

Imunizace, nádorová imunologie,
transplantace, reprodukční
imunologie

Marcela Vlková

Záměrné a cílené ovlivnění imunity

- **IMUNIZACE**
 - aktivní (vakcinace)
 - pasivní („hyperimunní“ antiséra)
- **IMUNOSUBSTITUCE**
 - „normální“ gamaglobulin
- **IMUNOMODULACE**
 - imunoprese
 - imunostimulace
 - plasmaferéza a imunoadsorpce

IMUNIZACE AKTIVNÍ A PASIVNÍ

Imunizace

- Aktivní
- Pasivní

Aktivní imunizace

Pasivní imunizace

Rychlost nástupu

Opožděná

Okamžitá

Délka účinnosti

Dlouhodobá

**Krátkodobá
(maximálně týdny)**

Použití

**Dlouhodobá
profylaxe**

**Terapie, krátkodobá
profylaxe**

Pasivní imunizace

- Principem je dodání specifických protilátek chránících proti rozvoji onemocnění nebo léčících onemocnění.
- Je používána zejména u infekčních chorob nebo onemocnění způsobených toxiny.
- Účinek je „okamžitý“ ale krátkodobý.
- Nedochozí ke vzniku specifické imunitní paměti.

Pasivní imunizace přirozená

- Přenos protilátek IgG placentou
- Přenos sekrečních protilátek třídy sIgA v kolostru a zralém mateřském mléce kojenci

Pasivní imunizace umělá

- Aplikace zvířecích nebo lidských protilátek různého stupně purifikace
- Použití: imunomodulace – protekce u pacientů s probíhající virovou bakteriální infekcí
- Virová agens: CMV, virus hepatitidy A, B, virus vztekliny, varicella, vakcinia – zdroj protilátek – člověk
- Bakteriální agens: C.botulinium, C. diphteriae – zdroj protilátek kůň, C. tetani – lidské protilátky
- Respirační syncytiální virus RSV – monoklonální protilátky – palivizumab (nedonošenci)
- Protilátky proti Rh (D) – zdroj protilátek – člověk
- Podání: intramuskulárně, intravenózně, subkutánně
- Převládá imunomodulační účinek na přímou ochranou

Nespecifické imunoglobulinové preparáty

- Podávají se u imunosuprimovaných jedinců
- Extrakcí etanolem je možno ze séra získat imunoglobulinovou frakci – 16% roztok je používán jako „normální imunoglobulin“. Obsahuje zejména IgG, stopy dalších tříd jsou terapeuticky zanedbatelné.
- Další manipulací (odstranění polymerů IgG, které by se vázaly na Fc receptory a aktivovaly komplement) je možno získat deriváty k intravenóznímu podání
- Nově jsou používány i imunoglobuliny pro subkutánní léčbu.

Nespecifické imunoglobulinové deriváty

(příprava z plasmy 15 000-60 000 zdravých dárců krve)

Intravenózní - 5%:

7S - intaktní molekula IgG

5S - molekula IgG rozštěpena v pantové oblasti na fragmenty Fab₂ a Fc (Gama-Venin)

IgM, obohacené preparáty (Pentaglobin)

Intramuskulární 16% roztok převážně IgG

Subkutánní - jedná se v podstatě

o intravenózní deriváty zahuštěné na 16%.

Příprava imunoglobulinových preparátů

Polyklonální „antiséra“ (hyperimunní séra)

xenogenní (imunizace zvířat – králík, koza, prase, kůň...)

alogenní (lidská od přirozeně i záměrně imunizovaných dobrovolníků)

Monoklonální protilátky

myší

modifikované (chimerické, humanizované, lidské)

Využití imunoglobulinových preparátů

Identifikace a kvantifikace antigenů (mikrobiologie, hematologie, transplantologie, klinická imunologie)

Imunoterapie a imunoprolaxe

(klasická pasivní imunizace, terapie nádorů, imunomodulace, především imunosuprese)

Izolace a purifikace antigenních preparátů

Indikační skupiny imunoglobulinové léčby

Substituce tvorby protilátek

Primární imunodeficiencie

Sekundární imunodeficiencie

Imunoregulace

Autoimunitní choroby

Vaskulitidy

Alergická onemocnění

Léčba infekčních chorob - substituce i
imunoregulace

Aktivní imunizace

Vakcinace je hodnocena z medicínského i ekonomického pohledu jako jeden z nejefektivnějších způsobů prevence vzniku a šíření infekčních chorob.

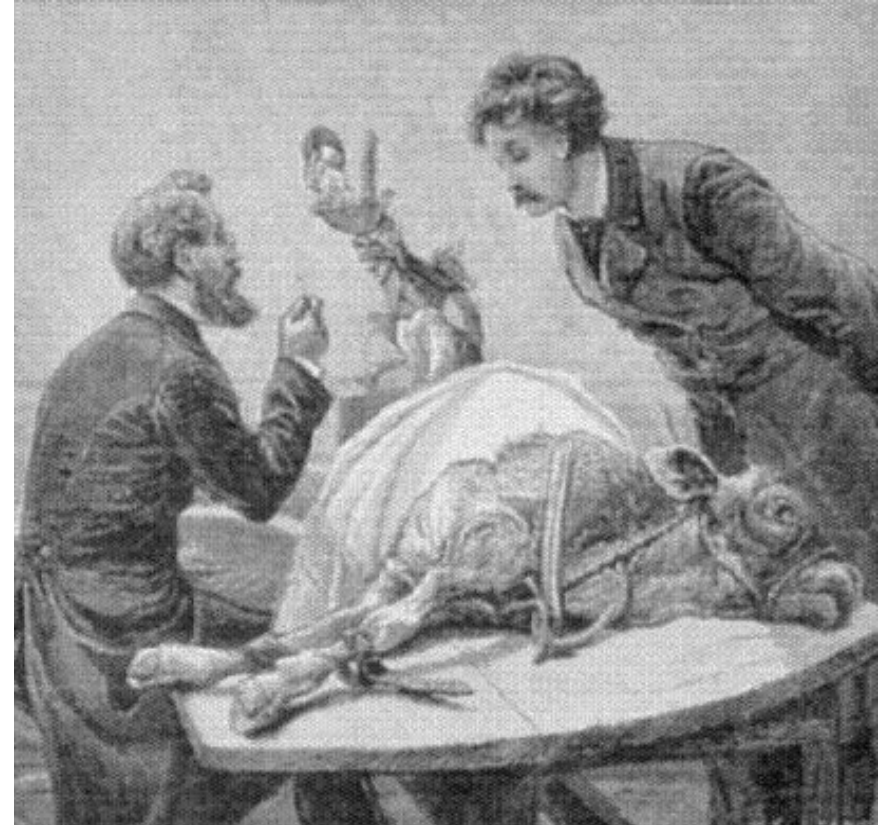
Na individuální úrovni chrání jedince před onemocněním.

Na populační úrovni (kolektivní imunita daná vysokou proočkovaností populace) brání šíření infekčních agens a ochrání i neočkované osoby.

Aktivní imunizace

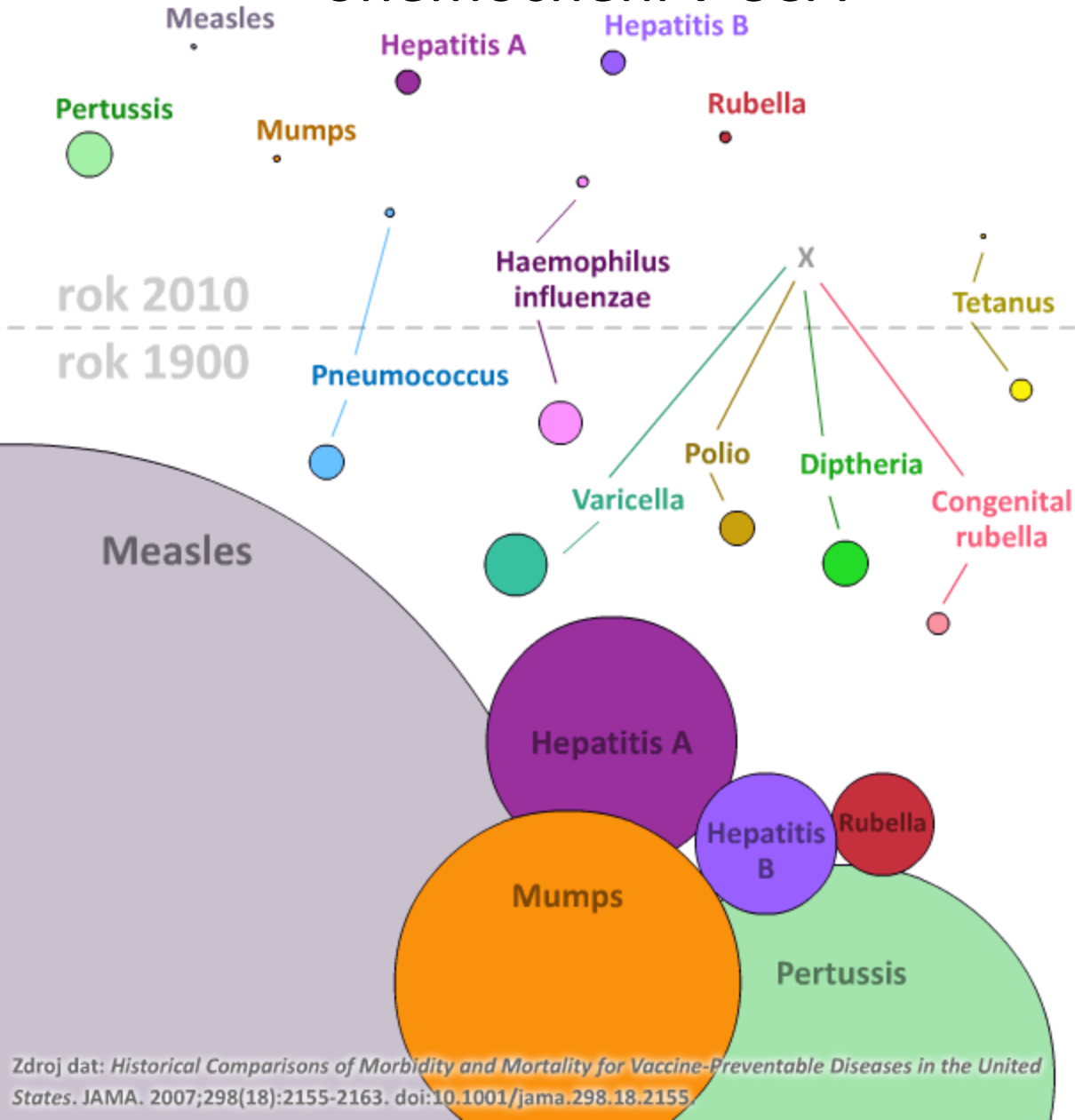
- Použití Ag k vyvolání imunitní reakce, která později chrání před patogenem nesoucí tento nebo podobný antigen
- Zakladatel E. Jenner — jako první v roce 1796 naočkoval virus kravských neštovic, 1798 - publikace
- Vyvolání je mírného onemocnění a především ochrana před pravými neštovicemi

Edward Jenner



Discovery of small pox vaccine

Vliv očkování na výskyt infekčních onemocnění v USA



1900:	29 005		Varicella	Neštovice
2010:	0	100%		
1900:	21 053		Diphtheria	Záškrt
2010:	0	100%		
1900:	16 316		Polio (paralytic)	Obrna
2010:	0	100%		
1900:	152		Congenital rubella	
2010:	0	100%		
1900:	580		Tetanus	
2010:	8	99%		
1900:	530 217		Measles	Spalničky
2010:	61	99%		
1900:	47 745		Rubella	Zarděnky
2010:	6	99%		
1900:	20 000		Haemophilus influenzae	
2010:	270	99%		
1900:	162 344		Mumps	Příušnice
2010:	2 528	98%		
1900:	117 333		Hepatitis A	
2010:	11 049	91%		
1900:	200 752		Pertussis	Černý kašel
2010:	21 291	89%		
1900:	66 232		Hepatitis B (acute)	
2010:	11 269	83%		
1900:	16 069		Pneumococcus	<5 years of age
2010:	4 167	74%		

„Klasické“ vakcíny

- **Atenuované mikroby:** spalničky, zarděnky, příušnice, rotaviry, varicella, BCG (proti TBC), poliomyelitis (Sabinova), cholera, žlutá zimnice
- Živí původci s omezenými faktory patogenity a virulence
- Vytváří kompletní T a B-lymfocytární protektivní odpověď, dlouhodobou paměť, absence adjuvans
- Riziková pro imunodeficiencie, možnost reverze do virulentní formy, citlivá na teplo

„Klasické“ vakcíny

- **Inaktivované mikroorganismy:** poliomyelitis (Salkova), vzteklna, hepatitis A, klíšťová encefalitida, cholera, mor, dříve pertusse
- Původci usmrceni chemicky nebo teplotou
- Nemožnost reverze do virulentního typu – lze užít u imunodeficiencí
- Vytváří převážně humorální odpověď
- Nevýhody – nutnost přeočkování, zvýšené riziko lokálních reakcí, omezená stimulace T-buněčné odpovědi

„Klasické“ vakcíny

- **Toxoidy** (chemicky modifikované, inaktivované): tetanus, záškrt
- Purifikované exotoxiny inaktivované chemicky nebo teplotou
- Stabilní, bezpečné, vyvolávají humorální i T-buněčnou odpověď
- Slabě imunogenní, nutnost adjuvans, nutnost přeočkování, lokální reakce

