

Transplantační imunologie

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



Transplantace

- přenosy tkání nebo orgánů
- nahrazují nefunkční tkáň nebo orgán příjemce zdravým ekvivalentem
- zásadní úloha imunitních pochodů

Typy transplantací

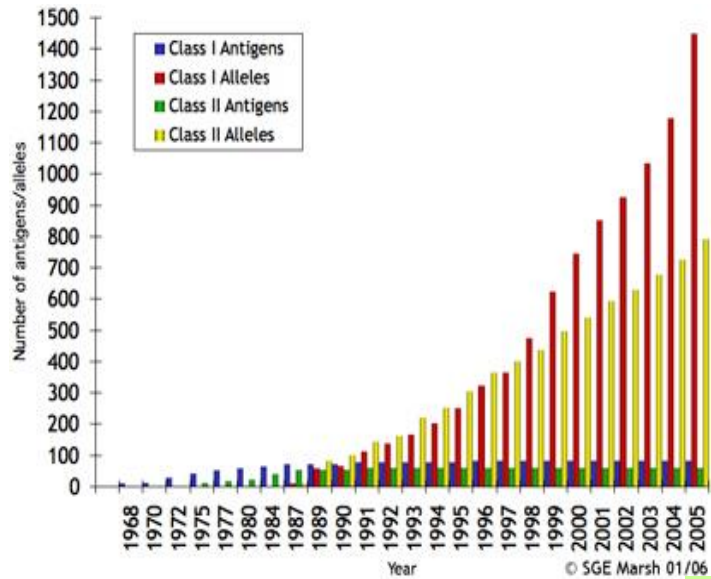
- Dle vztahu a dárce a příjemce
 - autologní
 - alogenní
 - syngenní
 - xenogenní

Dle charakteru transplantátu (štěpu)

- orgánové - ledvina, srdce, plíce, pankreas, játra, - rohovka
- tkáňové - kostní dřeň (kmenové buňky krvetvorby), kožní štěpy

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
 - reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)



2010

Numbers of HLA Alleles

HLA Class I Alleles 3,411

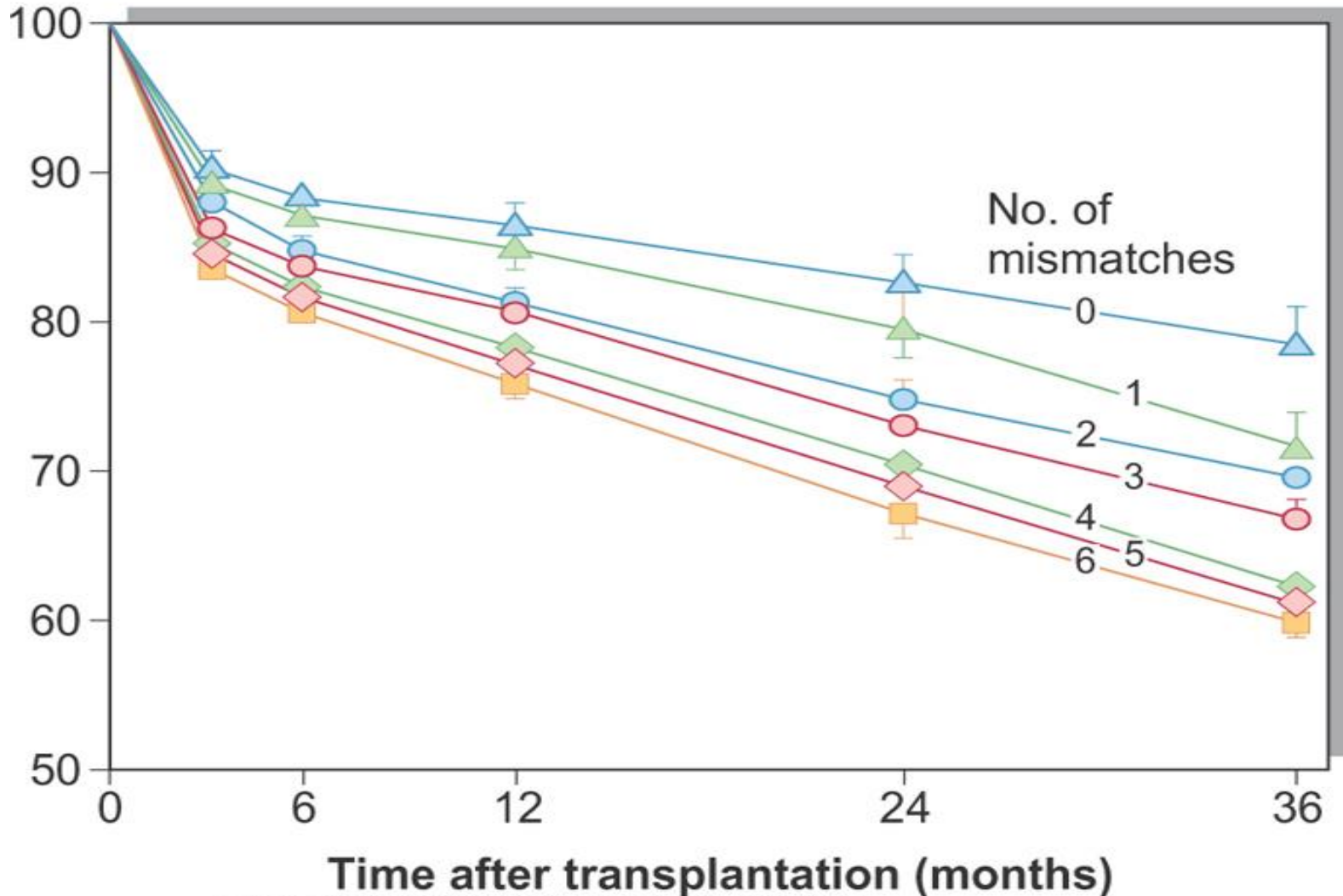
HLA Class II Alleles 1,222

HLA Alleles 4,633

Other non-HLA Alleles 110

Vliv počtu neshod v HLA systému mezi dárce

Graft-survival rate
(% total grafts)



