

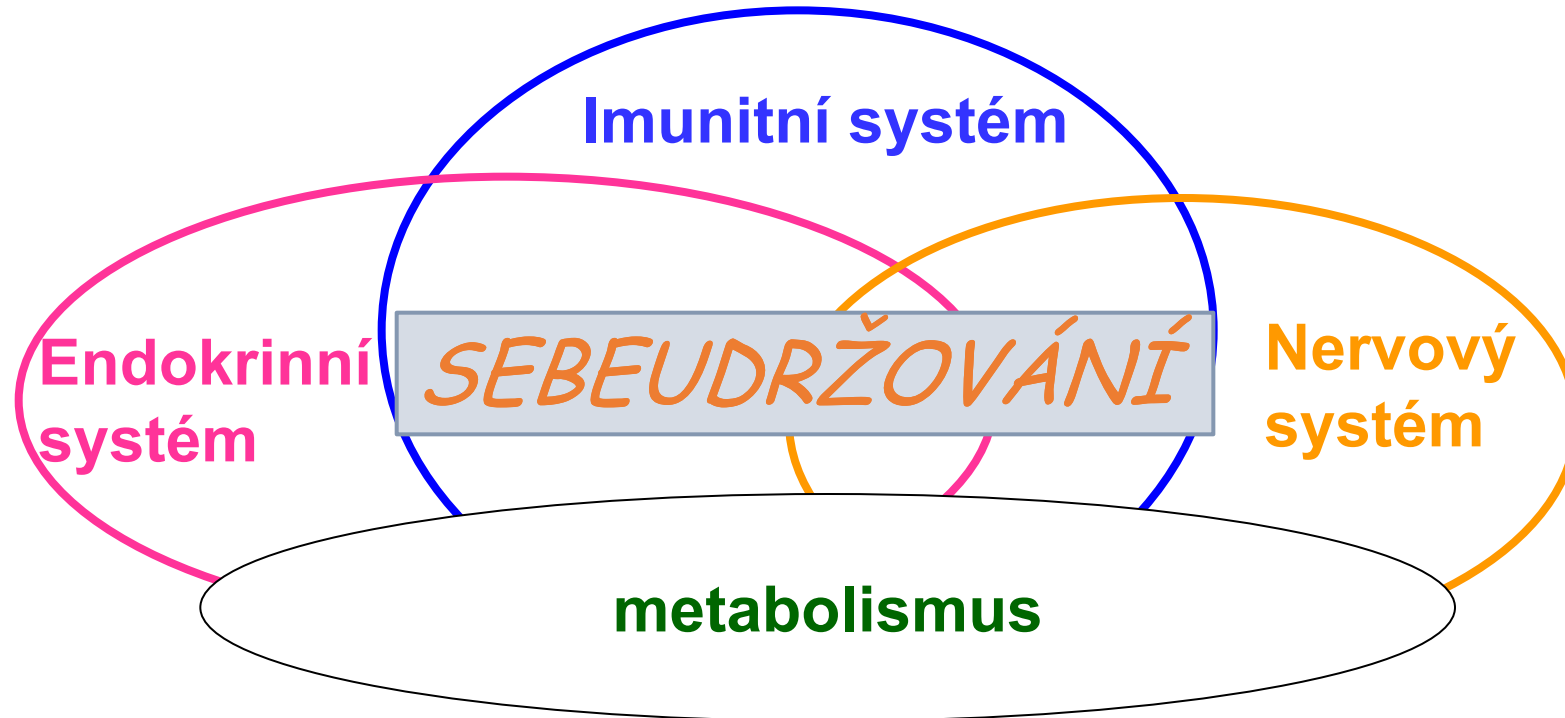
# Trendy v imunologii 2019

**J. Lokaj**

**ÚKIA LF MU Brno**

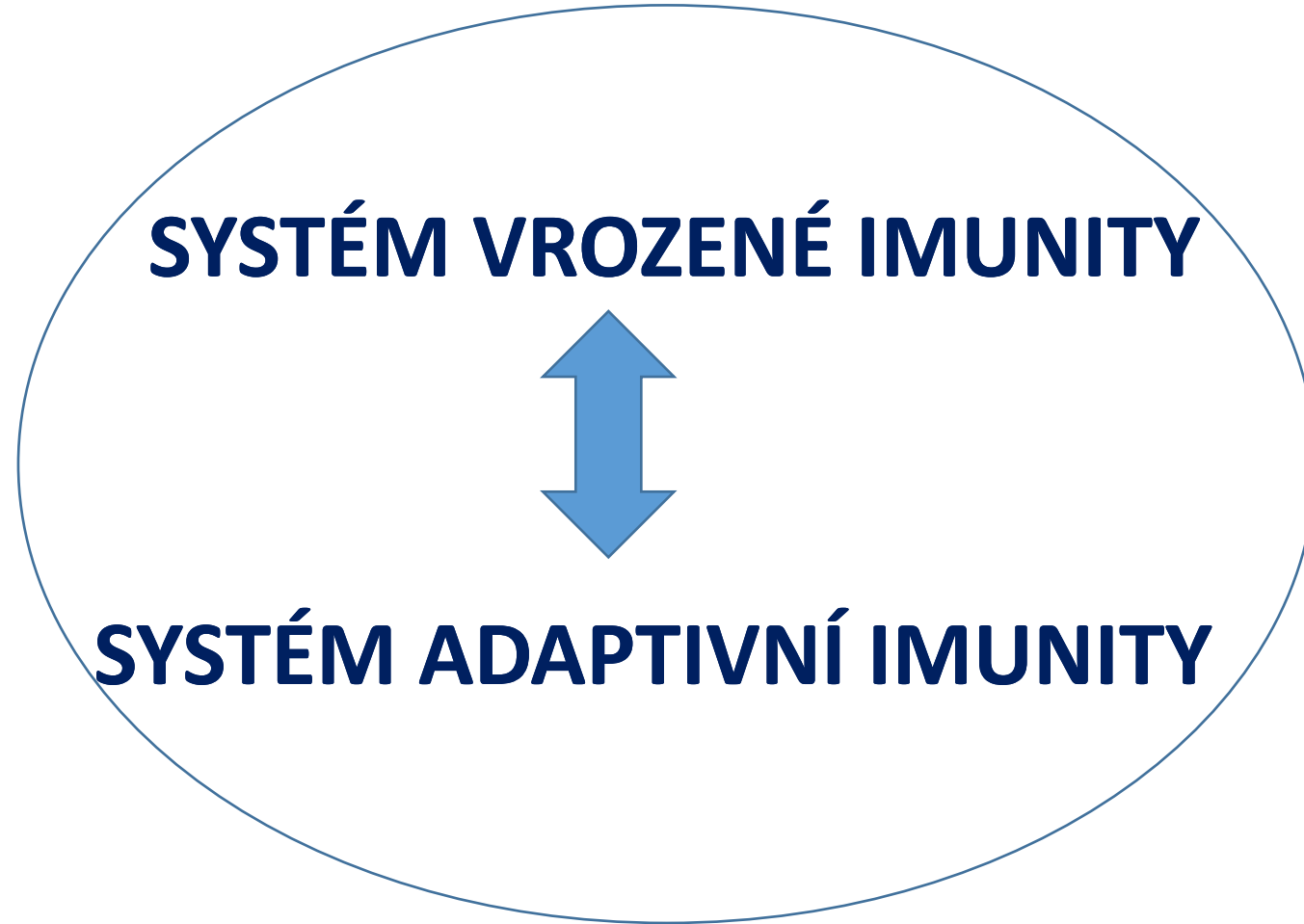
*(18. 11. 2019)*

# Lidský genom a Mikrobiom



**Faktory prostředí a životní styl**  
**Mikroorganismy**

# Imunitní systém člověka

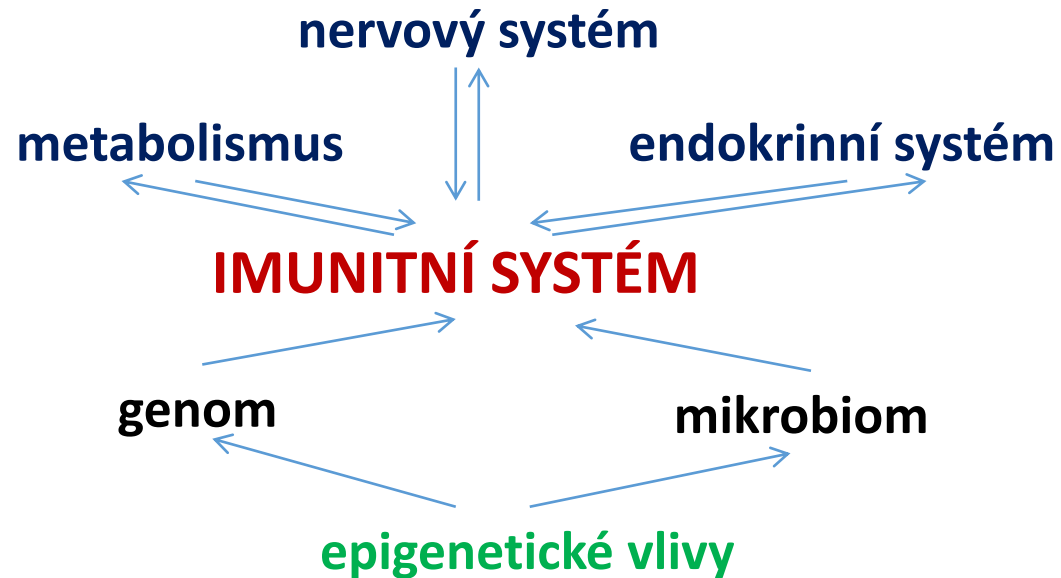


**Imunitní mechanismy  
zajišťující vrozenou a adaptivní imunitu**

**jsou integrovány,  
doplňují se a jsou na sobě závislé,  
tvoří funkční celek**

*Koncepce spojeného, jednotného  
imunitního systému*

***Imunitní systém je součástí  
fyziologického řádu organismu***



# Nové paradigma v imunologii

*Janeway CA, Jr.:*

Approaching the asymptote?

Evolution and revolution in immunology.

*(Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1989;54: 1-13)*

**vrozený imunitní systém poznává (infekční) původ antigenu**

**„*pattern recognition theory*“**

**adaptivní imunitní systém odlišuje specifčnost antigenu**

**„*clonal selection theory*“**

***Jedním z nejvýznamnějších objevů  
v imunologii je průkaz a charakterizace  
receptorů („senzorů“), zakodovaných  
v zárodečné linii.***

**Pattern – recognition receptors (PRR)**

# Receptory vrozené imunity („PRR“)

V cirkulaci, rozpustné, sekretované:

lektin vázající manózu ( MBL)

Na buňkách, membránové:

zprostředkovávající endocytózu ( např. pro manan na makrofázích)

signalizační „Toll-like receptory“, **TLR**

Intracelulární:

„Nucleotide-binding oligomerization domain proteins“, **NOD**

„Retinoic acid inducible gene I“, **RIG**



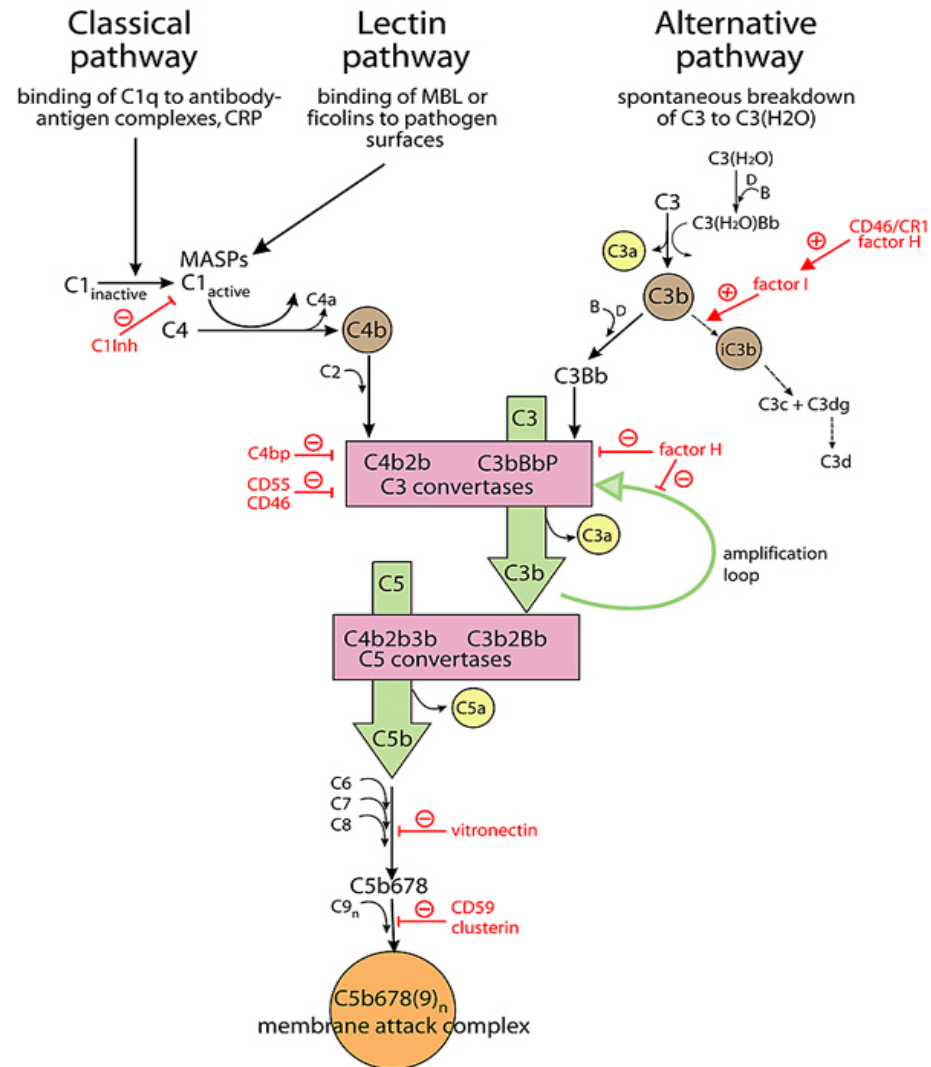
# PRR- Pattern Recognition Receptors

- **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

# Nezapomínejme na „komplement“!

Komplementový systém je archetypový imunosensor („PRR“), který poznává strukturální motivy a signatury mikroorganismů i hostitele, “patterns“, „archetopy“, které spouští kaskádu jeho aktivace.

# Aktivace komplementového systému



# Alternativní dráha aktivace komplementu

## **Properdin jako imunoreceptor:**

Properdin zahajuje aktivaci tím, že se nekovalentně váže na terčové struktury (zymosan, *Neisseria gonorrhoeae*, králičí erytrocyty) pak angažuje solubilní **C3b**

# Lektinová dráha aktivace komplementu

**MBL – MASP – C4–C2–C3 ...**

MBL (manose-binding lectin)

Reaguje především s terminálními zbytky manosy, ale i jiných cukrů, např. N-acetyl-D-glukosaminem.

