

IMUNOLOGIE V ZUBNÍM LÉKAŘSTVÍ

7 (2018)

Imunologické aspekty transfúze krve. Imunologické aspekty transplantací.

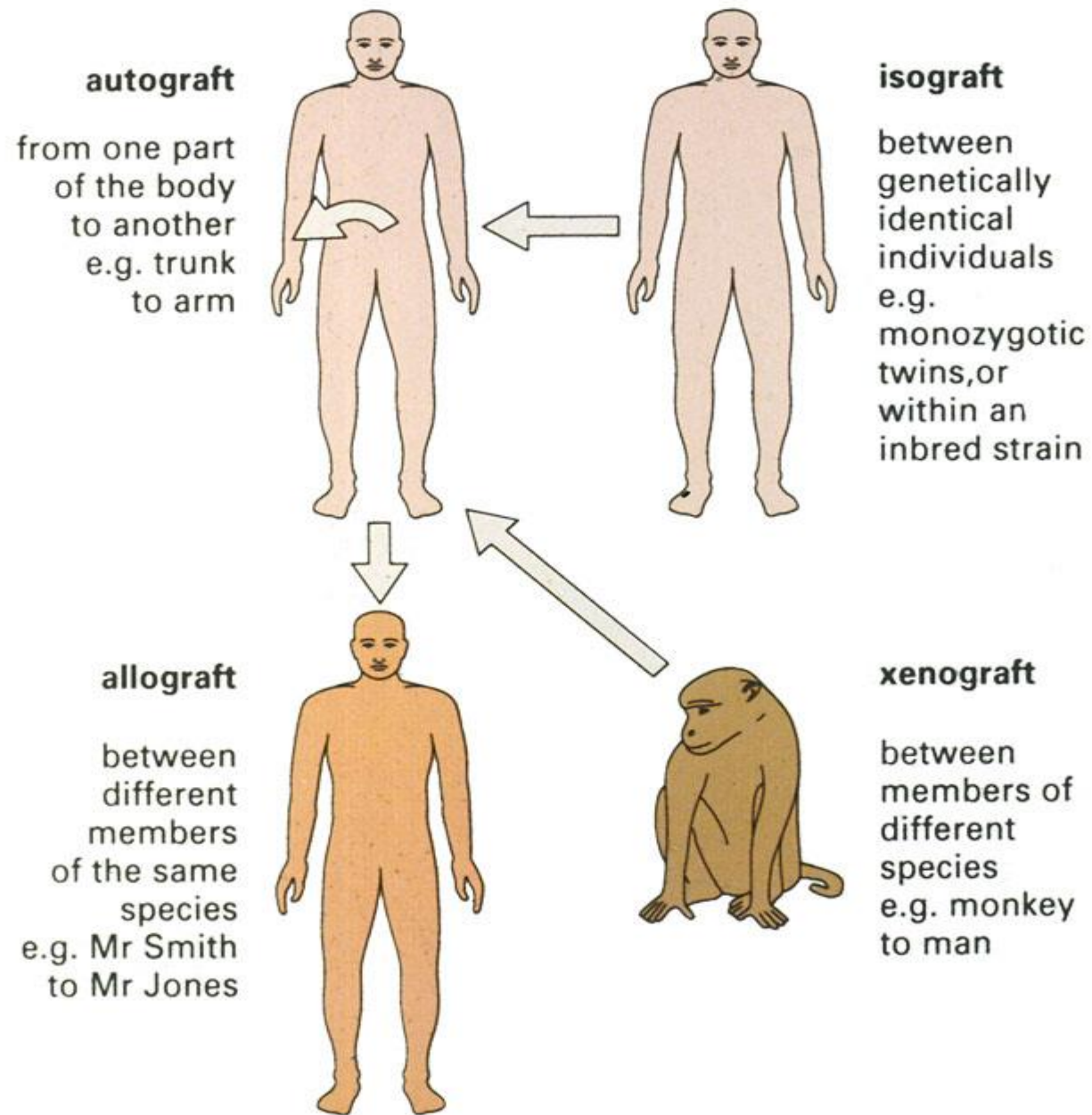
Vyšetřovací laboratorní imunologické metody.

Prof. J. Lokaj

Transplantační imunologie

„Transplantace“ (sv. Kosmas a Damián), 3. století n.l.





Transplantace orgánů, tkání, buněk

Dárce a příjemce:

- Autologní transplantace (autograft)
- Syngenní transplantace (isograft)
- Alogenní transplantace (allograft)
- Xenogenní transplantace (xenograft)

Důsledky histoinkompatibility:

- Rejekce (odvržení, odhojení) štěpu
- Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host reaction – GvHR)

Major histocompatibility complex (MHC)

