

# HLA systém, jeho struktura a funkce

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

# Historie

- 1930 – 1940- MHC geny nejdříve rozpoznány u myší na základě pokusů s transplantacemi tumorů u myší
- 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 obsahuje geny:**

- –A, -B, -C pro těžký řetězec  $\alpha$  molekul **HLA-A, -B, -C**, jejich produkty (glykoproteiny) jsou exprimovány na povrchu téměř všech 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

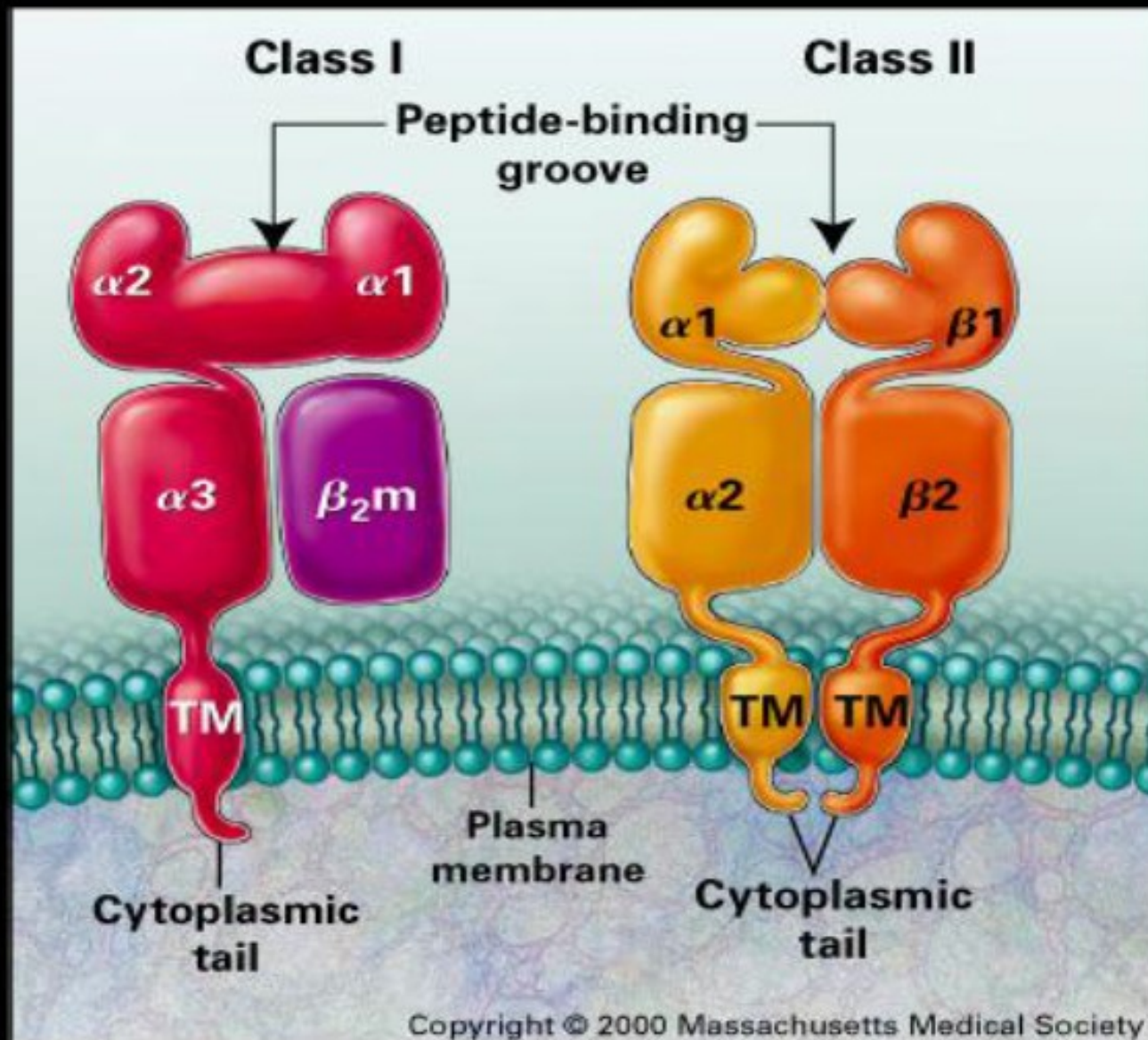
## HLA II. třída obsahuje:

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

## HLA III. třída obsahuje:

geny kódující strukturálně a funkčně odlišné proteiny

- složky **komplementu C4, C2, faktor B, 21-hydroxylasa, TNF, heat shock protein Hsp 70**

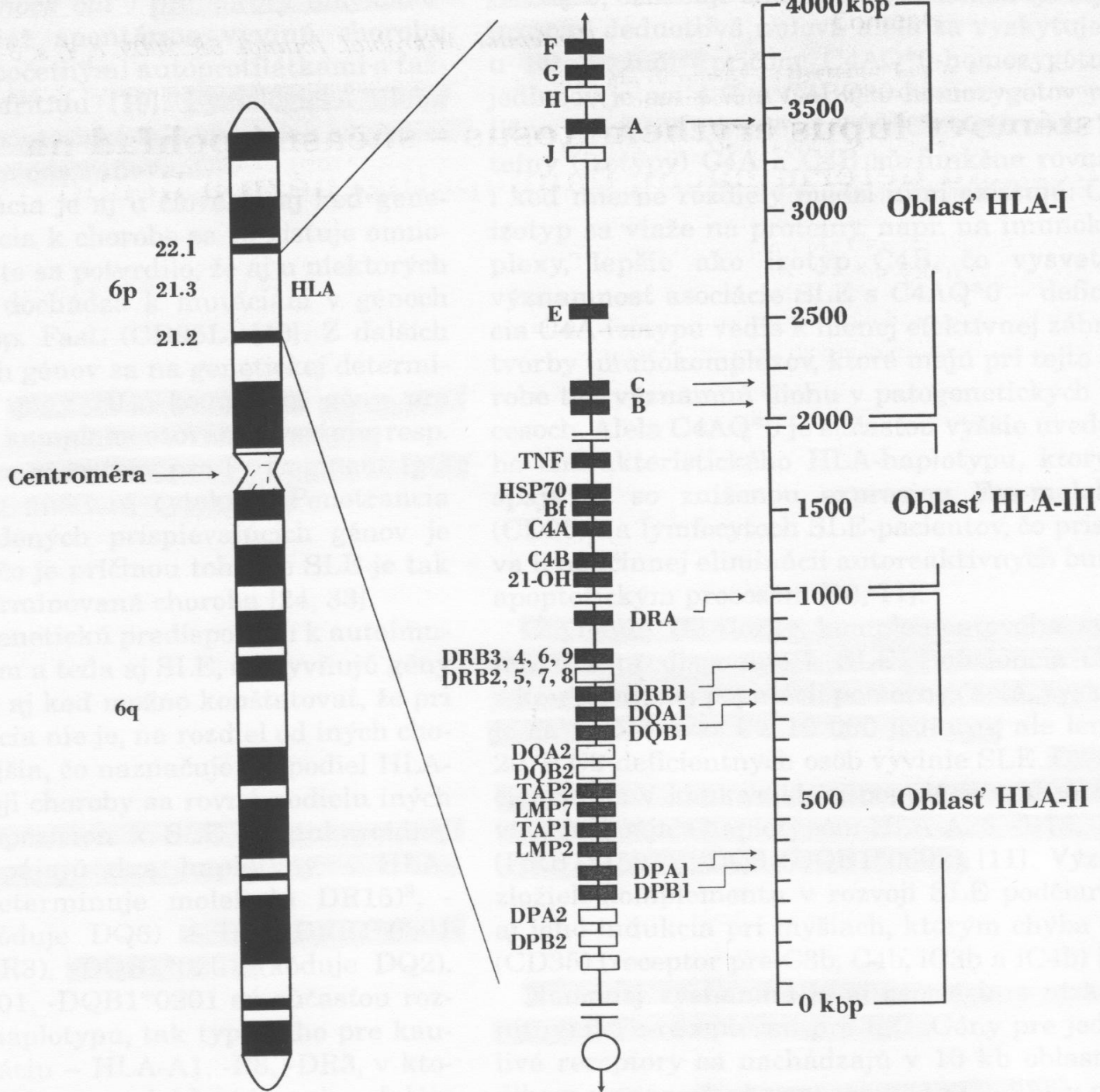


Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. N Engl J Med 2000;343:702-9.



