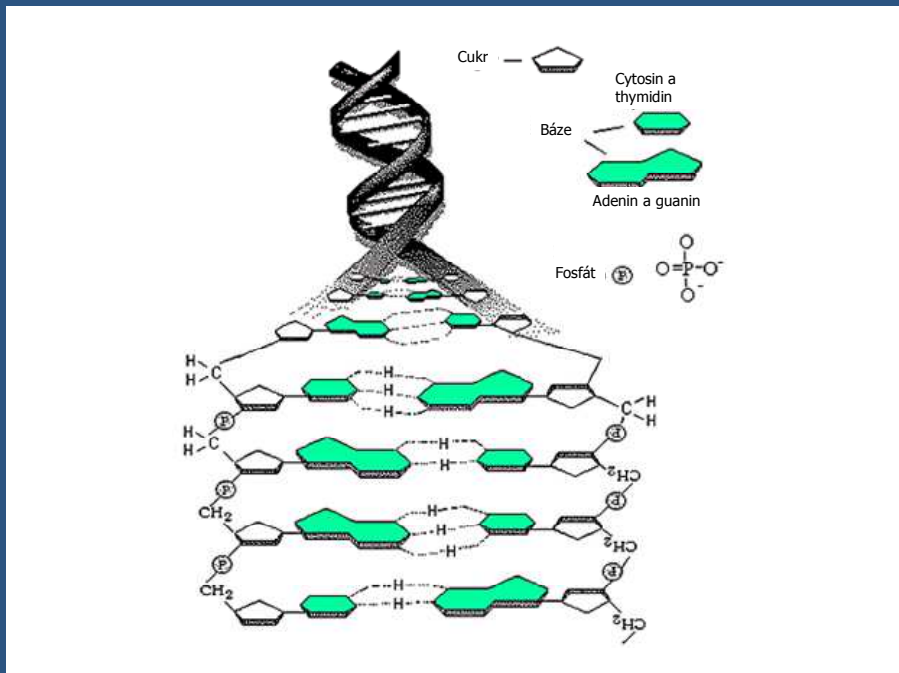
Molekulárně-genetické metody

PCR – enzymatická metoda in vitro, která slouží k namnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA vymezeného párem specifických primerů.

3 kroky – **izolace DNA** (plná krev, bukáni stěry, krevní skvrny, vlasové folikuly, parafínové tkáňové bloky)

- **amplifikace DNA (PCR)** - počet kopií DNA - 2^n
n = počet cyklů (30 – 35)

- **detekce PCR produktu**



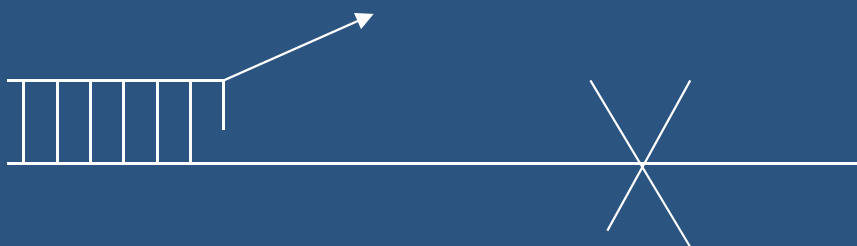
1. PCR – SSP (sekvenčně specifické primery)

- tolik primerových párů, aby mohly být amplifikovány a detekovány všechny známé alely daného lokusu
- každý pár primerů určuje jednu alelu nebo skupinu alel, rozlišení během PCR
- HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- v každé zkumavce tzv. interní kontrola amplifikace
- kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- detekce specifických PCR produktů elektroforeticky – rozdílná pohyblivost PCR produktů dle molekulové hmotnosti
- vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- fotodokumentace

