

Imunologie leukocytů a  
trombocytů  
Transplantologie

# Imunologie leukocytů a trombocytů

- Všechny buňky lidského těla nesou na svých membránách antigenní znaky, které jsou uspořádány do systémů
- Systémy membránových znaků byly nejdříve zjištěny a prozkoumány u erytrocytů, popsáno bylo také množství antigenů a antigenních systémů 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 - po transfuzích krve, koncentrátů trombocytů a leukocytů

- po transplantacích
- po záměrné imunizaci
- v průběhu těhotenství jako reakce na odlišné

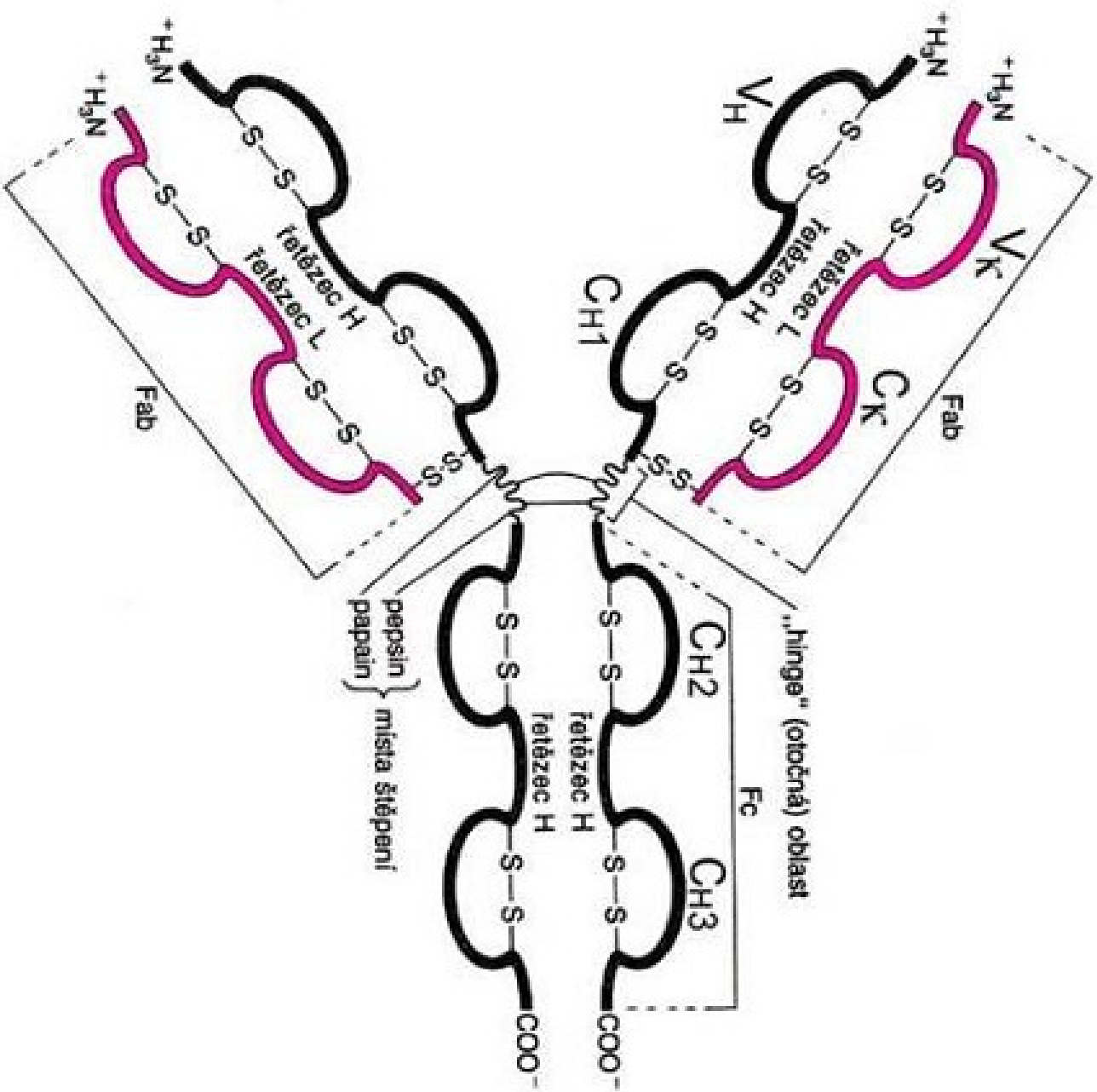
antigeny plodu

2. autoprotilátky – proti vlastním antigenům jedince

3. alergické protilátky – reakce organismu na některý lék nebo chemikálii

4. přirozené protilátky

- Molekula imunoglobulinu je tvořena dvěma těžkými řetězci (H) a dvěma lehkými řetězci (L) uspořádanými symetricky podél dlouhé osy molekuly
- těžký H řetězec složen z konstantní oblasti (C) a variabilní (V) oblasti, kde se váže antigen
- 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

- Antigeny přítomné na leukocytech se dělí do dvou skupin:
  1. antigeny společné s erytrocytárními - ABO, Rh, P, MNSs, Kell, Lewis, Duffy
  2. antigeny specifické pro leukocyty - specifické antigeny lymfocytů, **HLA antigeny**
    - specifické antigeny granulocytů, **HNA antigeny**
    - specifické antigeny monocytů, **HMA antigeny**

## HLA antigeny

- Specifické antigeny lymfocytů, HLA antigeny - probrány v kapitole „HLA systém“
- Anti-HLA protilátky jsou protilátky aloimunní, vznikají tehdy, obsahuje-li imunizační faktor HLA antigeny odlišné od osoby vystavené jeho účinku
- HLA protilátky jsou nejčastěji imunoglobuliny třídy IgG, méně často IgM
- v průběhu těhotenství (u cca 10 – 20% těhotných žen)
- po transfuzích (koncentrátů erytrocytů, trombocytů a leukocytů, plazmy)
- po transplantaci (kostní dřen, orgány)
- Přirozené se vyskytující anti-HLA protilátky - pravděpodobně jsou produkovány po expozici environmentálním antigenům (virové nebo bakteriální patogeny) a cross reaguji s určitými HLA epitopy – detekce technologií Luminex

# 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

## 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 provést zkoušku kompatibility v lymfocytotoxickém testu mezi sérem příjemce a lymfocyty dárce (cross-match)

## Potransfuzní reakce TRALI - imunní TRALI

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

## Akutní rejekce- odvrhnutí transplantovaného štěpu

- Pravděpodobnost vzniku akutní rejekce je tím větší, čím větší odlišnosti v HLA systémech dárce a příjemce existují. K akutní rejekci dochází s odstupem několika dnů po transplantaci orgánu až do zhruba 90 dní po transplantaci.