# Klasická dráha aktivace komplementu

## **C1q -**

imunokomplexy (Fc-Ig)

CRP vázaný na ligand

fosfatidylserin v membráně apoptotických buněk,  
některé viry a G- bakterie

# Vrozená imunita – poznávané struktury: **PAMP**



*C. A. Jeneway Jr, 1989*

## Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP)

()

- stejné pro skupiny mikroorganismů,
- konservované, nevariabilní molekulární „motivy“, „signatury“, „vzorce“, nezbytné pro životnost a patogenitu mikroorganismů,
- odlišné od molekulárních struktur hostitele

*např. lipopolysacharidy, lipopeptidy, peptidoglykany, manosa povrchových struktur bakterií a hub, nemetylované motivy CpG charakteristické pro bakteriální DNA, dsRNA representující strukturální signaturu RNA-virů*

# Vrozená imunita – poznávané struktury: **DAMP**



*Polly Celine Eveline Matzinger, 1994*

## Danger, Damage-Associated Molecular patterns (DAMP)

*endogenní molekulární struktury hostitele uvolňované při apoptóze nekróze, poškození buněk*

HMGB1 (high mobility group box 1)

eCIRP (extracellular cold-inducible RNA-binding protein)

Histony

ATP,

Kyselina močová

Jaderná i mitochondriální DNA

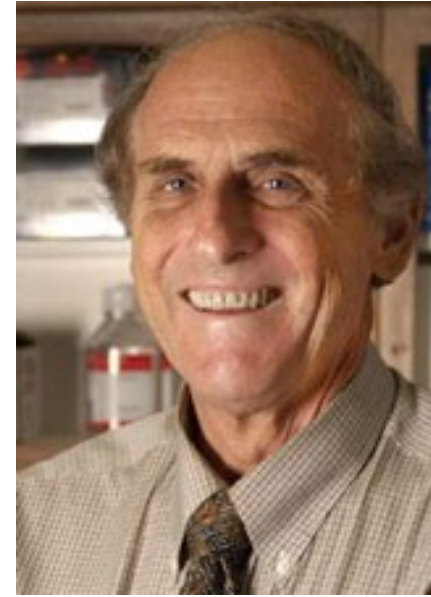




Bruce A. Beutler



Jules A. Hoffmann



Ralph M. Steinman

## **The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2011**

for the discoveries concerning the activation of innate immunity  
(Beutler, Hoffmann),  
for the discovery of the dendritic cell and its role in adaptive immunity  
(Steinman)

## Tři fáze imunitní reakce

- Neindukovaná, nespecifická reakce

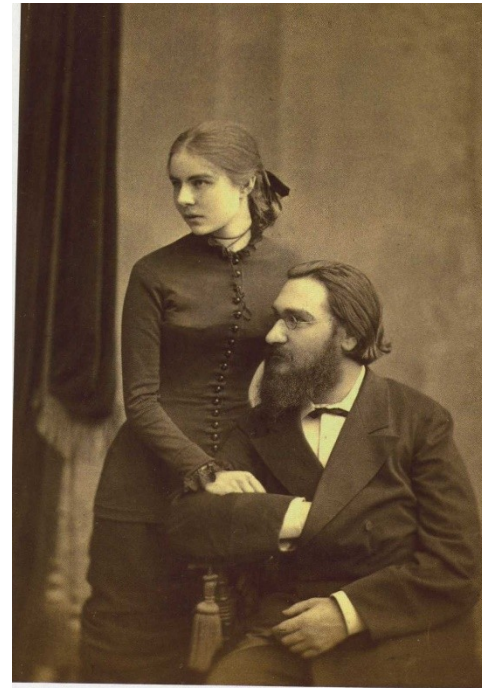
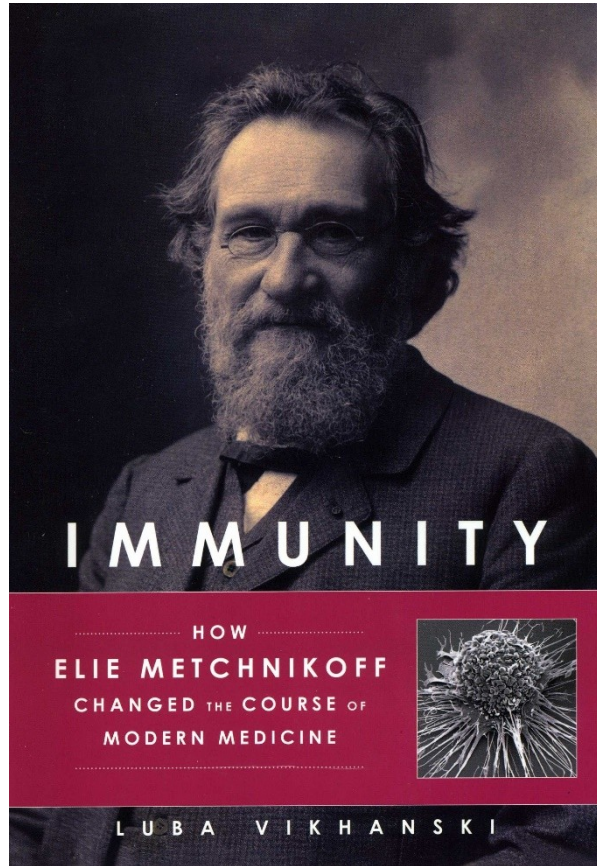
Bezprostřední, během 0-4 hodin:  
preformované faktory (kožní a slizniční bariéry, pH, lysozym a jiné enzymy)

- Indukovaná, omezeně specifická reakce

Odvíjí se během 4- 96 hodin: aktivace komplementového systému, fagocytóza, cytotoxicita, *zánětlivá reakce*

- Indukovaná adaptivní reakce-specifická

po 96 hodinách: tvorba protilátek, efektorové lymfocyty T (Tc, Th)

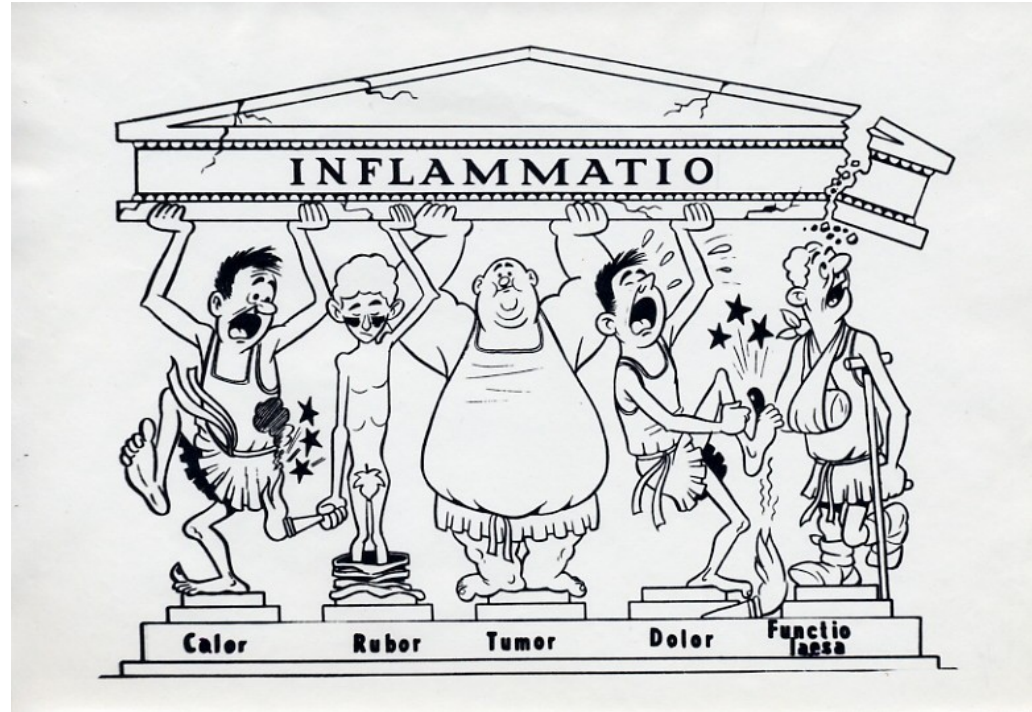


Metchnikoff and Olga in the late 1870s or early 1880s.  
© Archive of the Russian Academy of Sciences (584.2.254)

# Zánět

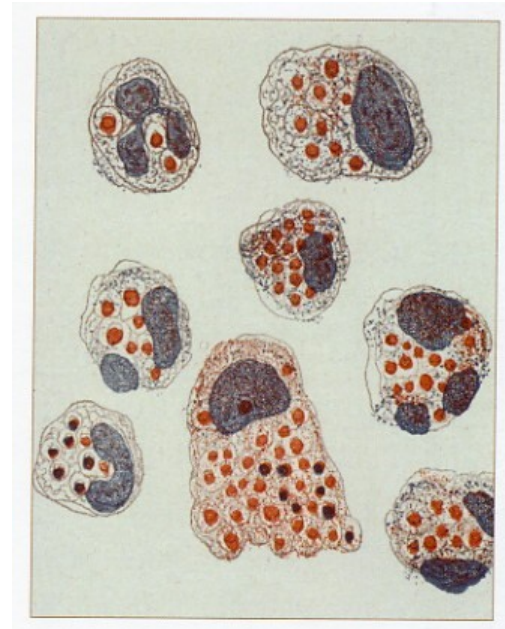
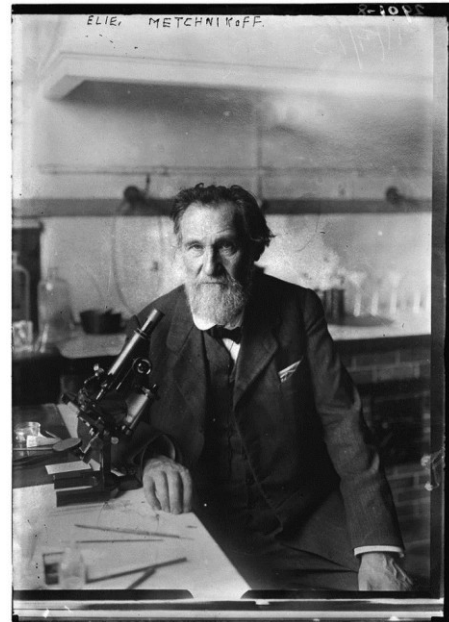
- základní, geneticky zakonzervovaná, obranná reakce mnohobuněčných organismů na infekční i jiné podněty, součást efektorových mechanismů adaptivní imunity.
- stereotypní v průběhu (*induktory – sensory – mediátory – efekty*).
- univerzální ve svém směřování (*cílem je aktivovat děje, které směřují k likvidaci škodliviny, ale současně i k obnově poškozených struktur a funkcí*).
- při nadměrné aktivaci nebo abnormální regulaci dochází k poškození vlastních buněk, tkání, orgánů, systémů; zánět pak chorobnou změnu přímo vyvolává nebo k ní přispívá.

# Klasické projevy zánětu



**Aulus Cornelius CELSUS, Rudolf VIRCHOW**

*„bloudivé buňky mesodermální pohlcují jak zbytečné části samotného těla živočichů, tak cizí tělesa, která pronikla zvenku nebo, je-li to nemožné, aspoň je obklopují a zadržují“ (I.I.Mečnikov)*

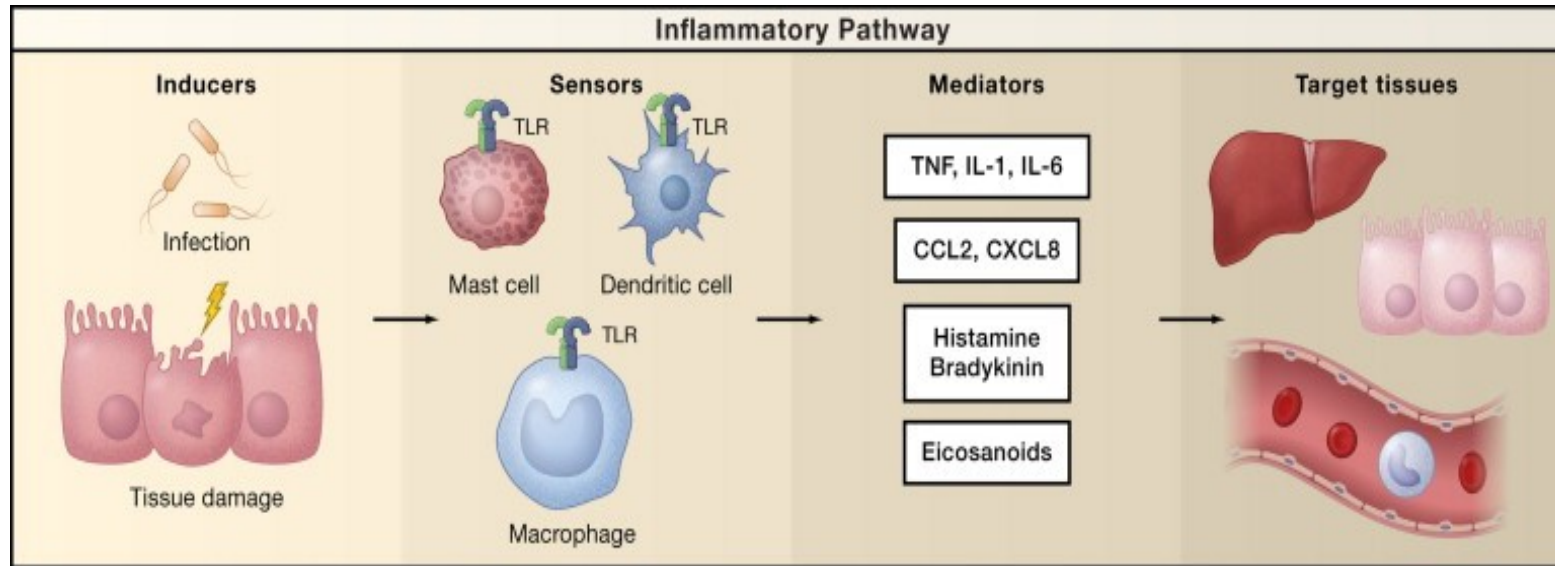


**Fagocyty: makrofágy a mikrofágy**

# Mečnikovova koncepce „fyziologického zánětu“

- Zánět je způsobem a zárukou udržování identity a integrity organismu.
- Organismus je „dysharmonickou entitou“ a musí se snažit dosáhnout stavu „harmonie“, jejímž výrazem je zdraví.
- Harmonizujícím procesem je fyziologický zánět, výkonnými buňkami jsou fagocyty.