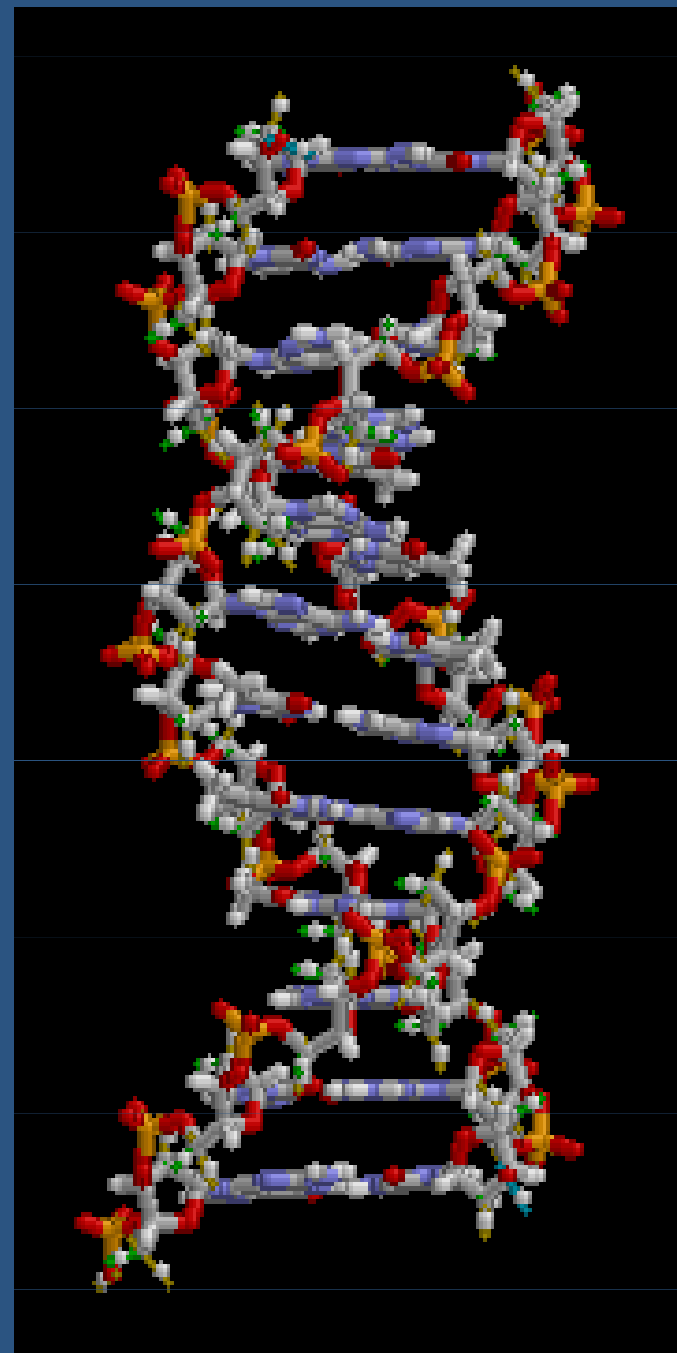
Princip SSP-PCR

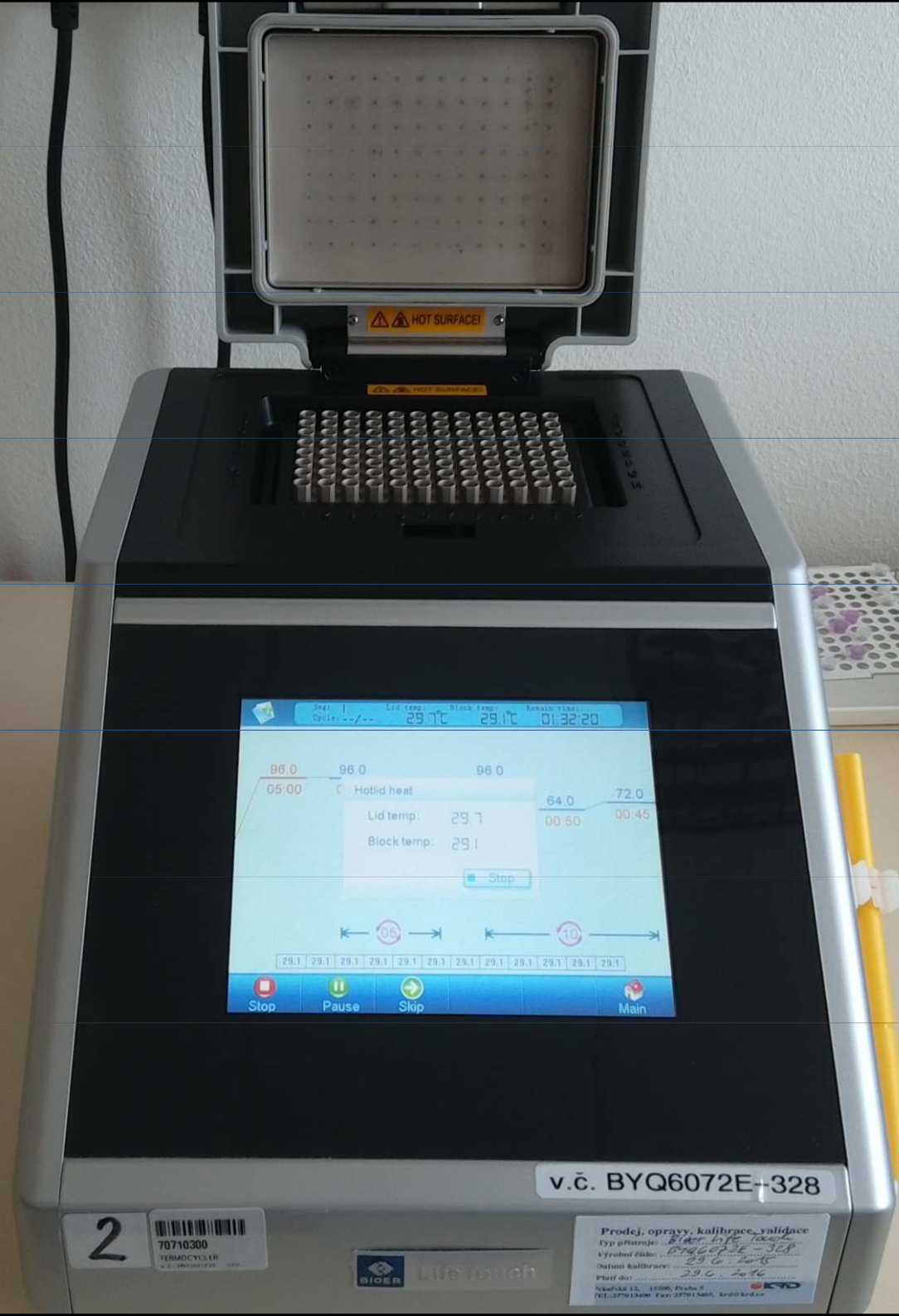


úplná shoda – amplifikace proběhne



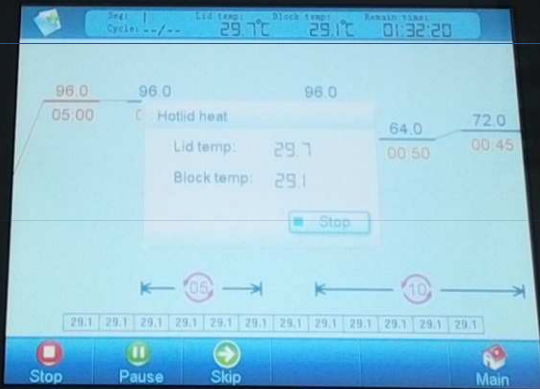
neshoda – amplifikace neproběhne





HOT SURFACE!

HOT SURFACE!



