



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

Imunologie

vypracované otázky

2021

1. Teoretická imunologie	7
1 — Imunologie, imunita	8
2 — Primární lymfatické orgány	10
3 — Sekundární lymfatické orgány	12
4 — Buněčné elementy nespecifické imunity	14
5 — Antigen prezentující buňky (APC)	18
6 — Úloha makrofágů	20
7 — Buněčné elementy specifické imunity	22
8 — Vztah buněk vrozené a získané imunity	24
9+10 — Komplement	28
11 — Protilátky	30
12 — Vazba protilátka-antigen	32
13 — Aktivace B-lymfocytů, protilátková odpověď	33
14 — IgE	37
15 — Protilátková heterogenita	38
16 — Antigeny, hapteny, alergen...	40
17 — Antigenicita	41
18 — MHC	42
19 — HLA-I, HLA-II	44
20 — Cytokiny a chemokiny	46
21 — Adhezivní molekuly	48
22 — T-lymfocyty	50
23 — TcR	52
24 — Th-lymfocyty	54
25 — Regulační lymfocyty	57
26 — Cytotoxické lymfocyty	58
27 — NK buňky (natural killers)	60
28 — Spolupráce T a B lymfocytů	62
29 — B1-lymfocyty, $\gamma\delta$ T-lymfocyty	63

2. Vyšetřovací metody v imunologii	65
1 — Vyšetření imunodeficitu	66
2 — Základy alergologického vyšetření	70
3 — Odběr biologického materiálu v imunologii	72
4 — Polyklonální a monoklonální protilátky	74
5 — Vyšetření parametrů humorální imunity	76
6 — Vyšetření populací lymfocytů a jejich funkcí	84
7 — Vyšetření funkce fagocytujících buněk	88
8 — Vyšetření HLA	90
9 — Molekulárně genetické metody v imunologii	92
10 — Diagnostika imunodeficitů	96
11 — Diagnostika nádorových onemocnění	98
12 — Diagnostika autoimunitních onemocnění	100
13 — Diagnostika alergií	104
14 — Před a potransplantační vyšetření	106
15 — Význam vyšetření HLA polymorfismu	108

3. Klinická imunologie a alergologie	111
1 — Alergická reakce I. typu	112
2 — Reakce přecitlivělosti II. typu	114
3 — Imunokomplexový typ přecitlivělosti	116
4 — Reakce pozdní přecitlivělosti	117
5 — Buňky a mediátory alergické reakce	118
6 — Alergická rhinitida	120
7 — Asthma bronchiale alergické	122
8 — Anafylaktická reakce	124
9 — Lékové alergie	126
10 — Potravinová alergie	128
11 — Potravinové intolerance	130
12 — Alergie na jed blanokřídlého hmyzu	132
13 — Imunodeficientní stavy	134
14 — SCID	136
15 — Vrozené imunodeficiency	137
16 — Získané imunodeficiency	142
17 — Možnosti léčby imunodeficitů	144
18 — Imunostimulancia	146
19 — Imunosupresiva	148
20 — Imunomodulancia	152
21 — Specifická alergenová imunoterapie (SAIT)	154
22 — Biologická léčiva v imunologii	155
23 — Vakcinace a očkování	156

1. Teoretická imunologie

1 — Imunologie, imunita

Co je imunologie, imunita, vztahy imunitního systému k systému neuroendokrinnímu.

Imunologie

- a) věda, která zkoumá imunitní systém
 - anatomie a buněčné prvky imunitního systému
 - imunitní odpověď, imunopatologické reakce
 - transplantační imunologie
 - imunologie infekcí a nádorů
 - imunoterapie, očkování
- b) odvětví medicíny s širokým záběrem
 - klinická imunologie spolupracuje téměř se všemi základními medicínskými obory, neboť imunopatologické mechanismy postihují v podstatě všechny orgány lidského těla
 - zabývá se studiem, diagnostikou, léčbou a prevencí nemocí, vzniklých na imunopatologickém základě
 - v systému ČR se obor nazývá „alergologie a klinická imunologie“, zabývá se pacienty s:
 - alergickými chorobami
 - závažnými primárními imunodeficity
 - systémovými autoimunitními onemocněními
 - laboratorní složka imunologie zajišťuje specializovanou laboratorní diagnostiku, vycházející z principů imunitních reakcí

Imunita

- **schopnost organismu bránit se antigenům z vnějšího i vnitřního prostředí** (patogenní organismy, nádorové buňky), v užším smyslu znamená odolnost organismu proti chorobě
- účastní se:
 1. **obranyschopnosti** — obrana proti infekcím
 2. **imunitního dohledu** — odklizení vlastních poškozených buněk (tzv. přirozená autoreaktivita)
 3. **nastavení autotolerance** — vůči vlastním tkáním na centrální a periferní úrovni
- tradičně se rozděluje na **nespecifickou (vrozenou)** a **specifickou (získanou)** imunitu

Vztah imunitního a nervového systému

- patří spolu s nervovým a endokrinním systémem k **regulačním systémům**
- fyziologicky významný vzájemný regulační vztah mezi systémy:
 - některé neurotransmitery působí přímo na leukocyty, které pro ně mají receptory
 - je přímý kontakt nervových zakončení a mastocytů, degranulace vyvolává stahy hladké svaloviny a bolest
 - na leukocyty působí mnoho endokrinních hormonů (kortikosteroidy, růstový hormon, tyroxin, endorfiny atd.), mají receptory
 - leukocyty produkují řadu hormonů (endorfiny, ACTH, TSH, STH, D3)
 - cytokiny aktivní v imunitním systému působí i na nervový systém (IL-1, IL-6, TNF)
 - vliv emocionálního stresu na imunitní systém — zřejmě přes kortikosteroidy (hojení ran, aktivita fagocytů a NK buněk, imunopatologické reakce)



How The Immune System ACTUALLY Works – IMMUNE

Kurzgestagt – In a Nutshell

<https://youtube.com/watch?v=IXfEK8G8CUI>



Tiny Bombs in your Blood – The Complement System

Kurzgestagt – In a Nutshell

<https://youtube.com/watch?v=BSypUV6QUNw>

2 — Primární lymfatické orgány

Struktura lymfatického systému — primární lymfatické orgány.

- mezi primární (centrální) lymfatické orgány zařazujeme thymus a kostní dřeň
- jsou **tvořeny retikulárním epitelem**
- vznikají v nich „naivní“ **lymfocyty** (bez kontaktu s antigenem), jsou arteriální **krví přiváděny do uzlin**, přestupují přes cévní stěnu a dochází ke stimulaci

Thymus (brzlík)

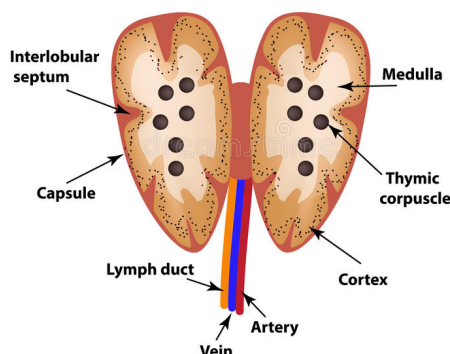
- vzniká ze 3. a 4. žaberní výchlípky
- thymus leží v předním horním mediastinu
- jeho velikost se s věkem mění, největšího rozvoje dosahuje v dětství, od puberty dochází k pomalému zániku a nahrazování tukovou tkání
- skládá se ze dvou laloků, které jsou rozděleny do lalůčků
- povrch orgánu je kryt tenkou vazivovou blánou (capsula), jež vniká dovnitř a tvoří septa, která dělí laloky na menší lalůčky (lobuli)
- jeho stromatem je retikulární epitel; v okách síťovitě uspořádaného epitelu jsou zachyceny vcestovalé lymfocyty, které vznikají v kostní dřeni
- každý lobulus má 2 části:

1. kůra (cortex) — při okrajích lalůčku, tmavší

- obsahuje velké množství T-lymfocytů, které se zde diferencují a množí
- do jejich membrány jsou zde zabudovávány integrální membránové proteiny umožňující identifikaci a funkci T-lymfocytu (imunokompetenci a autotoleranci) — tento proces je řízen cytokiny a chemokiny produkovanými epitelovými buňkami thymu
- do kůry pronikají pouze krevní kapiláry somatického typu s výstelkou souvislou, jejichž endotelová stěna je součástí hematothymické bariéry, která chrání vyvíjející se T-lymfocyty před antigeny

2. dřeň (medulla) — uvnitř lalůčku, světlejší

- oproti kůře je dřeň thymu slaběji zbarvena, což je způsobeno nižším počtem přítomných T-lymfocytů
- z kůry odcházejí do dřeně jen správně funkční lymfocyty, nefunkční jsou likvidovány makrofágy, část je likvidována i apoptózou (asi 98% naivních T-lymfocytů)
- speciálními útvary dřeně thymu jsou Hassalova tělíska, která vznikají keratinizací buněk retikulárního epitelu; jejich počet a velikost s věkem roste, časem mohou až kalcifikovat
- na hranici mezi kůrou a dření se vyskytují postkapilární venuly s vysokým endotelem (HEC, high endothelial cells); jejich stěnou prostupují T-lymfocyty do krevního oběhu a osidlují thymodependentní oblasti periferních lymfatických orgánů



Kostní dřeň

- měkká tkáň makroskopicky různého vzhledu
- vyplňuje dřevnou dutinu (cavitas medullaris) v tělech dlouhých kostí a dále všechny prostírky mezi tramečky spongiosy

1. červená kostní dřeň

- orgán krvetvorby
- skládá se z prostorové sítě retikulárního vaziva, makrofágů a širokých krevních vlásečnic
- v okách vaziva jsou kmenové buňky pro tvorbu erytrocytů, většinu leukocytů a krevní destičky
- u dětí vyplňuje všechny kosti
- v dospělosti se červená kostní dřeň nachází v trámčích spongiózních kostí (proximální konce humeru a femuru, krátké kosti zápěstí a zánarčí, sternum, těla obratlů, žebra, lopatky, kosti pánevní, kosti lebky)

2. žlutá kostní dřeň

- vzniká z červené kostní dřevě
- ve dřeví dlouhých kostí během růstu ustává krvetvorba, retikulární vazivo je prostupováno tukovými buňkami a červená dřeň se mění ve žlutou
- ve 20 letech je žlutá kostní dřeň v dutinách všech dlouhých kostí
- je schopna reaktivace na červenou kostní dřeň

3. šedá kostní dřeň

- je gelatinózní, průsvitná a vzniká ze žluté dřevě ztrátou tuku
- typická pro pozdní věk

Vlastní krvetvorba

- probíhá v červené kostní dřeví, kde se nacházejí vývojová stadia různých krevních buněk
- hemopoetické kmenové buňky nejsou diferencované, v dělení jsou málo aktivní, jsou však schopné se celoživotně obnovovat
- jejich dceřiné buňky tvoří různě diferencované buněčné linie, které se dále opakovaně člení až do zralého typu krevní buňky
- během tohoto děje jsou buňky schopny opakovaného dělení (důležité pro hromadnou produkci), ale ztrácejí schopnost sebeobnovy a jejich možnosti diferenciací se stále zužují (pevně určené progenitorové buňky — CFU, colony forming units)
- řízení krvetvorby — cytokiny
 - erythropoetin (EPO) — tvorba v ledvinách, podnětem je hypoxie
 - trombopoetin (TPO) — tvorba v hepatocytech
 - kolonie stimulující faktor (CSF) — podle působení na určitou CFU:
 - G-CSF — růstové faktory pro granulocyty
 - GM-CSF — růstové faktory pro granulocyty a monocyty

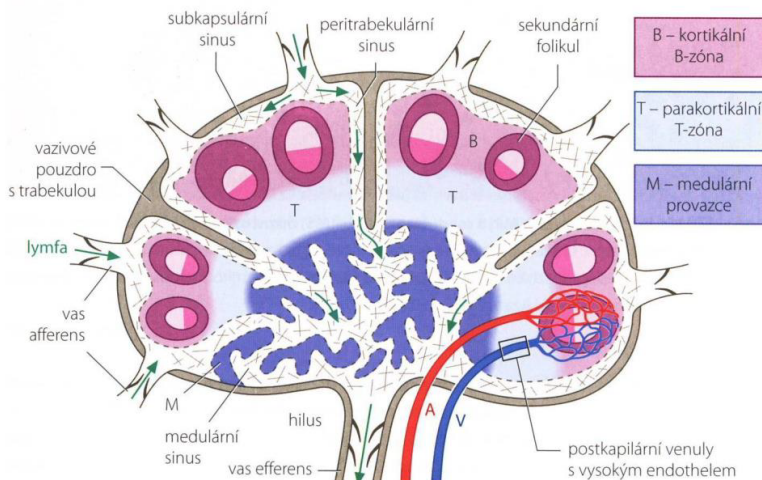
3 – Sekundární lymfatické orgány

Struktura lymfatického systému – sekundární lymfatické orgány.