R.Medzhitov: Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame





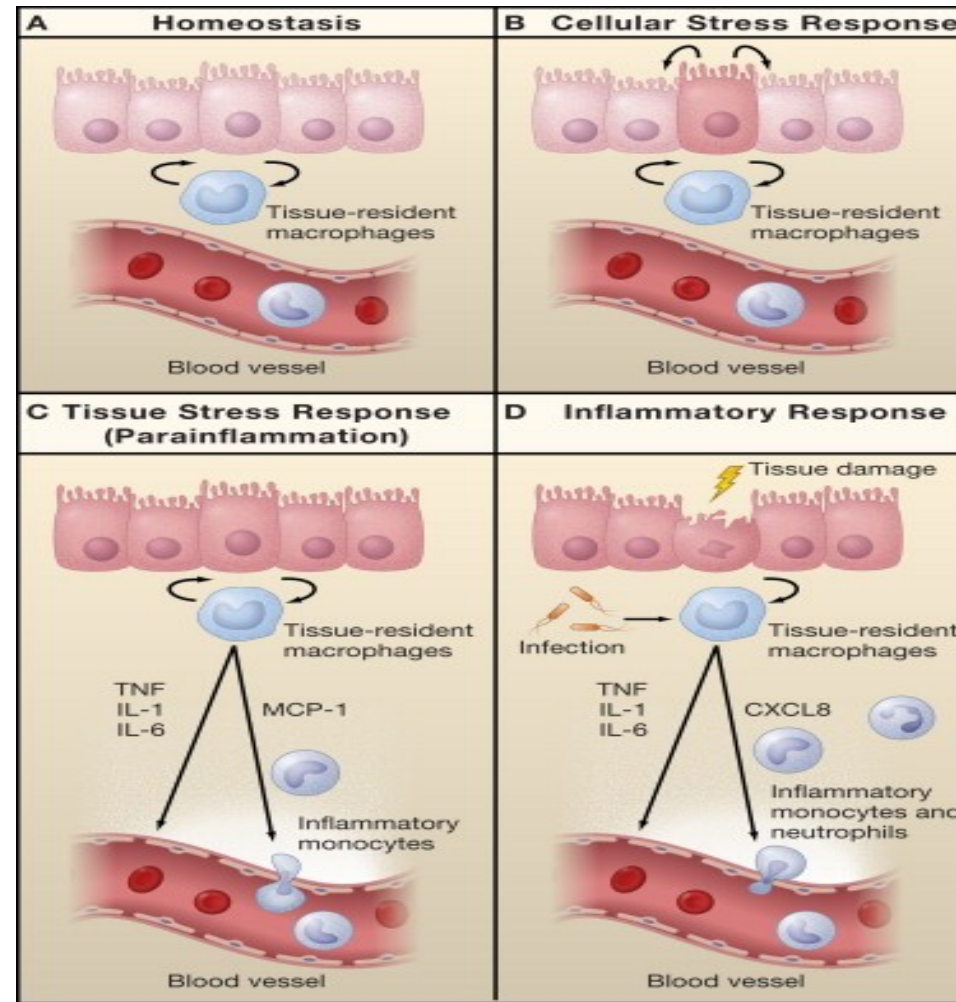
# Zánětlivá reakce při udržování stálosti vnitřního prostředí organismu

- Fyziologický stav tkáně: **homeostáza**
- Stres, malfunkce: **parainflamace**
- Poškození, infekce: **inflamace**

*(Medzhitov, R: Nature 2008; 454: 428-435)*



Ruslan Medzhitov,  
původem Taškent, Uzbekistan,  
žák prof. Janewaye



# Molekulární podstata rozvoje zánětu

- **INFLAMASOM**

multiproteinový komplex tvořený NLRP3 (PRR), adaptorovým proteinem ASC a proteolytickým enzymem, kaspázou-1, aktivujícím IL-1beta a IL-18

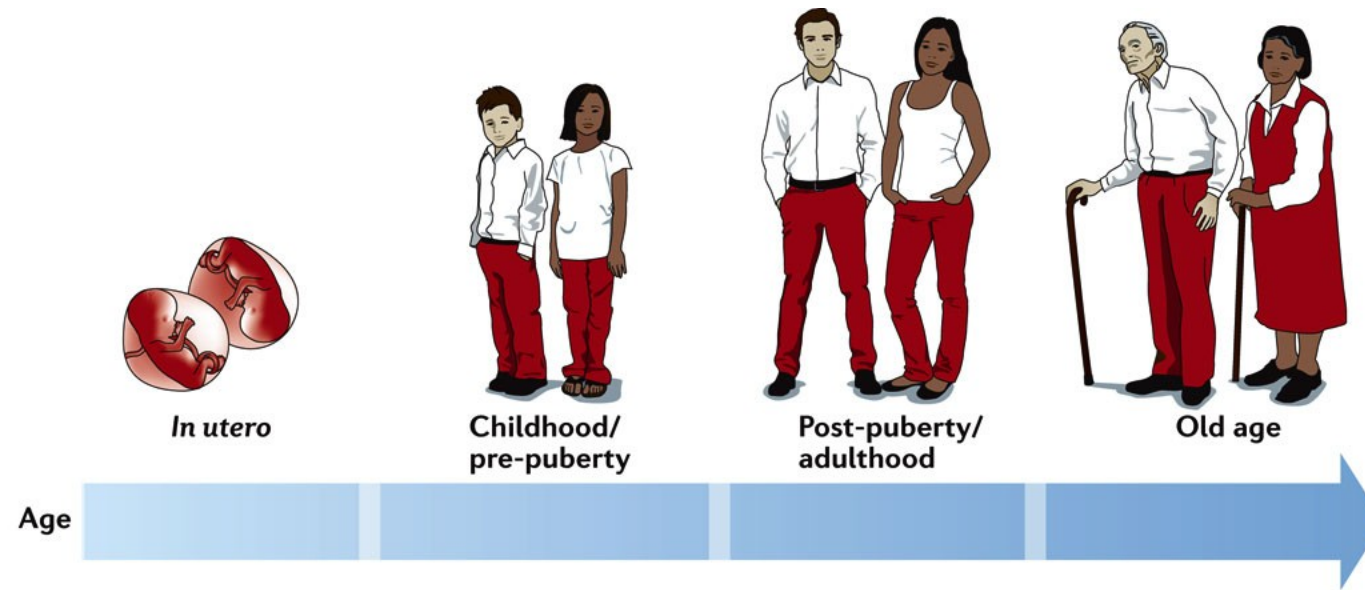
- **KOMPLOSOM**

intracelulární složky komplementu (C3, C3a, C5, C5a, C3aR, C5aR), interagují s inflamasomem

*Arbore G, Kemper C, Kolev M:*

*Intracellular complement – the complosome – in immune regulation.*

*(Molecular Immunology 2017; 89: 2-9)*



<b>Innate immunity</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased inflammatory responses in males</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Inflammation in males</li> <li>↑ NK cells in males</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Inflammation in females</li> <li>↑ NK cells in males</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Inflammation in males</li> <li>↑ IL-10 in females</li> <li>↑ NK cells in females</li> </ul>
<b>Adaptive immunity</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increased IgE levels in males</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD4/CD8 ratios and CD4<sup>+</sup> T cell numbers equal</li> <li>• CD8<sup>+</sup> T cell numbers equal</li> <li>• IgA levels in males ≥ females</li> <li>• IgM levels in males ≥ females</li> <li>• IgG and IgM levels equal</li> <li>• B cell numbers equal</li> <li>• T<sub>reg</sub> cell numbers in males ≥ females</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD4/CD8 ratios and CD4<sup>+</sup> T cells ↑ in females</li> <li>• CD8<sup>+</sup> T cells ↑ in males</li> <li>• T cell activation/proliferation ↑ in females</li> <li>• T<sub>reg</sub> cells ↑ in males</li> <li>• B cells ↑ in females</li> <li>• Immunoglobulins ↑ in females</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CD4/CD8 ratios and CD4<sup>+</sup> T cells ↑ in females</li> <li>• CD8<sup>+</sup> T cells ↑ in males</li> <li>• T cell activation/proliferation ↑ in females</li> <li>• T<sub>reg</sub> cells ↑ in males</li> <li>• B cells ↑ in females</li> <li>• Immunoglobulins ↑ in females</li> </ul>

# IMUNITA VE STÁŘÍ

**Biologický proces stárnutí je provázen poklesem imunity, zvýšeným výskytem běžných infekčních nemocí, vyšší prevalencí maligních nádorů, chorob autoimunitních a chronických, slabší odpovědí při vakcinaci.**

***Odhaduje se, že v roce 2050 bude v rozvinutých zemích 25% lidí nad 65 let; světová populace dosáhne počtu 9 miliard.***



# IMUNOSENESCENCE

S věkem imunitní systém postupně chřadne. Podstatou „**imunosenescence**“ je dysregulace imunitního systému, na níž se podílí involuce primárních imunologických orgánů i vnitřní defekty tvorby, zrání, migrace, homeostázy buněk imunity a jejichž příčinou jsou i změny epigenetické

Stárnutí je spojeno s chronickým prozánětlivým stavem („**inflammaging**“).

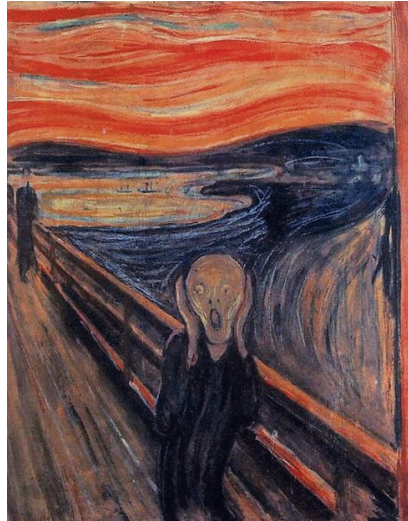
# Inflammaging

- Charakteristický znak imunosenescence
- Chronický, mírný, sterilní zánět
- Zvýšení pro- (*IL-6, TNF alfa, IL-1 beta*) i proti-(*IL-10*) zánětlivých cytokinů,  
tvořených především mononukleárními fagocyty, ale též buňkami svalové a tukové tkáně a v neposlední řadě starými buňkami s charakteristickým, se senescencí asociovaným sekrečním fenotypem.

*(Franceschi et al: Ann NY Acad Sci 2000; 908: 244- 254*

*Franceschi et al: Trends Endocrinol Metab 2017; 28: 199-212)*

# Autoinflamace



Edward Munch:  
„The Scream“  
1893–1910

Horror

autoinflammaticus

*McDermott MF et al.: (Cell 1999; 97: 133- 144)*

*Manthiram K et al.: The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation (Nature Immunology 2017; 18: 832- 842)*

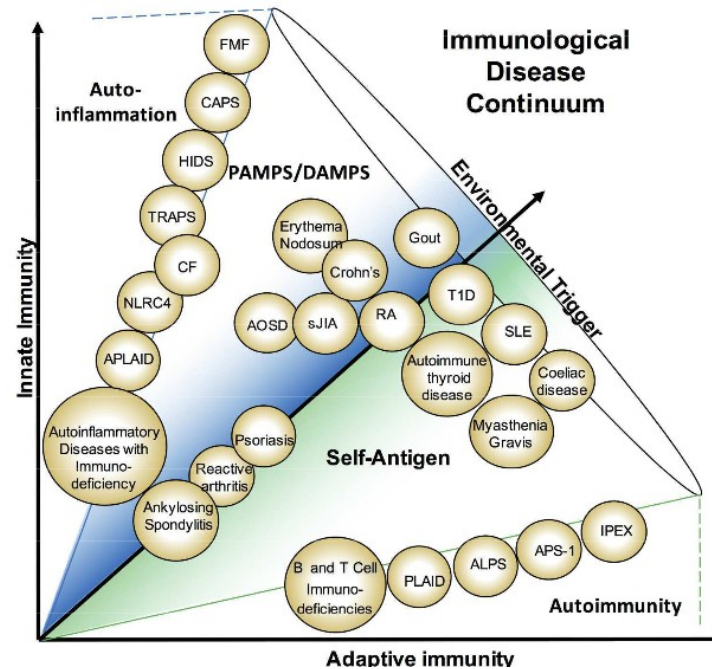


# Autoinflamační syndromy

- Poruchy s abnormálně zvýšenou zánětlivou reakcí, které jsou zprostředkovány především buňkami a molekulami systému vrozené imunity u predisponovaných organismů
- Jsou důsledkem nadměrné produkce anebo biologické aktivity zánětlivých mediátorů (především IL-1beta) nebo chybění endogenních inhibitorů.
- *Př.: familiární horečka středozemního moře, kryopyrinopatie, hyperimmunoglobulinemie D, syndromy periodických horeček....*

# Autoinflamace a autoimunizace v patogenéze chorob

(Peckham D et al.: The burgeoning field of innate immune-mediated disease and autoinflammation. J Pathol 2017; 241: 123 – 139)



Dochází v systému vrozené imunity  
k adaptivním změnám?  
Existuje paměť i na úrovni vrozené imunity?



Jaroslav Šterzl 1925-2012

*„Adaptivní změny jsou vázány s obecnou schopností biologických systémů zapamatovat*

*prožitou zkušenost a účinněji reagovat na opakované podněty kvantitativní i kvalitativní změnou“.*

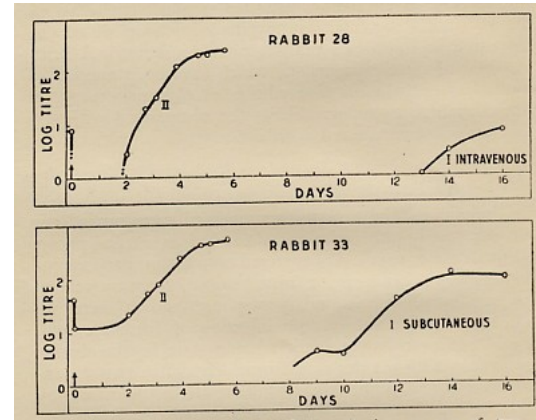
*Jaroslav Šterzl: Imunitní systém a jeho fyziologické funkce  
(Česká imunologická společnost, Praha, 1993)*

# Imunologická paměť

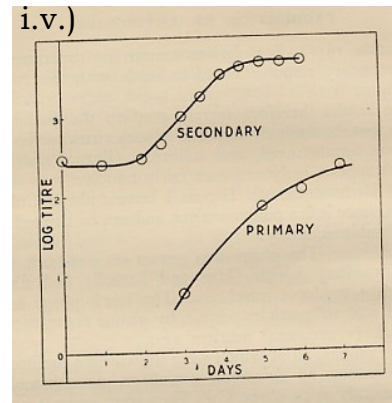


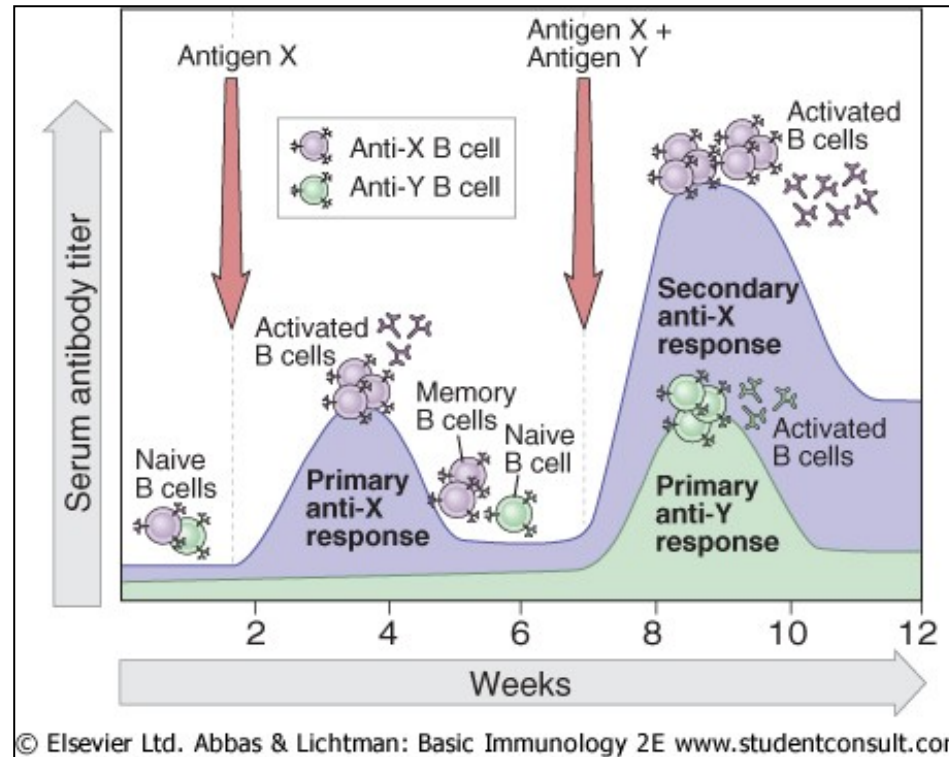
F.M. Burnet, F. Fenner:  
**The production of antibodies**  
(Macmillan, Melbourne, 1949)

## *Staphylococcal toxoid*



## *Phage C16* (rabbit – i.v.)





# Paměť lymfocytů B

## Aktivace lymfocytů B:

v lymfoidních folikulech sekundárních lymfatických orgánů se diferencují krátce žijící plasmatické buňky, které se dostávají do kostní dřeně a do sleziny, kde tvorí a produkují specifické protilátky

v zárodečných centrech lymfatických orgánů se zároveň formují buňky paměťové. Především to jsou dlouho žijící plasmatické buňky, které se dostávají do kostní dřeně a kontinuálně tvoří protilátky. Druhým typem paměťových buněk jsou centrální paměťové buňky, které zůstávají v sekundárních lymfatických orgánech, mírně proliferují, netvoří protilátky, ale mohou nahrazovat hynoucí dlouho žijící plasmatické buňky a po setkání se specifickým antigenem rychle přecházejí do stadia krátce žijících plasmatických buněk.

