

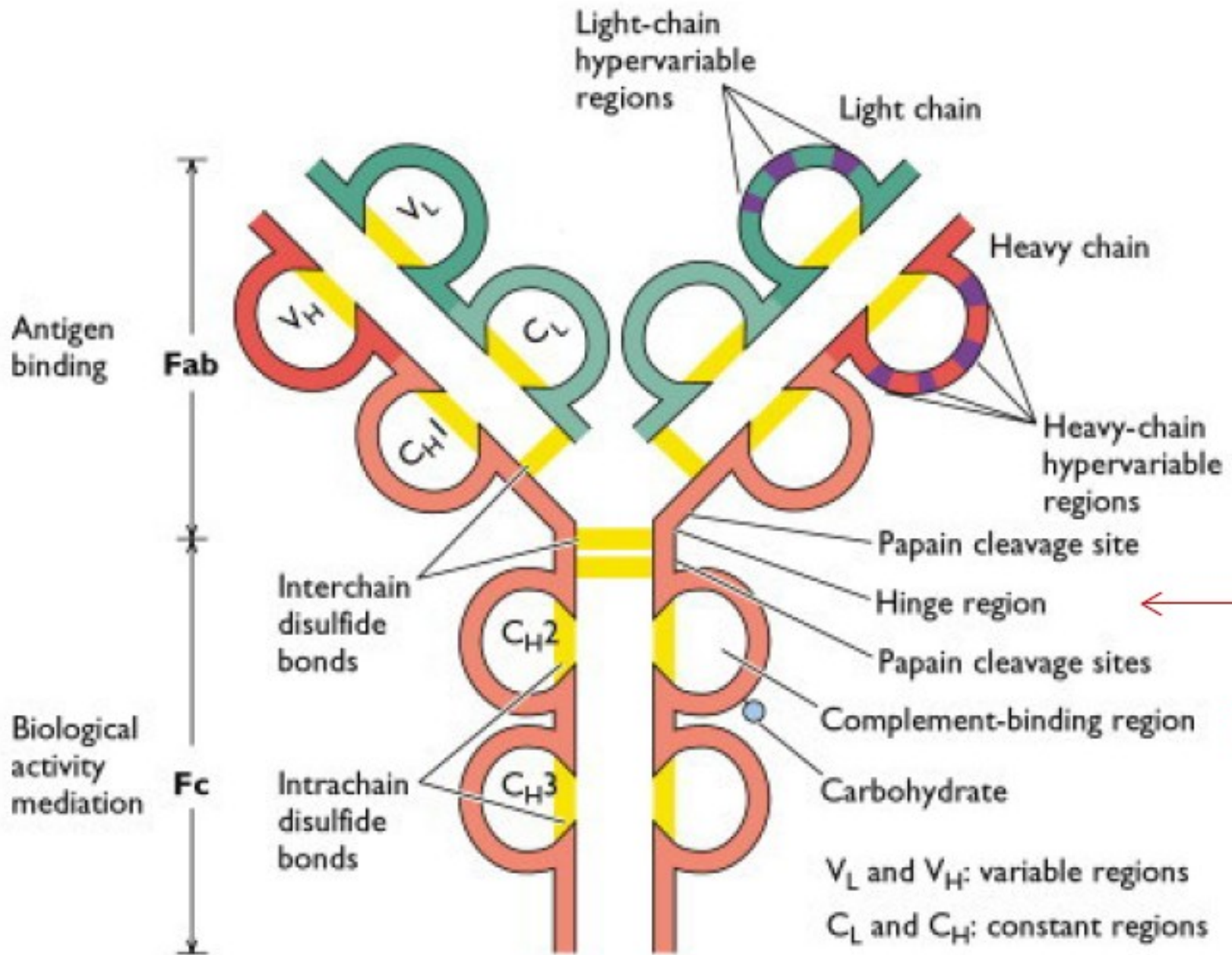
Imunologie leukocytů a
trombocytů
Transplantologie

Imunologie leukocytů a trombocytů

- Všechny buňky lidského těla nesou na svých membránách antigenní znaky, které jsou uspořádány do systémů
- Nejdříve byly zjištěny a prozkoumány u erytrocytů, později u leukocytů a trombocytů
- 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 lze rozdělit dle způsobu vzniku:

1. aloimunní protilátky – transfuze erytrocytů, plazmy, trombocytů
 - transplantace
 - těhotenství (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 Ig - dva těžké řetězce (H) a dva lehké řetězce (L)
těžký řetězec - konstantní oblast (C) a variabilní (V) oblast – vazba Ag
- 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 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 - imunoglobuliny třídy IgG, méně často IgM
- v průběhu těhotenství (cca 10 – 20% žen)
- po transfuzích
- po transplantaci (kostní dřen, orgány)
- přirozeně se vyskytující anti-HLA protilátky

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 antileukocytových protilátek v plazmě pacienta při podání TP kontaminovaných leukocyty
- Snížení výskytu FNHTR – plošná leukodeplece TP

Refrakternost k podání trombocytových TP

- Opakované, neúspěšné dosažení uspokojivé odezvy na transfuzi trombocytových TP od náhodných dárců – CCI (Corrected Count Increment)
- Neimunitní příčiny – infekce, sepse, horečka, antibiotika, antimykotika...
- Imunitní příčiny – trombocytové aloprotilátky - HLA, HPA, ABO ,
trombocytové autoprotilátky , lékově-dependentní Ab
- anti-HLA protilátek v séru pacienta reagujícími s HLA antigeny I. třídy na membránách trombocytů dárce
- výběr HLA kompatibilního dárce transfuzního přípravku z registru HLA otypovaných dárců
- zkouška kompatibility v lymfocytotoxickém testu mezi sérem příjemce a lymfocyty dárce (cross-match)

Potransfuzní reakce TRALI - imunní TRALI

- a-HLA nebo antigranulocytové protilátky v plazmě DK – pasivní převod
- Nebo protilátky v plazmě příjemce transfuze namířené proti antigenům na leukocytech přítomných v TP
- 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.