Transplantace – vyšetření příjemce štěpu

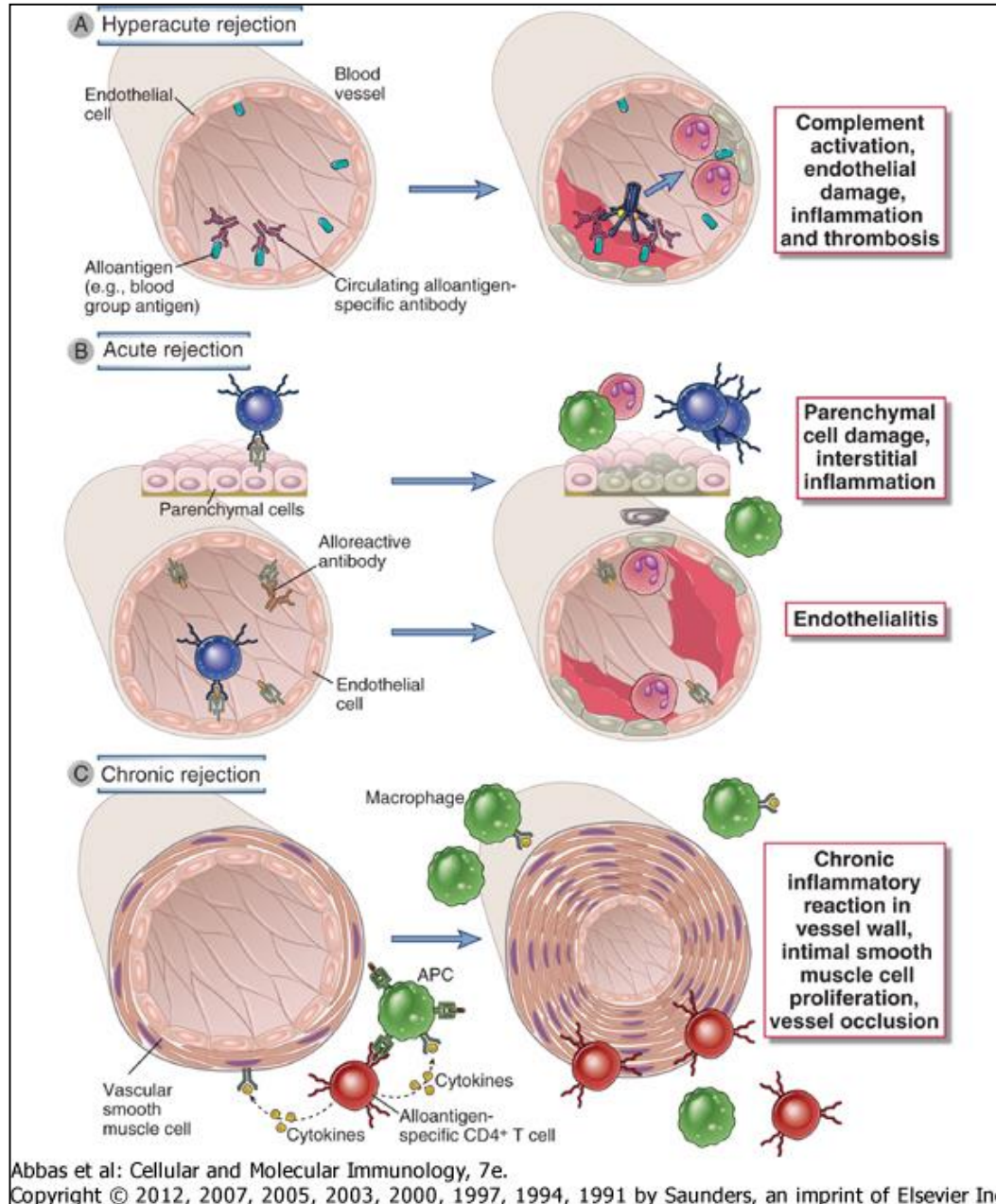
- Určení krevní skupiny AB0
 - transplantace orgánů
- Typizace HLA I (A, B, C), HLA II (DR, DQ)
 - Tx ledvin (A, B, DR – nízké rozlišení)
 - HSCT (A, B, C, DR, DQ – vysoké rozlišení)
- Preformované aloprotilátky (panel reactive antibody)
- „Crossmatching“ – přítomnost preformovaných protilátek specifických pro potenciálního donora

Transplantace – rejekce štěpu

- Rejekce **hyperakutní** - během minut- protilátky proti ABO nebo preformované protilátky proti 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 fibróze, poškození cév a ztrátě funkce štěpu

Imunosupresivní léčba

Mechanizmy rejekce štěpu



Transplantace hematopoetických buněk

- Užívá se buď kostní dřeň nebo izolované periferní CD34+ kmenové buňky
- Indikace:
 - Maligní nádory (leukémie, lymfomy neuroblastom...)
 - Selhání kostní dřeně
 - Primární imunodeficiency

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

- Makulopapulární exantém, generalizovaná erythrodermie, puchýře, deskvamace
- Hepatopatie, zvýšení koncentrace bilirubinu v séru
- Průjem, velké bolesti břicha, ileus

Imunosupresivní léčba

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 zirkonia implants and teeth, A cross-sectional assesment. Clin Oral Invest 2016; 20: 2285 – 2291)

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

- 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
- **Protilátky** jsou **IgM isotypu**, vyskytují se přirozeně

Polysacharidové antigeny systému ABO

0: 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

- Nejdůležitější je systém Rh
- Protilátky jsou IgG isotypu, objevují se pouze po antigenním stimulu

Malé krevní skupiny

- **System MNS**
 - silně glykosylované proteiny (glycophoriny) nesou antigeny M, N, S, s
 - protilátky IgG i IgM (podle cílového antigenu)
- **System Duffy**
 - glykoprotein, nejvýznamnější antigeny jsou Fy^a a Fy^b
 - protilátky IgG
- **System Kell**
 - glykoprotein, nejvýznamnější je K antigen
 - protilátky IgG
 - třetí nejčastější příčina hemolytické reakce novorozenců
- **System Lewis**
 - antigeny Le^a a Le^b jsou součástí antigenů ABO systému
 - protilátky IgM

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 (+ C-systém, fagocyty, buňky K): erythroblastosis fetalis
- Dg: Coombsův antiglobulinový test (přímý, nepřímý)
- Profylaxe: anti Rh sérum do 72 hod. po porodu (abortu...)

Transfúze krve - komplikace

Po převodu krve **neslučitelné v systému AB0** dochází k **hemolytické 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 z diseminované intravaskulární koagulace, trombocytopenie a fibrinolýzy

Transfúze 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
Příznaky: horečka, třesavka, zimnice, bolesti hlavy, zrudnutí, tlak na hrudi, kašel)
- Alergické reakce - kopřivka, larygospasmus
- Anafylaktoidní reakce – IgA-anti IgA
- Aloimunizace
- Reakce z přetížení oběhu - u zdravého lze převést 1l/za 2-3 hod., přetížení vede k akutnímu srdečnímu selhání

Imunoonkologie

Cancer immunoediting teorie 3E

Duální funkce imunitního systému

host-protecting x tumor-promoting

Eliminace

Equilibrium

Escape

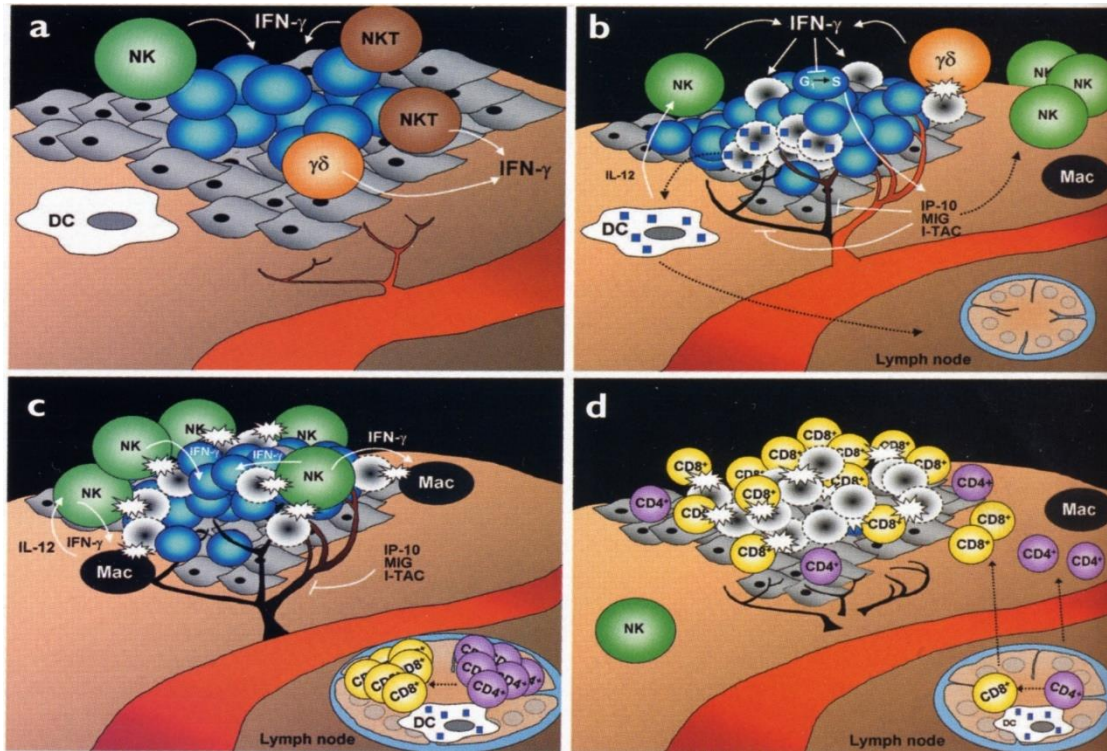
Imunitní systém a maligní nádor

Imunologická úprava nádoru (cancer immunoeediting):

