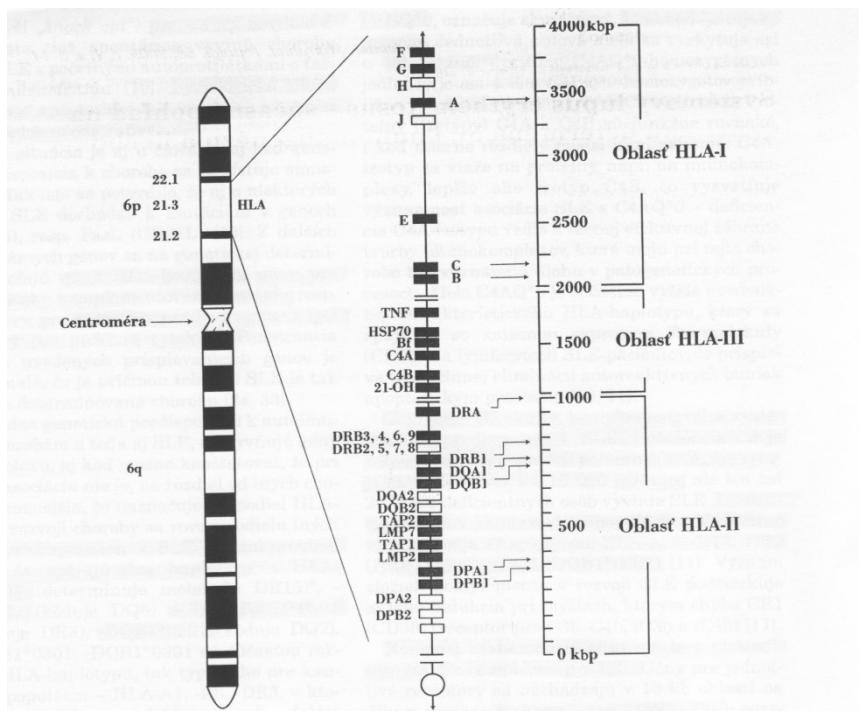


HLA SYSTÉM, JEHO STRUKTURA A FUNKCE

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

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** : jejich produkty glykoproteiny jsou **exprimovány na povrchu všech jaderných buněk** (transplantační, klasické)
- neklasické geny **HLA-E, -F, -G** (glykoproteiny - omezený výskyt)