# Paměť lymfocytů T

## Aktivace lymfocytů T:

- naivní T-lymfocyty jsou aktivovány, prolifерují a diferencují se jako efektorové lymfocyty T, které v tkáních působí proti specifickému antigenu jednak přímo, jako cytotoxické lymfocyty T, jednak nepřímo, prostřednictvím cytokinů; asi 90% z nich pak podlehne apoptóze
- některé z efektorových lymfocytů T zůstávají v tkáních v blízkosti místa vniku antigenu, jsou schopny rychlé reaktivace, proliferace a účinku – označují se jako efektorové paměťové buňky.
- část z aktivovaných T-lymfocytů zůstává v sekundárních lymfatických orgánech jako tzv. centrální paměťové buňky T. Po opakovaném střetu s antigenem jsou rychle aktivovány, prolifерují a diferencují se v efektorové elementy, některé v lymfatických orgánech zůstávají.

# Vlastnosti adaptivních paměťových buněk

- Množství antigen-specifických paměťových buněk je asi tisíckrát vyšší než původních (z  $1:10^6$  na  $1:10^3$ )
- Paměťové buňky T i B jsou snadněji aktivovatelné
- Paměťové buňky B nesou isotypový přesmyk (IgM-IgG, IgA, IgE) a jejich receptory vykazují vyšší afinitu způsobenou somatickou hypermutací
- V populaci buněk T není ekvivalent dlouho žijících paměťových buněk B
- Receptory buněk T nepodléhají somatickým hypermutacím

***Paměť adaptivního imunitního systému je „osobní“:  
každý z nás si zapamatoval jen to, s čím se setkal***



**Obsah a rozsah pojmu „*imunologická paměť*“ se vyvíjí –  
imunologická paměť se netýká pouze adaptivní imunity,  
jisté rysy paměti lze vidět i u imunity vrozené.**

*Farber DL, Netea MG, Radbruch A, Rajewsky K, Zinkernagel RM:*

***Immunological memory: lessons from the past and a look to the future***

*(Nature Reviews Immunology 2016; 16: 124 -128)*

---

Chester KS: The problem of acquired physiological immunity in plants. (Q Rev Biol 1933; 8: 275 - 324)

# Existuje paměť i na úrovni vrozené imunity?

*Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms*

Quintin J, Shin-Chin Cheng, van der Meer JWM, Netea MG: *Curr Opin Immunol* 2014; 29: 1-7

- Reakce vrozeného imunitního systému má adaptivní charakteristiky, které jsou funkčně ekvivalentní klasické imunologické paměti („*trained immunity*“)
- Základními mechanismy se jeví epigenetické modifikace histonu a modifikace buněčných receptorů (PRR).
- Projevuje se na úrovni mononukleárních fagocytů a buněk NK.

# „Paměťové stopy“ v systému vrozené imunity

Trained immunity    Innate immune memory    Inflammatory memory

Hromadí se důkazy, že buňky systému vrozené imunity (makrofágy, buňky NK) po infekci nebo vakcinaci mění své funkční programy; vykazují vyšší a dlouhodobější odpovědávost na sekundární stimuly. Tedy i komponenty systému vrozené imunity mají adaptivní schopnosti.

Tyto vlastnosti jsou podmíněny jejich epigenetickým reprogramováním po stimulaci exogenními i endogenními faktory.

Biologický význam: např. nespecifické protekční účinky (vakcinací), poškozující důsledky nepatříčné aktivace (imunologická paralýza, autoinflamační procesy, ateroskleróza).

# *Jen ten uvidí budoucnost, kdo vystoupí na vrchol minulosti*

**Antoine de Saint-Exupéry**  
Celková mortalita ve skupině 20 000 dětí v prvních čtyřech letech života byla nižší u dětí imunizovaných BCG než u neimunizovaných. Uvažovalo se o tom, že BCG indukuje „nespecifickou imunitu“.

*(Näslund C, 1932)*

Infekce určitými mikroorganismy často vede i k navození rezistence proti jiným, nepříbuzným mikrobům *(Lurie, 1942, Suter 1953, Elberg 1960)*.

Zvýšená odolnost experimentálních zvířat po infekcích určitými bakteriemi je způsobena získanou schopností fagocytů destruovat mikroorganismy.

*Mackaness GB: The immunological basis of acquired cellular resistance.*

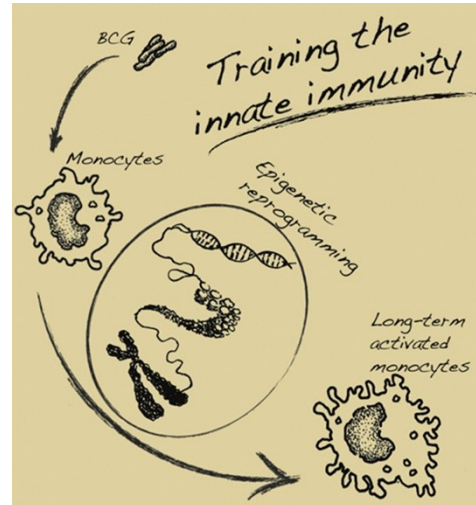
*(J exp Med 1964; 120: 105 – 120)*

**Význam „heterologního“, „nespecifického“ „necíleného“ účinku vakcín je v současné době studován i pod záštitou WHO (*Working group on nonspecific effects of vaccines*). Pozornost je věnována živým atenuovaným mikrobům (BCG, virus spalniček a poliomyelitidy).**



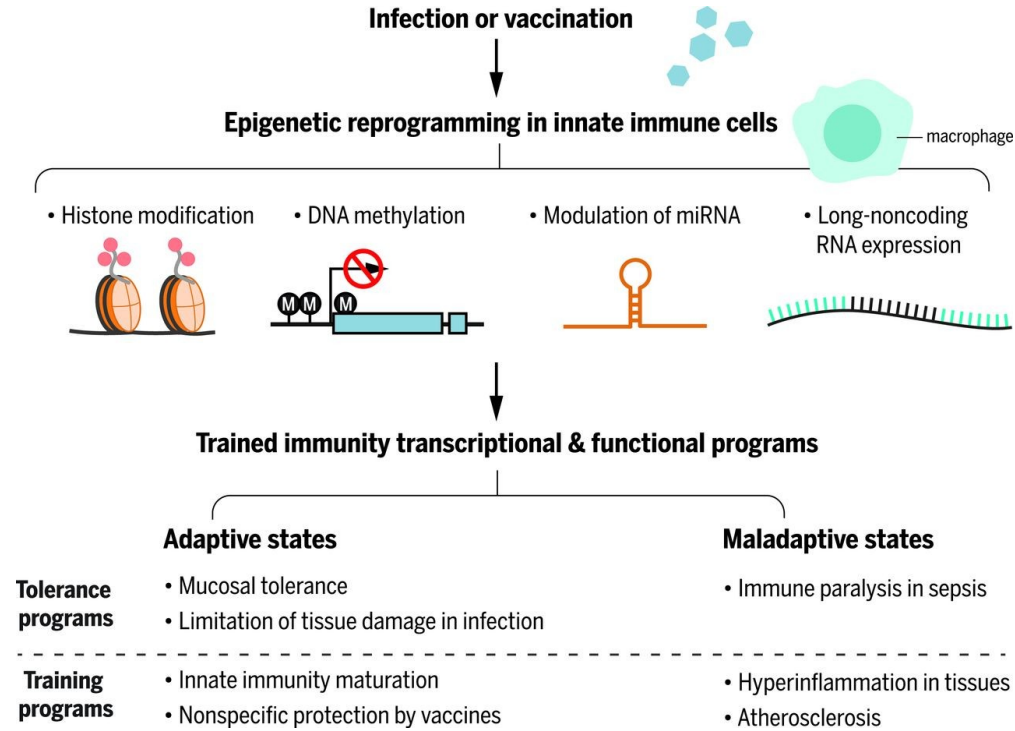
Prof. Mihai G. Netea  
Radboud University,  
Nijmegen, The Netherlands

**Netea MG, Quintin J, Van der Meer JWM:**  
**Trained immunity: a memory for innate host defense.**  
(*Cell Host Microbe* 2011; 9: 355 – 361)



**Netea MG, van der Meer JWM:**  
**Trained immunity: an ancient way of remembering**  
(*Cell Host Microbe* 2017; 21: 297 -300)

Innate immune activation by infections or vaccinations leads to histone modifications and functional reprogramming of cells (such as monocytes, macrophages, or NK cells) termed **“trained immunity”** or **“innate immune memory.”**



*Mihai G. Netea et al. Science 2016*



**System vrozené imunity má schopnost adaptačních změn, které, na rozdíl od adaptivní imunity, neznamenají nutnost genetické rekombinace, ale spočívají v epigenetické remodelaci, která ovlivňuje genetický profil aniž by došlo ke změně sekvence DNA.**

**Adaptační změny („trénink“) byly popsány u profesionálních fagocytů, buněk NK, ILC2, dendritických, endotelových a fibroblastových buněk stromatu, kmenových buněk epitelu, ale i u hematopoetických prekursorových buněk kostní dřeně, stimulovaných bakteriemi (BCG),  $\beta$ -glukanem, ale též oxLDL.**



**Výzkumné projekty INTRIM**  
*(International Trained Immunity Consortium)* jsou zaměřeny na infekce (tbc, malarie, mykózy), vakcinaci (heterologní účinky vakcinace), autoinflamaci, aterosklerózu, imunosenescenci, nežádoucí účinky chemoterapie nádorů (hematopoetické a progenitorové buňky kostní dřeně).

# **Komplementový systém starobylý pilíř imunity**

## Václav Tomášek: Bakteriologie

(Vysokoškolské rukověti, řada spisů lékařských ,  
Melantrich, 1938)

„Komplement jest součást normálních sér živočišných vyznačující se tím, že se váže na sensibilisované antigeny a rozpouští je, jsou-li k tomu způsobilé. Schopnost *fixace* jest obecnou vlastností komplementu, schopnost *lysy* jest účinek speciální. Podle povahy rozpuštěného antigenu rozeznává se účinek *hemolytický* a *bakteriolytický*. Jest pravděpodobno, že funkcí komplementu jsou ještě jiné účinky sera, např. účinek *opsonisační* záležející v tom, že serum připravuje bakterie k fagocytose. Komplement je činitel nespecifický, je obsažen v seru normálním a jeho účinnosti nepřibývá v průběhu imunisace.“

# Fyziologie komplementového systému

**mikrobicidní účinky**

**zánětotvorné působení**

**regulace adaptivní imunity**

**ovlivňování buněk, orgánů a systémů**



# Evoluční aspekty komplementového systému a hemostázy

Hlavní proteolytické kaskády krve – komplement a koagulace – začínají v evoluci společně.

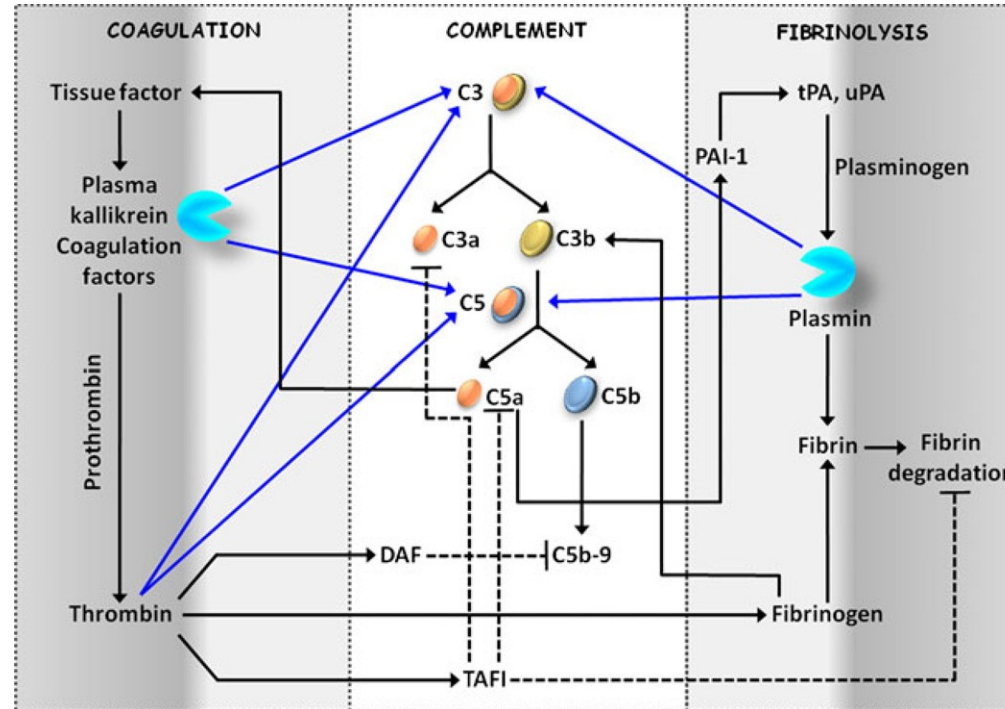
Např. „živá fosilie“, charakteristický členovec, podkovovitý krab z doby před 500 miliony lety, využívá integrovaného systému koagulace a komplementu k zábraně vykrvácení i k obraně proti infekci.