Úloha non-HLA faktorů při rejekci - např. MICA (MICB) antigeny  
= MHC I Chain-related gene A (B)

- Exprese pouze na endoteliálních buňkách, ne na lymfocytech
- Podobná struktura jako HLA molekuly I. třídy, nemají  $\beta$ 2-mikroglobulin
- Anti-MIC protilátky zodpovědné za rejekci transplantované tkáně
- Jejich exprese je indukovaná stresem, ligandy pro aktivační receptory (KIR) NK buněk
- Další non-HLA faktory – Minor Histokompatibility Complex, KIR, Cytokiny



# Detekce anti-HLA protilátek

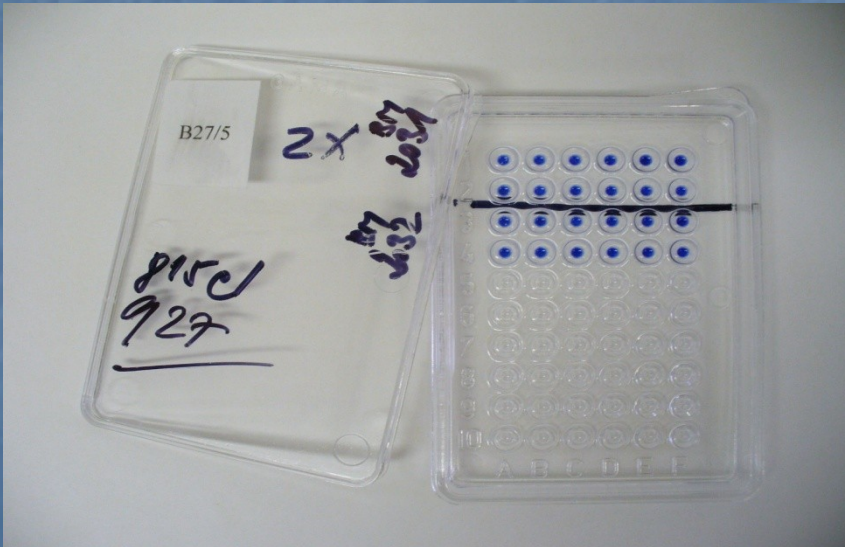
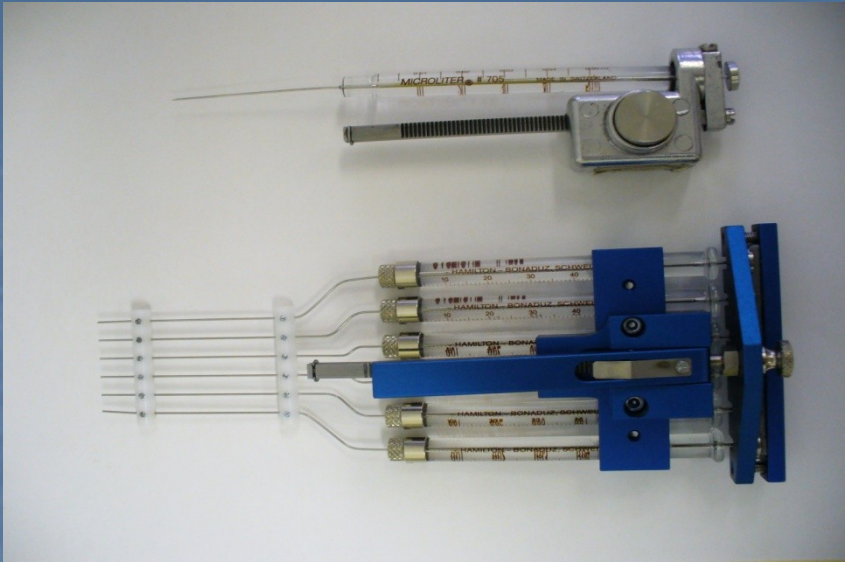
## Lymfocytotoxický test (LCT)

- zachycuje lymfocytotoxiny, protilátky, vážící komplement
- Reakce probíhá mezi protilátkou v séru pacienta a antigenem buněčné membrány typových lymfocytů
- komplex antigen-protilátka aktivuje dodaný králičí komplement
- aktivací vzniklý enzym fosfolipáza poruší buněčnou membránu lymfocytů, buňky pak následně přijmou vitální barvivo (trypanová modř, eosin)
- Hodnocení testu se provádí mikroskopicky. mrtvé buňky se jeví v mikroskopu jako modré (červené), živé buňky zůstávají nezbarvené

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

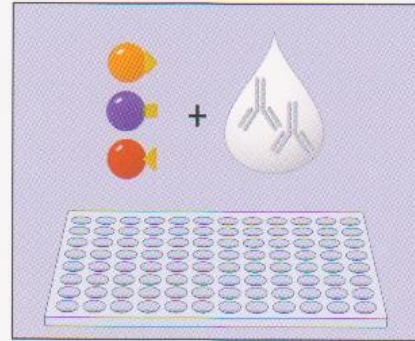
- Luminex® je metoda využívající navázané HLA glykokoproteiny na barevně značené mikročástice a vazba protilátek ze séra je prokázána průtokovou cytometrií s dvojitým laserem.
- Luminex® má větší specifitu než LCT a není ovlivněn přítomností non-HLA protilátek, autoreaktivních protilátek nebo lymfocytotoxických protilátek (např. ATG).



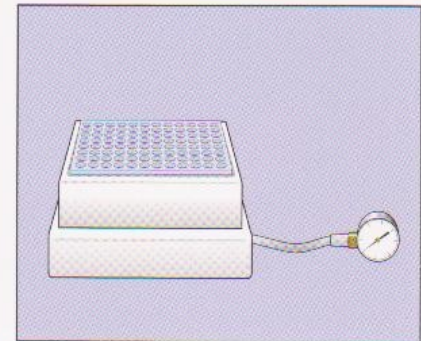


# Detekce anti-HLA protilátek technologií Luminex

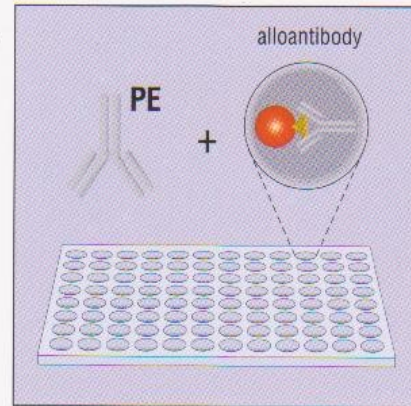
- Barevně značené mikročástice s navázanými HLA antigeny
- Inkubace mikročástic se sérem pacienta
- Přidání fluorescenčně značené sekundární protilátky
- Detekce pomocí laserových paprsků



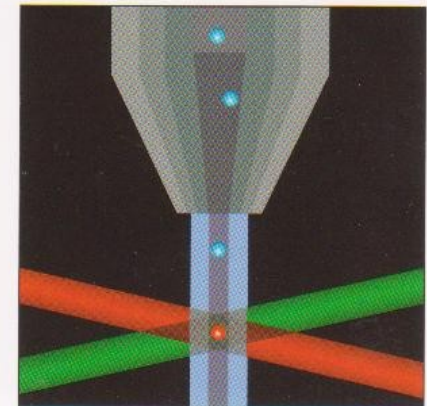
1. Mix beads coupled to purified HLA antigens with patient sera in a membrane filter plate. Incubate for 30 minutes.



