

# **HLA antigeny, imunologie transplantací**

Imunologie – cvičení  
3. ročník všeobecného lékařství LF MU

# Major histocompatibility complex (MHC)

- ▶ MHC je soubor molekul (glykoproteinů) odpovědných za odvržení transplantované tkáně nebo orgánu (odtud název)
- ▶ Hlavní úloha MHC spočívá v prezentaci antigenů T-lymfocytům
- ▶ Je tvořen souborem 40-50 genů seřazených na chromosomu 6
- ▶ **MHC u člověka je nazýván HLA (Human Leukocyte Antigen)**

# Struktura molekul MHC

- ▶ MHC I. třídy
  - těžký **řetězec  $\alpha$**  nekovalentně spojen s  **$\beta$ 2-mikroglobulinem** (kódovaným mimo MHC oblast)
  - řetězec  $\alpha$  tvořen doménami pro vazbu peptidu ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2), doménou podobnou imunoglobulinové doméně ( $\alpha$ 3), transmembránovou a cytoplazmatickou částí
- ▶ MHC II. třídy
  - heterodimery 2 těžkých **řetězců  $\alpha$  a  $\beta$**  spojených nekovalentní vazbou
  - řetězce tvořeny doménami pro vazbu peptidu ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 1), doménami podobnými imunoglobulinové doméně ( $\alpha$ 2,  $\beta$ 2), transmembránovými a cytoplazmatickými částmi

# MHC I.třídy

- ▶ MHC I.třídy jsou přítomny na všech jaderných buňkách organismu
- ▶ MHC I předkládají (prezentují) peptidy lymfocytům CD8+, jedná se převážně o peptidy produkované buňkou
- ▶ Rozlišujeme 3 isotypy lidských klasických MHC glykoproteinů I.třídy (HLA-A, HLA-B, HLA-C)
- ▶ Existují rovněž tzv. neklasické MHC glykoproteiny I.třídy (HLA-E, HLA-F, HLA-G), dále CD1 (nejedná se o produkty MHC genů, ale mají strukturální a funkční podobnost)

# MHC II.třída

- ▶ MHC II.třída jsou na rozdíl od MHC I.třída přítomny za fyziologických podmínek pouze na antigen prezentujících buňkách (APC)
- ▶ MHC II.třída prezentují peptidy lymfocytům CD4+; jedná se převážně o peptidové fragmenty pohlcené buňkou
- ▶ Rozlišujeme 3 izotypy MHC glykoproteinů II.třída (HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP)

# Charakteristika interakcí mezi MHC a peptidy

- ▶ MHC molekuly **neodlišují peptidy vlastní a cizí**
- ▶ Imunogennost proteinových antigenů je určena schopností buněk předkládajících antigen vytvořit peptidy, které se budou vázat na vlastní molekuly MHC
- ▶ MHC molekuly vážou v 1 chvíli jeden peptid, ale celkově mohou vázat řadu strukturálně podobných peptidů (x TCR-epitop)
- ▶ Vazba je nekovalentní, ligand je lineární a sestává z 8-11 aminokyselin (MHC I), resp. z 10-30 aminokyselin (MHC II)
- ▶ *T-lymfocyty jsou schopny poznávat i lipidové a glykolipidové struktury: je to populace NK-T, která poznává tyto antigeny „neklasickými molekulami MHC“ – CD1*

# Exprese molekul MHC na buňkách

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

# Původ a zpracování antigenů

## ▶ MHC I. třídy

- prezentuje **cytoplazmatické antigeny** (cytoplasmatické proteiny, peptidové fragmenty proteinů kódovaných infikujícími viry či intracelulárními parazity, peptidy aberovaných buněk, např. nádorových, extracelulární antigeny uvolněné do cytoplazmy apod.)
- **proteolytická degradace** antigenů **v proteasomech**
- transport peptidů do ER, kde se váží na molekulu MHC I
- komplex MHC I s antigenem se dostává přes Golgiho systém exocytózou na povrch buňky



# Původ a zpracování antigenů

## ▶ **HLA II. třídy**

- prezentuje pohlcené **extracelulární peptidy** (mikrobiální antigeny)
- **proteolytická degradace** proteinů **v endosomech a lysosomech**
- molekula HLA II v ER zablokována pro vazbu peptidu, transportována přes Golgiho systém do endosomu/lysosomu
- vazebná část HLA II molekuly v endosomu/lysosomu uvolněna, navázání peptidu a transport exocytózou na povrch buňky