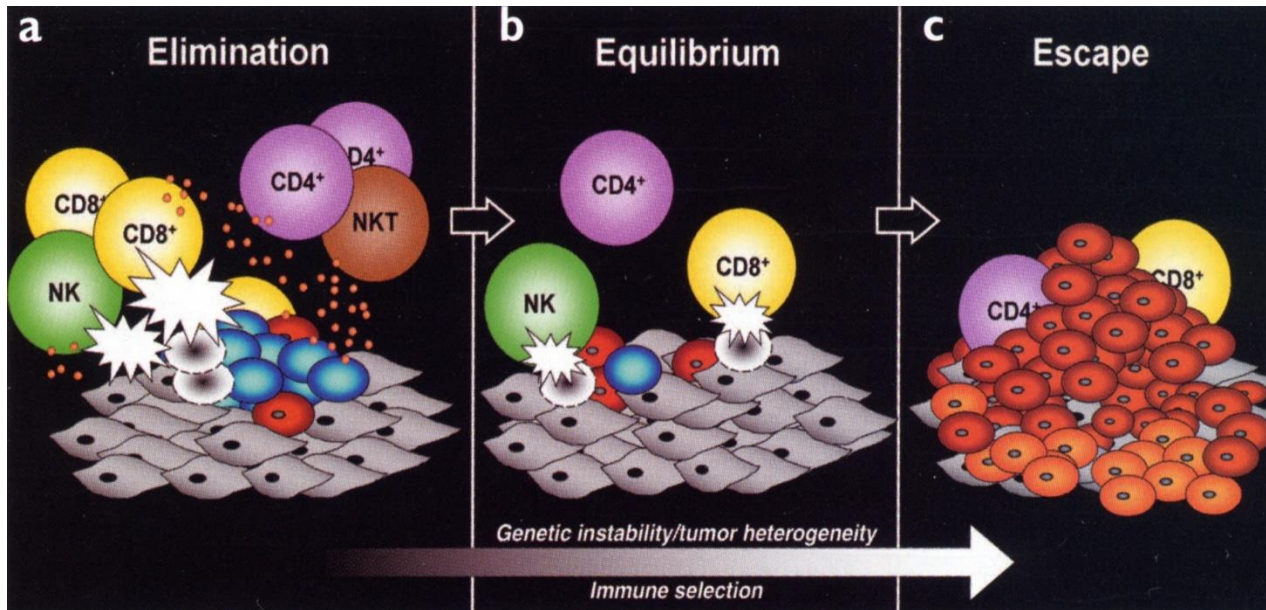
Imunologická ostraha (immunological surveillance) – **eliminace** maligně transformovaných buněk.

Vytvoření **rovnováhy** mezi imunitním systémem a nádorem, selekce rezistentních mutantů.

Únik maligních buněk před imunitními reakcemi.



Imunologická eliminace maligních buněk
 (Dunn GP et al.: Nature Immunology 2002; 3: 991-998)



Cancer immunoediting

Dunn GV, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD:
 Nature Immunology 2002; 3:991-998

Editace nádoru imunitním systémem

Eliminace

Kooperace nespecifických a specifických složek imunitního systému vede k rozpoznání tumorogeneze a její eliminaci před vlastní klinickou manifestací

- Nedetekovatelné stadium (in vivo)
- Dominují mechanismy nespecifické a specifické složky imunity

proces je **ukončen**
kompletní **eliminací nádorových buněk**
nebo
přechází do **stavu rovnováhy**

Editace nádoru imunitním systémem

Equilibrium

Dominují mechanismy **specifické imunity** vedoucí k **prevenci progresu tumorogeneze**, ale zároveň se vyvíjí **imunogenicita nádoru**

- **dynamická rovnováha**
- obtížně diagnostikovatelné stadium (vyjímka MGUS)

Výsledkem může být:

kompletní **eliminace** buněk nádoru

nebo

dlouhodobý stav **rovnováhy**

nebo

únik kontrole imunitního systému a **rozvoj nádorového onemocnění**

Editace nádoru imunitním systémem

Escape

Rozvoj imunosupresivního mikroprostředí tumoru a selekce nízké imunogenních rychle proliferujících buněk tumoru, které se stávají „neviditelnými“ pro imunitní systém

- Stadium progresivně rostoucího viditelného tumoru
- Diagnosticky průkazné stadiu

únik buněk tumoru mechanismům editace imunitního systému

Nádorové antigeny TSA x TAA

TSA tumor specifické antigeny

- nevyskytují na nemaligních buňkách

TAA tumor asociované antigeny

- nejsou výlučně specifické pro nádorové buňky

TSA tumor specifické antigeny

Nelze prokázat na nemaligních buňkách Neo-antigeny

- **Komplex MHC gpI s abnormálními fragmenty buněčných proteinů**
- **MHC gpI s fragmenty oncovirů** - HPV, EBV
- **Produkty abnormální glykosylace proteinů** - glykosylace, syalizace
- **Idiotypy myelomu a lymfomů** - klonotypické BCR a TCR - NHL, HL, MM)
- **Produkty mutovaných genů** - chromosomální translokace (filadelfský chromosom translokace 9 a 22 AML a ALL), fusní geny, fusní proteiny (chimerický bcr-abl)
- **Mutace genů tumor supresor genes** - geny kontroly buněčného cyklu
P53

TAA tumor-associated antigens

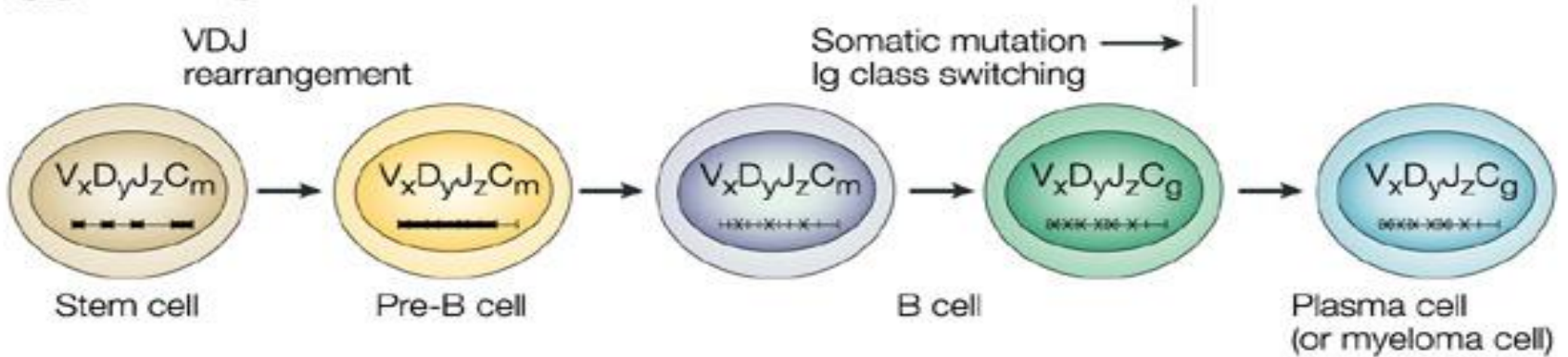
- **nejsou** výlučně **specifické pro nádorové buňky**
 - exprese je fyziologická v určitém **ontogenetickém období**
 - za určitých okolností je lze nalézt i **na normálních buňkách**
 - **u malignit - ektopická exprese x zvýšená exprese**
 - pomocné diagnostické markery
- **onkofetální antigeny** antigeny specifické pro tkáň nebo orgán z nichž vycházejí
 - AFP – hepatomy
 - CEA - carcinoembryonální proteiny buňky
 - **antigeny specifické pro tkáň nebo orgán z nichž vycházejí**
 - MAGE-1 melanomový antigen
 - PSA prostatický Ag
 - **proteiny řídce přítomné ve vlastní tkáni a hojně přítomné neoplastické tkáni**
 - receptor HER2/neu
 - **diferenční antigeny malignit lymfatického systému**
 - CALLA common acute lymphoblastoid leukemia antigen CD 10 – pre B buňky
 - fyziologicky přítomny na normálních buňkách vývojových řad leukocytů