Klasické vakcíny

- Podjednotkové, polysacharidové: virus hepatitidy B, influenza, N. meningitis, S. pneumonia, H. influenzae
- Antigenní součásti původců: purifikované nebo rekombinantní
- Jsou to molekulárně definované Ag
- Vyvolávají humorální odpověď
- Musí se vázat na nosičové proteiny (polysacharidy na tetanový toxoid), nutnost adjuvans, lokální reakce

„Klasické“ vakcíny

- **Podjednotkové** (izolované složky mikroorganismů): chřipková, pertusse
- **Polysacharidové** (polysacharidová pouzdra): Haemophilus influenzae B (konjugovaná), Meningococcus (skupina A a C, konjugované i nekonjugované), Pneumococcus (konjugovaná i nekonjugovaná)
- **Rekombinantní**: konkrétní gen z viru, bakterie či parazita, který je kóduje vznik specifického antigenu. Tento gen se inkorporuje do jiného organismu jež poté produkuje specifický antigen hepatitis B
- **Virus-like particles** (neobsahují DNA): papilomaviry

NOVÉ VAKCÍNY

Nanočásticové – virus hepatitidy A, B, C, HPV,
Influenza

- Liposomy, virus-like particules, virosomy
- Biologicky dostupné, internalizace vakcíny, nitrobuněčné zpracování, depozice, řízené uvolňování, adjuvanicita, prezentace, kostimulace, paměť
- Imunitní odpověď je humorální i buněčná

NOVÉ VAKCÍNY

- Vektorové rekombinantní živé virové nebo bakteriální vektory - virus hepatitidy B, C, M. tuberculosis
- Vnesen cílový vakcinační Ag
- Vysoká účinnost, komplexní odpověď humorální i buněčná, adjuvancita, biologická dostupnost
- Nevýhody: potenciální mutace, odpověď na nosič, limitovaná velikost, výrobní náročnost

- DNA-vakcíny – genetické vektory nesoucí Ag, virus hepatitidy B, C, HPV, Influenza
- Výhody – bezpečnost, skladovatelnost, stabilita
- Pouze pro proteinové Ag komplexní odpověď humorální i buněčná

Imunologické adjuvans

- anorganické či organické chemické látky, makromolekuly nebo celé buňky některých usmrcených bakterií, které nespecificky zesilují imunitní reakci na podaný antigen
- váže antigen, zabraňuje jeho rychlému uvolnění z místa aplikace a jeho degradaci
- mohou antigen prezentující buňky antigen lépe fagocytovat.
- může aktivovat monocyty a makrofágy, nebo podporovat produkci cytokinů

Adjuvans

Zesiluje a udržuje imunogenost antigenu.
Účinně moduluje imunitní reakci.

Redukuje potřebné množství antigenu i
nutnost opakovaného podání.

Zlepšuje účinnost vakcín u novorozenců,
starých osob i nemocných s podlomenou
imunitou.

Jejich význam je zvláště důležitý u strukturálně
jednoduchých preparátů.

Adjuvans:

základní mechanismy účinku

- „Doručení“ antigenu buňkám a orgánům imunitního systému
 - *minerální soli*
 - *emulze*
 - *liposomy*
 - *virosomy,*
 - *biodegradovatelné polymerní mikrosféry,*
 - *ISCOM (immune stimulating complexes)*
- Imunostimulace aktivace buněk vrozené imunity
- *ligandy TLR, cytokiny, saponiny, bakteriální exotoxiny*
- *Budoucnost mají komplexní adjuvantní systémy (integrovaná adjuvancia); je nutno vzít v úvahu zvláštnosti patogeneze i rozdílné imunogenní vlastnosti*

Adjuvans aktivuje dendritické buňky

Aktivace přímá

interakce složek adjuvans charakteru „PAMP“
s TLR i dalšími PRR

Aktivace nepřímá

prostřednictvím „DAMP“ uvolňovaných při
poškození tkání mikroby (kyselina močová,
ATP, HMGB-1)

Význam „fylogeneticky konservovaných“ struktur mikrobů.

Freudovo adjuvans

- tvořeno směsí minerálních olejů, vosků a inaktivovaných *Mycobacterium tuberculosis*
- nekompletní adjuvans pak obsahuje pouze olejovou emulzi
- používá se ve veterinárním lékařství

Adjuvans v humánní medicíně

- hydroxid hlinitý
 - hexavakcína,
 - samostatné očkování tetanickým toxoidem
- fosforečnan hlinitý
 - očkování proti hepatitídě B
- fosforečnan vápenatý
 - alergenové vakcíny

Adjuvans - Soli hliníku

- Aplikace vede k poškození buněk, podkoží a svalů, vyvolání DAMP signálů
- Aktivace inflammasomů – tvorba pluripotentních prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18
- Th2 odpověď spojená s tvorbou protilátek
- Absence Th1 cytotoxicity

Moderní adjuvans

- Emulzní adjuvans – emulze voda v oleji
- schváleno pro:
 - MF59 (uvolnění DAMP (ATP), stimulace makrofágů, dendritických buněk, uvolnění prozánětlivých cytokinů, akumulace buněk) – virus chřipky H1N1 pandemický kmen
 - AS03(aktivace NF-κB) – virus chřipky – senioři, malárie
 - vakcína proti rakovině děložního čípku obsahující AS03 (deacylovaný lipopolysacharid adsorbovaný na hydroxidu hlinitém) - indukuje vyšší a delší protilátkovou odpověď, ale také mnohem silnější specifickou imunitní paměť ve srovnání s hodnotami pozorovanými po vakcinaci pouze s aluminiovou solí.

Moderní adjuvans - mikropartikule

- **VLP – virus like particules**

- Napodobují virové částice
- Neinfekční aktivace dendritických buněk
- Aktivace CD8+ T-LYMFO
- Přímá aktivace B-lymfocytů
- pro HBV, HPV, malárie

Virosomy

- Virové obalové glykoproteiny obsahující hemaglutinin a neuraminidázu
- Interakce s DC a kostimulace DC
- Stimulace t-lymfocytů (CD4 i CD8)
- Tvorba IFN γ , TNF α , GM-CSF
- Virus chřipky, HBA

Moderní adjuvans – agonisté receptorů vrozené imunity

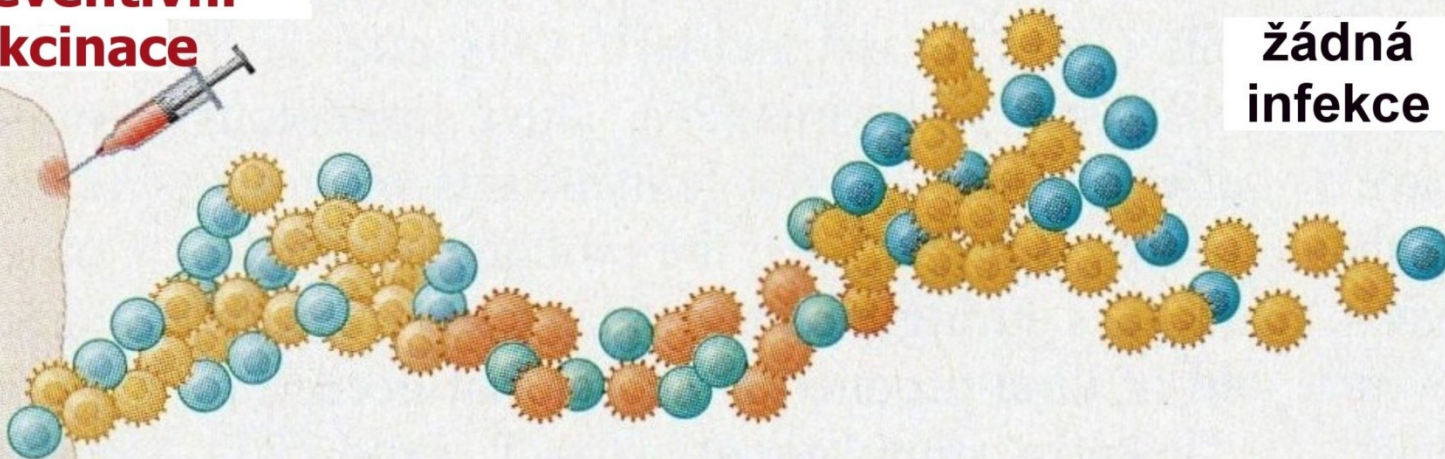
- **Monofosforyl lipid A**
 - Detoxifikovaný LPS *Salmonella minnesota*
 - Agonista TLR4, tvorba IFN γ , IL-12 = Th1 odpověď
 - HPV, leishmanióza, malárie
- **Flagelin**
 - Složka bakteriálních bičků, agonisté TLR-5 – klinické zkoušky viru chřipky
- **CpG fragmenty** – syntetické oligonukleotidy – (18-25 nukleotidů)
 - Agonisté TLR-9
 - Th1 odpověď
 - Aplikace s vakcinami proti HBV u non-respondentů

A

**preventivní
vakcinace**



**žádná
infekce**



patogen

Expanze
T/B efektorových
buněk

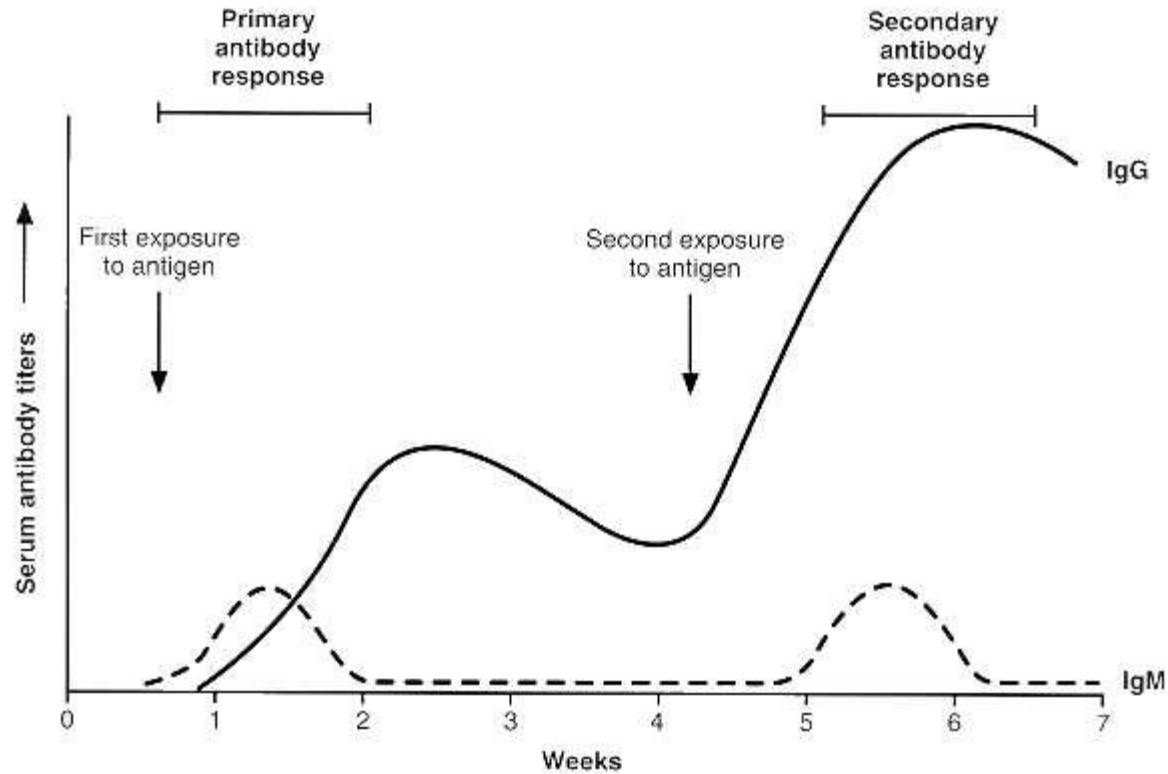
Vytvoření
T/B paměťových
buněk

Další expanze
T/B efektorových
buněk

Imunologická paměť a vakcinace

Otevřeným problémem protektivní účinnosti vakcinace je, zda se paměťové buňky, které jsou indukovány vakcinací, dokáží aktivovat a diferencovat do efektorových elementů ještě před tím, než se patogen začne projevovat.

Primární a sekundární imunitní odpověď



Ostatní biologicky významné součásti vakcín

Antibiotika (kanamycin, neomycin)

Konservační prostředky (thiomersal)

Stabilizátory: struktura a konformační integrita epitopů je ovlivněna především teplotou a pH.

Chlorid hořečnatý, humánní albumin, laktóza, sorbitol, želatina.

Látky z technologického procesu (např. OVA)

Národní imunizační programy ČR

Vyhláška č. 537/2006 Sb.
o očkování proti infekčním nemocem

Novela: Sbírka zákonů č. 299/2010 (zejména BCG)

Pravidelné očkování v ČR 2011

(Vyhláška 537/2006, novela 299/2010 Sb.)

povinné plošné očkování proti

záškrtu, tetanu, černému kašli, hemofilové invazivní infekci, virové hepatitidě B, dětské obrně, spalničkám, zarděnkám, příušnicím

doporučená očkování

u rizikových dětí proti tbc (BCG)

proti pneumokokovým a meningokokovým (A+C) onemocněním, klíšťové encefalitidě, virové hepatitidě A, planým neštovicím, infekci lidskými papilomaviry, chřipce

Povinné očkování - vymahatelnost

Rozhodnutí Ústavního soudu (únor 2011):

V obecné rovině je povinné očkování ospravedlnitelné nejen ve vztahu k Úmluvě na ochranu lidských práv a důstojnosti lidské bytosti v souvislosti s aplikací biologie a medicíny, ale i k dalším základním právům občana podle Ústavy ČR a Listiny základních práv a svobod. Jde o opatření nezbytné pro ochranu veřejné bezpečnosti, zdraví a práv a svobod druhých.