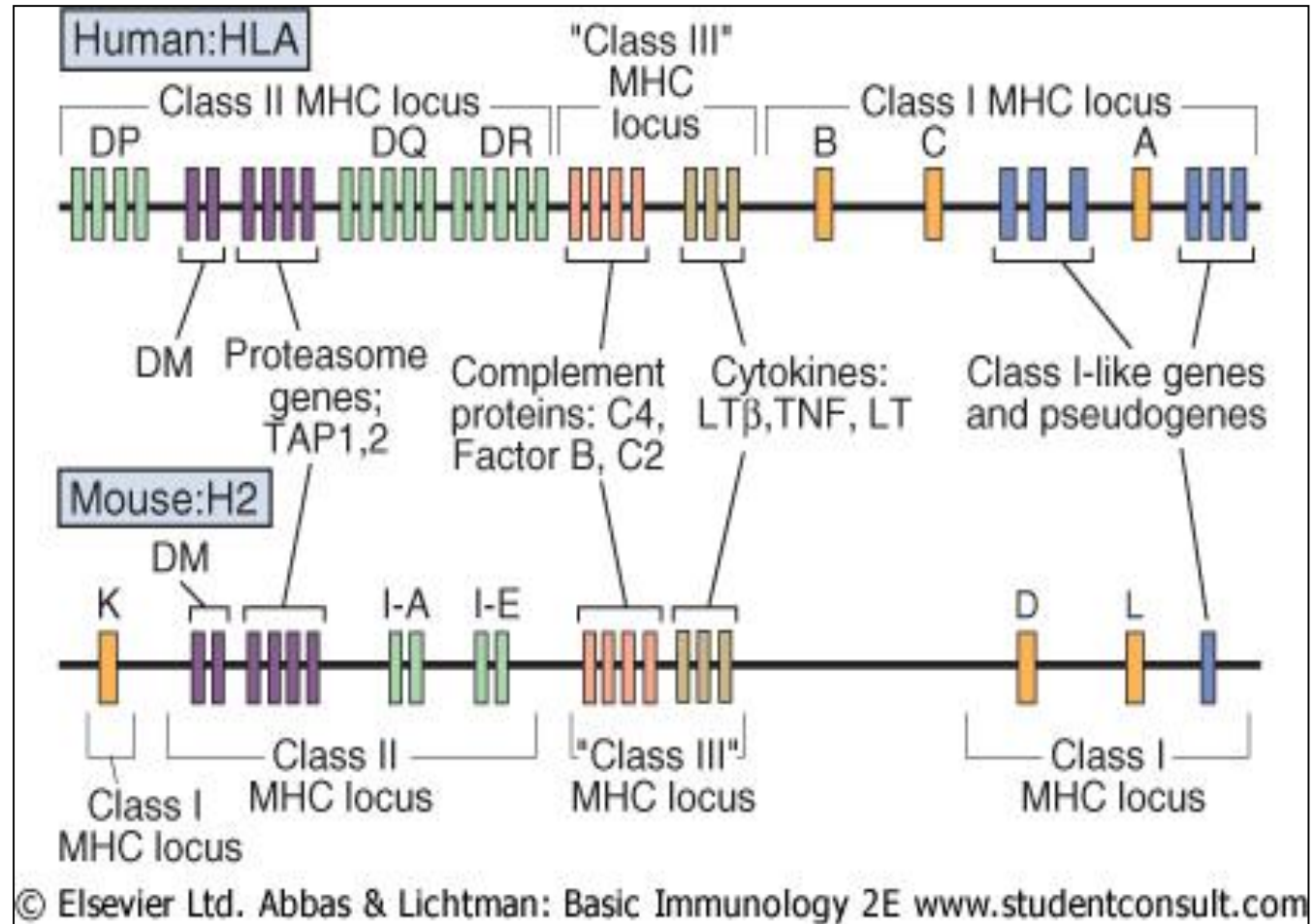
Human leukocyte antigens
(HLA)

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 γ



Feature	Significance	
<p>Co-dominant expression: Both parental alleles of each MHC gene are expressed</p>	<p>Increases number of different MHC molecules that can present peptides to T cells</p>	<p>T cells</p> <p>MHC molecules</p> <p>Parental chromosomes</p>
<p>Polymorphic genes: Many different alleles are present in the population</p>	<p>Ensures that different individuals are able to present and respond to different microbial peptides</p>	
<p>MHC-expressing cell types:</p> <p>Class II: Professional APCs, macrophages, B cells</p> <p>Class I: All nucleated cells</p>	<p>CD4⁺ helper T lymphocytes interact with dendritic cells, macrophages, B lymphocytes</p> <p>CD8⁺ CTLs can kill any virus-infected cell</p>	<p>Dendritic cell Macrophage B cell</p> <p>Leukocytes Epithelial cells Mesenchymal cells</p>

Nomenklatura HLA systému (WHO)

Sérologická (HLA antigeny):

Např.:

HLA-A2

HLA-DR3

HLA-B27

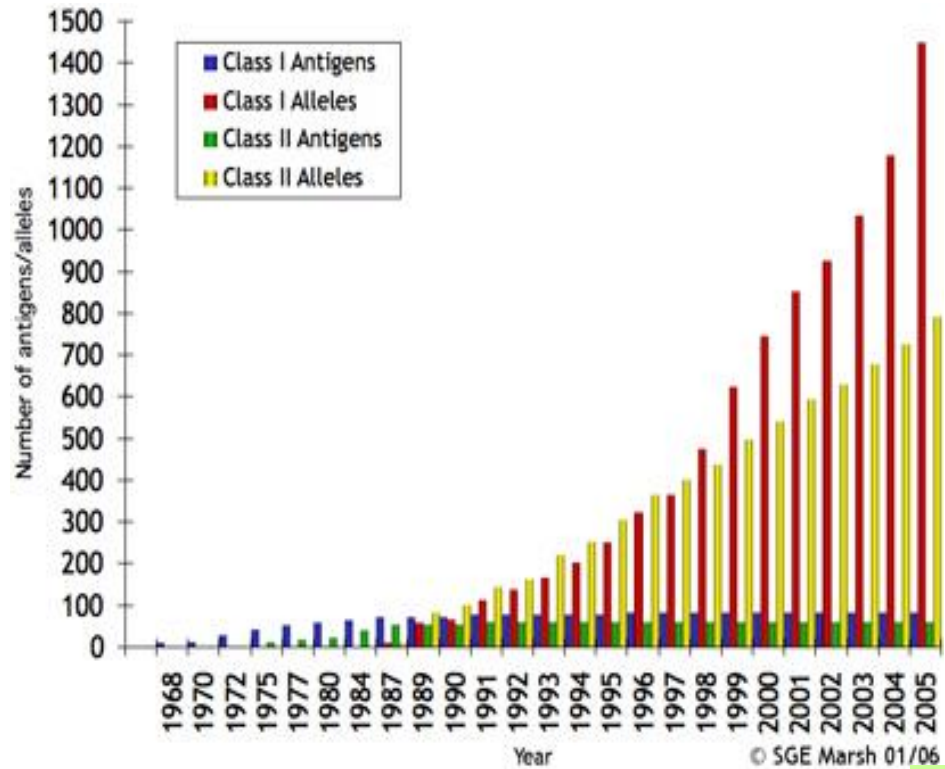
Molekulárně genetická (DNA) nomenklatura (HLA alely)

Např.:

HLA-A*0201

*HLA-A*02 alelická skupina*

*HLA-A*0201 alela*



2010

Numbers of HLA Alleles

HLA Class I Alleles 3,411

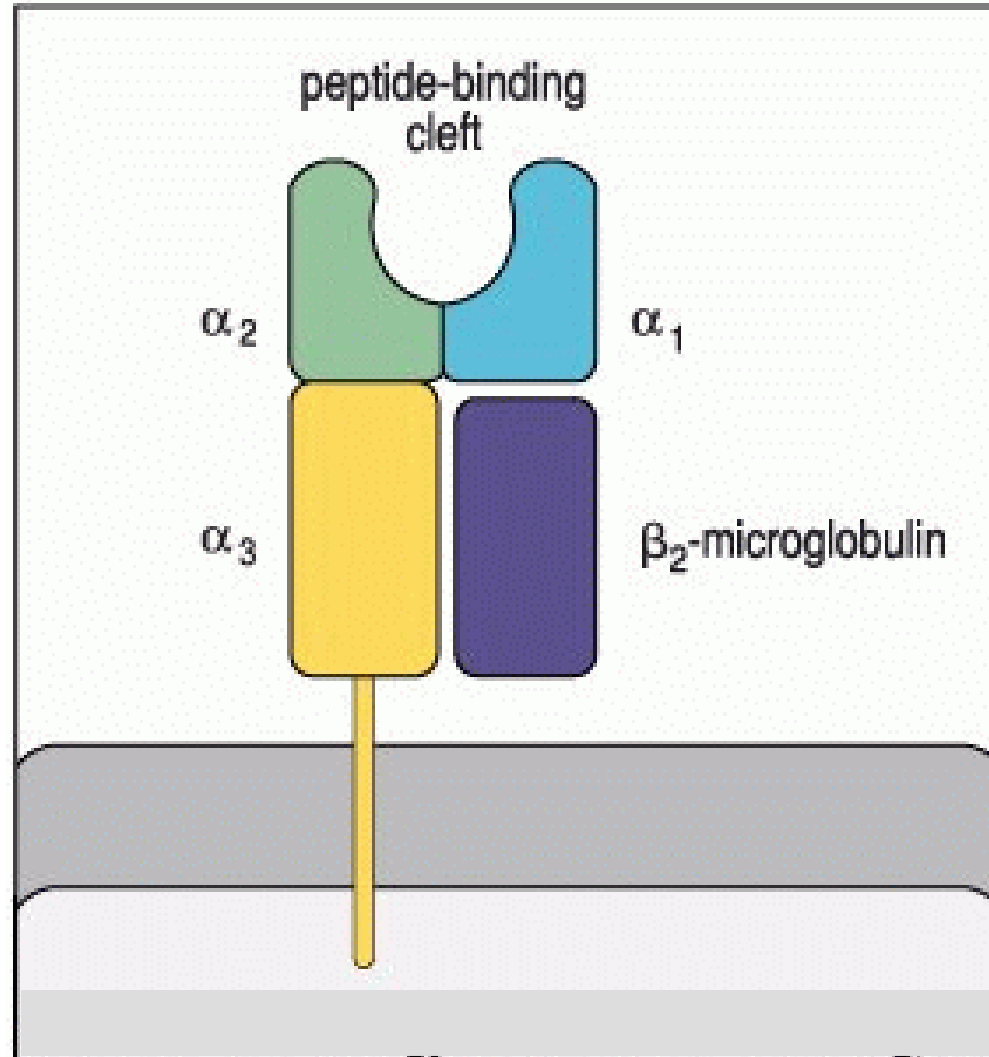
HLA Class II Alleles 1,222

HLA Alleles 4,633

Other non-HLA Alleles 110

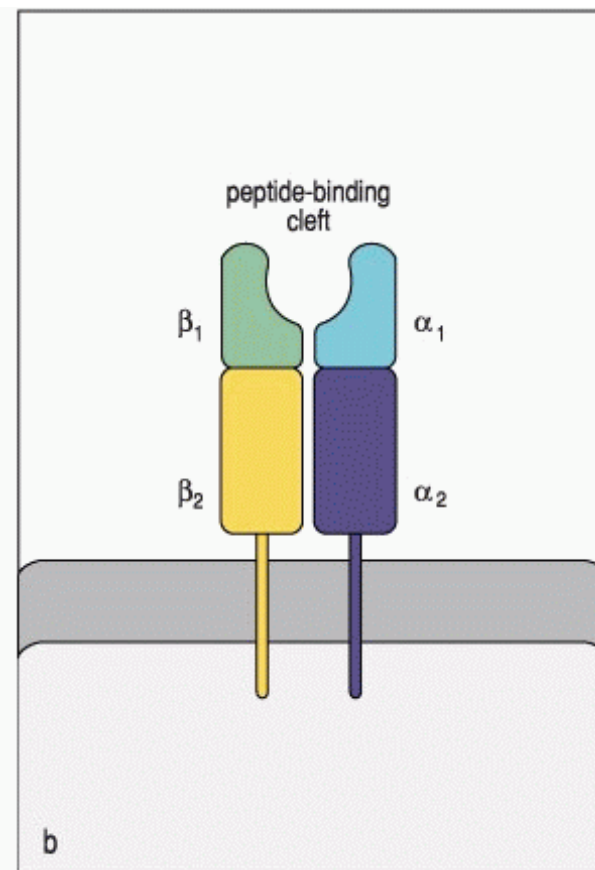
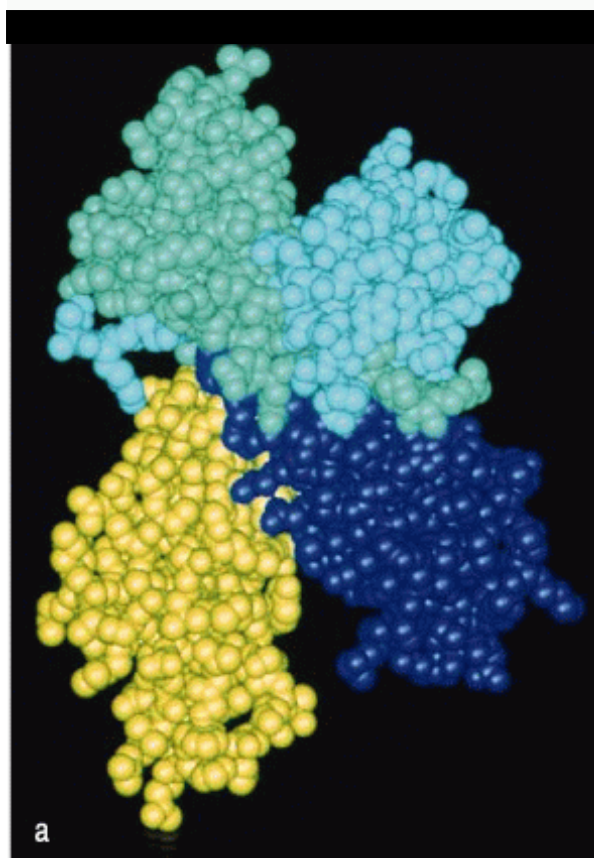
Molekula MHC I. třídy