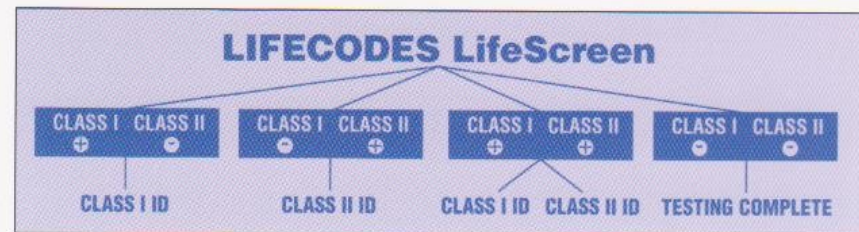
2. Wash 3x using a vacuum manifold



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



4. Analyze in the Fluoroanalyzer













# HNA antigeny (Human Neutrophil Antigens)

- 1. specifický granulocytární antigen byl popsán v r. 1960
- Známo 7 antigenů, které jsou uspořádány do 5 HNA systémů:
- **HNA-1** má 3 alely: **HNA-1a**, **HNA-1b**, **HNA-1c** (polymorfni 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, Asiatů a Brazilců
- Exprese na neutrofilech, monocytech a NK
- Funkce – adheze leukocytů k endoteliálním buňkám a při fagocytóze
  
- **HNA-5a** – exprese na všech leukocytech
- Funkce – adheze leukocytů

# Specifické antigeny neutrofilů

System	Antigen	Lokalizace (glykoprotein)	Frekvence % populace kavkazská	asiatská	černošská
HNA-1	HNA-1a	FcγRIIIb	58	89	68
	HNA-1b	FcγRIIIb	88	51	78
	HNA-1c	FcγRIIIb	5	?	38
HNA-2	HNA-2a	gp50-64	97	88-99	?
HNA-3	HNA-3a	gp70-95	97		
HNA-4	HNA-4a	MAC-1	99		
HNA-5	HNA-5a	LFA-1	96		

# Klinické syndromy způsobené anti-HNA protilátkami

## Aloimunitní

- Aloimunitní neutropenie novorozence
- Transfusion – related acute lung injury (TRALI)
- Febrilní nehemolytická potransfuzní reakce (FNHTR)

## Autoimunitní

- Autoimunitní neutropenie u dětí

## Iatrogenní příčina

- Léky indukovaná imunitní neutropenie (přímý účinek léku na kostní dřeň nebo imunitní mechanismy; nesteroidní antirevmatika, antibiotika, antikonvulsiva)



## Aloimunitní neutropenie novorozence

- způsobená mateřskými aloprotilátkami proti HNA antigenům přítomných na neutrofilech plodu při absenci na neutrofilech mateřských nebo jako transplacentární přenos protilátek od matky s autoimunitní neutropenií
- Mateřské protilátky (imunoglobuliny třídy IgG) přechází přes placentu a ničí neutrofile plodu
- ANN se vyskytuje v častosti méně než 1 případ na 1000 porodů
- Neutropenie může trvat až několik měsíců, vyvolává u dětí riziko infekčních komplikací
- Ve většině případů jsou mateřské aloprotilátky zaměřeny proti antigenům HNA-1a, HNA-1b a HNA-2a, méně často proti antigenům HNA-1c a HNA-4a.

## Febrilní nehemolytická potransfuzní reakce FNHTR

(teplota, třesavka, zimnice, bolest hlavy)

- vyvolaná přítomností antigranulocytárních protilátek příjemce transfuzního přípravku proti HNA antigenům dárce.

## TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injuri)

- závažná potransfuzní reakce
- způsobená nejčastěji reakcí protilátek dárce transfuzního přípravku reagujících s granulocyty příjemce, méně často je reakce protilátek příjemce s granulocyty dárce transfuzního přípravku
- aktivované leukocyty - obstrukce plicní mikrocirkulace, vzniká plicní edém
- klinické projevy do 6 hodin po podání transfuze (většinou neprodleně po zahájení transfuze)
- TRALI je tedy většinou vyvolána pasivní transfuzí leukocytárních protilátek (neutrofilních a anti-HLA), zahrnujících a-HNA-1a, a-HNA-1b, a-HNA-2a, a-HNA-3a protilátky a protilátky proti molekulám HLA I. a II. třídy

## Autoimunitní neutropenie (AIN)

- popsána u dětí, je vyvolaná antigranulocytárními autoprotiilátkami
- diagnostikována nejčastěji v kojeneckém a batolecím období
- protilátky jsou nejčastěji směřovány proti antigenům HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-4a
- u dospělých je neutropenie spíše jako jako sekundární neutropenie jiných poruch (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, chronická lymfatická leukémie), lékově indukovaná neutropenie nebo jako neimunitní chronická idiopatická neutropenie

# 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-isothiocyánátem (FITC)
- na typové granulocyty je tedy navázána protilátka ze séra pacienta a na ni pak zvířecí, značená FITC
- granulocyty s navázanou protilátkou svítí ve fluorescenčním mikroskopu zeleně.



# HMA antigeny (Human Monocyte Antigens)

- na povrchu monocytů se vyskytují antigeny dvojího typu:
  1. antigeny, společné s ostatními buňkami (HLA antigeny I. a II. třídy)
  2. antigeny, specifické pro monocyty, značené **HMA antigeny**
- HMA antigeny jsou svou strukturou podobné HLA antigenům I. třídy, obsahují  $\beta$ 2-mikroglobulin
- geny lokalizované na krátkém raménku 6. chromozomu v blízkosti lokusu HLA-B.
- HMA antigeny jsou kódovány ze dvou lokusů, HMA-A a HMA-B, zatím známo 7 antigenů HMA-A1; HMA-A3; HMA-A5; HMA-A6; HMA-B2; HMA-B4; HMA-B7

## Výskyt monocytárních protilátek:

- po transfuzi, mohou být příčinou i potransfuzní reakce
- u těhotných žen
- po transplantaci

# Imunologie trombocytů

- Antigeny přítomné na trombocytech se dělí do dvou skupin:
  1. antigeny, společné s buňkami ostatních tkání, např. erytrocytárního systému (ABO, P, Kell, Duffy), HLA systému (antigeny I. třídy)
  2. antigeny, specifické pro trombocyty - **HPA antigeny**
- Na trombocytech bylo dosud objeveno 8 bialelických systémů - HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6, HPA-9 a HPA-15
- Antigeny přítomné na membránových glykoproteinech lze určit sérologicky, nověji též metodami DNA analýzy
- 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)
- autoprotilátky způsobující destrukci trombocytů (autoimunitní trombocytopenie)
- léky indukovaná trombocytopenie (antiepileptika, analgetika, některá antibiotika)
- antitrombocytární protilátky jsou většinou třídy IgG, často také IgM a zřídka IgA.