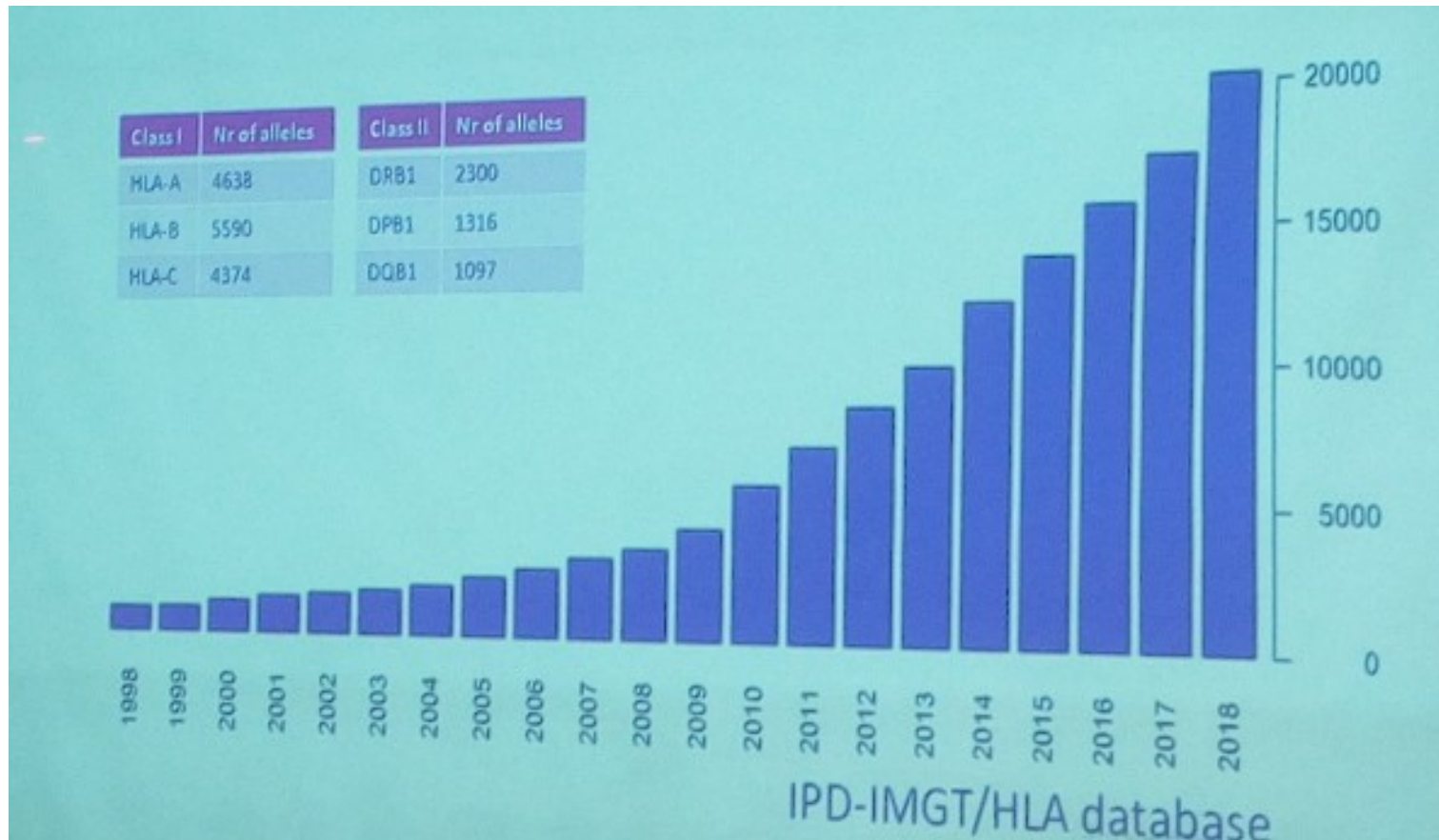
HLA II. třída zahrnuje geny:

- **-DR, -DQ, -DP** : jejich produkty glykoproteiny jsou **exprimovány na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk**
- geny **-DM, -DO** : jejich produkty nejsou exprimovány na buněčné membráně (endozomy)

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

Počet alel stále vzrůstá



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 (zahrnují v sobě vždy skupinu antigenů)]**
- 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:
 - úroveň „**low resolution**“
př. HLA-A*02, *31, B*08, *44, C*02, *12, DRB1*04, *13, DQB1*07, *08
 - úroveň „**high resolution**“
př. 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
- 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

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 cizorodé agens, tzn., že imunitní systém musí rozlišovat mezi „vlastními“ a „cizími“ antigeny.*
- HLA restrikce - buněčné receptory T lymfocytů (TCR) rozpoznávají cizorodé antigenní peptidy navázané na molekuly HLA I. či II.tř.
- 2 způsoby prezentace cizorodých antigenů T lymfocytům:
 - endogenní (HLA I. tř.)
 - exogenní (HLA II. tř.)