(HLA-A, HLA-B, HLA-C)



Molekula MHC II. třídy

(HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ)

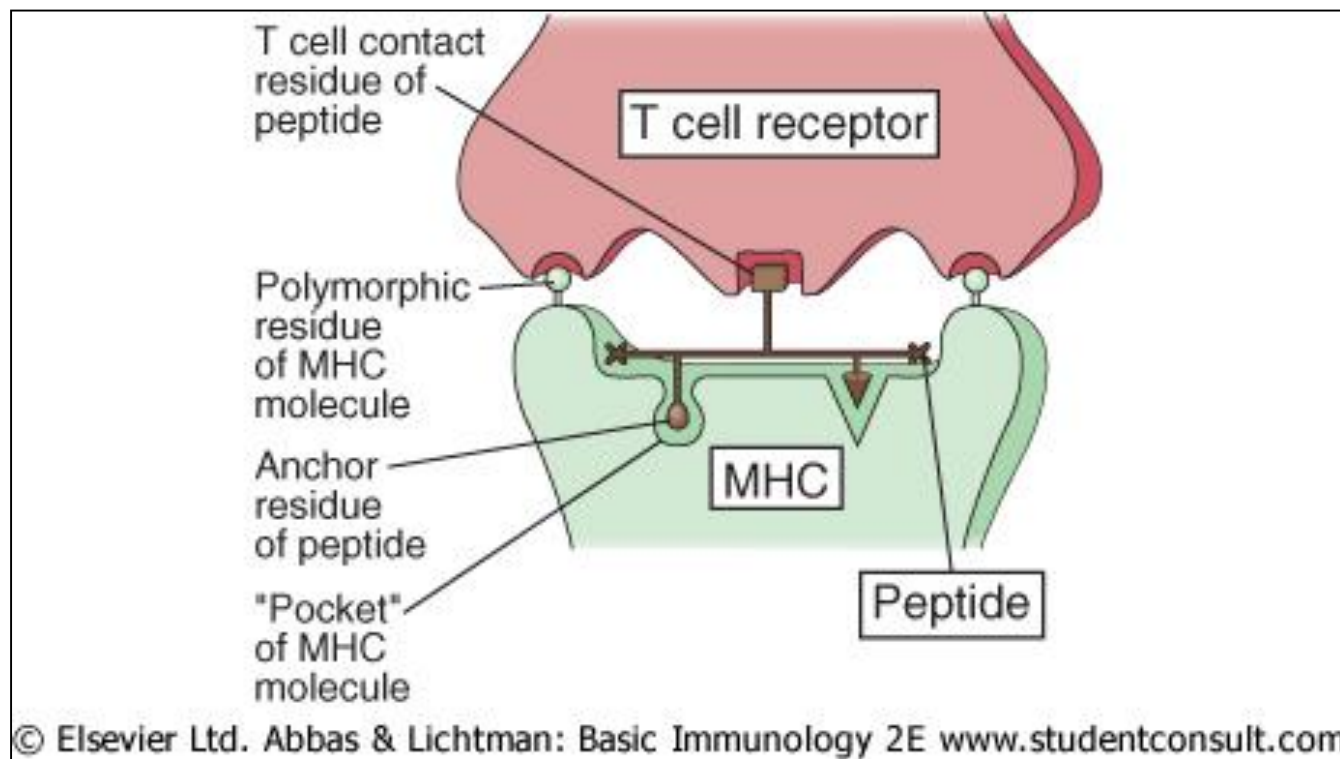


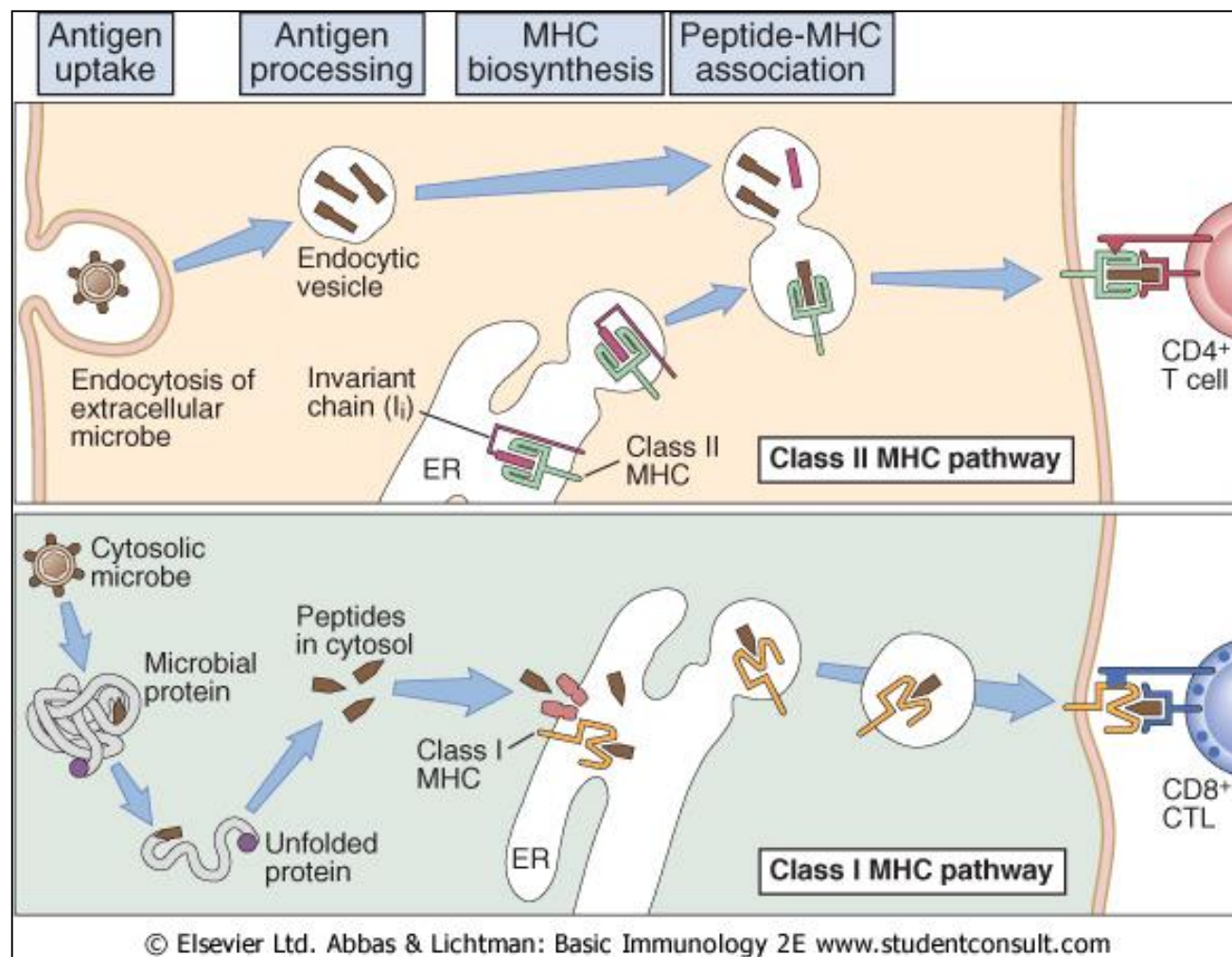
Charakteristika interakcí mezi MHC a peptidy