# Evoluční aspekty

V průběhu vývoje došlo k rozdílnosti:

savci reagují na poranění a nebezpečí vykrvácení aktivací hemostázy, zatímco antimikrobiální obrana je zprostředkována imunitními mechanismy vrozenými a později adaptivními. Přesto řada pozorování svědčí, že hemokoagulace a aktivace trombocytů má stále vztah k obraně protiinfekční, že některé původní funkce zůstávají zachovány.

# Komplement – koagulace – fibrinolýza



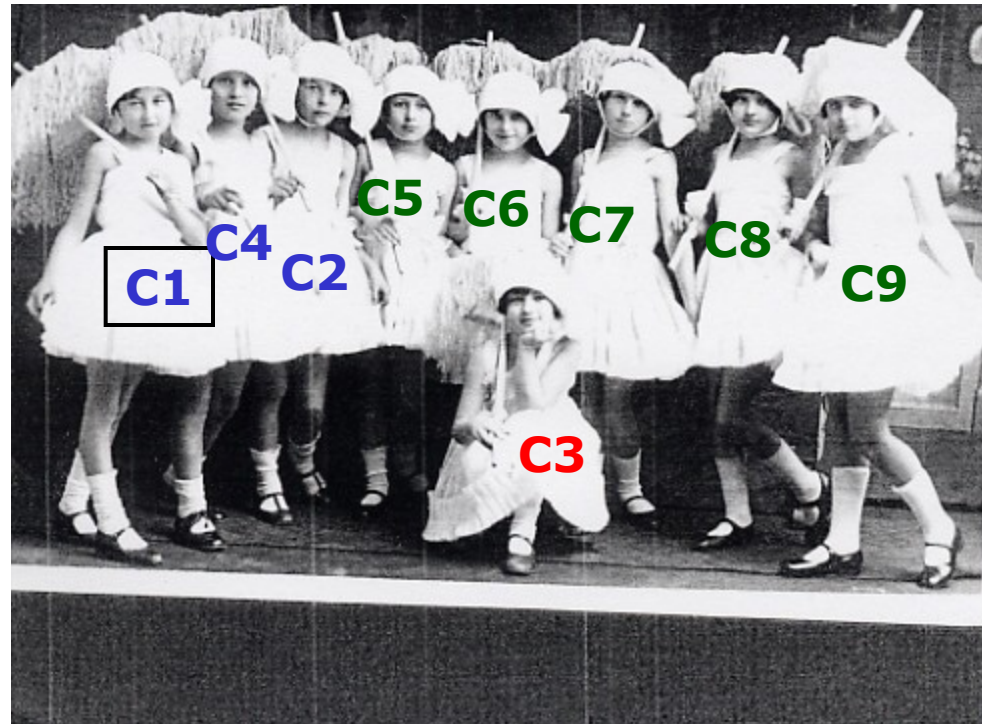
# Komplementový systém

## základní složky

**Properdin**

**Faktor B**

**Faktor D**



**MBL**

**Ficolin L,H,M**

**MASP 1,2,3**

**Regulační proteiny komplementu**

**Receptory pro komplement**



# Komplementový systém (regulační proteiny komplementu)

## Solubilní

- C1 INH** (váže se na C1r a C1s oddělující je od C1q)
- Faktor I** (štěpí C3b a C4b využívá faktoru H, C4BP, MCP a CR1 jako kofaktorů)
- Faktor H** (váže C3b a vyřazuje Bb)
- C4BP** (C4-binding protein, váže C4b C-3 konvertázu AP) a vyřazuje C2)
- Properdin** (stabilizuje
- Vitronectin** (brání vazbě C5b-9 na membrány a polymerizaci C9)
- Clusterin** (brání vazbě C5b-9 na membrány a polymerizaci C9)
- Karboxypeptidáza N** (inaktivuje C3a a C5a, štěpí C-term. arginin)

# Komplementový systém (regulační proteiny komplementu)

## Vázané na membrány buněk

- CR1-CD35** (urychluje rozklad CP i AP C3-konvertáz)
- MCP-CD46** (membrane cofactor protein – kofaktor pro I)
- DAF-CD55** (decay accelerating factor, urychluje rozklad CP i AP C3- a C5- konvertáz )
- Protectin-CD59** (blokuje vazbu C9 a brání tvorbě MAC)
- CR1g** (váže se na C3b a inhibuje AP C3 a C5 konvertázy)

# Komplementový systém

## (receptory pro komplement – CR)

- CR1** (CD35) – vazba C3b a C4b, transport a klírens imunokomplexů, fagocytóza
- CR2** (CD21) – vazba C3d, C3dg, iC3b, CD23, IFN $\gamma$ , EBV, aktivace B- lymfocytů
- CR3** (CD11b/CD18) – vazba iC3b, ICAM-1, LPS, fibrinogenu, koagulačního faktoru X, mikrobiálních proteinů; fagocytóza
- CR4** (CD11c/CD18) – vazba iC3b, fibrinogenu; fagocytóza
- CR1g** – vazba C3b, iC3b, C3c; fagocytóza, inhibice aktivace T- lymfocytů

# Komplementový systém

(receptory pro komplement – CR)

**C1qRp** (CD93) - fagocytóza

**cC1qR** (calreticulin) – fagocytóza, respirační vzplanutí,  
odstraňování apoptotických buněk

**gC1qR** – chemotaxe

**C3aR** – prozánětlivá aktivace

**C5aR** (CD88) – prozánětlivá aktivace

# Komplement jako imunoreceptor

## Klasická dráha aktivace

### C1q –

imunokomplexy (Fc-Ig)

CRP vázaný na ligand

fosfatidylserin v membráně apoptotických buněk,

některé viry a G- bakterie

**C1 r,s – C4-C2-C3 ...**

# Komplement jako imunoreceptor

## Lektinová dráha aktivace

### **MBL** – MASP – C4–C2–C3 ...

MBL (manose-binding lectin) reaguje především s terminálními zbytky manosy, ale i jiných cukrů, např. N-acetyl-D-glukosaminem.

### **Ficoliny** – MASP1,2,3 – C4–C2–C3 ...

jsou receptory pro acetylové skupiny cukrů

# Komplement jako imunoreceptor

## Alternativní dráha aktivace

### **Standardní model:**

Aktivace je zahájena kovalentní vazbou **C3b**, který je tvořen spontánní hydrolysou thioesterové vazby C3, na proteinové, sacharidové, lipidové struktury mikroorganismů i na jiné povrchy.

### **Properdin jako imunoreceptor:**

Properdin zahajuje aktivaci tím, že se nekovalentně váže na terčové struktury (zymosan, *Neisseria gonorrhoeae*, králičí erytrocyty) pak angažuje solubilní **C3b**

*(Spitzer D et al. J Immunol 2007; 179: 2600-2608)*

# Čtvrtá cesta aktivace komplementu?

## Aktivace C5 trombinem

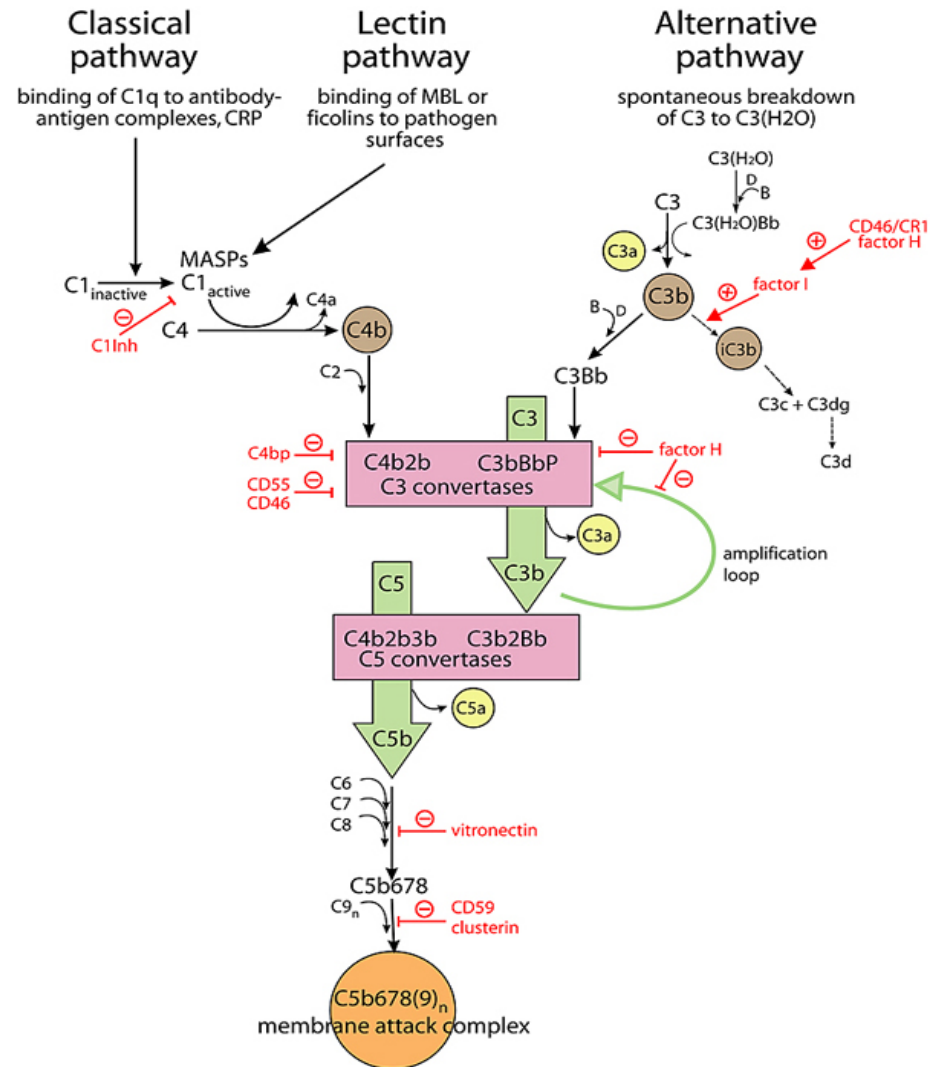
- Byla prokázána v experimentu na „C3-knock-out myších“, u nichž se netvoří C3-konvertáza.
- Inkubace trombinu s lidským C5 vede k tvorbě C5a.

*Huber –Lang M et al.:*

*Generation of C5a in the absence of C3:  
new complement activation pathway  
(Nat Med 2006; 12: 682-687)*



# Aktivace komplementového systému



# C5a, C3a, C4a: „anafylatoxiny“

*C5a je 20x účinnější než C3a a 2500x účinnější než C4a*

degranulace mastocytů a basofilů

chemoatraktans (hlavně neutrofilů)

zvyšují expresi CR3 na neutrofilech a ICAM-1 na endotelu

stimulace degranulace a respirační vzplanutí neutrofilů

zvýšení exprese adhezních molekul a makrofázích,

zvýšení sekrece IL-1 a IL-6

stimulace proliferace aktivovaných lymfocytů T

# Komplement a angiogenéze

- **Vaskulární endotelové růstové faktory (VEGF) a receptory pro ně (VEGFR) mají zásadní roli při tvorbě nových krevních cév i při jejich remodelování.**
- **Jejich tvorbu ovlivňuje i komplementový systém, který může být terčem terapie např. makulární degenerace závislé na věku, retinopatie prematurity, poruch intrauterinního vývoje plodu.**

# Komplement komplikuje graviditu

*(Girardi G et al.: J exp Med 2006; 203: 2165-2175)*

**Porucha vývoje placenty vedoucí k potratu nebo k omezení intrauterinního růstu plodu může být způsobena nadměrnou aktivací komplementového systému : **C5a vede k dysregulaci angiogenních faktorů** (funkční deficience VEGF a zvýšení koncentrace sVEGFR-1).**



# Komplement v patogenéze chorob

- Deficience funkčních proteinů C-systému
- Poruchy regulace aktivace C-systému
- Persistentní aktivace C-systému
- Únik mikroorganismů před účinky komplementu
- Nefunkčnost C-systému u maligních procesů
- CR jsou receptory i pro mikroorganismy a viry

# Vrozené deficience C-systému

(Speth C et al, 2008)

C1	(SLE, bakteriální infekce)	50-100
C4	(SLE, bakteriální infekce)	20-50
C2	(SLE, bakteriální infekce)	> 1000
C3	(bakteriální infekce)	20-50
<u>C1-INH</u>	<u>(hereditární angioedém)</u>	<u>&gt; 10 000</u>
B		0
D	(bakteriální infekce)	< 5
P	(meningokokové infekce)	> 100

# Vrozené deficience C-systému

(Speth C et al, 2008)

H (meningokokové infekce glomerulonefritis MPGN II atypický hemolytický uremický syndrom, věkem podmíněná makulární degenerace)	>100
I (bakteriální infekce)	20-50
Karboxypeptidáza (angioedém, urtika)	<5
C5 (meningokokové infekce)	20-50
C6,C7,C8 (meningokokové infekce)	cca po 100
C9 (meningokokové infekce)	>1000

## Komplementový systém: atraktivní terapeutický terč



*Flexner S, Noguchi H: Snake venom in relation  
to hemolysis, bacteriolysis and toxicity  
(J exp Med 1903; 6: 277-301)*