- sekundární (periferní) lymfatické orgány jsou vysoce specializované orgány, kde probíhá **hlavní fáze antigenně specifických imunitních reakcí**

Lymfatické uzliny

- malé, oválné útvary, velikosti od několika mm po 1-2 cm
- jsou vloženy do průběhu lymfatických cév a slouží jako filtr pro lymfu
- po obvodu do uzliny vstupují aferentní lymfatické cévy, zpravidla jedna eferentní céva opouští uzlinu v hilu
- pouzdro uzliny tvořeno vazivem, vycházejí z něj trabekuly, které rozdělují uzlinu na menší lalůčky
- **parenchym tvořen retikulárním vazivem** (retikulum – prostorová síť, tvořená retikulárními buňkami a retikulárními vlákny); rozděljuje se na:
 1. **kůra (cortex)** – dále se dělí na:
 - a) **zevní kůra** – obsahuje lymfatické folikuly a B-lymfocyty
 - b) **vnitřní kůra (tzv. parakortex)** – neobsahuje folikuly, tvořena difúzní lymfatickou tkání; obsahuje T-lymfocyty
 2. **dřeň (medulla)** – tvořena medulárními trámcí, mezi nimiž probíhají sinusy
 - **sinusy** – kapilární prostory, štěrbiny v lymforetikulární tkáni; aferentní cévy ústí do subkapsulárního (marginálního) sinusu, protékajícího mezi pouzdrem a vlastní lymfatickou tkání uzliny – z něj směřují paprscitě skrz kůru peritrabekulární sinusy, z nichž se ve dřeň stávají široké medulární sinusy; jejich splynutím se v oblasti hilu utváří eferentní lymfatická céva
- **primární folikuly** – obsahují klidové B-lymfocyty, které nebyly stimulovány antigenem
- **sekundární folikuly** – obsahují v centru světlejší oblast s menším množstvím malých lymfocytů (tzv. germinální centrum), vzniká po antigenní stimulaci a obsahuje větší stimulované lymfocyty, bývají zde mitózy
- lymfatické uzliny slouží jako filtr lymfy, který zachycuje drobné částice a antigeny pomocí makrofágů a retikulárních buněk; odstraňují se také zaniklé buňky včetně erytrocytů
- antigeny, které se dostávají do uzlin, zachycují folikulární dendritické buňky (APC), následně se aktivuje imunitní systém – T-lymfocyty aktivují pomocí cytokinů B-lymfocyty k proliferaci, B-lymfocyty se dělí a transformují plazmatické buňky, které syntetizují protilátky
- lymfatické uzliny, které reagují na antigenní stimulaci se zvětšují, zárodeční centra mohou být několikanásobně větší, než v klidovém stavu



Slezina

- hmotnost asi 150 g, uložena intraperitoneálně v levé brániční klenbě
- na povrchu je kryta tuhým vazivovým pouzdrém; z pouzdra odstupují do nitra sleziny vazivové trámce, které neúplně člení parenchym pulpy
- na řezu jsou patrné světlé, cca 1 mm široké lymfatické folikuly (v souhrnu tvoří bílou pulpu), rovnoměrně rozložené mezi tmavočervenou houbovitou tkání červené pulpy (obklopuje tedy bílou pulpu a tvoří cca 75% objemu celé sleziny)
- krevní cévy — v hilu vstupuje do sleziny 4-6 větví a. lienalis, které se dále větví na trabekulární arterie, probíhající do nitra orgánu uvnitř vazivových trabekul; od výstupu z trámce jsou tepénky provázeny vrstvou lymfatické tkáně (periarteriální lymfatická pochva), tyto tepénky pak vstupují do lymfatických folikulů — po výstupu z uzlíků bíle pulpy se tepénka větví do červené pulpy jako aa. penicillatae (štětičkovité tepénky), na každé je krátký úsek ztluštění (Schweiggerovo-Seidelovo pouzdro, z retikulárních buněk), tepénka v tom místě má jen endotel, a buňky pouzdra zastupují ostatní vrstvy cévní stěny; po výstupu z pouzdra pokračuje tenká prekapilární tepénka a ta se otevírá do sinus lienalis
- **bílá pulpa** — největší periferní lymfatický orgán, reaguje na antigeny cirkulující v krvi, nejvýraznější reakce při septikémii, 2 části:
 1. periarteriální provazec obklopující arteriolu — převaha Th-lymfocytů
 2. lymfatické folikuly (Malpighiho tělíska) — převaha B-lymfocytů (místo tvorby plazmatických buněk a protilátek třídy IgM)
- **červená pulpa** — prostoupěna venózními sinusy, mezi nimi Billrothovy provazce
 - sinusy — široké venózní kapilární prostory, vystlány endotelovými buňkami, mezi nimiž jsou štěrby; bazální membrána je nesouvislá (připomíná obruče sudu)
 - Billrothovy provazce — sestávají z řídké sítě tvořené retikulárními buňkami, v této síti je smíšená buněčná populace (erytrocyty, granulocyty, plazmocyty, monocyty, trombocyty)
 - funkce — hematopoéza v prvním trimestru, zásobárna krve v dospělosti a destrukce starých a abnormálních krevních buněk

Slizniční imunita

- slizniční tkáň obsahuje převážnou část lymfoidních složek organismu a jsou také významnou lokalitou tvorby protilátek IgA
 - **MALT** (mucosa-associated lymphoid tissue) — slizniční imunitní systém
 - **O-MALT** (organized mucosa-associated lymphatic tissue) — organizovaná lymfoidní tkáň (například tonsily, M-celové oblasti, Peyerovy plaky)
 - **D-MALT** (diffuse mucosa-associated lymphatic tissue) — difúzní, neohraničená lymfoidní tkáň, tvoří makroskopicky zjevnou masu (například intraepitelové lymfocyty, lymfocyty v lamina propria)
 - **GALT** (gut-associated lymphoid tissue) — trávicí trakt (například M-buňky)
 - **BALT** (bronchus-associated lymphoid tissue) — dýchací trakt
 - **NALT** (nasal-associated lymphoid tissue) — sliznice nosních dutin
 - **VALT** (vulvo-vaginal-associated lymphoid tissue) — vulvo-vaginální sliznice
 - **CALT** (conjunctival-associated lymphoid tissue) — oční spojivky
- **klíčovou molekulou slizniční imunity je IgA1** (převažuje v krvi a v sekretech dýchacích cest; IgA2 převažuje v sekretech trávicího traktu)

4 — Buněčné elementy nespecifické imunity

Buněčné elementy účastnící se na nespecifické obranyschopnosti — epitelie, leukocyty

- buněčnou složku nespecifické (vrozené) imunity tvoří:
 1. leukocyty (makrofágy, monocyty, granulocyty, mastocyty, dendritické buňky, NK buňky)
 2. jiné typy buněk (například endotelové buňky, trombocyty)
- prostupu mikrobů tělem brání i překážky a bariéry anatomické
- základním mechanismem zabránění šíření mikrobů v nespecifické obraně je jejich likvidace pomocí fagocytů — pohlcovat korpuskulární materiál dovedou kdejaké buňky, ale pouze tzv. profesionální fagocyty dovedou pohlcené bakterie zabít; fagocyty jsou přítomny:
 - volně ve tkáních pod kůží a sliznicemi
 - strategicky rozmístěny v lymfatických uzlinách (očišťují lymfu)
 - v játrech (Kupfferovy buňky) odstraňují bakterie přinášené krví ze zažívacího traktu
 - ve slezina zachycují mikroby kolující v krvi

Leukocyty

1. Neutrofily

- neutrofily jsou pohybující se buňky vznikající z kmenových buněk v kostní dřeni, vyžívají zhruba 2 týdny
- během zánětu se rychle hromadí v místě poškození nebo infekce.
- v jejich cytoplasmě se vytvářejí granula dvojího typu
 1. **azurofilní** — obsahují lysozym, katepsin G, elastázu, myeloperoxidázu
 2. **specifická** — obsahují lysozym a laktoferin
- za fyziologického stavu část z nich volně adhezuje k endotelu, a volně se po něm koulí (tzv. rolling); dojde-li k poškození tkáně, objeví se na endoteliích cév v postižené oblasti molekuly, k nimž neutrofily přilnou daleko pevněji a lákány chemoatraktanty se protlačí skrze stěnu cévy (tzv. diapedeze) a zaměří do místa, z něhož vycházejí chemoatraktanty
- neutrofily žijí krátce, necelý den, nemají mitochondrie a své energetické požadavky ukájejí štěpením cytoplasmatického glykogenu (glykolýza je pochod anaerobní, neutrofily tedy dovedou účinkovat i za anaerobních podmínek, například v centru zánětlivého ložiska)
- funkce neutrofilů:
 1. **marginace k povrchu endotelu** — převalují se po povrchu endotelové výstelky (tzv. rolling) a postupně se přichytávají k povrchu těchto buněk, což je umožněno především adhezivními molekulami typu selektinů — selektiny jsou exprimovány jak na povrchu endotelií, tak leukocytů; k uvolnění selektinů na povrch endotelií přispívají histamin a některé mediátory, jako je TNF a IL-1
 2. **adheze k endoteliím a diapedeze** — proces adheze je zprostředkován především integriny, exprimovanými na povrchu leukocytů a reagujícími s ligandami, které exprimují aktivované endotelie (k jejich aktivaci je třeba chemokinů); adheze umožňuje transmigraci leukocytů skrze cévní stěnu (tzv. diapedeze); migrace je řízena chemokiny vytvořenými extravaskulární tkání, které stimulují pohyb neutrofilů podle chemického gradientu
 3. **chemotaxe** — pohyb leukocytů do místa zánětlivého ložiska, je založen na chemickém gradientu chemoatraktantů (například C3a a C5a, LTB4, IL-8)
 4. **fagocytóza** — viz otázku 1.6

2. Eozinofily

- cirkulují v krvi a vystupují do místa zánětlivého procesu, podobně jako neutrofilů — největší nahromadění těchto buněk je možné pozorovat v místě zánětlivé reakce na parazita nebo u alergických procesů, jako je asthma bronchiale
 - počet eozinofilů je při parazitární infekci typicky zvýšen, což je důležitým laboratorně diagnostickým znakem
 - jejich aktivita přispívá k některým patologickým stavům (atopie)
- obsahují acidofilní granula — ty obsahují kationické proteiny (eozinofilová peroxidáza a molekula fungující jako perforin)
- produkují leukotrieny, prostaglandiny a řadu cytokinů
- eozinofily nijak zvlášť dobře nefagocytyjí, po aktivaci ale tvoří velké množství aktivních kyslíkových metabolitů
- na povrchu eozinofilů jsou **receptory pro C3b** — mnozí helminti navazují na svůj povrch C3b a tím aktivují komplement alternativní dráhou; buňky parazitů sice odolávají lytickému účinku C9, ale takto aktivované eozinofily uvolňují svoji granulární výzbroj a poškozují povrch parazita