The New England Journal of Medicine





# 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 ciz. antigenů T lymfocytům - endogenní (HLA I. tř.)
  - exogenní (HLA II. tř.)

## PŮVOD PEPTIDŮ

Odkud pocházejí cizorodé antigeny rozpoznávané T lymfocyty:

Patogeny A)

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

B)

- replikace v endosomech a lysosomech (bakterie, paraziti)
- **proteiny buňkou pohlcené - exogenní zdroj**
- 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



## Endogenní prezentace antigenů T buňkám

Původ peptidů prezentovaných pomocí HLA I – cytoplasmatické/endogenní

- virové proteiny jsou syntetizovány na ribosomech
- **ubiquitin** - označení proteinu určeného k likvidaci
- **proteasom** - rozštěpení proteinu  
multikatalytický proteinázový komplex buňky  
štěpení proteinů za spotřeby ATP na peptidy
- **TAP1/TAP2** (Transport of Antigenic Peptides)  
transport peptidů z cytosolu do endoplasmatického retikula – ATP
- naložení peptidu na HLA molekulu I. třídy a transport na povrch buňky
- CD 8+ cytotoxické T lymfocyty - Tc  
Tc lymfocyty rozpoznávají komplex HLA I .tř./ virový peptid a mohou zabít infikované buňky dříve než dojde k replikaci viru.

## Exogenous Antigen Presentation Pathway

### Původ peptidů prezentovaných HLA II – exogenní

- Peptidy prezentované HLA molekulami II. třídy jsou odvozeny od mikroorganismů ( exogenní zdroj ), do buňky se dostávají endocytózou a jsou obaleny plazmatickou membránou – tzv. endosom, který později fúzuje s lysozomem a dochází ke štěpení exogenních antigenů na peptidy pomocí **LMP**.
- Nově syntetizovaná HLA molekula II. tř. je v ER sdružena s tzv. invariantním proteinem Ii, který ji chrání před naložením peptidu z endogenního zdroje.
- HLA molekula II. třídy se setkává s exogenním peptidem ve struktuře **MIICs** ( **MHC class II loading compartments** ).
- v MIICs dochází k odstranění Ii pomocí DM a naložení exogenního peptidu na molekulu HLA II. třídy a transport na povrch antigen prezentující buňky.

Komplex HLA II.tř./peptid je rozpoznán TCR CD4 pozitivních T buněk ( pomocné T lymfocyty - Th), které stimulují B lymfocyty k produkci protilátek.

## 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



A. Normal HLA Tissue Distribution



B. No HLA Class I Molecules



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



## 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
<b>BUŇKY IMUNITNÍHO SYSTÉMU</b>		
<b>dendritické buňky</b>	+++	+
<b>makrofágy</b>	+++	++
<b>T lymfocyty</b>	+++	+
<b>B lymfocyty</b>	+++	+++
<b>JINÉ JADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>neutrofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>eosinofilní granulocyty</b>	+++	-
<b>epitelové buňky</b>	+++	-
<b>hepatocyty</b>	+	-
<b>nervové buňky</b>	+	-
<b>buňky ledvin</b>	+	-
<b>NEJADERNÉ BUŇKY</b>		
<b>trombocyty</b>	++	-
<b>erytrocyty</b>	-	-

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

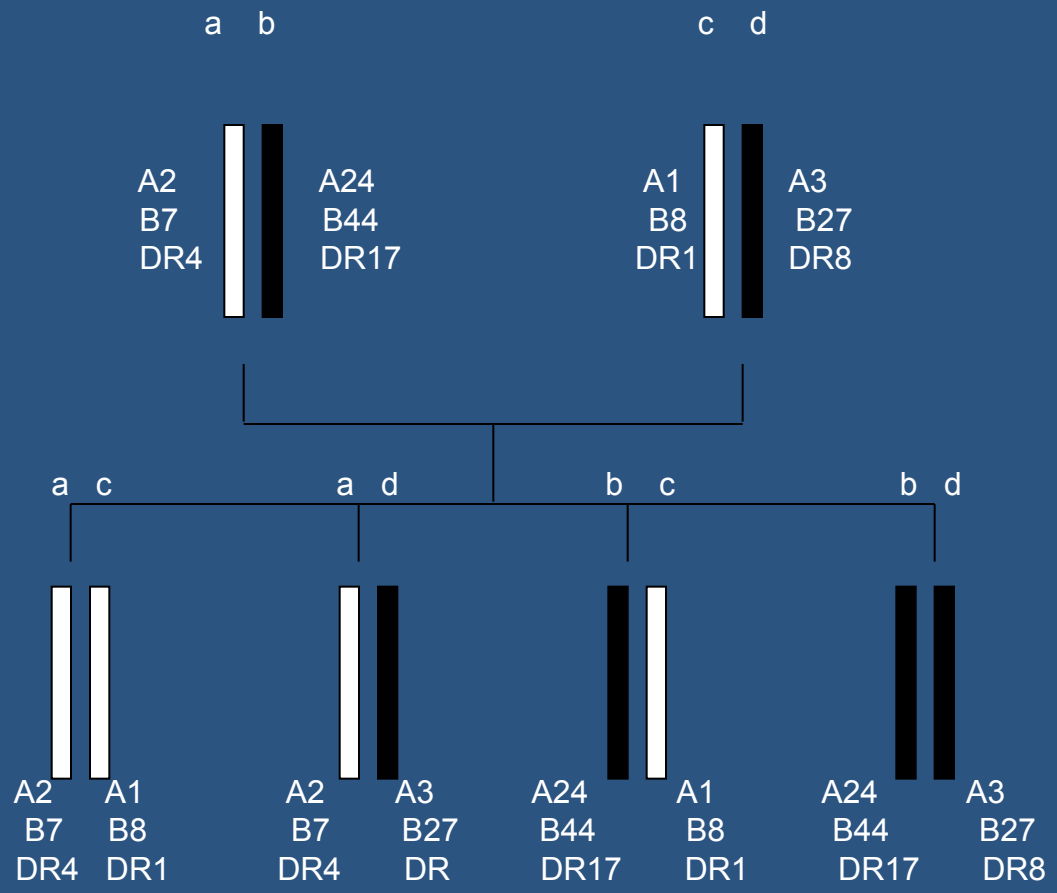
Charakteristika	HLA I	HLA II
Struktura	$\alpha$ řetězec + $\beta$ 2m	$\alpha$ a $\beta$ řetězce
Domény	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\alpha$ 3 + $\beta$ 2m	$\alpha$ 1, $\alpha$ 2 a $\beta$ 1, $\beta$ 2
Buněčná exprese	téměř všechny jad.buňky	APC (B buňky, dendritické buňky, makrofágy)
Peptidy vázající místo	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