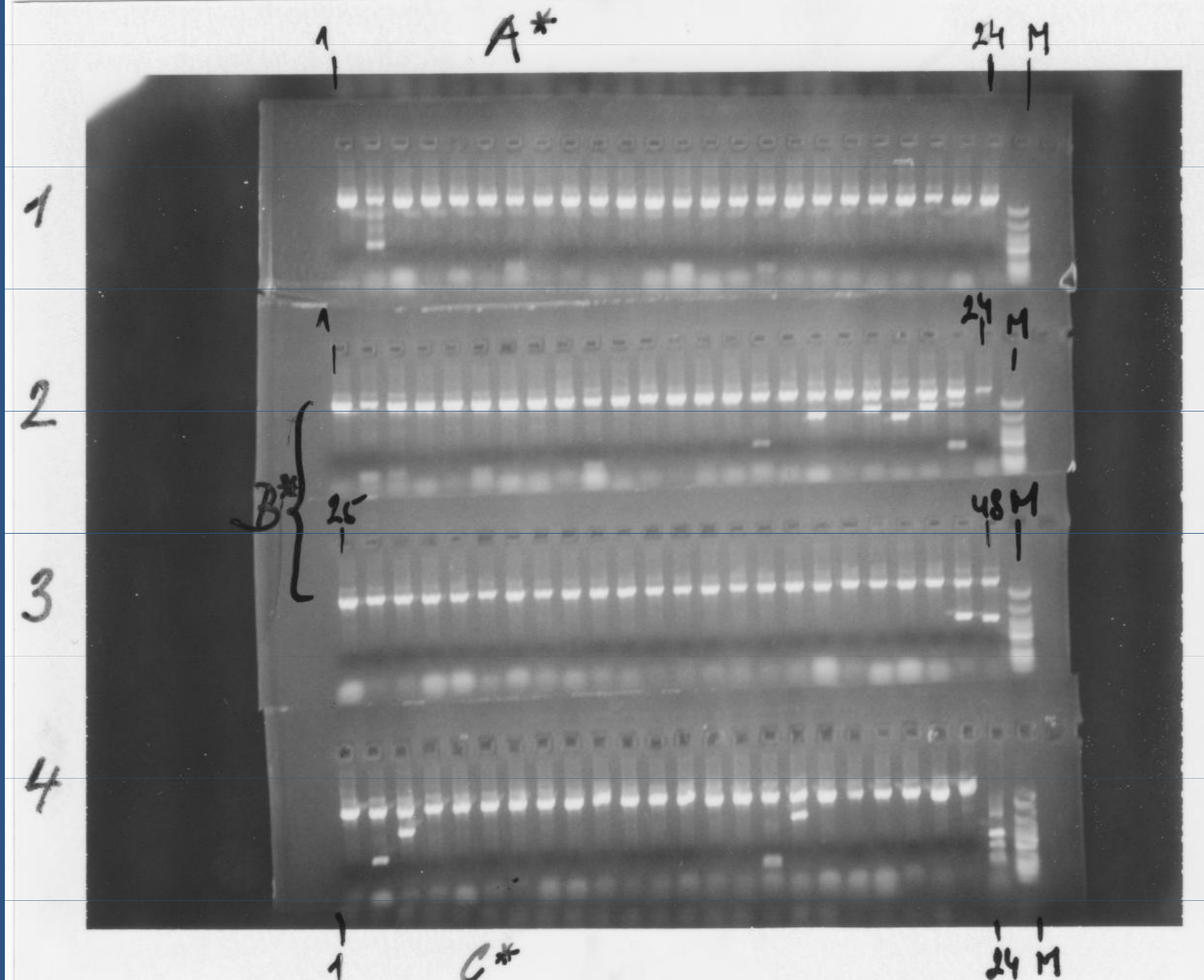
v.č. BYQ6072E+328

2

70710300
THERMOCYCLER
v.č. 200807221 1000

BIOER LifeTouch

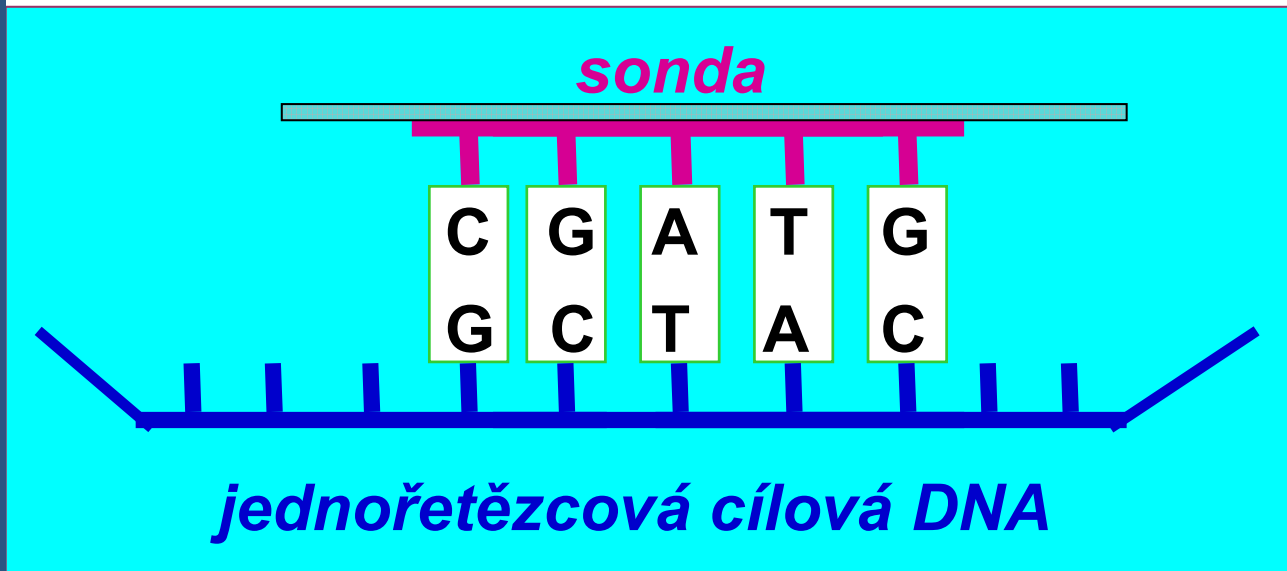
Prodej, opravy, kalibrace, validace
Typ přístroje: *BIOER LIFE TOUCH*
Výrobní číslo: *BYQ6072E-328*
Datum kalibrace: *29.6.2016*
Pracovní doba: *29.6.2016*
Kč: *29.6.2016*
Kč: *29.6.2016*
TEL: 277013400 Fax: 277013405 kr@bioer.cz



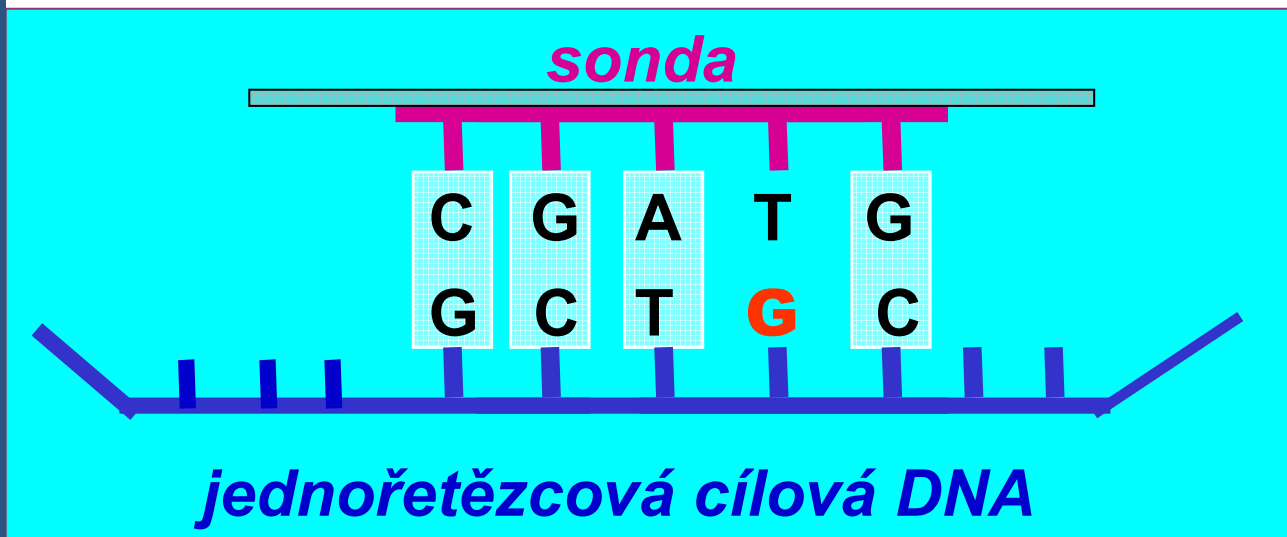
2. PCR – SSO (sekvenčně specifické oligonukleotidy)

- využití lokus – specifických primerů (značené biotinem)
- amplifikuje se celá oblast kódovaná jedním lokusem (exon 2,3)
- specifické alely nebo skupiny alel jsou následně určeny reverzní hybridizací s oligonukleotidovými próbami (sondami)
- denaturace amplifikované DNA
- DNA próby (sondy) imobilizovány (nitrocelulózovém stripu, mikropartikule)
- reverzní hybridizace denaturované DNA s DNA próbou
- vymytí nespecificky navázané DNA
- konjugát (streptavidin + alkalická fosfatáza), vytvoření barevného precipitátu na stripech - systém INNO Lipa
- Konjugát – streptavidin + PE - Luminex, snímání fluorescence laserem
- Vyhodnocení pomocí softwaru

hybridizační reakce



perfektní shoda
HYBRIDIZACE



1 neshoda
ŽÁDNÁ
HYBRIDIZACE

Chromogen
(NBT/BCIP)

