

# IMUNITA VROZENÁ

Marcela Vlková

# Vrozená imunita

## Fyzikální bariéry

Kůže  
Sliznice  
Respirační trakt  
Močový trakt

## Chemické bariéry

pH (kůže 5,5, žaludek 1-3, vagina 4,5)  
sekrece  
antimikrobiálních  
peptidů  
(lysozym, defensiny,  
cathelicidiny...)

## Biologické bariéry

Mikroorganismy  
fyziologické  
mikroflóry  
(komensální  
mikroorganismy)

## Celulární složky

Makrofágy, neutrofily  
Mastocyty, eosinofily,  
bazofily  
Epitelové a  
endotelové  
buňky,  
erytrocyty,  
destičky  
NK-buňky  
Dendritické buňky

# Antimikrobiální peptidy

- Endogenní **antibiotika**.
- Charakterizováno asi 20 různých proteinů.
- Tvořeny keratinocyty, mastocyty, buňkami ekrinních žláz, ale též neutrofilními granulocyty a buňkami NK.
- Spouštějí a koordinují aktivitu řady složek vrozeného a adaptivního imunitního systému („**alarminy**“).
- zajišťují integritu a růst epitelu, podporují angiogenézi.

# Antimikrobiální peptidy v residentních kožních buňkách

cathelicidiny (hCAP18/LL 37)

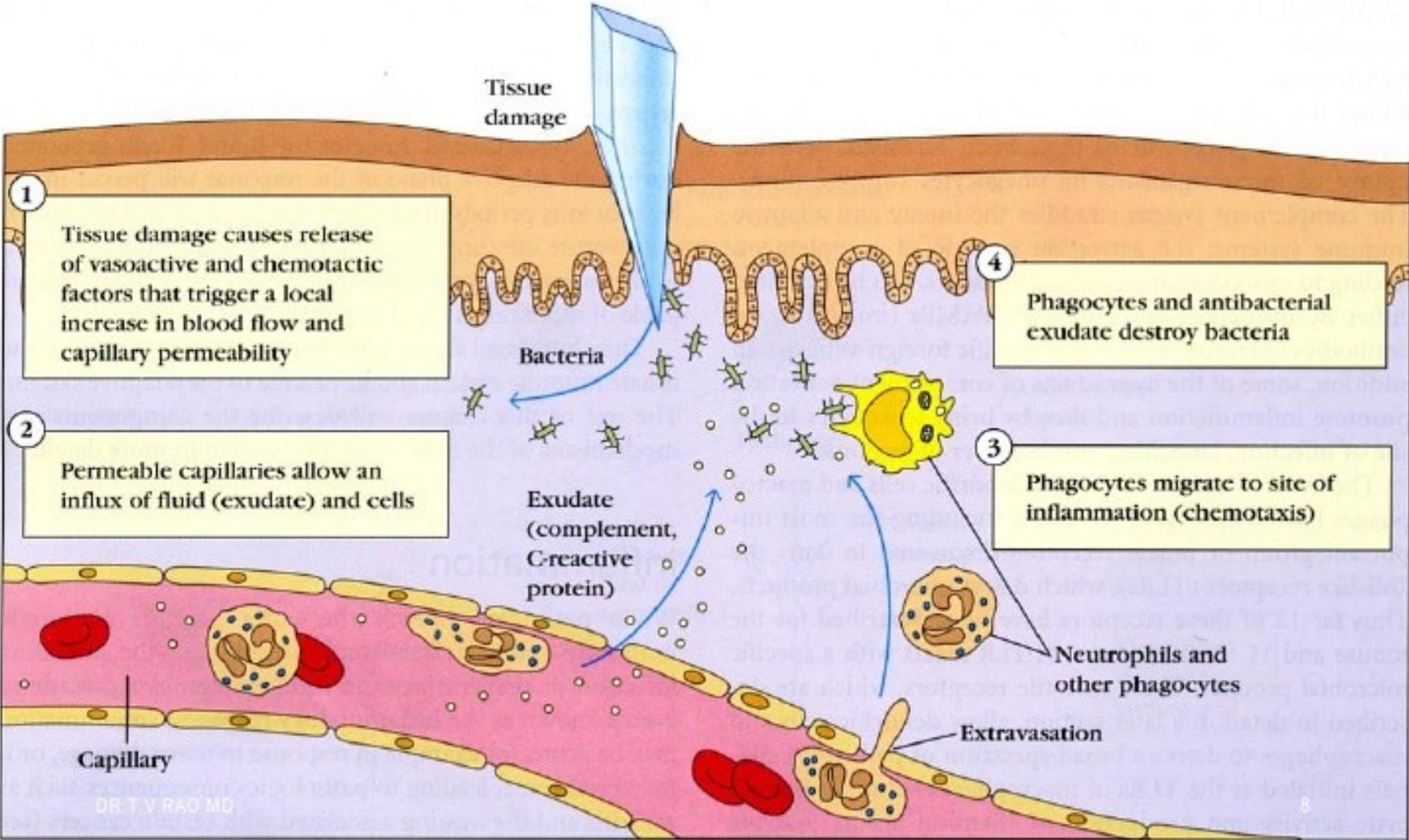
*keratinocyty*

$\beta$  - defensiny (HBD - 2, HBD - 3)

*keratinocyty*

dermcidiny (DCD)

*ekkrinní potní žlázy*



# Vrozená imunita – charakteristické rysy

- Vytvořila se k rozpoznávání cizích mikroorganismů, nikoliv vlastních molekul
- Aktivace reakce nastává během několika minut po rozpoznání patogenu
- Nevytváří imunologickou paměť
- Je závislá na zárodečně kódovaných receptorech rozeznávajících struktury společné mnoha patogenům

# Vrozená imunita: charakteristické rysy

## Specifičnost:

Jsou rozeznávány struktury, které jsou stejné u řady cizorodých agens (u mikroorganismů jsou to tzv. „pathogen associated molecular pattern“, **PAMP**, např. v lipopolysacharidech nebo peptidoglykanech).

*Adaptivní imunitní systém naproti tomu poznává a odlišuje epitopy antigenů (T-, B-)*

# PAMP „ Pathogen Associated Molecular Pattern“

- Patogenem asociované molekulové vzory
- Vysoce konzervované struktury přítomny na rozsáhlých skupinách mikroorganismů, jsou esenciální pro jejich životní funkce
- Nevyskytují se na hostiteli
- Peptidoglykany, kyselina lipoteichová, lipopolysacharid bakteriální manany, glukany,
- Bakteriální sekvence DNA tvořené cytosinem a guaninem (CpG) a dvoušroubovicovou DNA



# DAMP „Damage Associated Molecular Patterns“

- Vznikají při poškození infekcí, zánětem, chemickými toxiny, trauma, snížené krevní zásobování
- Nesouvisí s buňkami v apoptóze

# PAMPs and DAMPs

<b>TABLE 4–2 Examples of PAMPs and DAMPs</b>		
<b>Pathogen-Associated Molecular Patterns</b>		<b>Microbe Type</b>
Nucleic acids	ssRNA dsRNA CpG	Virus Virus Virus, bacteria
Proteins	Pilin Flagellin	Bacteria Bacteria
Cell wall lipids	LPS Lipoteichoic acid	Gram-negative bacteria Gram-positive bacteria
Carbohydrates	Mannan Dectin glucans	Fungi, bacteria Fungi
<b>Damage-Associated Molecular Patterns</b>		
Stress-induced proteins	HSPs	
Crystals	Monosodium urate	
Nuclear proteins	HMGB1	
CpG, cytidine-guanine dinucleotide; dsRNA, double-stranded RNA; HMGB1, high-mobility group box 1; HSPs, heat shock proteins; LPS, lipopolysaccharide; ssRNA, single-stranded RNA.		

# Vrozená imunita: charakteristické rysy

## Receptory:

pro tyto molekulární struktury jsou geneticky zakódovány - v DNA zárodečné linie. Označují se jako „pattern recognition receptors“, **PRR**.

Jsou jak na nebo v buňkách (např. TLR, NLR), tak i solubilní (např. CRP, MBL).

*Naproti tomu u adaptivní imunity receptory lymfocytů T a B vznikají somatickým přeskupováním genů.*

# Vrozená imunita: charakteristické rysy

## Rozsah repertoáru:

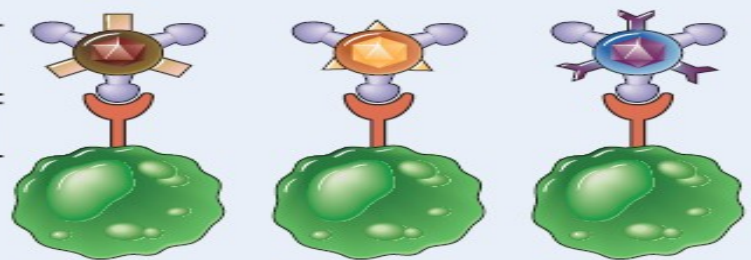
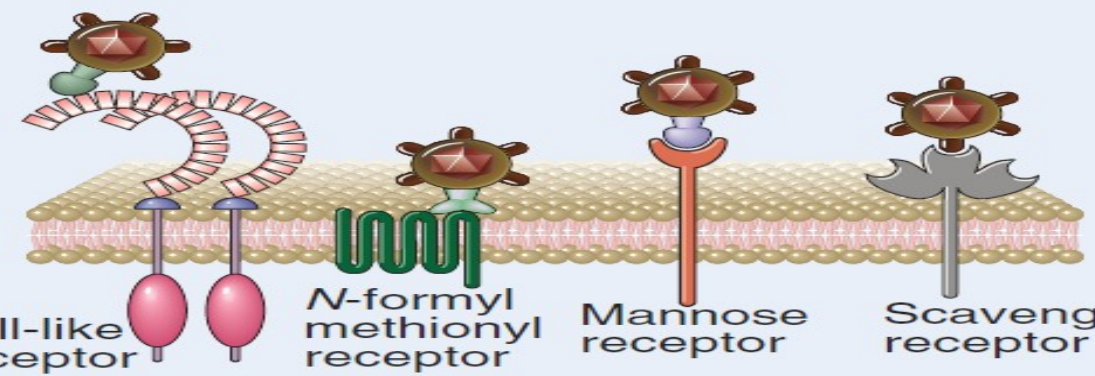
Poznávací schopnost PRR je omezená, odhaduje se na cca  $10^3$  „molekulárních vzorců“, zatímco *adaptivní imunitní systém je schopen odlišit (TCR, BCR lymfocytů) více než  $10^{7-8}$  epitopů antigenů.*

Kromě součástí mikroorganismů poznává vrozený imunitní systém také alterované buňky hostitele (prostřednictvím např. heat shock proteinů, membránových fosfolipidů, MHC)

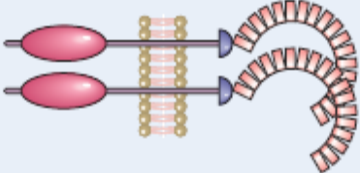


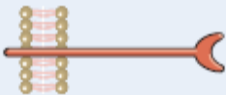
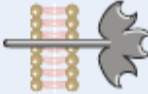

# PRR- Pattern Recognition Receptors

- Identifikace PAMP a solubilních složek imunity
- Exprese receptorů není klonální – receptory přítomné na stejném typu buněk mají stejnou identitu
- Připraveny okamžitě reagovat – není potřeba proliferace – rychlá odpověď
- Schopny diskriminace mezi patogenními a nepatogenními mikroorganismy

# PRR- Pattern Recognition Receptors

Innate Immunity	
Specificity	<p>For structures shared by classes of microbes (pathogen-associated molecular patterns)</p> <p>Different microbes</p> <p>Identical mannose receptors</p> 
Receptors	<p>Encoded in germline; limited diversity (pattern recognition receptors)</p>  <p>Toll-like receptor</p> <p>N-formyl methionyl receptor</p> <p>Mannose receptor</p> <p>Scavenger receptor</p>
Distribution of receptors	Nonclonal: identical receptors on all cells of the same lineage
Discrimination of self and non-self	Yes; healthy host cells are not recognized or they may express molecules that prevent innate immune reactions

# Cell associated PRR

Cell-Associated Pattern Recognition Receptors	Location	Specific Examples	PAMP/DAMP Ligands
<p>Toll-like receptors (TLRs)</p> 	Plasma membrane and endosomal membranes of dendritic cells, phagocytes, B cells endothelial cells, and many other cell types	TLRs 1-9	Various microbial molecules including bacterial LPS and peptidoglycans, viral nucleic acids
<p>NOD-like receptors (NLRs)</p> 	Cytoplasm of phagocytes epithelial cells, and other cells	NOD1/2 NALP family (inflammasomes)	Bacterial cell wall peptidoglycans Flagellin, muramyl dipeptide, LPS; urate crystals; products of damaged cells
<p>RIG-like receptors (RLRs)</p> 	Cytoplasm of phagocytes and other cells	RIG-1, MDA-5	Viral RNA
<p>C-type lectin-like receptors</p> 	Plasma membranes of phagocytes	Mannose receptor  Dectin	Microbial surface carbohydrates with terminal mannose and fructose Glucans present in fungal cell walls
<p>Scavenger receptors</p> 	Plasma membranes of phagocytes	CD36	Microbial diacylglycerides
<p><i>N</i>-Formyl met-leu-phe receptors</p> 	Plasma membranes of phagocytes	FPR and FPRL1	Peptides containing <i>N</i> -formylmethionyl residues

# PRR- Pattern Recognition Receptors

- **TLR** (Toll-like receptor): TLR1 -11
  - v buněčné membráně (např. TLR2, 4)
  - v endosomech ( TLR3, 7, 9)
- **RLR** (RIG-I-like receptor):
  - intracelulární (reakce s viry, tvorba IFN $\alpha$ )
- **NLR** (Nod-like receptors): např. NOD2, NALP3
  - v cytoplasmě, složky inflamasomů
- **CLR** (C-type lectin receptor)
  - poznávají nekrotické buňky, manosové zbytky



# Vrozená imunita

## Humorální složky

Mikrobicidní faktory (lysozym, defensiny, cathelicidiny a další)

Histamin, eikosanoidy


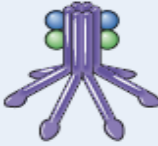


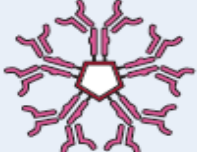
## **Komplementový systém**

Pentraxiny (CRP, SAP, PTX3)

Kolektiny (MBL, SP-A, SP-B), Fikoliny

Cytokiny (Interferony  $\alpha, \beta, \gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6, chemokiny)

# Solubilní PRR

Soluble Recognition Molecules	Location	Specific Examples	PAMP Ligands
Pentraxins 	Plasma	C-reactive protein	Microbial phosphorylcholine and phosphatidylethanolamine
Collectins 	Plasma Alveoli	Mannose-binding lectin Surfactant proteins SP-A and SP-D	Carbohydrates with terminal mannose and fructose Various microbial structures
Ficolins 	Plasma	Ficolin	<i>N</i> -Acetylglucosamine and lipoteichoic acid components of the cell walls of gram-positive bacteria
Complement 	Plasma	C3	Microbial surfaces
Natural antibodies 	Plasma	IgM	Phosphorylcholine on bacterial membranes and apoptotic cell membranes

# Vrozená imunita

## Humorální složky

### **Pentraxiny (CRP, SAP – sérový amyloid P, PTX3)**

CRP a SAP – produkovány buňkami jater

PTX3 produkován dendritickými buňkami, makrofágy a endotelem v odpovědi na vazbu na TLR a cytokiny

CRP a SAP se váží na různá místa buněčných stěn bakterií plísňí a apoptotických buněk obsahujících fosfatidylcholin a fosfatidylmetanolamin

PTX – vazba na vybrané typy gram-positivních i negativních bakterií, viry a plísně, apoptotické buňky