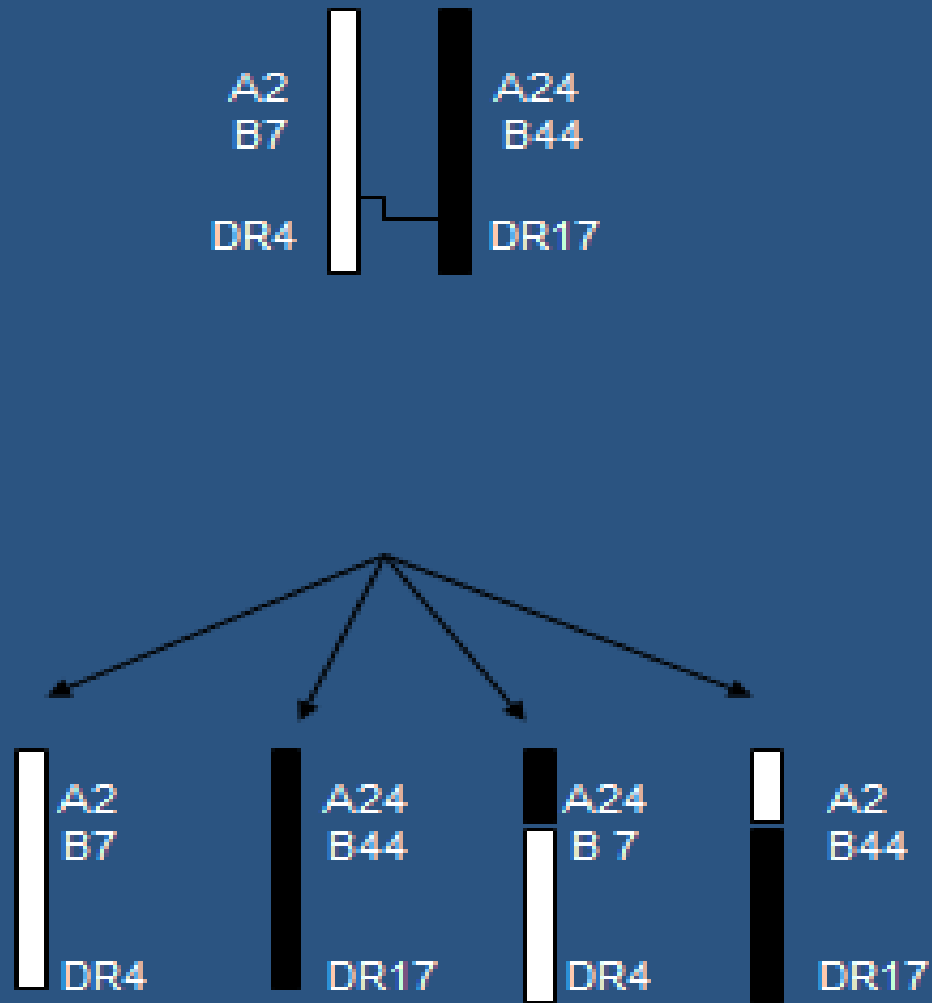
- geny vázané X geny volně kombinovatelné
- HLA geny jsou vázané → děděny „en bloc“ od rodičů jako haplotyp
- někdy rekombinace ( crossing-over během meiotického dělení) v HLA oblasti → výměna genetického materiálu mezi homologickými chromozómy → vznikají rekombinantní sestavy alel
- frekvence rekombinace 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, ...)

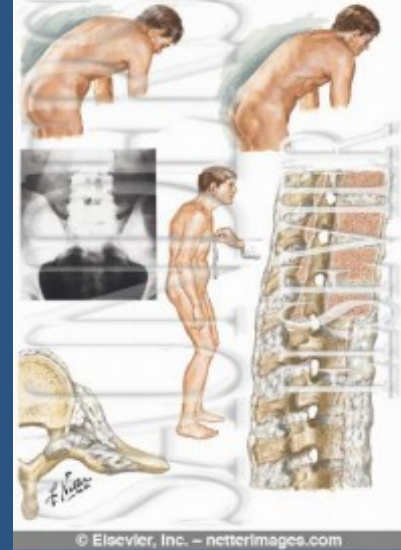
## Některé příklady asociace HLA alel s chorobou:

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 ( CD )

-predispoziční haplotypy

**-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**

- **Bw4, Bw6 specificity** – nejedná se o genové produkty, ale o „**public**“ epitopy. Jsou to alternativní aminokyselinové sekvence přítomné na všech HLA-B molekulách a na HLA-A23, 24, 25, 32.

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 specificity molekuly ( antigenu )

## 2. Molekulárně-genetická definice HLA alel

Na rozdíl od serologické nomenklatury, která má maximálně dva číslicové znaky, 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**

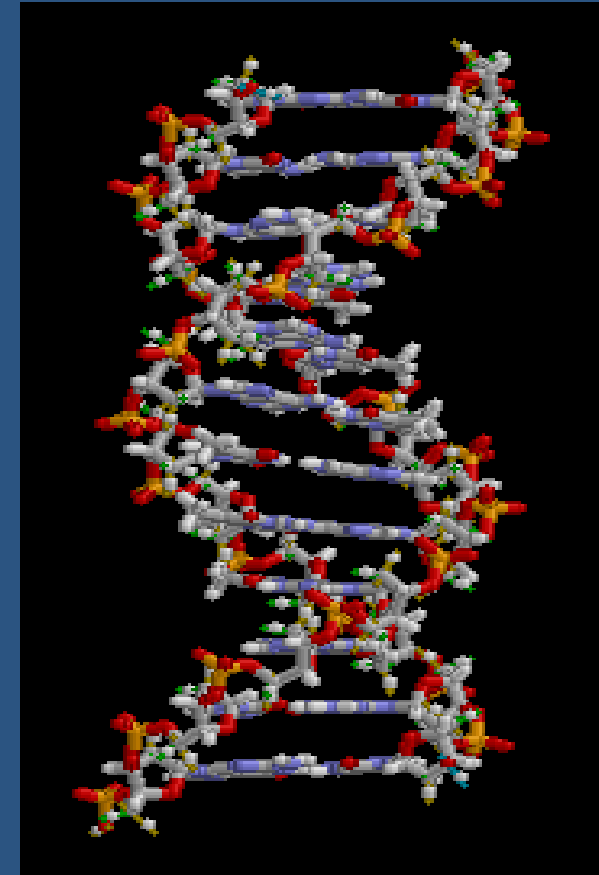
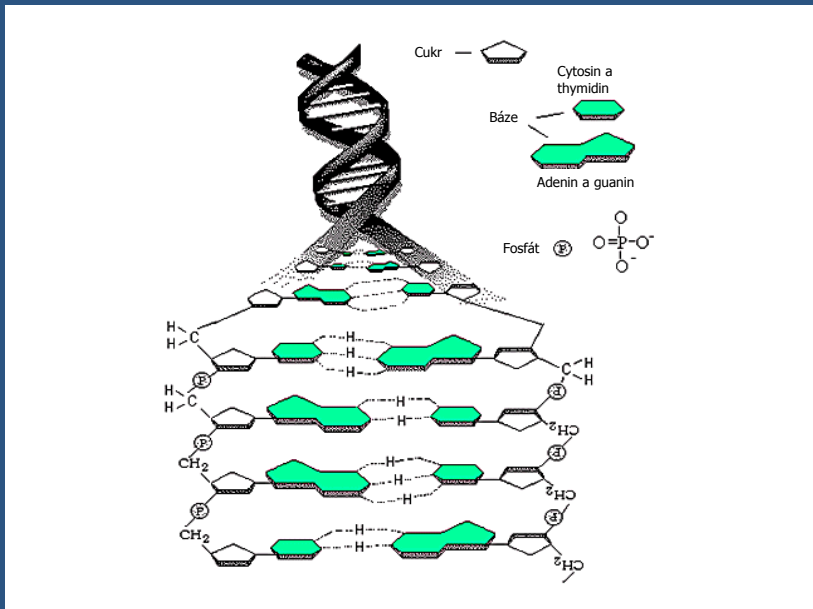
## 2. molekulárně-genetické metody