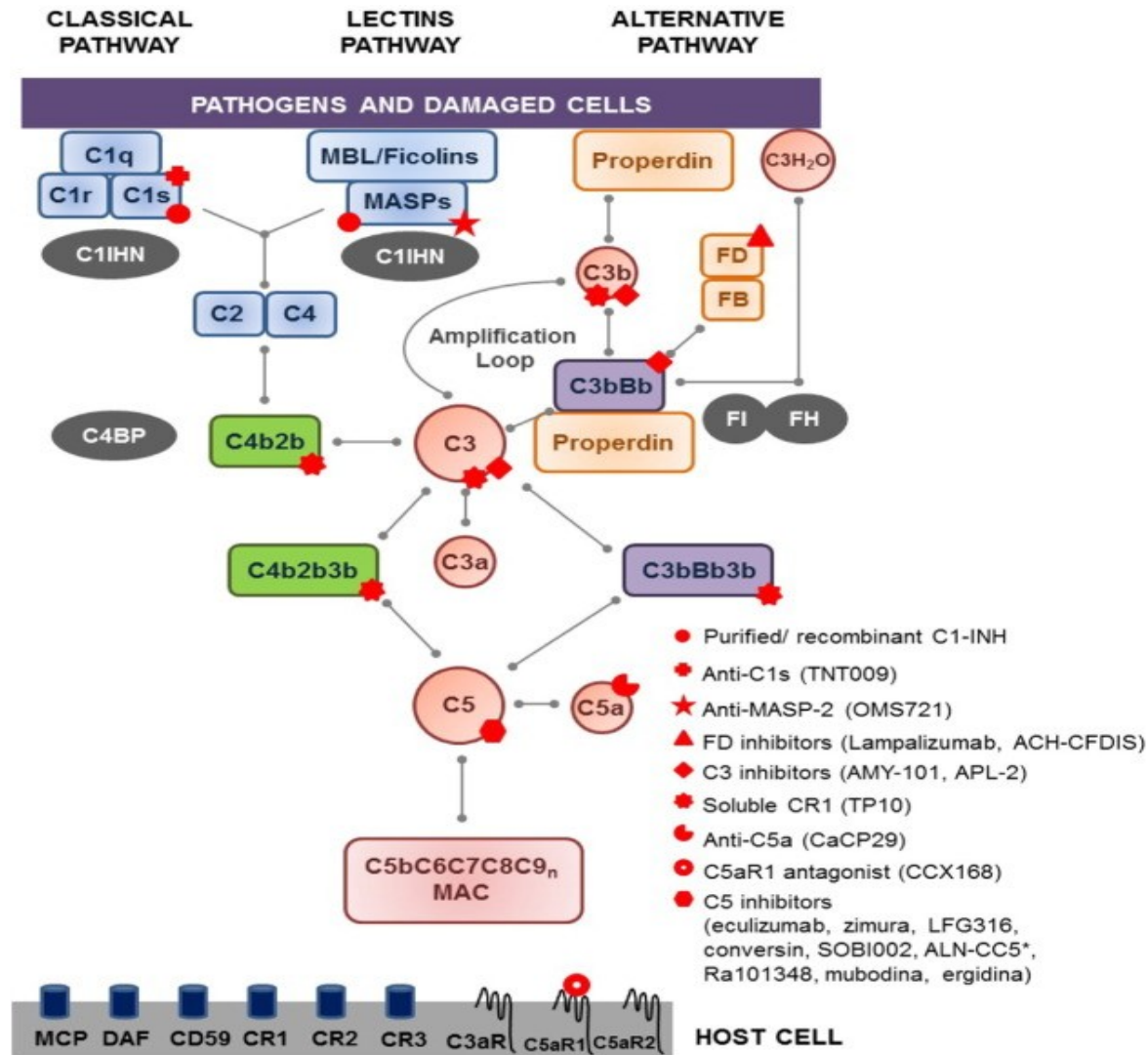


# Ovlivnění aktivity C-systému jako možnost imunoterapie

- **C1-inhibitor**
- **Ovlivnění C3 a C5 konvertáz**
  - CR1 (CD35)-complement receptor type 1
  - DAF (CD55)-decay-accelerating factor
  - MCP (CD46)-membrane cofactor protein
- **Ovlivnění komplexu atakujícího membránu (MAC)**
  - CD59
- **Inhibice C5**
  - Humanizované monoklonální protilátky  
(Pexelizumab, Eculizumab)

# Možnosti ovlivnění komplementové kaskády

(Reis ES et al: Clin Immunol 2015)



*kompliment  
komplementu*



**Complement Melody Girls**

# Člověk a jeho mikroby: „superorganismus“; „kompletní já“

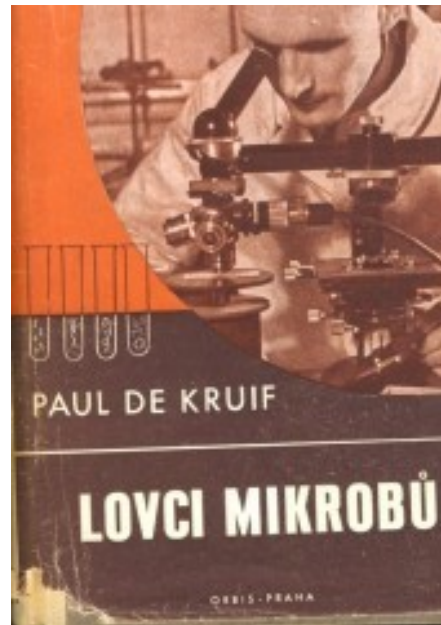
**Mikrobiota obsahuje  $10^{14}$  bakteriálních buněk, tj. 10x více než je buněk, které tvoří naše tělo.**

*(Jsme tedy z více než 90% „mikrobiální“).*

**Počet genů našeho mikrobiomu převyšuje 150x počet genů v lidském genomu.**

*(V lidském trávicím traktu je 3,3 milionu genů z více než tisíce druhů mikrobů; lidský genom má 20-25000 genů).*

Myšlenka, že mikroorganismy, které jsou všude kolem nás, mají snahu dostat se nám pod kůži a zničit nás, je stále pevně zakořeněna i v moderním vědomí.



***Ale z mnoha tisíců mikrobiálních druhů je jen asi stovka patogenních!***



**„Parasitismus vznikl v temné prapůvodní dávnověkosti jako následek stálého styku mezi různými živými bytostmi. Znamená průlom do oné obrany, kterou se normálně každá živá struktura brání vpádu jiných živých jednotek.“**

*Hans Zinsser, 1935*

# Bacilonosičství



## "TYPHOID MARY"

**MOST HARM**

*The Extraordinary Predicament of Mary Mallon, a Prisoner on New York's Quarantine Hospital*

**By Dr. Wm. H. Park, New York Board of Health.**

**The Extraordinary and D**  
*The Official*

**I**t is probable that Mary Mallon is a prisoner for life—and yet she has committed no crime, has never been accused of an immoral or wicked act, and has never been a prisoner in any court, nor has she been sentenced to imprisonment by any judge.

Mary Mallon is a cook by profession. She has served in the kitchens of many New York millionaires with entire satisfaction for many years.

Mary Mallon for more than two years has been a prisoner on New York's quarantine island, along with the unfortunate who are from time to time removed to this isolated spot because they are suffering from amebiasis, scarlet fever or other contagious diseases.

But while Mary sees these unfortunate victims of various diseases come on the hospital boat and, in due time, return to their homes and friends—Mary stays on forever.

There is probably in the whole wide world no prisoner that can furnish a parallel to the extreme misfortune which has brought Mary Mallon to North Brother Island. Through no fault of hers, Mary Mallon is a living, waiting incubator of typhoid fever germs. Every day for two years the officials of the New York Board of Health have examined Mary, and they have been discouraged to find a beautiful supply of new typhoid fever bacilli freshly made each twenty-four hours by Mary Mallon, in the five year authorities got their hands on her of twenty-six cases of typhoid fever. So far as is known, she had the disease, and is not now. But somewhere in her anatomy of the gall duct, there is a nest of typhoid fever germs. To the Board of Health Mary has been typhoid bacilli for seven years, they are able to track her high

**M**ARY MALLON is the kind of city person, scores of whom have been diagnosed within the past two years, in this country, whom we know in medical circles as typhoid bacilli carriers. Her name is the most recognizable will which we are acquainted, because of the number of persons to whom she has communicated the disease.

Our study of the case leads us to believe that the typhoid germs lodge in the gall bladder, where they are produced. From there they are carried through the body by the bile.

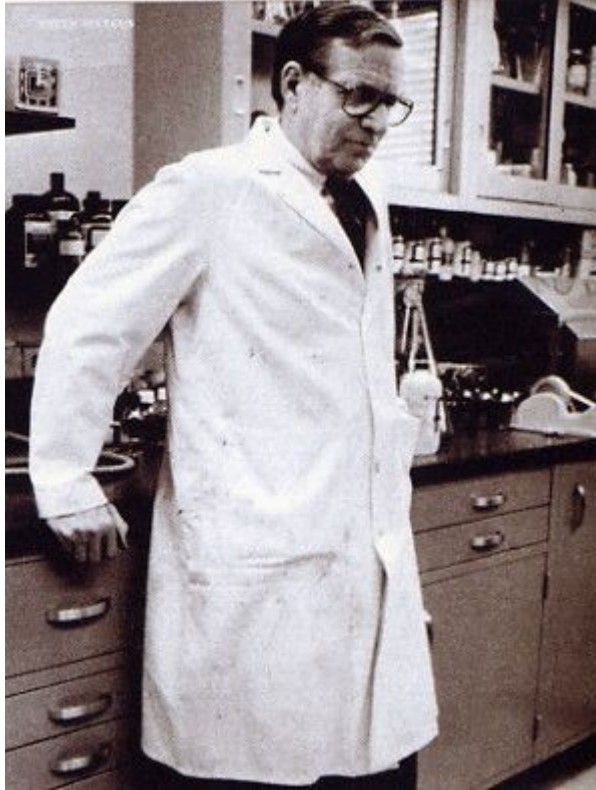
She is confined on North Brother Island, where she has been a prisoner for two years, and where, of course, she will remain indefinitely. She is a large, shabby looking woman, a typical cook, and there is nothing to her outward appearance to indicate that she is sicker than normal. She is, of course, segregated with the typhoid patients. When we consider that she has been spreading the contagion for many years, it is clear that she will be a prisoner on North Brother Island for a long time, perhaps for life, certainly until we are convinced that the typhoid germs and typhoid bacilli have been eliminated from her body.

Every effort has been made by the health authorities to cure the unfortunate woman, but so far without success. Examinations to date each day, with the hope that some one of the various organisms we have tried may get an entry in the discharge of her bile. Nothing we have tried so far has proved effective. There

**I**n the Winter of 1906 I was called on to investigate a household epidemic of typhoid fever which had broken out in the latter part of August at Oyster Bay, N. Y. The epidemic had been studied carefully immediately after it broke out, but its cause had not been ascertained with as much certainty as seemed desirable for a number of the property.

The essential facts concerning the investigation are as follows:

At Oyster Bay, in the Summer of 1906, six persons in a household of course were attacked with typhoid fever. The house was large, surrounded with ample grounds, in a desirable part of it



Lewis Thomas 1913 - 1993

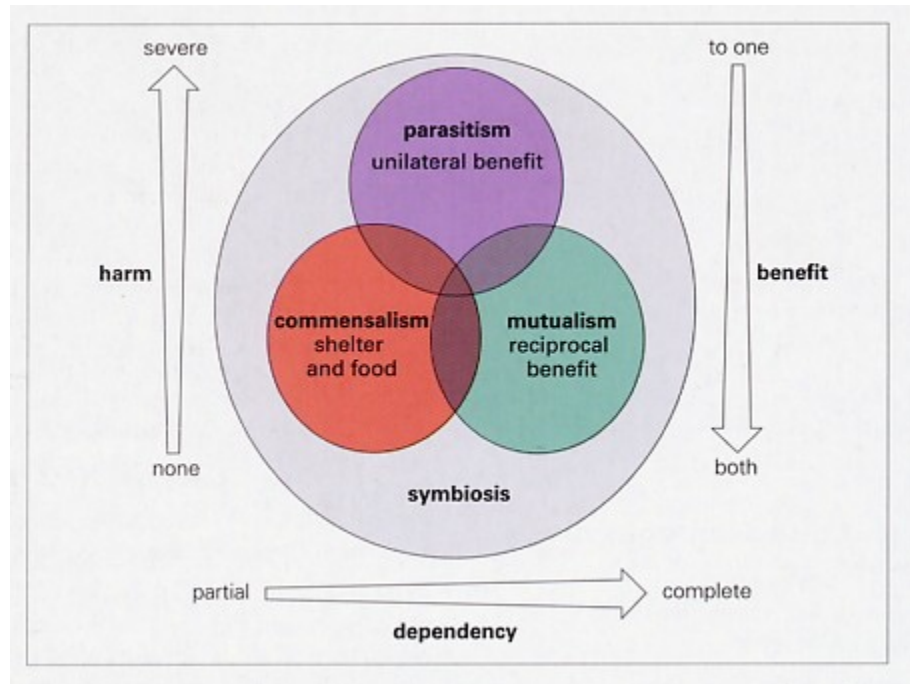
**„Mikroorganismy,  
jak bylo zjištěno,  
jsou spíše přihlížející.  
Je to naše odpověď na jejich  
přítomnost, která způsobuje nemoc.  
Naše výzbroj pro likvidaci bakterií  
je totiž tak silná, že nás ohrožuje  
mnohem víc než útočník“.**

**Úloha mikroorganismů při vzniku a rozvoji alergických  
a autoimunitních chorob**



# Ekologické interakce mikrobů a hostitele

## Parasitismus



**Komensalismus**

**Mutualismus**

**PATHOBIONT – PATHOGEN**

*...Člověk hned po narození už není jen sám sebou.  
Lidský organismus se stává gigantickým sídlištěm pro  
miliardy mikroorganismů.*

*Soužití hostitele s mikroorganismy je výsledkem  
oboustranných adaptací, které se v průběhu věků  
neustále vyvíjely a zdokonalovaly...*

**Jiří Kruml a Ivo Miler: Život bez mikrobů (Orbis, Praha, 1975)**

# Terminologie

***Microbiota (dříve mikroflóra):***

***společenství mikroorganismů v různých místech  
hostitele***

***Mikrobiom:***

***původně kompletní set genů v mikrobiotě, hromadný  
genom mikrobů žijících v a na nás,  
nyní mikrobiota a její veškerý genetický materiál***

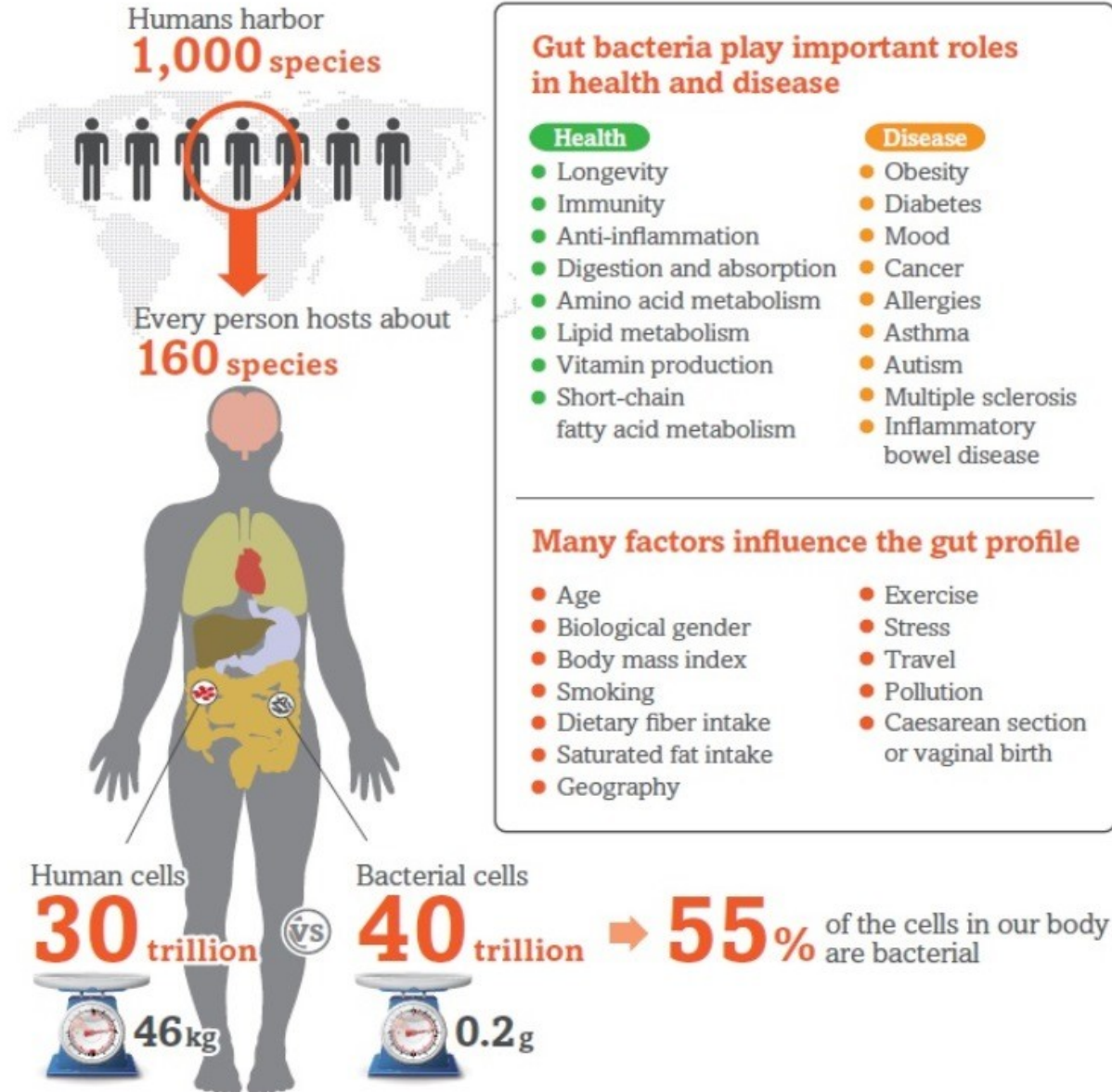
**Mikrobiota obsahuje  $10^{14}$  bakteriálních buněk, tj. 10x více než je buněk, které tvoří naše tělo.**  
*(Jsme tedy z více než 90% „mikrobiální“).*