Hexavakcína

Záškrt, tetanus, pertuse, virová hepatitida B, dětská obrna, infekce způsobené H. influenzae b.

Ukončení do 18 měsíců věku, přeočkování.

Spalničky, zarděnky, příušnice

Od 15. měsíce, přeočkování za 6-10 měsíců („vychytávací“, „catch up“ dávka)

Očkovací kalendář ČR 2011

2. měsíc (od 9. týdne)	hexavakcína (1. dávka)
3. měsíc	hexavakcína (2. dávka)
4. měsíc	hexavakcína (3. dávka)
15. měsíc	spalničky, zarděnky, příušnice (1. dávka)
Do 18 měsíce	hexavakcína (4. dávka)
21.-25.měsíc	spal.,zard.,příuš. (2. d.)
5.-6. rok	záškrt,tetanus,pertuse
10.-11. rok	záškrt,tetanus,pertuse dětská obrna

Principy správné vakcinace

Individuální přístup k očkovanému.

Dodržování absolutních a relativních kontraindikací.

Dodržování správné očkovací techniky.

Použití vhodné vakcíny podle věku.

Vybrání vhodného místa aplikace.

Desinfekce místa vpichu (alkohol)

Zdravotnický dohled po dobu 30 min.

IMUNOLOGIE V ONKOLOGII

Způsoby maligní transformace buněk

- Maligní zvrát - transformace buněk jako důsledek selhání regulace buněčného dělení a sociálního chování bb.
- Mutace v onkogenech nebo anti-onkogenech
- Nekontrolované dělení - proliferace, únik z normální tkáňové lokalizace, diseminace do jiných tkání a agresivního růstu v nich

ONKOGENY

Akumulace genetických poruch, které aktivují buněčné protoonkogeny a inaktivují antionkogeny

Protoonkogeny – kódují bílkoviny pro přenos růstových a diferenciačních signálů do nitra buňky

Antionkogeny – kontrola přenosu růstových a diferenciačních signálů do nitra buňky

- inaktivace nebo dysfunkce vede k nekontrolovanému buněčnému dělení

- dochází k úniku těchto buněk z normální tkáňové lokalizace a prostupu do jiných tkání a růstu v nich (metastáze)

Protoonkogeny – kontrola růstu a buněčného dělení

Růstové faktory – PDGF, EgF, FgF, Src sarkoma virus

Receptory růstových faktorů- erb-b receptor pro epidermální růstový faktor

Signální transduktory – proteiny signálních kaskád – src, ras, G proteiny

Transkripční faktory – jun, myb, c-myc, fos – aktivovány chromosomálními translokacemi u hematologických malignit

Regulátory buněčné smrti Bcl-2 – inhibitor apoptózy,
Bax – regulátor apoptózy

Geny tlumící nádorový růst - p-53 nukleární protein tlumící růst nádoru

Antionkogeny

- **Retinoblastom** - delší raménko 13.ch
- **Protein Rb1** - fosfoprotein o Mr=110kDa
 - v jádrech všech bb
 - stupeň fosforylace závisí na fázi buněčného cyklu (začíná G1/S, vrcholí G2/M)
 - fosforylace inaktivuje – regulace buněčného cyklu
- 2 formy
 - dědičná forma heterozygoti – stačí 1 další mutace) (výskyt 1:20 000) – postiženy obě oči, více ložisek
 - Nedědičná forma – vzácnější vyžaduje 2 mutace (na každém homologním ch) - postiženo jen 1 oko 1 nádorem
 - Vyskytuje se i u nádorů plic, močového měchýře prostaty, prsu

Mechanismy aktivace protoonkogenů

- 1. Retroviry
- 2. Mutace
- 3. Genové amplifikace
- 4. Chromosomální přestavby
 - Vede k narušení struktury protoonkogenů nebo ke zvýšení jejich exprese

Antionkogen p53

- – krátké raménko 17. Ch
 - fosfoprotein – homotetramery, sekvenčně specifická vazba DNA
 - transkripční faktor – brzda vstupu bb do S-fáze
 - zástava buněčného cyklu v G1 fázi
 - umožňuje přestávku nutnou k opravám DNA
- Nefunkčnost – smrt bb nebo genetická nestabilita
- Mutace p53 – nejčastější genetická změna v lidských nádorech (50%)
- Trojí význam - kontrola BC
 - apoptóza
 - udržení genetické stability

Aktivita se zvyšuje:

při oxidačním stresu

po UV záření

při zvýšené expresi onkogenů Ras a Myc

Nefunkční p53

- 1) poškozené mutované bb pokračují v buněčném cyklu
- 2) umožní poškozeným bb vyhnout se apoptóze
- 3) vznik genetické instability, umožňující akumulaci mutací

Onkoviry - retroviry

- Oncovirinae
 - lidský lymfotropní virus typu I (HTLV-1)
 - T-leukemie (lymfom) dospělých (ATTL),
 - doba latence asi 30 let,
 - vysoká proliferační aktivita napadených bb- -
 - větší pravděpodobnost mutací

Lerntivirinae

- •Viry HIV-1 a HIV-2
 - nádory spojené s jejich infekcí
 - non-Hodkinův lymfom,
 - primární mozkový lymfom,
 - Kaposiho sarkom

DNA - onkoviry

- DNA nádorové viry (onkodnaviry) – nestejnorodý soubor
- Buď proběhne v bb replikace viru, která vede k zániku bb – nevede k transformaci – **permisivní bb**
- Nebo se virus bb přizpůsobí a replikuje se společně s jejím genomem - **nepermisivní bb**
- Cílem viru není bb zahubit, ale řídí svou i její replikaci a v tom může nastat chyba
- Extrachromozomální cirkulární DNA - episomy neobsahují lidské onkogeny - kódují proteiny, které interagují s nádorovými supresory (RB, p53, p300/CBP)
- Virové onkoproteiny, antigeny T (tumor antigens) jsou nezbytné pro virovou replikaci
- Aktivují replikaci blokadou tumor supresorových genů, ovlivnění kontroly BC

Nádorová imunologie

- Vztah mezi imunitním systémem a nádorem
- Role IS v obraně proti nádoru
- Zvyšování obranyschopnosti
- Imunodiagnostika nádorů
- Souvislosti mezi poruchami IS a nádorovými onemocněními

Typy nádorů

- Karcinomy – epiteliální buňky
- Sarkomy – mezenchym
- Lymfomy – solidní nádory lymfytických tkání
- Leukémie – nádory lymfocytů a ostatních hemopoetických buněk

Relativní výskyt maligních nádorů

(Mak a Saunders, 2008)

- „Hematopoetické“ (8-10%)
 - Lymfomy (57%)
 - Leukemie (29%)
 - Plazmacytomy (myelomy) (14%)
- Ostatní (90-92%)
 - Karcinomy
 - Sarkomy

Karcinogenese

- **Karcinogeny** (chemické, radioaktivní, mikrobiální)
*Iniciace – vytvoření preneoplastického klonu -
vytvoření a progresse neoplastického klonu –
vytvoření maligního klonu*
- Další mutace podmiňující schopnost **metastazovat**
- Význam **nádorových kmenových buněk**

Imunitní reakce na nádorové buňky

- Akutní zánět
DAMP nádoru – prozánětlivé cytokiny, ROI, RNI
destrukce nádorových buněk, útlum angiogeneze
a metastatické schopnosti
- Buňky NK
- Buňky NKT
- T-lymfocyty γ/δ , α/β
- Lymfocyty B

Stimulace imunitní odpovědi u nádorů vede k

- Zničení klonů nádorových buněk
- Odstranění nádoru

X

- Nádorové buňky vznikají z vlastních buněk
- Malá exprese Ag
- Slabá imunogennost

- Silná imunitní odpověď vzniká pouze u onkogenních virů

Nádorové antigeny

- Změněné exprese normálních buněčných proteinů
- Exprese se zvyšuje malignancí
- Nesprávná exprese normálních genů
 - Ve špatné tkáni
 - Ve špatném čase

Nádorové antigeny

- Produkty mutovaných onkogenů a supresorové geny
- Nacházejí se v cytoplazmě nebo na povrchu buněk v komplexech s MHC I.třídy
- Po smrti nádorové buňky mohou být fagocytovány APC buňkou, zpracovány a nabízeny pomocí MHC II.třídy

Reakce imunitního systému s nádorovými buňkami

- Existence nádorově specifických povrchových antigenů – dvě skupiny
- Antigeny specifické pro nádory (TSA – Tumor specific antigens)
- Antigeny asociované s nádory (TAA – Tumor – associated antigens)
 - produkty mutovaných genů (nové proteiny, cukry..)
 - idiotypy myelomů a lymfomů
- Jsou selektivně exprimovány pouze na nádorových buňkách
- Jsou rozpoznávány T- i B-lymfocyty

NÁDOROVÉ ANTIGENY - TSA

Komplexy MHC s abnormálními fragmenty

- a) buněčných proteinů
 - produkty abnormálního štěpení v normálních proteinů v nádorové buňce
 - Produkce specifického abnormálního proteinu (nádory a leukémie s chromozomálními aberacemi)
- b) fragmenty proteinů onkogenních virů
 - Polyoma virus, EBV (B-lymfomy, nasofaryngeální karcinom)
 - HPV (ca čípku)
 - produkty mutovaných genů (nové proteiny, cukry..)
- c) abnormální typy glykoproteinů
- d) Idiotypy myelomů a lymfomů – nádory odvozené od B a T-lymfocytů – vazebná místa jsou unikátní antigenní struktury

NÁDOROVÉ ANTIGENY typu TAA

- **Antigeny asociované s nádory**
- Nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky, liší se od normálních buněk kvalitou exprese, nebo v abnormální časové nebo místní expresi
- Patří mezi pomocné diagnostické markery
- U nádorových buněk se objevují ve vysokých koncentracích

Onkofetální Ag - výskyt v normálních embryonálních buňkách

AFP (alfa-fetoprotein) – fetální sérum, karcinom jater, žaludku, pankreatu

CEA – fetální játra, kolorektální karcinom, ca žaludku, prsa

Oba se monitorují při metastázách

NÁDOROVÉ ANTIGENY typu TAA

- **Změněné glykolipidy a glykoproteinové Ag**
- **Zvýšené množství**
- **Diagnóza, terapeutické cíle**
- **Melanomované Ag**
- **MAGE-3, GAGE-1,2, BAGE** – normální testes, melanom
- **Antigen Her2/neu** – receptor růstového faktoru epiteliálních buněk - různé buňky, mamární karcinom
- **PSA** – prostatický sérový antigen, karcinom prostaty
- **Diferenciační antigeny leukemických buněk** – přítomny v různých diferenciačních stádiích (CD10)

Imunitní systém a maligní nádor

Imunologická úprava nádoru (cancer immunoediting):

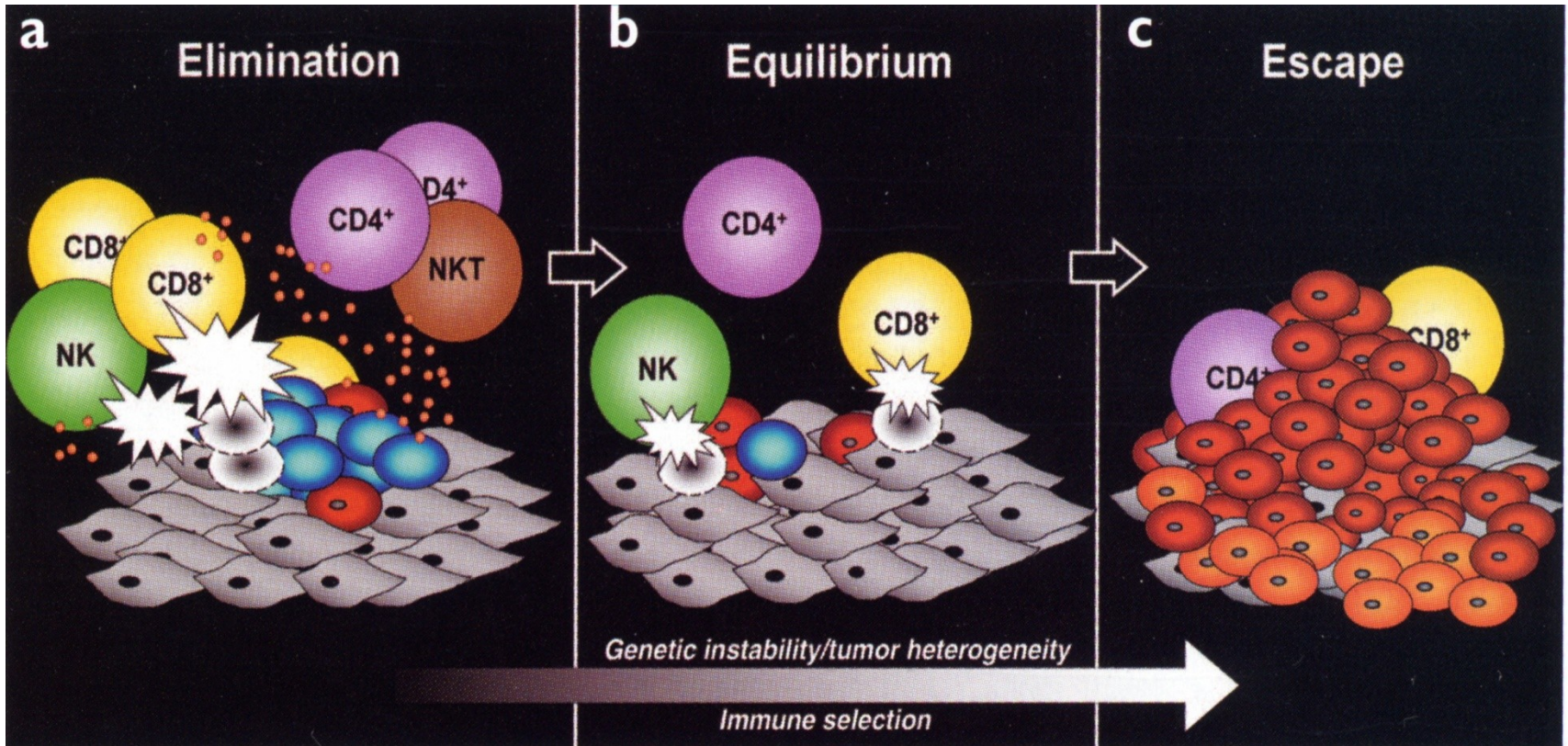
Stadium imunitního dozoru (immunological surveillance) – **eliminace** maligně transformovaných buněk.