Další funkce

- 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

Exprese a distribuce HLA molekul

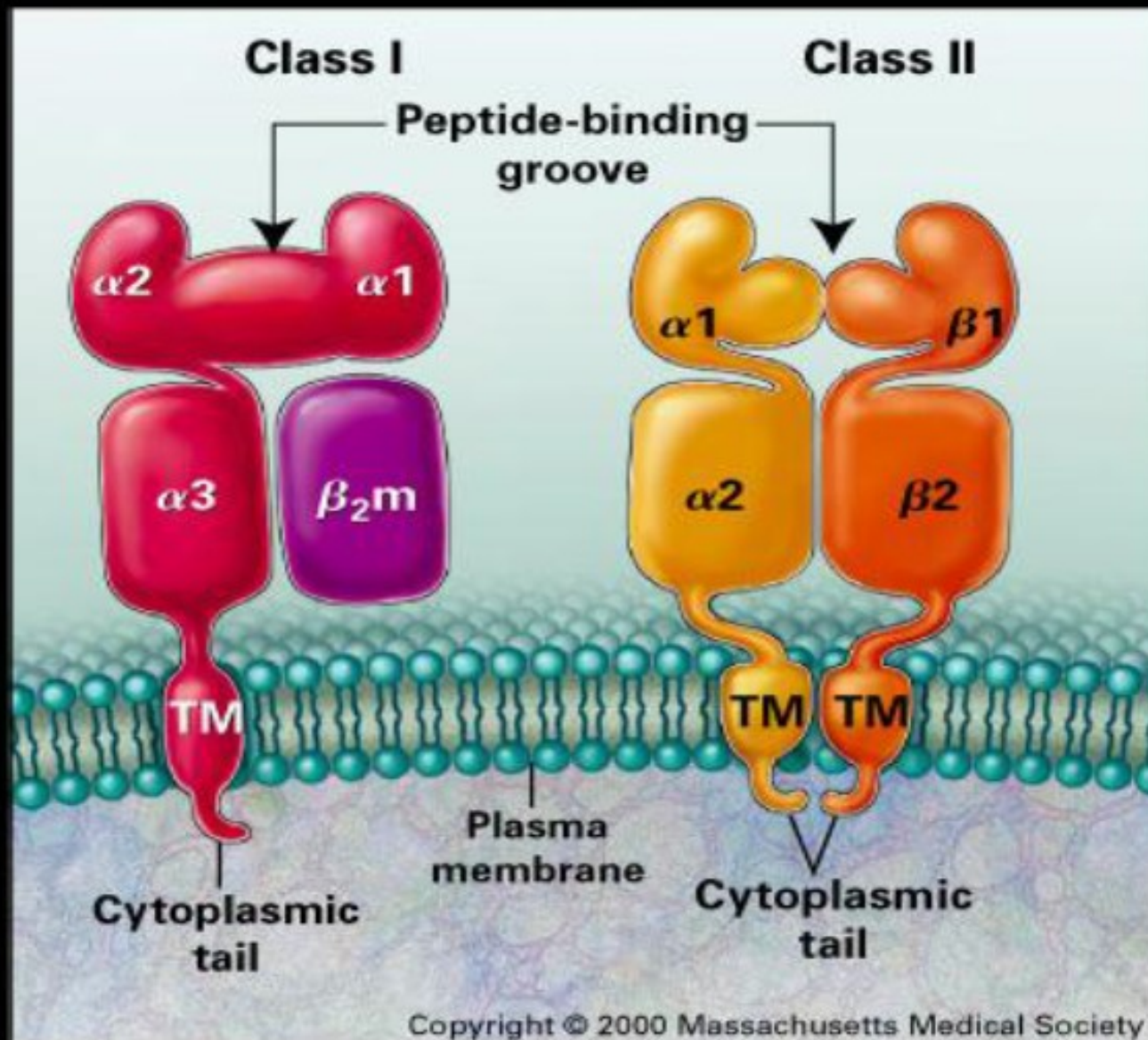
- produkty genů HLA I. tř. - nalezeny na všech jaderných buňkách
- HLA geny exprimovány kodominantně – oba geny (alely) každého HLA lokusu se vyjádří syntézou polypeptidového řetězce HLA produktu
- na mladých červených krvinkách – atypický antigenní systém Bga, Bgb, Bgc (reziduální HLA antigeny)
- plazma – solubilní HLA antigeny
- produkty genů HLA II. tř. – omezená distribuce na APC: B lymfocyty, makrofágy, dendritické buňky, Langherhansovy buňky kůže, některé endoteliální buňky