Všechny tři aktivují komplement vazbou na složku C1q

# Vrozená imunita

## Humorální složky

### **Kolektiny (MBL, SP-A, SP-D)**

MBL = Mannose binding Lectin - vazba manozových zbytků ve stěnách bakterií

SP-A, SP-D = Surfactant protein A, Surfactant protein D – opsoniny, nacházejí se v plicních sklípcích,

Funkce – inhibice růstu bakterií, spolupráce s alveolárními makrofágy

**Fikoliny** – N-acetylglukosoamin a lipoteichová kyselina – součást buněčné stěny grampozitivních bakterií

Cytokiny (Interferony  $\alpha, \beta, \gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1, IL-6, chemokiny)

# Komplementový systém - funkce

Skupina proteinů – proteolytickým štěpením dochází k aktivaci komplementové kaskády – vznik molekul s různými biologickými účinky:

Označení nebezpečných vzorů

mikroorganismů - opsonizace (C3b, C4b)

Chemotaxe (C3a, C5a, komplex C567)

Tvorba anafylatoxinů (C3a, C4a, C5a)

Osmotická lýza (komplex C5b-C9)

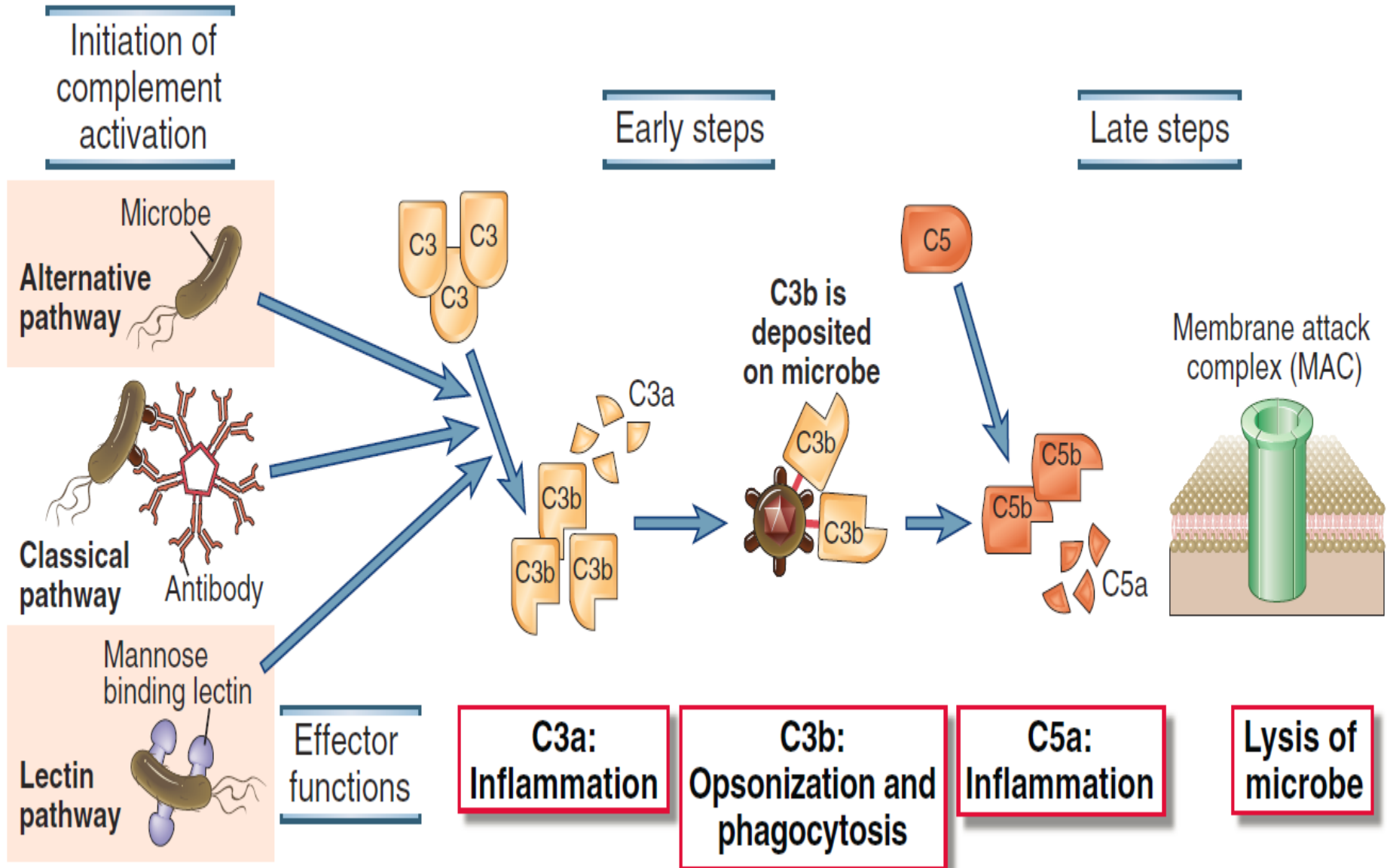
# Komplementový systému

- Soustava asi 30 sérových a membránových proteinů
- Hlavní složky 9 sérových proteinů C1-C9
- Kaskádovitá aktivace
- C3 ústřední složka, C3b vazba na mikrobiální povrch
- Terminální produkt komplementové kaskády C5b, C6, C7, C8 a C9 (MAC membrane attack complex)

# Aktivace aneb cesty komplementového systému

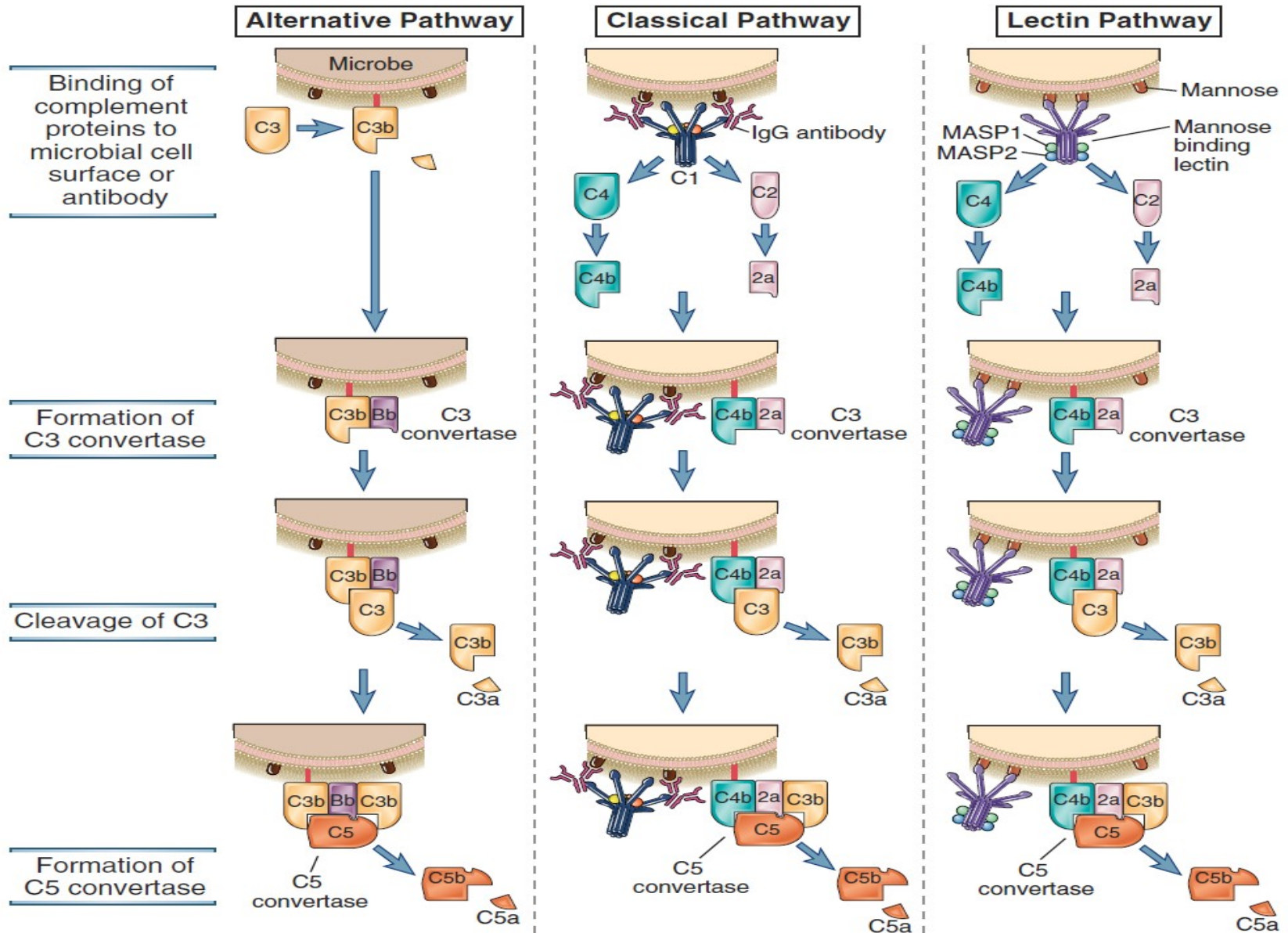
- ☞ klasická - spouštěna vazbou C1q na Fc úsek molekuly IgG nebo IgM
- ☞ alternativní - spouštěna bakteriálními produkty nebo jako následek spontánní hydrolýzy C3 složky komplementu regulačními faktory I a H
- ☞ lektinová - na C1q a na protilátce nezávislá, spouštěna vazbou MBL-mannan

# Aktivace komplementového systému

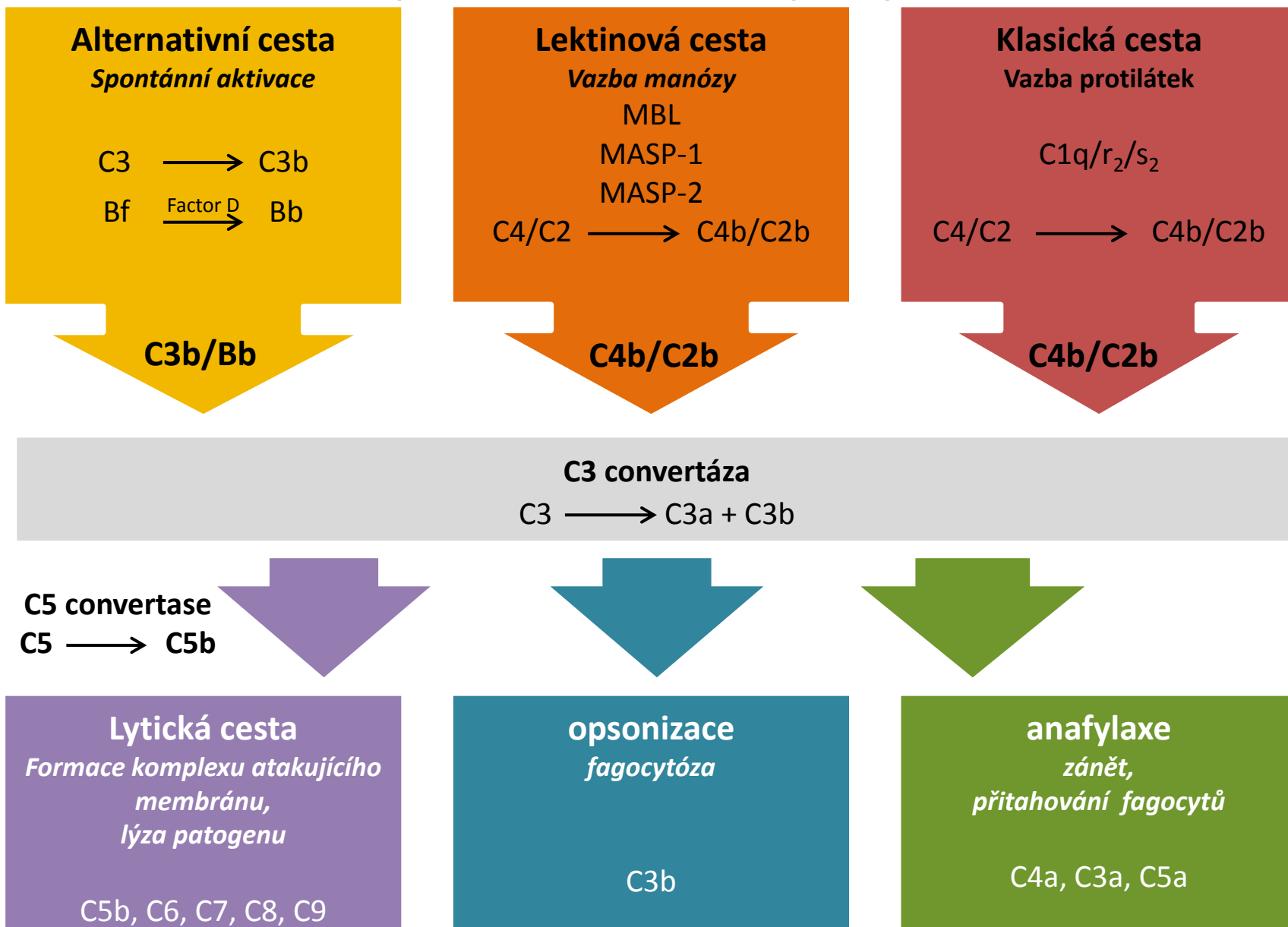




# Aktivace komplementového systému



# Komplementový systém



# Biologicky aktivní produkty aktivace C

- C2b, C2a
- C3a, C3b
- C4a, C4b
- C5a, C5b
- C5b679(n)
- Ba, Bb

adhese, chemotaxe, aktivace buněk, lýza buněk,  
odstraňování imunokomplexů a buněčných odpadů,  
modulace aktivity APC, B - i T-lymfocytů

# Deficience komplementového systému

- C1-C4 : častý vývoj systémových imunokomplexových chorob (SLE-like), náchylnost k pyogenním infekcím.
- C3-C9: zejména náchylnost k pyogenním infekcím. U deficitu C9 jsou typické opakované meningokové meningitidy.
- C1 INH: hereditární angioedém.

# Základní indikace vyšetření složek komplementového systému

- **Podezření na deficit některé složky aktivačních drah:**
  - Funkční vyšetření klasické (CH 50) nebo alternativní (AH 50) dráhy
  - V případě patologického nálezu vyšetření hladiny jednotlivých složek komplementu.
- **Monitorování zánětlivého procesu:**
  - Složky komplementu se chovají jako proteiny akutní fáze.
  - Při silné aktivaci komplementu při imunokomplexových chorobách ale dochází k výrazné konzumpci.
- **Podezření na poruchu regulačních složek komplementové kaskády (hereditární angioedém):**
  - Vyšetření C1 INH a hladiny složek C3 a C4.

# FUNKČNÍ VYŠETŘENÍ KLASICKÉ DRÁHY

## *Hemolytický test CH50*

**!Odběr sražené krve do skleněné zkumavky, nutno zpracovat do 1 hodiny!**

- erythrocyty po inkubaci s protilátkami (amboceptorem) vytvoří komplex antigen – protilátka
- přidání vyšetřovaného séra (obsahuje komplement)
- lýza erythrocytů se projeví uvolněním hemoglobinu; detegujeme spektrofotometricky

# Imunochemické vyšetření jednotlivých složek komplementového systému

- **C3** (0,7 – 1,5 g/L)
- **C4** (0,1 – 0,4 g/L)
- **C1-INH** (210-390 mg/L); + funkční test
- **C1q** (100-250 mg/L), **C2** (10 – 30 mg/L), **C5** (80 – 170 mg/L)
- **MBL** (0,3 – 3,5 mg/L)

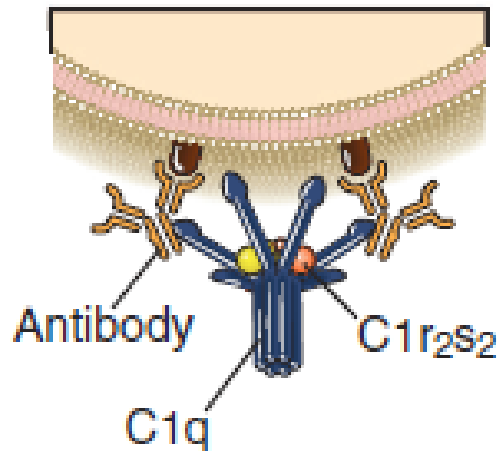
# Lektin vázající manózu (MBL)

- Po vazbě na manózové zbytky na povrchu bakterií aktivuje C2 a C4.
- Asi u 25% populace lze prokázat heterozygótní deficit.
- Deficit MBL je asociován s vyšší frekvencí banálních infekcí a komplikací při cytostatické léčbě.