Hnědý precipitát



Alkalická fosfatáza

Streptavidin

Biotin

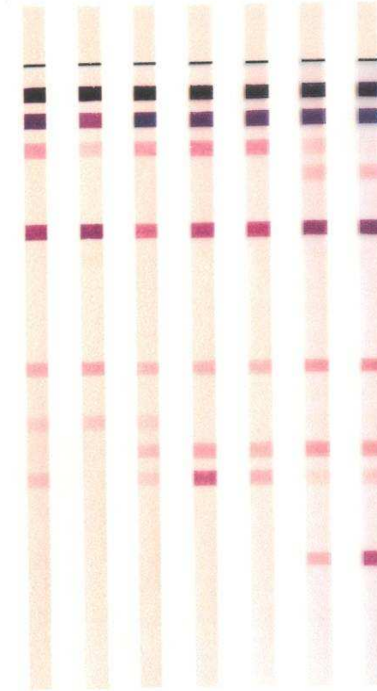
5'

Amplifikovaná cílová
sekvence

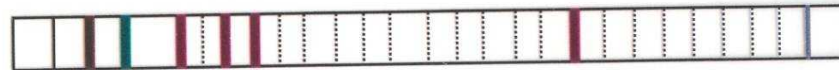
DNA sonda

3'

Nitrocelulozový proužek



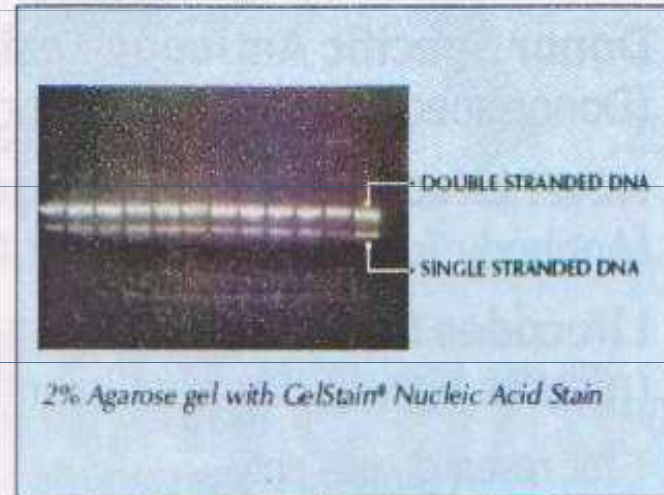
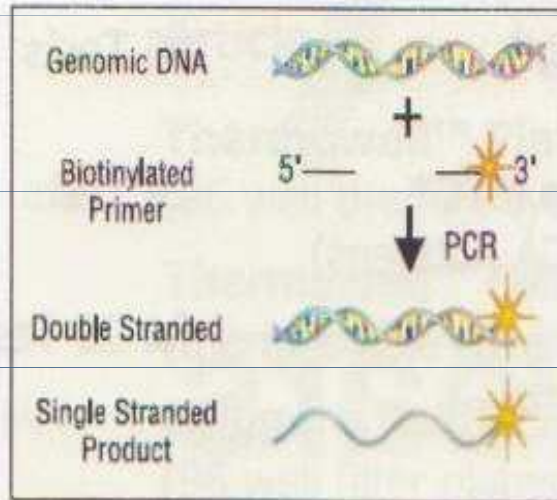
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



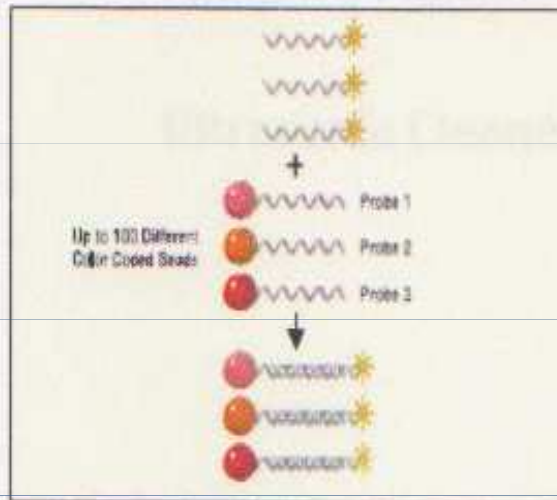
DQB typizace: DQB1*0302 x DQB1*0401

PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



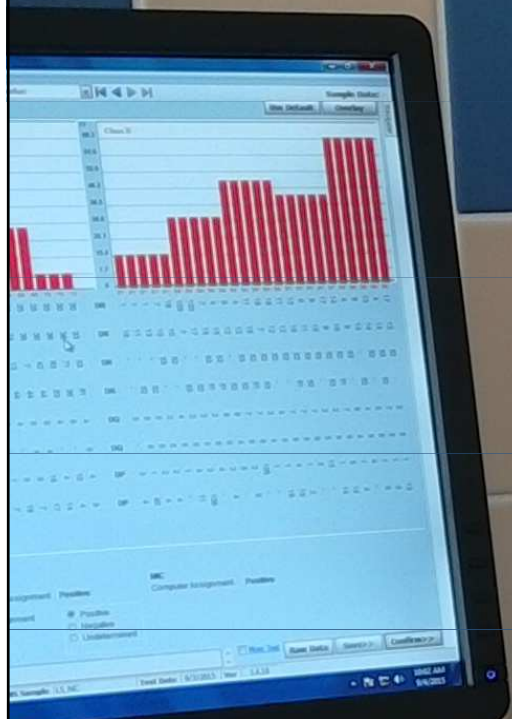
2. Hybridize with beads



3. Label with SA-PE



4. Analyze in the fluoroanalyzer



Imunologie leukocytů a trombocytů Transplantologie

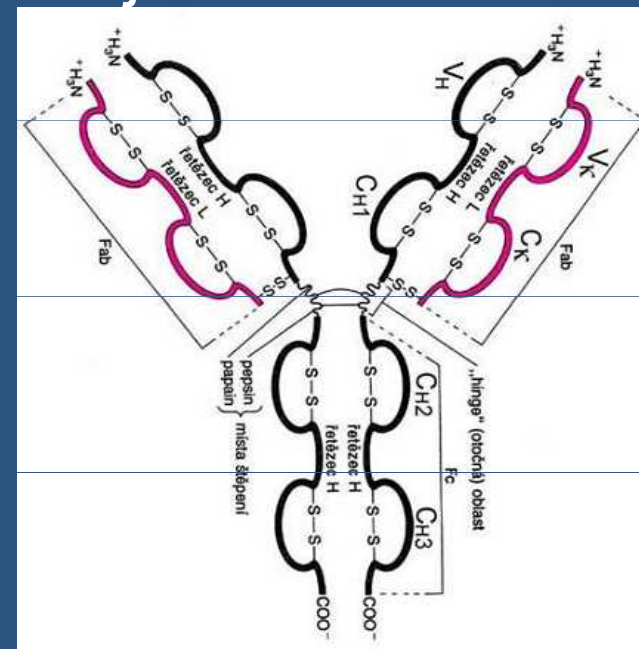
- Všechny buňky lidského těla nesou na svých membránách antigenní znaky, které jsou uspořádány do systémů
- Systémy membránových znaků byly nejdříve zjištěny a prozkoumány na erytrocytech, později leukocytech a trombocytech
- Antigeny mají schopnost indukovat v organismu detekovatelnou odpověď a specificky reagovat s produkty této odpovědi, t.j. s protilátkami nebo efektorovými T buňkami.
- Protilátky se uvolňují zejména do krevní plazmy, v menším množství se vyskytují také v tělních tekutinách, hlenu a na povrchu sliznic
- Hladina protilátek v séru kolísá v závislosti na věku, pohlaví a na stupni rozvinutí imunitních reakcí
- Protilátky, patřící do rodiny imunoglobulinů, lze rozdělit dle způsobu vzniku:

1. aloimunitní protilátky - transfuze krevních složek
- transplantace
- záměrná imunizaci
- těhotenství, aborty

2. autoprotilátky – proti vlastním antigenům jedince

3. alergické protilátky

4. přirozené protilátky



- Dle různých typů H řetězce lze rozlišit 5 tříd imunoglobulinů – IgG, IgM, IgA, IgD a IgE.
- V imunologii leukocytů a trombocytů hrají důležitou roli imunoglobuliny třídy IgG, IgM a IgA.