**Počet genů našeho mikrobiomu převyšuje 150x počet genů v lidském genomu.**

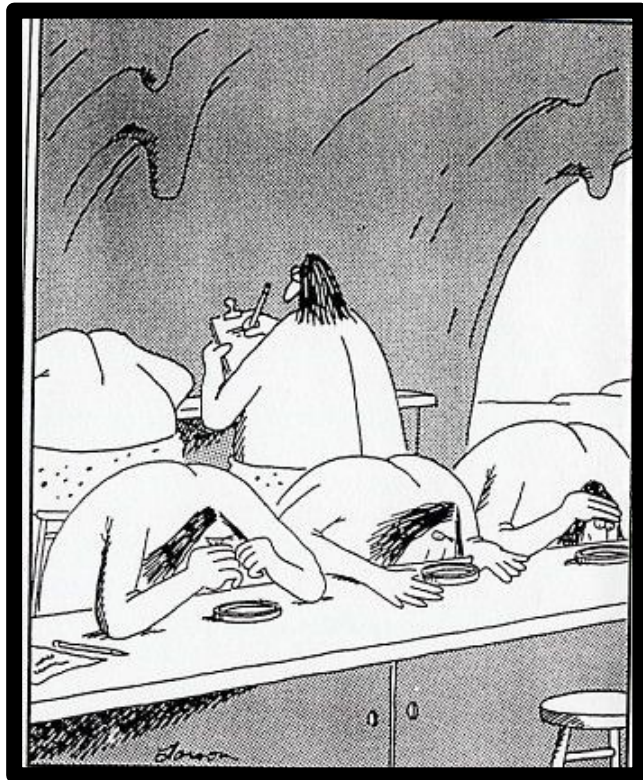
*(V lidském trávicím traktu je 3,3 milionu genů z více než tisíce druhů mikrobů (lidský genom má 20-25000 genů).*

**! Gilbert JA et al.: Current understanding of the human microbiome  
Nature Medicine 2018; 24(4): 392 -400**

# The gut microbiota



# Průkaz a identifikace mikroorganismů (dříve a nyní)



„prabakteriologové“  
mikroskopie, kultivace, pokus na zvířeti

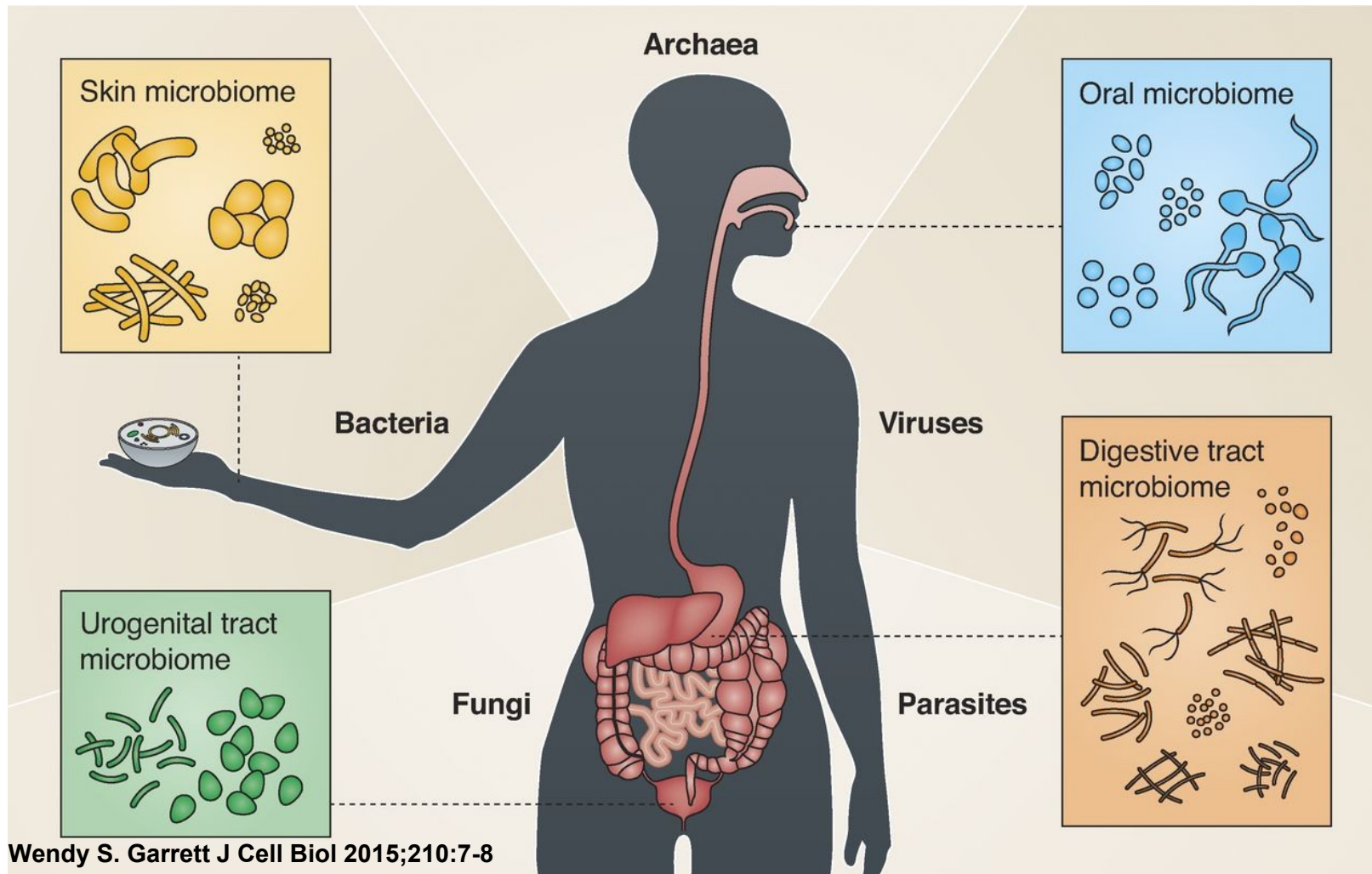


„molekulární biologové“  
16S rRNA gene sequence

# Molekulární biologické metody při studiu mikrobioty

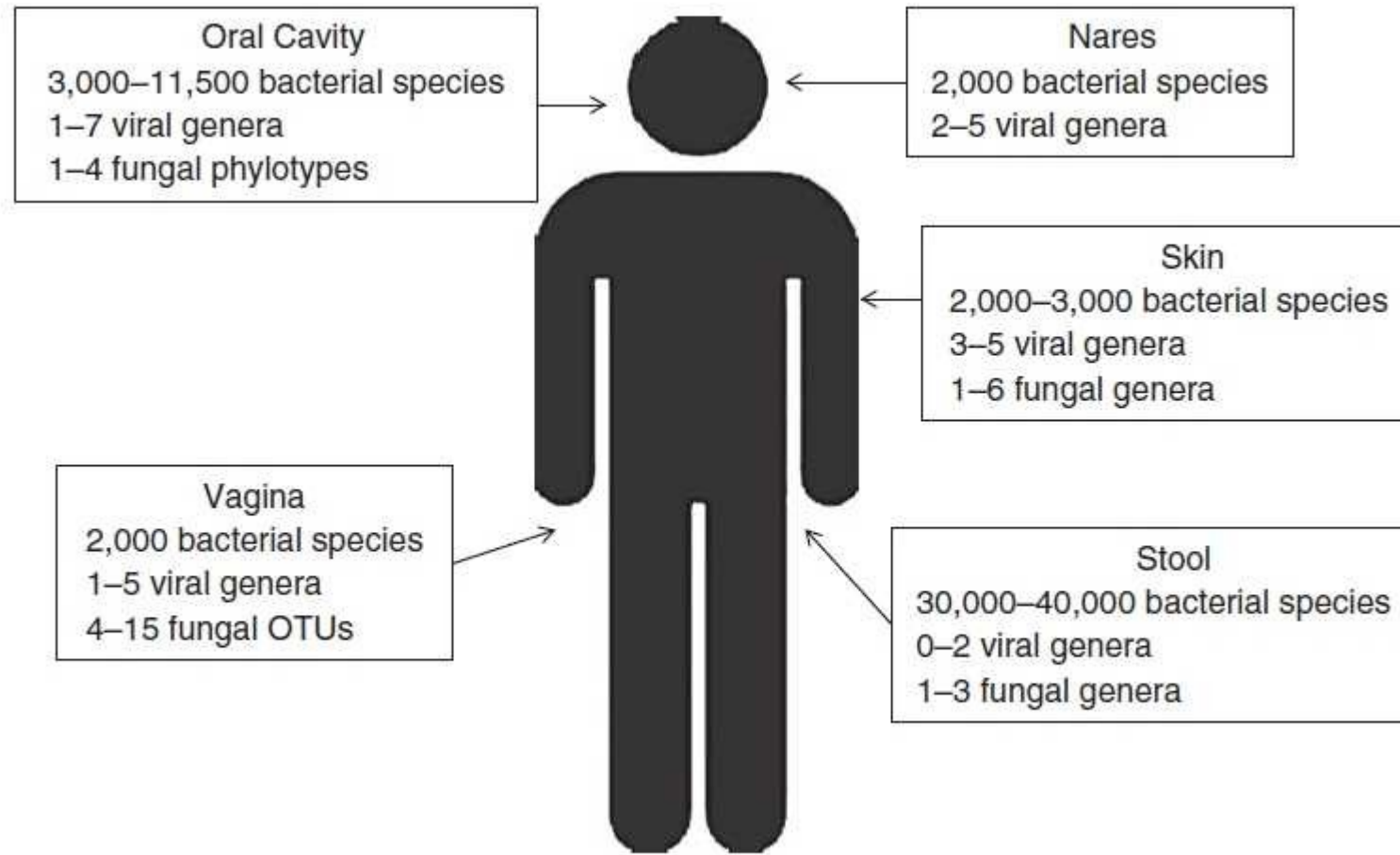
- 16S rRNA – kódující geny
- Metagenomická analýza – sekvenování veškeré mikrobiální DNA komplexního společenstva
- Analýza transcriptomu, proteomu, metabolomu

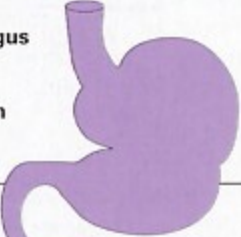


# Mikrobiom člověka



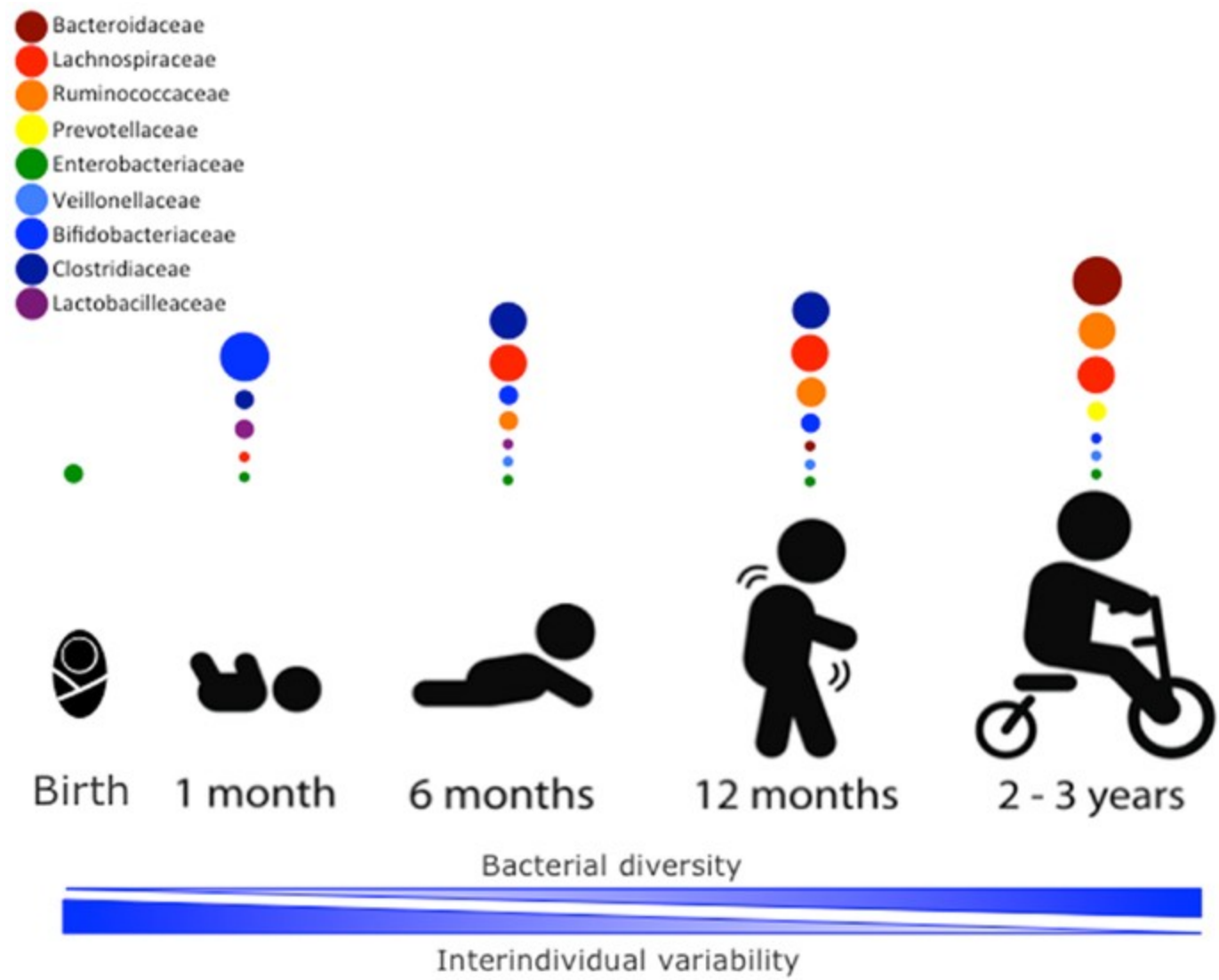


# Rozmanitost mikroorganismů v lidském těle



density	frequency of occurrence in population
<b>esophagus</b> <b>stomach</b> 	<div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">lactobacilli</div>
<b>small bowel</b> duodenum jejunum ileum 	<div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">lactobacilli streptococci</div> <div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">enterobacteria <i>Bacteroides</i> spp.</div>
<b>large bowel</b> 	<div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;"><i>Bacteroides</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp. <i>Strep. faecalis</i> <i>Escherichia coli</i></div> <div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">enterobacteria <i>Klebsiella</i> spp. eubacteria bifidobacteria</div>
	<div style="border: 1px solid black; background-color: #90EE90; padding: 2px;">lactobacillus <i>Staph. aureus</i> <i>Clostridium</i> spp.</div> <div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">streptococci <i>Pseudomonas</i> <i>Salmonella</i></div>
<b>fecal material</b>	<div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;"><i>Bacteroides</i> spp. bifidobacteria eubacteria</div> <div style="border: 1px solid black; background-color: #FFD700; padding: 2px;">coliforms <i>Strep. faecalis</i></div>