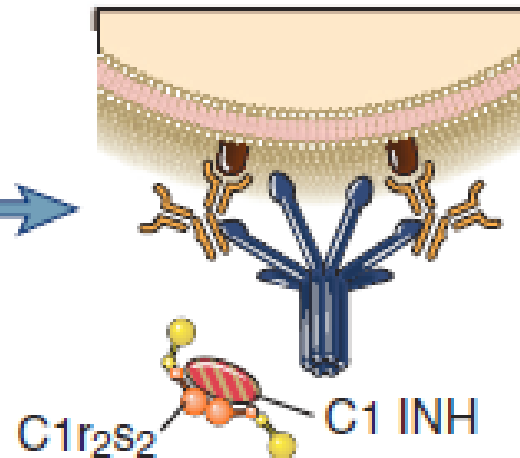


# Funkce C1-INH

C1q binds to antigen-complexed antibodies, resulting in activation of C1r<sub>2</sub>s<sub>2</sub>



C1 INH prevents C1r<sub>2</sub>s<sub>2</sub> from becoming proteolytically active



# Hereditární angioedém

- Způsoben deficitem C1 INH, dominantně dědičný
- Při traumatech, stomatologických výkonech, infekcích, menstruaci dochází k nekontrolované aktivaci komplementového systému
- Vazoaktivní peptidy způsobují zvýšenou vaskulární permeabilitu se vznikem edémem; terčem terapie může být bradykinin
- Klinické příznaky- nesvědivé kožní otoky, dechové obtíže, průjmy, křeče v břiše

# Komplementový systém je pilířem imunity

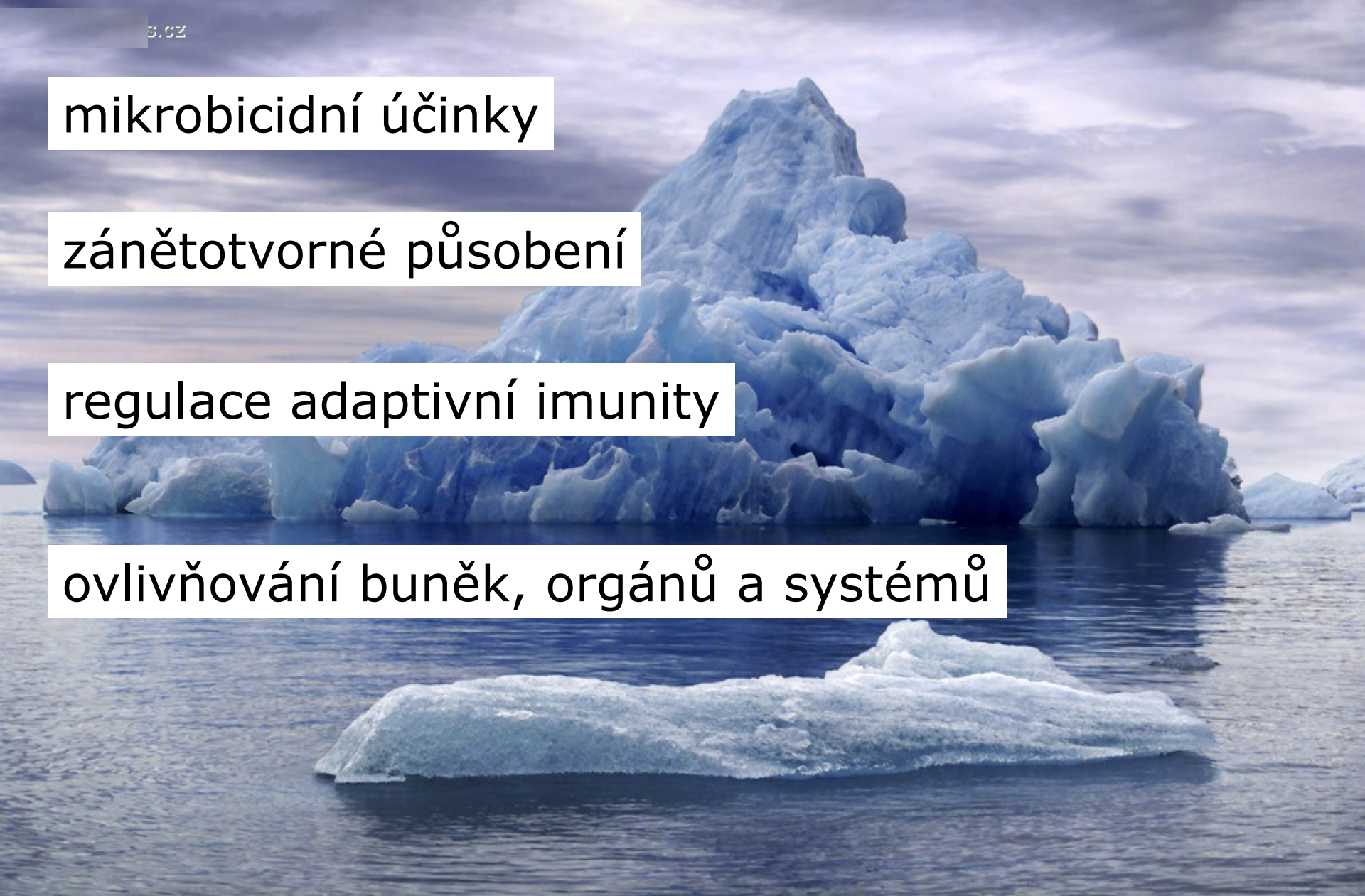
3.02

mikrobicidní účinky

zánětotvorné působení

regulace adaptivní imunity

ovlivňování buněk, orgánů a systémů



# Celulární složky vrozené imunity



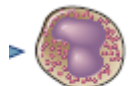
Erythrocyte

Neutralizace chemokinů, odstraňování komplexů Ag-Ab, zpomalení pohybu leukocytů v kapilárách zvyšují adhezi na endotel, krevní skupiny, Rh- faktor



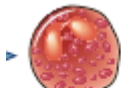
Platelet

Obsahují denzní tělíska (ADP, serotonin, histamin) a alfa granule (cytokinů, chemokinů, růst.faktorů) - modulace zánětové odpovědi



Basophil

Krátce žijící buňky, v cytoplazmě četná granula obsahující histamin, proteoglykany, interleukiny (IL-4, IL-13) – časná fáze zánětové reakce, Váží IgE – degranulace - rozvoj zánětu



Eosinophil

Krátce žijící buňky 10-20h – v periferní krvi, delší životnost v tkáních - sliznice dýchacího, trávicího a močopohlavního ústrojí; Receptory pro Ig, chemokiny cytokiny složky komplementu... v cytoplazmě četná granula obsahující kationické proteiny (ECP), cytokiny (IL-3,IL-5, TNFalfa...) chemokiny, úloha v časně fázi zánětu

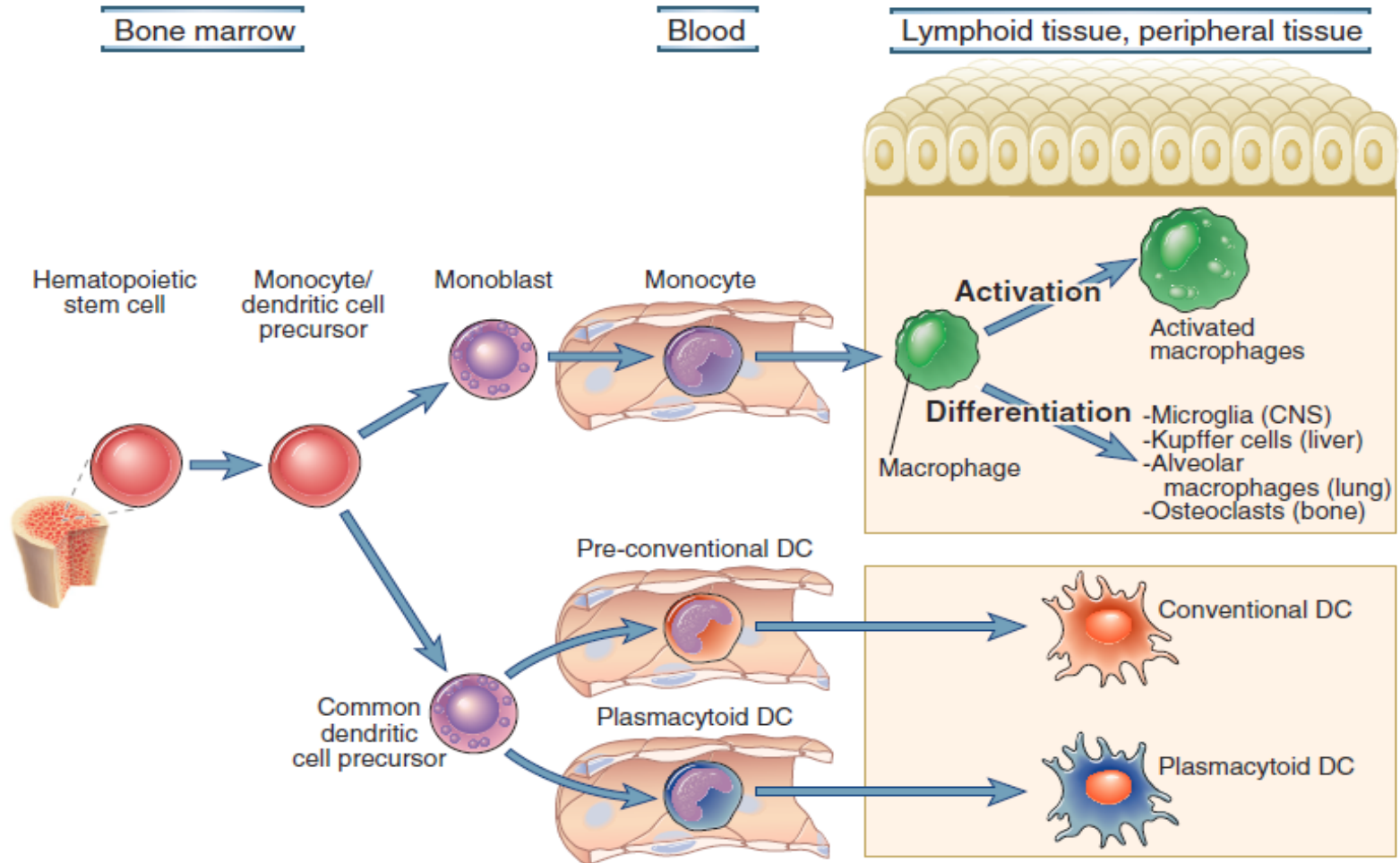
# Celulární složky vrozené imunity

## Mastocyty

- Lokalizovány perivaskulárně a v blízkosti neuronů
- Dlouhožijící buňky
- Jsou aktivovány IgE a antigeny, imunokomplexy, cytokiny, anafylatoxiny, hormony, neurotransmitery
- Sekretují řadu vasodilatačních a prozánětlivých mediátorů – preformovaných (histamin, kininy, proteasy) i nově syntetizovaných (leukotrieny, prostaglandiny, NO, cytokiny –zejm.  $\text{TNF}\alpha$ )
- Důsledek – akumulace buněk přirozené imunity (neutrofily, eosinofily, monocyty-makrofágy a lymfocyty
- Účast v reparačních procesech

**Jsou jednou z nejvýznamnějších součástí vrozených obranných imunitních mechanismů.**

# Buňky imunitního systému – monocyty, makrofágy, dendritické buňky



# PROFESIONÁLNÍ FAGOCYTY

Polymorfonukleární leukocyty  
(neutrofilní granulocyty)  
„mikrofágy“ (I. Mečnikov)

Mononukleární fagocyty  
(v krvi i ve tkáních)  
„makrofágy“ (I. Mečnikov)

# Fagocytóza

- Neutrofilní granulocyty a eosinofilní granulocyty
- Monocyty a makrofágy
- Fyziologická funkce:
  - » 1. pohlcení - ingesce
  - » 2. nitrobuněčné zabití - cidie
  - » 3. odstranění - eliminace
- Antimikrobiální systémy:
  - » 1. závislý na kyslíku
  - » 2. nezávislý na kyslíku



# Zabíjecí mechanismy fagocytujících buněk

## 1. závislý na kyslíku

Reaktivní metabolity kyslíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}^-$ , hydroxylový radikál, superoxidový aniont, singletový kyslík( $\text{O}_2$ ))

Reaktivní dusíkové metabolity ( $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ )

Hydrolázy: proteázy, lipázy, DNAsy, RNAsy

## 2. nezávislý na kyslíku

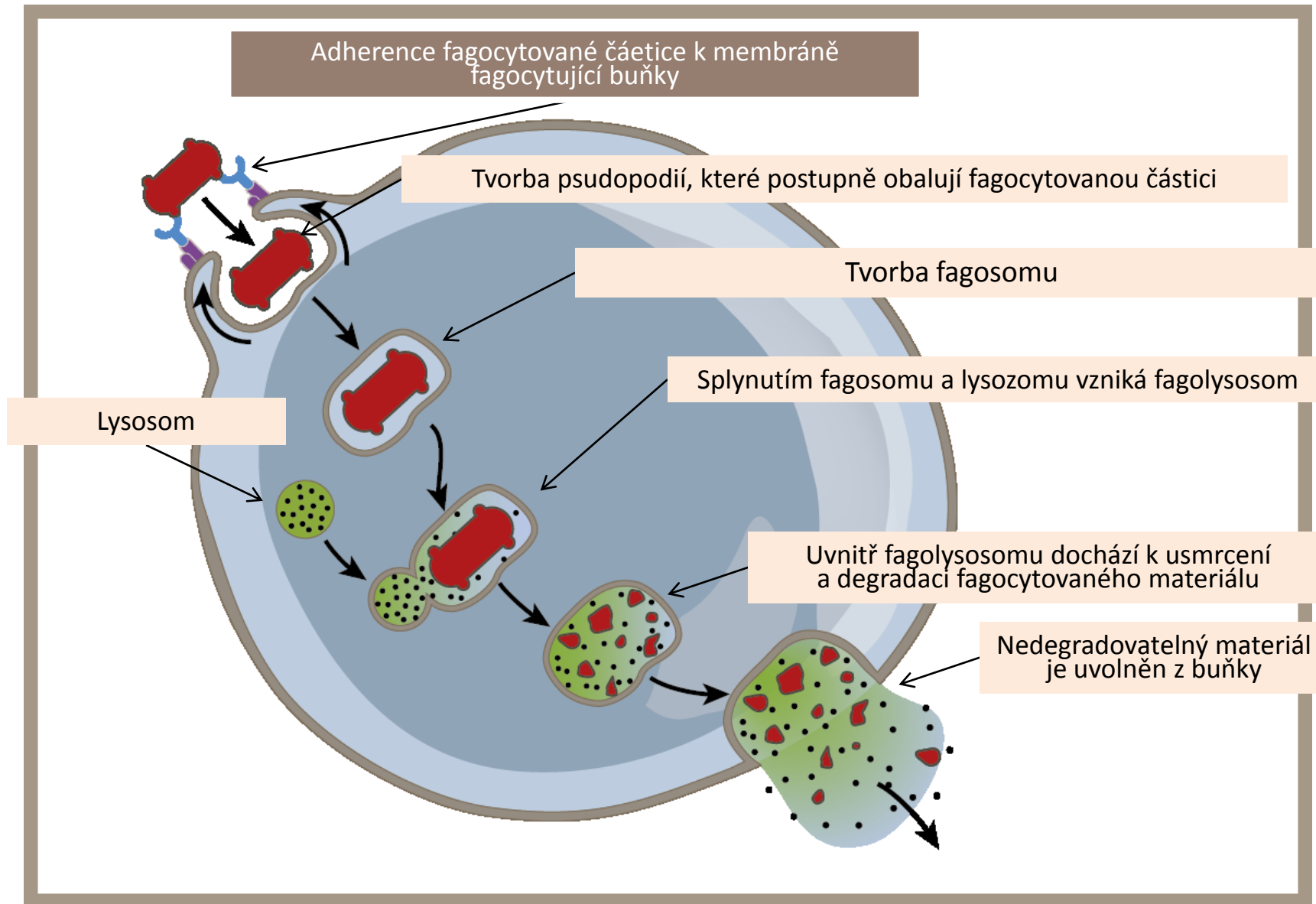
Nízké pH

Lysozym

Lactoferin

Defenziny – antimikrobiální polypeptidy

# Fagocytóza



# Možnosti vyšetření fagocytárních funkcí

Chemotaxe: vyšetření chemotaxe pod agarózou

Ingesce: ingesce metakrylátových partikulí

Tvorba reaktivních metabolitů kyslíku:

NBT test, chemiluminiscence, redukce tetraarhodamidu.