Imunologická diagnostika nádorů

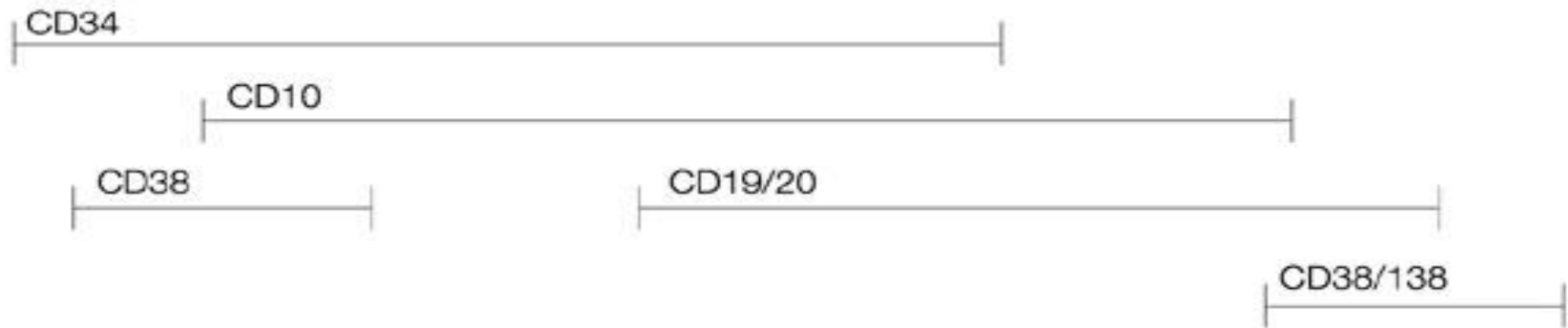
- Onkomarkery“
 - Alfa-feto protein (Ca jater)
 - CEA (Ca colon)
 - PSA (Ca prostaty)
- Paraprotein
- Diferenciační antigeny na buňkách malignit lymfatického systému (CD znaky)
- Průkaz klonality
- Exprese check point molekul ve vzorku maligní tkáně

Vývoj B-lymfocytů

Ig gene changes



Cell-surface markers



Buňky imunitního systému v obraně proti nádorům

Obranná funkce specifické a nespecifické imunity

- NK buňky
- Tc lymfocyty

- Aktivované makrofágy
- Dendritické buňky (DC)

Obranné mechanismy nádorů proti imunitnímu systému

Ztráta exprese nádorových antigenů – snížení antigenní variability nádorů, mutantní formy ztrácejí nádorový antigen

Selekce nízké antigenních variant buněk tumoru

ignorace imunitním systémem

ovlivnění exprese MHC I proteinů, zpracování a vazba antigenu na MHC I

Inhibice funkce dendritických buněk

NO – apoptosa DC, IL1, TGF beta - inhibice zrání DC, VEGF - inhibice prekursorů DC ve dřeni

Tlumení funkce T-lymfocytů (TGF-b, IL-10)

T reg – inhibice funkce tumorspecifických T lymfocytů (TGFbeta, Il-10, PD, PDL1, CTLA-4)

MDSC – (Myeloid Derived Suppressor Cells)

Indukce apoptózy - exprese FasL, aktivace STAT3 dráhy, exprese BCL-2

“Enhancement” efekt protinádorových protilátek- stimulace růstových receptorů nádoru

Absence kostimulačních molekul - utlumení Tc a Th

Imunoonkologická terapie

Indukce protinádorové imunity

nebo

Využití imunitních mechanismů k cílenému
nasměrování léčiva k místu nádoru

Imunoonkologická léčba

- **Monoklonální protilátky** (anti-CD20, anti-HER2).
- **Check point inhibitor blockers** (anti PD, anti PDL1, anti CTLA4)
- **Adoptivní buněčné terapie** (TIL, DC vac,CAR)
- **Imunomodulační preparáty**
 - **Auto a alo HSCT** (mechanismus GVLR)
 - **Imunostimulační a imunomodulační cytokiny** (IFN-a, IL-2)
 - **Indukce zánětu se stimulací Th1 buněk** (BCG vakcína)

Imunomodulační a imunostimulační cytokiny

IL 2

- Růstový faktor T lymfocytů
- Na dávce závislý imunomodulační a antitumorosní efekt
- Rekombinantní preparát, multiorgánová toxicita, nahrazen check point inhibitory.
- Maligní melanom, renální carcinom (vysokodávkováný IL2)

BCG bacillus Calmette-Guerin

- Astenuované mycobacterium bovis
- Léčba karcinomu močového měchýře intravesikální aplikací
- Elevace INF γ , indukce exprese MHC II na buňkách tumoru
- Infiltrace močového měchýře makrofágy a CD4+T buňkami

Immunomodulační a imunodtimulační cytokiny

INF α

Stimulace Th1 prostřednictvím STAT1 a STAT 3 drah k sekreci IL 12

Vysokodávkovaný INF Interferon alfa-2b

Lymfatické malignity

Adjuvantní léčba high risk melanomu před zavedením ipilimumabu

Monohočetné AE (hepatotoxicita, myelotoxicita, thyreotoxicita...)

Check points

spouštěče kostimulačních a inhibičních drah T lymfocytární odpovědi vedoucí k modulaci délky amplitudy imunitní odpovědi a tím k udržení integrity organismu (self tolerance)

T buněčné inhibiční a stimulační receptory a jejich ligandy

Anti PD(CD279), Anti PD –L1(CD274), anti PD-L2(CD273), anti CTLA4(CD152)

CAVE: časté vedlejší reakce (irAE)

Check point blockers

CTLA 4

cytotoxic T lymphocyte associated antigen

- inhibiční molekula T lymfocytů (CD4+, CD8+)
- interakce s CD80/86 na APC
- kompetice s CD28 T buněk (CD28 stimulace vs CTLA4 inhibicie)
- inhibice T lymfocytární proliferace a aktivace

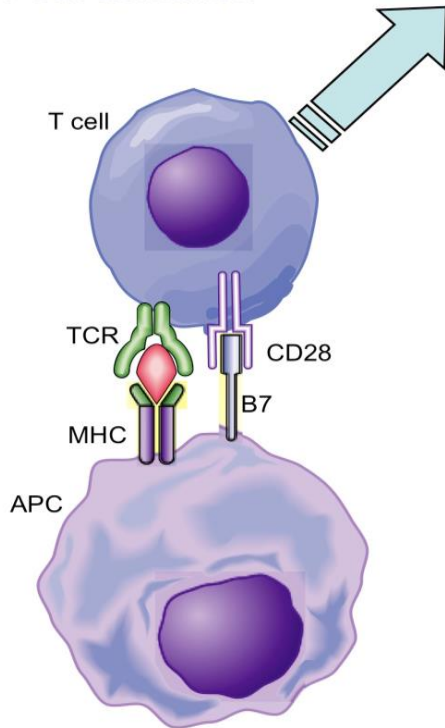
PD1 program cell death receptor

- transmembránový protein T, B, NK, DC monocytů
- exprese je zvýšena na lymfocytech v mikrosprotředí nádoru
- inhibice apoptosy maligních buněk přeměna T efektorových na Treg, vyčerpání T efektorových buněk
- interakce s PD-L1 a PD-L2