# Prezentace antigenů lymfocytům T

- ▶ T-lymfocyty poznávají antigeny pouze ve formě peptidových fragmentů vázaných na MHC I. nebo II. třídy - **fenomen MHC-restrikce**
- ▶ MHC I. třídy
  - Prezentace antigenů **cytotoxickým** T lymfocytům CD8+
- ▶ MHC II. třídy
  - Prezentace antigenů **pomocným** T lymfocytům CD4+

# Charakteristika genů MHC

- ▶ Lokalizované na krátkém raménku 6. chromozomu
  - Soubor MHC genů na 1 chromosomu se nazývá **haplotyp**
  - Nízká míra rekombinace mezi geny na jednotlivých lokusech – určité kombinace se vyskytují častěji než by odpovídalo volné kombinovatelnosti alel = **vazebná nerovnováha**
- ▶ **Kodominantní exprese**: každý jedinec má dvě alely (od obou rodičů); na jedné buňce je tedy exprimováno maximálně 6 různých molekul HLA I.třídy (HLA–A, –B, –C)
- ▶ Jedná se o **nejpolymorfnější geny v genomu**, nyní je známo více než 20 000 různých alel HLA; je obtížné najít 2 jedince s plnou shodou MHC Genů
- ▶ Polymorfismus MHC má **ochranný význam** jak pro jedince tak pro populaci X přináší komplikace při orgánových transplantacích

# Dědičnost HLA

- ▶ Každý člověk nese 1 mateřský a 1 otcovský haplotyp
- ▶ Sourozenci mohou navzájem:
  - HLA identičtí (25% sourozenců zdědí stejný haplotyp od matky i otce)
  - Haploidentičtí (50% sourozenců)
  - Zcela rozdílní (25% sourozenců)
- ▶ Důležité pro transplantologii

# HLA typizace

- ▶ stanovení HLA výbavy konkrétního jedince
- ▶ **serologické** techniky – stanovení antigenu (HLA-A2, HLA-B27) – reakce antigenu s protilátkou
  - Lymfocytotoxický test – reakce protilátek s antigenními strukturami na povrchu lymfocytů
  - postupně nahrazeno molekulárně–genetickými metodami
- ▶ **molekulárně genetické** metody –určení alely (HLA-A\*02:01)
  - sekvenčně specifická PCR, hybridizace specifických sond, sekvenace
  - vyšší přesnost a spolehlivost typizace
    - nízké (HLA-DR\*03) nebo vysoké (HLA-DR\*03:02) rozlišení
  - vyšší náklady

# Klinické využití HLA typizace

*Asociace molekul HLA systému s chorobami*

*Transplantologie*

# Asociace HLA s chorobami

- ▶ Některé alely se vyskytují častěji u pacientů s daným postižením než v obecné populaci
- ▶ Jedná se o choroby s imunologickou patogenezí (např. autoimunitní choroby – revmatoidní artritida, juvenilní diabetes, celiakie, m. Bechtěrev, psoriasis vulgaris)
- ▶ Může se však jednat i o choroby, u nichž se imunopatogenetický mechanismus neuplatňuje (narkolepsie, idiopatická hemochromatóza, adrenogenitální syndrom)
- ▶ Dosud nebyla popsána situace, kdy by se nemoc rozvinula u všech jedinců s daným HLA antigenem ⇒ specifický HLA antigen je důležitou predispozicí, avšak pro vznik choroby je nutný ještě jiný spouštěč

# Asociace HLA s chorobami

- **Možné příčiny:**
  - Specifická prezentace peptidu, který je spouštěčem daného onemocnění, konkrétní HLA molekulou (jiná HLA molekula by této vazby nebyla schopna)
  - HLA antigen je znakem přítomnosti defektního genu, který se nachází v blízkosti HLA (vazebná nerovnováha)
  - Selhání mechanismu negativní selekce autoreaktivních T lymfocytů
  - Selhání funkce regulačních T lymfocytů
  - HLA antigeny jsou receptory pro mikroby – fenomén 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. Bechtěrev:** HLA-B27 (96 – 9 – 87,4)
- ▶ **Celiakie:** HLA-DQ2 (100 – 72 – 38,5)
- ▶ **Juvenilní diabetes mellitus:** HLA-DR3/4 (32 – 1 – 47,0)
- ▶ **Revmatoidní arthritida:** HLA-DR4 (50 – 19 – 4)