3. Žírné buňky (mastocyty)

- diferencují se z granulocytových prekurzorů v kostní dřeni a jsou v mnoha ohledech podobné bazofilům
- jejich hlavní funkcí není fagocytóza, fungují více jako buňky sekreční — základní funkcí je obrana proti parazitárním infekcím a také zřejmě role při regulaci imunitní odpovědi, zabezpečování fyziologických funkcí sliznic a přispívají k normálnímu metabolismu pojivových tkání
- za patologických okolností jsou zodpovědné za časný typ přecitlivělosti (I. typ)
- charakteristickým receptorem žírných buněk je **vysokoafinní Fc receptor pro IgE** — po vazbě antigenu dojde k aktivaci a degranulaci buňky — uvolněné fyziologicky účinné látky jednak přímo poškozují napadeného parazita, jednak vyvolávají fyziologické reakce vedoucí k jeho vypuzení, resp. k rozvoji dalších obranných mechanismů (stejně mechanismy jsou zodpovědné za projevy časného typu přecitlivělosti na neškodné antigeny — tj. alergie)
- v cytoplasmě mastocytů se nachází velké množství granulí (specializovaných lysozomů), které obsahují hydrolytické enzymy, proteoglykany (heparin, chondroitinsulfát) a biogenní aminy (histamin, serotonin); zároveň s degranulací se v žírných buňkách aktivuje metabolismus kys. arachidonové a vznikají LTC₂ a PGD₂
- secernují i několik cytokinů, které přispívají k rozvoji lokálního zánětu i k dalším imunitním reakcím — například TNF, TGF-β, IL-5, IL-6, IL-4

4. Bazofily

- bývají považovány za „cirkulující formu“ žírných buněk
- jde o terminálně diferencované buňky, které ale nejsou předchůdci žírných buněk — diferencují se z myeloidního prekurzoru v kostní dřeni
- svojí receptorovou výbavou, obsahem granulí, mechanismy stimulace a funkcemi jsou si s žírnými buňkami velmi podobné
- jsou zodpovědné za vznik anafylaktického šoku

5. Makrofágy

- profesionální fagocyty, nacházejí se ve všech tkáních
- jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému spolu s monocyty, které cirkulují v krvi a dávají vznik makrofágům (histiocyty) ve tkáních
- většina z nich osidluje organismus již v průběhu embryogeneze a pod vlivem lokálních cytokinů a dalších faktorů diferencuje ve specializované typy tzv. **rezidenčních makrofágů** (Kupfferovy buňky v játrech, mikroglie v mozku, osteoklasty v kostech, alveolární makrofágy v plicích)
- hlavní funkcí makrofágů je fagocytóza — zabíjení a eliminace mikroorganismů, fagocytóza apoptotických buněk a neživých částic (například uhlíku — antrakotický pigment)
- dalšími funkcemi jsou pak iniciace a koordinace zánětlivé reakce pomocí produkce cytokinů a dalších faktorů, produkce látek toxických pro mikroorganismy (kyslíkové radikály, NO), indukce specifické imunitní reakce vedoucí ke tvorbě protilátek a k aktivaci Tc-lymfocytů
- uplatňují se i jako antigen prezentující buňky (APC)

6. Dendritické buňky

- nejúčinnější antigen prezentující buňky (APC)
- hlavní spojující článek mezi rychlou antigenně nespecifickou a pomalu se rozvíjející (4-7 dní po infekci) antigenně specifickou částí imunitního systému
- jsou strategicky rozmístěny v tkáních, které jsou na rozhraní organismu a okolního prostředí — nejvíc jich je v kůži a ve sliznicích dýchacího a zažívacího traktu, vydávají své výběžky mezi epiteliálními buňkami na slizniční povrch a odebírají tam aktivně vzorky potravních či vdechnutých antigenů
- pokud rozpoznají nebezpečný podnět (mikroorganismy, vlastní nekrotické buňky), aktivují se, přesunují se z tkání do lymfatických uzlin a jiných sekundárních lymfatických orgánů a mění se na účinné APC
- ve zralém stadiu dendritické buňky vydrží asi 2-3 dny, během nichž aktivují T-lymfocyty, poté hynou apoptózou

7. NK buňky (natural killers)

- popisovány jako velké granulární lymfocyty
- součást nespecifické obrany proti virovým infekcím — dovedou zahubit nakaženou buňku dříve, než v ní dozrají a uvolní se nové viriony
- podnětem pro jejich činnost jsou virové glykoproteiny, které se během dozrávání virionů objevují na povrchu infikovaných buněk
- NK buňka se k infikované buňce těsně přiblíží a do mezery mezi sebou a napadenou buňkou uvolní obsah svých granúl, což jsou především molekuly typu perforinů — ty vytvoří póry v membráně, jimiž do cílové buňky proniknou z buňky NK další bílkoviny, zvané granzymy (například granzym B)
- výsledkem tohoto procesu je apoptóza cílové buňky a přerušení reprodukčního cyklu viru
- podobným způsobem dovedou NK-buňky ničit i buňky nádorové

Další buňky účastníci se nespecifické imunity

1. Endotelové buňky

- fyziologicky zajišťují antitrombogenní potenciál cévní stěny (udržují průchodnost cév) a regulují cévní tonus v mikrocirkulaci)
- endotel je stimulován buď přímo inzuletem, nebo prostřednictvím jiných účastníků zánětlivé reakce:
 - při zánětlivé reakci indukuje lokální změny cévního tonu (lokalizace zánětlivých procesů), zajišťuje trombogenní potenciál (význam pro hemostázu) a zvyšuje permeability cévní stěny (umožňuje migraci leukocytů do intersticia)
 - stimulační signály pro aktivaci endotelových buněk — lipopolysacharidy a mikrobiální toxiny, histamin, trombin, plazmin, elastáza, PAF, C3a, C5a, cytokiny (IL-1, TNF- α)
- aktivace vede k tvorbě účinných látek regulujících cévní tonus a expresi receptorů pro adhezi leukocytů
 - tvoří účinné látky s vazodilatačním a vazokonstrikčním účinkem — NO (vazodilatace, antitrombotický účinek), prostacyklin I₂ (vazodilatace, antitrombotický účinek), endothelin (vazokonstrikce), tromboxan A₂ a PAF (vazokonstrikce, adheze a agregace destiček)
 - tvoří prozánětlivé cytokiny — IL-1, IL-6 a TNF- α
- endoteliální adhezivní receptory:
 - **P-selektin, E-selektin** — pro rolling leukocytů (které nesou ligand pro tyto selektiny)
 - **ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1** — pro diapedezu leukocytů (exprimují integriny)

2. Trombocyty

- nemají jádra, vznikají rozpadem vícejaderných megakaryocytů v kostní dřeni
- jejich cytoplazma obsahuje 3 typy granul obsahujících různé produkty, z nichž nejvýznamnější je serotonin, histamin, destičkový růstový faktor a také hydroláza
- v kontaktu s fibrilami kolagenu dochází k jejich agregaci a degranulaci
- uvolněný serotonin zvyšuje permeabilitu cév

5 — Antigen prezentující buňky (APC)

Antigen prezentující buňky — zapojení v indukci imunitní odpovědi, rozdělení.

- mezi antigen prezentující buňky (APC) patří:

1. **dendritické buňky**
2. **makrofágy** — viz otázku 1.6
3. **B-lymfocyty** — viz otázky 1.7, 1.29

Dendritické buňky

1. Myeloidní dendritické buňky (mDC)

- nejúčinnější APC
- hlavní spojující článek mezi rychlou antigenně nespecifickou a pomalu se rozvíjející (4-7 dní po infekci) antigenně specifickou částí imunitního systému
- hlavními růstovými a diferenciacními faktory jsou IL-4 a GM-CSF
- vyskytují se jednak ve formě nezralé, jednak zralé
- **nezralé DC** — strategicky rozmístěny v tkáních, které jsou na rozhraní organismu a okolního prostředí — nejvíc jich je v kůži a ve sliznicích dýchacího a zažívacího traktu, kde tvoří 1-2% celkového počtu buněk
 - slizniční DC „vystrkují“ své výběžky mezi epiteliálními buňkami na slizniční povrch a odebírají tam aktivně vzorky potravních či vdechnutých antigenů
 - dendritické buňky se nacházejí v menším množství téměř ve všech orgánech a tkáních a dynamicky cestují mezi krví a lymfou — putování DC do sekundárních lymfatických orgánů ovlivňují chemokiny CCL-19 a CCL-21, pro něž mají zralé DC receptor CCR7
- pokud není v organismu přítomna infekce, nezralé dendritické buňky průběžně pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání — pohlcené vlastní molekuly zpracují a jejich fragmenty vystaví v komplexu s MHC proteiny na svém povrchu
 - specifické T lymfocyty, které takové normální autoantigeny rozpoznají, nejsou tímto kontaktem aktivovány — jsou buď zcela utlumeny, nebo se z nich tvoří tzv. regulační T-lymfocyty (Treg), které imunitní reakce vůči danému antigenu aktivně potlačují
 - nezralé DC se tak významně podílejí na **zachování tolerance** vůči vlastním tkáním
- **zralé DC** — aktivují se z nezralých forem, pokud rozpoznají nebezpečný podnět (mikroorganismy, vlastní nekrotické buňky) — nebezpečný podnět představují zejména molekulární struktury spojené s patogeny (PAMP), které jsou rozpoznávány příslušnými receptory
 - aktivace vede k diferenciaci (maturaci), která je spojena s dramatickými změnami jejich vlastností — zvýšení exprese MHC, zvýšení exprese kostimulačních molekul (CD80, CD86), zvýšení exprese adhezivních molekul, produkce cytokinů potřebných pro optimální stimulaci diferenciaci antigenně specifických efektorových T-lymfocytů (například IL-1, IL-6, TNF a IL-12).
 - vyvrávající DC se přesunují z tkání do lymfatických uzlin a jiných sekundárních lymfatických orgánů, ztrácejí schopnost pohlcovat částice z okolí a mění se na účinné APC
 - pouze zralé DC dokáží aktivovat naivní T-lymfocyty
 - DC dosáhne zralosti během 48 h a tento proces je ireverzibilní; ve zralém stadiu DC vydrží asi 2-3 dny, během nichž aktivují T-lymfocyty, poté DC hynou apoptózou
 - zásoby DC jsou kontinuálně doplňovány z prekursorů v kostní dřeni a snad i z krevních monocytů

2. Plasmacytoidní dendritické buňky (pDC)

- kromě mDC existují ještě morfologicky a funkčně odlišné plasmacytoidní dendritické buňky (pDC) — tento název neznamena, že by měly cokoli společného s plazmocytů
- růstovými faktory jsou CD40L a IL-3.
- na rozdíl od mDC nefungují primárně jako APC, ale jako buňky produkující zánětlivé cytokiny — produkcí těchto cytokinů **aktivují NK buňky** a spouštějí tím vrozenou imunitní odpověď či zahajují zánětlivou reakci
- **exprimují hlavně receptory nukleových kyselin TLR-7 a TLR-9** — jsou velmi účinně stimulovány virovými RNA, resp. DNA
- po setkání s virem **produkují velká množství IFN-α**
 - produkce IFN-α je mimo jiné důležitá i pro aktivaci NK buněk, které také velmi významně přispívají k obraně organismu proti virům

3. Folikulární dendritické buňky (fDC)

- nepocházejí z hematopoetických kmenových buněk (na rozdíl od mDC, které pocházejí z myeloidní linie)
- nacházejí se v primárních lymfoidních folikulech lymfatických uzlin a jiných sekundárních lymfatických orgánů
- hlavní funkcí je stimulace B-lymfocytů
- na svém povrchu vážou antigeny v nativní formě, velmi dlouho (až roky) — tyto antigeny pak mohou být rozeznávány B-lymfocyty (fungují tedy jako buňky prezentující antigen B-lymfocytům)

Průběh prezentace antigenu APC

- APC zachycují antigeny, zpracovávají je na malé fragmenty, a ty pak ve spojení s molekulami MHC umísťují na svůj povrch a předkládají je T-buňkám
- na povrchu každé APC jsou přítomny tisíce různých komplexů MHC s peptidy — většina peptidů pochází z normálních proteinů organismu vlastních, část peptidů může pocházet z cizorodých zdrojů
 - antigeny extracelulárního původu bývají předkládány pomocným Th-lymfocytům subpopulace CD4+ — Th-buňky se vážou svým receptorem na komplex antigenu s molekulou MHC II. třídy umístěným na povrchu APC; k aktivaci je třeba ještě dalších, tzv. kostimulačních signálů — výsledkem toho je tvorba IL-2, jenž podněcuje množení a diferenciaci T-buněk
- na povrchu dendritických buněk se dále nacházejí:
 - adhezivní molekuly (protein ICAM-1) — váže se na adhezivní receptor LFA-1 na povrchu T-lymfocytů; tyto adhezivní páry molekul umožňují dostatečně pevný kontakt obou buněk
 - ligandy kostimulačních receptorů (protein CD86) — váže se na kostimulační receptor CD28 na povrchu T-lymfocytů
- prekurzor Th v rámci tohoto procesu tedy dostane soubor signálů přes TcR, CD28, receptory pro cytokiny (IL-2) a přes další povrchové adhezivní a signalizační molekuly
 - tyto signály vedou k pomnožení klonu Th s příslušnou specifitou a ke konečné diferenciaci na efektorové T-buňky příslušného typu

6 – Úloha makrofágů

Úloha makrofágů v imunitním systému.