Vytvoření **rovnováhy** mezi imunitním systémem a nádorem, selekce rezistentních mutantů – populace nádorových buněk konstantní, pod úrovní klinické detekovatelnosti

Imunitní systém není schopen buňky eliminovat, může trvat až 10 let(melanom, nádor prsu)

Únik maligních buněk před imunitními reakcemi – klinicky detekovatelné

Klonálně expandující nádorové buňky jsou geneticky značně nestabilní a snadno u nich dochází k chromosomálním aberacím



Cancer immunoediting

Dunn GV, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD:
 Nature Immunology 2002; 3:991-998

Buněčná imunita proti nádorům

- Ag nádorových buněk zachyceny APC
- Prezentace Ag na komplexech MHC-II. Třídy
- Komplex MHC II.třídy a peptid – rozpoznán CD4+ T-lymfocyty
- Aktivované T-lymfocyty – produkce cytokinů, které jsou 2.signálem pro konečnou diferenciaci cytotoxických CD8+ T-lymfocytů

Obrana proti nádorům – T-lymfocyty

- **CD4+ Th-lymfocyty**
- Sekrece IFN- γ – aktivace makrofágů
- TNF- α – po vazbě na buňku způsobují její apoptózu
- Zvýšení exprese MHC I.třídy – zvýšení citlivosti k lýze cytotoxickými lymfocyty

- **CD8+ Tc-lymfocyty**
- Rozpoznání a zabití potenciálně maligních buněk exprimujících peptidy:
 - Z mutovaných buněčných proteinů
 - Z proteinů onkogenních virův komplexu s MHC I.třídy

Buněčná imunita proti nádoru

- APC + nádorové Ag – aktivace nádorově-specifických CD4+ pomocných T-ly
- Jeden typ b. (APC) může senzitivovat T-ly na Ag, které se vyskytují na jiné b. (nádorové)
- Vzniklé efektorové cytotoxické T-ly (CTL) rozpoznávají a zabíjejí nádorové b. bez další kostimulace.
- Praxe: vakcíny založené na izolaci a produkci dendritických b. jsou prototypem profesionálních APC pacienta. Po inkubaci s nádorovými Ag mohou stimulovat T-b. odpověď.

Protilátky

- Namířeny proti nádorovým Ag
- EBV –indukovaný Lymfom : Ab proti EBV
- Aktivace komplementu,ADCC
- (Ab-dependent cell cytotoxicity)

X

- Schopnost zabíjet nádorové b. prokázána „in vitro“
- Chybí důkazy k průkazu „in vivo“

NK - buňky

- NK buňky (natural killers, přirození zabíječi)
- In vitro : lýza buněk napadených viry i nádorových b.
- Cíl:
 - Buňky, které neexprimují MHC I.třídy
 - buňky, které jsou obaleny IgG protilátkami
- Aktivitu NK buněk zvyšují IL-2 a IL-12

Makrofágy

- Lýza nádorových buněk
- Produkce TNF
 - Přímé působení – vazbou na receptory způsobují apoptózu
 - Nepřímé působení – trombóza v cévním zásobení

Nejdůležitější obranné mechanismy nádorů proti útoku imunitního systému

- Antigenní variabilita (ztráta nebo alterace TSA a TAA)
- Zvýšená exprese neklasických MHC I (blok NK- buněk)
- Nízká exprese HLA-I antigenů (blokáda CTL)
- Exprese FasL - indukce apoptózy Tc buněk
- Inhibice funkce dendritických buněk
- T-reg inhibice protinádorové reakce T-lymfocytů
- Produkce imunosupresivních cytokinů (TGF- β , IL-10)
- “Enhancement” efekt protinádorových protilátek

JAK NÁDORY UNIKAJÍ PŘED IMUNITNÍ REAKCÍ HOSTITELE

- Aktivně potlačují expresi MHC I.třídy – unikají pozornosti spec.cytotoxických T ly
- Zbavují se Ag, které by mohly vyvolat imunitní odezvu (rychle rostoucí nádory)
- Neexprimují kostimulátory nebo MHC II.třídy (nenavodí stimulaci cytotoxických T ly)
- Nádorové Ag mohou navodit specifickou imunologickou toleranci- obal z glykokalixových molekul (mukopolysacharidy), obal z fibrinu

Monoklonální gamapatie

Důsledek neregulované proliferace jednoho klonu plasmatických buněk tvořících homogenní imunoglobulinové molekuly – „paraprotein“.

„Benigní“: MGUS

Maligní: myelom (plasmacytom)

(tvoří asi 14% všech hematopoetických malignit)

Definice monoklonální gamapatie

Biochemická definice: přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru a v moči (M-Ig)

Klinická definice: Onemocnění či stav patofyziologicky související s klonální proliferací lymfoidní řady B diferencujících se v plazmocyty projevující se přítomností monoklonálního Ig v séru a patologickými lezemi především ve skeletu

Diagnóza monoklonálních gamapatií se stanovuje na základní splnění přijatých kritérií

- **Jak velký je relativní počet plazmocytů v kostní dřeni?** (myelogram v.s. histologie kostní dřeně)
Jsou klonální?
- **Je osteolýza skeletu** či jiný typ poškození skeletu?
(rtg, MR, PET, hyperkalcemie)
- **Je přítomen monoklonální imunoglobulin?**
(imunofixace a denzitometrie M-Ig) a jaká je hladina polyklonálních imunoglobulinů
- **Je přítomen amyloid typu AL?** (histologie)

Waldenströмова makroglobulinemie

Morfologie – dle WHO klasifikace lymfoplazmocytoidní lymfom

Přítomnost monoklonálního imunoglobulinu třídy Ig-M

Klinické projevy nemoci:

anémie

důsledky hyperviskozity – epistaxe, retinopatie, únavnost, neurologické příznaky, cefalea, závratě, nystagmus, ataxie, kvalitativní až kvantitativní porucha vědomí, srdeční selhávání

Lymfomy

(tvoří asi 57% všech hematopetických malignit)

Solidní nádory vycházející z maligní transformace jednoho lymfocytu. Lokalizovány většinou v lymfatických uzlinách, též ve slezině nebo thymu. Mohou být i v difusních lymfatických tkáních, např. v GALT, pak se nazývají extranodální.

Hodgkinský lymfom (HL, cca 12,5%)

Non- Hodgkinský lymfom (NHL, cca 44,5%)

Hodgkinský lymfom

V lymfatické uzlině je několik velkých mnohojaderných buněk (*buňky Reed-Sternbergovy*), které jsou maligně transformované lymfocyty B, zbytek tumorové masy je tvořen tzv. reaktivním infiltrátem z netransformovaných lymfocytů, fibroblastů a jiných buněčných elementů.

Postihuje především mladé pacienty (15-35 let), zvl. mužského pohlaví

Nehodgkinské lymfomy

- Skupina heterogenních nádorů (subtypy z B- i T-buněk).
- Nádorová masa je tvořena prakticky výhradně maligními lymfoidními buňkami.
- Vyskytuje se především u starších osob (65 let) ale významný počet je i u osob mezi 30-40 lety).
- Burkittův lymfom je vázán na EBV, je u dětí.

Leukemie

(tvoří asi 29% všech hematopoetických malignit)

- „Tekuté nádory“ krve, pocházejí z maligně transformovaných prekursorů hematopoetických prekursorů v kostní dřeni nebo zralých hematopoetických buněk v krvi. Mohou být lymfoidní, myeloidní, akutní, chronické.
- V dětském věku je nejčastější akutní lymfoblastická (75%) a myeloidní (20%) leukemie.
- U dospělých se nejčastěji vyskytuje chronická lymfatická leukemie (35%).

Imunologická léčba maligního bujení

- Imunomodulační cytokiny (IFN- α , IL-2)
- Indukce zánětu se stimulací Th1 buněk - BCG vakcína
- Léčba monoklonálními protilátkami (anti-CD20, anti-HER2)
- GVLR po alogenní transplantaci kostní dřeně
- LAK a TIL buňky
- Imunizace nádorovým antigenem v dendritických buňkách, imunizace proti onkogenním virům

Imunoterapie nádorů

- Specifická léčba – cytostatika zabíjejí (poškozují) všechny dělí se b., především b. imunitního systému
- Stimulace aktivní imunitní protinádorové reakce
- a) vakcinace nádorovými b. nebo Ag – podávání vlastních APC (dendritické b.) po jejich inkubaci s nádorovými Ag „in vitro“
- b) stimulace hostitelské imunitní reakce cytokiny a kostimulátory : systémové podání cytokinů (IL 2) stimuluje proliferaci a aktivitu NKb. a cytotoxických T ly (toxické projevy-horečka, plicní edem), IFN alfa (současně s chemoterapií)
- c) nespecifická stimulace imunitního systému (lokální podávání látek, které stimulují zánět)

Imunoterapie nádorů

- Pasivní imunoterapie T_b. A protilátkami.
- a) adaptivní buněčná terapie – pacientovi podávány kultivované imunitní b. s protinádorovou aktivitou
- b) podání protilátek s protinádorovou aktivitou
- MP eliminují nádorové b. opsonizací, fagocytozou a aktivací komplementu
- MP anti Her-2/Neu- namířeny proti produktu onkogenu, Herceptin-nádor prsu.

TRANSPLANTAČNÍ IMUNOLOGIE

Transplantace

- Přenosy tkání nebo orgánů
- Cíl: náhrada nefunkční tkáně nebo orgánu příjemce zdravým ekvivalentem (štěp) od dárce

Štěpy:

- Syngenní – dárce geneticky identický s příjemcem (identická dvojčata)
- **Alogenní** – geneticky odlišní dárci stejného živočišného druhu
- Xenogenní – dárce z jiného živočišného druhu (prase)
 - Nedostatek vhodných dárců - značné množství přirozených protilátek → hyperakutní odhojování → vývoj transgenních prasat – bb by nesly méně antigenů rozeznávaných lidskými přirozenými protilátkami
- Autologní transplantace – přenos tkání jedince na jiné místo jeho organismu
- Implantace – umělé (syntetické) náhrady tkání

Transplantace orgánů, tkání, buněk

Dárce a příjemce:

- Autologní transplantace (autograft)
- Syngenní transplantace (isograft)
- Alogenní transplantace (allograft)
- Xenogenní transplantace (xenograft)

Důsledky histoinkompatibility:

- Rejekce (odvržení, odhojení) štěpu
- Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host reaction – GvHR)

Hlavní histokompatibilní komplex

- Jedná se o genetický systém, který je primárně zodpovědný za **rozeznávání vlastního od cizorodého (Major Histocompatibility Complex)**. U člověka je hlavním histokompatibilním systémem komplex **HLA (Human Leucocyte Antigen)** – rozsáhlý komplex genů, které determinují povrchové molekuly (Ag) umístěné v plazmatické membráně buněk.