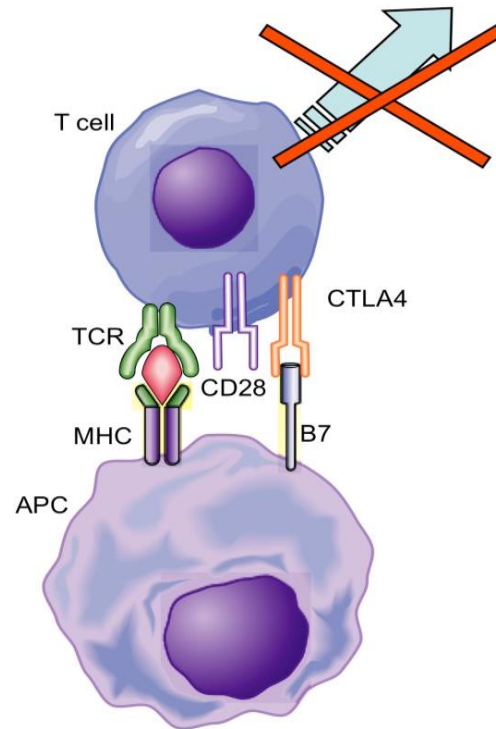
Monoklonální protilátky proti těmto check points se úspěšně využívají při imunostimulační terapii v onkologii

Ipilimumab Blocks Negative Signaling From CTLA-4

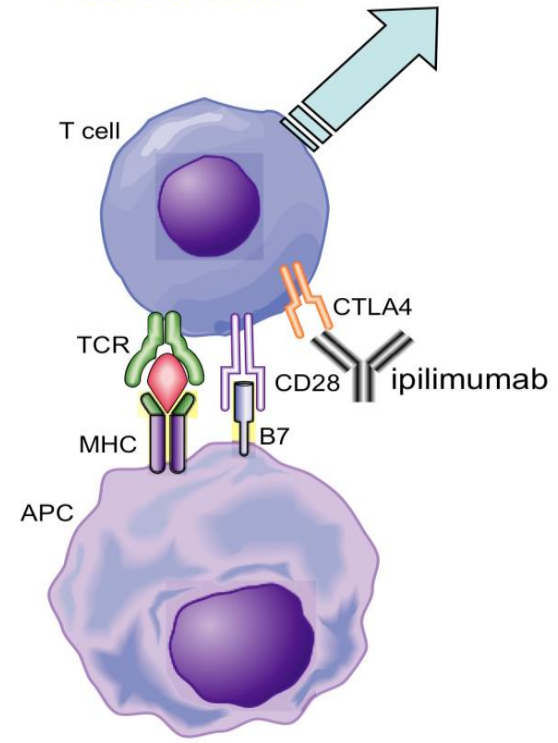
Co-stimulation via CD28:
T-cell activation



CTLA-4 blocks co-stimulation:
No T-cell activation



Ipilimumab blocks CTLA-4:
T-cell activation



Adapted from Lebbé et al. ESMO 2008

APC, antigen-presenting cell; CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen-4; MHC, major histocompatibility complex; TCR, T-cell receptor.

Monoklonální protilátky v onkologii mAbs

- **Přímý protitumorosní efekt prostřednictvím inhibice nebo aktivace receptoru mAb**
- **Imunologicky mediované usmrcení buněk** tumoru ACCD, fagocytosa, aktivace komplementu, crossprezentace DC, CTLA4 blokace
- **Ablace buněk stromatu a buněk cévního zásobení mikroprostředí tumoru**

Monoklonální protilátky v onkologii

Trastuzumab (Herceptin) :

anti ERBB2, (epidermal growth factor receptor, HER 2 receptor)
metastasující mamární karcinom.

Cetuximab (Erbix):

anti-EGFR, anti epidermal grow factor receptor
kolorektální ca

Bevacizumab (Avastin):

anti VEGF

inhibitor angiogenese

kolorektální ca

Monoklonální protilátky cílené proti CD znakům v onkologii

Rituximab (Mabhtera)

- **antiCD20** IgG1 chimerická mAb, CD20 pos NHL a CLL, folikulární NHL
- ADCC, přímá indukce apoptosy and CD

CD 20 povrchový marker vývojových řad B lymfocytů absentuje na plasmatických buňkách

Alemtuzumab (Campath)

- IgG1 humanisovaná **anti CD 52**
- CLL, NHL
- Přímá indukce apoptosy a CDC

CD 52 povrchový antigen maturovaných lymfocytů

Adoptivní celulární terapie

- Nádorová vakcinace
DC ...
- CAR
Chimerické antigenní receptory T buněk
- TIL
Tumor infiltrující lymfocyty

Nádorové vakcíny

Preventivní

- vakcinace zdravých pacientů
- vznik specifických protilátek a paměťových buněk
- **proti papilomavirům, hepatitidě B**

Terapeutické

- vakcinace onkologicky nemocných pacientů
- indukce cílené protinádorové imunitní odpovědi
antigen spec CTL a antigen spec. CD4+ Th

Nádorové vakcíny

Terapeutické

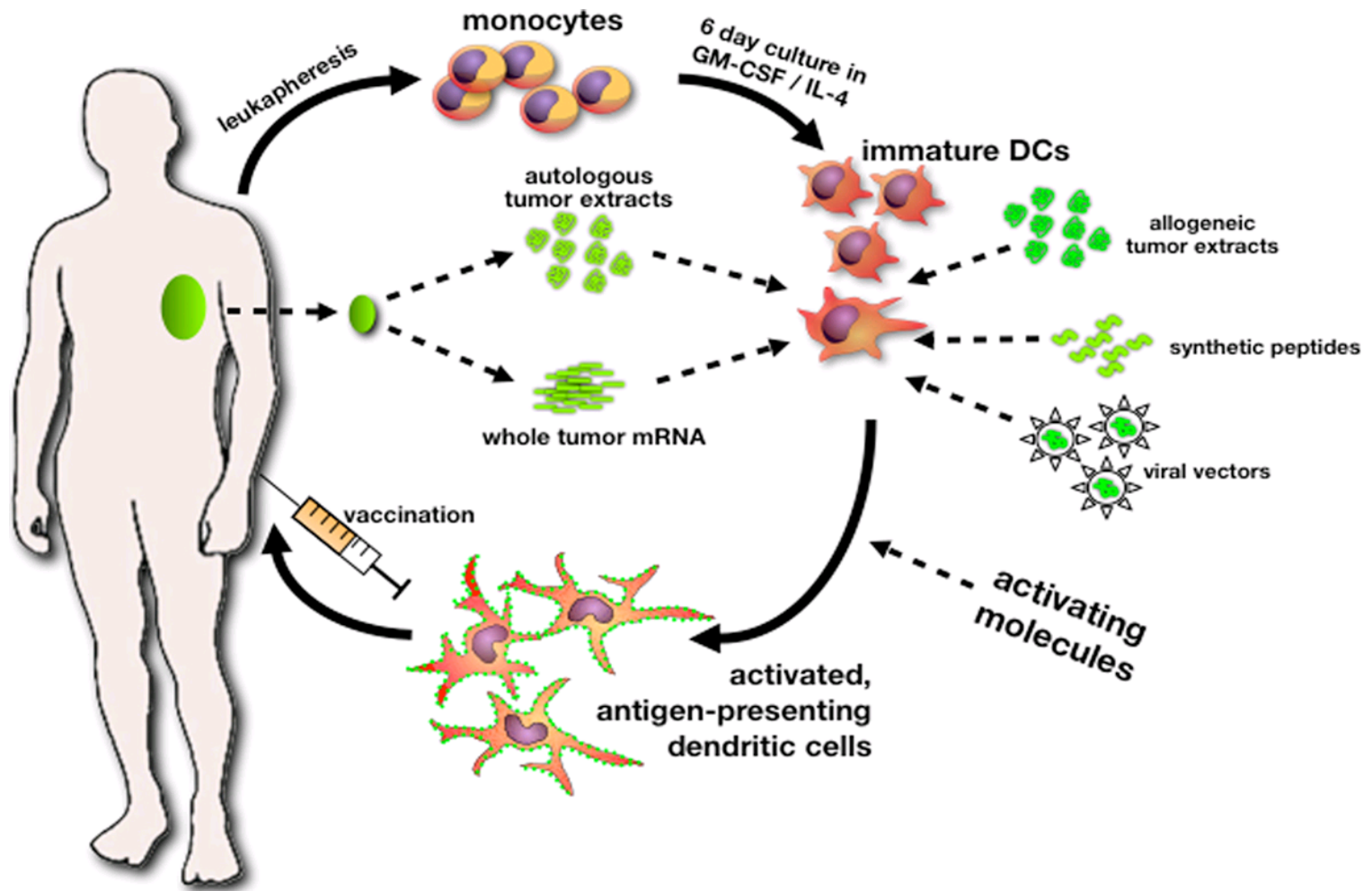
Ex vivo generované autologní vakcíny z dendritických buněk