- profesionální fagocyty, nacházejí se ve všech tkáních
 - žijí déle než neutrofily, mohou fagocytovat opakovaně, tvoří „uklízecí četu“ v ložisku
 - uplatňují se i jako antigen prezentující buňky (APC)
- jsou součástí mononukleárního fagocytárního systému spolu s monocyty, které cirkulují v krvi a dávají vznik makrofágům (histiocytům) ve tkáních
 - monocyty jsou také zdrojem makrofágů v místě zánětlivé reakce při infekci nebo poranění
- většina z nich osidluje organismus již v průběhu embryogeneze a pod vlivem lokálních cytokinů a dalších faktorů diferencuje ve specializované typy tzv. **rezidenčních makrofágů**:
 - **Kupfferovy buňky** v játrech
 - **mikroglie** v mozku
 - **osteoklasty** v kostech
 - **alveolární makrofágy** v plicích
- v postnatálním období se v řadě tkání makrofágy udržují v nezávislých sebeobnovujících populacích, bez významnějšího přispěvku prekursorů z kostní dřeně
- v jiných tkáních (kůže, střevo) jsou však makrofágy průběžně obnovovány diferenciací z monocytů

Funkce makrofágů

- hlavní funkcí makrofágů je fagocytóza — zabíjení a eliminace mikroorganismů, fagocytóza apoptotických buněk a neživých částic (například uhlíku — antrakotický pigment)
- další funkce:
 - iniciace, koordinace zánětlivé reakce pomocí produkce cytokinů a dalších faktorů
 - produkce látek toxických pro mikroorganismy (kyslíkové radikály, NO)
 - antigen prezentující buňky (APC)
 - indukce specifické imunitní reakce vedoucí ke tvorbě protilátek a k aktivaci Tc-lymfocytů
 - po proběhlém zánětu podporují procesy hojení
- vzhledem k jejich rozmanitým funkcím je aktivita makrofágů regulována, mohou se nacházet v celém spektru aktivačních stavů v závislosti na prostředí a kombinaci stimulů, kterým byly vystaveny
 - rozpoznání a fagocytóza apoptotických buněk má na zánětlivou odpověď makrofágů tlumivé účinky
 - rozeznání patogenů pomocí PRR vede k jejich aktivaci a iniciaci efektorových funkcí a zánětlivé odpovědi
- makrofágy označované jako M1 a M2:
 - M1 mají prozánětlivou funkci (podporují zánět), vznikají působením cytokinu IFN- γ (zdrojem jsou Th1 lymfocyty)
 - M2 se diferencují v přítomnosti cytokinu IL-4, ukončují zánětlivou odpověď a zabezpečují procesy hojení tkáně

Úloha makrofágů v nespecifické imunitě

- normální neaktivované makrofágy některé patogeny (například houby) zabíjejí hůře než neutrofily — vynahrazují si to však po tzv. aktivaci
 - aktivační signály makrofágů — IFN- γ , endotoxin G– bakterií, složka C3b komplementu
- aktivované makrofágy mohutněji fagocytují, spotřebovávají více O₂, vytvářejí více hydroláz, jsou schopny ničit i tak odolné intracelulární parazity jako je *Mycobacterium tuberculosis*
 - k zabíjení mikrobů stejně jako neutrofily produkují kyslíkové radikály a NO
 - v granulích obsahují lysozym a dále také produkují metabolity kys. arachidonové
- v odpovědi na lipopolysacharid a další složky bakteriální stěny uvolňují cytokiny (**TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12** a další) — zahajují tím reakci akutní fáze
 - TNF- α , IL-1 a IL-6 — v hypothalamu působí jako endogenní pyrogeny, stimulují kostní dřeň k uvolňování většího počtu leukocytů, v játrech aktivují tvorbu proteinů akutní fáze
 - působením cytokinů na endotel dochází k jeho aktivaci — k expresi adhezivních molekul na jeho povrchu a k produkci vazoaktivních mediátorů
 - IL-12 aktivuje NK-buňky, které dovedou tvořit IFN- γ , jenž spolu s IL-1 a TNF prohlubuje další aktivaci makrofágů
- i když jsou makrofágy aktivovány během pochodů vrozené nespecifické rezistence, výrazná aktivace makrofágů je typická pro specifickou celulární imunitu

Úloha makrofágů ve specifické imunitě

- makrofágy dále představují přechod mezi nespecifickou a specifickou imunitou
- mají ve své membráně přítomny molekuly MHC II, což umožňuje jejich reakci s T-lymfocyty jako APC — spolupracují s Th1-buňkami
 - makrofág infikovaný intracelulárními parazity vystavuje na svém povrchu fragmenty proteinů pocházejících z parazita v asociaci s MHC II
 - efektorové Th1-buňky kontaktují prostřednictvím TcR a adhezivních molekul a secernují IFN- γ , který je stimuluje k přeměně v aktivovanou formu
- pomocí IL-1, IL-6 a IL-12 makrofágy přispívají k další stimulaci T-buněk
- vzájemné působení Th1 a makrofágů je základním mechanismem imunopatologické reakce opožděného typu (IV. typu)

Úloha makrofágů v hojení tkáně

- v přítomnosti cytokinu IL-4 převažují jejich funkce pro hojení tkání po proběhlé zánětlivé reakci — secernují různé růstové faktory (EGF, bFGF, PDGF), které stimulují fibroblasty
- nadměrná tvorba vláken je podkladem různých patologických stavů — fibróza, například při zaprášení plic (pneumokoniózy)

7 — Buněčné elementy specifické imunity

Buněčné elementy účastnící se na specifické obranyschopnosti.

- základními typy buněk, které se účastní na specifické imunitní reakci, jsou:

1. **antigen prezentující buňky (APC)** — viz otázku 1.5
2. **B-lymfocyty a plazmatické buňky**
3. **T-lymfocyty a jejich subpopulace**

1. Antigen prezentující buňky (APC)

- patří mezi ně dendritické buňky, makrofágy a aktivované B-lymfocyty
- zachycují antigeny, zpracovávají je na malé fragmenty, a ty pak ve spojení s molekulami MHC umisťují na svůj povrch a předkládají je T-buňkám
- vyskytují se v celém těle, kolují i v krvi, lymfou jsou dopravovány ze tkání do regionálních mízních uzlin — tam v parakortikální oblasti aktivují T-lymfocyty a stimulují je k další činnosti
- zcela odlišným druhem buněk jsou folikulární dendritické buňky (fDC) — nalézají se v lymfatických folikulech a dovedou na svém povrchu vázat nezpracovaný antigen po mnoho měsíců — takto vázaný antigen je nezbytný pro udržování zárodečných center a vznik paměťových B-buněk

2. B-lymfocyty

- dozrávají v mikroprostředí kostní dřeně
- zralé B-lymfocyty nesou na svém povrchu molekuly imunoglobulinu, jež slouží jako specifický receptor pro antigen — v přítomnosti antigenu a většinou ještě ve spolupráci s T-buňkami se z nich vyvinou buňky plazmatické
- zralé plazmatické buňky (plazmocyty) se vyznačují přítomností mohutného endoplazmatického retikula; jejich úkolem je tvorba velkého množství protilátek stejné specifity, jakou nesla původní B-buňka
- u dospělého se vyskytují desítky miliónů klonů B-buněk, každý z nich specifický pro jiný antigen

2.1. B1-lymfocyty

- první B lymfocyty, které se objevují během vývoje jedince
- jsou zdrojem tzv. **přirozených protilátek**, což jsou málo specifické protilátky třídy IgM často reagující s několika odlišnými antigeny běžných patogenů

2.2. B2-lymfocyty

- běžné, konvenční B-lymfocyty, které představují výraznou většinu B-lymfocytů
- na svém povrchu nesou jako receptory pro antigeny imunoglobuliny IgM a IgD
- ke kontaktu s antigenem dochází v zárodečných centrech sleziny a lymfatických uzlin — antigen tu bývá spolu s protilátkou a komplementem lokalizován na povrchu fDC
 - výsledkem kontaktu je tvorba imunoglobulinu jen určité třídy (IgG, IgA nebo IgE)
 - zároveň dochází k tzv. **somatické hypermutaci genů pro B-buněčné receptory** — jde o drobné změny ve struktuře molekuly protilátky sloužící i jako receptor, vedou k zesílené schopnosti protilátky vázat antigen (k vyšší specifitě i afinitě vazby) — buňky, které lépe vážou antigen, se lépe aktivují, a proto se rychleji množí.
- selektivně tak vzniká klon B-lymfocytů o vysoké afinitě i antigenní specifitě
- na závěr se mění v konečné producenty protilátek, v plazmocyty, k tomu dochází již mimo zárodečná centra

2.3. Paměťové buňky

- vedle plazmocytů vznikají z B-lymfocytů po styku s antigenem paměťové B-lymfocyty
- zatímco plazmocyty přežívají jen několik dní, paměťové buňky zůstávají v těle desítky let
- tyto buňky jsou příčinou jevu zvaného **imunologická paměť**
- opakovaná (sekundární) reakce na tentýž antigen je daleko rychlejší a mohutnější než reakce primární — při opakovaném styku s antigenem je totiž k dispozici daleko více buněk, které jsou schopny s ním reagovat

3. T-lymfocyty

- nabývají svůj charakter v mikroprostředí thymu — dostávají se do něj kmenové buňky z kostní dřeně a pod vlivem thymových hormonů (thymopoetinu a thymosinu) dozrávají v T-lymfocyty; navzdory částečné involuci thymu během dospívání se v něm T-buňky vyvíjejí po celý život
- **receptor T-buněk (TcR)** — struktura zakotvená v buněčné membráně, skládá se ze 2 řetězců (mohou být typu $\alpha\beta$, méně často $\gamma\delta$)
 - **$\alpha\beta$ T-lymfocyty** — receptor rozeznává cizorodý peptid usazený v prohlubni molekuly MHC, zbývající část poznává tuto molekulu jako vlastní
 - antigenní komplex tvořený peptidem a MHC je uložen na povrchu APC
 - **$\gamma\delta$ T-lymfocyty** — poznávají cizorodý antigen přímo, bez přítomnosti molekul MHC
 - tyto buňky se nalézají především v epiteliálních tkáních a předpokládá se, že se uplatňují v časně obraně sliznic
- **thymová výchova** — tj. dozrávání T-lymfocytů v thymu — podstatou je výběr buněk, které dovedou poznat vlastní molekuly MHC, ale nereagují na vlastní antigeny
 - **pozitivní selekce** — probíhá na epiteliálních buňkách kůry thymu
 - většinanezralých T-lymfocytů je bezcenná, protože jejich receptory vůbec nerozeznají vlastní molekuly MHC — tyto buňky podlehnou apoptóze
 - zbytek, jehož receptory se s různou afinitou vážou na vlastní molekuly MHC, se může množit
 - **negativní selekce** — probíhá na dendritických buňkách a makrofázích v dřeni thymu
 - některé z buněk, které přežily předchozí krok jsou ale potenciálně nebezpečné — lymfocyt, který má receptor s vysokou afinitou pro komplex vlastního antigenu spolu s vlastní molekulou MHC, rovněž podlehnou apoptóze (autoreaktivní T-lymfocyty)
 - během výchovy v thymu se mění charakter řady důležitých molekul na povrchu T-lymfocytů — na povrchu nezralého T-lymfocytu jsou jak CD4, tak CD8; zralý T-lymfocyt má už jen jednu z těchto molekul
 - CD4 se váže na molekulu MHC II. třídy
 - CD8 se váže na molekulu MHC I. třídy
- z hlediska funkce lze rozeznávat 3 skupiny T-buněk (subpopulace):
 1. **pomocné Th-lymfocyty (CD4+)** — viz otázku 1.24
 2. **cytotoxické Tc-lymfocyty (CD8+)** — viz otázku 1.26
 3. **regulační Treg lymfocyty (CD4+, CD8+)** — viz otázku 1.25

8 — Vztah buněk vrozené a získané imunity

Vztah a dominance buněčných elementů vrozené a antigenně specifické imunity.