# Vztah antigenů HLA k chorobám

	HLA	Relativní riziko
m. Bechtěrev	B27	90–100
Celiakie	DR3	12
IDDM	DR3 / DR4	20
Revmatoidní arthritida	DR4	6

- ▶ relativní riziko je poměr pravděpodobnosti vzniku onemocnění u nositele specifické alely HLA a u jedince bez této alely

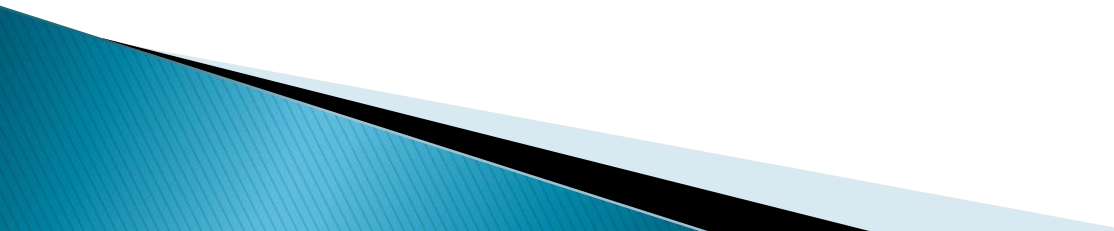
Přítomnost specifických alel HLA systému může **zvýšit dispozici** daného jedince ke vzniku autoimunitní choroby, ale **není dostačující** podmínkou, aby onemocnění vzniklo.

# Ankylozující spondylartritis (M. Bechtěrev)

- ▶ Postižení především muži
- ▶ Začíná obvykle sakroileitidou, postupně postižena celá páteř
- ▶ Dochází k fibrotizaci až osifikaci intervertebrálních kloubů a ligament
- ▶ Mohou být postiženy i kyčelní a ramenní klouby
- ▶ Mimokloubní příznaky: iridocyklitida, aortitida
- ▶ Většina pacientů (95%) je **HLA-B27 pozitivních** (x 3–10% zdravých; vysoká negativní prediktivní hodnota vyšetření!)
- ▶ Jen u 2% HLA-B27 pozitivních se vyvine AS
- ▶ Laboratoř: hypergamaglobulinémie, zánětlivé reaktanty

# IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY TRANSFUZE KRVE

# Transfúze krve = transplantace krve

- ▶ Transfúze krve – nejčastější druh transplantace v klinické praxi
  - ▶ Krevní skupiny
    - polysacharidové a peptidové antigeny
    - protilátky
  - ▶ Inkompatibilita krve v těhotenství
  - ▶ Komplikace transfúze
- 

# Polysacharidové antigeny krevních skupin

- ▶ Mezi polysacharidové antigeny na povrchu erytrocytů patří systémy ABO, Lewis, P, Ii
- ▶ 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 řídké se vyskytuje „bombajský fenotyp“, tj. nepřítomnost H-substance (riziko hemolytické reakce po krevní transfuzi jiného než bombajského fenotypu)
- ▶ **Protilátky** proti polysacharidovým antigenům jsou **IgM izotypu**, vyskytují se přirozeně

# Polysacharidové antigeny systému ABO

**O:** ceramid–Glu – Gal – GluNAc – Gal  
|  
Fuc

**A:** ceramid–Glu – Gal – GluNAc – Gal – GalNAc  
|  
Fuc

**B:** ceramid–Glu – Gal – GluNAc – Gal – Gal  
|  
Fuc

# Přirozené isohemaglutininy (IgM)

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

- **Křížová zkouška (cross-match test):  
sérum příjemce + erytrocyty dárce**



# Bílkovinné antigeny krevních skupin

- ▶ Mezi glykoproteinové systémy krevních skupiny patří Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNSs, a další
- ▶ Nejdůležitější je systém Rh (pozitivní u 85% populace)
- ▶ Protilátky jsou IgG isotypu, objevují se pouze po antigenním stimulu