Vyšetření exprese  $\beta$ 2-integrinů

Komplexní vyšetření: mikrobicidie

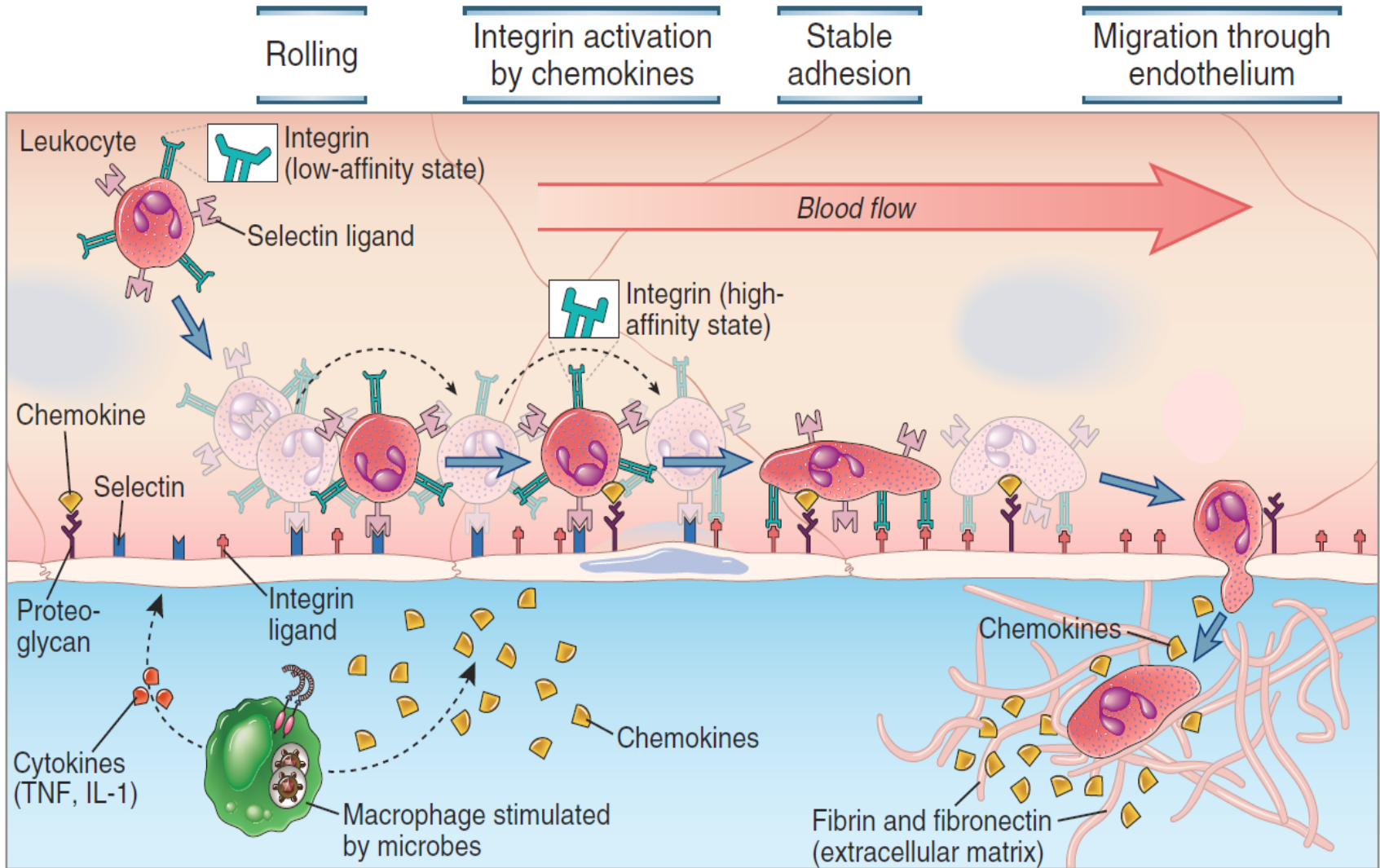
# Indikace k vyšetření fagocytárních schopností granulocytů

- Především opakované hluboké abscesy, hnisavé lymfadenitidy, případně i první epizoda abscesu v neobvyklé lokalizaci (jaterní absces). Obtíže jsou vrozené, tj. objevují se obvykle od časného věku.
- Výskyt solitárních, granulomů v časném věku.
- Poruchy odhojování pupečníku spojené s poruchou hojení ran a výraznou leukocytózou (LAD syndrom).

# Deficit leukocytárních integrinů (LAD-I)

- Příčinou syndromu je porucha syntézy CD18, nevytváří se komplex CD11/CD18 – integriny nutné k přechodu cév do místa zánětu.
- Opožděné odhojování pupečníku s omfalitidou.
- Abscesy s malou tvorbou hnisu.
- Často postižena periproktální oblast, objevují se gingivitidy, lymfadenitidy, kožní infekce.
- Porucha hojení ran.
- V krvi výrazná leukocytóza i mimo akutní infekci.

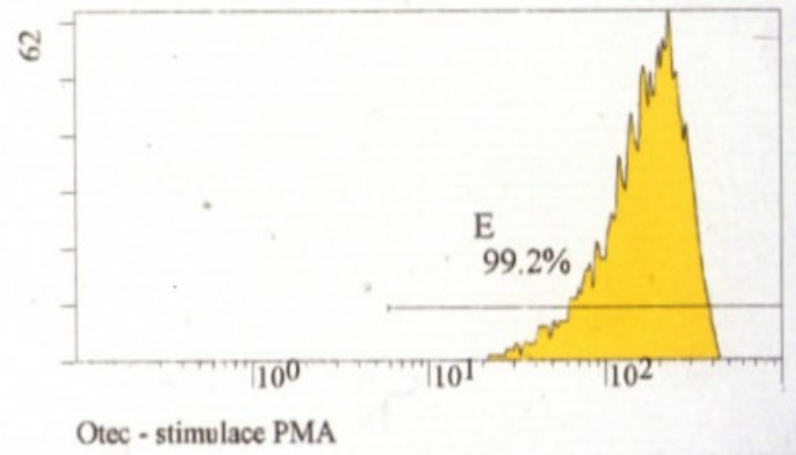
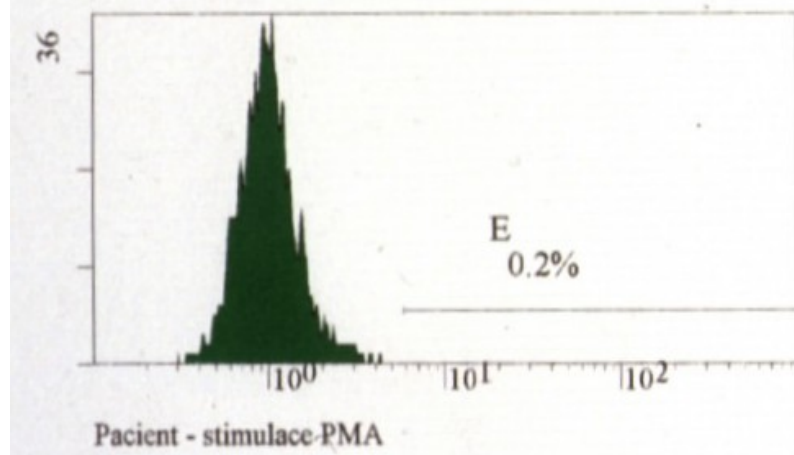
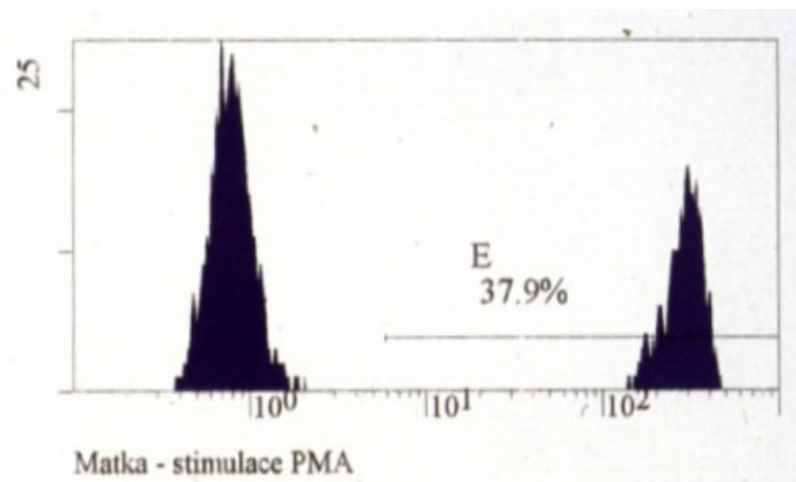
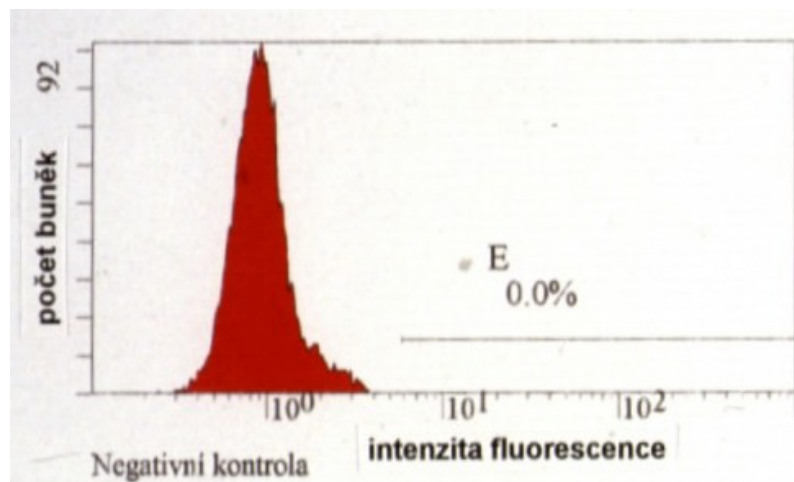
# Cesta leukocytů do místa zánětu



# Chronická granulomatózní choroba

- Opakované abscesy nejčastěji postihující játra, periproktální oblast, plíce, objevují se hnisavé lymfadenitidy, osteomyelitidy.
- Granulomy mohou působit útlak, například žlučovýchodů.
- Většinou poměrně časný nástup obtíží, první příznaky se však vzácně mohou objevit i v dospělosti.
- Příčinou je **porucha tvorby reaktivních metabolitů kyslíku.**

# Chronic Granulomatous Disease (X-linked)





# NK (Natural Killer) buňky

jsou morfologicky podobné lymfocytům („velké granulární lymfocyty“, LGL), nefagocytují, nemají adhezenční schopnosti

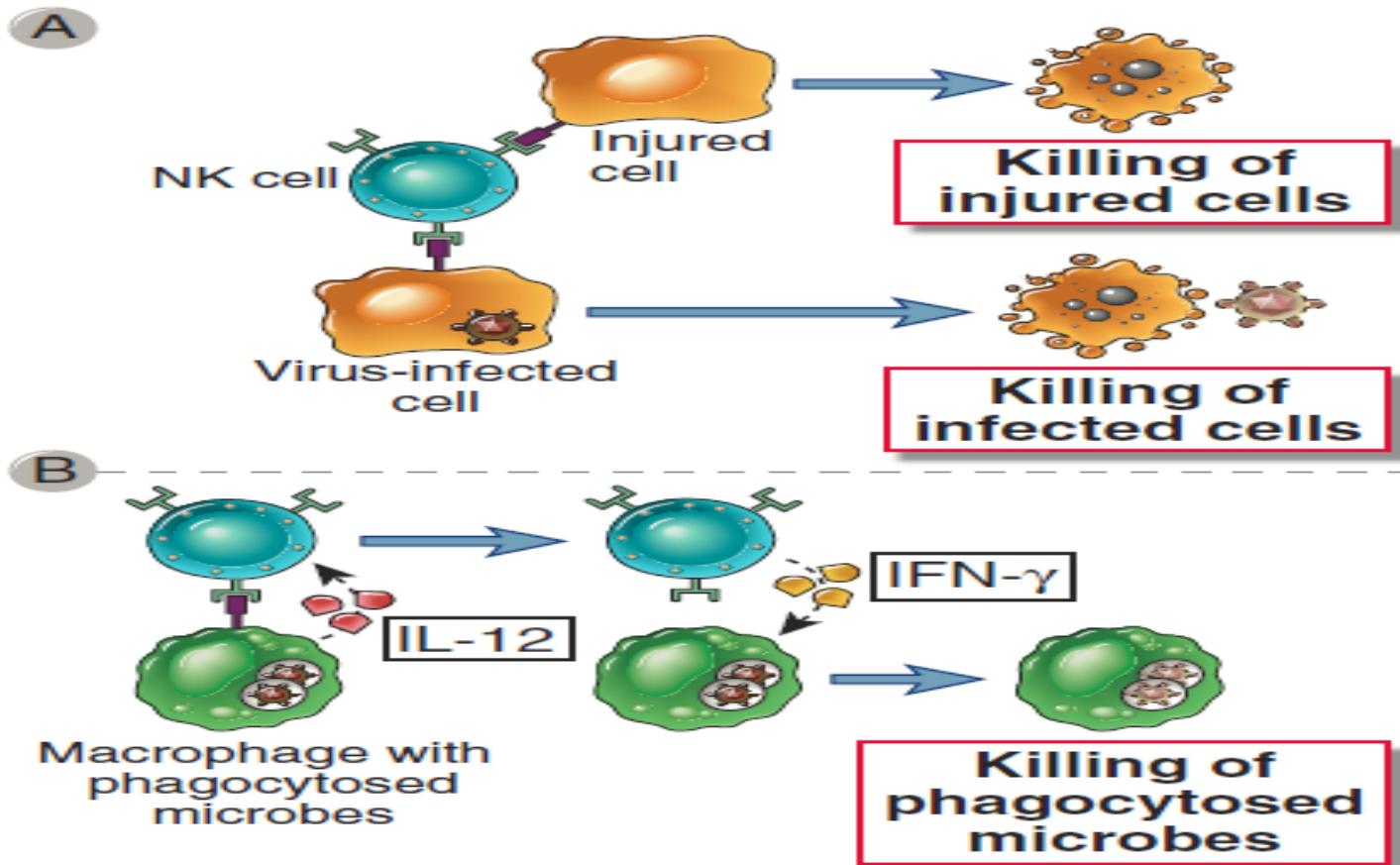
specializují se na zabíjení abnormálních vlastních buněk organismu nápadných nízkou expresí MHC molekul (např. infikovaných viry, intracelulárními bakteriemi, nádorové buňky)

cytotoxické nástroje NK buněk – perforin a granzym – podobně jako u CD8+ cytotoxických buněk

jejich cytotoxická aktivita je jednak přirozená, jednak může být zprostředkována protilátkami vázanými na FcR III (CD16), ADCC

ovlivňují vrozenou i adaptivní imunitu svými cytokiny, především  $\text{IFN}\gamma$  a  $\text{TNF}\alpha$