- imunitní mechanismy lze rozdělit do 2 základních kategorií:
 1. **nespecifické (neadaptivní)**
 2. **antigenně specifické (adaptivní)**
- obě kategorie pak zahrnují složky:
 - a) **humorální** — různé sérové proteiny a sekretované molekuly
 - b) **buněčné** — různé typy buněk

Rozdíly mezi vrozenou a získanou imunitou

Nespecifická imunita (vrozená)	Specifická imunita (získaná)
zaměřena proti širokému spektru mikrobus	zaměřena na konkrétního mikroba
vrozená, dědí se	získána během života, nedědí se
její mechanismy jsou předem připraveny k boji s infekčním agens	vyvíjí se až po setkání s daným agens
působí stejně — ať jde o první, či opakovaný styk s mikrobem	vzniká tzv. imunologická paměť — při opakovaném styku s mikrobem vede k účinnější obraně (nemusí se projevit ani chorobnými příznaky)
působí okamžitě	

Nespecifické mechanismy (neadaptivní, vrozené)

- **evolučně starší** (přítomné v různé míře u všech mnohobuněčných organismů)
- založeny na mechanismech, které jsou v organismu připraveny předem a jsou obvykle **účinné proti mnoha různým patogenům** (reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné)
- tvořeny složkami buněčnými a humorálními:
 - buněčná složka — fagocyty buňky, přirozeně cytotoxické buňky (NK buňky)
 - humorální složka — komplementový systém, interferony, laktiny a jiné sérové proteiny
- nespecifické složky **reagují na přítomnost škodliviny rychle**, řádově v minutách
- na rozdíl od specifických složek **nemají imunologickou paměť**, tj. nejsou ovlivněny předchozím setkáním se škodlivinou a jejich reakce je při každém setkání s patogenem stejná
- kromě toho se v nespecifické obraně uplatňují i další mechanismy:
 - **mechanické** — pohyb řasinek, longitudinální tok vzduchu v dýchacích cestách nebo tekutiny v močových cestách
 - **chemické** — mastné kyseliny na kůži, enzymy (lysozym) ve slinách, slzách a potu, pepsin v žaludku a střevě, antibakteriální peptidy (defenziny), kyselé pH žaludku a moči
 - **mikrobiální** — normální nepatogenní flóra soutěží s patogenními mikroorganismy o živiny a o receptorová místa, která zprostředkují adhezi na epitelie, a produkuje antibakteriální látky

Rozpoznávací mechanismy nespecifické obrany

- fagocyty rozeznávají struktury na povrchu mikroorganismů, ale nikoli na vlastních nepoškozených buňkách
- tyto struktury jsou evolučně velmi konzervované, sdílené různými mikroorganismy a jsou nezbytné pro jejich život — označují se jako „**pathogen associated molecular patterns**“ (**PAMP**); jsou to například:
 - endotoxiny (lipopolysacharidy) — společné G⁻ bakteriím
 - peptidoglykany — společné G⁺ bakteriím
 - glukany a mannany — typické pro kvasinky a plísně
 - povrchové fosfolipidy — společné pro vlastní apoptotické buňky; u normálních buněk nacházejí výhradně na vnitřní straně membrány
- **PRR (pathogen recognition receptors)** – receptory pro PAMP; některé jsou exprimovány konstitučně, jiné jsou indukovány různými podněty
 - kromě fagocytů jsou tyto struktury rozpoznávány i humorálními složkami nespecifické imunity (komplementem, proteiny akutní fáze, přirozenými protilátkami)

1. TLR (toll-like) receptory

- mají mimořádnou důležitost — rozeznávají celou řadu chemických struktur charakteristických pro různé patogeny (lipopolysacharidy, lipoproteiny, prokaryotické a virové nukleové kyseliny atd.)
 - některé z těchto receptorů mohou být stimulovány také endogenními ligandy, které se uvolňují například při stresovém nebo nekrotickém poškození (signály nebezpečí)
- některé TLR jsou lokalizovány na buněčném povrchu, jiné (TLR 3, 7, 8, 9) především v intracelulárních membránách, kde mají optimální podmínky k setkání s ligandy uvolněnými z pohlcených mikroorganismů
- aktivací těchto receptorů se spouští exprese prozánětlivých cytokinů (například IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a některých adhezivních a kostimulačních receptorů na povrchu APC

2. Nod receptory

- cytoplazmatické receptory, mají podobnou funkci jako TLR
- přítomny nejen ve fagocytujících buňkách, ale například také v epitelích
- váží uvnitř infikovaných buněk charakteristické mikrobiální produkty, a poté aktivují podobné signální dráhy jako TLR
- genetické polymorfismy Nod genů jsou asociovány s různými zánětlivými chorobami nebo imunodeficiencemi

3. Scavenger receptory

- tzv. scavengerové („uklízecí“) receptory rozeznávají polyanionické struktury (například kyseliny teichoové) přítomné na povrchu některých mikroorganismů, ale také negativně nabitě fosfolipidy charakteristické pro apoptotické buňky

4. Oponizace

- opsonizace je závislá na spolupůsobení protilátek, složek komplementu a dalších sérových proteinů; nejvýznamnější opsoniny:
 - **protilátky** vázané na mikroorganismus (jsou rozeznávány Fc receptory fagocytů)
 - **složka komplementu C3b** (jsou rozeznávány komplementovými receptory)
- opsoniny tak označují částici jako cizorodou a umožňují její snadnější fagocytózu
- jako opsoniny působí také tzv. **proteiny akutní fáze** — ty jsou produkovány játry pod vlivem zánětlivých cytokinů (lektin vážící mannosu, fibronectin, fibrinogen, CRP, SAA)

Specifické mechanismy (adaptivní, získané)

- evolučně mladší, adaptivní (schopna se přizpůsobit danému mikrobu a jeho přizpůsobení)
- antigenně specifické mechanismy — aktivují se až po setkání s daným antigenem
- zahrnuje humorální a buněčné složky:
 - humorální — založené na protilátkách
 - buněčná — založené hlavně na T lymfocytech
- k úplnému rozvoji imunitní reakce specifické je zapotřebí několika dní až týdnů
- charakteristickým rysem těchto reakcí je **imunologická paměť** — při opakovaném styku s daným infekčním agens se kontakt nemusí vůbec projevit chorobnými příznaky
 - tato obrana je ale specifická, to znamená zaměřená pouze na určité, konkrétní agens (čili adaptivní, tomuto agens přizpůsobená)
 - imunologická paměť ovšem trvá jen během života konkrétního jedince a nedědí se
- jakkoli je specifická imunita vysoce účinná, začíná se v průběhu infekce uplatňovat poměrně pozdě a bohužel se proto někdy nerozvine včas; jindy je zase hlavní příčinou poškození a tudíž chorobných příznaků (AIO)

Průběh specifické reakce

- specifická imunitní odpověď **začíná vazbou antigenu na specifický receptor na povrchu imunokompetentní buňky** (tj. buňka schopná specificky reagovat s antigenem)
 - ve většině případů bývá antigen upraven a prezentován APC
- klíčovými buňkami specifické imunity jsou:
 1. T-lymfocyty
 2. B-lymfocyty
 3. APC
- aby se zvýšila pravděpodobnost, že se setkají s příslušným antigenem, lymfocyty cestují nejen mezi jednotlivými lymfatickými orgány, ale kolují celým tělem
- k této migraci dochází i po setkání s antigenem — například lymfocyty aktivované v Peyerových placích se dostávají i do lamina propria dalších sliznic, na nichž se pak rovněž tvoří tzv. sekreční protilátky
- na základě povrchových znaků lze rozlišit 2 základní populace lymfocytů:
 1. **B-lymfocyty — odpovídají za tvorbu imunoglobulinů**, což jsou protilátky specificky se vážící na příslušný antigen a odpovědné za odstranění extracelulárních mikrobů a jejich produktů
 2. **T-lymfocyty — jednak pomáhají B lymfocytům tvořit protilátky, jednak pomáhají likvidovat intracelulární parazity** (aktivují makrofágy a usmrkují buňky nakažené virem)
- buňkami zprostředkovaná imunita:
 - zabezpečují ji T-lymfocyty a aktivované makrofágy
 - obrana proti mikrobům množícím se uvnitř buněk (příkladem jsou herpesviry nebo mykobakterie)
- humorální imunita:
 - založena na protilátkách
 - chrání především proti patogenům vyskytujícím se extracelulárně (rozmanité opouzdřené bakterie, z virů například enteroviry)

Primární imunitní reakce

- **při prvním styku s určitým antigenem** je v těle k dispozici nanejvýš několik tisíc lymfocytů, které jsou schopny specificky s tímto antigenem reagovat a zahájit primární imunitní reakci
- primární imunitní reakce se rozbíhá poměrně pomalu a protilátky se ve znatelném množství objevují až během druhého týdne po styku s antigenem
- zpočátku to bývají protilátky třídy IgM a bývají vystřídány protilátkami IgG o nízké aviditě (nízkoavidní protilátky bývají méně specifické, a proto jejich vazba s antigenem je méně pevná)
- po primární imunitní reakci však zůstává v těle daleko větší zásoba tzv. **paměťových lymfocytů**, jejichž receptory jsou schopny se specificky vázat s daným antigenem

Sekundární imunitní reakce

- k sekundární (též anamnestické) imunitní reakci dochází **po opakovaném kontaktu s antigenem** — protože je při ní k dispozici o několik řádů vyšší počet buněk schopných rozpoznat daný antigen, probíhá sekundární imunitní reakce daleko rychleji, mohutněji a účinněji
- protilátky se objevují dříve (již koncem prvního týdne po styku s antigenem), jejich množství (titr) stoupá daleko rychleji a dosahuje mnohem vyšších hodnot, mnohem specifičtěji (a proto pevněji) se vážou na antigen (mají vyšší aviditu)
- důsledkem sekundární imunitní reakce je, že opakovaná infekce se vůbec nemusí projevit, a o tom, že k ní vůbec došlo nás informuje jen stoupnutí titru protilátek
- rozdíl mezi intenzitou odpovědi při primární a sekundární (event. další) imunitní reakci je podstatou účinnosti očkování — mikrob, jeho produkt nebo součásti použité k očkování jsou upraveny tak, aby nevyvolaly poškození, zachovávají si však stejné antigenní složení
 - po primární imunitní reakci vyvolané očkovací látkou vzniká dostatečná zásoba paměťových buněk, aby po následujícím přirozeném kontaktu s antigenem mohlo rychle dojít k mohutné sekundární reakci — ta zlikviduje příslušné agens dříve, než se infekce stačí projevit chorobnými příznaky

9+10 – Komplement

Klasická, lektinová a alternativní dráha komplementu – biologický význam, rozdíly.