Systém	Antigen	Lokalizace ( glykoprotein)	Alelová frekvence
			Česká republika
HPA-1	HPA-1a	GPIIIa	0,83
	HPA-1b	GPIIIa	0,17
HPA-2	HPA-2a	GPIb	0,90
	HPA-2b	GPIb	0,10
HPA-3	HPA-3a	GPIIb	0,59
	HPA-3b	GPIIb	0,41
HPA-4	HPA-4a	GPIIIa	
	HPA-4b	GPIIIa	
HPA-5	HPA-5a	GPIa	0,93
	HPA-5b	GPIa	0,07
HPA - 15	HPA- 15a	CD109	
	HPA- 15b	CD109	

# Klinické syndromy způsobené antitrombocyturními protilátkami

## Fetomaternální aloimunitní trombocytopenie (FMAIT)

- důsledek inkompability v HPA antigenech mezi matkou a plodem
- většina případů je diagnostikována až po narození, proto také nazývána NAITP (neonatální aloimunitní trombocytopenie nebo aloiminutní trombocytopenie novorozence)
- matka vytváří protilátky proti trombocyturním antigenům plodu ze strany otce a u matky chybí
- protilátky IgG prochází přes placentu, váží se na trombocyty plodu a urychlují jejich destrukci - trombocytopenie plodu už kolem 20. týdne gravidity
- trombocytopenický plod je ohrožen intrakraniálním krvácením in utero, během porodu a v prvních dnech života
- jeden případ na cca 1500 porodů
- mortalita je 6 – 10% a neurologické následky po intrakraniálním krvácení se vyskytují přibližně ve 20% případů

- nejčastější příčinou FMAIT je protilátka anti-HPA-1a, způsobující klinicky nejzávažnější trombocytopenie (85% případů)
- 10% případů je způsobeno protilátkou anti-HPA-5b
- 4% protilátkou anti-HPA-3a, 3% protilátkou anti-HPA-1b
- zbývající případy FMAIT jsou vyvolány inkompatibilitou v ostatních HPA antigenech

### **Potransfuzní purpura (PTP)**

- vzácná, ale závažná potransfuzní reakce
- projevuje se prudkým poklesem v počtu trombocytů a život ohrožujícím krvácením
- PTP se objevuje za 3 – 10 dnů po podání transfuze plazmy nebo trombocytů
- Vyskytuje se u již imunizovaných pacientů, rizikovou skupinou jsou ženy s častějšími těhotenstvími v anamnéze
- nejčastější příčinou PTP je protilátka anti-HPA-1a, kterou vytváří jedinci HPA-1a negativní, po podání transfuzního přípravku s HPA-1a antigenem
- méně často je příčinou PTP protilátka anti-HPA-5b



## Refrakterita na podání trombocytových transfuzních přípravků

- charakterizována malým vzestupem počtu trombocytů po transfuzi
- může být zapříčiněna klinickými faktory (např. sepse, splenomegalie, akutní krvácení, účinky léků) nebo jde o příčinu imunitního charakteru
- refrakterita je nejčastěji zapříčiněna produkcí protilátek proti HLA antigenům, méně často a-HPA
- pro zajištění úspěšné hemoterapie je třeba připravit HLA kompatibilní trombocytové transfuzní přípravky (registr HLA otypovaných dárců, cross-match)
- v případě výskytu specifických protilátek proti trombocytům je třeba provést křížovou zkoušku mezi trombocyty dárce a sérem příjemce (DIFT)

## Pasivní aloimunitní trombocytopenie

- Vyskytuje se u pacientů po transfuzi plazmy od imunizovaného dárce obsahující specifickou aloprotilátku
- popsány jsou pouze protilátky anti-HPA-1a a anti-HPA-5b
- trombocytopenie nastává okamžitě (na rozdíl od PTP)
- V tomto případě je nutné vyřazení dárce transfuzního přípravku.

## **Idiopatická trombocytopenická purpura (ITP)**

- nejčastější krvácivé onemocnění dětského věku
- autoimunitní trombocytopenie, která je charakterizována destrukcí trombocytů autoprotilátkami namířenými proti některým HPA antigenům
- většina protilátek patří do třídy IgG, byly nalezeny i protilátky třídy IgM a IgA
- onemocnění velmi často několik týdnů předchází virová infekce
- typická manifestace kožních projevů – petechie, hematomy

## **Poléková trombocytopenie**

- léků způsobujících pokles trombocytů je popsáno mnoho, k nejčastějším patří některá antiepileptika, analgetika a některá antibiotika.
- nutnost vysazení preparátu, který trombocytopenii vyvolal
- [www.ouhsc.edu/platelets](http://www.ouhsc.edu/platelets)

# Screeningové testy k detekci antitrombocytárních protilátek

## DIFT (destickový imunofluorescenční test)

- zachycuje specifické antitrombocytární protilátky i HLA protilátky
- je to test vysoce citlivý, ve kterém detekujeme přímo vazbu antigenu s protilátkou
- k vizualizaci navázané protilátky na povrch typových trombocytů dochází pomocí anti-lidského imunoglobulinu značeného fluoresceinem
- testem určujeme protilátky třídy IgG, jen ojediněle spolu s IgM či IgA

## ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

- enzymoimunostanovení, zachycující specifické 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
- testem zachycujeme většinou protilátky třídy IgM nebo spolu s IgA



## Průtoková cytometrie (flow cytometrie)

- měření a analýza fyzikálně-chemických vlastností buňky během průchodu laserovým paprskem
- Identifikace různých buněčných typů uvnitř smíšené populace nebo analýza jednotlivých subpopulací v rámci jedné populace
- Rychlá, přesná a reprodukovatelná metoda, umožňuje současné měření několika parametrů až na 100 000 buněk za 1 sekundu