- MHC molekuly neodlišují peptidy vlastní a cizí
- MHC molekuly váží 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

Presentace antigenů lymfocytům T

- T-lymfocyty poznávají antigeny pouze ve formě peptidových fragmentů vázaných na MHC I nebo II. (*Fenomen MHC-restrikce*).
- Antigen musí být nejdříve v buňkách „zpracován“ (*processing*)- nativní protein je proteolyticky degradován na peptidy, které se (intracelulárně) váží na molekuly MHC. Tento komplex se dostává na buněčnou membránu, kde je schopen reagovat s TCR.
- T-lymfocyty jsou schopny poznávat i lipidové a glykolipidové struktury: je to populace NK-T, která poznává tyto antigeny „neklasickými molekulami MHC“ – CD1
- *Imunogennost proteinových antigenů je určena schopností buněk předkládajících antigen vytvořit peptidy, které se budou vázat na vlastní molekuly MHC.*





ALLORECOGNITION

- Direct allorecognition

(response of the recipient's T-cells to the graft is really due to cross-reactivity in which peptide/alloMHC complexes look like nonself peptides presented on self MHC)

- Indirect allorecognition

(recipient CD4+ T cells are stimulated by recipient APC that have acquired peptides derived from proteins, predominantly MHC molecules, of the donor)

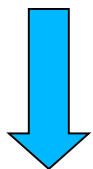
Využití HLA typizace

- transplantace
 - PBSCT – vysoké rozlišení
 - ledviny – nízké rozlišení
- asociace HLA s určitými chorobami
 - ankylozující spondylitida
 - celiakie

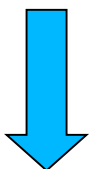
Vyšetření HLA systému

HLA typizace - stanovení HLA výbavy (antigenů, alel)
konkrétního jedince

DNA (HLA gen)



mRNA



protein (HLA antigen)

Mol. genetické techniky

Sérologické techniky

SÉROLOGICKÉ *versus* DNA TECHNIKY

Sérologie (mikrolymfocytotoxický test):

typizace HLA I. třídy (rozlišení př. HLA-A2)

crossmatch

screening anti-HLA protilátek

relativně rychlá a levná

DNA techniky:

typizace HLA I. a II. třídy (nízké i vysoké rozlišení)

vyšší přesnost a spolehlivost typizace

lze i statim vyšetření

vyšší náklady

HLA typizace - DNA techniky

Nejčastěji používané techniky:

PCR-SSP

(Polymerase chain reaction with sequence specific primers)

PCR-SSO

(Polymerase chain reaction with sequence specific oligoprobes)

SBT

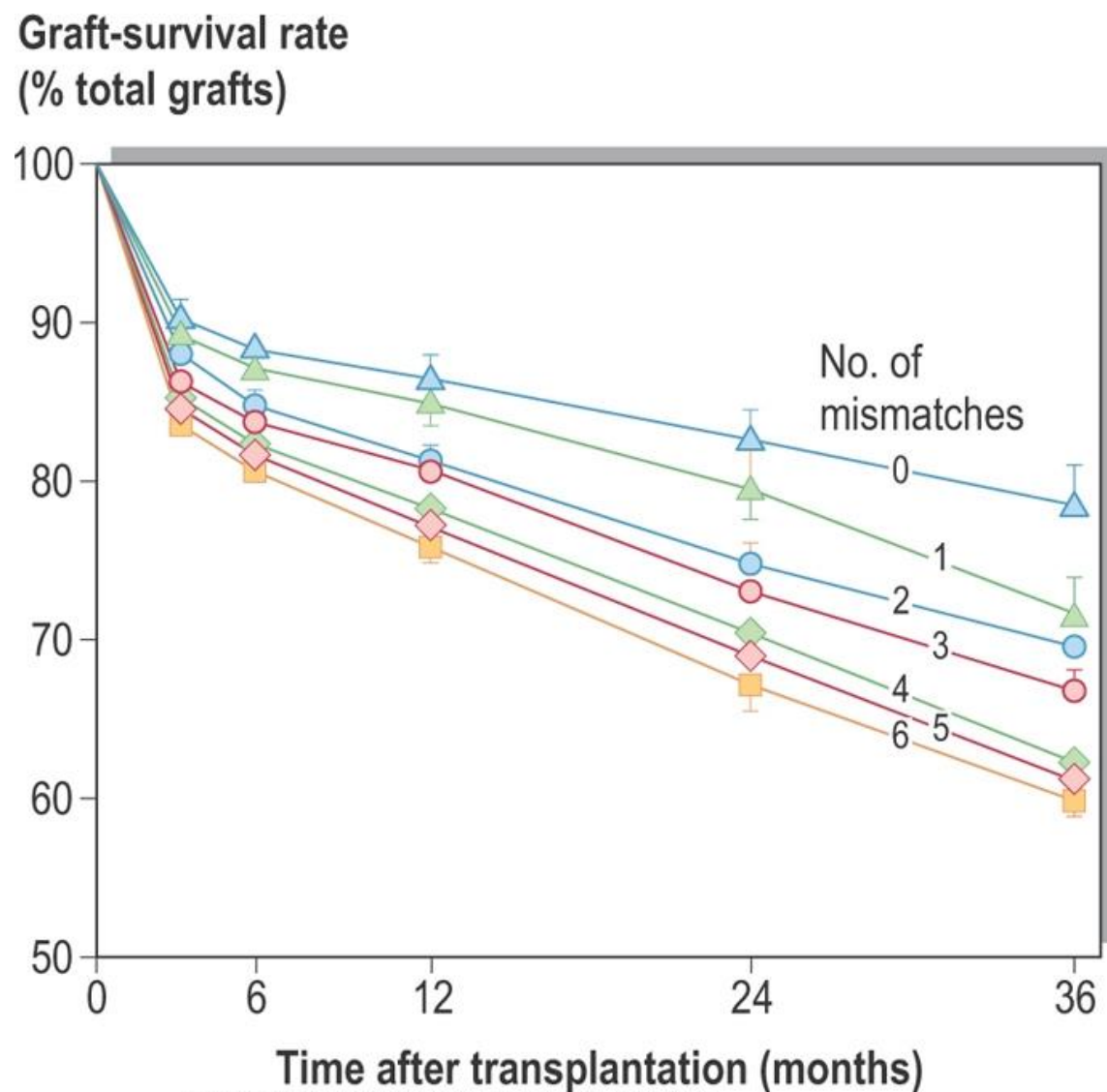
(Sequence based typing)