# Krevní transfuze

- ▶ Indikována při klinických projevech anémie
- ▶ Jednoznačnou indikací jsou hodnoty hemoglobinu pod 70g/l, přičemž u dospělých po transfuzi očekáváme vzestup hemoglobinu cca o 10g/l
- ▶ K transfuzi se připravují erytrocyty stejné krevní skupiny v systémech ABO a Rh
- ▶ Za mimořádných okolností platí, že skupina 0 je „univerzální dárce“, skupiny AB „univerzální příjemce“
- ▶ Za indikaci krevní transfuze, volbu transfuzního přípravku a dodržení doporučených postupů odpovídá lékař!

# Inkompatibilita v Rh systému mezi matkou a plodem

- ▶ Senzitivace Rh- matek plodem Rh+
- ▶ V následné graviditě protilátky proti Rh (IgG), přestupují přes placentu
- ▶ hemolytický účinek (komplementový systém, fagocyty) ⇒ erythroblastosis fetalis
  
- ▶ Dg: Coombsův antiglobulinový test (přímý, nepřímý)
  
- ▶ Profylaxe: podání anti-Rh séra do 72 hod. po porodu (abortu...) ⇒ zábrana Rh imunizace

# Transfúze krve – komplikace

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

**Příznaky:** 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 při diseminované intravaskulární koagulaci, trombocytopenii a fibrinolýze

**Terapie:** okamžité zastavení krevní transfuze, léčba komplikací, léčba hypotenze, udržování adekvátní renální perfuze, dostatečné diurézy, atd.

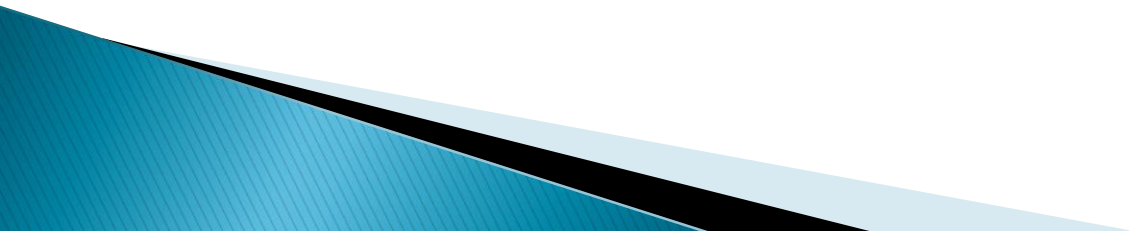
# Transfúze krve – komplikace

- ▶ Časné komplikace z imunitních příčin:
  - Akutní hemolytická reakce (při ABO inkompabilitě)
  - Febrilní nemeholytická reakce – reakce vyvolaná protilátkami proti leukocytům a trombocytům, příznaky: horečka, třesavka, zimnice, bolesti hlavy, urtika
  - Alergická či anafylaktoidní reakce (anti-IgA protilátky)
- ▶ Časné komplikace z neimunitních příčin:
  - Oběhové přetížení při rychle aplikované transfuzi, citrátová toxicita s projevy hypokalcémie a srdeční arytmie; hyperkalémie
- ▶ Pozdní komplikace z imunitních příčin:
  - Aloimunizace (např. proti antigenům HLA ⇒ komplikace u případné transplantace)
  - Pozdní hemolytická potransfuzní reakce (zrychlená destrukce transfundovaných erytrocytů)
- ▶ Pozdní komplikace z neimunitních příčin:
  - Přetížení železem
  - Potransfuzní infekce

# Transfúzí indukovaná GvHR

- ▶ Může být způsobena podáním neozářené krve imunodeficitnímu pacientovi (T-buněčné primární imunodeficiency, leukémie....)
- ▶ Je terapeuticky prakticky nezvládnutelná

# IMUNOLOGIE TRANSPLANTACÍ



# Transplantace

- ▶ přenosy tkání nebo orgánů (štěpu)
- ▶ nahrazují nefunkční tkáň nebo orgán příjemce zdravým ekvivalentem od dárce
- ▶ **typy transplantací**
  - dle příjemce – autogenní, isogenní, alogenní, xenogenní
  - dle štěpu – orgánové/tkáňové
- ▶ zásadní úloha imunitních pochodů