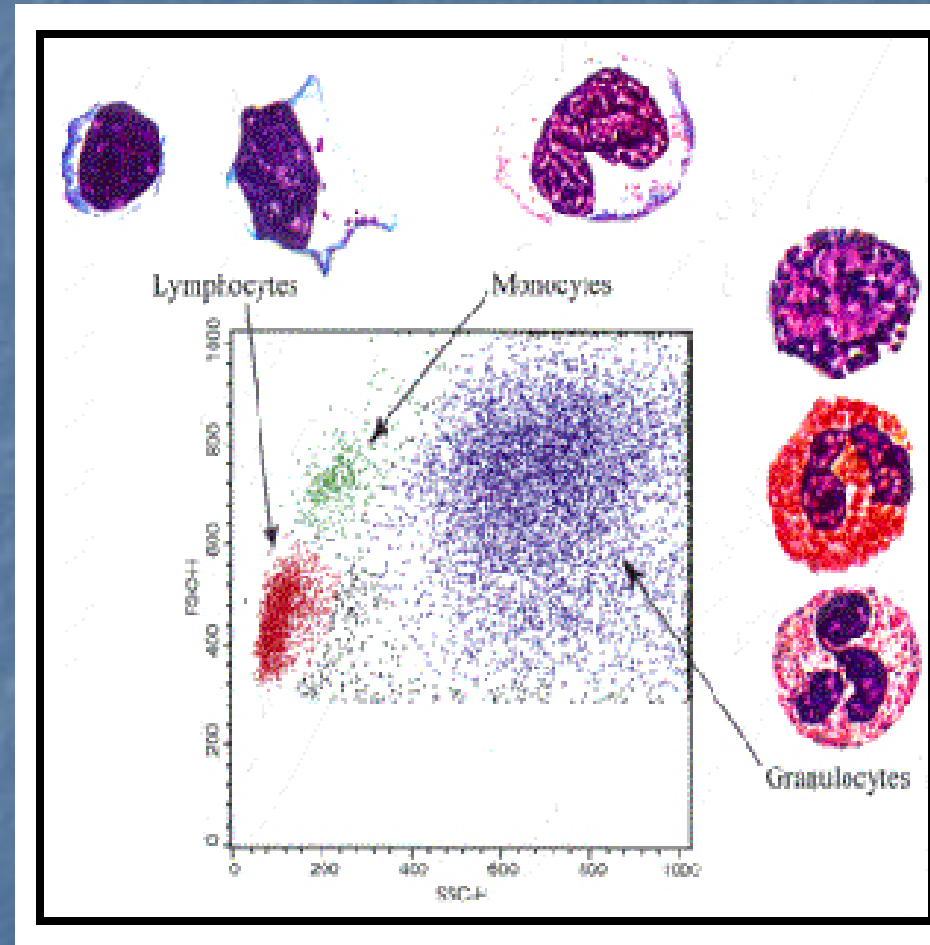


- využívá anti-CD41 protilátky značené fluorochromem ( např. phycoerithrinem - PE) k označení populace trombocytů
- navázaná protilátka na trombocytech je detekována sekundární anti-lidskou protilátkou značenou jinou fluorescenční barvou (např. Fluorescein Isothiocyanatem - FITC)
- hodnocení přítomnosti antitrombocytárních protilátek jak autoimunních tak i aloimunních probíhá ve flow cytometru, ve kterém laserový paprsek snímá fluorescenci každého jednotlivého trombocytu
- pozitivní výsledek je charakterizován posunem fluorescence populace trombocytů do horního pravého kvadrantu

**Forward scatter channel (FSC,** rozptyl v přímém směru)-velikost částic, odlišení buněčné debris od živých buněk

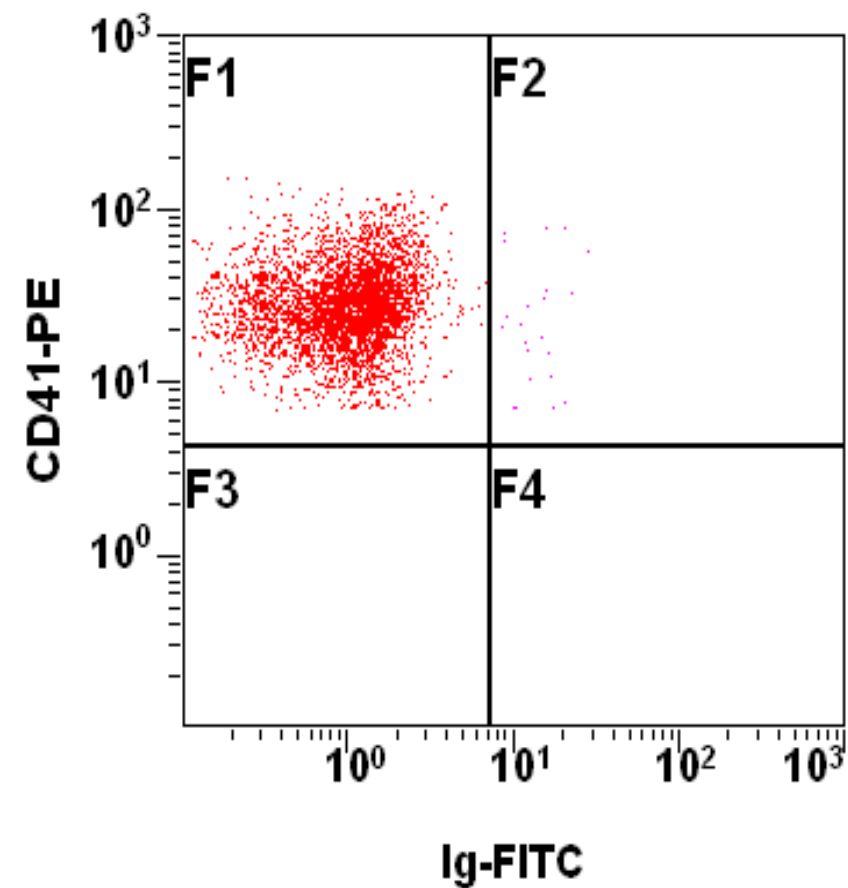
**Side scatter channel (SSC,** rozptyl pod úhlem 90°)- informace o granularitě buněk