HLA při transplantacích buněk a orgánů

- Význam „HLA typizace“
- Imunologické příčiny rejekce transplantátů
- Imunologická reakce štěpu proti hostiteli (GvHR)

- Imunosuprese a transplantace

Vliv HLA-identičnosti dárce a příjemce na přežití ledvinného štěpu



Transplantace – vyšetření příjemce štěpu

- Určení krevní skupiny ABO (transplantace orgánů)
- Typizace HLA I (A, B, C)
- Typizace HLA II (DR, DQ)
- Přítomnost autoprotilátek
- Preformované aloprotilátky (panel reactive antibody)
- „Crossmatching“ – přítomnost preformovaných protilátek specifických pro potenciálního donora
- Kultivace směsi lymfocytů (mixed lymphocyte culture assay) – shoda v oblasti D.

Transplantace – rejekce štěpu

- Rejekce hyperakutní - během minut- (protilátky proti ABO nebo HLA antigenům)
- Rejekce akutní – po prvním týdnu - (je způsobena efektorovými lymfocyty T příjemce, odpovídajícími na HLA dárce, a protilátkami).
- Rejekce chronická – asi po půl roce- (reakce pozdní přecitlivělosti, vedoucí k fibrose, poškození cév a ztrátě funkce štěpu).

Imunosupresivní léčba

Transplantace hemopoetických kmenových buněk

Zdroj:

kostní dřev (*odběr z lopaty kosti kyčelní*)

periferní krev (*dárce „stimulován“ růstovými faktory k zvýšení tvorby kmenových buněk*)

pupečnicková krev (*zdroj nezralých kmenových buněk omezené imunogennosti*)

Typy transplantace:

autologní

alogenní

Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host reaction, GvHR)

Důsledek imunologické reakce T-lymfocytů donora na tkáň pacienta

- Makulopapulární exantém, generalizovaná erythrodermie ,
puchýře, deskvamace
- Zvýšení koncentrace bilirubinu v séru
- Průjem, velké bolesti břicha, ileus
- Orální manifestace

Chronická reakce štěpu proti hostiteli (GvHR) *orální manifestace*

Ústní dutina bývá postižena u 45% - 83% pacientů s GvHR:

mukokéla

atrofie, periorální fibróza

postižení temporomandibulárního kloubu

otok sliznice

ulcerace

lichenoidní léze

slizniční erytém

pocit suchosti v ústech, bolest, zvýšená citlivost

Imunologická reakce na zubní implantáty

- Prevalence „periimplantatidy“ v souvislosti s titanovými implantáty se odhaduje cca u 20% pacientů.
- Uvádí se úloha titanium oxidu jako faktoru, podílejícího se na biologických komplikacích.
- K vyšetřování reakce hostitele v parodontálních tkáních se využívá analýzy sulkulární tekutiny, především cytokinů ; především jde o IL-1 beta a TNF alfa, jejichž koncentrace je zvýšena.
- Podobná exprese vybraných biomarkerů implantátů titanu, zirkonia a zdravých zubů patrně odráží individuální zánětlivou reaktivitu pacientů, která není lokálně modifikována implantátem.

(Cionca N et al.: Pro-inflammatory cytokines at zirconia implants and teeth, A cross-sectional assesment. Clin Oral Invest 2016; 20: 2285 – 2291)

Imunosupresivní léčba

- Indikována především u autoimunitních chorob, vaskulitid, a **u pacientů po transplantacích**.
- Vyjímečně používána u těžkých alergických chorob nebo u onemocnění způsobených nadměrnou aktivací T-lymfocytů (psoriáza).
- Léčba vždy **vede k sekundární imunodeficienci** - náchylnosti k infekcím, častější výskyt malignit, zejména lymfatického systému.
- Ke snížení výskytu vedlejších reakcí se obvykle používá kombinovaná léčba.

Antiproliferativní imunosupresiva

- Antagonisté kyseliny listové - metotrexát (Methotrexat)
- Alkylační látky - cyklofosfamid (Cyclophosphamide), chlorambucil (Leukeran)
- Purinové analogy- azathioprin (Azamun, Imuran)
- Inhibitory inosinmonofosfát dehydrogenázy - mykofenolát mofetil (Cellsept)

Imunosupresiva zasahující do metabolismu IL-2

- Kalcineurinové inhibitory:

Blokují funkci Ca^{2+} -dependentního kalcineurinu, tím blokují aktivaci NFAT. Nedojde k derepresi genu pro IL-2.

- Cyklosporin A - vazba na cyklofilin
- Tacrolimus (FK 506) vazba na FKBP

- Sirolimus (Rapamycin) - blokuje přenos signálu z IL-2, též se váže na FKBP.

NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells FKBT: FK- Binding Protein

Cyklosporin-A (Consupren, Sandimun)

- Snižuje produkci IL-2 i odpověď T- lymfocytů na tento cytokin.
- Ovlivněny především Th lymfocyty.
- Nežádoucí účinky: nefrotoxicita, hirsutismus, hypertrofie gingiv, neurotoxicita.
- Používán v transplantologii a u závažných autoimunitních chorob.