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

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

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

- **detekce PCR produktu**

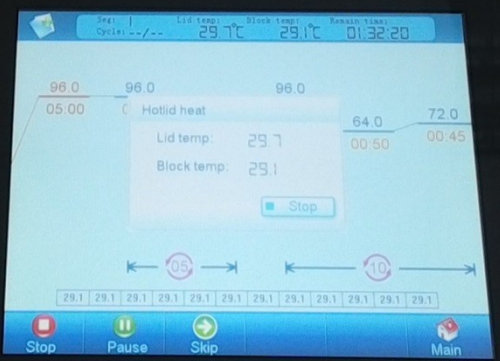






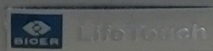
HOT SURFACE!

HOT SURFACE!



v.č. BYQ6072E+328

2  
70710300  
THERMOCYCLER  
v.č. BYQ6072E 328



Prodej, opravy, kalibrace, validace  
 Typ přístroje: Biorad LifeTorch  
 Vyroben číslo: BYQ6072E-328  
 Datum kalibrace: 29.6.2016  
 Platí do: 29.6.2016  
 Kvalita 12. třída, Právní z. 1000  
 TEL: 021 619 000 FAX: 021 619 000



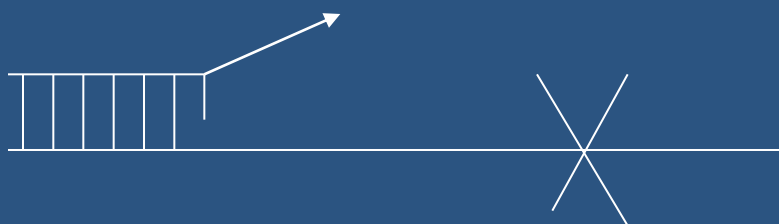
## 1. PCR – SSP (sekvenčně specifické primery)

- 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
- v závislosti na výběru primerových párů PCR – SSP může být užita pro „low resolution“ nebo „high resolution“ typizaci
- HLA typizace „low resolution“ pro lokusy -A, -B, -DR, -DQ vyžaduje 95 – 100 primerových párů
- „high resolution“ - následně po sérologické nebo po „low resolution“ typizaci
- v každé zkumavce tzv. interní kontrola amplifikace
- kontrola kontaminace – zkumavka obsahuje všechny reagenty pro PCR kromě templátové DNA
- detekce specifických PCR produktů elektroforeticky, specifita amplifikované DNA sekvence (amplikonu) je určena molekulovou hmotností, která se projeví rozdílnou pohyblivostí v agarózovém gelu při elektroforéze
- vizualizace – obarvení gelu fluorescenční barvou, která se inkorporuje do DNA, expozice gelu UV světlem na transiluminátoru
- fotodokumentace