# Funkce NK buněk



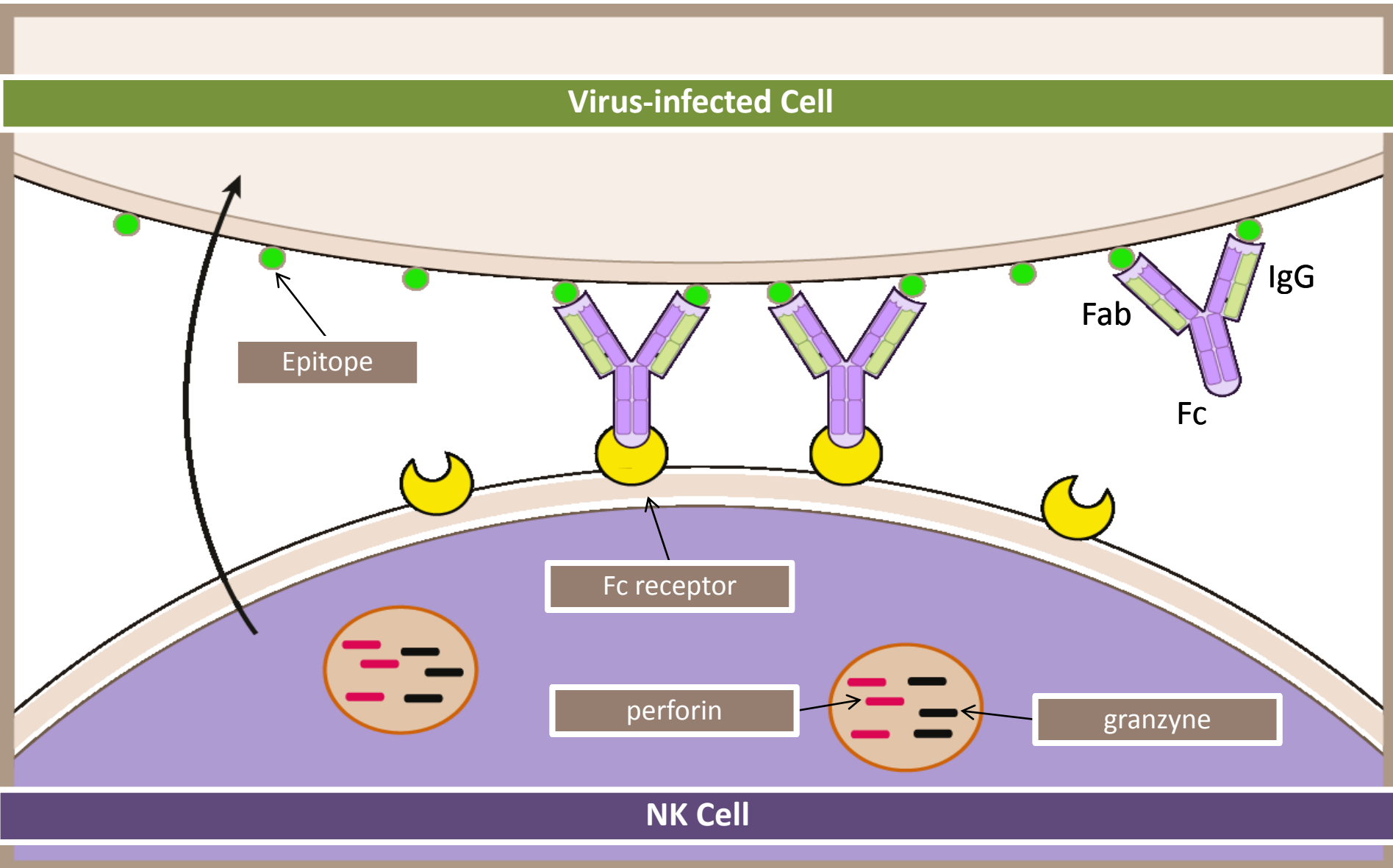
# Buňky NK

Aktivace NK-buněk je regulována souhrou signálů, které vycházejí z aktivačních a inhibičních receptorů.

- Inhibiční receptory (KIR) se váží na molekuly MHC I, které jsou přítomny na většině zdravých buněk.
- Aktivační receptory (KAR) poznávají heterogenní skupinu ligandů, které se objeví na buňkách v důsledku stresu, maligní konverse, virové infekce.

Řada genů, které ovlivňují funkci NK, jsou shluknuty na chromosomu 12 („natural killer gene complex – NKC“)

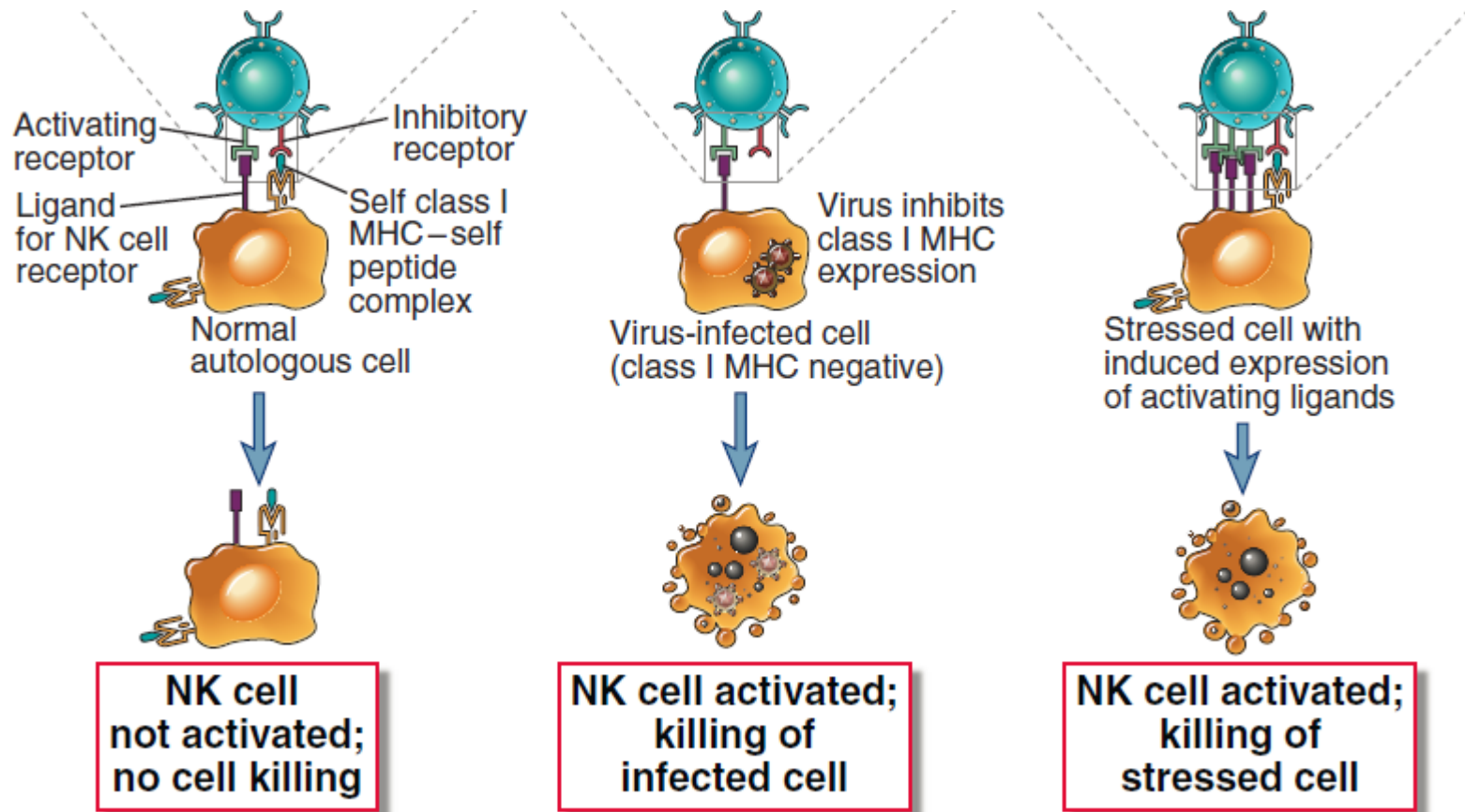
# Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC)



# Interferony (IFN)

- Existují dva typy interferonů:
- Typ I: IFN a, IFN b - jsou produkována některými buňkami infikovanými viry (hlavně fibroblasty, makrofágy). V cílové buňce inhibují virovou replikaci.
- Typ II tzv. imunní - IFN g: produkován NK buňkami, aktivovanými  $T_H1$  buňkami, způsobuje především aktivaci makrofágů.

# Reakce NK buněk



# Buňky NKT

- Imunofenotypově i funkčně podobné NK a T
- Přítomny v periferní krvi, slezině, játrech, lymfatických uzlinách, kostní dřeni, thymu
- Aktivované migrují do míst infekce nebo zánětu
- Receptor má charakter „semi-invariantního“  $\alpha\beta$ TCR (Va24/Ja18 – Vb11)
- **Poznávají glykolipidové nebo lipidové struktury presentované na nepolymorfní CD1 molekule (lysofostatidylcholin je autoantigenem pro lidské NKT)**

# Molekuly buněčných interakcí

## Cytokiny

Interleukiny (IL-1 – IL-35),  
IFN, TNF, TGF, CSF

Chemokiny (C, CC, CXC, CX3C)

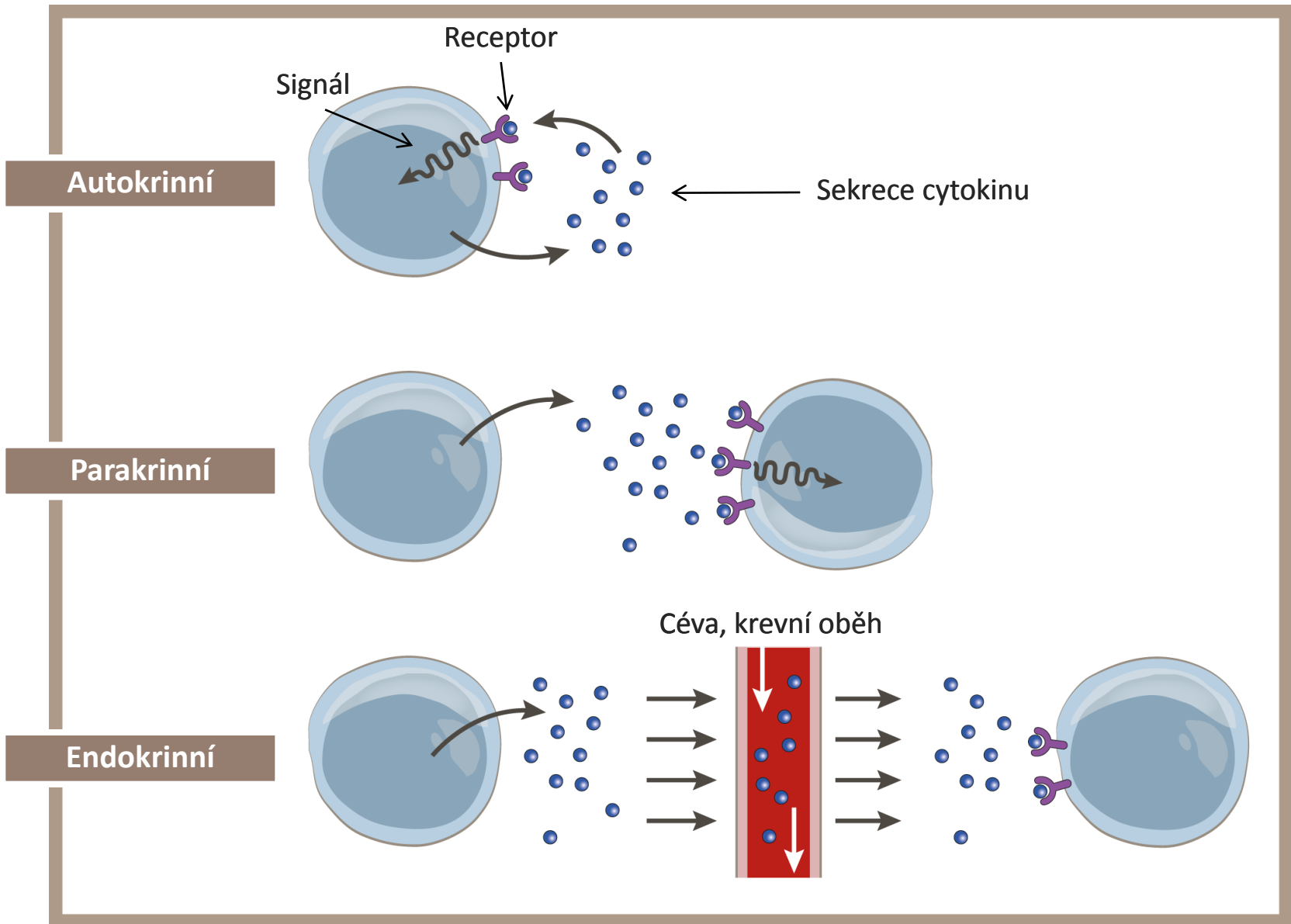
Adhezivní molekuly: integriny, selektiny, adresiny



# Cytokiny

- Hlavní regulátory imunitního systému, působící na krátkou vzdálenost prostřednictvím vazby na specifické receptory na povrchu buněk
- Jsou produkovány buňkami imunitního systému, mají krátký biologický poločas
- Účinek – autokrinní, parakrinní, endokrinní