Imunologie leukocytů

1. antigeny společné s erytrocytárními - ABO, Rh, P, MNSs, ...

2. antigeny specifické pro leukocyty

- specifické antigeny lymfocytů **HLA antigeny**
- specifické antigeny granulocytů **HNA antigeny**
- specifické antigeny monocytů **HMA antigeny**

HLA antigeny a anti- HLA protilátky

- anti-HLA protilátky vyvolané účinkem HLA antigenů jsou nejčastěji lymfocytotoxiny, méně často leukoaglutininy
- anti-HLA protilátky vznikají tehdy, obsahuje-li imunizační faktor HLA antigeny odlišné od osoby vystavené jeho účinku
- a-HLA protilátky jsou imunoglobuliny třídy IgG a IgM

Klinické syndromy způsobené anti-HLA protilátkami

Febrilní nehemolytická potransfuzní reakce – FNHTR

(teplota, třesavka, zimnice, bolest hlavy)

- příčinou mediátory a cytokiny z leukocytů uvolněné v průběhu zpracování a skladování TP
- někdy je příčinou přítomnost antileukocytárních (často a-HLA) protilátek v plazmě pacienta při podání TP kontaminovaných leukocyty
- Snížení výskytu FNHTR – plošná leukodeplece TP

Potransfuzní reakce TRALI - imunní TRALI

- a-HLA nebo antigranulocytární protilátky v plazmě DK reagující proti antigenům leukocytů příjemce transfuze nebo antileukocytární protilátky v plazmě příjemce transfuze reagující proti antigenům leukocytů přítomných v TP
- aktivované leukocyty - obstrukce plicní mikrocirkulace, vzniká plicní edém
- klinické projevy do 6 hodin po podání transfuze (většinou neprodleně po zahájení transfuze)
- podpora vitálních funkcí
- i jiné příčiny – stáří skladovaného TP

Refrakterita

- refrakterita na podání trombocytových transfuzních přípravků způsobená přítomností anti-HLA protilátek v séru pacienta reagujícími s HLA antigeny I. třídy nacházejících se na membránách trombocytů dárce
- výběr HLA kompatibilního dárce transfuzního přípravku z registru HLA otypovaných dárců nebo zkouška kompatibility v lymfocytotoxickém testu mezi sérem příjemce a lymfocyty dárce (cross-match)

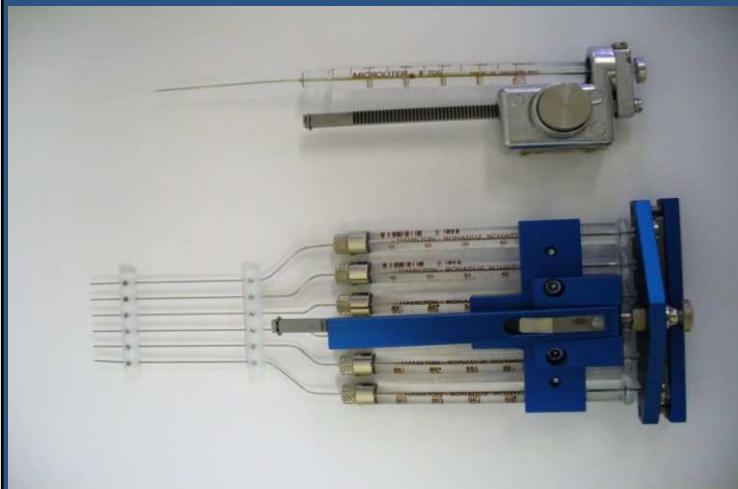
Akutní rejekce

- odvrhnutí transplantovaného štěpu
- pravděpodobnost vzniku akutní rejekce je tím větší, čím větší odlišnosti v HLA systémech dárce a příjemce existují
- úloha non-HLA faktorů

Detekce anti-HLA protilátek

Lymfocytotoxický test (LCT)

- reakce mezi protilátkou v séru pacienta a antigenem buněčné membrány typových lymfocytů (dárce krve)
- záchyt protilátek pouze proti HLA I. třídě



Detekce anti-HLA protilátek pomocí analyzátoru Luminex

- Luminex® je metoda využívající navázané HLA glykokoproteiny na barevně značené mikročástice a vazba protilátek ze séra je prokázána průtokovou cytometrií s dvojitým laserem
- Luminex® má větší specifitu a senzitivitu než LCT, umožňuje záchyt protilátek proti HLA I., II. třídě a anti-MICA

HNA antigeny (Human Neutrophil Antigens)

- Známo 7 antigenů, které jsou uspořádány do 5 HNA systémů:
- **HNA-1** má 3 alely: **HNA-1a**, **HNA-1b**, **HNA-1c** (polymorfní formy neutrofilního Fcγ receptoru IIIb (CD16b)), HNA-1 specifický pouze pro neutrofilly
- Vzácně HNA-1 null fenotyp – jedinci neexprimují Fcγ receptor IIIb, možnost tvorby protilátek
- Funkce - Fcγ receptor IIIb slouží jako receptor pro IgG1 a IgG3
 - - přispívá k fagocytóze opsonizovaných mikroorganismů
- **HNA-2a antigen** – typická heterogenní exprese jedince (jedinec má subpopulaci neutrofilů s HNA-2a a subpopulaci bez HNA-2a)
- Vyšší exprese HNA-2a u žen než u mužů, u žen klesá s věkem
- HNA-2 null fenotyp – tvorba specifických protilátek
- Funkce – zahrnut do procesu adheze neutrofilů k endoteliálním buňkám a jejich migraci

- **HNA-3a** antigen exprimován na neutrofilech a lymfocytech
- Protilátky a-HNA-3a schopné aglutinovat neutrofilly
- Funkce neznámá

- **HNA-4a** antigen a HNA-4a negativní jedinci objeveni v roce 1986
- HNA-4a genotypy nalezeny u více jak 90% bělochů
- Exprese na neutrofilech, monocytech a NK
- Funkce – adheze leukocytů k endoteliálním buňkám a při fagocytóze

- **HNA-5a** – exprese na všech leukocytech
- Funkce – adheze leukocytů

Klinické syndromy způsobené anti-HNA protilátkami

- **Aloimunitní neutropenie novorozence**

způsobená mateřskými aloprotilátkami proti HNA antigenům na neutrofilech plodu při absenci na neutrofilech mateřských nebo jako transplacentární přenos protilátek od matky s autoimunitní neutropenií

Většinou jsou mateřské aloprotilátky zaměřeny proti antigenům HNA-1a, HNA-1b a HNA-2a, méně často proti HNA-1c a HNA-4a.