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

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



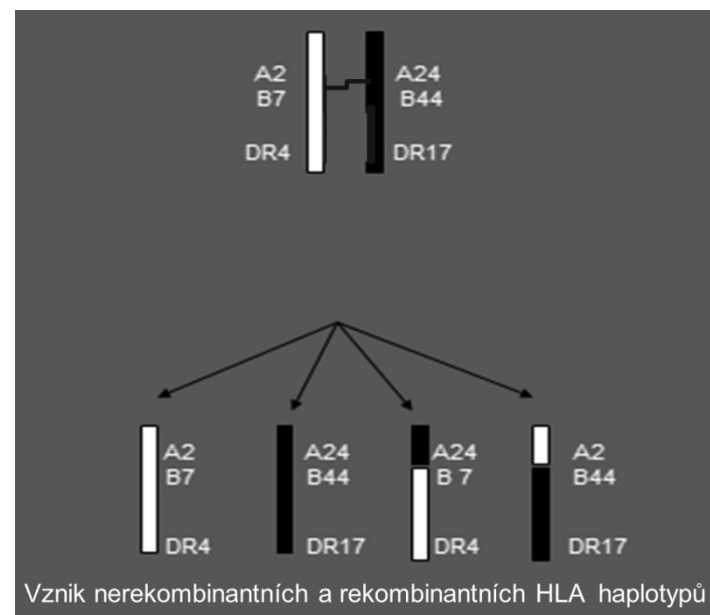
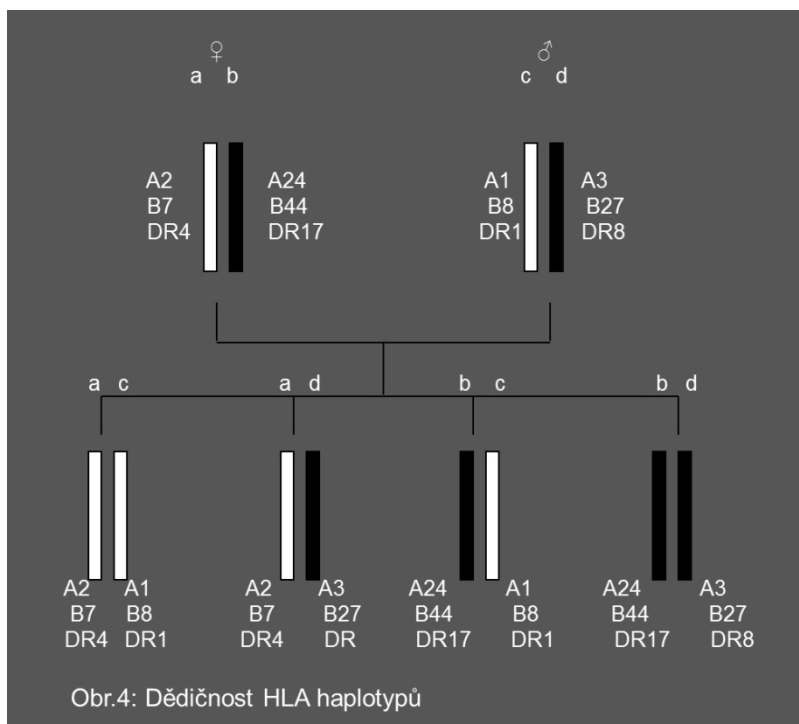
Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine

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



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 environmentální faktory (např. mikroorganismy, stres, ...)

Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

Birdshot retinopathy	-A29	RR=200
Ankylosing spondylitis (M.Bechtěrev)	-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
Multiple sclerosis	-DR2, -DQ6	4

Typizace HLA antigenů

- Pro účely transplantace nebo krevní transfuze (trombocytové TP) - vyšetření dárce i příjemce
- vyšetření HLA znaků asociovaných s chorobami

• 1. Serologické metody

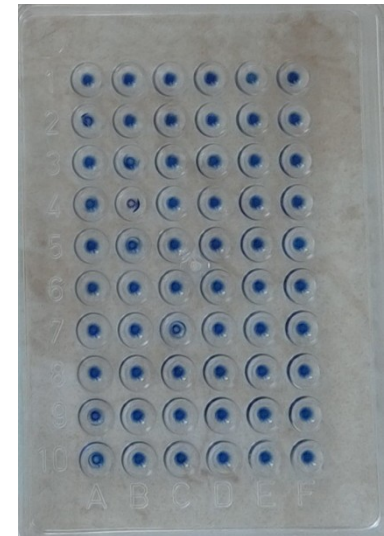
• **Lymfocytotoxický test (LCT)**

- Lymfocyty inkubovány na Terasakiho deskách se specifickými antiséry, poté přidán komplement. Pokud došlo k vazbě Ag-Ab, dojde k rozpadu lymfocytů s navázanou protilátkou (obarvení usmrcených buněk)
- Hodnotí se skóre mikroskopicky

• 2. Molekulárně-genetické metody

• **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

- Izolace DNA, amplifikace DNA, detekce produktu PCR



Terasakiho deska

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

- 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).