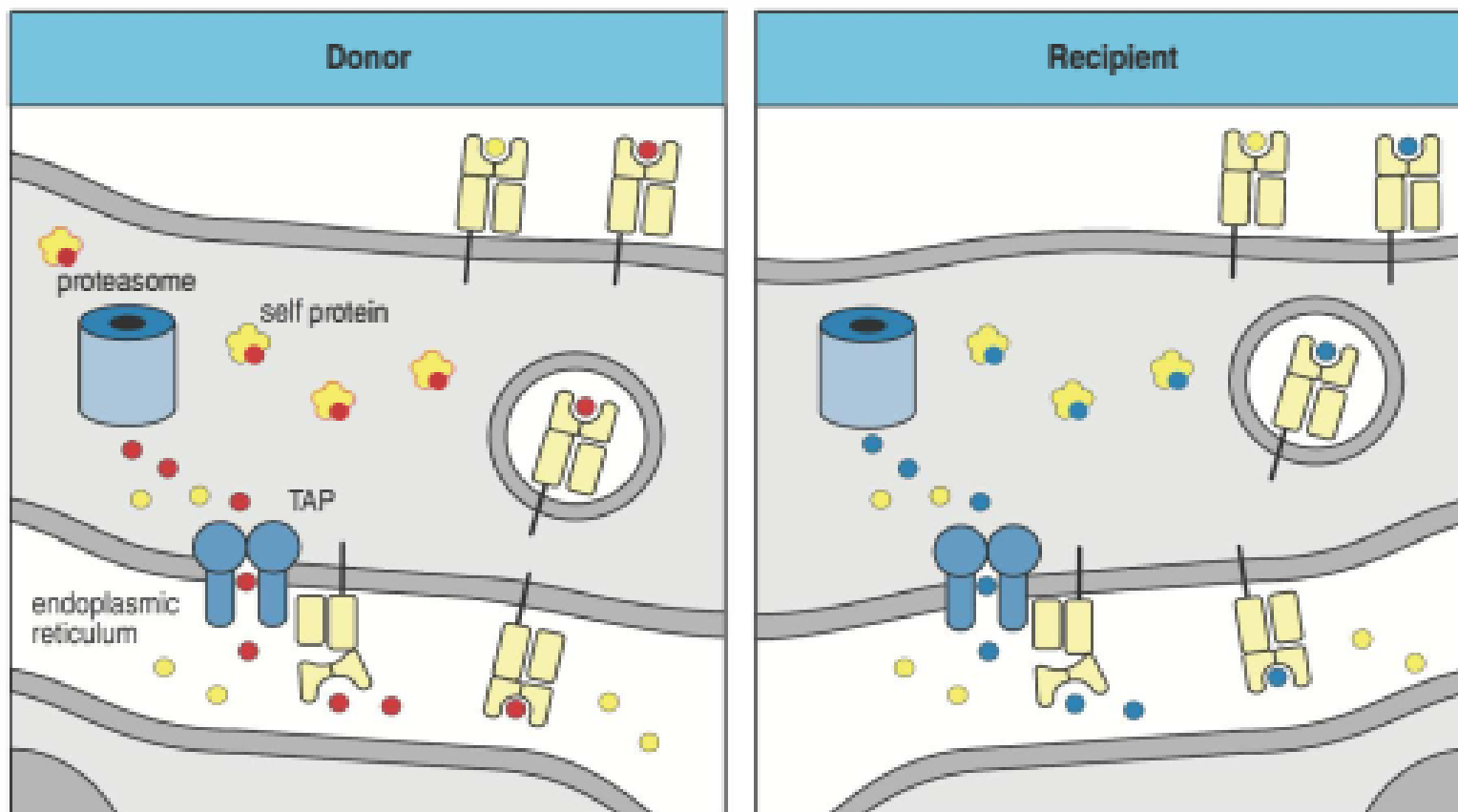
HLA

- Antigeny se chovají jako **transplantační**, tzn. že jsou příčinou odhojení tkáně při inkompatibilních transplantacích
- HLA systém je homologický s lokusem H-2 u myši (systém, na kterém byl poprvé objeven princip histokompatibility) a je lokalizovaný v určitém úseku krátkého raménka chromosomu 6
- Obsahuje geny pro histokompatibilní antigeny, složky komplementu a pravděpodobně i Ir-geny (immune response genes, geny zodpovědné za intenzitu imunitní odpovědi)

Funkce HLA-systému

- Hlavní fyziologickou funkcí molekul MHC je předkládat antigeny nebo jejich fragmenty buňkám imunitního systému, především T-lymfocytům
- Prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce a tím obrany proti napadení mikroorganismy

Prezentace HLA Ag dárce a příjemcem



Polymorphic self proteins that differ in amino acid sequence between individuals give rise to minor H antigen differences between donor and recipient

Druhy transplantace

- Nejčastějším druhem transplantace v klinické praxi jsou krevní transfuze
- Orgánové transplantace – ledviny, srdce, játra, rohovka
- Transplantace kostní dřeně

Orgánové transplantace

- Ortotopická transplantace – na stejné místo
- Ektopická transplantace – na jiné místo organismu
- Transplantované orgány
 - Ledviny
 - Srdce
 - Plíce
 - Játra
 - Pankreat
 - Velké klouby
 - Kůže

Transplantace – vyšetření příjemce štěpu

- Určení krevní skupiny ABO (transplantace orgánů)
- Typizace HLA I (A, B, C)
- Typizace HLA II (DR, DQ)
- Přítomnost autoprotilátek
- Preformované aloproutilátky (panel reactive antibody)
- „Crossmatching“ – přítomnost preformovaných proutilátek specifických pro potenciálního donora
- Kultivace směsi lymfocytů (mixed lymphocyte culture assay)
– shoda v oblasti D.

Kritéria výběru pro transplantace

- Genetický rozdíl (MHC)
- Druhy tkáně – závisí na obsahu buněk, které mají schopnost prezentovat Ag (např. kůže)
- Aktivita imunitního systému příjemce – úprava imunosupresí
- Stav transplantovaného orgánu

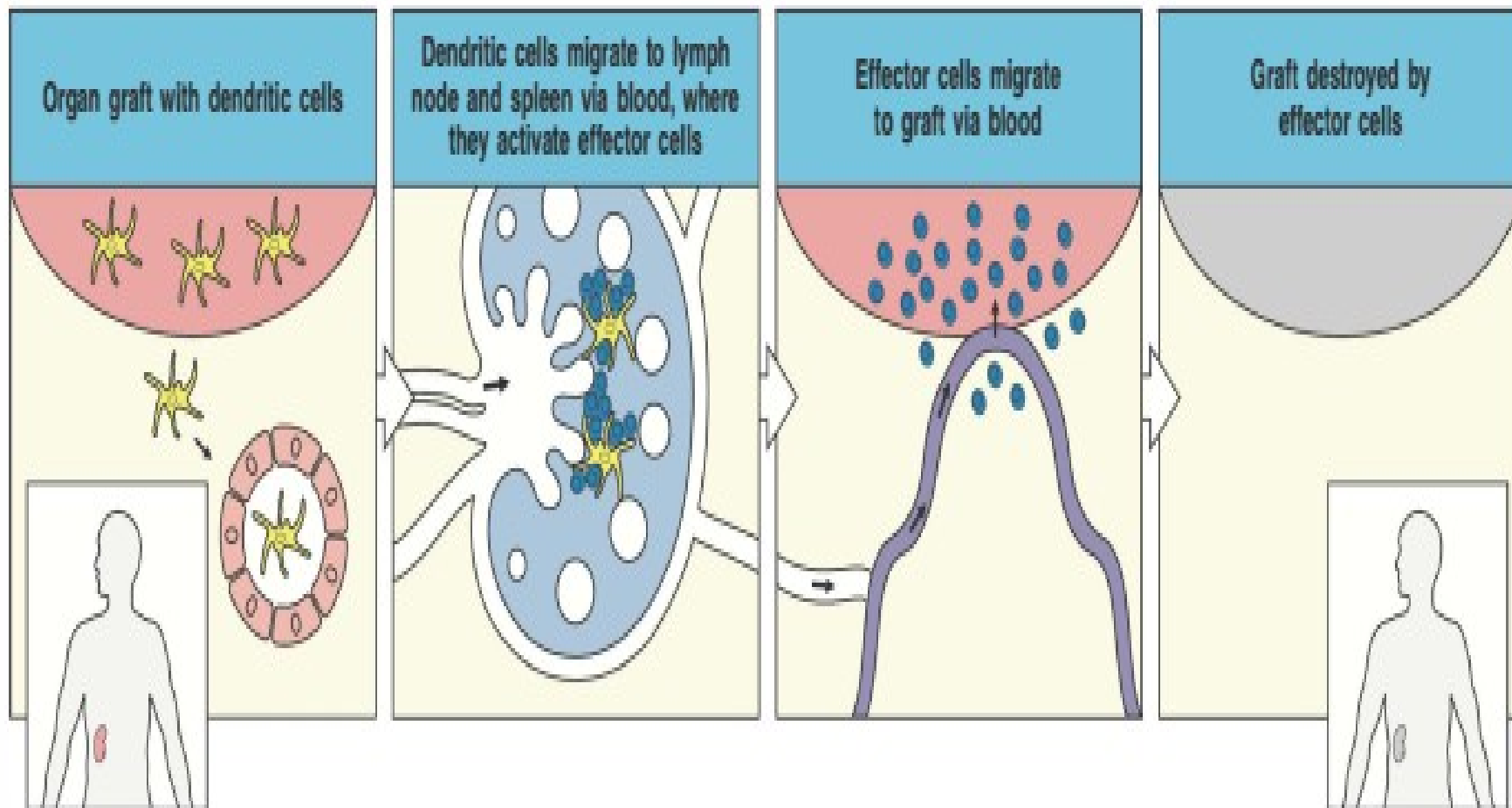
Cross-match

- Sérum příjemce se smíchá s lymfocyty dárce v přítomnosti komplementu...
- Pokud jsou v séru přítomné cytotoxické protilátky - aloantigeny, dojde k lýze dárcových leukocytů za účasti komplementového systému

Rejekce

- nepřijetí tkáně nebo transplantovaného orgánu
- Podílejí se na ní:
 - aloreaktivní T-lymfocyty, kterým jsou prezentovány antigenní peptidy pocházející z hlavních nebo vedlejších histokompatibilitních Ag štěpu nebo transplantátu
 - protilátky proti HLA antigenům dárce
 - Na úroveň poškození transplantovaného orgánu reaguje nespecifická imunita prostřednictvím DAMP signálů

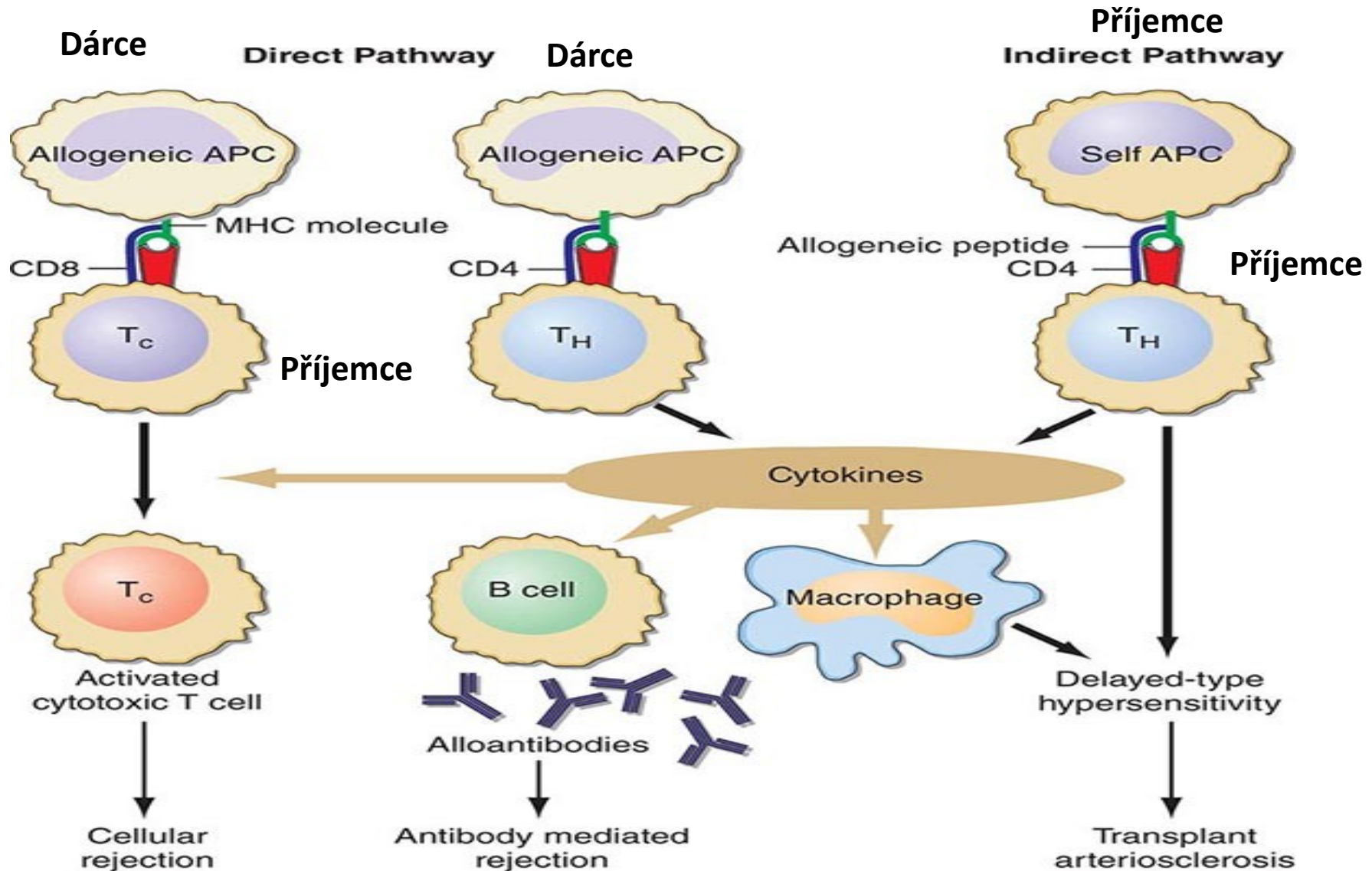
Rejekce



Transplantační – aloimunitní reakce

- Genetický polymorfismus → Imunokompetentní buňky jednoho jedince reagují s antigeny tkání jiného jedince
- vznikají na základě: aloreaktivity ...
- **Aloreaktivita T-lymfocytů: - přímé rozpoznání antigenů**
- T-lymfocyty příjemce jsou schopny rozeznávat jako **cizorodé**:
- odlišné alelické formy MHC gp – vážou různé peptidové fragmenty normálních buněčných proteinů
- T-lymfocyty příjemce náhodně váží na tyto mnohočetné struktury MHC s peptidy, se kterými se nemohly setkat během vývoje a není vůči nim ustanovena tolerance
- Alogenní buňky dárce se imunitnímu systému příjemce jeví jako např. napadané virem