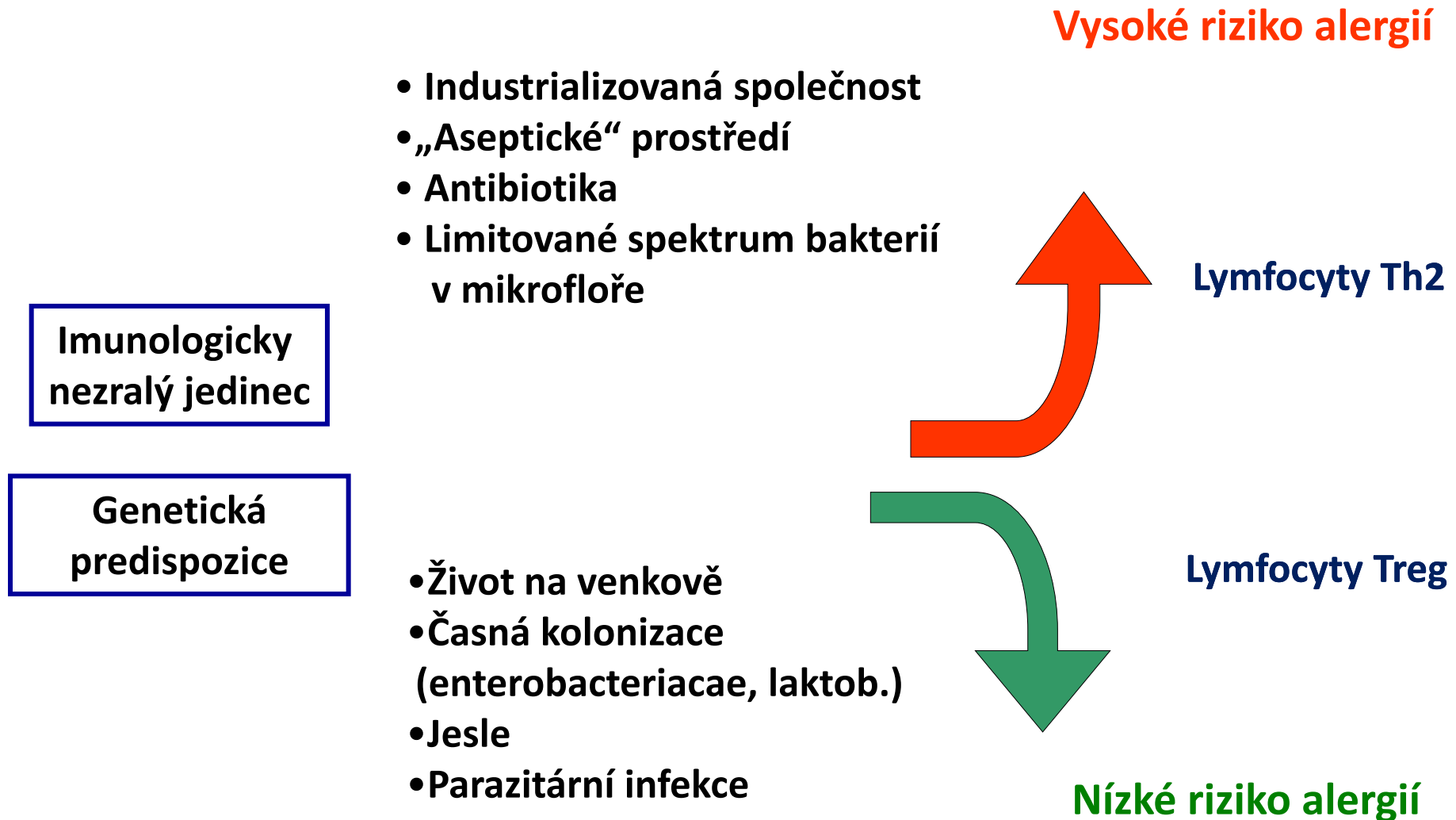
# Fyziologická mikrobiota indukuje tvorbu „přirozených protilátek“

- Isohemaglutininy (anti A, B)
- Xenoaglutininy (např. anti  $\alpha$ Gal)
- Protilátky proti antigenům mikrobioty

*Nízká séroreaktivita proti některým mikrobům (např. Firmicutes, Proteobacteria) v raném dětství je asociována s vývojem alergie v pozdějším období).  
Christman et al. JACI 2015*

# „Hygienická“ hypotéza

Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size (BMJ 1989; 299: 1259-1260)



# Mikroby a autoimunitní choroby

## Molekulární (antigenní) mimikry:

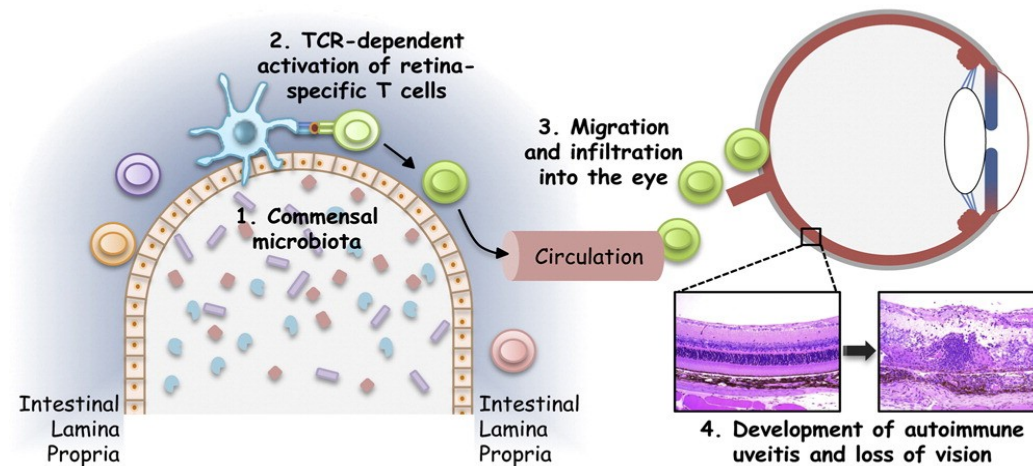
Genetická konservace klíčových molekul v průběhu evoluce zaručuje, že četné významné molekuly infekčních agens a jejich hostitele jsou si velmi podobné, v určitých doménách dokonce identické.

## Rozšiřování spektra epitopů v průběhu infekčního procesu

## Vliv střevní mikrobioty

Experimentální modely vč. bezmikrobních zvířat: vliv na zánětlivé choroby střeva, ale i na extraintestinální autoimunitní choroby (revmatoidní artritida, T1 diabetes, roztroušená skleróza, uveitida).

# Aktivace autoreaktivních lymfocytů T střevní mikrobiotou provokuje autoimunitní reakci i v imunologicky privilegovaných oblastech.



*Horai R et al: Immunity 2015; 43(2): 343-353*

# Mikrobiota a nádory

Hromadí se důkazy, že fyziologická, komensální mikrobiota má významný vliv na karcinogenezi, progresi nádorů i odpověď na protinádorovou léčbu.

Tyto účinky mohou být lokální i celkové.

K praktickému využití se nabízí úprava diety, prebiotika, probiotika, transplantace stolice nebo definované mikrobioty.

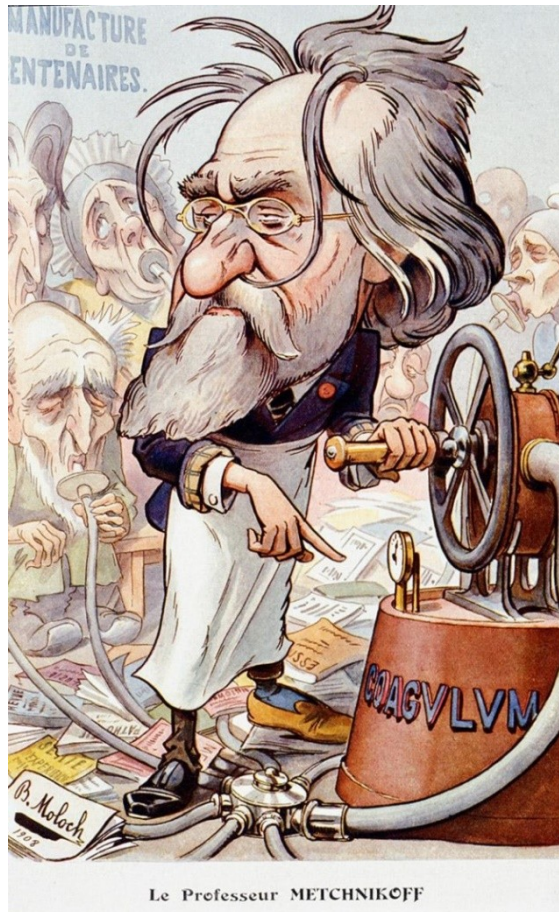
*(Dzutsev A et al, Eur J Immunol 2015; 45: 17-31)*



# Možnosti ovlivnění mikrobioty

- Antibiotika
- Probiotika
- Prebiotika
- Imunomodulátory
- Terapie bakteriofágy
- Transplantace stolice (u infekcí *C. difficile*)
- Produkty mikrobioty (např. bakteriální polysacharidy *Bacteroides fragilis*)

# Od Mečnikova k současné koncepci probiotik



**Metchnikoff E:**  
**Intestinal poisons and arteriosclerosis.**  
*(Annales de l'Institut Pasteur 1910;24:  
753- 70)*

**Metchnikoff E, Williams HS:**  
**Why not live forever?**  
*(Cosmopolitan 1912; 53: 436 – 464)*

**Bacillus bulgaricus**  
***Lacto-bacilline of Metchnikoff***

# PROBIOTIKA

**živé mikroorganismy aplikované perorálně,  
působící blahodárně na zdraví člověka a  
zvířat**

nejčastěji používaná probiotika:

*laktobacily,*

*streptokoky, enterokoky*

*bifidobakterie,*

*E. coli (kmen Nissle),*

*kvasinky (Saccharomyces boulardii)*

# PREBIOTIKA

Selektivně fermentované složky potravy, které vedou k specifickým změnám ve složení a aktivitě střevní mikrobioty s blahodárným vlivem na zdraví hostitele:

*Inulin, fructo-oligosacharidy, galacto-oligosacharidy, lactulosa...*

# Transplantace mikrobioty stolice (fecal microbiota transplantation)

- Od jednoho dárce, často blízkého příbuzného.
- Od více dárců (stool banks).
- Transplantace autologní stolice (odebrané v klidovém období a vhodně uchované).
- Anaerobně kultivovaná stolice od zdravých dárců.

*Využití: průjem vyvolaný antibiotiky  
průjem způsobený Clostridium difficile  
perspektivně metabolické, kardiovaskulární,  
neurologické, autoimunitní, alergické choroby*

# **Každý máme svůj vlastní mikrobiální „makeup“**

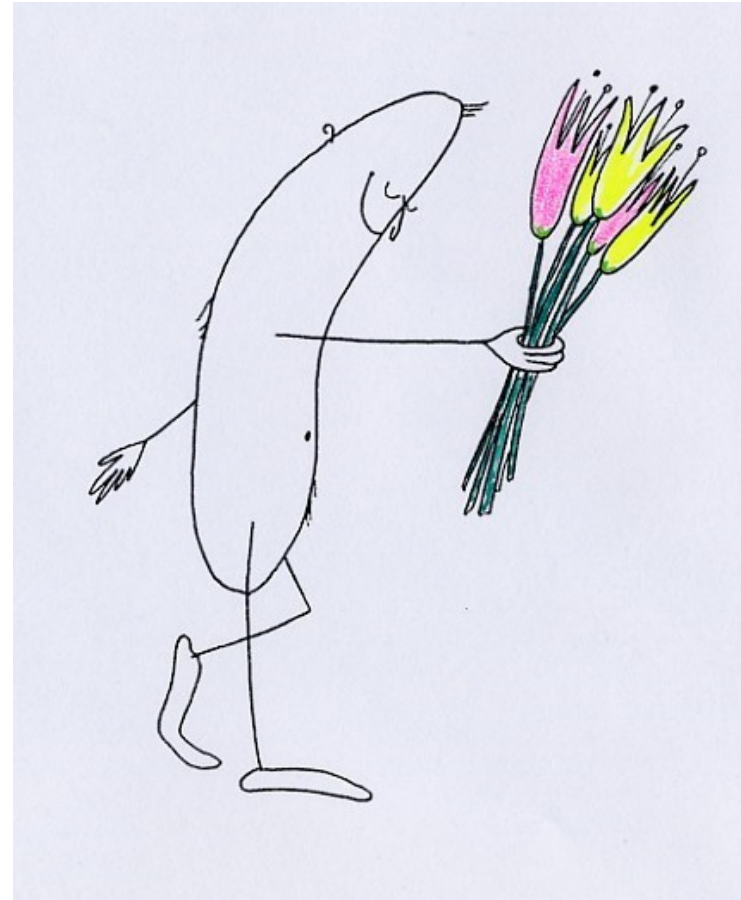
**„Náš individuální osud, zdraví a možná i některé z našich činností je mnohem více závislé na variantách genů v našem mikrobiomu než v našich vlastních génech“.**

*Ackerman J: The ultimate social network.  
(Scientific American 2012)*

Podkladem individualizované, personalizované, „precizní“ medicíny bude nejen analýza organismu, ale i jeho **mikrobiomu**.



„c' est les  
microbes,  
qui auront le  
dernier mot“



Jsou to <sup>Louis</sup> mikroby, které budou  
<sup>Pasteur</sup> mít poslední slovo.

*Jsou to lékaři, kteří jim ho chtějí utnout.*