Chronická rejekce – tvorba a-HLA a non-HLA protilátek (roky po Tx)

Úloha non-HLA faktorů při rejekci - např. MICA (MICB) antigeny = MHC I Chain-related gene A (B), Minor Histokompatibility Complex, KIR, Cytokiny

Detekce anti-HLA protilátek

Lymfocytotoxický test (LCT)

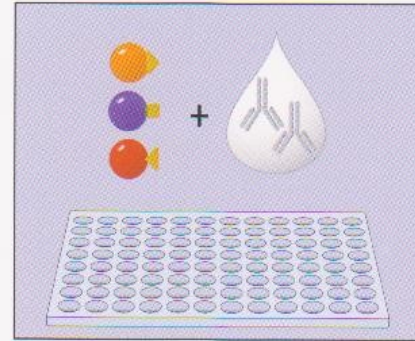
- zachycuje lymfocytotoxiny, protilátky, vážící komplement.
- Reakce probíhá mezi protilátkou v séru pacienta a antigenem buněčné membrány typových lymfocytů.
- komplex antigen-protilátka aktivuje dodaný králičí komplement.
- aktivací vzniklý enzym fosfolipáza poruší buněčnou membránu lymfocytů, buňky 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)

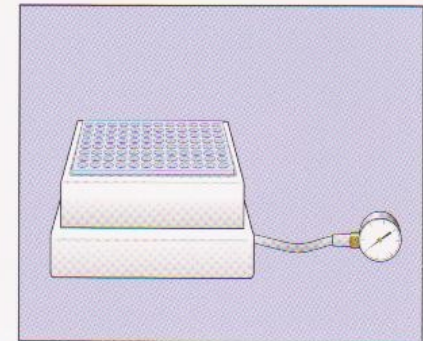
- Luminex® je metoda využívající navázané HLA glykokoproteiny na barevně značené mikročástice a vazba protilátek ze séra je prokázána průtokovou cytometrií s dvojitým laserem.
- Luminex® má větší specifitu než LCT a není ovlivněn přítomností non-HLA protilátek, autoreaktivních protilátek nebo lymfocytotoxických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

Detekce anti-HLA protilátek – Luminex

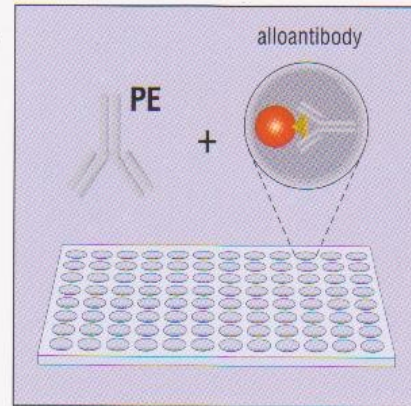
- Barevně značené mikročástice s navázanými HLA antigeny
- Inkubace mikročástic se sérem pacienta
- Přidání fluorescenčně značené sekundární protilátky
- Detekce pomocí laserových paprsků



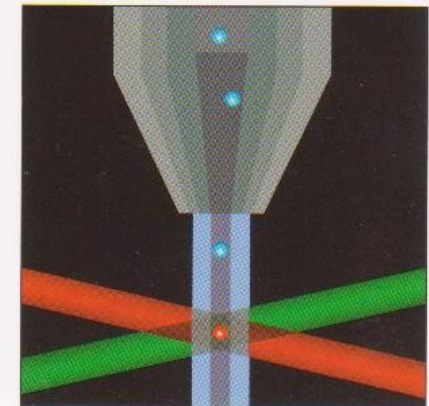
1. Mix beads coupled to purified HLA antigens with patient sera in a membrane filter plate. Incubate for 30 minutes.



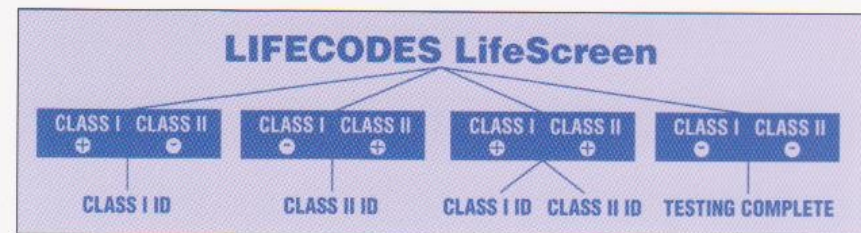
2. Wash 3x using a vacuum manifold

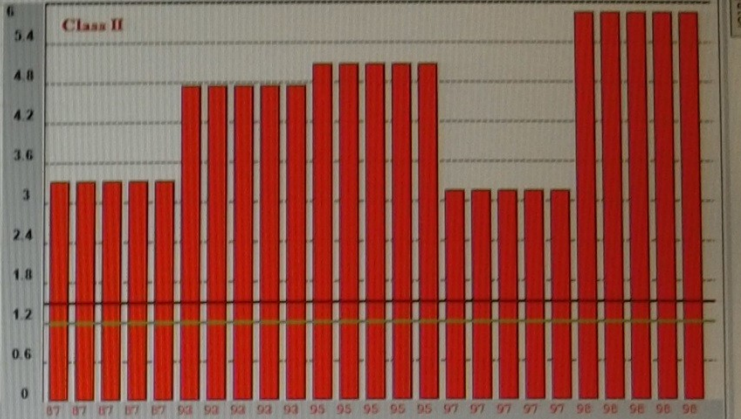
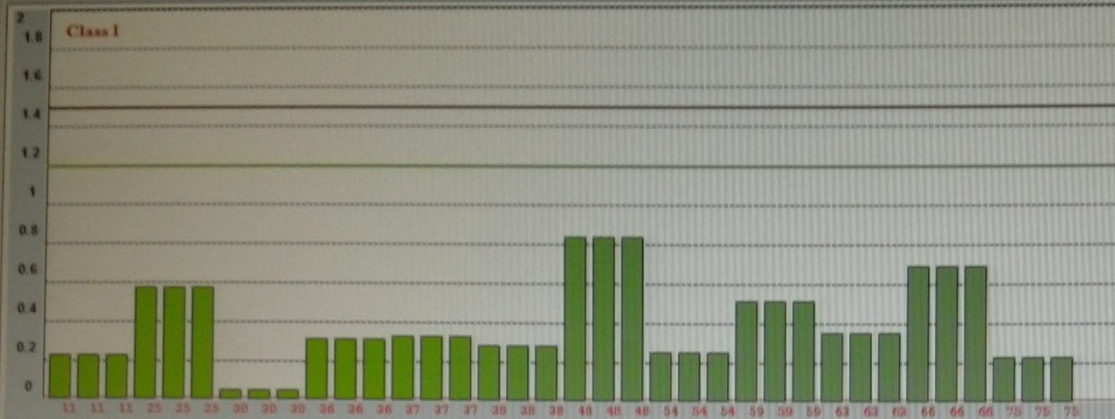