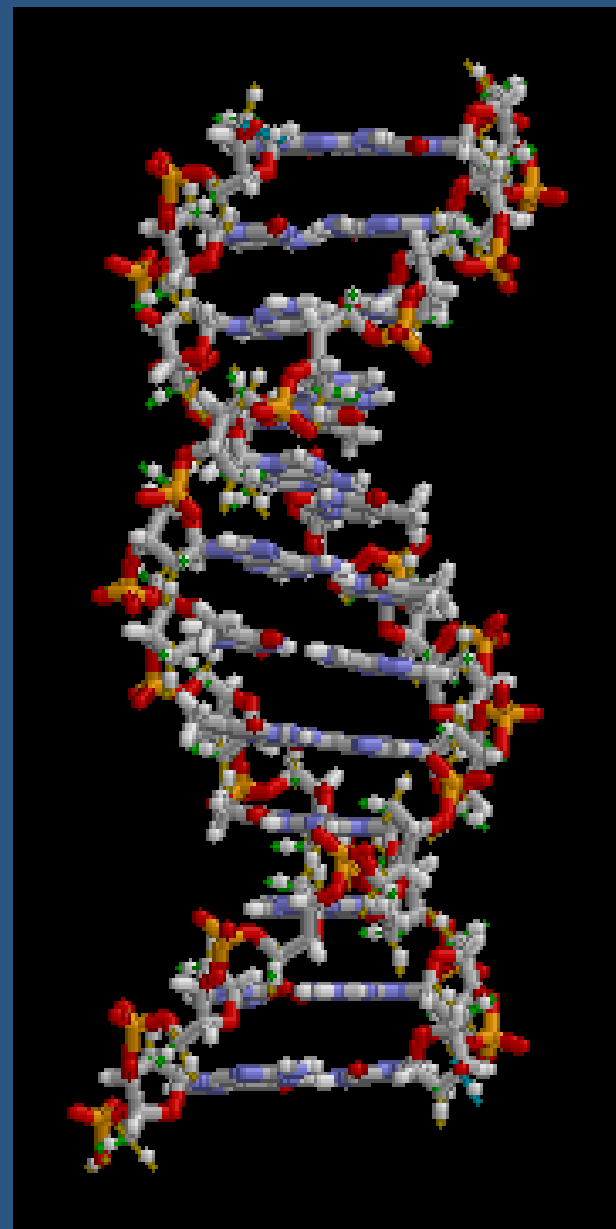
## Princip SSP-PCR

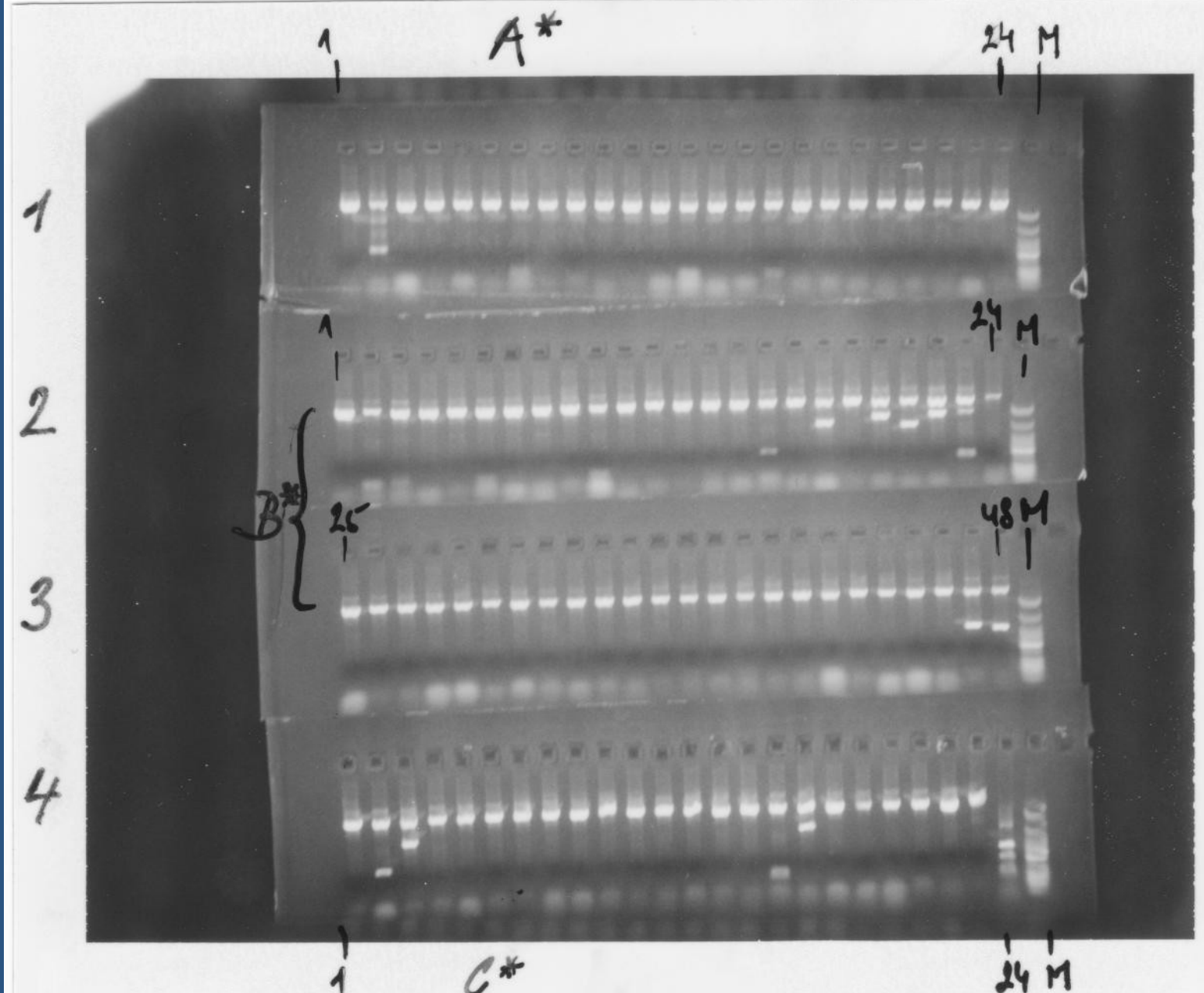


úplná shoda – amplifikace proběhne



neshoda – amplifikace neproběhne

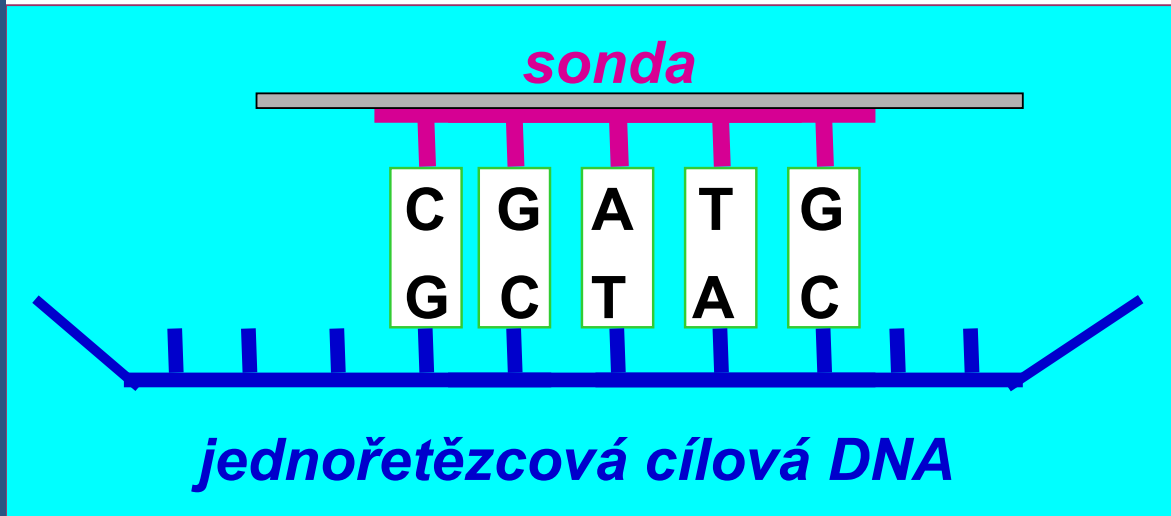




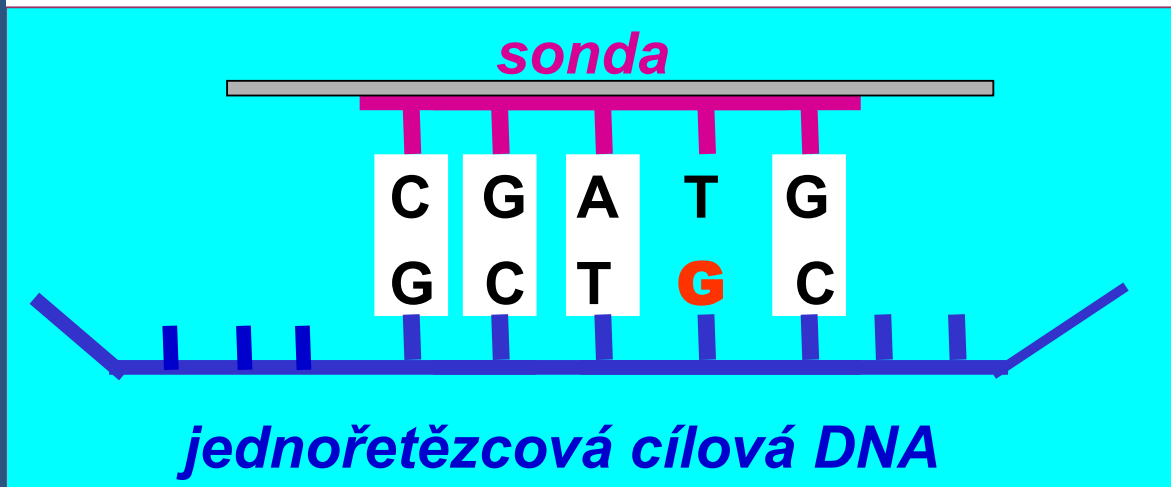
## 2. PCR – SSO (sekvenčně specifické oligonukleotidy)

- 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 (nitrocelulóзовém 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

