

**HLA ANTIGENY**

**IMUNOLOGIE**  
**TRANSPLANTACÍ**

praktikum č. 11

# Major histocompatibility complex (MHC)

## Human leukocyte antigens (HLA)

soubor 40-50 genů seřazených v úseku DNA  
na chromozomu 6

hlavní histokompatibilní komplex (MHC) se u lidí  
nazývá HLA (human leukocyte antigens)

# MHC

**(major histocompatibility complex)**

soubor molekul zodpovědných za odvržení  
transplantované tkáně nebo orgánu  
(odtud název)

**hlavní úloha MHC spočívá v prezentaci  
antigenů T lymfocytům**

MHC u člověka →  
**HLA (human leukocyte antigen)**

# STRUKTURA MOLEKUL MHC

**prostorová struktura MHC I. a II. třídy je podobná**

## **MHC I. třídy**

těžký řetězec  $\alpha$  nekovalentně spojen s  $\beta$ 2-mikroglobulinem  
(kódovaným mimo MHC oblast)

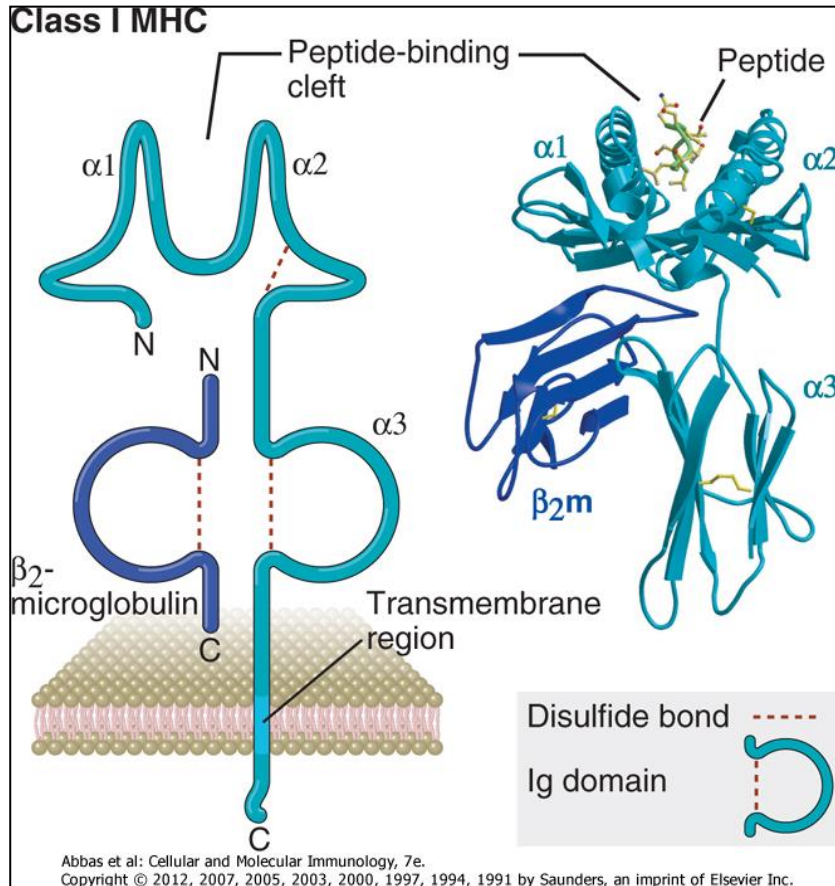
řetězec  $\alpha$  tvořen doménami pro vazbu peptidu ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2),  
doménou podobnou imunoglobulinové doméně ( $\alpha$ 3),  
transmembránovou a cytoplazmatickou částí