3. Add antihuman IgG with PE to membrane filter plate. Incubate 30 minutes.



4. Analyze in the Fluoroanalyzer





Sample ID	DR	DR	DR	DR	DQ	DQ	DP	DP
11	1	1	1	1	6	6	2	2
12	1	1	1	1	6	6	8	8
13	1	1	1	1	6	6	8	8
14	1	1	1	1	6	6	1	1
15	1	1	1	1	6	6	1	1
16	1	1	1	1	6	6	1	1
17	1	1	1	1	6	6	1	1
18	1	1	1	1	6	6	1	1
19	1	1	1	1	6	6	1	1
20	1	1	1	1	6	6	1	1
21	1	1	1	1	6	6	1	1
22	1	1	1	1	6	6	1	1
23	1	1	1	1	6	6	1	1
24	1	1	1	1	6	6	1	1
25	1	1	1	1	6	6	1	1
26	1	1	1	1	6	6	1	1
27	1	1	1	1	6	6	1	1
28	1	1	1	1	6	6	1	1
29	1	1	1	1	6	6	1	1
30	1	1	1	1	6	6	1	1
31	1	1	1	1	6	6	1	1
32	1	1	1	1	6	6	1	1
33	1	1	1	1	6	6	1	1
34	1	1	1	1	6	6	1	1
35	1	1	1	1	6	6	1	1
36	1	1	1	1	6	6	1	1
37	1	1	1	1	6	6	1	1
38	1	1	1	1	6	6	1	1
39	1	1	1	1	6	6	1	1
40	1	1	1	1	6	6	1	1
41	1	1	1	1	6	6	1	1
42	1	1	1	1	6	6	1	1
43	1	1	1	1	6	6	1	1
44	1	1	1	1	6	6	1	1
45	1	1	1	1	6	6	1	1
46	1	1	1	1	6	6	1	1
47	1	1	1	1	6	6	1	1
48	1	1	1	1	6	6	1	1
49	1	1	1	1	6	6	1	1
50	1	1	1	1	6	6	1	1
51	1	1	1	1	6	6	1	1
52	1	1	1	1	6	6	1	1
53	1	1	1	1	6	6	1	1
54	1	1	1	1	6	6	1	1
55	1	1	1	1	6	6	1	1
56	1	1	1	1	6	6	1	1
57	1	1	1	1	6	6	1	1
58	1	1	1	1	6	6	1	1
59	1	1	1	1	6	6	1	1
60	1	1	1	1	6	6	1	1
61	1	1	1	1	6	6	1	1
62	1	1	1	1	6	6	1	1
63	1	1	1	1	6	6	1	1
64	1	1	1	1	6	6	1	1
65	1	1	1	1	6	6	1	1
66	1	1	1	1	6	6	1	1
67	1	1	1	1	6	6	1	1
68	1	1	1	1	6	6	1	1
69	1	1	1	1	6	6	1	1
70	1	1	1	1	6	6	1	1
71	1	1	1	1	6	6	1	1
72	1	1	1	1	6	6	1	1
73	1	1	1	1	6	6	1	1
74	1	1	1	1	6	6	1	1
75	1	1	1	1	6	6	1	1

Class I & II MIC

Statistics

PC: (002) 18,128.64
 NC: (001) 88.12
 PC/NC: 205.73
 NC Threshold (CL1): 50(50)
 NC Threshold (CL2): 50(50)

Cut-off	Default	Current
CL I +ve	1.5	1.5
CL I -ve	1.2	1.2
CL II +ve	1.5	1.5
CL II -ve	1.2	1.2

Comments/ (System):

Class I Computer Assignment **Negative**

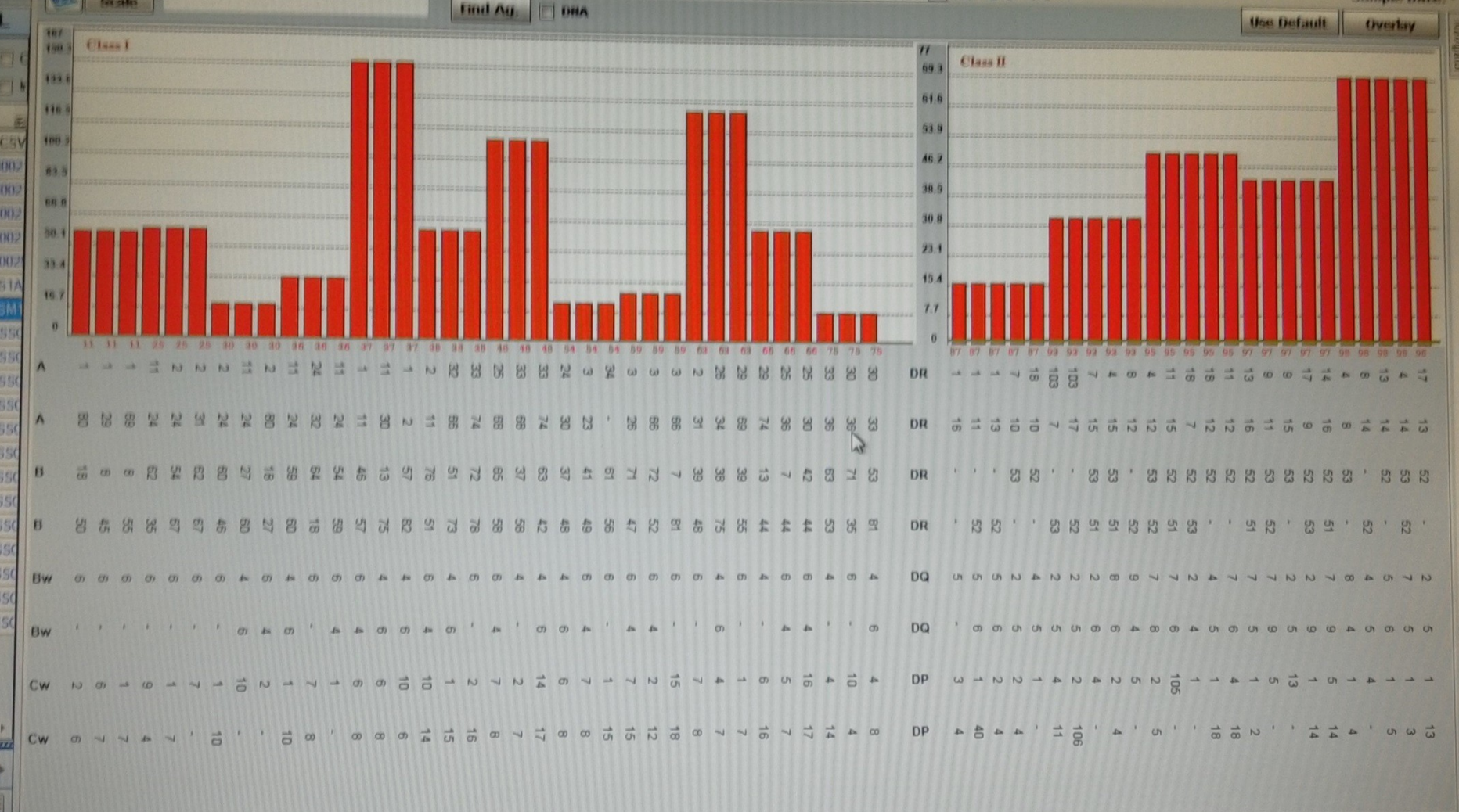
Final Assignment Positive Negative Undetermined