FSC, SSC – jedinečné pro každou částici,

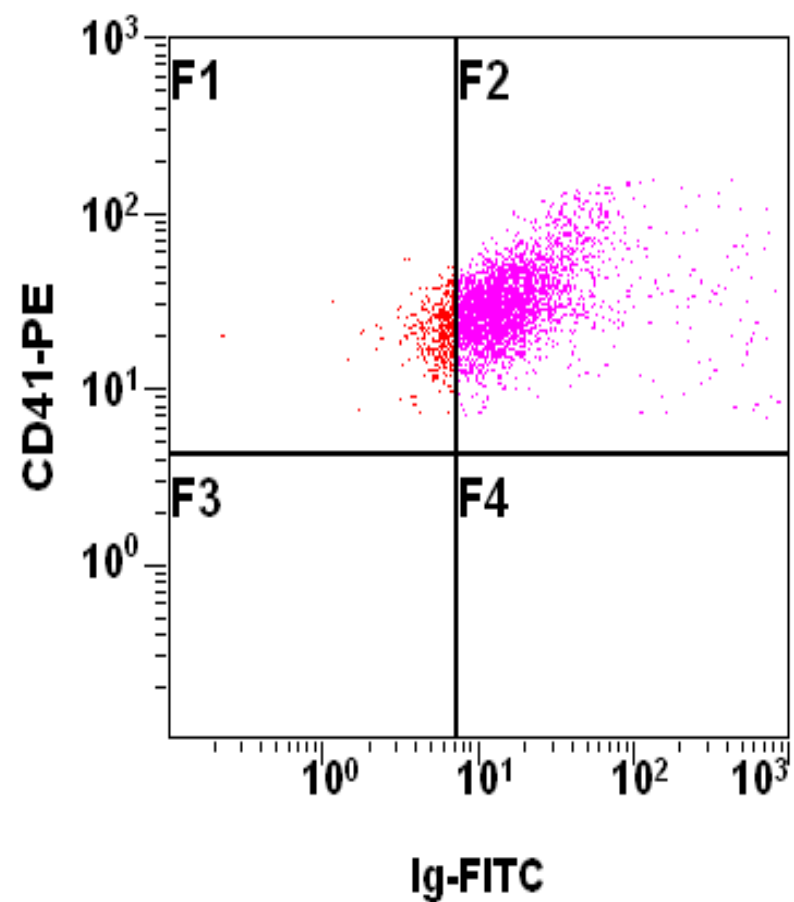


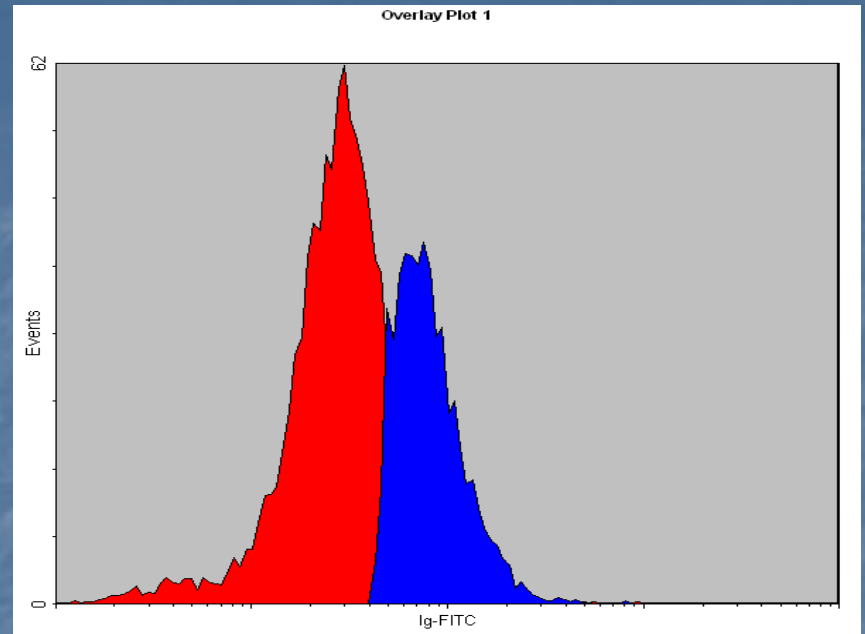
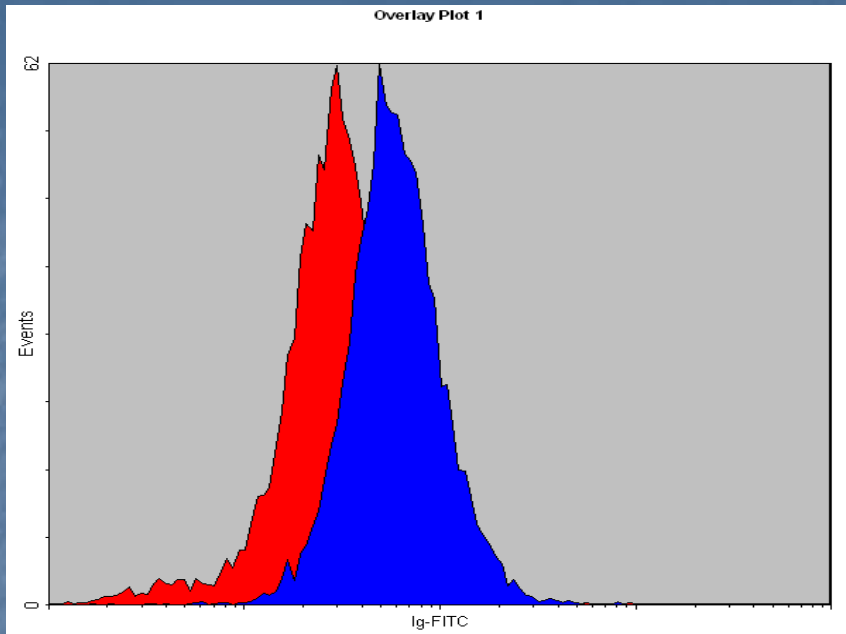


DJ P8 plt-Ig prumK 00048135.001 : FL1 Log/FL2 L

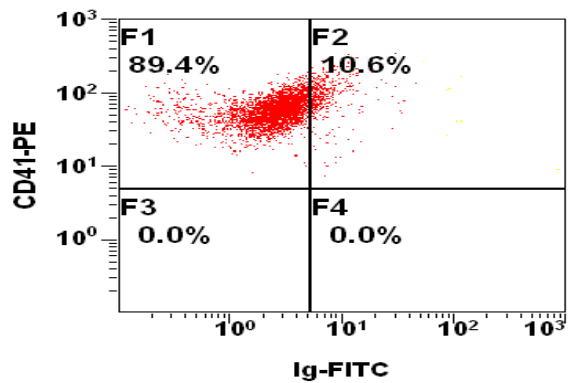


D D] P8 plt-Ig clg 00048136.002 : FL1 Log/FL2 L

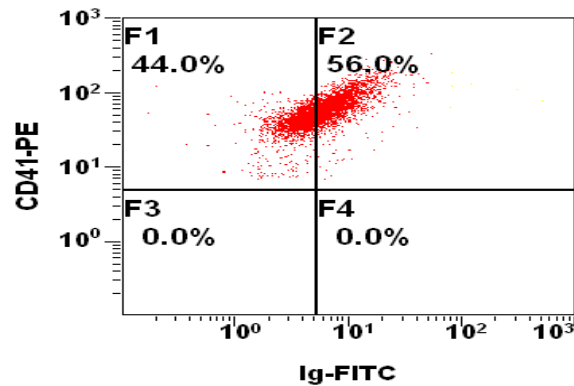




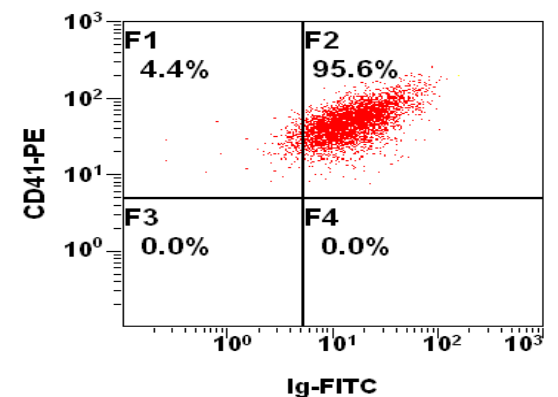
D] K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2  
 D] K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2