## **MHC II. třídy**

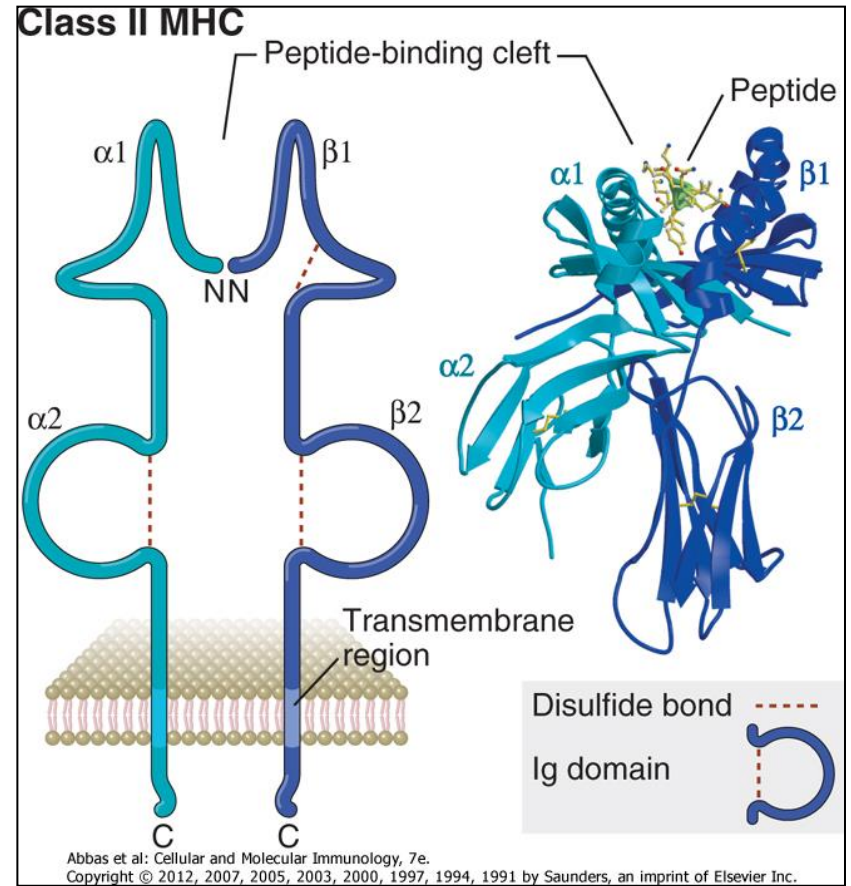
heterodimery 2 těžkých řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  spojených  
nekovalentní vazbou

řetězce tvořeny doménami pro vazbu peptidu ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 1),  
doménami podobnými imunoglobulinové doméně ( $\alpha$ 2,  $\beta$ 2),  
transmembránovými a cytoplazmatickými částmi

# SCHÉMA MHC I



# SCHÉMA MHC II



# CHARAKTERISTIKA GENŮ MHC

Dvě třídy: **MHC I a MHC II**

MHC I předkládají (presentují) peptidy lymfocytům CD8+

MHC II předkládají (presentují) peptidy lymfocytům CD4+

## **POLYMORFISMUS**

Geny MHC jsou nejpolymorfnějšími geny v genomu  
(cca 500 alel HLA)

## **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 GENŮ MHC

dvě třídy: **MHC I a MHC II**

**klasické MHC glykoproteiny I. třídy**

3 IZOTYPY → HLA-A, HLA-B, HLA-C

**neklasické MHC glykoproteiny I. třídy**

HLA-E, HLA-F, HLA-G a také CD1

nejsou produkty MHC genů, ale strukturálně a funkčně k nim mají velmi blízko

**MHC glykoproteiny II. třídy**

3 IZOTYPY → HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP

# CHARAKTERISTIKA INTERAKCÍ MEZI MHC A PEPTIDY

## MHC molekuly neodlišují peptidy vlastní a cizí

imunnogenost 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-g

# PŮVOD A ZPRACOVÁNÍ ANTIGENŮ

## HLA antigeny I. třídy

prezentuje **cytoplazmatické antigeny**  
(peptidové fragmenty proteinů kódovaných infikujícími viry  
či intracelulárními parazity, peptidy aberovaných buněk,  
např. nádorových, extracelulární antigeny uvolněné do  
cytoplazmy a podobně)



proteolytická degradace antigenů v proteasomech

transport peptidů do ER → vazba na molekulu HLA I

komplex HLA I s antigenem přes Golgiho systém exocytózou  
na povrch buňky

# PŮVOD A ZPRACOVÁNÍ ANTIGENŮ

## HLA antigeny II. třídy

prezentuje pohlcené **extracelulární peptidy**  
(mikrobiální antigeny)



proteolytická degradace proteinů v endosomech  
a lysozomech

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 glykoproteinech I. nebo II. třídy (tzv. fenomén MHC-restrikce)

## **MHC I. třídy**

prezentace antigenů  
cytotoxickým T lymfocytům CD8+

## **MHC II. třídy**

prezentace antigenů  
pomocným T lymfocytům CD4+

# GENETIKA HLA

HLA systém je 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 (2 haplotypy) → jeden  
od každého z rodičů

## **vysoká míra polymorfizmu**

geny MHC jsou nejpolymorfnějšími geny v genomu  
je obtížné najít 2 jedince s plnou shodou MHC genů