Class II Computer Assignment **Positive**

Final Assignment Positive Negative Undetermined

MIC Computer Assignment **Negative**

More Test Raw Data Save>> Confirm>>



Class I & II MIC

Statistics	
PC: (002)	11,887.95
NC: (001)	83.68
PC/NC:	142.06
NC Threshold (CL1):	50(50)
NC Threshold (CL2):	50(50)
Cut-off Default Current	
CL I +ve	1.5 1.5
CL I -ve	1.2 1.2
CL II +ve	1.5 1.5
CL II -ve	1.2 1.2

Class I
ComputerAssignment Positive
Final Assignment Positive
 Negative
 Undetermined

Class II
ComputerAssignment Positive
Final Assignment Positive
 Negative
 Undetermined

MIC
ComputerAssignment Positive

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 neutrofilny
- Funkce neznámá

- **HNA-4a** antigen a HNA-4a negativní jedinci objeveni v roce 1986
- 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 protilátky

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

Autoimunitní protilátky

- 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 na neutrofilech plodu a při absenci na neutrofilech mateřských nebo jako transplacentární přenos protilátek od matky s autoimunitní neutropenií
- Mateřské protilátky (IgG) přechází přes placentu a ničí neutrofilu 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 reagujícími s HNA antigeny dárce

TRALI (Transfusion Related Acute Lung Injuri)

- způsobená nejčastěji reakcí protilátek dárce transfuzního přípravku reagujících s granulocyty příjemce nebo 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)
- 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 autoprotilátkami proti granulocytům
- diagnostikována nejčastěji v kojeneckém a batolecím období
- protilátky jsou nejčastěji směřovány proti antigenům HNA-1a, HNA-1b, HNA-2a, HNA-4a

Dospělí:

- sekundární neutropenie jiných poruch (revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses, chronická leukémie)
- lékově indukovaná neutropenie
- neimunitní chronická idiopatická neutropenie

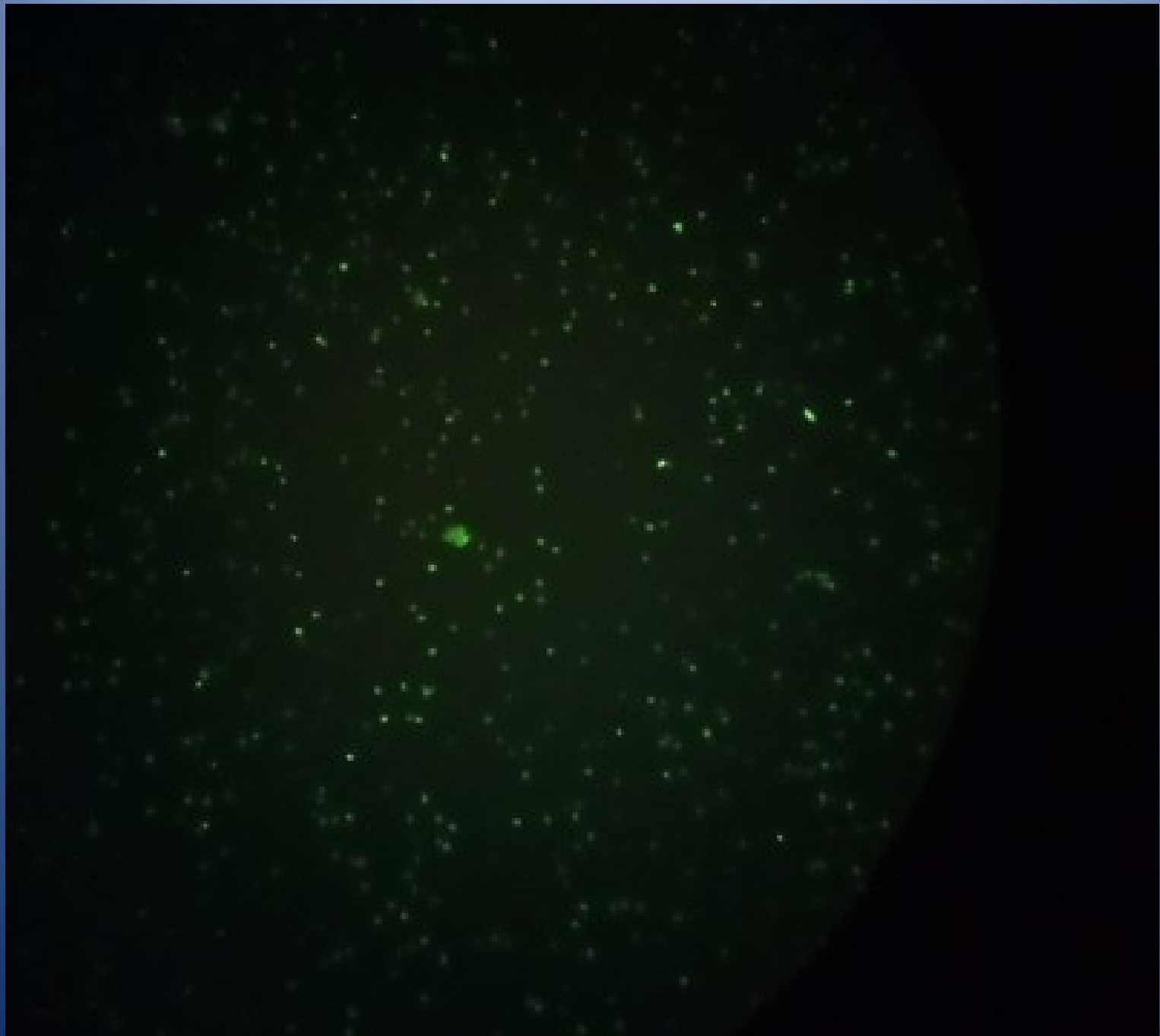
Detekce antigranulocytárních protilátek

Granuloaglutinační test (GA)

- zachycuje granuloaglutininy
- Reakce mezi antigeny membrány typových granulocytů a protilátkami vyšetřovaného séra
- Hodnotí se mikroskopicky shluky granulocytů, při negativní reakci zůstávají granulocyty volné.