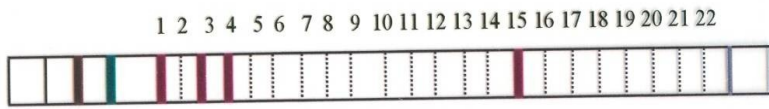
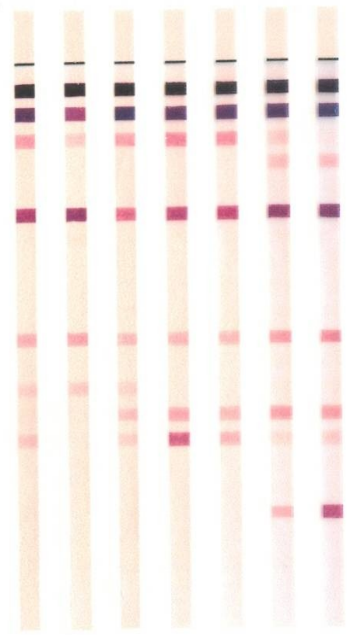
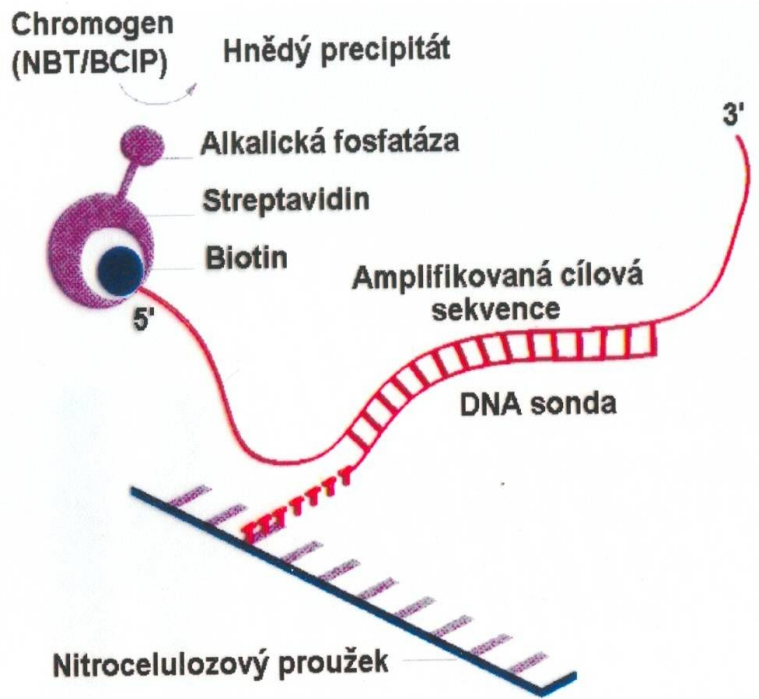
# hybridizační reakce



*perfektní shoda*  
**HYBRIDIZACE**



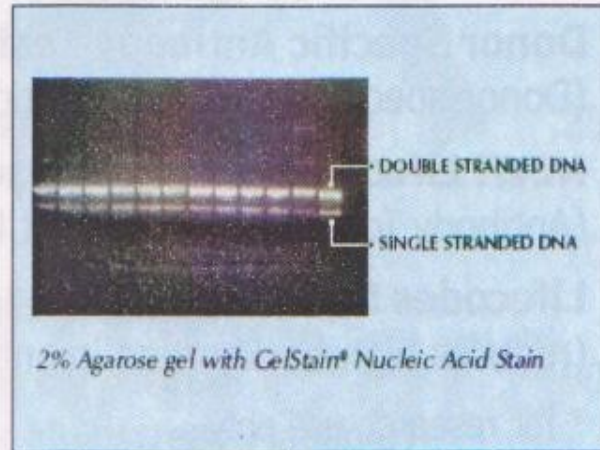
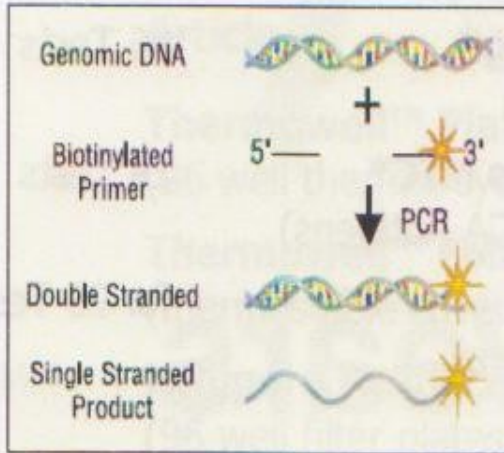
*1 neshoda*  
**ŽÁDNÁ**  
**HYBRIDIZACE**



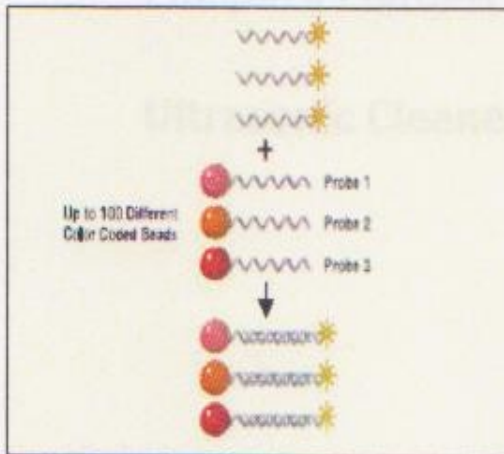
DQB typizace: DQB1\*0302 x DQB1\*0401

# PCR-SSO typizace na analyzátoru Luminex

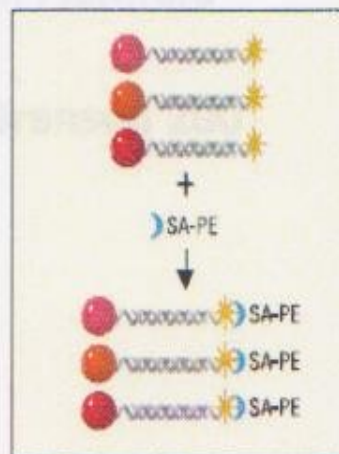
(for 100 typings)



1. Amplify with biotinylated primers



2. Hybridize with beads



3. Label with SA-PE



4. Analyze in the fluoroanalyzer

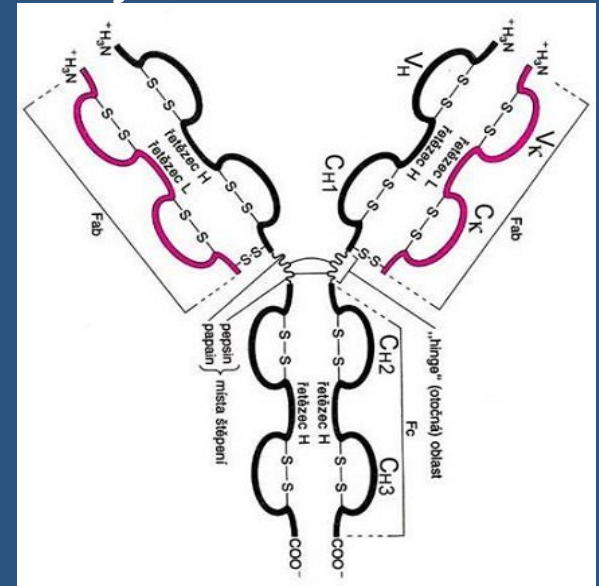




# Imunologie leukocytů a trombocytů Transplantologie

- 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 také na 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, produkty plazmatických buněk, 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. aloimunní 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 aloimunní imunoglobuliny třídy IgG a IgM.
- přirozeně se vyskytující anti-HLA protilátky (bez imunizačního podnětu) jsou velmi vzácné.

# 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 (částo 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)

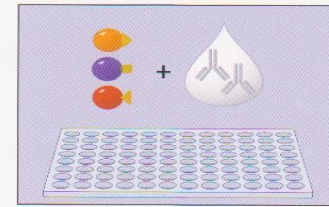
- reakce mezi protilátkou v séru pacienta a antigenem buněčné membrány typových lymfocytů
- záchyt protilátek pouze proti HLA I. třídě

## Detekce anti-HLA protilátek pomocí analyzátoru (Luminex)

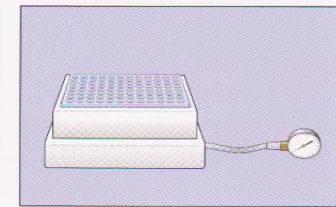
- Luminex® je metoda využívající navázané HLA glykokoproteiny na barevně značené mikročástice a vazba protilátek ze séra je prokázána průtokovou cytometrií s dvojitým laserem
- Luminex® má větší specifitu a senzitivitu než LCT, umožňuje záchyt protilátek proti HLA I., II. třídě a anti-MICA

# Detekce anti-HLA protilátek metodou Luminex

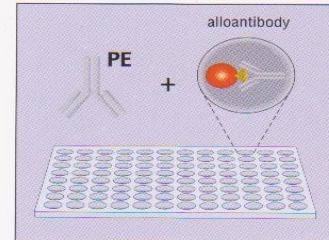
- Barevně značené mikročástice navázanými HLA antigeny
- Inkubace mikročástic se sérem pacienta
- Přidání fluorescenčně značené sekundární protilátky
- Detekce pomocí laserových paprsků



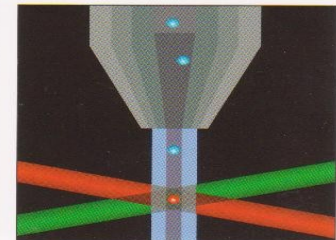
1. Mix beads coupled to purified HLA antigens with patient sera in a membrane filter plate. Incubate for 30 minutes.