Glukokortikoidy jako imunosupresiva

- Imunosupresivně působí především dávky 0,5-1 mg Prednisonu/kg/den, udržovací dávka bývá u dospělých 5-10 mg Prednisonu/den.
- Mechanismy účinky:
 - Snížená produkce cytokinů (IL-1, TNF- α , IL-2)
 - Snížení exprese adhezivních molekul
 - Inhibice exprese HLA-II
 - Inhibice fosfolipázy A2 v granulocytech - blok tvorby metabolitů kyseliny arachidonové.
- Vedlejší činky: redistribuce tuku, vznik vředové choroby, steroidní diabetes, hypertenze, poruchy růstu dětí, hypokalémie, osteoporóza, katarakta, psychózy....

Terapeutické využití monoklonálních protilátek

- Imunosupresivní léčba:
 - Anti-CD3 (Ortoclone OKT3)
 - Anti-CD25: daclizumab (Zenapax), basiliximab (Simulect)
- Protizánětlivá léčba
 - Anti TNF α : infliximab (Remicade)
- Protinádorová léčba:
 - Anti-CD20: rituximab (Mabthera) + kombinace s ^{90}Y nebo ^{131}I
 - Anti-CD52 altuzumanb (Campath)
 - Anti-epidermal growth factor-R: trastuzumab (Herceptin)
 - Anti-CD33 konjugovaná s ozogamycinem (Mylotarg)
-

Imunosupresiva registrovaná v České republice 2018

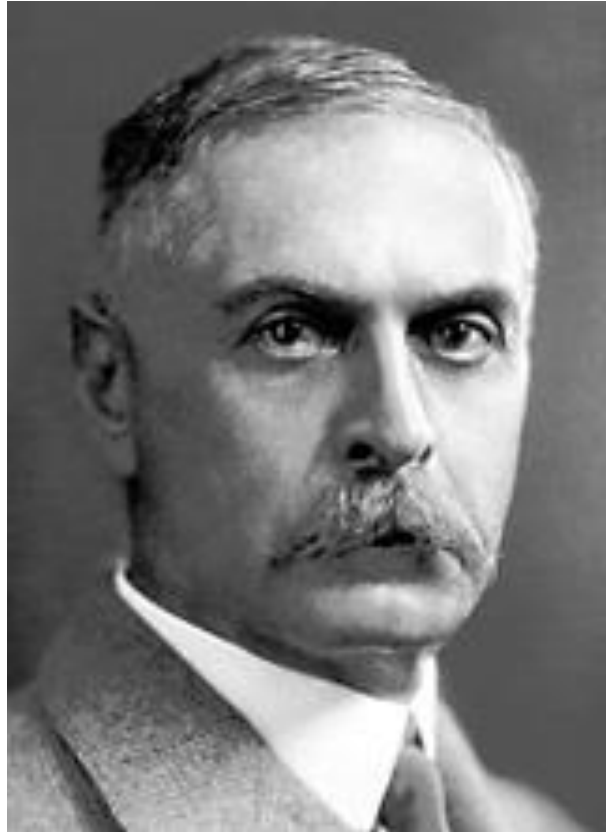
mechanismus účinku

- Glukokortikoidy: *ovlivnění exprese genů*
- Cyklofosfamid, azathioprin, mykofenolát: *ovlivnění metabolismu DNA*
- Cyklosporin, takrolimus, sirolimus: *vazba na imunofiliny*
- Monoklonální protilátky: rituximab (*proti CD20 lymfocytů B*), infliximat, adalimumab (*proti TNF alfa*), anakinra (*proti IL-1*), brodalumab (*proti IL-17*), natalizumab (*proti alfa4 integrinu*), ekulizumab (*proti C5 složce komplementu*)
- Immunoglobuliny (iv, sc) : *ovlivnění buněk imunitního systému*

IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY TRANSFUZE KRVE

Karl Landsteiner (1868 – 1943)

Nobelova cena 1930



The specificity of
serological reactions
(Harvard University Press,
1945)

H A P T E N

*Biochemical specificity
peculiar to a species.*

Blood groups AB0; M and N types; Rh-factor

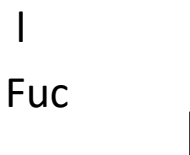
Polysacharidové antigeny krevních skupin

- Nejdůležitější je systém ABO.
- Antigeny mohou být přítomny i v sekretech a na mnoha epiteliálních a endoteliálních buňkách.
- „Základní strukturou“ ABO antigenů je substance H. Velmi řídce se vyskytuje „bombajský fenotyp“ tj nepřítomnost H-substance.
- Protilátky jsou IgM isotypu, vyskytují se přirozeně.
- Mezi malé krevní skupiny patří systémy MN a Ss

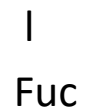
Transfúze krve

System krevních skupin „AB0“

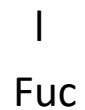
O: ceramid-Glu-Gal-GalNAc-Gal



A: ceramid-Glu-Gal-GalNAc-Gal-**GalNAc**



B: ceramid-Glu-Gal-GalNAc-Gal-**Gal**



Přirozené isohemaglutininy

Krevní skupina A: isohemaglutininy anti-B

Krevní skupina B: isohemaglutininy anti-A,

Krevní skupina 0: isohemaglutininy anti-A, anti-B

Krevní skupina AB: isohemaglutininy anti-A ani anti-B nejsou
přítomny

Bílkovinné antigeny krevních skupin

- Nejdůležitější je systém Rh.
- Protilátky jsou IgG isotypu, objevují se pouze po antigenním stimulu.
- Mezi malé krevní skupiny patří systémy Kelly, Lewis, Duffy.

Další příklady krevních skupin – antigeny a protilátky

Krevní skupina	Antigen	Alogenní protilátky	Klinická relevance
Rh (D, C/c, E/e)	protein	IgG	HTR, HDN
Lewis (Le ^a , Le ^b)	oligosacharid	IgM/IgG	vzácně HTR
Kell (K/k)	protein	IgG	HTR, HDN
Duffy (Fy ^a , Fy ^b)	protein	IgG	HTR, HDN
Kidd (Jk ^a , Jk ^b)	protein	IgG	HTR (opožděně) HDN (slabší)
I/i	sacharid	IgM	-
MNSsU	protein	IgM/IgG	Anti-M: vzácně HDN Anti-S, -s, -U: HTR, HDN

Transfuze krve - komplikace

Po převodu krve neslučitelné v systému AB0 dochází k **hemolytické reakci**, která je způsobena intravaskulární destrukcí červených krvinek protilátkami příjemce:

Bolesti na hrudi, v zádech, dušnost, neklid, horečka s třesavkou, zvracení, hypotenze, šokový stav.