Granuloimunofluorescenční test (GIFT)

- detekuje protilátky navázané ze séra pacienta na povrch typových granulocytů.
- k vizualizaci navázané protilátky dochází pomocí sekundární protilátky proti lidskému imunoglobulinu značené fluorescein-isothiocyánátem (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 strukturou podobné HLA antigenům I. třídy, obsahují β 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

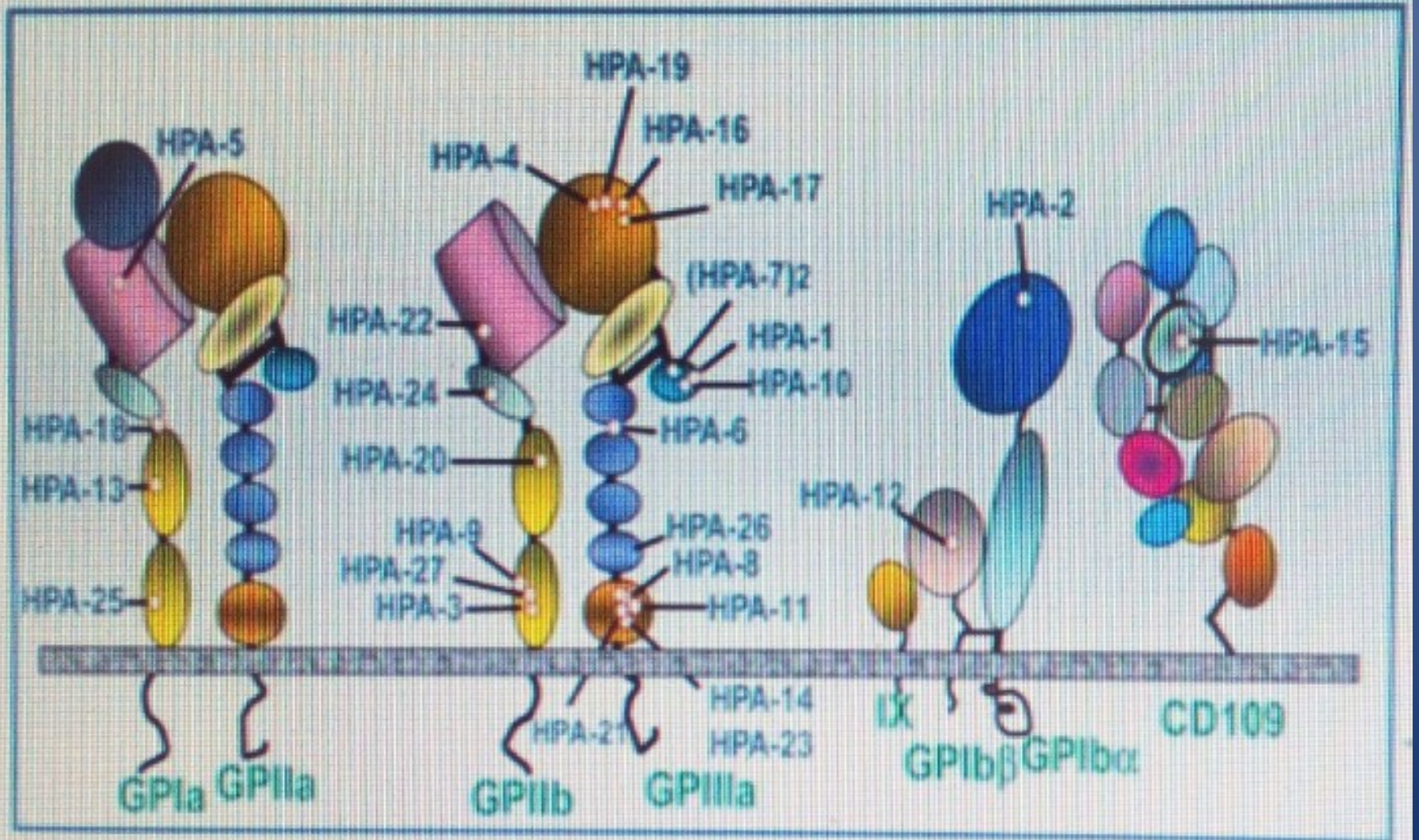
Výskyt monocytárních protilátek:

- 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**
- 12 alel uspořádáno do 6 bialelických systémů - HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 a HPA-15 (zatím známo 35 alel)
 - a= běžná alela; b= méně běžná alela
- Uspořádány na 6 trombocytových glykoproteinech
- HPA databáze – <https://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/index.html>
- Jako první HPA antigen byl určen HPA-1a, s frekvencí výskytu v populaci cca 98%, protilátka proti antigenu HPA-1a nejčastější příčinou **fetomaternální aloimunitní trombocytopenie**

Platelet specific antigens



Collagen
receptor

Fibrinogen
receptor

Von
Willebrand

Uncertain
function

Protilátky proti trombocytům se dělí:

- aloprotilátky (po transfuzi, po transplantaci, v průběhu těhotenství)
- autoprotilátky způsobující destrukci trombocytů (autoimunitní trombocytopenie)
- léky indukovaná tvorba protilátek (antiepileptika, analgetika, některá antibiotika)
- IgG, často také IgM a zřídka IgA.