# Schéma typů působení cytokinů na druhé buňky



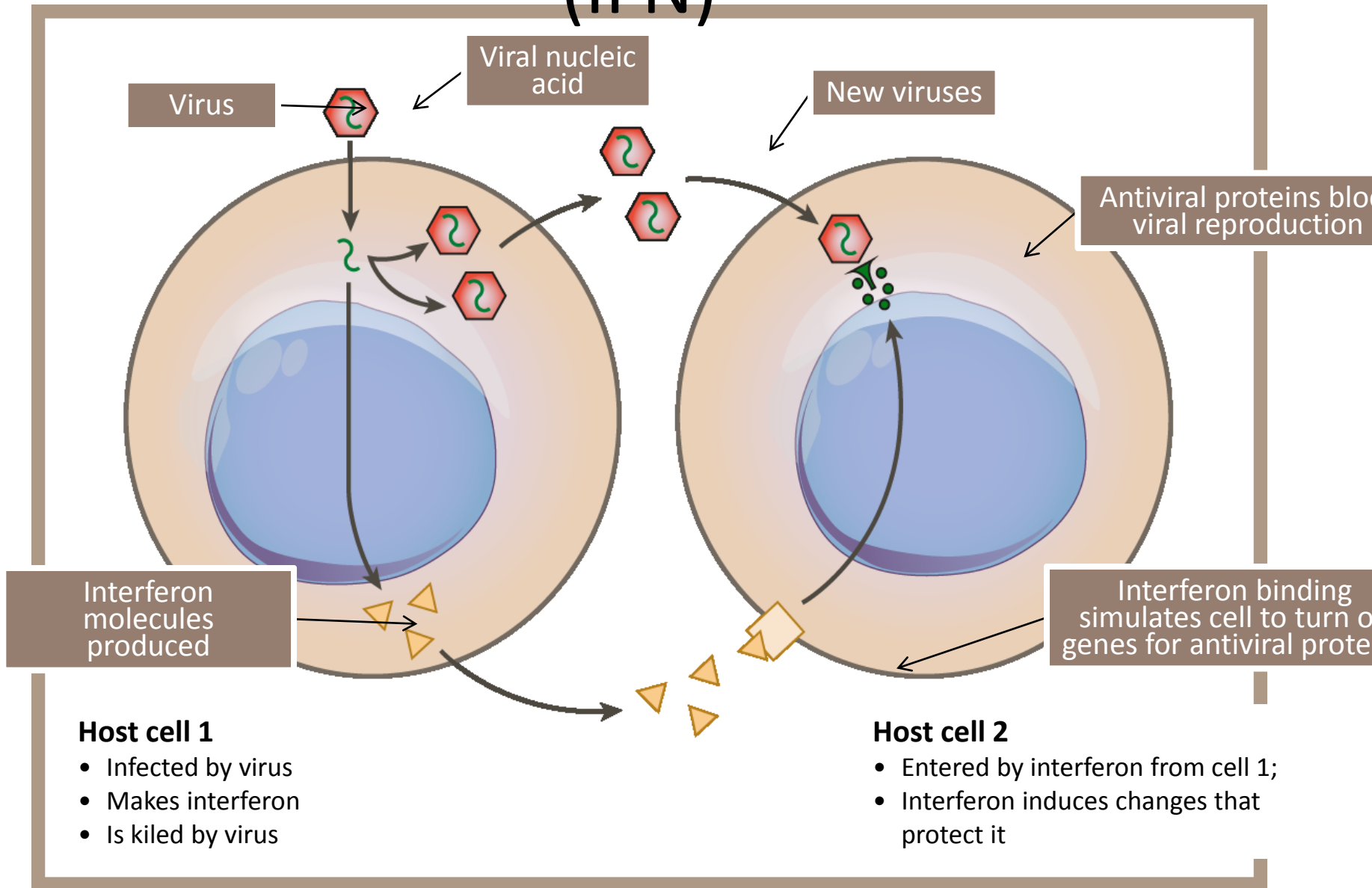
# Cytokiny

- Hlavním producentem je určitá skupina buněk x mohou však být produkovány různými buňkami
- Vytvářejí funkční cytokinovou síť
- Jeden cytokin má často stimulační i tlumivý efekt
- Působí na více oblastí, vlastností – tzv. pleiotropní efekt

# Funkce cytokinů

- Stimulační:
  - Stimulace T- lymfocytů: IL-2
  - Stimulace B-lymfocytů, produkce protilátek: IL-4, IL-5, IL-10, IL-21
  - Stimulace makrofágů: IFN- $\gamma$
  - Stimulace granulocytů: IL-8, chemokiny
  - Proliferace progenitorových buněk
- Prozánětlivé cytokiny: IL-1, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$
- Regulační: IL-10, IL-13, TGF- $\beta$

# Mechanismus účinku interferonu (IFN)



# Cytokiny

- Uplatňují se v patogenezi:
  - atopických chorob (IL-4, IL-13 – stimulace tvorby IgE)
  - Zánětlivé choroby (TNF- $\alpha$ )
  - Imunodeficiency (defekt produkce IFN $\gamma$ , IL-12)
- Ale lze je využít i terapeuticky
  - protinádorová léčba (IL-2, IFN- $\alpha$ )
  - Léčba sklerózy multiplex (IFN- $\beta$ )
  - Léčba některých imunodeficitů (IFN- $\gamma$ )

# Zánět

- fylogeneticky stará a monotónní obranná reakce
- efektorový mechanismus nejen vrozené , ale i adaptivní imunity
- rozvoj zánětu:
  - rozpoznání nebezpečného podnětu
  - vyhodnocení charakterů podnětu a rizika
  - vylití granul, transkripce genů, ..
- každý zánět má imunopatologickou složku

# **Zánět- komplexní obranná reakce systému vrozené imunity**

- na infekci bakteriální, virovou, parazitární,
- na poškození tkání fyzikálními a chemickými faktory
- na efektorové stadium adaptivní imunitní reakce

**Směřuje k odstranění škodliviny a k obnově  
poškozených struktur a funkcí**



# Zánět

- rychlá odpověď organismu na poškození tkání, (neimunologický podnět)
- nebo infekci (imunologický podnět)
- vede k lokalizaci onemocnění
- Eliminace případné infekce
- zahojení
- Reakce organismu může být místní nebo celková – závisí na rozsahu poškození a délce trvání

# Dva druhy zánětu

- Akutní zánět – fyziologický proces:
  - Odezní bez důsledků, dochází ke zhojení poškozené tkáně
- Chronický zánět – patologická reakce
  - Patologický, dochází k destrukci tkáně, nahrazování vazivem a vede k trvalému poškození

# Průběh zánětlivé reakce

- Fagocyty a tkáňové žírné buňky – uvolnění obsahu granulí do okolí
- Látky uvolněné z poškozených buněk –
- **Důsledek** - zvýšení permeability cév – tzn. prostup plazmatické tekutiny do extravaskulárního prostoru a vzniká otok

# Klasické známky zánětu

- Bolest
- Zarudnutí
- Otok
- Horečka

# Zánět - průběh

- Zvýšení adhezivity endotelií expresí adhezivních molekul – zachycení fagocytů a lymfocytů – jejich průnik do tkáně
- Aktivace koagulačního, fibrinolytického, komplementového a kininového systému
- Ovlivnění místních nervových zakončení (bolest)
- Změny regulace teploty (některé mediátory působí jako pyrogeny)

# Vliv prozánětlivých cytokinů

- Uplatňuje se zejména IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ .
- Ovlivněním hypotalamického centra termoregulace se zvyšuje tělesná teplota
  - Aktivátor metabolických pochodů v buňkách IS: indukce exprese heat shock protein (HSP) ( pomoc při skládání nativních nově syntetizovaných proteinů do správných konformací)
- Aktivace osy hypothalamus – hypofýza nadledinky – mobilizace tkáňového metabolismu
- Cytokiny se dostávají do oběhu – stimulace sérových proteinů tzv. “proteinů akutní fáze”.
- Klesá sérová hladina Fe a Zn.
- Objevuje se únavnost, ospalost, nechutenství.

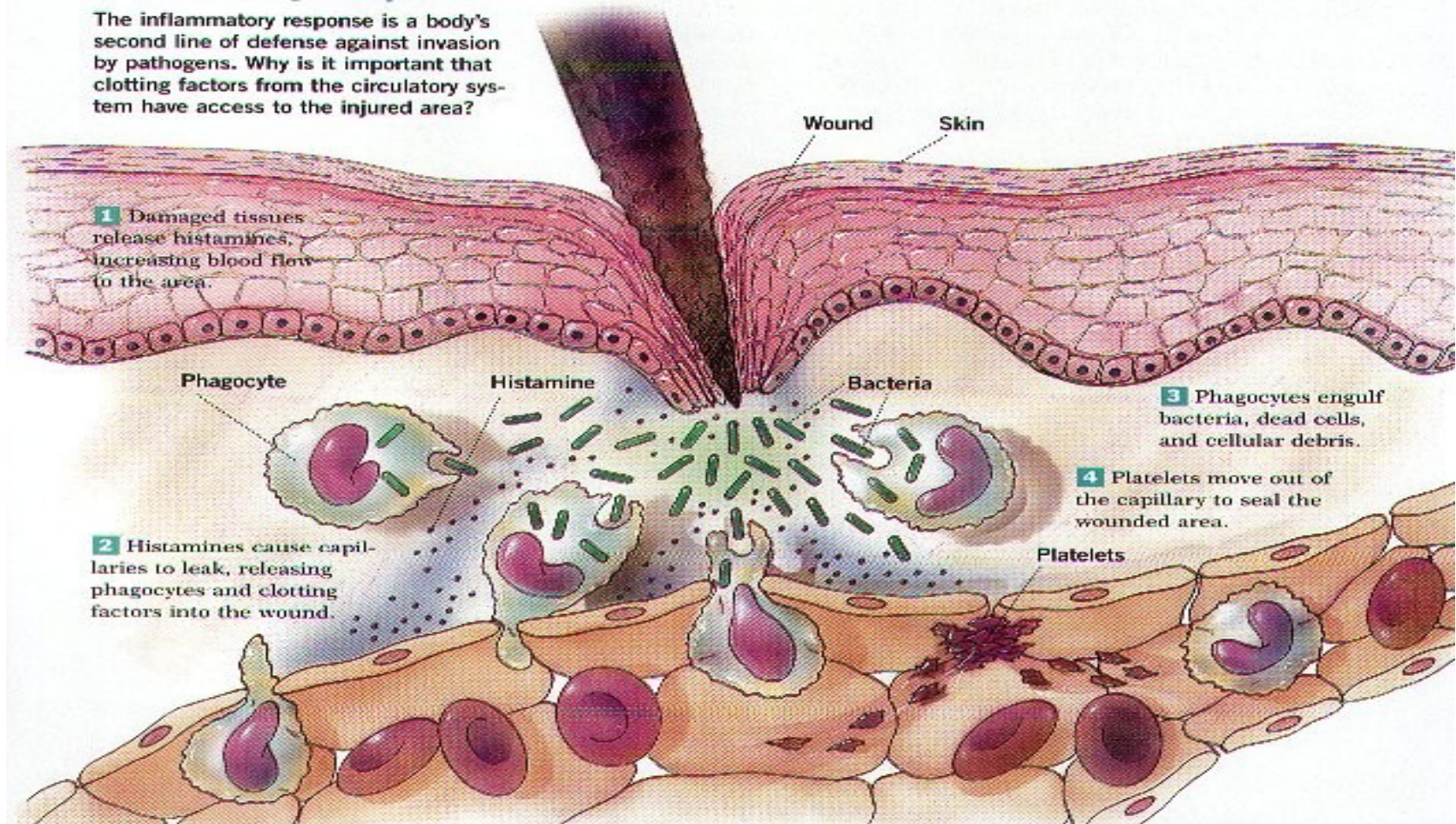
# Hlavní události v místě zánětu

- Hlavní roli hrají složky nespecifické imunity
  - Vznik vasoaktivních a chemotaktických látek, často produktů aktivace komplementového systému.
  - Zvýšený přítok krve do místa zánětu.
  - Příliv zánětotvorných buněk, zejména granulocytů a makrofágů.
  - Zvýšená cévní permeabilita vede k přechodu bílkovin do extravaskulárních prostorů.

# Iniciace zánětlivé odpovědi

## Steps of the Inflammatory Response

The inflammatory response is a body's second line of defense against invasion by pathogens. Why is it important that clotting factors from the circulatory system have access to the injured area?





# Laboratorní známky zánětu

- leukocytóza,
- zvýšená FW
- zvýšené hladiny reaktantů akutní fáze
- snížené hladiny železa a zinku v plazmě

# Proteiny akutní fáze

- Jejich hladina se zvyšuje v dob akutního zánětu
- Jsou produkovány hlavně játry pod vlivem IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$
- Nejznámější a diagnosticky nejčastěji využívaný: C-reaktivní protein (CRP)
- Další: součásti komplementového systému, alfa-1-antitrypsin, sérový amyloid A, fibrinogen...

# Proteiny akutní fáze

## Oponizace

- CRP – C-reaktivní protein
- SAP – sérový amyloid
- Složky komplementu C3, C4

CRP a SAP váží nukleoproteiny vzniklé při rozpadu tkání a napomáhají jejich odstraňování fagocytózou

Zvýšená syntéza sérových transportních proteinů (ceruloplazmin, ferritin)

Antimikrobiláních proteinů – hepcidin

Snižuje se tvorba albuminu, prealbuminu, transferinu

# Nejdůležitější léky využívané k tlumení zánětlivých procesů

- Nesteroidní antiflogistika (antirevmatika): kyselina acetylosalicylová, paracetamol...
- Glukokortikoidy
- Antimalarika
- Koloidní zlato
- Monoklonální protilátky proti prozánětlivým cytokinům a adhezivním molekulám.

# Reparace poškozené tkáně

- Eliminace poškozených buněk makrofágy
- Aktivace fibroplastických mechanismů
- Aktivace angiogeneze
- Regenerace a remodelace tkání
- Kontrolováno hormony enzymy a cytokiny
- U chronického zánětu zvýšená sekrece TGF beta – aktivace fibroblastů – vznik fibrotické tkáně

# Mediátory zánětlivé odpovědi

- IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  – celkové zánětlivé příznaky
- IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-18 - lokální aktivace buněk imunitního systému
- IL-8, leukotrieny, prostagladiny, C5a- chemotaxe.
- Histamin, serotonin, metabolity kys. arachidonové - vazodilace, ovlivnění permeability.

# Monitorování akutního zánětlivého procesu

Tělesná teplota

Sedimentace erytrocytů (FW)

Počet leukocytů v krvi

Změny spektra sérových bílkovin

v elektroforéze (pokles albuminu, vzestup  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  globulinů)

Sledování hladin proteinů “akutní fáze”

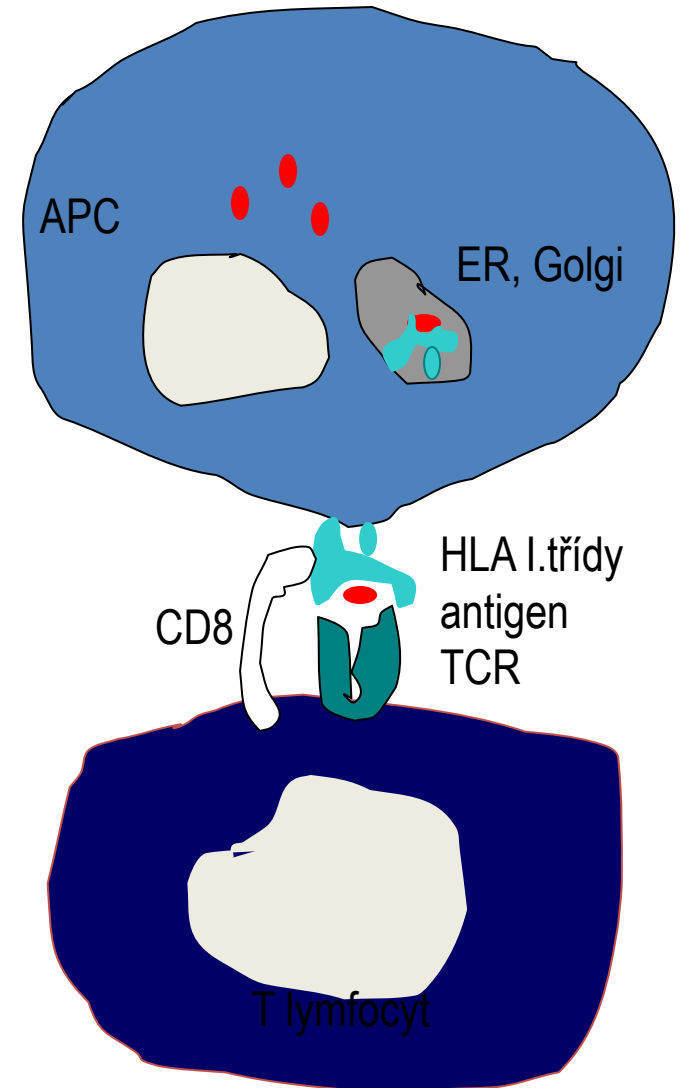
# Prezentace Ag

- Antigeny jsou molekuly, které vyvolají imunitní odpověď.
- Antigeny jsou většinou proteiny či glykoproteiny, nebo polysacharidy.
- Antigeny pocházející z vnějšího prostředí se do organismu dostanou přes gastrointestinální trakt, respirační trakt, kůži nebo arteficiálně např. injekčně.
- Antigeny vnitřní se nacházejí přímo v buňkách, může se jednat např. o proteiny kódované virovými geny nebo proteiny kódované mutovanými geny v nádorově změněných buňkách.