- komplement tvoří asi **30 sérových a membránových proteinů** a je **součástí nespecifické humorální imunitní odpovědi**
- složky komplementu se kaskádovitě aktivují a tím spouštějí imunitní reakci
- hlavními složkami je **9 sérových proteinů C1–C9**, dále faktory (B, D, P), inhibitory a inaktivátory (H, I); většina jich je syntetizována v játrech, ostatní v makrofázích a fibroblastech
 - **ústřední složkou je C3** (fragment C3b se kovalentně váže na mikrobiální povrch); meziprodukty této kaskádovité reakce mají výrazné biologické funkce, jako jsou opsonizace a chemotaxe
 - terminálním produktem kaskády je komplex proteinů C5b, C6, C7, C8, C9 nazývaný **MAC (membrane attack complex)** — ten perforuje cytoplasmatické membrány některých buněk a působí jejich lýzu, zabíjí je
- funkce komplementu:
 1. **opsonizace** (C3b) — komplement se aktivuje po vniknutí bakterie; složka C3a se uvolní, C3b opsonizuje
 2. **chemotaxe** (C3a, C5a)
 3. **prozánětlivé funkce** (C3a, C5a) — anafylatoxiny (mediátory zánětu, způsobují vazodilataci, zvyšují permeabilitu cévních stěn uvolňováním histaminu)
 4. **osmotická lýza** (C5b-C9) — cytotoxické působení membranolytického komplexu
- rozeznáváme 3 cesty aktivace:
 1. **klasickou** — zahájena IgG či IgM
 2. **lektinovou** — zahájena sérovým lektinem (MBL)
 3. **alternativní** — zahájena přímým kontaktem C3 s chemickými látkami

1. Klasická dráha aktivace komplementu

- vývojově mladší než alternativní cesta, objevena dříve
- **zahájena na povrchu s navázanou protilátkou (IgG, IgM); cílem je vytvoření MAC**
 - dá se aktivovat i pentraxiny (reaktanty akutní fáze) — tj. CRP a sérový amyloid P — váží se na některé mikroorganismy a vážou protein C1
- **vazbou na povrch (bakterie) se změní konformace protilátky → odhalí se vazebné místo pro protein C1** (komplex podjednotek), který po vazbě na protilátku získá proteolytickou aktivitu — **štěpí C4 a C2** → fragmenty C4b a C2a se naváží na povrch napadeného mikroorganismu a vytvoří **C3-konvertázu (C4bC2a)**
- C3-konvertáza štěpí velké množství C3 na **C3a (chemotaxe)** a **C3b (opsonizace)**
- poté se vytváří **C5-konvertáza (C4bC2aC3b)**, která štěpí C5 na C5a (chemotaxe) a C5b (součást MAC)

2. Lektinová dráha aktivace komplementu

- podobná klasické cestě aktivace
- místo protilátky ji iniciuje **sérový lektin** — lektin vázající mannózu (**MBL**)
 - ten se váže na sacharidové struktury povrchů některých mikrobů přímo (nezávisle na protilátkách)
- jeho struktura a funkce je podobná C1 — po vazbě na povrch štěpí C4 a C2 → vytvoří C3-konvertázu apod.

3. Alternativní dráha aktivace komplementu

- vývojově starší než klasická a lektinová dráha
- **neadaptivní**, nespecifická imunitní reakce
- **začíná u C3 přímým kontaktem s chemickými látkami** (endotoxiny) ve stěnách bakterií apod.
 - **složka C3 se samovolně štěpí na fragmenty C3a (chemotaxe) a C3b** → ve vzniklém C3b se odhalí velmi reaktivní skupiny (thioesterová skupina), které rychle reagují s okolními hydroxy a aminoskupinami — pokud tyto skupiny leží na povrchu buněk tělu vlastních nebo na mikroorganismu, C3b se naváže kovalentně
 - většinou thioesterová skupina reaguje s vodou, čímž se inaktivuje
 - C3b je inaktivována faktorem H a faktorem I
- vazba C3b na povrch zahájí kaskádu — připojí se k ní sérový protein **faktor B** (štěpen faktorem D na Ba a Bb) → komplex C3bBb po stabilizaci faktorem P (properdinem) působí jako **alternativní C3-konvertáza** — štěpí další C3 na fragmenty C3a a C3b → zesilování kaskády
 - vzniklé C3b se kovalentně zachycují na povrchu kolem enzymově aktivního komplexu — slouží jako významné opsoniny
 - C3a působí chemotakticky na fagocyty
- některé molekuly C3-konvertázy se přemění na složitější komplex (**C3bBbC3b — alternativní C5-konvertáza**) a štěpí C5 na **C5a (chemotaxe)** a **C5b**
 - vznikem C5b nastává terminální (lytická) fáze komplementové kaskády
- **iniciace spontánním nespecifickým způsobem**, k aktivaci může dojít jak na povrchu cizorodých částic, tak i vlastních → regulační proteiny (CD47, CD200 – nejez mě)

Terminální (lytická) fáze komplementové kaskády

- **fragmenty C5b tvoří MAC** se složkami **C6–C8**, zanoří se do povrchu membrány a připojí se několik (13-18) molekul **C9** → **vznikne pór** → **lýza**
 - většina mikroorganismů je odolná — mají buněčnou stěnu
- kontrolována C1-inhibitorem, C3-konvertázy se rozpadají po interakci s membránovým proteinem DAF

11 – Protilátky

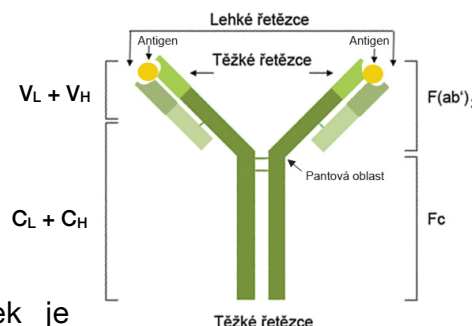
Třídy a podtřídy protilátek, fyziologické koncentrace, funkce v systému a na sliznicích.

Imunoglobuliny

- **imunoglobulinová rodina** — skupina funkčně i strukturně příbuzných proteinů, které hrají klíčovou roli v imunitním systému — vážou **antigen**
 - jsou exprimovány především na leukocytech, ale některé nacházíme i u jiných buněk (například HLA I na všech jaderných buňkách)
 - vyskytují se jako volné molekuly nebo jsou zabudovány do buněčné membrány
 - mezi imunoglobuliny řadíme protilátky, specifické receptory T-lymfocytů a B-lymfocytů, molekuly HLA, adhezní molekuly a receptory pro růstové faktory
- **antigen** se váže specificky — vzniklá vazba má charakter nekovalentních interakcí
 - antigen může být protein, glykoprotein, sacharid, DNA, fosfolipid, nízkomolekulární látka
- v průběhu **specifické imunitní odpovědi** humorálního typu jsou tyto látky **tvořeny B-lymfocyty a plasmoblasty** (plasmatickými buňkami), jež z B-lymfocytů v rámci terminální diferenciací vznikají

Struktura protilátek

- každá protilátka je tvořena ze **2 těžkých řetězců (H, heavy)** a **2 lehkých řetězců (L, light)** — tzv. **imunoglobulinové domény** — globulární smyčky o cca 100 aminokyselinách obsahující cysteinový můstek (dělíme podle variabilní oblasti na hypervariabilní a konstantní domény)
- **lehké řetězce (L řetězce)** — skládají se z **konstantní** a **variabilní domény (V_L a C_L)**
 - vykytují se ve 2 typech — κ (kappa) a λ (lambda)
 - v jedné molekule jsou 2 řetězce stejného typu (u člověka nejčastěji κ)
- **těžké řetězce (H řetězce)** — mají vždy 1 doménu variabilní (IgG, IgA, IgD), příp. 4 konstantní (IgE, IgM) — V_H a C_H 1-4
 - pro odlišení jednotlivých tříd (izotypů) protilátek je směrodatný druh těžkého řetězce (IgA α , IgG γ , IgD δ , IgE ϵ , IgM μ) — liší se jak složením, tak velikostí
 - **konstantní oblast (C_L + C_H)** — tvořená konstantními doménami (**Fc fragment**), je **totožná** ve všech protilátkách téže třídy
 - **variabilní oblast se liší dle klonu B-lymfocytů**
- **pantová oblast** — místo na H řetězci, na kterém dochází ke stěpení rostlinným enzymem papainem; zaručuje imunoglobulinu flexibilitu → protilátku lze tak rozdělit na 3 části:
 - 2 části (**Fab-fragment**) obsahující obě rozvětvená ramena (tzn. celý L a část H řetězce)
 - na Fab-fragmenty se mohou vázat antigeny
 - zvyňující část (**Fc-fragment**) obsahující zbývající část obou H řetězců spojených disulfidickými můstky
 - Fc-fragmenty se váží na receptory na povrchu leukocytů
- **vazbené místo** — vytvořené variabilními doménami L i H
- **izotyp** — určen typem těžkého řetězce — **určuje třídu** protilátky
- **idiotyp** — rozdíl ve variabilní oblasti — **určuje specifitu**
- **allotyp** — nemá vztah k funkčním charakteristikám molekuly



Třídy (izotypy) protilátek

IgG (8-18 g/l; $T_{1/2}$ 21 dnů)

- nejvýznamnější, tvoří 75% všech protilátek v séru; **monomerní**
- vytváří **4 podtřídy (IgG1-4)** — vzájemně se liší opsonizačními vlastnostmi, vazbou na komplement a časem, po který jsou aktivní (strukturálně počtem můstů v pantové oblasti)
- jediná třída protilátek **schopná procházet placentou** — proto jsou u novorozenců stejné hodnoty IgG jako u dospělých
- význam:
 - **opsonizace** — Fc-receptory na neutrofilech a makrofázích
 - **aktivace komplementu klasickou cestou** (IgG1, IgG3) — po vazbě IgG na antigen
 - **neutralizace toxinů** — po navázání dojde k zablokování a neutralizaci

IgA (1-3,5 g/l; $T_{1/2}$ 6 dnů)

- rozlišujeme 2 formy:
 1. **sérová** — narozdíl od IgG se mohou vyskytovat i jako **dimery** (spojené **J-řetězcem**)
 2. **slizniční** — dimer spojený J-řetězcem a chráněn sekreční komponentou proti slizničním štěpícím enzymům (produkována slizničními B-lymfocyty)
- tvoří **2 podtřídy (IgA1-2)** — IgA1 (B-lymfocyty), IgA2 (kostní dřeň)
- význam:
 - **blokáda adhezních molekul bakterií**
 - **opsonizace** — váží se na specifické Fc- α -receptory fagocytů
 - nemá schopnost aktivovat komplement

IgM (1-2,5 g/l; $T_{1/2}$ 6 dnů)

- tvoří 10% všech protilátek v séru
- **monomer** IgM je integrální součástí membrány B-lymfocytů (BCR); secernovaný IgM tvoří **pentamer** (jednotlivé podjednotky jsou spojeny do kruhu cystinovými můstky a J-řetězcem) — díky struktuře nepronikají do tkání a zůstávají v krvi
- **jsou jako první vytvářeny při zahájení specifické imunity** — produkce nevyžaduje izotopový přesmyk
- význam:
 - **aktivuje klasickou cestu komplementu** (váže C1)
 - jako jediný tvoří odpověď na polysacharidové antigeny (ABO systém)
 - **aglutinace** — IgM je schopno navázat hodně antigenů → snadno tvoří aglutináty

IgE (3×10^{-14} g/l; $T_{1/2}$ 2 dny)

- zodpovědný za reakci časně přecitlivělosti — zvýšená koncentrace bývá při alergických (atopických) reakcích; dále úloha v antiparazitární obraně (stimuluje procesy k vypuzení)
- vysokoafinní receptory Fc ϵ RI na mastocytech a bazofilech — degranulace (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny)

IgD (0,1 g/l; $T_{1/2}$ 3 dny)

- nachází se hlavně na povrchu B-lymfocytů (BCR) — funkce receptoru pro antigen

12 – Vazba protilátka-antigen

Charakteristika vazby protilátka-antigen (afinita, avidita, specifita).