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



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



# Srdce – historie transplantace

- 1.Tx srdce – 9.12.1967 v Kapském Městě v JAR, 45letý příjemce srdce zemřel 18. den po operaci na bronchopneumonii (zánět průdušek a plic)
- V pořadí 2. pacient, 58letý stomatolog žil 18 měsíců – zemřel na vaskulopatii (onemocnění cév) štěpu, do té doby neznámou komplikaci
- 9.7.1968 – 1.Tx srdce v Československu – pacientka zemřela po 6 hodinách
- Nemocní při nedokonalé imunosupresi umírali na akutní rejekce (odhojení transplantovaného štěpu)→důvod k celosvětovému útlumu Tx programů
- Nový vzestup - 80. léta minulého stl., do rutinní imunosupresivní léčby zaveden cyklosporin A, výrazné zlepšení v přežívání pacientů
- V 60. letech dosahovalo jednoleté přežívání po Tx srdce hodnot pouze okolo 25% nyní – 80% pacientů přežívá jeden rok, 70% pacientů přežívá 5 let a 50% pacientů přežívá 10 let
- r.1984 - 1.Tx srdce v České republice byla provedena v pražském IKEMu
- r. 1992 v Brně – zahájena činnost 2. českého transplantačního centra (CKTCH , Pekařská)



# Játra – historie transplantace

- r. 1955 – první zmínka o Tx jater, Spojené státy – přenosy jater u psů, bez imunosuprese docházelo během několika dnů k rejekci štěpů
- Delšího přežívání štěpů mnohem později po zavedení azathioprinu (imunosupresivum), kdy k poškození štěpu docházelo za cca 14 dní po Tx
- Od r.1956 vyvíjena technika ortotopické Tx, v březnu 1963 – 1. ortotopická Tx jater, pacient zemřel v důsledku masivního krvácení
- r.1967 v Denveru – 1.úspěšná Tx jater, pacient přežíval po výkonu více než 1 rok a zemřel na rekurenci nádorového onemocnění. I přes tento úspěch byly výsledky na několika pracovištích ve světě špatné s časnou mortalitou vyšší než 70%
- r.1968 – 1. Tx jater v Evropě
- r.1978 - zavedení cyklosporinuA, zvýšení přežívání štěpů více jak o 20%
- r.1983 v Brně – 1. úspěšná Tx jater týmem II. chir. Kliniky
- Dnes – na světě se provádí cca 10 000 Tx jater ročně, zavedeny nové chirurgické techniky – redukce velkých štěpů, splitovací techniky (rozdělení jater) pro dva příjemce a odběry laloků od žijících dárců
- V ČR se programem Tx jater zabývá CKTCH v Brně a IKEM v Praze

# Ledviny – historie transplantace

- r. 1902 – 1. experimentální Tx u psa, pokusy na zvířatech pokračovaly i ve 30. a 40. letech min. stl.
- Prosinec 1952 – 1. Tx ledvin na světě u 15-ti letého dítěte, které úrazem přišlo o svou jedinou ledvinu, dárkyně matka, ledvina byla funkční ihned po operaci, ale ztratila funkci za 22 dní a pacient zemřel za dalších 10 dní pro selhání ledvin z důvodu rejekce
- 23.12.1957 v Bostonu v USA – 1. úspěšná Tx ledviny u člověka mezi jednovaječnými dvojčaty, následně provedeno dalších 7 Tx ze žijících dárců, některé z těchto ledvin byly funkční déle než 30 let.
- Pokusy o Tx ze zemřelých dárců (kadaverózních dárců) byly však neúspěšné, docházelo k rejekci
- r.1960 – poprvé použit merkaptopurin k potlačení imunity
- Přelom 70. a 80. let – objev cyklosporinu A
- r.1961 Hradec Králové – 1. Tx ledviny klinicky neúspěšná z důvodu rejekce
- r.1966 v IKEM Praha – zahájení transplantačního programu, kde 1. transplantovaný pacient K.P. dostal ledvinu od své matky

- 30.11.1972 v Brně – 1.Tx ledviny 30letému příjemci na I. Chirurgické klinice FN USA
- Počátek 90. let – Tx se provádějí v CKTCH, každoročně 40 – 50 Tx ledvin, která je řešením konečného stadia funkce ledvin
- Výsledky – více než 90% Tx ledvin pracuje déle než rok, 80% déle než 5 let, 70% déle než 10 let. Nejdelší funkce ledviny z našeho centra je 33 let
- V případě ztráty funkce Tx ledviny se pacienti mohou vrátit do hemodialyzační péče a mohou být znovu zařazeni k další transplantaci
- Tx od žijících dárců přináší lepší výsledky než od zemřelých dárců
- 14.10.1999 v Brně provedena 1. Tx ledviny darované sourozencem
- r.1998 provedena 1. kombinovaná Tx srdce a ledviny
- r. 2005 Tx všech tří orgánů jako první v ČR (srdce , játra, ledvina)



# Požadavky na dárce orgánů

- 2 typy dárců – kadaverózní dárce a dárce žijící
- Dárce kadaverózní = 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 naší republice platí **předpokládaný souhlas s dárcovstvím**
- registr NROD = registr osob nesouhlasících s dárcovstvím Pracoviště zvažující dárcovství musí ověřit, zda pacient v tomto registru není. Souhlas rodiny není zákonně nutný (s výjimkou dětí), ale obvykle se bez souhlasu rodiny dárcovství neuskuteční.
- Smrt mozku je ze zákona potvrzována komplexem vyšetření (angiografie-znázornění oběhu krve kontrastní látkou, kdy se prokáže zástava kr. oběhu mozku). Ostatní krevní oběh je zachován a přerušuje se až při odběru orgánů na chir. sále

- Organizace dárcovství řídí transplantační koordinátoři jednotlivých TC
- Srdce, játra, plíce, slinivka - příjemce je určen již před odběrem orgánů (shoda KS)
- Ledviny jsou alokovány až po odběru
  
- Přibližně 10% dárců představují u nás **žijící dárce ledviny (rodiče, sourozenci, jiní příbuzní)**.
- Absolutní kontraindikací pro Tx ledviny ze 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, vyloučení jednání pod nátlakem či za úplatu
  
- Kadaverózní dárce – delší doba studené ischémie než u dárců žijících
- Žijící dárce – kratší doba studené ischémie, odběr a Tx jsou naplánované a probíhají prakticky ve stejnou dobu = lepší výsledky přežívání štěpu od žijících dárců
- Podmínkou je negativní cross-match (křížová zkouška) mezi dárce a příjemcem a kompatibilita v KS.
- Kadaverózní dárce jsou hlavní možností pro čekatele na Tx, u žijících dárců zůstává v popředí neohrozit dárce.