Přímá a nepřímá cesta rozpoznávání



Aloimunitní reakce

- **Aloreaktivita T-lymfocytů: nepřímé rozpoznání Ag**
- odlišné MHC gp dárce jsou zpracovávány APC příjemce a jejich štěpy jsou předkládány T-lymfocytům jako cizorodé Ag
- Průkaz aloreaktivity T-lymfocytů: směsná lymfocytární reakce (MLR)
 - V kultuře smícháme lymfocyty s příměsí monocytů dvou geneticky odlišných jedinců
 - T lymfocyty reagují na alogenní komplexy MHC – nastává aktivace a buněčná proliferace
 - Reagují buňky příjemce na buňky dárce – jednosměrná MLR reakce – buňky dárce se ozáří nebo se vystaví cytostatikům – mitomycinu C – nemůžou se dělit. Další aktivace a proliferace buněk je pak dána reakcí příjemce

Aloimunitní reakce

- vznikají na základě: aloreaktivity ...
- odlišné alelické formy vedlejších histokompatibilních antigenů (MHC dárce a příjemce geneticky shodné) – méně intenzivní aloreaktivita
- Aloantigeny mohou v příjemci transplantátu vyvolávat tvorbu protilátek
- Tvorba protilátek proti aloantigenům – mohou vznikat stejně jako při aktivaci T-lymfocytů
- Nebo mohou být přítomné již před transplantací (krevní transfuze, opakované těhotenství)
- Nebezpečné protilátky proti štěpu jsou takové, které aktivují komplement
- Přítomnost těchto protilátek = kontraindikace transplantace → hyperakutní rejekce

Ovlivnění transplantátu přirozenou reaktivitou

- Stav transplantovaného orgánu závisí
- na okolnostech smrti dárce, které může předcházet cytokinová bouře
- Manipulaci s transplantovanou tkání, zajištění perfuze, chirurgické a tkáňové procedury
- Uvolnění DAMP signálů:
 - Alarminy: HMGB-1 (1hydroxy-2methyl-but-2-enyl 4-pyrofosfát), IL-33, IL-1 α
 - Mediátory uvolněné z cytoplazmy poškozených buněk: DNA, RNA, Hsp proteiny, ATP...
- Vazba na PRR – TLR, C-lektinové receptory...
- Výsledkem je aktivace buněk přirozené imunity spojená s produkcí prozánětlivých cytokinů: IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α , produkce chemokinů a exprese kostimulačních molekul

Ovlivnění transplantátu přirozenou reaktivitou

- Podpora exprese adhezních molekul na stěnách endotelu, zvyšování prostupnosti pro zejména dendritické buňky migrující z transplantované tkáně do lymfatických uzlin příjemce a naopak podpora průniku efektorových buněk do transplantované tkáně
- Podpora rozvoje zánětu především na endotelové výstelce cév transplantovaných orgánů
- Jedná se o nespecifickou odpověď na předoperační a perioperační poškození transplantovaného orgánu a není závislá na HLA dárce a příjemce
- Sama o sobě není schopna vyvolat rejekci

Rejekce transplantátu

Ovlivňující faktory:

- Genetický rozdíl dárce a příjemce v genech kódujících MHC
- Druh tkáně- nejsilnější reakce vznikají proti vaskularizovaným tkáním obsahujícím hodně bb prezentujících antigen
- Aktivita imunitního systému příjemce- imunodeficientní příjemci vyvíjí menší odhojovací reakci, imunosuprese
- Stav transplantovaného orgánu- délka ischemie, způsob uchování, traumatizace orgánu při odběru a samotné transplantaci → vaskulární (popř. chronická) rejekce
- Farmakologická imunosuprese – imunosupresivní léčba – celkový útlum imunitních reakcí

Druhy rejekce

Imunitní reakce protilátkového typu:

- způsobená protilátkami buď přirozenými nebo vytvořenými v důsledku předchozích imunizací
 - **Hyperakutní** (min. – hod.)
 - **Akcelerovaná** (3 – 5 dnů po transplantaci)
- (xenotransplantace, transfuze krve neshodné v ABO systému)

Imunitní reakce proti štěpu:

- **Akutní odhojování** (dny – týdny) – primární imunitní reakce proti štěpu – důsledek útoku Th1 a Tc buněk
- **Chronická** (2 měsíce po transplantaci)- – ischemie tkání, poškození cév – transplantační vaskulární skleróza – nahrazování funkční tkáně vazivem, poškození endotelu a vaskularizace s následnou obliterací cév → poruchy prokrvení štěpu a postupná ztráta funkce
- Způsobená protilátkami (nejčastější) nebo T-lymfocyty (Reakce pozdní přecitlivělosti – vznik Th2 a Th3 – vznik aloprotilátek a fibrogenních faktorů)

Transplantační – aloimunitní reakce

- Genetický polymorfismus → Imunokompetentní buňky jednoho jedince reagují s antigeny tkání jiného jedince

→ Odhojení – rejekce transplantátu

- Transplantát vnímán imunitním systémem příjemce jako cizorodý
- Orgánové transplantace

→ Reakce štěpu proti hostiteli (GvH)

- Imunokompetentní buňky ve štěpu reagují s tkáněmi příjemce
- Imunodeficientní pacienti
- Transplantace hematopoetických kmenových buněk

Aloantigeny:

- **MHC glykoproteiny** (HLA antigeny)
- **Vedlejší histokompatibilitní antigeny** (polymorfní tkáňové antigeny)

→ **alorektivita T-lymfocytů**

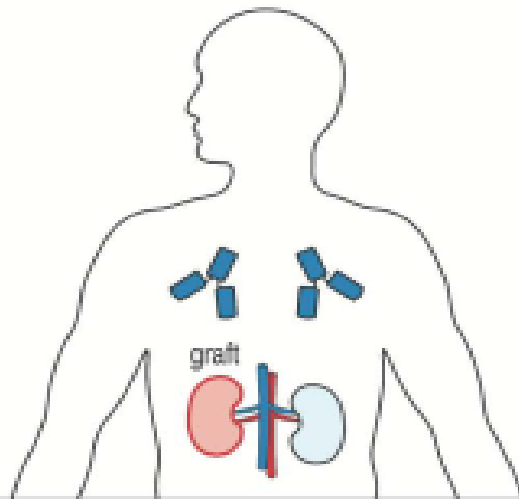
tvorba protilátek proti aloantigenům

Úloha protilátek při transplantaci

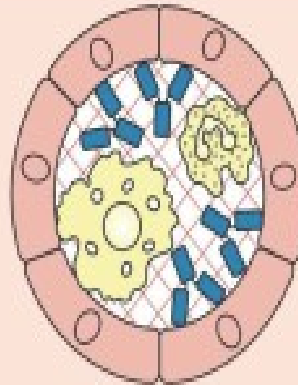
- Protilátky jsou namířeny proti HLA Ag transplantátu – Donor specific antibodies (DSA)
- Klinicky nejvýznamnější jsou ve třídě IgG – namířeny proti HLA I. a II. třídě a také proti molekulám MICA a MICB (=non HLA- antigeny MHC class I Chain related A, MHC class I Chain related B)
- Váží se na své Ag cíle na endotelové výstelce transplantátu
- Po vazbě aktivují komplement – dochází k rozvoji zánětu, který poškozuje endotelové buňky a aktivaci koagulační kaskády
- Protilátky poškozují štěp mechanismem ADCC
- Účastní se všech typů rejekce, dominují u hyperakutní rejekce
- Přítomnost DSA protilátek u příjemce – nepříznivý faktor ovlivňující prognózu přežití transplantovaného orgánu
- Hladina protilátek koreluje s rizikem rejekčních příhod
- Nález IgG protilátek proti antigenům HLA- I. třídy – kontraindikace k transplantaci
- Nález IgG protilátek proti antigenům HLA- II. třídy – kontraindikace k retransplantaci
- Odstranění protilátek - plasmaferézou

Protilátková rejekce

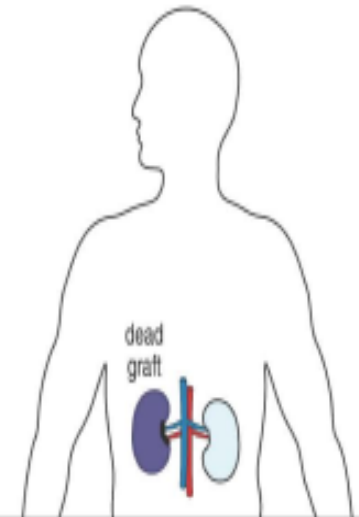
Normal kidney grafted into patient with defective kidney and preexisting antibodies against donor antigens



Antibodies against donor antigens bind vascular endothelium of graft initiating an inflammatory response, which occludes blood vessels



Graft becomes engorged and purple-colored because of the hemorrhage



Program transplantace orgánů

- živý dárce versus **kadaverózní** dárce
- Příjemce imunogenetické vyšetření pacienta (čekatele):
 - HLA typizace (A,B,DR – sérologie, nízké rozlišení DNA)
 - Autoprotilátky
 - Pravidelný screening anti-HLA protilátek
- Imunogenetické vyšetření kadaverózního dárce - statim
 - HLA typizace (A,B,DR – sérologie, nízké rozlišení DNA)
 - Cross-match (sérum pacienta s lymfocyty dárce)
 - před vlastní transplantací

Transplantace hematopoetických kmenových buněk

- (= transplantace kostní dřeně)
- Cíl: osídlení dřeně příjemce kmenovými buňkami dárce → vznik celé krvetvorby
- Kmenové buňky z kostní dřeně, pupečnickové krve, z periferní krve dárce po stimulaci růstovými faktory
- Poruchy krvetvorby, imunodeficience, vrozené metabolické vady, leukemie, léčba ozáření, těžce probíhající autoimunitní choroby
- Vždy se jedná o rizikovou proceduru zatíženou velkou mírou morbidit a letality

Transplantace hemopoetických kmenových buněk

Zdroj:

kostní dřeň (*odběr z lopaty kosti kyčelní*)

periferní krev (*dárce „stimulován“ růstovými faktory k zvýšení tvorby kmenových buněk*)

pupečnicková krev (*zdroj nezralých kmenových buněk omezené imunogennosti*)

Typy transplantace:

autologní

alogenní

Průběh transplantace

- **Myeloablace** – zničení vadných kmenových buněk příjemce
je potřeba uvolnit prostor v kostní dřeni, ozářením nebo farmakologicky, od doby myeloablace do doby přihojení nemá pacient prakticky žádné periferní leukocyty, je ohrožen infekcemi, proto je nutné dodržovat sterilní podmínky
- **Suspenze směsi dřevňových buněk do periferní žíly**- kmenové buňky si najdou cestu do kostní dřene a usídlí se tam (předepsaný počet buněk na kg)
- **Engraftment – přihojení**- ve chvíli, kdy je detekována krvetvorba: erytro → granulo → trombo → lymfocyty
- Odvržení stěpu – rejekce – zástava krvetvorby pocházející od dárce, obnova krvetvorby příjemce
- Reakce stěpu proti hostiteli

Pluripotentní kmenové buňky

- Expresí znaku CD34 a CD45, CD117, CD133 a další
- Nízký podíl – méně než 1%
- Pro transplantaci bb je nutné získat pro štěp dostatečný počet kmenových buněk
- U autologní transplantace, nebývá imunologický problém, ale je problém se získáním vzorku dřene před započítím nemocí, jinak nutnost zbavit dřeň nádorových buněk

Poškození krvetvorby u osob trpících nádorovým onemocněním

- Neselekční působení chemoterapie a radiační terapie na buňky kostní dřeně
- Nutná podpora krvetvorby
- Aplikace rekombinantních růstových faktorů: G-CSF, GM – CSF – řešení neutropenie
- Neřeší se trombocytopenie – důsledek: krvácivé projevy
- Autologní transplantace bb. kostní dřeně nebo kmenových buněk krvetvorby

Transplantace kmenových buněk periferní krve

- Alogenní transplantace
- Není přítomna úplná deplece buněk kostní dřeně, což snižuje riziko komplikací
- Umožňuje vysokodávkovou chemoterapii nádoru, která by bez kmenových buněk nebyla možná
- Časté použití při léčbě non-Hodgkinských lymfomů v relapsu, mnohočetného myelomu, akutní myeloblastické leukémie
- Někdy se používá i při léčbě solidních nádorů a autoimunitních chorob (RA, SLE, SM)

Transplantace kmenových buněk periferní krve

- Pacient je uveden do remise běžným terapeutickým postupem
- Po dosažení požadované leukopenie v periferní krvi se začnou podávat růstové faktory, nejčastěji G-CSF
- Prudká stimulace krvetvorby, pluripotentní kmenové buňky jsou častěji uvolňovány do periferie
- Z ní se získávají leukafarézou – oddělení leukocytů a plasmy
- Z takto získaných buněk se magneticky separují
- Štěp by měl dosahovat 5×10^6 CD34+ buněk na kilogram příjemce
- Poté následuje léčba vysokodávkovými režimy – vede k útlumu krvetvorby
- Poté se podávají kmenové buňky

Transplantace kmenových buněk pupečnickové krve

- Vysoký obsah CD34+ - více než 1% z jaderných elementů
- Po porodu zůstává v placentárních cévách až 150ml fetální krve, možno získat 80-100ml
- obsah kmenových buněk v této krvi postačuje na úplnou transplantaci u dětí nebo dospělých s nízkou hmotností
- Stoupá procento využití v budoucnosti

Složení pupečnickové krve

- Vysoký počet leukocytů
- Snížen celkový počet T-lymfocytů
- T-lymfocyty mají nižší známky aktivace (nižší exprese CD25 a HLA-DR)
- Vyšší zastoupení NK buněk
- Jiné zastoupení pluripotentních prekurzorových buněk krvetvorby (erytrocyty, monocyty, megakaryocyty)
- Zastoupení prekurzorových buněk je podobné jako v kostní dřeni