Vazebné místo

- vazebná místa **tvorí nekovalentní komplexy s molekulami antigenů** — uplatňují se slabé vazebné interakce (iontové, hydrofobní, van der Waalsovy síly a vodíkové můstky)
 - vazebné místo je vždy svým tvarem a náboji **komplementární k epitopu** antigenu
- komplexy antigen-protilátka jsou reverzibilní** — mají vysokou rychlost vzniku i rozpadu →
 - rovnovážná konstanta K** — pro typické komplexy $10^6 - 10^{12}$ l/mol
 - převrácená hodnota je **disociační konstanta**
 - čím vyšší je K, tím vyšší je afinita protilátky k antigenu (jedno vazebné místo a jednoduchý epitop)
 - afinita** — definuje sílu vazby jednoho vazebného místa s jedním epitopem
 - avidita** — součet afinit v polymeru — vyjadřuje sílu interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem (desetivalentní molekuly IgM se váží s vysokou aviditou například na bakteriální povrch);
 - avidita se zvyšuje s afinitou jednoho vazebného místa nebo s počtem simultánně se uplatňujících vazebných míst

Efektorové funkce imunoglobulinů

1. Oponizace

- imunoglobulin se váže Fab-fragmentem na epitop antigenu; Fc-fragment se poté může navázat na Fc-receptor makrofágů, neutrofilů nebo $\gamma\delta$ T-lymfocytů → fagocytóza
- zásadání při obraně proti extracelulárním bakteriím (hlavně G+) — bez oponizace jsou špatně fagocytovány
- tento mechanismus může být kryt PRR a měnit optimální profil imunitní odpovědi
- efektivní jsou IgG1, IgG3, IgM

2. Neutralizace

- imunoglobulin se naváže Fab-fragmentem na receptor viru (v krevním oběhu, ve tkáních), bakterií (na sliznicích), čímž blokuje vazbu na příslušný buněčný ligand
 - patogeny — influenza, příušnice, spalničky, zarděnky, HIV...
 - toxiny — ASLO, difterický toxin, cholera toxin...
- nejefektivnější IgG, IgA, méně IgM
- neutralizační protilátky jsou často cílem preventivní vakcinace (záškrt, tetanus)

3. ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity)

- buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách — protilátka se naváže Fab-fragmentem na antigen cílové buňky (nádorová, infikovaná virem, parazit) a Fc-fragmentem se naváže na Fc-receptor (FcR) NK buněk, eozinofilů nebo neutrofilů
- aktivace FcR vede k tzv. **polibku smrti** a uvolnění cytotoxických substancí (perforiny, granzymy, INF- γ , ARBP, defenziny)
- nejefektivnější jsou IgG1 a IgG3

4. Aktivace komplementu

- imunoglobulin se Fab-fragmentem naváže na epitop antigenu, čímž dochází k aktivaci klasické dráhy komplementu — důsledkem je eliminace vzniklého komplexu, zabíjení cílové buňky, oponizace, uvolnění chemotaktických složek C3a a C5a, aktivace zánětu
- nejefektivnější jsou IgG1, IgG3 a IgM

13 — Aktivace B-lymfocytů, protilátková odpověď

Průběh aktivace B lymfocytů, protilátková odpověď primární a sekundární.

Imunitní reakce založené na protilátkách

- založena na rozeznání antigenu povrchovým antigenně specifickým receptorem B lymfocytů (BcR) — za vhodných podmínek (většinou spolupráce s folikulárními Th-lymfocyty, tzv. Tfh) se takto stimulované B lymfocyty pomnoží, vzniknou klony dceřiných buněk s identickou specifitou a diferencují na plazmatické buňky, které sekretují protilátky

BcR (B celulární receptor)

- BcR rozeznává antigen jako takový (v nativní formě), na rozdíl od TcR není nutná prezentace v komplexu s MHC
- komplex BcR se skládá z:
 1. vlastního povrchového imunoglobulinu (rozeznává antigen)
 - povrchové imunoglobuliny patří k třídám IgM a IgD, jejich struktura je jinak stejná jako struktura sekretovaných imunoglobulinů (skládá se ze dvou těžkých (H) a dvou lehkých (L) řetězců)
 - těžké řetězce jsou transmembránové proteiny — v C-terminální části mají úsek 20 hydrofobních aminokyselin, kterým jsou zakotveny v membráně
 2. asociovaných signalizačních molekul (Igα a Igβ)
 - s imunoglobulinem komplexu BcR jsou asociovány 2 transmembránové proteiny zvané Igα (CD79α) a Igβ (CD79β), které mohou být nekovalentně spojeny s cytoplazmatickými protein-tyrosin kinázami (PTK)
 - aktivované kinázy pak fosforylují cytoplazmatické proteiny, což vede ke spuštění složitých signalizačních kaskád — ty nakonec mohou vést (dostane-li buňka další nezbytné signály) ke změnám transkripce některých genů, buněčnému dělení, diferenciaci B buňky na plazmatickou buňku a sekreci protilátek (imunoglobulinů)
- signály spuštěné vazbou antigenu na BCR mohou být výrazně zesíleny spoluprací BcR s dalším povrchovým receptorem B lymfocytů — komplementovým receptorem CR2 (CD21), který váže degradační produkt C3dg
 - propojení BCR a CR2 antigenními částicemi opsonizovanými fragmenty C3dg zřejmě lépe aktivuje kinázy spojené s oběma receptory

Rozdělení antigenů podle závislosti na T-lymfocytech

1. T-závislé (dependentní) antigeny
 - většina antigenů, hlavně proteiny
 - schopné vyvolat protilátkovou odpověď pouze ve spolupráci Tfh buněk s B-lymfocyty
 2. T-nezávislé (independentní) antigeny
 - zvláště polysacharidy
 - vyvolávají diferenciaci B-lymfocytů na plazmocyty a sekreci protilátek i bez spolupráce s Tfh
- u jedinců s určitými poruchami funkce T-lymfocytů zůstává zachována schopnost produkovat protilátky proti T-nezávislým antigenům; v některých případech (u novorozenců, pacientů po splenektomii, u některých primárních imunodeficitů) je naopak zachována pouze schopnost tvořit protilátky proti T-dependentním antigenům

1. Protilátková reakce vyvolaná T-nezávislými antigeny

- dochází k tvorbě nízkofinních protilátek třídy IgM
- podle toho, jakým způsobem aktivují B-lymfocyty, lze T-nezávislé antigeny rozdělit:
 1. skupina TI-1
 - patří sem zejména bakteriální lipopolysacharid (LPS) a některé další ligandy TLR
 - ve vyšších koncentracích se LPS váže na receptor B-lymfocytů pro LPS (TLR4), což způsobuje „nespecifickou“ stimulaci velkého množství B-lymfocytů a produkci protilátek nezávisle na jejich antigenní specifitě
 - LPS tedy působí jako polyklonální mitogen B lymfocytů
 2. skupina TI-2
 - má charakteristickou strukturu — polymery složené z mnohokrát opakovaných základních jednotek, jako například mikrobiální povrchové polysacharidy (obsažené typicky v obalu opouzdřených bakterií, například pneumokoků) nebo polymerní proteiny (například flagelin skládající se z mnoha shodných podjednotek a tvořící bičíky bakterií)
 - tyto polymerní antigeny reagují simultánně s velkým počtem BcR a intenzivně je tím shlukují — tím vznikají signály, které jsou dostatečně silné k tomu, aby vyvolaly buněčné dělení a diferenciaci na plazmatické buňky bez přímé pomoci Th
 - nezávislost na T-lymfocytech ale není úplná — B-lymfocyty stimulované TI-2 antigeny sice nepotřebují přímý kontakt s Th, ale potřebují některé cytokiny (IL-2, IL-3, IFN- γ), které jsou produkovány buď T-lymfocyty, nebo NK buňkami, nebo pocházejí z jiných zdrojů

2. Protilátková reakce vyvolaná T-závislými antigeny

- tento typ odpovědi **vyžaduje kooperaci mezi B-buňkami a folikulárními Th-lymfocyty**
- B-lymfocyt stimulovaný určitým antigenem musí obdržet pomoc od Tfh buňky, která rozeznává stejný antigen — to je možné díky tomu, že rozpoznání antigenu antigenně specifickým receptorem (BcR) vede k jeho pohlcení B-buňkou a k rozštěpení na peptidové fragmenty — tyto fragmenty se navážou na MHC II a tyto komplexy se objeví na povrchu B-lymfocytu
- pokud je takovýto komplex specificky rozeznán lymfocytem Tfh, může tato Tfh buňka poskytnout B-lymfocytu pomoc a stimulovat tak jeho diferenciaci v plazmatickou nebo paměťovou buňku
 - na povrchu takové B-buňky se objevují stejné komplexy MHC II-peptid, jako na povrchu dendritické buňky, která pohltila stejný antigen a pak iniciovala vznik příslušného klonu Th
- jde tedy o specifickou přímou pomoc B buňkám, které byly stimulovány rozeznáním stejného antigenu, který vyvolal (po zpracování v APC) i vznik příslušně specifických Tfh buněk
- pomoc Tfh buněk B-lymfocytům je založena na:
 - a) **sekreci cytokinů** — IL-21 a IL-4 ve spojení s cytokiny charakteristickými pro Th1, Th2 a Th17 — v závislosti na převažujícím typu odpovědi
 - b) **přímém mezibuněčném kontaktu** — interakce mezi kostimulačním receptorem CD40 (B-lymfocyt) a jeho ligandem CD40L (na povrchu aktivovaných Tfh)
- ke stimulaci sekrece cytokinů Tfh buňkou už není nutný signál přes kostimulační receptor CD28 (B-lymfocyty v tomto stadiu mají na svém povrchu jen velmi málo kostimulačních molekul CD80 a CD86), postačí signál přes TCR

- pro optimální stimulaci B lymfocytů je tedy obvykle potřeba souhry 3 typů buněk — APC (hlavně dendritické buňky), Tfh a B-buňky
- tzv. **alternativní (minimální) model spolupráce** — někdy ale stačí spolupráce pouze mezi Tfh a B lymfocyty — je však potřeba, aby se z B lymfocytu stala APC
 - to nastane, když B-lymfocyt dostane signál přes BcR (rozeznáním antigenu) a současně je „nespecificky“ stimulován přes TLR některými bakteriálními produkty (bakteriální DNA, povrchový lipopolysacharid)
 - to způsobí, že se B-lymfocyt dostane do stavu částečné aktivace, na jeho povrchu se objeví kostimulační ligandy CD80 a CD86 (a ovšem také komplexy MHC II s fragmenty pohlčeného antigenu)
 - tak se z B lymfocytu stane APC, která může stimulovat vznik klonů specifických Th

Primární a sekundární fáze T-závislé protilátkové reakce

- charakteristickým rysem protilátkových reakcí závislých na Tfh je, že probíhají ve 2 fázích — primární a sekundární
- v závislosti na dávce antigenu a způsobu jeho podávání:
 - mohou být tyto fáze jasně oddělené (typicky tehdy, když jsou opakovaně podávány malé dávky s vhodným časovým odstupem)
 - nebo na sebe mohou bezprostředně navazovat (typicky u přirozené infekce, kdy v organismu přetrvává, resp. vzniká relativně velké množství antigenu po delší dobu)
- pro tento druh protilátkové odpovědi je **charakteristický vznik paměťových buněk a vznik vysokoafinních protilátek v procesu tzv. afinitní maturace**

I. Primární fáze T-závislé protilátkové reakce

- **k zahájení protilátkové reakce dochází v sekundárních lymfoidních orgánech při prvním setkání s antigenem** (po imunizaci nebo po přirozené infekci)
- současně probíhají 2 děje:

1. stimulace B lymfocytů

- po proniknutí antigenu do organismu už probíhá přirozená (neadaptivní) imunitní odpověď a antigeny obvykle dorazí do sekundárních lymfoidních orgánů označené fragmenty komplementu
 - podílet se mohou také tzv. přirozené protilátky, které jsou některými B-buňkami (B1) produkovány spontánně a konstitutivně a tvoří s těmito antigeny imunokomplexy; později se zapojí také protilátky vzniklé v rámci již probíhající adaptivní imunitní odpovědi
- tyto opsonizované antigeny jsou zachycovány v lymfoidních folikulech na folikulárních dendritických buňkách (fDC) prostřednictvím komplementových receptorů a Fc receptorů — zachycené antigeny nejsou těmito buňkami pohlčeny, ale jsou dlouhodobě uchovávány v nativním stavu na jejich povrchu, kde mohou stimulovat B-lymfocyty
- FDC tedy slouží jako buňky prezentující antigen B lymfocytům.