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 Ab proti HPA 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
- Tvorba a-HPA Ab asociována s alelami HLA-DRB3*01:01 (DRB4*01:01)
- HLA-DRB3*01:01-DRA1*01:01 = DR52 molekula váže peptidy s leucinem v pozici 33 (HPA-1a) a ne peptidy s prolinem ve stejné pozici (HPA-1b)

Potransfuzní purpura (PTP)

- vzácná, ale závažná potransfuzní reakce
- projevuje se prudkým poklesem v počtu trombocytů a život ohrožujícím krvácením
- opožděná reakce - PTP se objevuje za 7 – 14 dní po podání transfuze obsahující trombocyty
- vyskytuje se u již imunizovaných pacientů s Ab proti trombocytům dárce
- rizikovou skupinou jsou ženy s častějšími těhotenstvími v anamnéze, transfuze
- nejčastější příčinou - anti-HPA-1a u příjemce TP, méně často anti-HPA-5b
- Nejasný mechanismus - panreaktivní autoprotilátky - spolu s aloprotilátkami destruují i vlastní pacientovy antigen-negativní trombocyty

Refrakternost k podání trombocytových transfuzních přípravků

- charakterizována malým vzestupem počtu trombocytů po transfuzi
- často zapříčiněna klinickými faktory (např. sepse, splenomegalie, akutní krvácení, účinky léků) nebo méně často přítomností protilátek
- Většinou a-HLA protilátky, 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
- Popsána u protilátky anti-HPA-1a a anti-HPA-5b
- trombocytopenie nastává okamžité (na rozdíl od PTP)
- V tomto případě je nutné vyřazení dárce transfuzního přípravku.

Idiopatická trombocytopenická purpura (ITP)

- u dětí i dospělých
- autoimunitní trombocytopenie, která je charakterizována destrukcí trombocytů autoprotiátkami namířenými proti HPA antigenům
- většina protilátek patří do třídy IgG, byly nalezeny i protilátky třídy IgM a IgA
- U dětí nejčastější krvácivé onemocnění, velmi často několik týdnů předchází virová infekce, akutní forma
- Dospělí – spíše chronické formy
- typická manifestace kožních projevů – petechie, hematomy

Léky vyvolaná imunitní trombocytopenie (drug-induced immune thrombocytopenia, DITP)

- léků způsobujících pokles trombocytů je popsáno mnoho, k nejčastějším patří některá antiepileptika, analgetika a některá antibiotika
- Tvorba autoprotilátek nebo lékově specifických protilátek
- Destrukce trombocytů v retikuloendotelovém systému
- Typicky 5-10 dní po začátku užívání léku nebo po několika hodinách při opětovném užívání léku
- Často u hospitalizovaných pacientů s bohatou medikací a komorbitami
- Rychlý nástup trombocytopenie, časté krvácivé projevy, nutnost vysazení preparátu, který trombocytopenii vyvolal
- www.ouhsc.edu/platelets
- Některé nápoje obsahují quinine a jejich požívání může spustit DITP

Screeningové testy na zachycení antitrombocytárních protilátek

DIFT (destickový imunofluorescenční test)

- zachycuje specifické antitrombocytární protilátky i HLA protilátky
- vazba protilátky z vyšetřovaného séra na typové trombocyty
- vizualizace navázané protilátky – sekundární anti-lidská protilátka značeného fluoresceinem
- detekce protilátek třídy IgG, IgM, IgA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

- enzymoimunostanovení, zachycující specifické protilátky proti trombocytům
- vazbu antigenu s protilátkou detekujeme pomocí sekundární protilátky značené peroxidázou
- po proběhnutí reakce enzym-substrát a zastavení reakce hodnotíme intenzitu zbarvení na fotometru vzhledem ke kontrolám
- testem zachycujeme většinou protilátky třídy IgM, 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

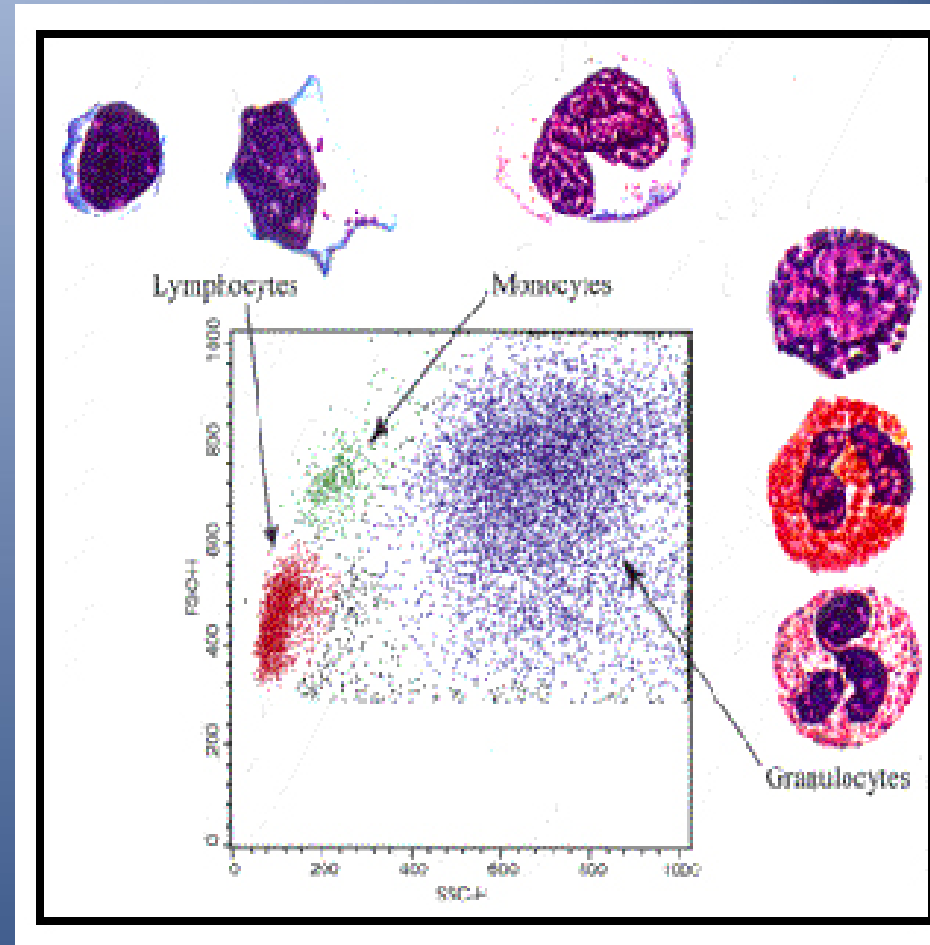


- využívá anti-CD41 protilátky značené fluorochromem (např. phycoerithrinem - PE) k označení populace trombocytů
- navázaná protilátka na trombocytech je detekována sekundární anti-lidskou protilátkou značenou jinou fluorescenční barvou (např. Fluorescein Isothiocyanatem - FITC)
- měření probíhá ve flow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