Proteinové/peptidové vakcíny (cíl TAA – gp100, PSA...)

Genetické vakcíny

- DNA vakcíny (bakteriální plasmidy – tumor antigen)
- RNA vakcíny (mRNA autologní tumorosní tkáně)
- Na virech založené vakcíny (virové vektory)

Protinádorové vakcíny

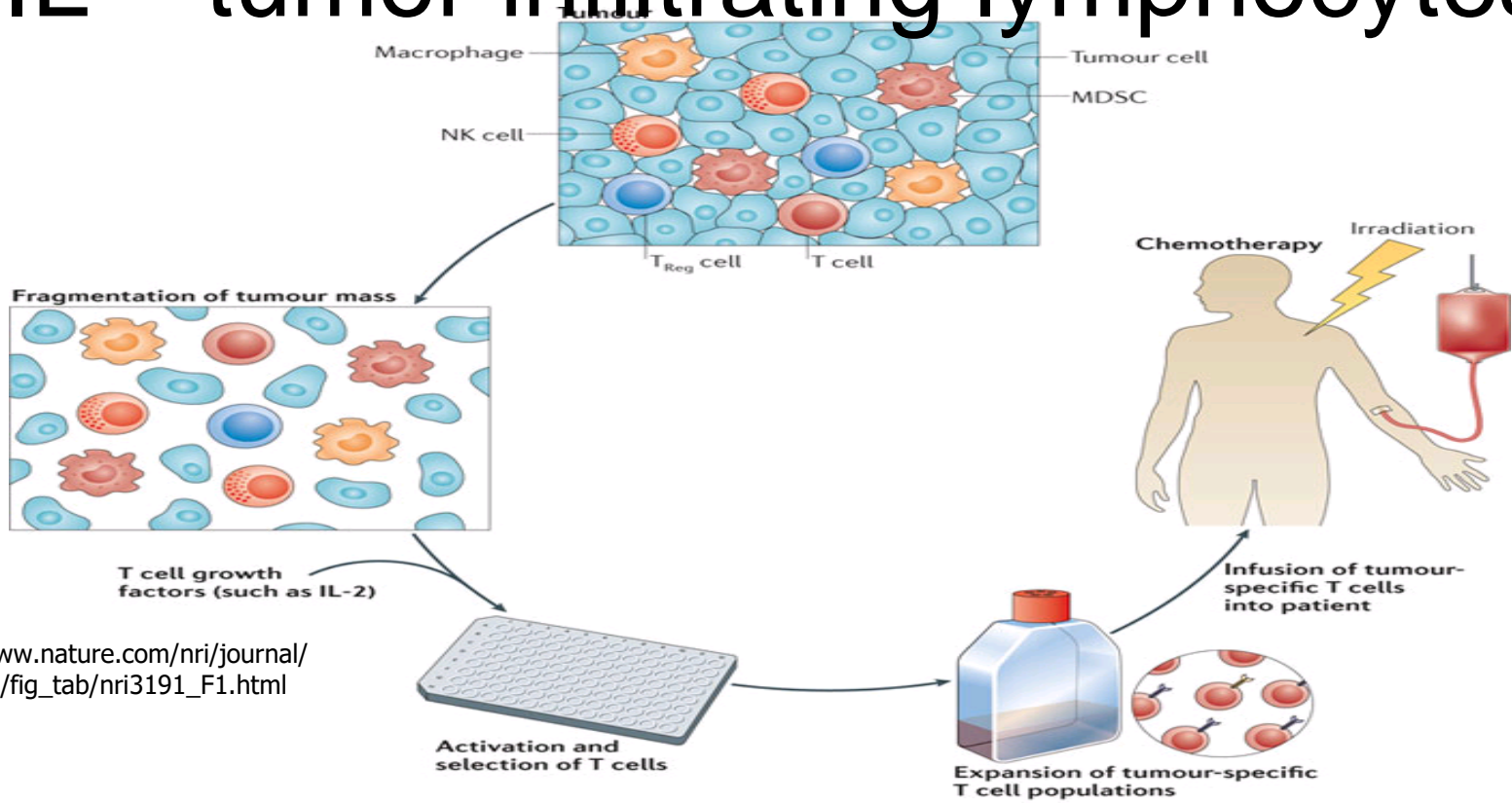


CAR

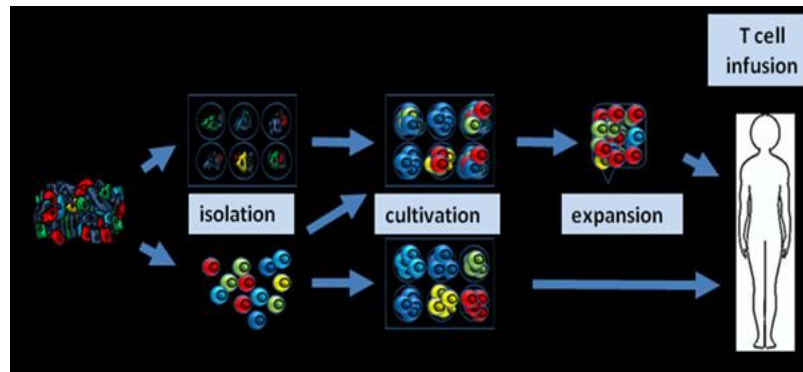
chimerické antigenní receptory T buněk

- 1-3 generace
- metody genetického inženýrství
- obchází HLA gp prezentaci
- antigen vážící doména scVF (single chain variable fragment), hinge oblast, transmembránová doména ,intracelulární signalizační domény aktivovné po navázání antigenu)
- **kombinace antigenní specifity s cytotoxicitou T lymfocytů**
- **geneticky modifikované T buňky mířící na TAA antigen**
- CD 19 CAR T