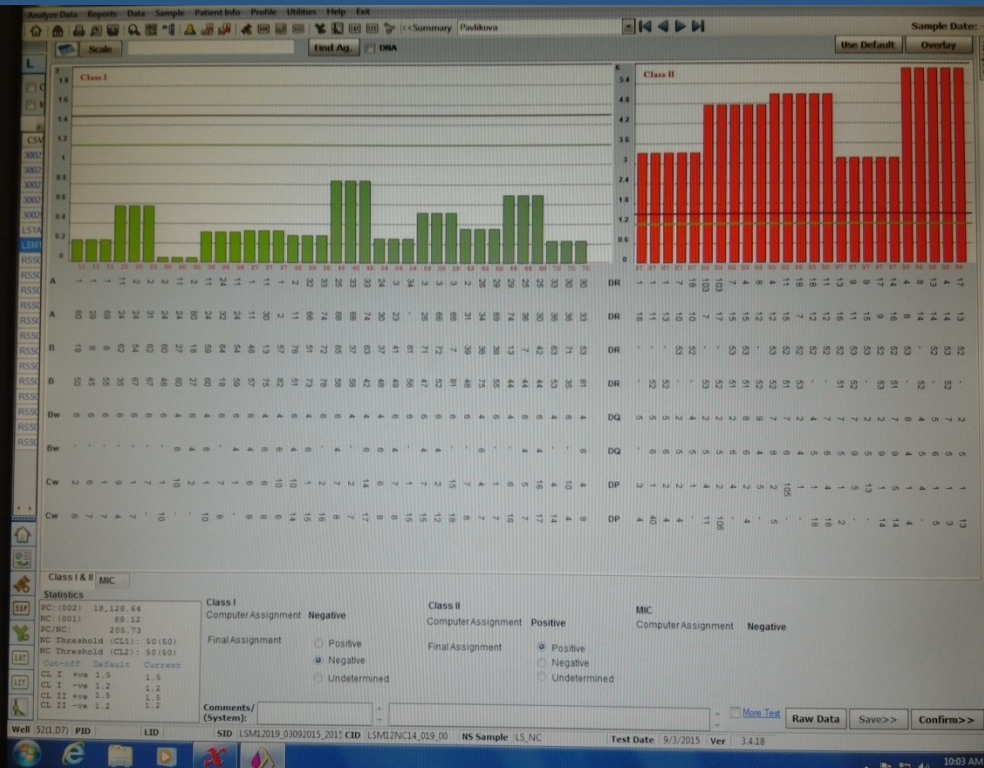
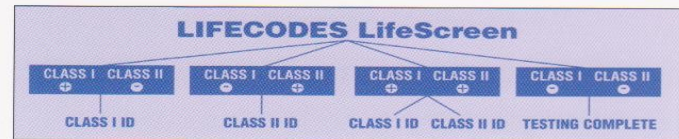
2. Wash 3x using a vacuum manifold



3. Add antihuman IgG with PE to membrane filter plate. Incubate 30 minutes.



4. Analyze in the Fluoroanalyzer



# 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 neutrofilny
- 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, exprese na trombocytech je sporná
  - 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

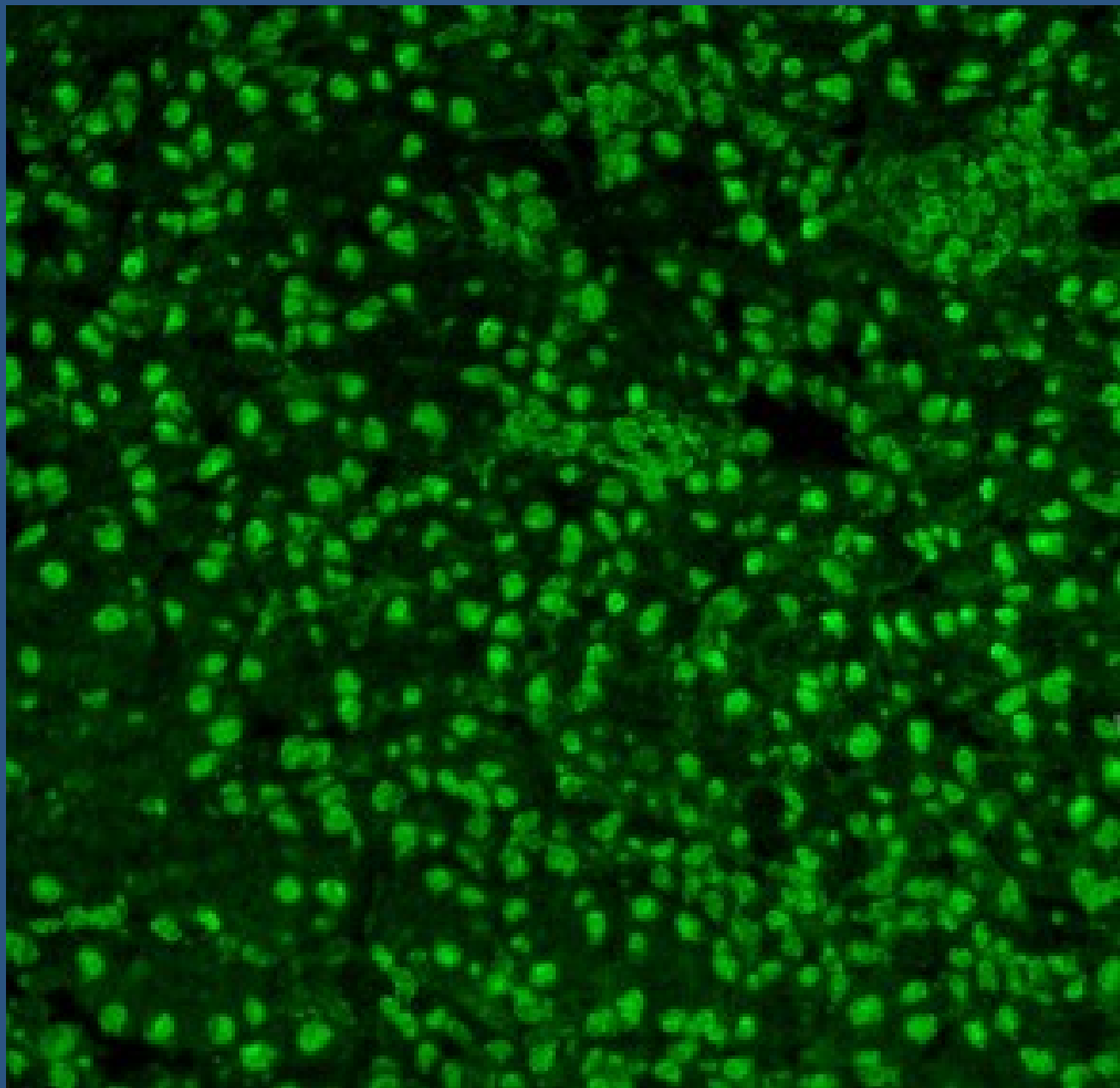
# Detekce antigranulocytárních protilátek

## 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 bylo dosud objeveno 8 bílelických systémů - HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6, HPA-9 a HPA-15
- jako první trombocytární antigen byl určen antigen HPA-1a, který se v populaci vyskytuje ve fenotypové frekvenci 97,9%
- 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)
  - **autoprottilátky** způsobující destrukci vlastních trombocytů (autoimunitní trombocytopenie, ITP)
  - léky indukovaná trombocytopenie (antiepileptika, analgetika, některá antibiotika)
- antitrombocytární protilátky jsou většinou třídy IgG, často také IgM a zřídka IgA.