# Transplantace orgánů, tkání, buněk

## *Dárce a příjemce:*

- ▶ Autogenní transplantace (autograft)
- ▶ Isogenní transplantace (isograft)
- ▶ Alogenní transplantace (allograft)
- ▶ Xenogenní transplantace (xenograft)

## *Význam MHC:*

- ▶ Rejekce (odvržení, odhojení) štěpu
- ▶ Reakce štěpu proti hostiteli (graft vs. host reaction)

# HLA a transplantace

- Shoda mezi dárce a příjemcem štěpu v HLA znacích
  - snížení výskytu komplikací
  - vyšší úspěšnost transplantací
  - delší přežívání pacientů i transplantátů
  - zvýšení kvality života pacientů po transplantaci
- Imunitně zprostředkované komplikace transplantace
  - rejekce štěpu - hlavní problém u transplantací solidních orgánů
  - reakce štěpu proti hostiteli (GvHD) – hlavní problém u transplantací hematopoetických buněk

# Transplantace – vyšetření příjemce štěpu

- ▶ Určení krevní skupiny ABO
  - transplantace orgánů
- ▶ Typizace HLA I (A, B, C), HLA II (DR, DQ)
  - Tx ledvin (A, B, DR – nízké rozlišení)
  - HSCT (A, B, C, DR, DQ – vysoké rozlišení)
- ▶ Přítomnost autoprotilátek
- ▶ Preformované aloprotilátky (panel reactive antibody)
- ▶ „Crossmatching“ – přítomnost preformovaných protilátek specifických pro potenciálního donora

# TRANSPLANTACE

## \*ledvin

- ▶ shoda v krevní skupině
- ▶ HLA typizace s nízkým rozlišením v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-DR

# TRANSPLANTACE

## \*srdce, plic, pankreatu, střeva

## \*jater, rohovky

- shoda v krevní skupině
- HLA typizace se neprovádí

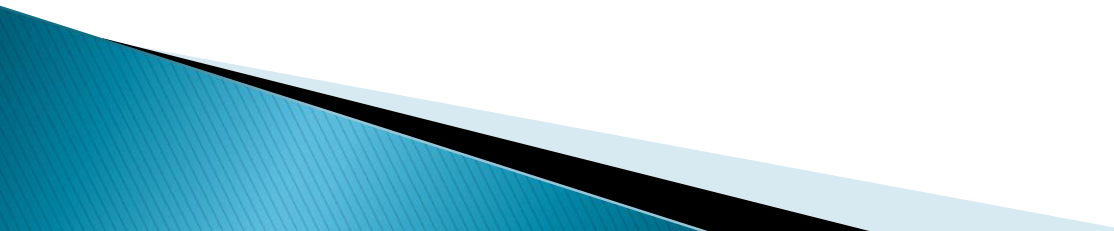
# PREFORMOVANÉ PROTILÁTKY

- ▶ Screening výskytu **preformovaných anti-HLA protilátek** (porody, transfúze, transplantace)
  - malé množství séra pacienta je smícháno s buňkami 40–60 osob reprezentujících dárcovskou populací – tvorba imunokomplexů – komplement – lýza nebo anti-IgG protilátky/fluorescein a průtoková cytometrie
  - **výsledky se udávají jako PRA** (percent reactive antibodies) – procento dárcovských buněk reagujících s pacientovým sérem

# CROSS MATCH TEST

- ▶ po nalezení vhodného dárce testuje, zda pacient nemá protilátky specificky reagující s buňkami dárce
- ▶ Sérum příjemce versus lymfocyty dárce
  - cytotoxický test či průtoková cytometrie

# Transplantace – rejekce štěpu

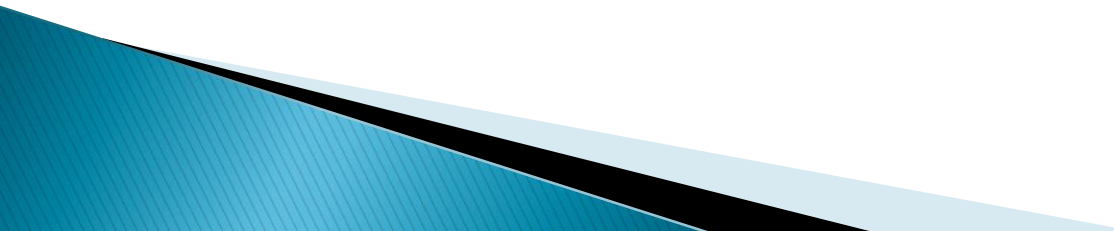
- ▶ Rejekce **hyperakutní**
  - ▶ Rejekce **akutní**
  - ▶ Rejekce **chronická**
- 