# HLA TYPIZACE

stanovení HLA výbavy konkrétního jedince

serologické techniky – stanovení antigenu  
(HLA-A2)

mikrolymfocytotoxický test

HLA I. třídy (na ústupu)

cross-match test

screening anti-HLA protilátek

relativně rychlá a levná

molekulárně genetické metody – určení alely  
(HLA-A\*0201)

sekvenčně specifická PCR, hybridizace specifických sond,  
sekvenace

vyšší přesnost a spolehlivost typizace

nízké (HLA-DR\*03) nebo vysoké (HLA-DR\*0302) rozlišení

vyšší náklady

# **KLINICKÉ VYUŽITÍ HLA TYPIZACE**



asociace molekul HLA systému s chorobami

transplantologie

# ASOCIACE MOLEKUL HLA SYSTÉMU S CHOROBAMI

choroby s imunologickou patogenezí  
(např. revmatoidní artritida, juvenilní diabetes, celiakie a další)

choroby s etiopatogenezí nejasnou  
(m. Bechtěrev, psoriasis vulgaris)

choroby, u nichž se imunopatogenetický mechanismus  
neuplatňuje  
(narkolepsie, idiopatická hemochromatóza, adrenogenitální syndrom)

## **možné příčiny**

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

**narkolepsie**

HLA-DQ6

**M. Bechtěrev**

HLA-B27

**Celiakie**

HLA-DQ2 a HLA-DQ8

**juvenilní diabetes mellitus**

HLA-DR3/4

**revmatoidní arthritida**

HLA-DR4

# 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 (90%) je HLA-B27 pozitivních (x 3-10%  
zdravých; vysoká negativní prediktivní hodnota vyšetření!)  
jen u asi 2% HLA-B27 pozitivních pacientů se rozvine AS  
obvykle je přítomna hypergamaglobulinémie a zánětlivé  
příznaky

# CELIAKIE (GLUTENOVÁ ENTEROPATIE)

## klasické klinické příznaky

dítě ve věku 4–24 měsíců → zvracení, steatorhea, objemné stolice 1–3x denně, neprospívání, malá postava

v současnosti stále větší počet pacientů diagnostikován ve vyšším věku s **nevýraznými nespecifickými příznaky**  
průjmy, úbytek na váze, abdominální dyskomfort, únava, periferní neuropatie, nutriční deficiencie, anemie, osteoporóza, psychické poruchy, infertilita

neléčená celiakie je asociována se vznikem střevního lymfomu!

95% pacientů jsou nositelé **HLA-DQ2 a/nebo HLA-DQ8**  
(také 20% zdravé populace; vysoká negativní prediktivní hodnota vyšetření HLA)

# **CELIAKIE**

## **výskyt autoantiláték**

Ize prokázat protilátky proti řadě antigenů  
gliadinu  
endomysiu hladkého svalstva  
tkáňové transglutamináze

za nejspecifičtější je v současné době považováno  
vyšetření

**autoantiláték proti tkáňové  
transglutamináze (anti-tTG) ve třídě IgA**

# IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY TRANSFUZE KRVE

transfúze krve představuje nejčastější druh  
transplantace v klinické praxi



**polysacharidové antigeny krevních skupin**  
nejdůležitější je systém ABO

**proteinové antigeny**  
nejdůležitější je systém Rh

# IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY TRANSFUZE KRVE

## polysacharidové antigeny

### 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 tzv. bombajský fenotyp → nepřítomnost H-substance)

protilátky proti polysacharidovým antigenům krevních skupin → isohemaglutininy



vyskytují se přirozeně → **zejména ve třídě IgM**

# **PŘIROZENÉ ISOHEMAGLUTININY (IgM)**

**krvní skupina A** → isohemaglutininy anti-B

**krvní skupina B** → isohemaglutininy anti-A

**krvní skupina 0** → isohemaglutininy anti-A, anti-B

**krvní skupina AB** → isohemaglutininy anti-A ani anti-B  
nejsou přítomny

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

# TRANSFUSE KRVE

## system krevních skupin AB0

**O:** ceramid-Glu-Gal-GalNAc-Gal  
|  
Fuc

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

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



# IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY TRANSFUZE KRVE

## proteinové antigeny

### nejdůležitější je systém Rh

Rh faktor je pojmenován podle makaků *Macaca mulatta* (anglicky Rhesus Macaque), u kterých jej Landsteiner a Wiener objevili

Rh faktor je zapříčiněn skupinou zhruba 40 antigenů, ale nejvýznačnějších je pět antigenů uložených na třech genech → nejdůležitější je antigen D



protilátky proti antigenu D se vyskytují až po antigenní stimulaci → **podstatné zejména ve třídě IgG**