Přežije-li nemocný šokový stav, objeví se do 24 hod. žloutenka, selhání ledvin, krvácení z diseminované intravaskulární koagulace, trombocytopenie a fibrinolýzy.

Transfuze krve - komplikace

- Reakce vyvolané protilátkami proti leukocytům a trombocytům (asi u 1/3 nemocných s těmito protilátkami po opakovaných transfuzích – do 3 hod. po převodu horečka, třesavka, zimnice, bolesti hlavy, zrudnutí, tlak na hrudi, kašel)
- Alergické reakce (kopřivka, larygospasmus, anafylaktoidní reakce – IgA-anti IgA)
- Aloimunizace
- Reakce s přetížení oběhu (u zdravého lze převést 1L/za 2-3 hod., přetížení vede k akutnímu srdečnímu selhání)
- Vzduchová embolie (při přetlakové transfusi)

Potransfuzní reakce - shrnutí

- Hemolytické : bolesti svalstva, hlavy, nausea, vzestup teploty. Stav může vyústit do šoku a/nebo ledvinného selhání. Obvykle se objevuje rychle, během vlastní transfúze, existují i pozdní formy.
- Febrilní - často dána protilátkami proti vedlejším krevním skupinám.
- Alergické: kopřivka, může se rozvinout bronchospasmus, někdy až anafylaktický šok.
- TRALI syndrom: (*transfusion-related acute lung injury*) dušnost, kašel časně po transfúzi. Příčinou jsou agregáty trombocytů v plicích.

Transplacentární přenos faktorů imunity

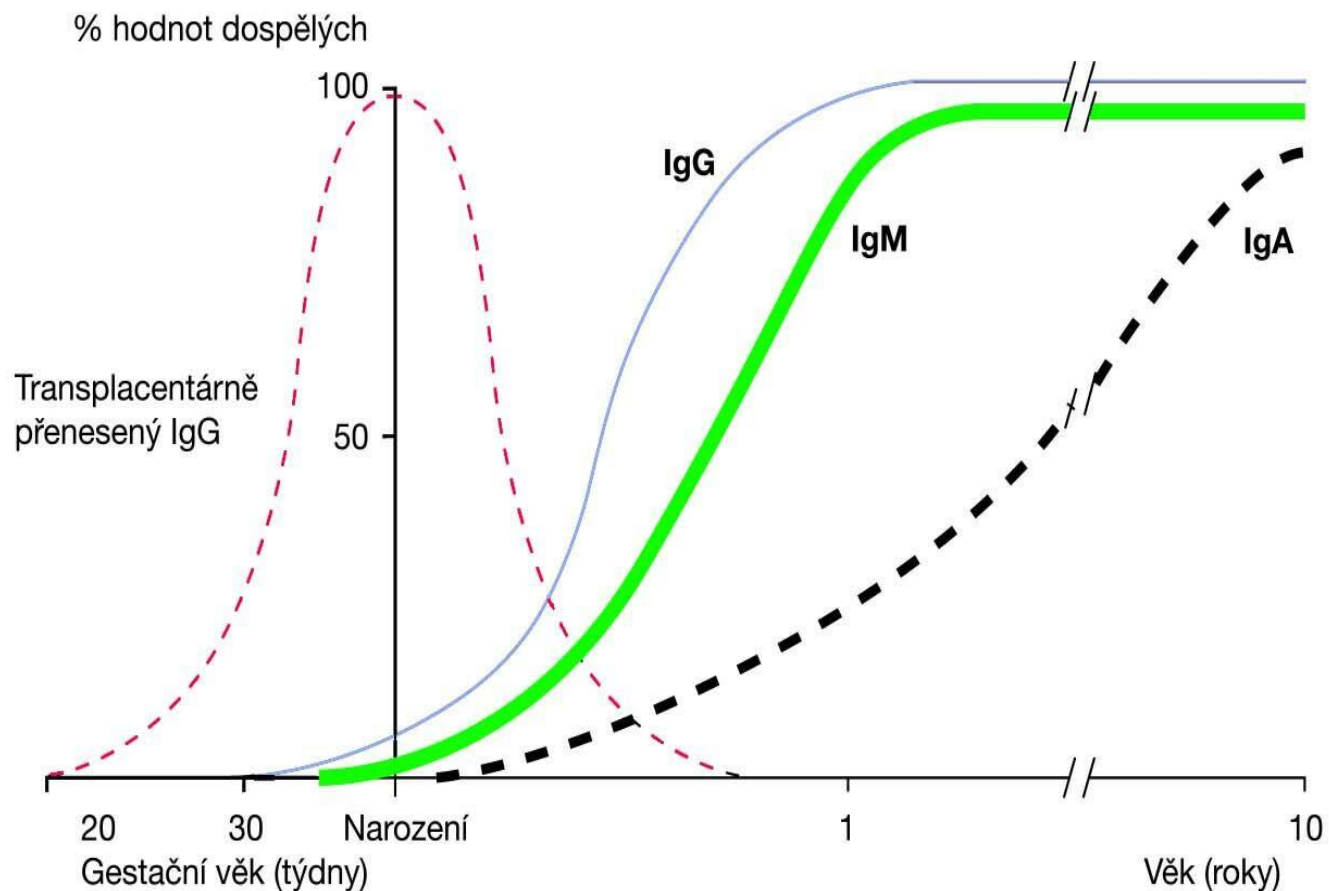
imunoglobuliny (IgG) (úloha FcRn)

buňky

v 3. trimestru se dostává z plodu do mateřského oběhu
cca 200 000 buněk denně - zejména **buňky trofoblastu**

do oběhu plodu pronikají transplacentárně
mateřské lymfocyty – („mikrochimerismus“)

Hladiny imunoglobulinů v séru před a po narození



Inkompatibilita v Rh systému mezi matkou a plodem

Protilátky proti Rh = IgG

Transplacentární přenos

Hemolytický účinek (+ C-systém, fagocyty)

Coombsův antiglobulinový test (přímý, nepřímý)

Cave: Mater certa, pater semper incertus!

Profylaxe: anti Rh sérum po porodu