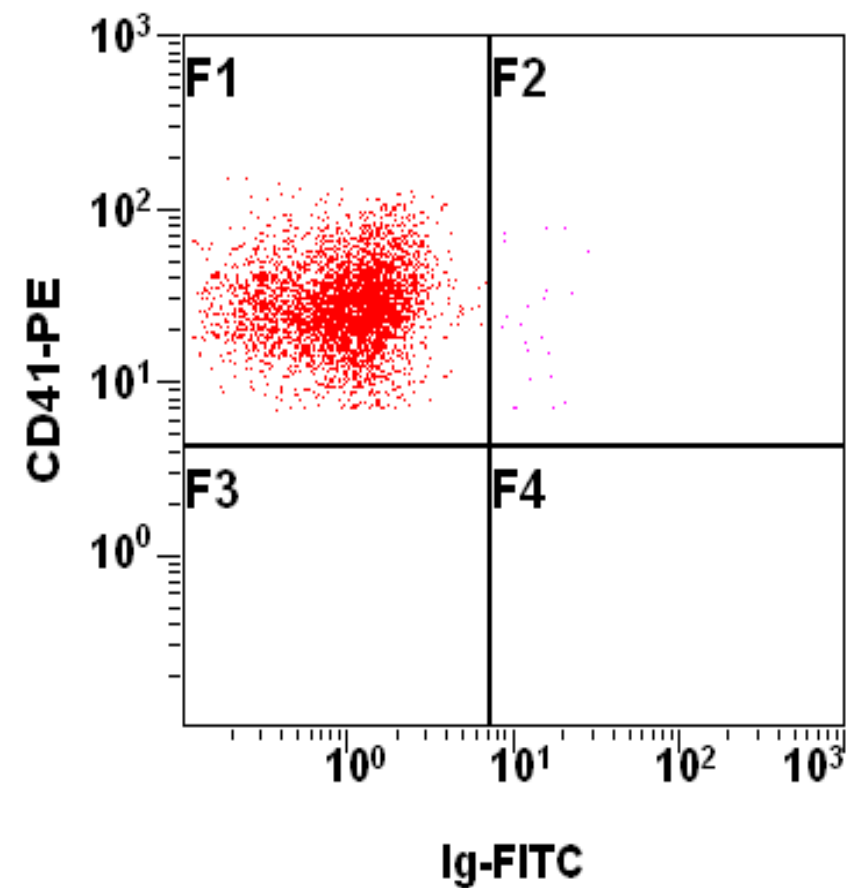
Forward scatter channel (FSC, rozptyl v přímém směru)-velikost částic, odlišení buněčné debris od živých buněk

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

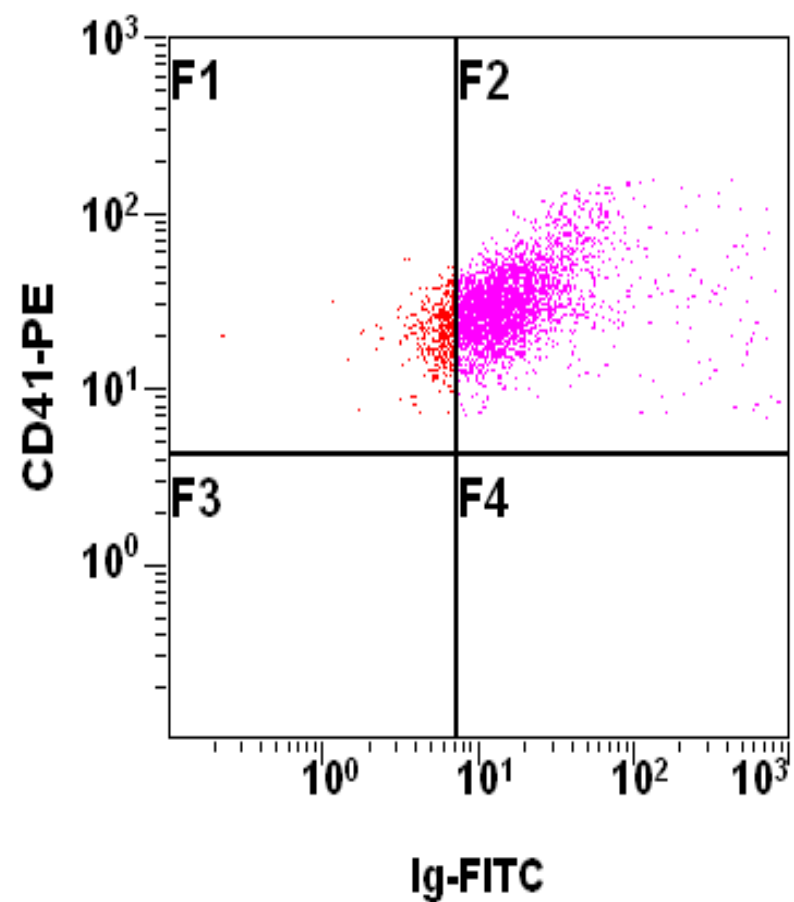
FSC, SSC – jedinečné pro každou částici,