T-lymfocyty v pupečnickové krvi

- Nejen nižší počet, ale i trvale snížená odpovídavost na alogenní podněty
- Navíc nízká produkce IL-12 přítomnými APC
- Snížení výskytu reakce štěpu proti hostiteli
- Využití při léčbě krevních malignit – akutní myeloblastické leukémie, chronické myeloidní leukémie, ale i neuroblastomu
- Dále nenádorová onemocnění např. idiopatická aplastická anémie, srpkovitá anémie, různé typy SCID a další

Výhody transplantace pupečnickové krve

- Buňky je možné zamrazit na dlouho dobu v tekutém dusíku
- Využití v případě onemocnění daného jedince
- Použití pro alogenní transplantace
- Minimální riziko přenosu infekčních agents, včetně CMV a EBV
- Je možné tyto buňky využít pro genové manipulace – např. vnesení intaktních genů pro vyléčení geneticky podmíněných nemocí
- Nevýhody:
 - u relapse maligních onemocnění není reakce štěpu proti hostiteli, ve které by T-lymfocyty dárce napadaly maligně transformované buňky příjemce
 - Není známo jestli dárce trpí geneticky přenosnou chorobou

Obnova imunitního systému po transplantaci kmenových buněk

- Postupně dochází k úpravě počtu jednotlivých druhů leukocytů
- Obnova funkcí těchto buněk může trvat měsíce až roky
- V podstatě nikdy úplně nedojde k úplné restauraci všech složek imunity do optimálních fyziologických hodnot
- Nejrychleji se obnovují NK-buňky – po pěti měsících je dosaženo normálních hodnot i funkčnost

Obnova T-lymfocytů po transplantaci kmenových buněk

- T-lymfocyty normálně dozrávají v thymu – ve věku nad 40let je to ale nefunkční tkáň
- Extrathymová diferenciaci – zpravidla v gastrointestinálním traktu a v játrech
- Rychleji se zvyšuje počet CD8+ T-lymfocytů a to až nad fyziologickou mez, podíl CD4+ T-lymfo je dlouhodobě snížen (CD8+ T-lymfocyty mají i větší radiorezistenci)
- Obnova funkcí u CD8+ T-lymfocytů – zhruba po třech měsících u CD4+ T-lymfo to trvá déle
- Mají sníženou proliferační aktivitu, tvoří méně IL-2
- Zdrojem T-lymfocytů mohou být také prekurzory T-lymfocytů příjemce, které přežily přípravný režim
- Prekurzory T-lymfocytů dárce v transplantovaném štěpu
- Byl zaznamenán přenos imunity vůči konkrétnímu virovému agens z dárce

Obnova B-lymfocytů po transplantaci kmenových buněk

- Podíl B-lymfocytů je výrazně snížen po dobu prvních 9-ti měsíců po transplantaci
- Po tuto dobu nesou B-lymfocyty znaky nevyzrálých buněk např. CD10, tzv. transientní B lymfocyty
- Zdrojem B-lymfocytů – kmenové buňky ve štěpu nebo rezidující kmenové buňky v příjemci, dále B-lymfocyty v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a ve slezině
- Jsou přítomny i ve štěpu
- Byl prokázán i přenos specifické humorální imunity z dárce na příjemce
- Dynamika tvorby Ig je podobná jako u dětí

Reakce štěpu proti hostiteli

- Akutní GvHD (I.-IV. stupeň závažnosti)
postihuje- kůže, střevo, játra
Fáze 1: „Priming” (příprava) imunitní odpovědi
Fáze 2: Aktivace T-lymfocytů, kostimulace
Fáze 3: Proliferace a diferenciaci aloreaktivních T-lymfocytů
Fáze 4: Migrace aktivovaných T-lymfocytů do cílových orgánů
Fáze 5: Poškození cílových tkání efektorovými T-lymfocyty
- Chronická GvHD (limitovaná/extenzivní)
podobnost s chronickým autoimunitním postižením

Reakce štěpu proti hostiteli

- Začíná už před vlastní transplantací – ozáření, cytostatika – rozsáhlé poškození buněk příjemce (játra a slizniční imunitní systém)
- Uvolnění značného množství prozánětlivých cytokinů a chemoků (IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IFN- γ)
- Dlouhodobý důsledek zvýšená exprese HLA I. a II. třídy na buňkách příjemce
- Po infuzi štěpu jsou jako první napadány endotelové buňky cévního řečiště
- T-lymfocyty ve štěpu rozeznávají tkáňové antigeny příjemce jako cizorodé (aloreaktivita) a reagují proti nim

Reakce štěpu proti hostiteli

- **T-lymfocyty ve štěpu rozeznávají tkáňové antigeny příjemce jako cizorodé (aloreaktivita) a reagují proti nim**
- Akutní GvH – dochází k poškození jater, kůže a střevní sliznice - co nejbližší gen. příbuzný dárce, odstranění T-lymfocytů a imunosuprese
- Chronická GvH – tvorba Th2, aloprotilátek, produkce cytokinů – vede k fibrotizaci tkání

Reakce štěpu proti leukemickým buňkám (GvL)

Garft – versus - leukemia

- **T-lymfocyty ve štěpu reagují vůči zbytkovým leukemickým buňkám příjemce**
- **Schodný s akutní GvH**

- GvH – nežádoucí reakce
- GvL – žádoucí reakce
- Řešení - T-lymfocytů ze štěpu + imunosuprese → omezení rizika GvH reakce X riziko návratu onemocnění! → po přihojení kostní dřeně aplikovat malé dávky periferních T-lymfocytů dárce – navození specifické tolerance

Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host reaction, GvHR)

- Makulopapulární exantém
generalizovaná erythrodermie
puchýře, deskvamace
- Zvýšení koncentrace bilirubinu v séru
- Průjem, velké bolesti břicha, ileus

Možnosti potlačení transplantačních rejekcí a reakce proti štěpu hostiteli

- Výběr dárců geneticky blízkých příjemců
- Použití imunosupresivních léků
- Procedury odstraňující T-lymfocyty dárce ze štěpu
- Purifikace kmenových buněk z periferní krve

Imunosupresivní léčba

- Indikována především u autoimunitních chorob, vaskulitid, a **u pacientů po transplantacích**.
- Vyjimečně používána u těžkých alergických chorob nebo u onemocnění způsobených nadměrnou aktivací T-lymfocytů (psoriáza).
- Léčba vždy **vede k sekundární imunodeficienci** - náchylnosti k infekcím, častější výskyt malignit, zejména lymfatického systému.
- Ke snížení výskytu vedlejších reakcí se obvykle používá kombinovaná léčba.

Imunosupresiva zasahující do metabolismu IL-2

- Kalcineurinové inhibitory: Blokují funkci Ca^{2+} -dependentního kalcineurinu, tím blokují aktivaci NFAT. Nedojde k derepresi genu pro IL-2.
 - Cyklosporin A- vazba na cyklofilin
 - Tacrolimus (FK 506) vazba na FKBP
- Sirolimus (Rapamycin) - blokuje přenos signálu z IL-2, též se váže na FKBP.

NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells FKBP: FK- Binding Protein

Glukokortikoidy jako imunosupresiva

- Imunosupresivně působí především dávky 0,5-1 mg Prednisonu/kg/den, udržovací dávka bývá u dospělých 5-10 mg Prednisonu/den.
- Mechanismy účinky:
 - Snížená produkce cytokinů (IL-1, TNF- α , IL-2)
 - Snížení exprese adhezivních molekul
 - Inhibice exprese HLA-II
 - Inhibice fosfolipázy A2 v granulocytech - blok tvorby metabolitů kyseliny arachidonové.
- Vedlejší činky: redistribuce tuku, vznik vředové choroby, steroidní diabetes, hypertenze, poruchy růstu dětí, hypokalémie, osteoporóza, katarakta, psychózy....

REPRODUKČNÍ IMUNOLOGIE

REPRODUKČNÍ IMUNOLOGIE

se zabývá studiem funkce imunitní soustavy
v reprodukčních orgánech.

Imunologie / imunopatologie:

- mužského (uro)genitálního traktu
 - ženského genitálního traktu
 - fertilizace
 - nidace
 - těhotenství

Imunitní soustava dozrává perinatálně, tedy je také uzavírána "inventura" vlastních antigenů

ALE !!

**zralé gamety, jejich přídatné tkáně
a endokrinně aktivní buňky
se objevují až v období puberty**

**jejich orgánově specifické antigenní znaky
jsou proto vnímány jako cizí**

Podmínkou přežití gamet je dobře fungující soubor pasivních a aktivních ochranných mechanismů, specifických pro orgány reprodukční soustavy (např. hematotestikulární "bariéra").

Speciální ochranu vyžaduje také semialogenní plod, rostoucí v děloze matky.

Imunitní soustava v reprodukčních orgánech má tudíž dvě protichůdné povinnosti:

- chránit vnitřní stálost**
- umožnit existenci "cizorodých" gamet a semialogenního plodu**

Hematotestikulární bariéra

- specializovaná buněčná bariéra mezi krví a vyvíjejícími se spermiogenními buňkami v semenotvorných kanálcích [varlat](#)
- tvořena pevnými spojeními v oblasti baze Sertoliho buněk.
- chrání zárodečné buňky před toxickými látkami obsaženými v krvi a zároveň vytváří imunologickou bariéru
- diferenciace spermatogonií začíná až v období puberty
- organismus vytvořeny imunokompetentní buňky, které by mohly nově vzniklé spermie identifikovat jako "cizí,"
- brání kontaktu imunitního systému s diferencujícími se spermii a zabraňuje tak autoimunitní odpovědi

Imunita v reprodukčním traktu muže

Co a jak musí vyřešit:

a) ochránit před infekcí, vadnými buňkami atd.

Obranné mechanismy slizniční imunity, t.j. makrofágy / fagocyty, NK a LAK (lymfokiny aktivované NK buňky), specifické mechanismy humorální a buněčné imunity.

b) umožnit dozrání relativně „cizorodých“ spermií, aniž by byly napadeny vlastní imunitní reakcí.

Mechanismy zabezpečující imunologickou toleranci k spermiím:

pasivní ochrana – nízká antigenicita spermií a jejich prekurzorů

převaha tlumivých buněk (Th2)

Patologická imunitní reakce proti mužským gonádám

- získané poruchy imunity v urogenitálním traktu, typicky záněty, poruchy prokrvení, ale i punkce a biopsie varlat, anální sex u bisexuálů, ale někdy ji vyvolá i vrozená porucha imunity
- Způsobuje
 - poškození spermií během jejich vývoje, zejména kvůli buňkami zprostředkované imunitě, dále například blokádu spermií protilátkami

Imunologie reprodukce – negativní mechanismy - muži

- Přítomnost protilátek proti spermiím
- Důvody vzniku – narušená hematotestikulární bariera z důvodů poranění, po vasektomii, chronické infekce urogenitálního traktu, častější u homosexuálních mužů
- V ejakulátu se pak nacházejí Ig třídy IgG a IgA
- Ve spermatu infertilních mužů často zvýšený počet leukocytů - vznik reaktivních kyslíkových radikálů – perforace cytoplazmatické membrány spermií – zabránění fúze s plazmatickou membránou vajíčka

Imunita v reprodukčním traktu zdravé ženy

Co a jak musí vyřešit:

a) ochránit před infekcí, vadnými buňkami atd.

Obranné mechanismy slizniční imunity, t.j. fagocyty, NK a LAK buňky, specifické mechanismy humorální a buněčné imunity.

b) umožnit dozrání relativně „cizorodých“ vajíček a přídavných tkání

pasivní ochrana – nízká antigenicita povrchu
zona pelucida a buněk cumulus oophorus
převaha tlumivých buněk (Th2) ve stromatu ovaria,
folikulární tekutině a tubách

Imunita v reprodukčním traktu zdravé ženy

Co a jak musí vyřešit:

a) ochránit před infekcí, vadnými buňkami atd.