- **Potransfuzní reakce TRALI a FNHTR**

- **Autoimunitní neutropenie u dětí vyvolaná antigranulocytárními autoprotilátkami nejčastěji proti HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-4a**

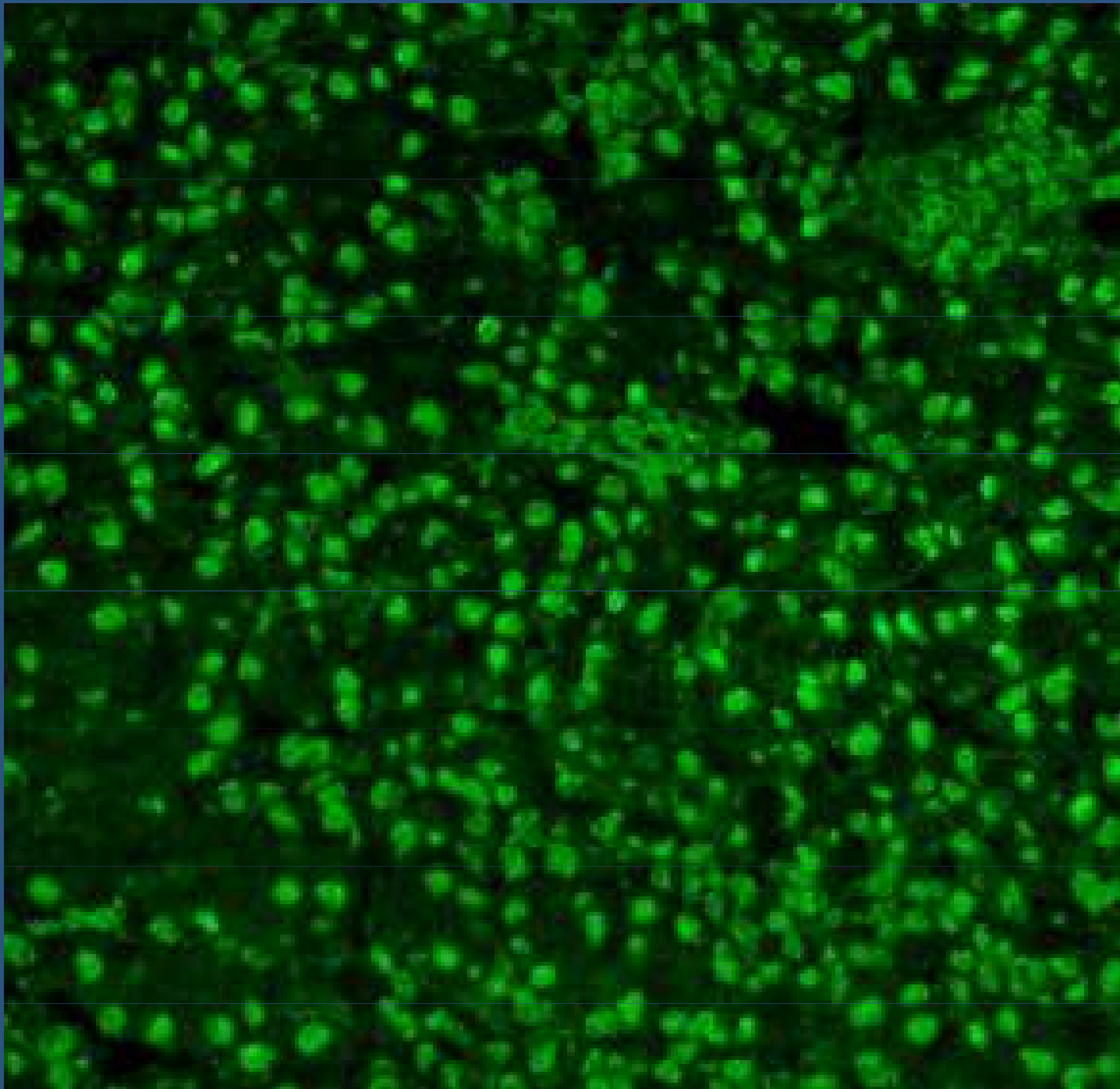
Detekce antigranulocytárních protilátek

Granuloaglutinační test (GA)

- zachycuje granuloaglutininy
- reakce probíhá specificky mezi antigeny membrány typových granulocytů a protilátkami vyšetřovaného séra
- hodnotí se mikroskopicky shluky granulocytů, při negativní reakci zůstávají granulocyty volné.

Granuloimunofluorescenční test (GIFT)

- detekuje antigranulocytární protilátky navázané ze séra pacienta na povrch typových granulocytů.
- k vizualizaci navázané protilátky dochází pomocí zvířecí protilátky proti lidskému imunoglobulinu značené fluorescein-isothiocyanátem (FITC)
- na typové granulocyty je navázána protilátka ze séra pacienta a na ni pak zvířecí protilátka značená FITC
- granulocyty s navázanou protilátkou svítí ve fluorescenčním mikroskopu zeleně.