TIL – tumor infiltrating lymphocytes

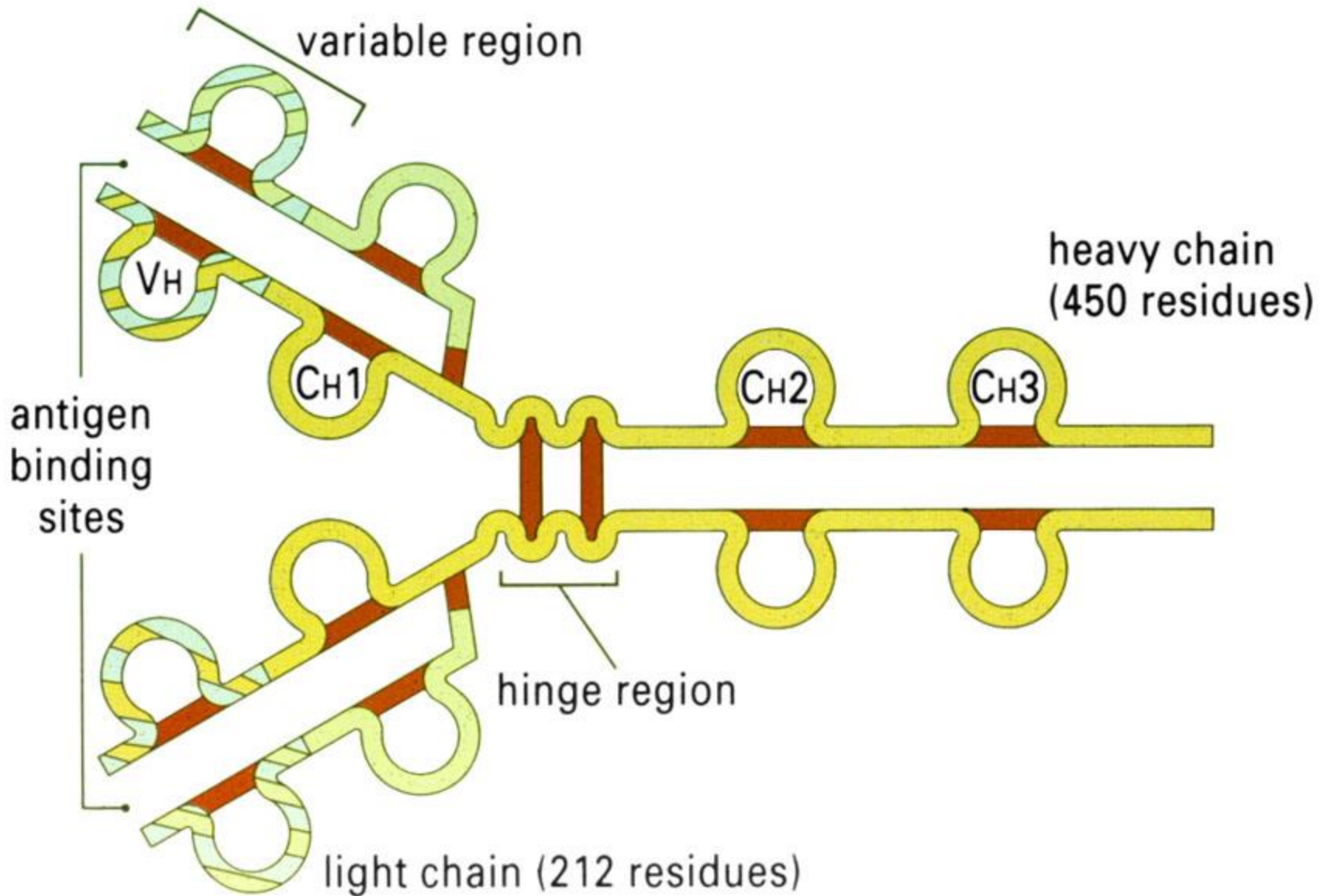


http://www.nature.com/nri/journal/v12/n4/fig_tab/nri3191_F1.html

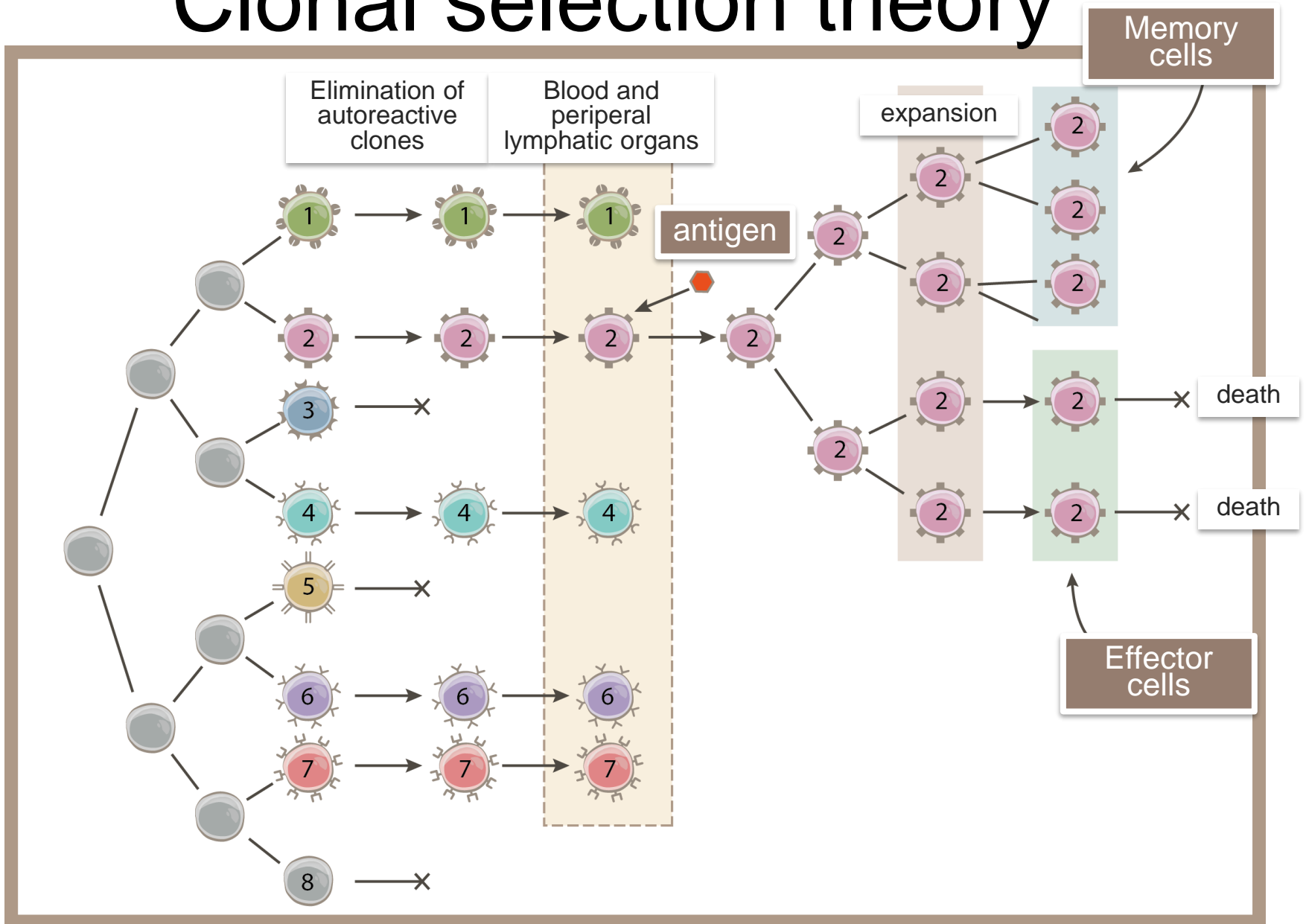


Monoklonální gamapatie

The basic structure of IgG1

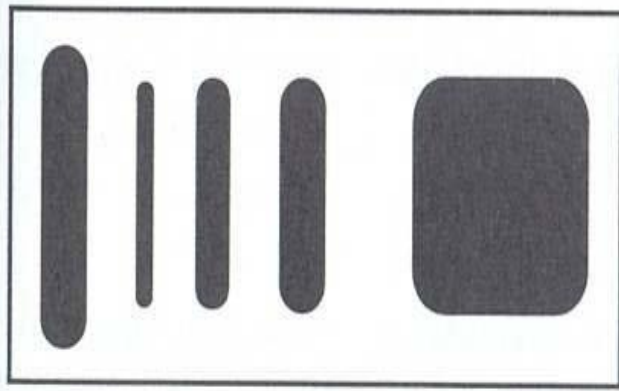


Clonal selection theory

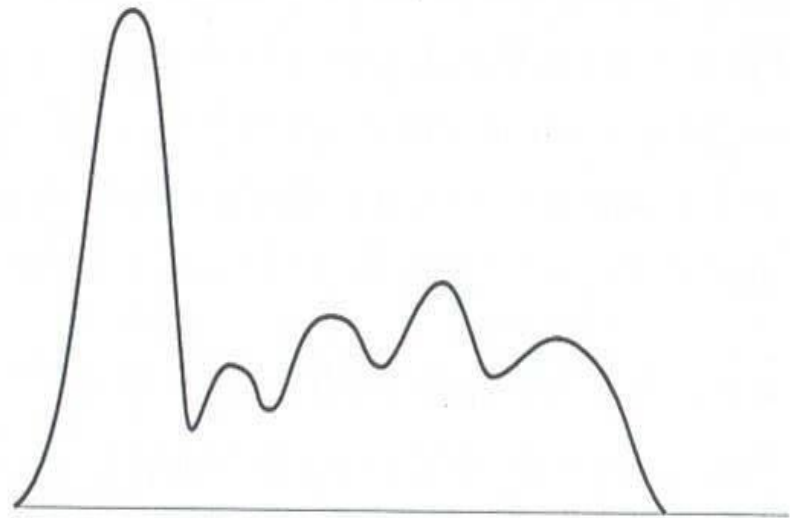


ELEKTROFORESA SÉRA

sérum zdravého jedince



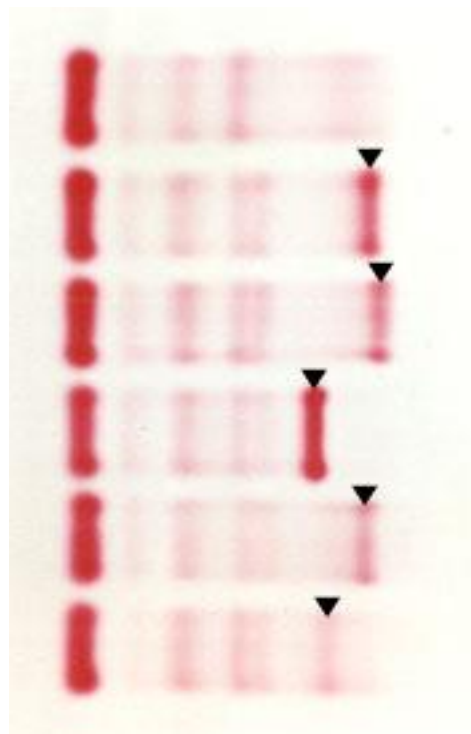
Alb. α_1 α_2 β γ



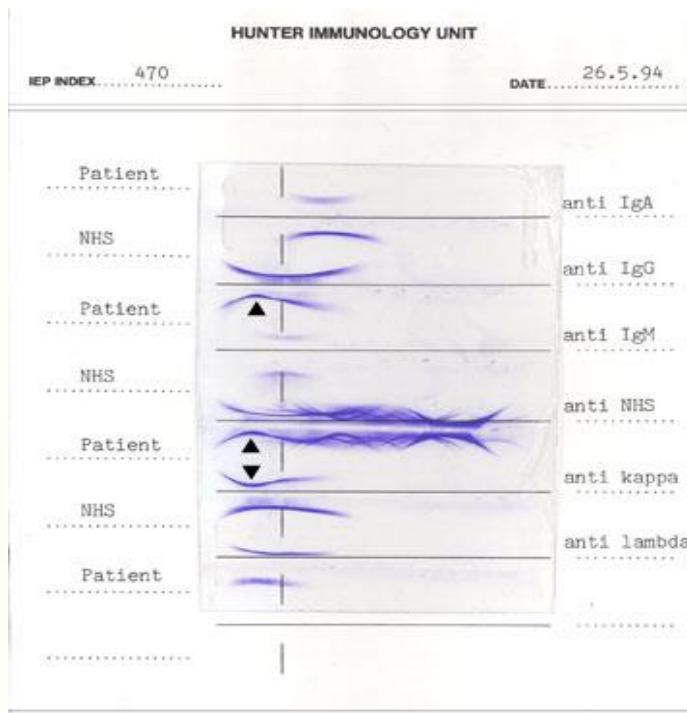
Albumin α_1 α_2 β γ

Možnosti vyšetření

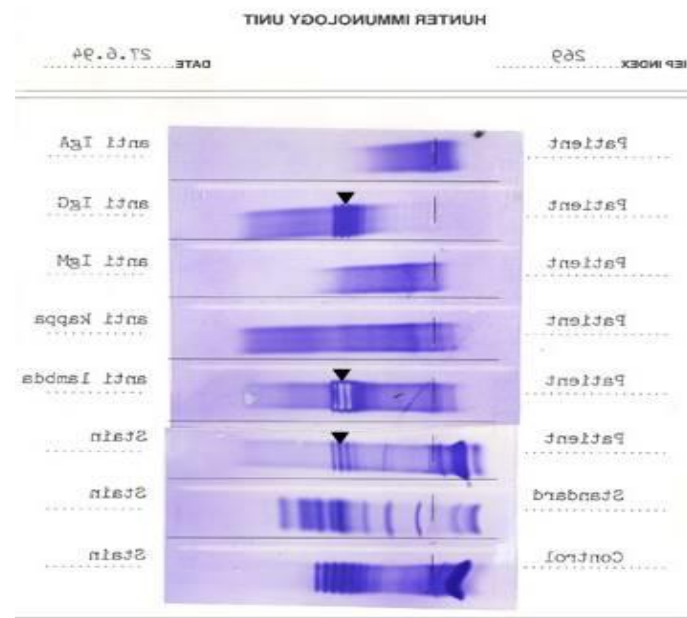
**Elektroforéza
Identifikace
monoklonálního Ig**



**Imunoelektroforéza
(antisérum IgG kappa)**



**Imunofixace
(antisérum IgG
lambda)**



Monoklonální gamapatie

- MGUS
- Mnohočetný myelom
- Waldenstromova makroglobulinemie
- AL amyloidosa

MGUS monoklonální gamapatie nejistého významu

**přítomnost monoklonálního imunoglobulinu v séru
nebo v moči pacientů bez známek MM, WM nebo AL**

nejsou přítomny známky:

- maligní proliferace
- poškození organismu monoklonálním gamaglobulinem

Mnohočetný myelom

druhá nejčastější hematologická malignita

- 10% hematologických malignit
- onemocnění starší generace
- 5 leté přežití je cca 35 % a klesá s věkem
- medián přežití je 3 roky

Nádorová choroba vede i k imunodeficienci

Malígní procesy i protinádorová terapie tlumí aktivitu imunitního systému – příčiny jsou různorodé, zapojeny jsou mechanismy vrozené i získané imunity.

Důsledkem je snížení odolnosti vůči infekčním agens.

Objektivní posouzení schopnosti imunologické reaktivity pacientů s nádorovou chorobou je žádoucí jak vzhledem k infekčním komplikacím, tak vzhledem k účinku imunoterapie.