Obranné mechanismy slizniční imunity, t.j. fagocyty, NK a LAK buňky, specifické mechanismy humorální a buněčné imunity.

b) umožnit dozrání relativně „cizorodých“ vajíček a přídavných tkání

pasivní ochrana – nízká antigenicita povrchu
zona pelucida a buněk cumulus oophorus
převaha tlumivých buněk (Th2) ve stromatu ovaria,
folikulární tekutině a tubách

Zona pelucida

- glykoproteinový obal vajíčka savců –
produkován samotným vajíčkem v průběhu
oogeneze
- Funkce:
 - selekce spermií (nepoškozené spermie)
 - Zabránění polyspermie – vajíčko je oplozeno více
než jednou spermií

Cumulus Oophorus

- Obal z folikulárních buněk vaječnickového folikulu v závěrečném stádiu před ovulací
- Koordinuje dozrávání vajíčka, zvyšuje fertilizaci

Imunologické bariéry reprodukčních orgánů ženy

- Nejsilnější ochrana v děložním krčku
- Zde působí makrofágy – možnost ovlivnění spermií
- Imunita v urogenitálním traktu je tlumena cytokiny - TGF β
- Imunita je ovlivněna mikroflórou, věkem údobím menstruačního cyklu, těhotenstvím a přítomností infekce

Imunologické bariéry reprodukčních orgánů ženy

- Přirozenou složkou mikroflóry – Gram-
pozitivní tyčky z rodu *Lactobacillus* – k osídlení
dochází v pubertě (10^8 organismů/gram
vaginální tekutiny)
- Nízké pH
- Tvorba peroxidu vodíku- laktobacily

c) ochránit spermie v době ovulace před napadením imunitním systémem ženy

pasivní ochrana – potlačení imunogenních HLA znaků na povrchu spermií

aktivní mechanismy – zejm. změny v imunologických vlastnostech cervikálního hlenu v době ovulace
ze strany muže – přítomnost imunosupresivních faktorů v seminální plazmě

d) tolerovat „semialogenní“ plod

imunologie nidace a těhotenství

Imunologie reprodukce – negativní mechanismy - ženy

- zvýšená přítomnost protilátek proti spermiím u chronických infekcí
- Pohyb spermií je ovlivněn navázáním protilátek – navázání IgG nebo IgA na bičík neovlivňuje schopnost pronikat hlenem děložního hrdla
- navázáním protilátek zejména třídy IgA nebo kombinace IgG a IgA na hlavičku spermie – výrazně omezuje pohyb
- IgG možnost aktivace komplementu x spermie mají na svém povrchu CD46 – brání aktivaci komplementového systému

Reprodukční soubor laboratorních vyšetření

- 1. protilátky proti fosfolipidům
- 2. protilátky proti spermiím
- 3. protilátky proti zona pellucida
- 4. protilátky proti ovariím
- 5. protilátky proti annexinu V
- 6. protilátky proti tkáňové transglutamináze
- 7. antinukleární protilátky
- 8. [protilátky proti thyreoperoxidáze]
- 9. počet cirkulujících NK (natural killers) buněk
- 10. intracelulární produkce cytokinů

Protilátky proti spermiím – cílové antigeny

- protilátky proti spermiím – cílové antigeny
- specifické proteiny spermií
 - heat shock proteiny (HSP70, HSP70-2)
 - disulfid izomeráza (ER60), kaspáza 3
 - podjednotky proteasomu - komponenta C2 a zeta-řetězec
- metoda stanovení – ELISA
 - v séru, v seminální plazmě, v ovulačním hlenu, v peritoneální a folikulární tekutině

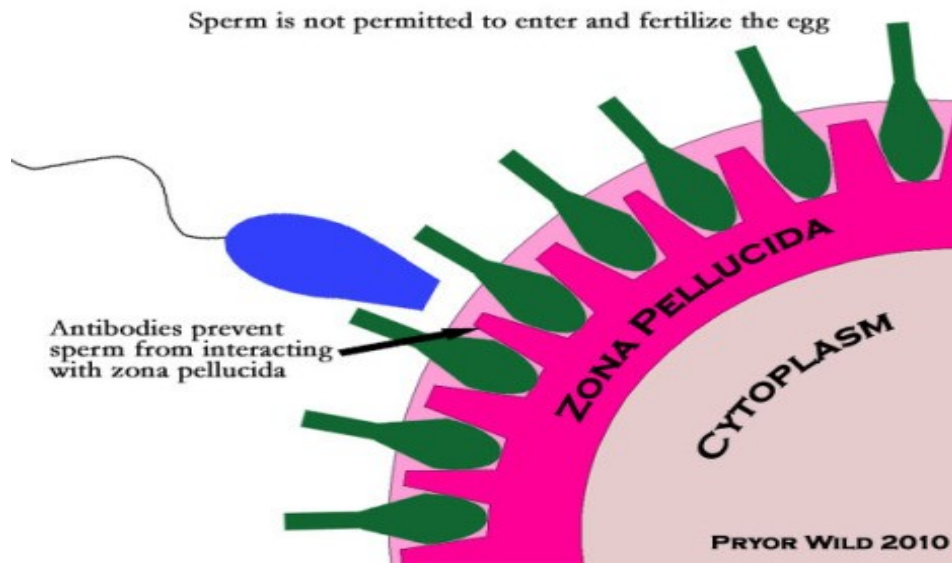
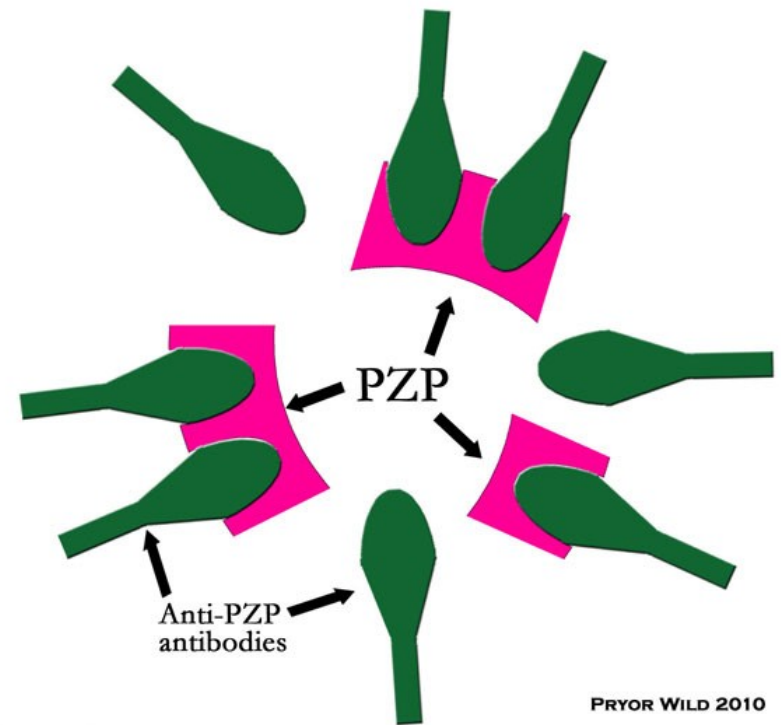
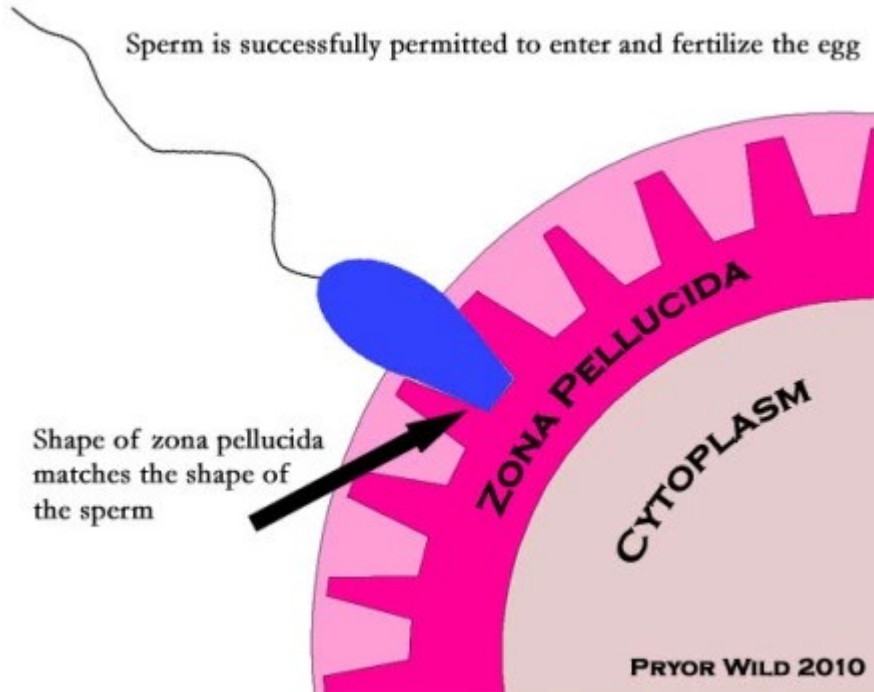
Protilátky proti ovariiám

- vyskytují se až u 2/3 žen s diagnózou předčasného ovariiálního selhání
- cílové antigeny: specifické ovariiální proteiny derivované z ooplasmy oocyty, buněk theca granulosa a corpus luteum
- metody stanovení: nepřímá imunofluorescence (řezy opičích ovarii),
- ELISA (aktinin-4, heat shock 70 protein 5, cytoplazmatický aktin)

Protilátky proti zona pellucida

- cílový antigen: proteiny extracelulární matrix oocyty, které mají významnou úlohu při folikulogenezi a fertilizaci
- nemožnost průniku spermie do oocyty jak při pokusech o fyziologickou koncepci, tak i při technikách IVF
- Metody stanovení: nepřímá imunofluorescence, ELISA

Protilátky proti zona pellucida



Protilátky proti annexinu V

- ANNEXIN V - placentární antikoagulační faktor
vysoká exprese na buňkách tvořící se placenty
- **Význam:** interference s implantací embrya -
ovlivnění placentace v průběhu invaze
trofoblastu
- **Indikace:** spontánní potraty zejm. v 1.
trimestru
- **Metody stanovení:** ELISA

Protilátky proti tkáňové transglutamináze

- Celiakie – gluten-senzitivní enteropatie
- „silent“ forma bez GI příznaků
- jediná a účinná terapie – bezlepková dieta
- porucha plodnosti při celiakii – malabsorpce?
- jiné mechanismy?

NK buňky (natural killers, přirození zabíječi)

- NK buňky jsou významně zastoupeny v děložní sliznici, kde v průběhu implantace embrya plní řadu fyziologických funkcí.
- U žen s primární idiopatickou sterilitou a u habituálního potrácení bylo zjištěno zvýšené zastoupení NK buněk v periferní krvi
- Dysregulace NK aktivity s patologickým vlivem NK cytotoxicity na spermie a/nebo buňky trofoblastu

Imunologie těhotenství

**Oplozené vejce,
pak embryo a další přídatné tkáně
představují pro matku cizorodý,
"semialogenní" štěp.**

Imunologie těhotenství

Oplozené vejce,
pak embryo a další
přidatné tkáně
představují pro matku
cizorodý,
"semialogenní" štěp.

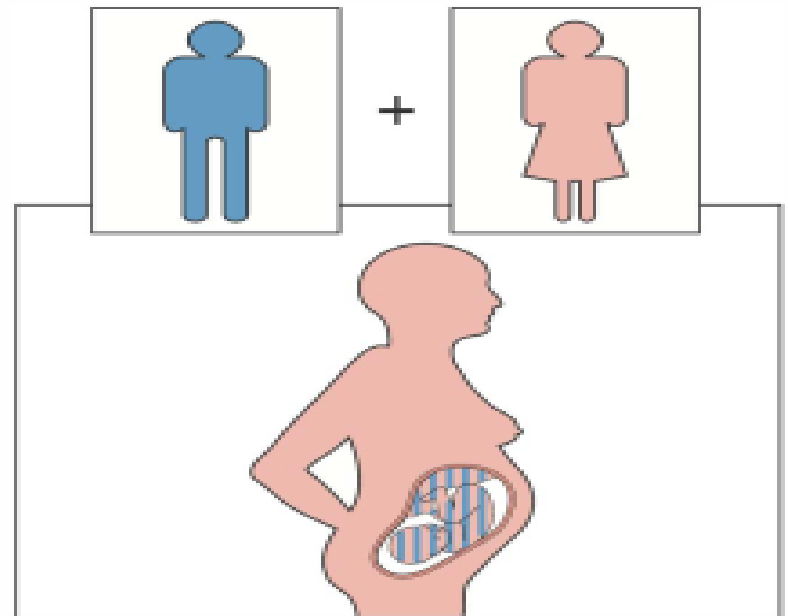


Fig. 15.50 The fetus is an allograft that is not rejected. Although the fetus carries MHC molecules derived from the father, and other foreign antigens, it is not rejected. Even when the mother bears several children to the same father, no sign of immunological rejection is seen.

Imunitní buňky v urogenitálním traktu ženy

- Slizniční výstelka dělohy – přeměna v deciduální tkáň – vstup a vývoj lymfocytů – 70% je tvořeno populací CD56+NK buněk, malá frakce T-lymfocytů – typu Th2
- Převaha Nk buněk v první polovině těhotenství

Embryonální ochranné mechanismy

- pasivní: velmi nízká exprese klasických HLA znaků A,B,C na buňkách cytotrofoblastu (chybějí antigeny HLA-DR a DQ, které jsou nutné pro aktivaci imunitní odpovědi)
- aktivní: produkce nespecifických tlumivých působků (alfa-fetoprotein, hCG) a indukce Th2 buněk v mateřské deciduální tkáni
- **Klíčovou funkci má produkt embryonálního HLA-G genu – HLA-G je ligandem pro inhibiční receptory NK buněk**

Mateřské ochranné mechanismy

- jsou spouštěny embryonálními faktory (produkty HLA-G, hCG, AFP)
- snížení koncentrace "toxických" Tc lymfocytů v periimplantační zóně i v oběhu
- převaha Th₂ nad Th₁, CD8 nad CD4
- deciduální makrofágy a monocyty mají sníženou fagocytární schopnost, navíc produkují embryoprotektivní faktory
- snižuje se produkce IL-2 i exprese rIL-2 na lymfocytech v periimplantační zóně i v oběhu

Transplacentární přenos faktorů imunity

- v 3. trimestru se dostává z plodu do mateřského oběhu cca 200 000 buněk denně - zejména buňky trofoblastu

do oběhu plodu pronikají transplacentárně

- mateřské lymfocyty („mikrochimerismus“)
- imunoglobuliny (IgG) (úloha FcRn)

Význam kojení

- Hlavním imunoglobulinem v mateřském mléku je **sekreční IgA**: neutralizuje viry, je baktericidní, agreguje antigeny, brání adhezenci bakterií na povrch epitelových buněk
- buňky v mateřském mléku :
 - **fagocyty**, především makrofágy
 - **lymfocyty**, především CD4
- Hlavním zdrojem je kolostrum

Hladiny imunoglobulinů v séru před a po narození