# Transplantace krvetvorných buněk

- 2.pol.19 stl. – rozpoznán význam kostní dřeně pro tvorbu krvinek→myšlenka léčit zdravou kostní dření krevní nemoci
- Výzkum Tx krvetvorby byl spuštěn i jadernými pokusy v 50. letech 20. stl., neboť nemoc z ozáření se projevuje poruchou funkce kostní dřeně
- 60. léta 20. stl. - důležitý mezník pro rozvoj **alogenních transplantací** krvetvorné tkáně, objev systému znaků bílých krvinek - HLA systém
- 70. léta 20. stl.- objev a zavedení do praxe léku cyklosporinu A, který potlačuje některé nežádoucí reakce po Tx
- R.1977 – publikována práce s výsledky prvních 100 alogenních Tx kostní dřeně od HLA-A, -B, -DR identických sourozenců provedených ve Spojených státech ve městě Seattle – autor této práce Donnell Thomas za ní dostal Nobelovu cenu v r.1990
- Úspěšné Tx by nebyly možné bez objevu dalších účinných léků – nová antibiotika, protiplísňové léky, růstové faktory krvetvorby, imunosupresiva, nutná dostupnost transfuzních přípravků a krevních derivátů
- Protože více než 2/3 nemocných nenajdou v rodině vhodného příbuzného dárce, vzniká myšlenka hledat vhodného dárce dřeně mezi dobrovolníky na celém světě – vytváření registrů dárců kostní dřeně



- Typy transplantace dle dárce – autologní Tx  
alogenní Tx  
syngenní Tx
  - Typy Tx dle zdroje – Tx kostní dřeně  
Tx krevetvorných buněk z periferní krve  
Tx pupečnickové krve
1. **Autologní transplantace** - převod vlastní krevetvorné tkáně nemocného. Krevetvorná tkáň je nemocnému odebírána před podáním vysokodávkové chemoterapie nebo celotělové radioterapie. Krevetvorná tkáň v době léčby je uschována, zamražena, po podání začíná většinou do 14 dnů až 3 týdnů opět produkovat krevní buňky, jedná se o vlastní krevetvorné buňky, není nutno užívat imunosupresiva.
  2. **Alogenní transplantace** – jde o převod krevetvorné tkáně získané od zdravého dárce. Pokud je dárce HLA identický sourozenec, jde o **alogenní příbuzeneckou** transplantaci. Pokud je dárce nepříbuzný jedinec HLA shodný, jde o **alogenní nepříbuzeneckou** transplantaci. U alogenní Tx nespočívá léčebný efekt pouze ve vysokodávkové terapii, ale i v tak zvaném efektu „štěpu proti nádorovému onemocnění“, kdy imunitní buňky dárce vznikající v kostní dřeni po Tx rozpoznají a zahubí zhoubné buňky nemocného příjemce.
  3. **Syngenní transplantace** – převod krevetvorné tkáně mezi jednovaječnými dvojčaty.

# Transplantace krvetvorných buněk

- Krvetvorné buňky podány do žíly jako transfuze po předchozí chemoterapii nebo ozáření
- Po autologní a syngenní Tx dochází k plnohodnotné produkci krvetvorných buněk přibližně za 2 týdny
- Po alogenní Tx dojde k přihojení krvetvorby dárce většinou za 2 – 4 týdny, nutno podávat imunosupresiva, která brání rozvoji nežádoucích imunitně zprostředkovaných reakcí vzniklých rozdíly mezi buňkami dárce a příjemce. Tyto rozdíly existují, i když mají dárce a příjemce shodné HLA znaky
- Krvetvorné buňky lze podávat nemocnému hned po odběru nebo je možné je zamrazit v tekutém dusíku a podat pak po rozmražení
- Tx krvetvorných buněk může být komplikována infekcemi, krvácením nebo „nemocí štěpu proti hostiteli“

# Registry dárců kostní dřeně

- R. 1970 - myšlenka vytvoření mezinárodního registru dárců kostní dřeně,
- prof. Jon J. van Rood na sjezdu Německé transfuziologické společnosti navrhl založit seznam HLA – typizovaných dobrovolných dárců krve k výběru HLA – shodných dárců krevních destiček i kostní dřeně k transplantacím
- **První aktivní registr dárců dřeně - Anthony Nolan Trust v Anglii**, založen v r.1974 ve snaze najít vhodného dárce pro chlapce Anthonyho Nolana s vrozeným defektem imunity. Chlapec se Tx nedočkal.
- Registr nepříbuzných dárců dřeně, založený jeho matkou roste a dál prosperuje ve snaze nalezení dárce kterémukoliv z pacientů, který Tx potřebuje kdekoliv na světě.
- V následujících letech John J. van Rood iniciuje spolupráci mezi rozvíjejícími se registry jednotlivých zemí za účelem hledání vhodných dárců pro nemocné. Společný mezinárodní seznam byl nazván **Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) – Dárci dřeně celého světa.**



# Banky pupečnickové krve

- R.1988 – 1. Tx s využitím kmenových buněk z placentární pupečnickové krve, dárce novorozená HLA – kompatibilní sestra nemocného dítěte. Její pupečnicková krev byla odebrána a zamrazena v době porodu. Tx byla úspěšná.
- 1. banka pupečnickové krve - New York Cord Blood Bank, která poskytla vzorky zamražených pupečnickových kreví k všeobecnému využití prostřednictvím BMDW
- Odběr krve ze zbytků pupečnicku po porodu neznámá žádné riziko ani pro matku ani pro narozené dítě. Pupečnicková krev se může uchovávat zamražená ve speciálních mrazících kontejnerech na libovolně dlouhou dobu.
- Kmenové buňky z pupečnickové krve nejsou plně imunitně dozrálé, jejich Tx přináší menší riziko reakcí štěpu proti hostiteli. Nižší riziko těchto reakcí umožňuje transplantovat pupečnickové kmenové buňky i při určité míře neshody HLA antigenů.
- Typický odběr pupečnickové krve obsahuje menší množství kmenových buněk než je možné získat od dospělého dárce a proto je pupečnicková krev použitelná k Tx jen pro děti.

- Výměna vhodných krvetvorných buněk dnes stále více přesahuje hranice jednotlivých zemí i kontinentů
- Závazná doporučení vydává světová asociace dárců dřeně ( World Marrow Donor Association – WMDA) – zahájila akreditační program pro jednotlivé národní registry za účelem dosažení pravidel mezinárodní výměny
- ČR – 2 registry dárců kostní dřeně
  - **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.