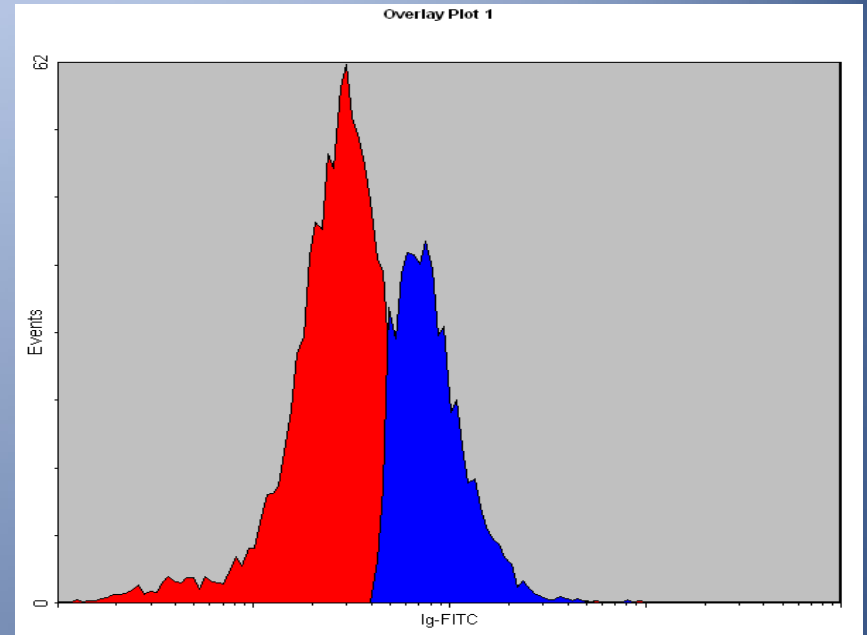
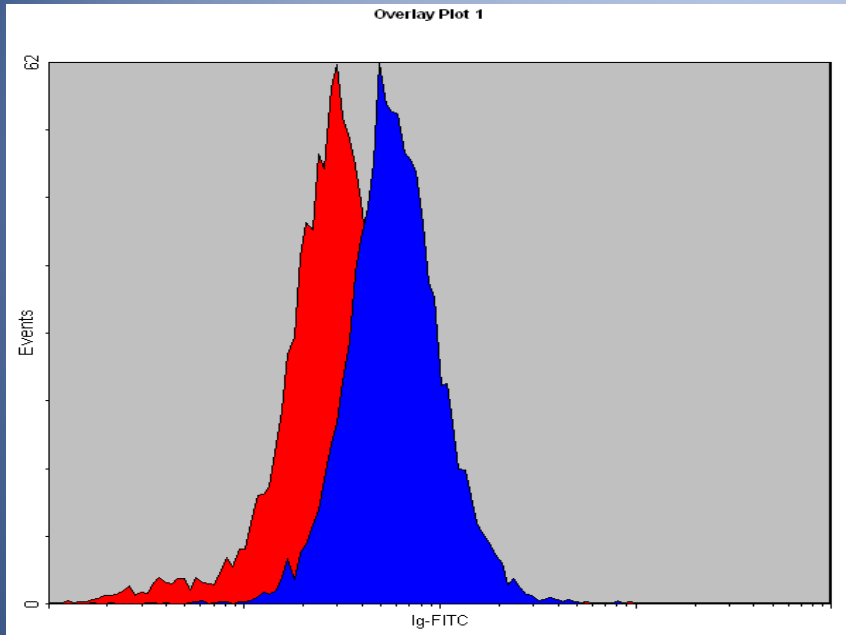


DJ P8 plt-Ig prumK 00048135.001 : FL1 Log/FL2

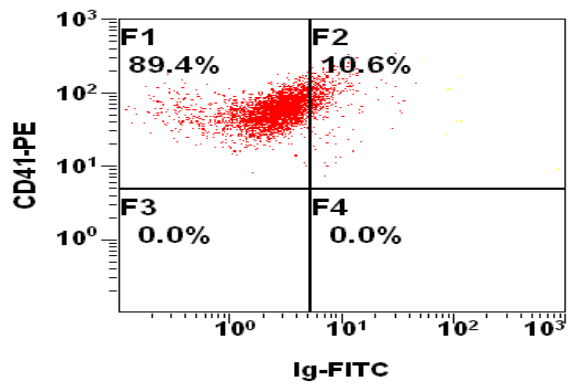


DJ P8 plt-Ig clg 00048136.002 : FL1 Log/FL2 L

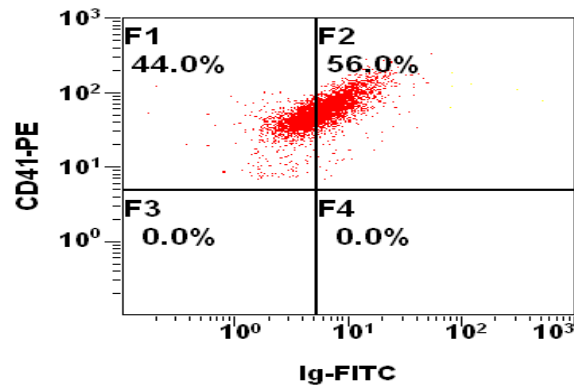




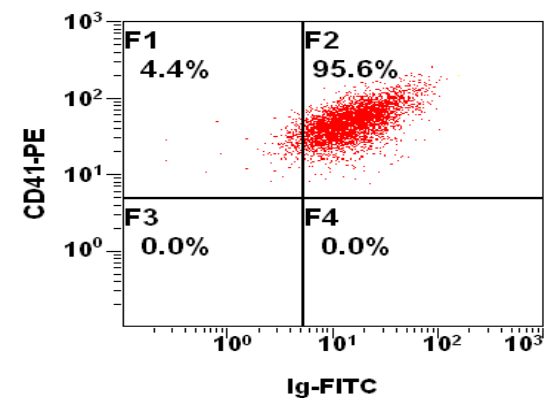
D] K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2
 D] K19 plt-Ig IgG 00048283.003 : FL1 Log/FL2



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



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



TRANSPLANTACE

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 -rejekce štěpů
- zavedení azathioprinu - delší přežívání štěpů cca za 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 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

- Prosinec 1952 – 1. Tx ledvin na světě u 15-ti letého dítěte, které úrazem přišlo o svou jedinou ledvinu, dárkyně matka, za 22 dní 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 od zemřelých (kadaverózních) dárců byly však neúspěšné – rejekce
-
- 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
- Počátek 90. let – 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 dárce
- Zákon č.285/2002 Sb. určuje přesná pravidla na určení mozkové smrti a souvisejících předpisů včetně požadavků na kvalifikaci odborníka potvrzující mozkovou smrt
- V naší republice platí **předpokládaný souhlas s dárce**
- registr NROD = registr osob nesouhlasících s dárce Pracoviště zvažující dárce musí ověřit, zda pacient v tomto registru není. Souhlas rodiny není zákonně nutný (s výjimkou dětí), ale obvykle se bez souhlasu rodiny dárce 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.
- Dárce s nebijícím srdcem (DCD – donor after circulatory death)

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.

Odběr kostní dřeně



Odběr periferních krvetvorných buněk



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.
- spolupráce 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.**
- BMDW dnes již 10 milionů dobrovolníků ze 42 zemí světa včetně ČR.

Banky pupečnickové krve

- R.1988 – 1. Tx s využitím kmenových buněk z placentární pupečnickové krve, dárce novorozená HLA – kompatibilní sestra nemocného dítěte, Tx úspěšná.
- 1. banka pupečnickové krve - New York Cord Blood Bank
- Odběr krve z pupečnicku- žádné riziko ani pro matku ani pro narozené dítě.
- 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.
- Pupečnicková krev obsahuje menší množství kmenových buněk než je možné získat od dospělého dárce - použitelná k Tx jen pro děti.

- 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 18-40 let (35)
- 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.

Děkuji za pozornost