# 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

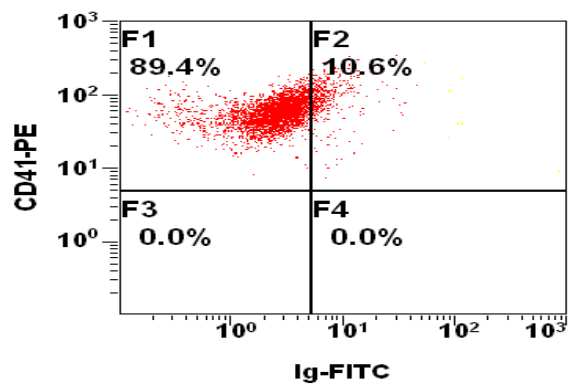
## ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

- enzymoimunostanovení, 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

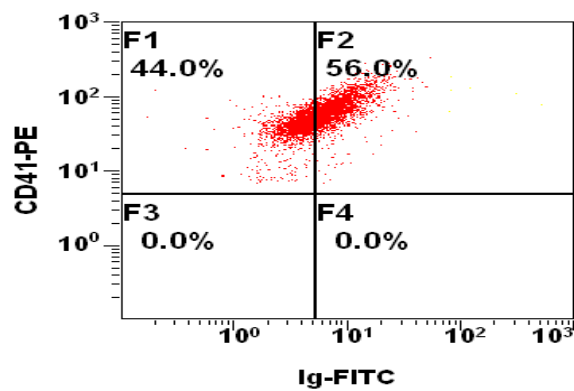
## Průtoková cytometrie (Flow cytometry)

- 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)

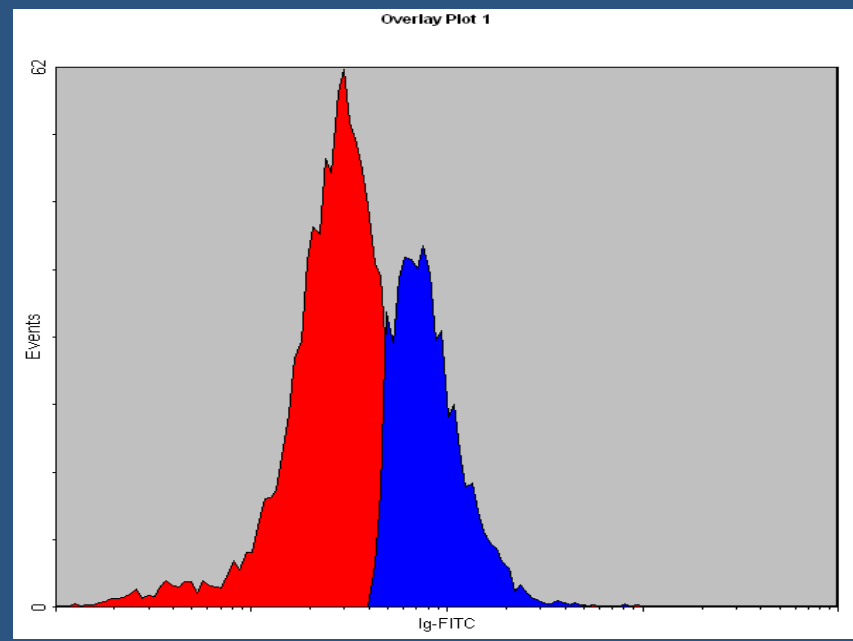
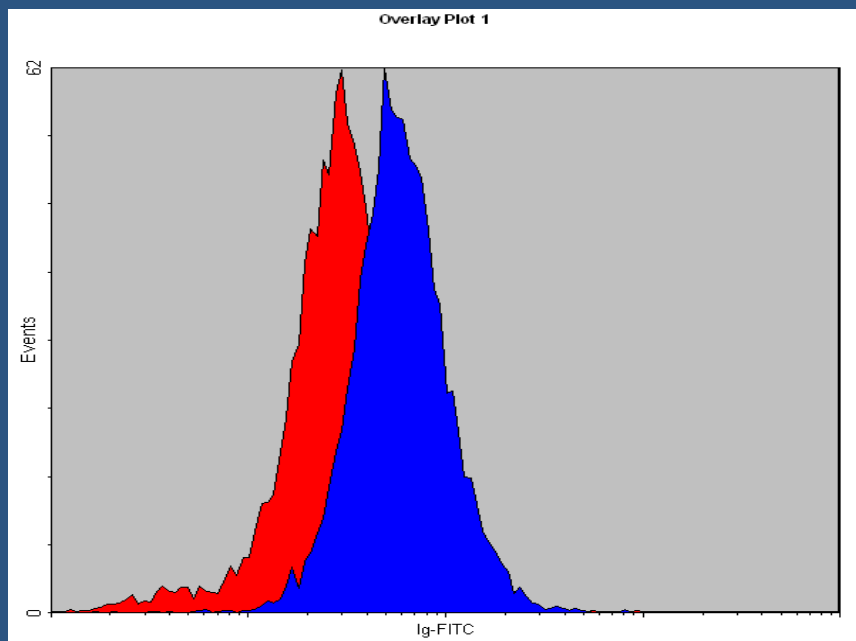
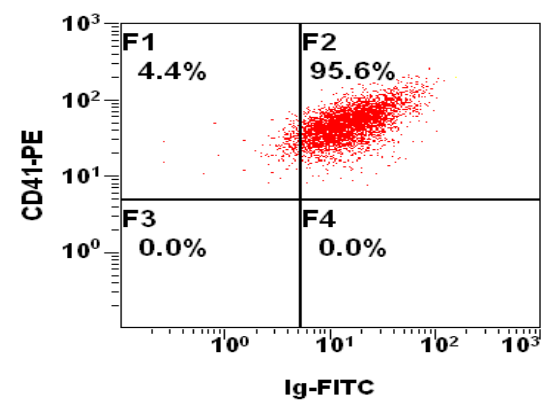
DJ K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2



DJ P14 plt-Ig IgG 00048297.003 : FL1 Log/FL2



DJ 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 dárcovství.
- 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 dárcovstvím, osoby nesouhlasící s dárcovstvím mají právo se přihlásit do speciálního registru osob nesouhlasících s dárcovstvím (registr NROD) .
- Pracoviště zvažující dárcovství musí ověřit, zda pacient v tomto registru není. Souhlas rodiny není zákonně nutný, ale obvykle se bez souhlasu rodiny dárcovství neuskuteční.
- Nejčastější dárce jsou s úrazy hlavy, nitrolební krvácení a další, první informaci o možném dárci 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 od 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.