# Antigen prezentující buňky a T lymfocyty

- K iniciaci imunitní odpovědi je nutné rozpoznání antigenu T lymfocyty
- Povaha imunitní odpovědi je určována druhem prezentovaného antigenu.
  - prezentace endogenního antigenu



Major histocompatibility complex (MHC)

Human leukocyte antigens  
(HLA)

# MHC

## HLA

- Jsou odpovědné za histokompatibilitu – tzn. slučitelnost tkání
- Jsou unikátní pro každého jedince, jediný případ shody jsou jednovaječná dvojčata
- Receptory tvořené glykoproteiny
- Jsou exprimovány na povrchu všech jaderných buněk
- Slouží k rozpoznání „vlastního a cizího“ pro T, B a NK lymfocyty
- Hlavní funkce – nabídka zpracovaných peptidových fragmentů pro T-lymfocyty
- Jsou odpovědné za odvržení transplantátu

# Charakteristika genů MHC

- Dvě třídy: **MHC I a MHC II (HLA I, HLA II)**  
(krátké raménko 6. chromosomu)
- Polymorfismus:  
Geny MHC jsou nejpolymorfnějšími geny v genomu
- Kodominantní exprese:  
Každý jedinec má dvě alely (od obou rodičů); označují se číslicemi (např. HLA-A2, HLA-B5, HLA-DR3 ...)
- Soubor MHC alel na chromosomu se nazývá  
**haplotyp**

# Charakteristika molekul (antigenů) MHC

- Molekuly MHC I třídy jsou přítomny na všech jaderných buňkách (tedy ne na erytrocytech!)
- Molekuly MHC II třídy jsou přítomny na buňkách imunitního systému (buňky předkládající antigen – dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty), dále na buňkách endotelových a na epitelu thymu.
- Exprese molekul MHC I je na většině buněk zvýšena působením IFN, TNF, LT (tedy při vrozených imunitních reakcích)
- Expresi molekul MHC II na buňkách prezentujících antigen, vaskulárních endotelových buňkách, ale i na jiných buňkách (ne však na neuronech) zvyšuje IFN $\gamma$

# Charakteristika interakcí mezi MHC a peptidy

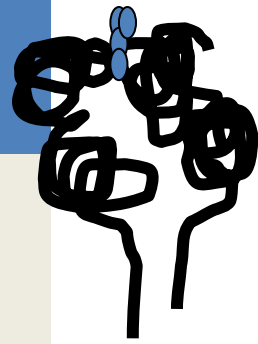
- MHC molekuly neodlišují peptidy vlastní a cizí
- MHC molekuly vážou řadu strukturálně podobných peptidů (**x** TCR-epitop)
- Vazba je nekovalentní, ligand pro MHC I sestává z 8-11 aminokyselin, pro MHC II cca z 10-30



# HLA molekuly I. třídy

- HLA molekuly I. třídy se skládají ze 3 částí
- transmembránový glykoprotein, nazývaný těžký řetězec, který má transmembránovou část a 3 domény extracelulární, nazývané  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  a  $\alpha 3$ .
- $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  domény jsou polymorfní částí HLA molekuly I. třídy
- tyto domény mají uspořádání, které umožňuje vazbu antigenního peptidu
- těžký řetězec je nekovalentně spojen s  $\beta 2$ -mikroglobulinem, nepolymorfním řetězcem HLA molekuly I. třídy
- třetí součástí HLA molekuly je peptid, vázající se do vazebného místa tvořeného  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  doménou

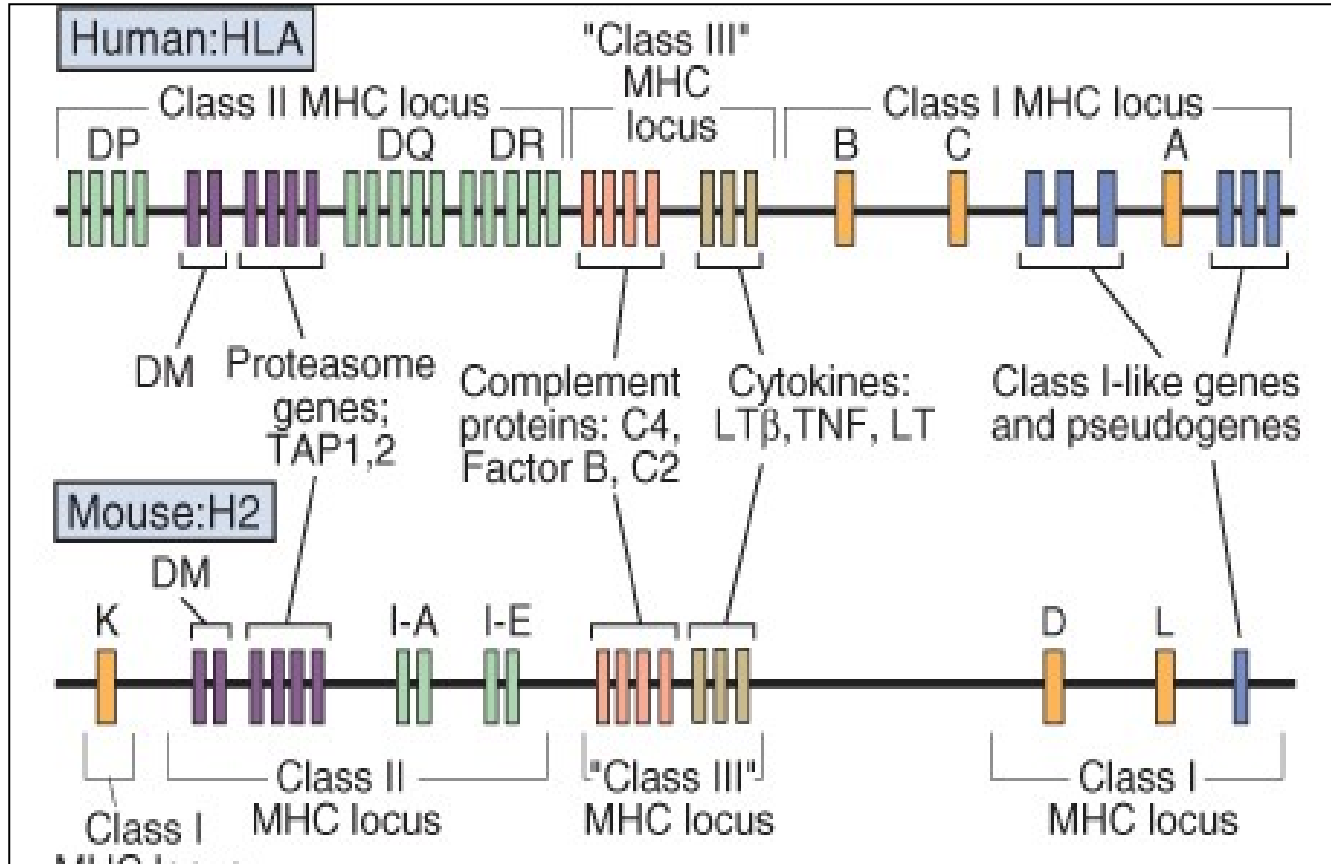
# HLA molekuly II. třídy



- HLA molekuly II. třídy se skládají z dvou transmembránových glykoproteinů, nazývaných  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec. Oba dva řetězce jsou polymorfní.
- HLA molekuly II. třídy se nacházejí ve 3 typech, pojmenovaných HLA DR, DP a DQ.
- Tyto molekuly jsou kódovány geny na 6 chromozomu, v oblasti HLA D.
- Molekuly HLA II. třídy jsou exprimovány velmi omezeně na buňkách prezentujících antigen. Exprese HLA II. třídy je indukovatelná, při zánětu je mohutně stimulována.



6.chromosom



# HLA a antigeny

- antigeny, které jsou předkládány imunitnímu systému v kontextu s HLA molekulami, pocházejí jednak z extracelulárního prostředí, tak zvané vnější antigeny - exoantigeny, jednak jsou lokalizovány uvnitř buňky, tak zvané vnitřní antigeny - endoantigeny.
- povaha vnitřních a vnějších antigenů se výrazně liší, každý indukuje zcela jiný typ imunitní reakce
- vnitřní antigeny jsou prezentovány v souvislosti s HLA I. třídy
- vnější antigeny jsou prezentovány v souvislosti s HLA II. třídy

# HLA antigeny

- HLA – I (A,B,C)
  - Prezentace antigenu CD8+ T lymfocytům
  - Prezentované antigeny jsou produktem buněčné proteosyntézy – vnitřní Ag
- HLA-II (DR, DP, DQ)
  - Prezentace na APC
  - Antigeny předkládány CD4+ T lymfocytům
  - Antigeny jsou exogenního původu – vnější Ag

# Exogenní antigeny

- Exogenní antigeny jsou zpracovány profesionálními antigen prezentujícími buňkami.
- Mezi tyto buňky patří
  - fagocytující buňky - makrofágy, dendritické buňky
  - B lymfocyty
- Všechny tyto buňky exprimují HLA II. třídy.

# Zpracování exogenních antigenů

- antigen se do buňky dostává endocytózou
- je zpracován v endocytárním kompartmentu buňky
- zde je degradován na fragmenty
- ve stejném kompartmentu je navázán na HLA molekulu II. třídy
- jako komplex je vystaven na povrchu buňky
- komplex HLA II. třídy a antigenu je rozpoznán CD4+ lymfocyty

# HLA II.třídy

Komplex HLA molekuly II. třídy a antigenu se tvoří v endosomálním kompartmentu buňky v několika krocích

- HLA molekula II. třídy je tvořena v endoplasmatickém retikulu z 2 řetězců
- v ER je stabilizována invariátním řetězcem
- tento komplex putuje do Golgi aparátu a do endosomů
- zde je invariátní řetězec aktivně odstraněn působením HLA DM
- antigen je vložen do vazebného místa HLA molekuly II. třídy
- komplex HLA a antigenu putuje na povrch buňky
- komplex HLA-antigen je připraven pro rozpoznání CD4+ T- lymfocytům

# Endogenní Ag

- normální produkt buněčné proteosyntézy
- cizorodý produkt syntetizovaný podle virové genetické informace
- produkt nádorově změněné buňky

# Endogenní cesta prezentace antigenu

- HLA antigeny I. třídy jsou exprimovány na všech jaderných buňkách
- komplex HLA I. třídy a antigenu se skládá z
  - $\alpha$  řetězce
  - $\beta$ 2mikroglobulinuendogenního antigenu
- na povrchu buňky se setkává s CD8+T-lymfocytem



# Endogenní antigeny

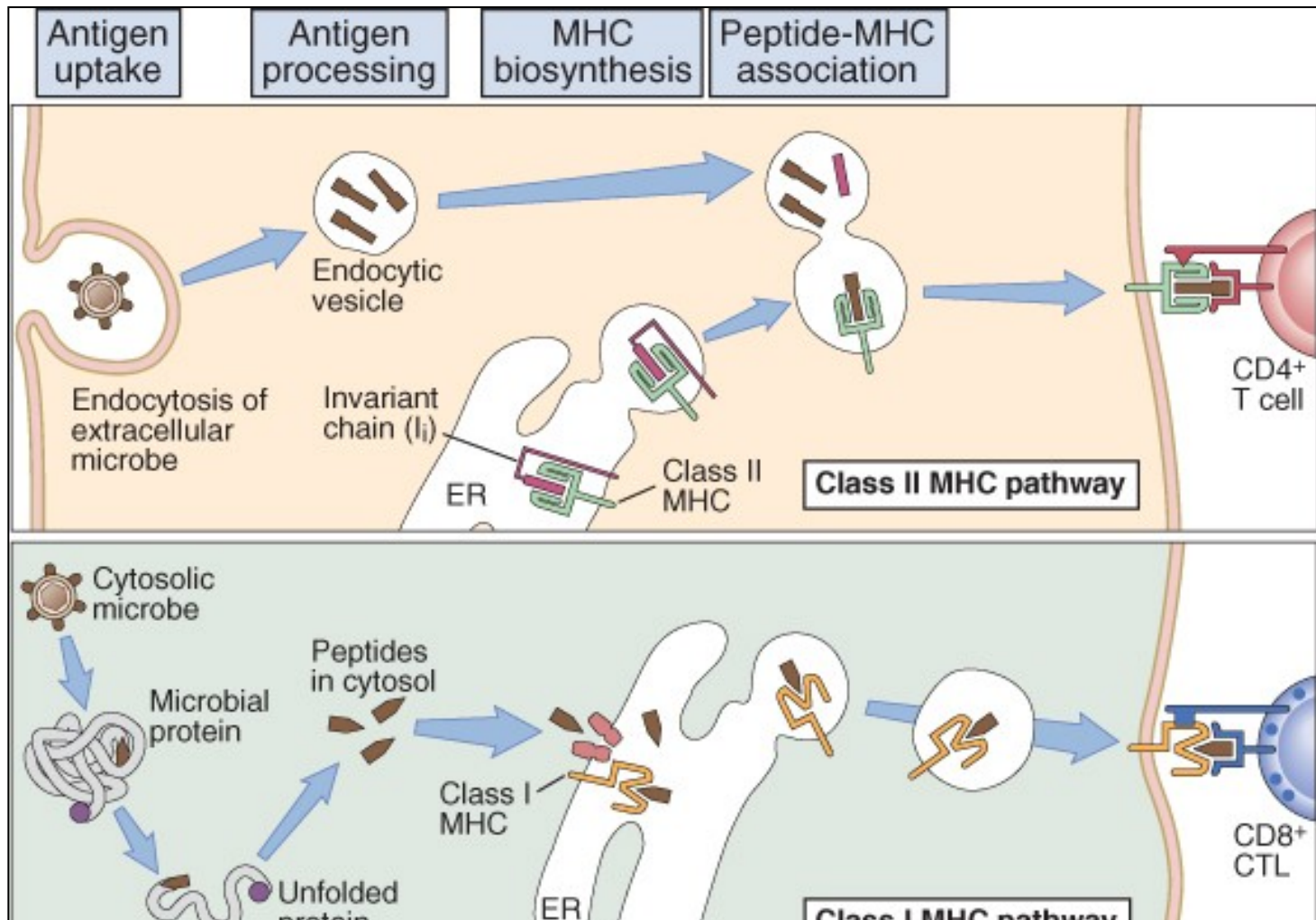
- Endogenní antigeny jsou proteiny vznikající uvnitř buněk.
- Antigeny jsou hydrolyzovány a degradovány na peptidy v cytoplasmě za pomoci proteazomu
- vybrané peptidy jsou aktivně transportovány do endoplasmatického retikula činností struktury zvané TAP (transport associated protein)
- v endoplasmatickém retikulu se formuje komplex HLA a řetězce,  $\beta$ 2 mikroglobulinu a antigenu
- tento komplex HLA I.třídy a antigenu putuje buňkou přes Golgiho aparát na povrch
- zde je připraven na kontakt s CD8+ T-lymfocytem
- buňka exprimující Ag, který je rozeznán CD8+ T-lymfocytem je zničena

# TAP



- Transport associated protein - TAP je struktura zodpovědná za přenos antigenních peptidů z cytoplasmy do endoplasmatického retikula.
  - proteiny jsou v cytoplasmě degradovány proteazomem na peptidy
  - peptidy jsou zachyceny TAP a transportovány do ER
  - v ER jsou tyto peptidy spojeny s HLA I. třídy a transportovány přes Golgiho aparát na povrch buňky

• .

# Vazba antigenu na HLA-I a HLA-II antigeny



**TABLE 6–5 Comparative Features of Class I and Class II MHC Pathways of Antigen Processing and Presentation**

Feature	Class I MHC Pathway	Class II MHC Pathway
Composition of stable peptide-MHC complex	Polymorphic $\alpha$ chain, $\beta_2$ -microglobulin, peptide Peptide  $\alpha$ $\beta_2$ -microglobulin	Polymorphic $\alpha$ and $\beta$ chains, peptide Peptide  $\alpha$ $\beta$
Types of APCs	All nucleated cells	Dendritic cells, mononuclear phagocytes, B lymphocytes; endothelial cells, thymic epithelium
Responsive T cells	CD8 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> T cells
Source of protein antigens	Cytosolic proteins (mostly synthesized in the cell; may enter cytosol from phagosomes)	Endosomal and lysosomal proteins (mostly internalized from extracellular environment)
Enzymes responsible for peptide loading of MHC	Cytosolic proteasome	Endosomal and lysosomal proteases (e.g., cathepsins)
Site of peptide loading of MHC	Endoplasmic reticulum	Specialized vesicular compartment
Molecules involved in transport of peptides and loading of MHC molecules	Chaperones, TAP in ER	Chaperones in ER; invariant chain in ER, Golgi and MIIC/CIIV; DM
APC, antigen-presenting cell; CIIV, class II vesicle; ER, endoplasmic reticulum; MHC, major histocompatibility complex; MIIC, MHC class II compartment; TAP, transporter associated with antigen processing.		