# **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

sensitizace Rh- matek plodem Rh+

v následné graviditě IgG anti-Rh protilátky přestupují  
přes placentu

## **hemolytický účinek**

Komplementový systém, fagocyty, NK buňky →  
erythroblastosis fetalis

**diagnostika** → Coombsův antiglobulinový test (přímý,  
nepřímý)

**profylaxe** → anti Rh sérum do 72 hodin po porodu nebo  
abortu

# **TRANSFÚZE KRVE**

## **komplikace**

po převodu krve neslučitelné v systému ABO 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 na imunologickém podkladě**

**reakce vyvolané protilátkami proti leukocytům a trombocytům**

asi u 1/3 nemocných s těmito protilátkami po opakovaných transfuzích



do 3 hodin po převodu se mohou rozvinout příznaky (horečka, třesavka, zimnice, bolesti hlavy, zrudnutí, tlak na hrudi, kašel)

alergické reakce → kopřivka, laryngospasmus

anafylaktoidní reakce → anti-IgA protilátky

aloimunizace

# TRANSFÚZÍ INDUKOVANÁ GVHR

podané lymfocyty obsažené v transfuzním přípravku mohou u imunokompromitovaných pacientů nebo při příbuzenské transfuzi uniknout imunitnímu dohledu příjemce a následně reagovat na antigeny příjemce a projít klonální expanzí a tvořit protilátky proti příjemci

může být způsobena podáním neozářené krve imunodeficitnímu pacientovi (např. T-buněčný primární imunodeficiency, leukémie) → terapeuticky prakticky nezvládnutelná



imunokompromitovaným pacientům nutné podávat ozářené transfuzní přípravky (deleukotizace není dostatečně efektivní)

# TRANSPLANTACE

přenosy tkání nebo orgánů  
nahrazují nefunkční tkáň nebo orgán příjemce zdravým  
ekvivalentem

## typy transplantací

dle příjemce → autogenní (přenos z téhož jedince),  
isogenní (přenos z monogenního jedince –  
jednovaječného dvojčete), alogenní (přenos z jiného  
jedince téhož druhu), xenogenní (přenos z jedince jiného  
druhu)

dle štěpu → orgánové/tkáňové

zásadní úloha imunitních pochodů → význam MHC

**rejekce** (odvržení, odhojení) štěpu

**reakce štěpu proti hostiteli (Graft Versus Host Reaction)**

# **HLA A TRANSPLANTACE**

**shoda mezi dárcelem 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)



# TRANSPLANTACE VYŠETŘENÍ PŘÍJEMCE ŠTĚPU

určení krevní skupiny AB0

typizace HLA I (A, B, C) a HLA II (DR, DQ) třídy

přítomnost autoprotilátek

preformované aloprotilátky

crossmatching

kultivace směsi lymfocytů

# TYPIZACE HLA

## **typizace HLA I (A, B, C), HLA II (DR, DQ)**

transplantace ledvin (A, B, DR → nízké rozlišení)

HSCT (A, B, C, DR, DQ → vysoké rozlišení)

## **SEROLOGICKÉ METODY**

### lymfocytotoxický test

reakce protilátek s antigenními determinantami na povrchu lymfocytů

(jamky mikrotitračních destiček s různými protilátkami proti HLA –  
přidání lymfocytů – tvorba imunokomplexů – aktivace komplementu  
– lýza buněk – barvení – odlišení živých a mrtvých buněk)

## **MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ TYPIZACE**

PCR

# PREFORMOVANÉ ALOPROTILÁTKY

screening výskytu preformovaných anti-HLA protilátek  
(porody, transfúze, transplantace)

zejména protilátky IgG anti-HLA I. třídy mohou být  
spojeny s rizikem hyperakutní rejekce

vlastní stanovení se provádí testováním séra za využití  
buněčného panelu několika desítek buněk, jenž mají  
známé HLA antigeny

testování probíhá pomocí lymfocytotoxického cross-  
match testu nebo pomocí metody ELISA či průtokové  
cytometrie (výrazně citlivější cross-match test)

# CROSS MATCH TEST

po nalezení vhodného dárce testuje, zda pacient nemá protilátky specificky reagující s buňkami dárce



sérum příjemce + lymfocyty dárce

cytotoxický test či průtoková cytometrie

# TRANSPLANTACE

## rejekce štěpu

### rejekce hyperakutní

rozvoj během minut

protilátky proti ABO nebo preformované protilátky  
proti HLA antigenům

### rejekce akutní

po prvním týdnu

je způsobena efektorovými lymfocyty T příjemce,  
namířenými proti HLA antigenům dárce, a protilátkami