# Hyperakutní rejekce

- ▶ Způsobena preformovanými protilátkami proti systému ABO nebo proti HLA antigenům
- ▶ Dochází k aktivaci komplementu, koagulační kaskády, vzniku trombů, akumulaci neutrofilů, vše vede k poškození štěpu
- ▶ Probíhá řádově během minut až hodin
- ▶ Prevencí je screening preformovaných protilátek a cross-match test



# Akutní rejekce

- ▶ Způsobena rozvíjející se imunitní reakcí příjemce proti HLA antigenům dárce
  - ▶ Patogeneticky zapojeny převážně efektorové T-lymfocyty, případně protilátky příjemce
  - ▶ Probíhá v rámci dnů až týdnů po transplantaci
- 

# Chronická rejekce

- ▶ Reakce pozdní přecitlivělosti vedoucí k fibrotizaci, poškození cév a postupné ztrátě funkce štěpu
- ▶ Patogeneticky se uplatňují protilátky, T-lymfocyty, důležitou roli hrají rovněž různé cytokiny a růstové faktory
- ▶ Rozvíjí se většinou v řádu měsíců po transplantaci

# Transplantace hematopoetických buněk

- ▶ Cílem je osídlit dřeň příjemce kmenovými buňkami dárce s následnou obnovou krvetvorby
- ▶ Užívá se buď kostní dřeň nebo izolované periferní CD34+ kmenové buňky
- ▶ Nutnost HLA typizace s vysokým rozlišením – požadována co největší shoda v HLA systému
- ▶ Indikace:
  - Maligní nádory (leukémie, lymfomy, vybrané solidní tumory – neuroblastom...)
  - Selhání kostní dřeně (aplastická anémie)
  - Závažné primární imunodeficity

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

## ▶ *Transplantace kmenových buněk*

- T lymfocyty ve štěpu dřeně rozeznávají tkáňové antigeny příjemce jako cizorodé

## ▶ *Transplantace solidních orgánů*

- T lymfocyty v transplantátu (např. játra) není možné dobře vymýt – cílovým orgánem GvHD je kostní dřeň

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

- ▶ Akutní GvHR – několik dní až týdnů po transplantaci, dochází k poškození jater, kůže, střevní sliznice
- ▶ Chronická GvHR – řada měsíců až let po transplantaci, charakterizována infiltrací tkání a orgánů Th2 lymfocyty, produkce aloprotilátek, cytokinů, vede k fibrotizaci tkání

Imunosupresivní léčba

# Reakce štěpu proti leukémii (graft versus leukemia, GvL)

- ▶ Reaktivita dárcovských T lymfocytů přenesených společně s kmenovými buňkami vůči zbytkovým leukemickým buňkám příjemce – příjemce je v imunosupresi – spojeno vždy i s GvHD
- ▶ Zatímco GvL je reakcí žádoucí, GvHD je reakcí nežádoucí, snahou je oddělit tyto 2 reakce:
  - Suspenze kmenových buněk bez T-lymfocytů (TL vzniklé z nové kostní dřeně prochází thymovou výchovou) + injekce malého množství TL dárce

**Waiting list**

Krevní skupina  
HLA typizace s nízkým rozlišením

Každé 3 měsíce PRA

Serologické markery infekce  
Infekce HBV, HBC, CMV

**Výběr 50 příjemců**

Dle ABO, HLA, urgentnost,  
doba čekání

**SPÁDOVÉ HLA LABORATOŘE**

Cross match test

**NÁRODNÍ CENTRUM koordinující  
transplantace ledvin**

Výběr 2 příjemců s negativním  
CMT dle vzdálenosti odběru  
ledviny a centra a jeho bilance

HLA typizace s nízkým rozlišením

**Kadaverózní dárce**