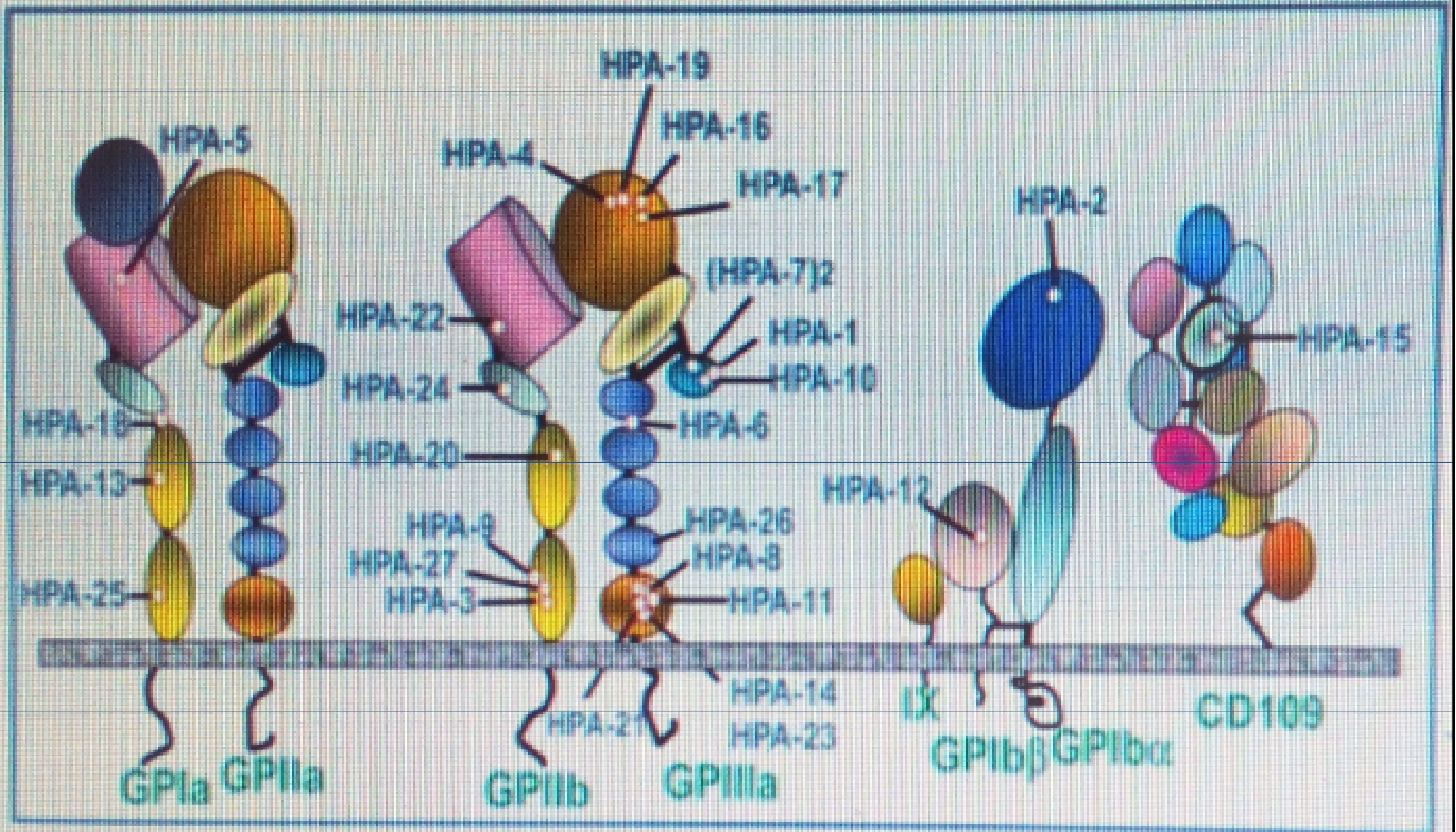


Imunologie trombocytů

Antigeny specifické pro trombocyty - **HPA antigeny**

- na trombocytech 6 bílelických systémů - **HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-15 (33 HPA alel na 6 glykoproteinech)**
- jako první trombocytární antigen byl určen antigen HPA-1a (fenotypová frekvence v populaci 98%)
- v kavkazské populaci je protilátka proti antigenu HPA-1a nejčastější příčinou **fetomaternální aloimunitní trombocytopenie**
- antitrombocytární protilátky vznikající jako odpověď imunitního systému na HPA antigen, se dělí:
 - **aloprotilátky** (po transfuzi, po transplantaci, v průběhu těhotenství)
 - **autoprotilátky** způsobující destrukci vlastních trombocytů (autoimunitní trombocytopenie, ITP)
 - léky indukovaná trombocytopenie (antiepileptika, analgetika, antibiotika)
- antitrombocytární protilátky jsou většinou třídy IgG, často také IgM a zřídka IgA

HPA antigeny



Collagen
receptor

Fibrinogen
receptor

Von
Willebrand

Uncertain
function

Detekce antitrombocytárních protilátek

DIFT (destičkový imunofluorescenční test)

- zachycuje specifické antitrombocytární protilátky ale i HLA protilátky
- k vizualizaci navázané protilátky na povrch typových trombocytů dochází pomocí anti-lidského imunoglobulinu značeného fluoresceinem

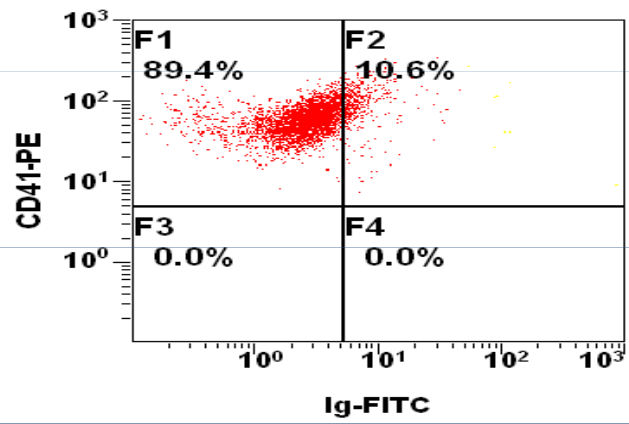
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

- enzyμοimmunostanovení, zachycující protilátky proti trombocytům
- vazbu antigenu s protilátkou detekujeme pomocí antiglobulinu, který je značený enzymem peroxidázou
- po proběhnutí reakce enzym-substrát a zastavení reakce hodnotíme intenzitu zbarvení na fotometru vzhledem ke kontrolám
- záchyt nespecifických protilátek

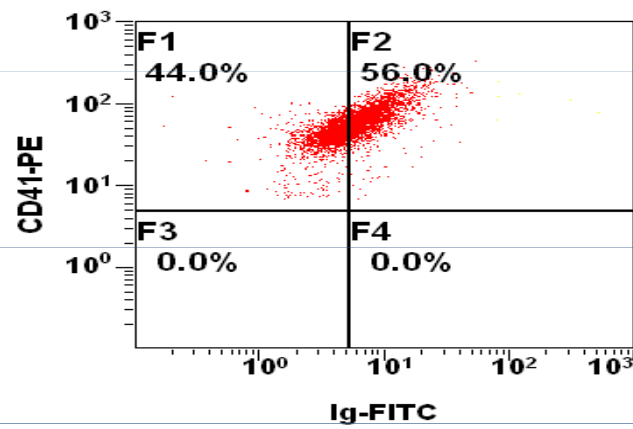
Průtoková cytometrie (Flow cytometry)

- využívá anti-CD41/PE protilátky k označení populace trombocytů
- navázaná protilátka na trombocytech je detekována sekundární anti-lidskou protilátkou značenou jinou fluorescenční barvou (např. Fluorescein Isothiocyanatem - FITC)