# FAKTORY SPRÁVNÉ PREZENTACE Ag A SPUŠTNÍ IMUNITNÍ REAKCE

- 1) geneticky určený typ MHC gp může vázat určitý okruh peptidů (kotvící AK zbytky vazebné štěrbiny ovlivují, která sekvence vázaných peptidů bude vhodná pro vazbu, zachována určitá variabilita)
- 2) potenciál vázaných peptid se zvětšuje díky řadě lokusů (HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, -DP)
- 3) MHC polymorfismus zajišťuje velké množství alel v populaci (p. HLA-B1 studie zjistila 100 alel daného lokusu v populaci) většina jedinců v populaci: heterozygoti
- polymorfismus: efektivní obrana proti mikrobiálním patogenům x problémy při transplantacích

# Vztah antigenů HLA k chorobám

- Choroby s imunologickou patogenezí (např. autoimunitní, jako revmatoidní artritida, juvenilní diabetes, celiakie..)
- Choroby s etiopatogenezí nejasnou (psoriasis vulgaris, m. Bechterev)
- Choroby, u nichž se imunopatogenetický mechanismus neuplatňuje (narkolepsie, idiopatická hemochromatóza, adrenogenitální syndrom)

*Možné příčiny: HLA antigen je znakem přítomnosti patognostického genu, HLA antigeny jsou receptory pro mikroby, fenomen molekulárního mimikry a zkřížená reaktivita*

# Vztah antigenů HLA k chorobám

(pacienti v %, kontroly v %, relativní riziko)

*M. Buc, 1997*

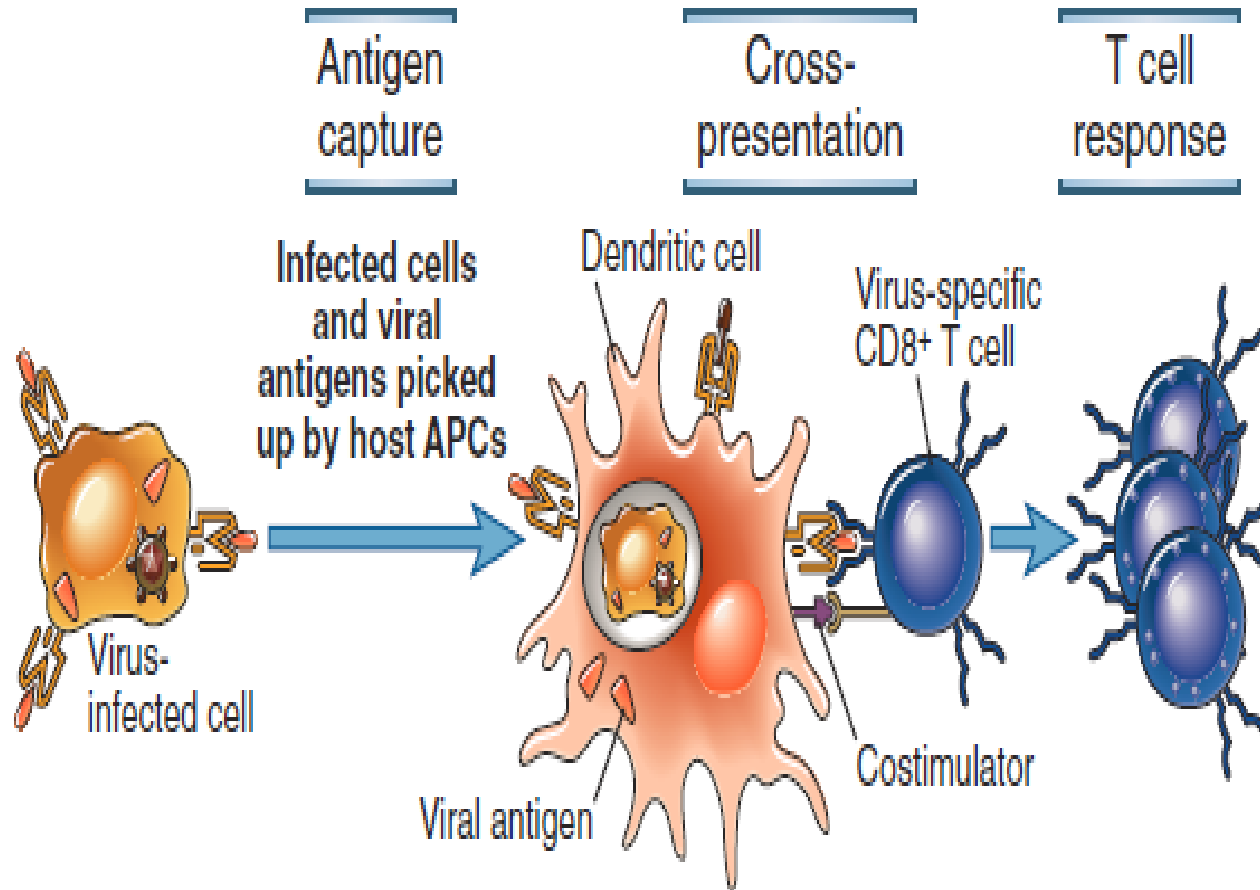
- Narkolepsie: HLA-DQ6 (100 – 25 - 297,0)
- M. Bechterev: HLA-B27 (96 – 9 – 87,4)
- Celiakie: HLA-DR7/DR3 (34 – 1 - 60,0)  
HLA-DQ2 (100 – 72 – 38,5)
- Juvenilní diabetes mellitus: HLA-DR3/4 (32 – 1 – 47,0)
- Revmatoidní arthritida: HLA-DR4 (50 – 19 – 4)

# Antigen prezentující buňky

- Dendritické buňky
- Monocyty, makrofágy
- B-lymfocyty



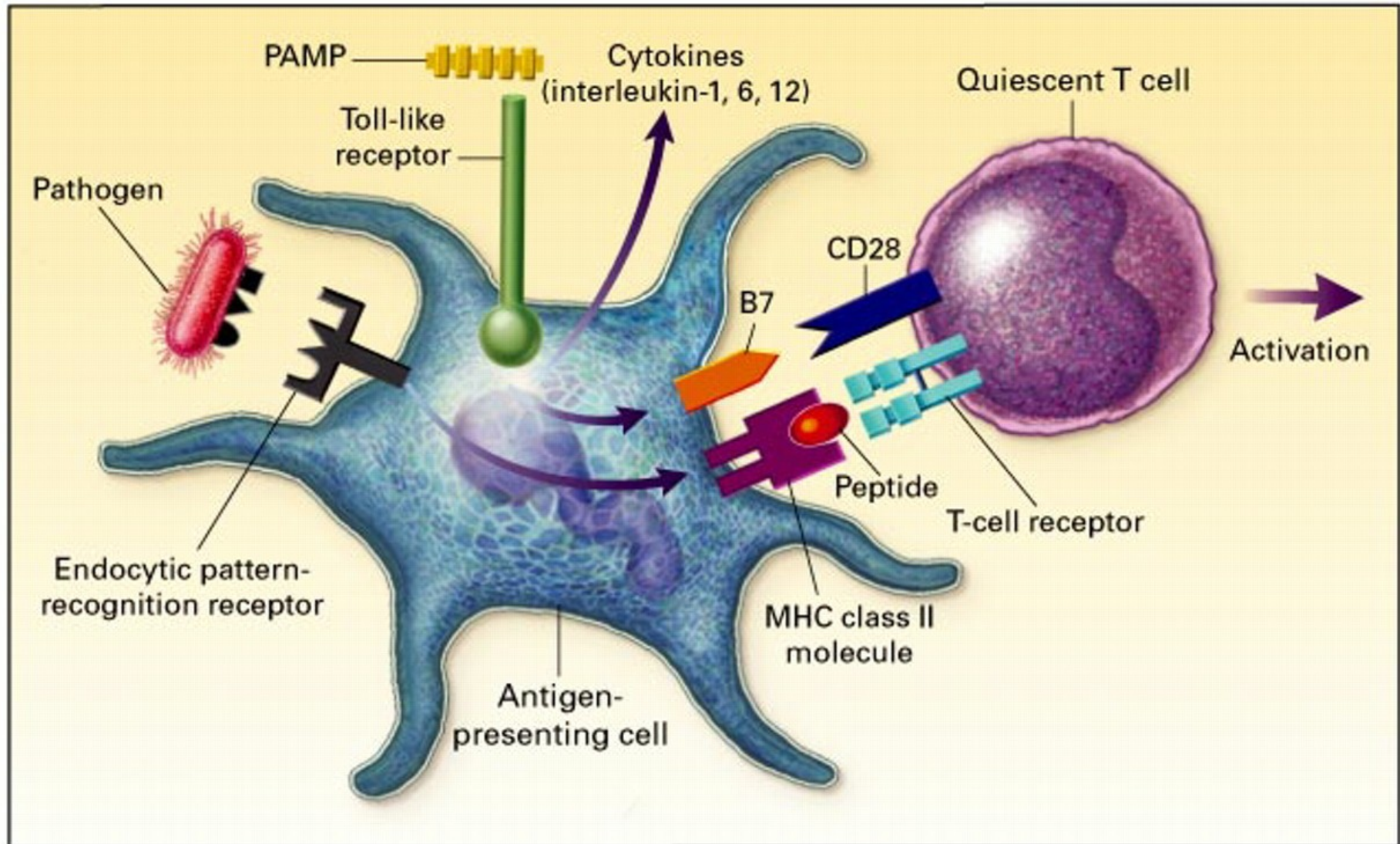
# APC



**TABLE 6–2 Properties and Functions of Antigen-Presenting Cells**

Cell Type	Expression of		Principal Function
	Class II MHC	Costimulators	
Dendritic cells	Constitutive; increases with maturation; increased by IFN- $\gamma$	Constitutive; increases with maturation; inducible by IFN- $\gamma$ , CD40-CD40L interactions	Initiation of T cell responses to protein antigens (priming)
Macrophages	Low or negative; inducible by IFN- $\gamma$	Inducible by LPS, IFN- $\gamma$ , CD40-CD40L interactions	Effector phase of cell-mediated immune responses (T cell–enhanced killing of phagocytosed microbes)
B lymphocytes	Constitutive; increased by IL-4	Induced by T cells (CD40-CD40L interactions), antigen receptor cross-linking	Antigen presentation to CD4 <sup>+</sup> helper T cells in humoral immune responses (cognate T cell–B cell interactions)
Vascular endothelial cells	Inducible by IFN- $\gamma$ ; constitutive in humans	Constitutive (inducible in mice)	May promote activation of antigen-specific T cells at site of antigen exposure
Various epithelial and mesenchymal cells	Inducible by IFN- $\gamma$	Probably none	No known physiologic function
IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL-4, interleukin-4; LPS, lipopolysaccharide.			

# Dendritická buňka jako antigen prezentující buňka



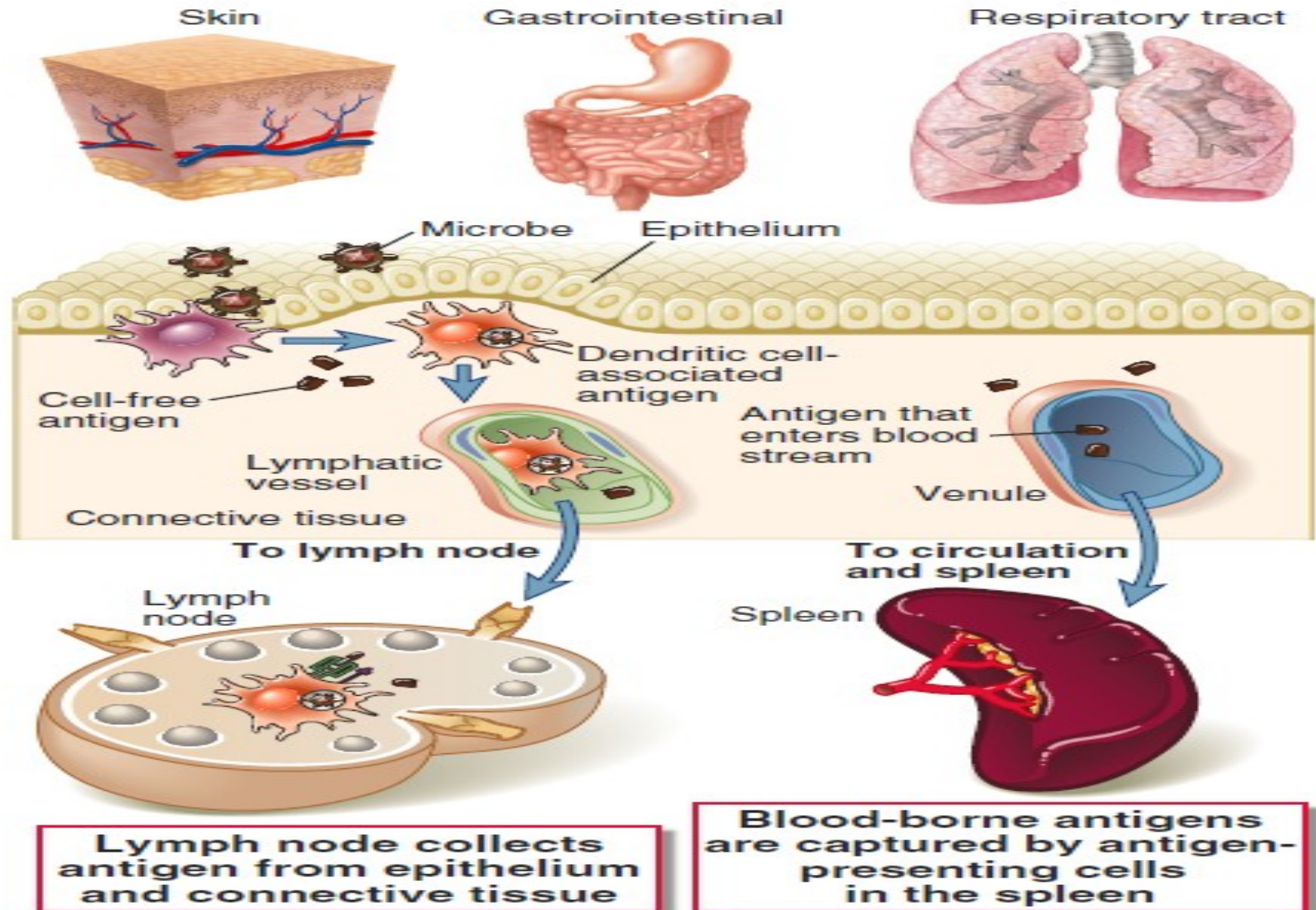
# Dendritické buňky

- Jsou mostem mezi přirozenou a adaptivní imunitou
- Presentace antigenů T lymfocytům – adaptivní imunitní reakce
- Zdroj kostimulačních signálů
- Podpora vrozené imunity (interakce s NK, NKT, T-lymfocyty  $\gamma, \delta$ )

# Populace lidských dendritických buněk

- Myeloidní (dermis, dýchací cesty, střevo, thymus, slezina, játra, lymfoidní tkáně)
- Plasmacytoidní (lymfoidní orgány, játra, plíce, kůže)
- Langerhansovy (epidermis, slizniční epitel)

# Cesty antigenů



# Cesty antigenů