Požadavky na dárce orgánů

- žijící dárce

- přibližně 10% dárců představují u nás **žijící dárce 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.

Protilátky proti leukocytům a trombocytům

- V imunologii leukocytů a trombocytů hrají důležitou roli imunoglobuliny třídy IgG, IgM a IgA

- Antigeny leukocytů
 - 1. antigeny společné s erytrocytárními – AB0, Le, P, I, ...

 - 2. antigeny specifické pro leukocyty
 - specifické antigeny lymfocytů **HLA antigeny**
 - specifické antigeny granulocytů **HNA antigeny**
 - specifické antigeny monocytů **HMA antigeny**

- Antigeny trombocytů
 - 1. antigeny společné s erytrocytárními – AB0, Le, P, I, ...

 - 2. HLA antigeny I. třídy (HLA-A, -B a -Cw)

 - 3. specifické antigeny trombocytů **HPA antigeny**

Anti-HLA protilátky

- nejčastěji lymfocytotoxiny (vážou komplement), méně často leukoaglutininy
- většinou IgG, méně často 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 (poškození plic způsobené transfuzí)**
 - 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)

Anti-HLA protilátky

Klinické syndromy způsobené anti-HLA protilátkami

➤ **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

System HNA (Human Neutrophil Antigens)

- Známo 7 antigenů, které jsou uspořádány do 5 HNA systémů:

ISBT Human neutrophil alloantigens (HNA) nomenclature.

Antigen system	Carrier glycoproteins	CD	Antigens	Former names	Alleles
HNA-1	Fc γ Receptor IIIb	CD16b	HNA-1a	NA1	<i>FCGR3B*01</i>
			HNA-1b	NA2	<i>FCGR3B*02</i>
			HNA-1c	SH	<i>FCGR3B*03</i>
HNA-2	NB1 glycoprotein	CD177	HNA-2a	NB1	<i>CD177*01</i>
HNA-3	unknown (GP 70–95)		HNA-3a	5b	<i>unknown</i>
HNA-4	MAC-1; CR3; $\alpha_M\beta_2$ -integrin	CD11b	HNA-4a	MART	<i>ITGAM*01 (230G)</i>
HNA-5	LFA-1; $\alpha_L\beta_2$ -integrin	CD11a	HNA-5a	OND	<i>ITGAL*01 (2372G)</i>

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

- viz. výše

➤ Autoimunitní neutropenie u dětí

- vyvolaná antigranulocytárními autoprotilátkami nejčastěji proti HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-4a

HPA antigeny

- Antigeny specifické pro trombocyty
- Nachází se na glykoproteinech destičkových membrán, většina HPA antigenů je součástí GPIIb/IIIa
- na trombocytech 6 bialelických systémů - **HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-15**

(celkem 33 HPA alel, další systémy jsou jednoalelové s nízkou frekvencí výskytu)

<i>Antigen</i>	<i>Glycoprotein</i>	<i>Encoding Gene</i>	<i>Phenotypic frequency</i>
<i>HPA-1a, HPA-1b</i>	GPIIIa	ITGB3	72% 1a/1a 26% 1a/1b 2% 1b/1b
<i>HPA-2a, HPA-2b</i>	GPIb α	GPIBA	85% 2a/2a 15% 2a/2b 1% 2b/2b
<i>HPA-3a, HPA-3b</i>	GPIIb	ITGA2B	37% 3a/3a 48% 3a/3b 15% 3b/3b
<i>HPA-4a, HPA-4b</i>	GPIIIa	ITGB3	>99.9% 4a/4a <0.1% 4a/4b <0.1% 4b/4b
<i>HPA-5a, HPA-5b</i>	GP1a	ITGA2	88% 5a/5a 20% 5a/5b 1% 5b/5b

Table 1: Commonly implicated human platelet antigens (HPA) in fetal and neonatal allo-immune thrombocytopenia (FNAIT). Adapted from: Roback JD. Technical Manual. American Association of Blood Banks (AABB); 2014.

Anti-HPA protilátky

- antitrombocytární protilátky jsou většinou třídy IgG, často také IgM a zřídka IgA
- 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)