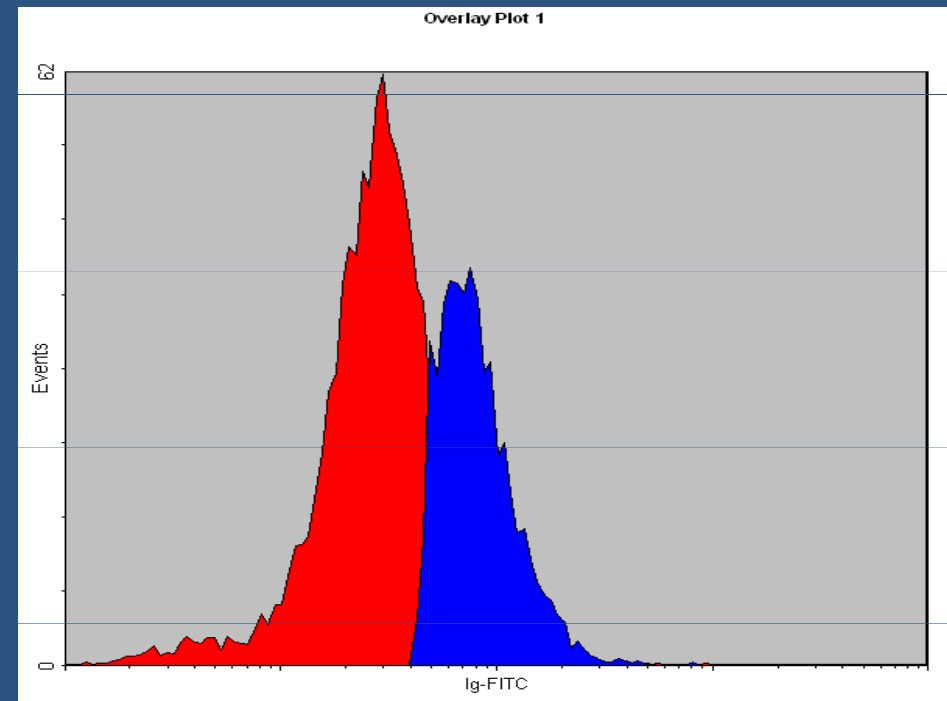
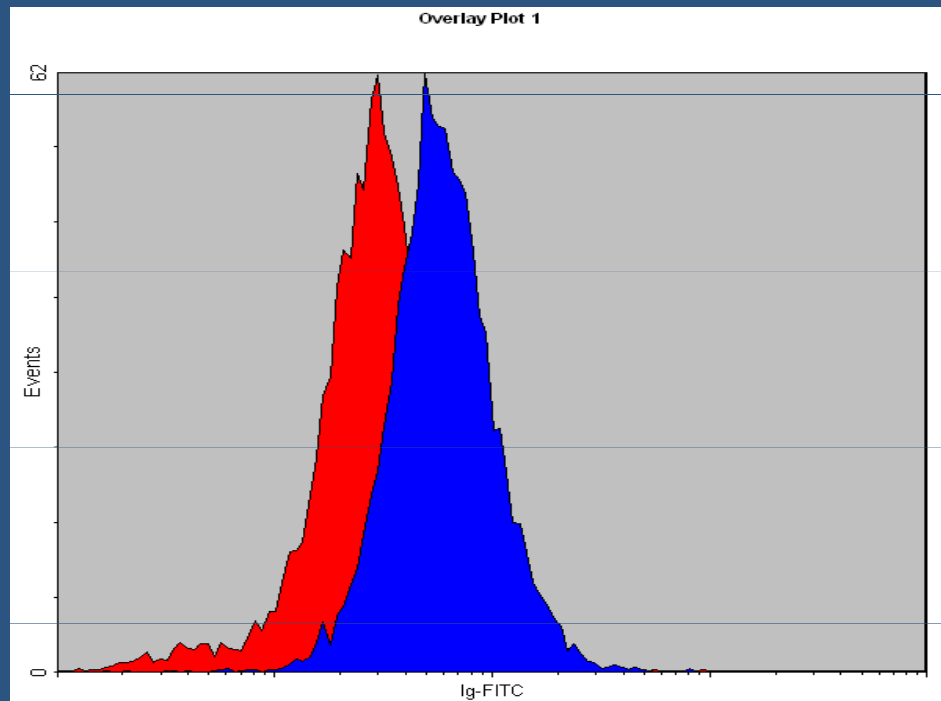
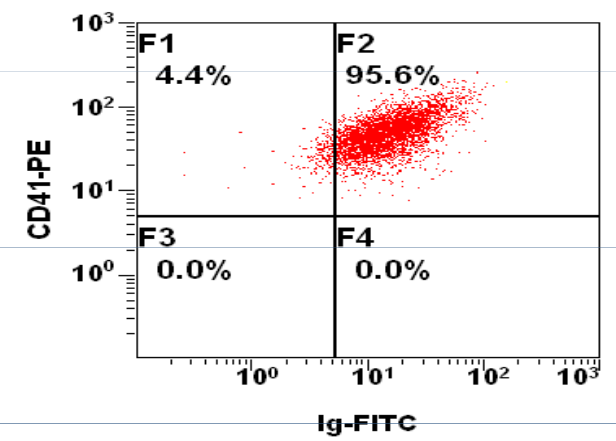
D] K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2



D] P14 plt-Ig IgG 00048297.003 : FL1 Log/FL2



D] P20 plt-Ig IgG 00048317.003 : FL1 Log/FL2



Transplantace

- Transplantace orgánová – srdce, játra, ledviny, plíce, kombinované Tx
- 2 typy dárců – kadaverózní dárce a dárce žijící

- Transplantace kostní dřeně, periferních kmenových buněk, pupečnickové krve
- Podle typu dárce Tx autologní, alogenní, syngenní
- Alogenní transplantace – příbuzenecká, nepříbuzenecká
- Registry dárců

Registry dárců kostní dřeně v ČR

Český národní registr dárců dřeně (ČNRDD) - Plzeň

**Český registr dárců krvetvorných buněk (CSCR) -
Praha**

Podmínky pro vstup do registru:

- věk 18-35 let
- dobrý zdravotní stav, žádné závažné onemocnění v minulosti
- ochota překonat určité nepohodlí a ztrátu času, spojené s jednou či několika návštěvami zdravotnického zařízení, případně s odběrem krvetvorných buněk v zájmu záchrany života druhého člověka.

Požadavky na dárce orgánů

- Kadaverózní dárce orgánů je osoba s prokázanou mozkovou smrtí při zachovalém krevním oběhu, s funkčními orgány a bez přítomnosti kontraindikace dárce.
- Zákon č.285/2002 Sb. určuje přesná pravidla na určení mozkové smrti a souvisejících předpisů včetně požadavků na kvalifikaci odborníka potvrzující mozkovou smrt.
- V ČR platí předpokládaný souhlas s dárce, osoby nesouhlasící s dárce mají právo se přihlásit do speciálního registru osob nesouhlasících s dárce (registr NROD) .
- Pracoviště zvažující dárce musí ověřit, zda pacient v tomto registru není. Souhlas rodiny není zákonně nutný, ale obvykle se bez souhlasu rodiny dárce neuskuteční.
- Nejčastější dárce jsou s úrazy hlavy, nitrolební krvácení a další, první informaci o možném dárce podává ošetřující lékař do spádového transplantačního centra ještě před ověřením smrti mozku.
- Smrt mozku je ze zákona potvrzována komplexem vyšetření (angiografie-znázornění oběhu krve kontrastní látkou, kdy se prokáže zástava kr. oběhu mozku).

- přibližně 10% dárců představují u nás **žijící dárci ledviny (rodiče, sourozenci, jiní příbuzní)**.
- pokud je dárce osoba bez příbuzenského vztahu k pacientovi, je nezbytné posouzení etickou komisí.
- absolutní kontraindikací pro Tx ledviny od žijícího dárce je onemocnění ledvin, maligní nádory s možností metastáz, přítomnost australského antigenu (riziko přenosu hepatitidy B), pozitivita na HIV a věk do 18 let. Další podmínkou všech Tx ze žijících dárců je vyloučení jednání pod nátlakem či za úplatu
- živý dárce – kratší doba studené ischemie, odběr a Tx jsou naplánované a probíhají prakticky ve stejnou dobu . Tato skutečnost výrazně přispívá k vynikajícím výsledkům Tx od žijících dárců i bez shody v HLA. Nutnou podmínkou je negativní cross-match (křížová zkouška) mezi dárce a příjemcem a shoda v KS.