### rejekce chronická

asi po půl roce

reakce pozdní přecitlivělosti, vedoucí k fibróze, poškození cév  
a ztrátě funkce štěpu

imunosupresivní léčba

# TRANSPLANTACE HEMATOPOETICKÝCH BUNĚK

užívá se buď kostní dřeň nebo izolované periferní CD34+  
kmenové buňky

cílem je osídlit dřeň příjemce kmenovými buňkami dárce  
s následnou obnovou krvetvorby

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

### **klinické příznaky**

makulopapulární exantém, generalizovaná erythrodermie, puchýře, deskvamace

hepatopatie, zvýšení koncentrace bilirubinu v séru  
průjem, velké bolesti břicha, ileus

# 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



suspenze kmenových buněk bez T lymfocytů + injekce malého množství T lymfocytů dárce

(T lymfocyty vzniklé z nové kostní dřeně prochází thymovou výchovou)



# IMUNOSUPRESIVNÍ LÉČBA

indikována především u autoimunitních chorob, vaskulitid, a u pacientů po transplantacích

výjimečně používána u těžkých alergických chorob nebo u onemocnění způsobených nadměrnou aktivací T-lymfocytů (psoriáza)



léčba vždy vede k sekundárnímu imunodeficitu - náchylnosti k infekcím a častějšímu výskytu malignit, zejména lymfatického systému  
ke snížení výskytu vedlejších reakcí se obvykle používá kombinovaná léčba

<b>MECHANISMUS ÚČINKU</b>		<b>IMUNOSUPRESIVUM</b>
ovlivnění genové exprese		glukokortikoidy
ovlivnění metabolismu DNA	alkylační agens	cyklofosfamid
	inhibice syntézy purinů	azathiorin, kladribin, mykofenolát
	inhibice syntézy pyrimidinů	leflunomid, teriflunomid
	antifolika	metotrexát
vazba na imunofiliny	kalcineuronové inhibitory	cyklosporin, takrolimus, pimekrolimus
	inhibitory mTOR	sirolimus, everolimus
kinázové inhibitory		nintedanib, tofacitinib, baricitinib
imunoglobuliny	polyklonální	IVIG, anti-thymocytární globulin
	monoklonální	viz následující slide
fúzní proteiny a analoga cytokinů		abatacept, belatacept, etanercept
analoga cytokinů		anakinra
další		apremilast, fingolimod, pirfenidon, talidomid, lenalidomid, pomalidomid

# PŘEHLED MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK REGISTROVANÝCH V ČR JAKO IMUNOSUPRESIVA

MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY		POUŽITÉ V KLINICKÉ PRAXI
infliximab	anti-TNFα	revmatoidní a psoriatická artritida, psoriáza, Crohnova choroba, ulcerózní kolitida, ankylozující spondylartritida
rituximab	anti-CD20	revmatoidní artritida, mikroskopická polyangiitida a granulomatóza s polyangiitidou
natalizumab	anti-alfa-4-integrin	roztroušená skleróza
brodalumab	anti-IL-17	psoriáza
ekulizumab	anti-C5	paroxysmální noční hemoglobinurie, atypický hemolytickoureemický syndrom, myasthenia gravis
tocilizumab	anti-IL-6	revmatoidní a juvenilní idiopatická artritida
kanakinumab	anti-IL1β	syndromy periodických horeček, Stillova choroba a dnava artritida
další monoklonální protilátky registrované v ČR jako imunosupresiva		adalimumab, alemtuzumab, basiliximab, belimumab, brodalumab, certolizumab pegol, ekulizumab, golimumab, guselkumab, ixekizumab, okrelizumab, sarilumab, sekukinumab, ustekinumab, vedolizumab

# **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- $\alpha$ , IL-2)  
snížení exprese adhezivních molekul  
inhibice exprese HLA antigenů II. třídy  
inhibice fosfolipázy A<sub>2</sub> v granulocytech → blok tvorby metabolitů kyseliny arachidonové

Vedlejší nežádoucí činky → redistribuce tuku, vznik vředové choroby, steroidní diabetes, hypertenze, poruchy růstu dětí, hypokalémie, osteoporóza, katarakta, psychózy a další

# IVIG V LÉČBĚ AUTOIMUNITNÍCH CHOROB A VASKULITID

léčba je někdy vysoce účinná → nelze však predikovat u kterého konkrétního pacienta

vysoké náklady na léčbu

jednoznačnou indikací je prevence koronárních aneurysmat u Kawasakiho choroby

## **možné mechanismy**

blokáda Fc-receptorů na fagocytujících buňkách  
inhibice tvorby protilátek včetně autoprotilátek  
přítomnost anti-idiotypových protilátek  
inhibice aktivace komplementového systému