2. vznik antigenně specifických Tfh buněk

- stejné antigeny jsou zároveň do sekundárních lymfoidních orgánů transportovány dendritickými buňkami, případně zachycovány rezidenčními dendritickými buňkami — tyto profesionální APC buňky rozštěpí antigen na peptidy a prezentují na svém povrchu (na MHC II) pro T-lymfocyty (prekurzorům Tfh buněk)
- výsledkem je vznik klonů antigenně specifických Tfh buněk

- **spolupráce B-lymfocytů a Tfh buněk** — zatímco ke stimulaci B-buněk dochází v lymfoidních folikulech, buňky Tfh jsou aktivovány v T-buněčné zóně lymfatických uzlin — rozeznání antigenu u obou typů buněk způsobí, že začnou migrovat do oblastí na hranici lymfoidního folikulu
 - časné Tfh buňky tam pak rozeznávají patřičné antigenem stimulované B buňky (podle přítomnosti komplexů MHC II s antigenními peptidy na jejich povrchu) a poskytují jim signály — těmito signály jsou sekretované a povrchové cytokiny (zejména CD40L), které způsobí pomnožení, diferenciaci na plazmatické buňky a sekreci protilátek
 - část B-buněk se nepřemění na plazmatické buňky, ale stanou se z nich paměťové buňky nebo mohou dále pokračovat ve vývoji a zahájit sekundární fázi odpovědi
 - tyto interakce mezi aktivovanými B a Tfh jsou důležité i pro další osud Tfh buněk, neboť stimulace antigenem a kostimulačními molekulami na povrchu B-lymfocytů vede k dokončení diferenciaci Tfh buněk, které se stanou plně kompetentními účastnit se sekundární fáze protilátkové reakce
- protilátky produkované první vlnou plazmatických buněk během 3-4 dnů od primární infekce (imunizace) jsou **téměř výhradně IgM** a mají poměrně nízkou afinitu k antigenu
- všechny tyto děje od rozeznání antigenu až po vznik plazmatických buněk probíhají hlavně v sekundárních lymfoidních orgánech; značná část plazmatických buněk je pak roznesena oběhovým systémem na různá místa v organismu, zvláště do kostní dřeně
- IgM protilátky produkované během této prvotní fáze protilátkové odpovědi jsou obvykle účinné při blokování šíření infekce; také přispívají k další tvorbě imunokomplexů, které jsou i nadále zachycovány v lymfatických uzlinách a jiných sekundárních lymfoidních orgánech

II. Sekundární fáze T-závislé protilátkové reakce

- část B buněk se nediferencuje v plazmatické nebo paměťové buňky, ale navrátí se do lymfoidního folikulu, kde proběhnou další kola dělení a diferenciaci B-lymfocytů (sekundární reakce)
 - vlivem signálů od fDC (prezentace antigenu) a Tfh (CD40L, cytokiny) dochází k intenzivním somatickým mutacím genů pro H a L řetězce (jejich V segmentů) a vznikem mutančních klonů B buněk nesoucích změněné BcR (ty tedy mají pozměněná vazebná místa pro antigen)
 - k tomu, aby tyto buňky přežily, musí obdržet dostatečně silné signály prostřednictvím BcR a cytokinových receptorů — v soutěži o omezené množství antigenu a o pomoc omezeného množství Tfh buněk mají tedy šanci přežít pouze ty buňky, které nesou BcR vážící s dostatečnou afinitou antigen na povrchu fDC — hynou všechny ty, u nichž mutace byly neproduktivní nebo vedly k BcR s nízkou afinitou k antigenu
 - intenzivní proliferace doprovázená masivním hynutím B buněk je mikroskopicky dobře pozorovatelná jako vznik sekundárních lymfoidních folikulů, které mají germinální centrum obsahující proliferující (a hynoucí) B buňky, fDC a malé množství Tfh
- celý tento děj se nazývá **germinální reakce** a jeho výsledkem je **afinitní maturace** vznikajících protilátek (afinita výsledných protilátek ve srovnání s IgM protilátkami z prvního kola obvykle o 4-6 řádů vyšší)
- kromě změn afinity, způsobených mutačními a selekčními procesy, dochází také k **izotypovému přesmyku**, tj. k záměně konstantní části produkovaných protilátek — místo původních IgM se začínou tvořit jiné izotypy (podtřídy IgG, IgA, IgE) — ireverzibilně se vyštěpují velké úseky v 3' části genového komplexu pro H řetězce
 - to, jaké izotypy vznikají, je určováno hlavně působením cytokinů
- výsledkem všech těchto dějů je tedy vznik protilátek, které oproti prvním IgM protilátkám produkovaným při primární imunitní reakci mají vyšší afinitu a jiné efektorové vlastnosti (aktivace komplementu, vazba na Fc receptory) závislé na izotypu

14 – IgE

IgE – jeho význam v imunologických reakcích, interakce s receptory na buňkách.

- ze všech protilátek má nejkratší poločas rozpadu
 - nalezneme jej v množství ještě nižším než IgD (sérová koncentrace 0,5 g/l) — to způsobuje také jeho krátký katabolický poločas
 - je homocytotropní — brzy se váže na jiné buňky vlastního těla (žírné buňky, bazofily) na receptory FcεRI; ve vázaném stavu je daleko stabilnější než jako volný
 - uvolňuje mediátory zánětu (histamin, serotonin, prostaglandiny, leukotrieny)
- protilátky IgE jsou zodpovědné za reakce časné přecitlivělosti
 - jejich zvýšená koncentrace bývá při alergických (atopických) reakcích
- dále mají úlohu v antiparazitární obraně (stimuluje procesy k vypuzení) — mediátory, vazodilatace, vykašlání, vykýchání, zvýšení peristaltiky střev, průjem
- vyskytují se zvláště ve slezině, mandlích, mukózních membránách plic a mukózních membránách GIT

Obrana proti mnohobuněčným organismům

- dominantním rysem je produkce IgE
- po setkání imunitního systému s antigenem parazita (prostřednictvím mastocytů, eozinofilů a bazofilů) se stimuluje proliferace a diferenciace Th2, kritickým faktorem je IL-4 (mastocyty a další APC)
 - efektorové Th2 stimulují proliferaci a terminální diferenciaci B-lymfocytů, které nesou specifické BCR, pod vlivem IL-4 dochází k izotypovému přesmyku a produkci IgE → nasedají na vysokoafinní IgE receptory na mastocytech → antigenně specifické receptory
 - po kontaktu s parazitem dojde k agregaci receptorů a uvolnění mediátorů z granulí, zároveň aktivace fosfolipázy A2 → metabolity kyseliny arachidonové
- v pozdějších stádiích stimulace Th1-lymfocytů a syntéza protilátek jiných tříd → potlačení infestace
- efektorovými buňkami jsou eozinofily (diferenciace pod IL-5), mohou fagocytovat komplexy antigen-IgE prostřednictvím IgE receptorů

Imunopatologická reakce I. typu

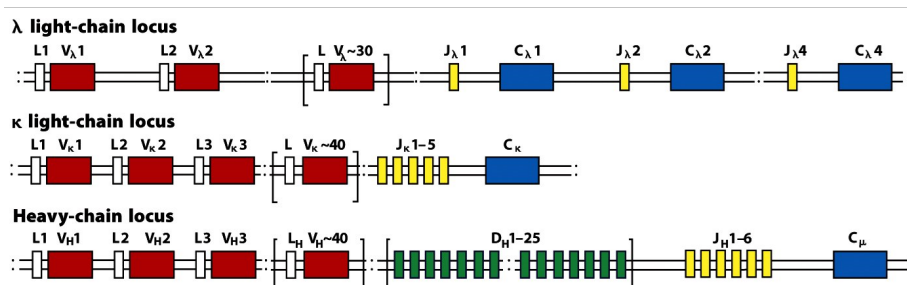
- **nejběžnější typ** imunopatologické reakce
- **tvorba IgE proti některým antigenům zevního prostředí** (pyl, roztoči, potraviny, srst...)
- jediná imunopatologická reakce, která není u AIO
- atopik — tj. jedinec, který na neškodné antigeny reaguje tvorbou IgE, genetická predispozice (atopie)
 - po prvním setkání dochází k **senzibilizaci** (podobné reakce jako při mnohobuněčných parazitech), stimulace diferenciace Th a následně B-lymfocytů, které secernují pod vlivem cytokinů IL-4, IL-5 protilátky IgE
 - IgE se váže na vysokoafinní receptory na žírných buňkách a bazofilech, při opakovaném setkání může dojít k **přemostění IgE**, agregaci receptorů a okamžitému uvolnění mediátorů (histamin, heparin) + tvorba metabolitů kyseliny arachidonové

15 – Protilátková heterogenita

Genetický základ protilátkové heterogenity, genové rekombinace, zdroje variability V_H a V_L .

Genetický základ protilátkové heterogenity

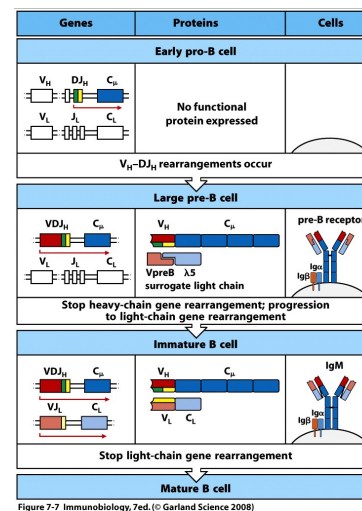
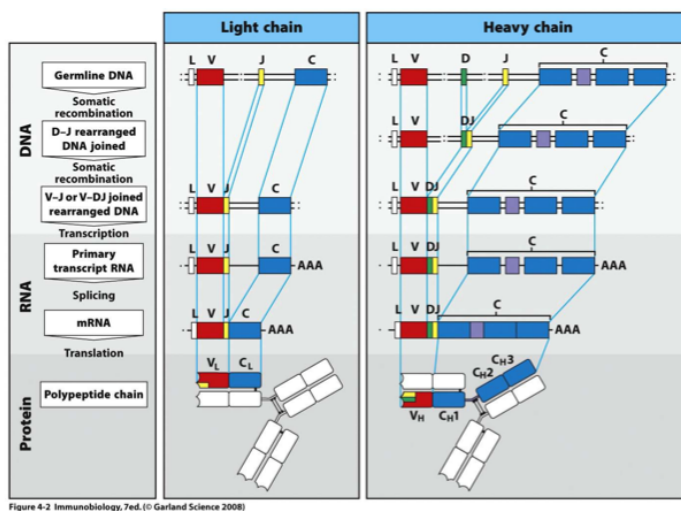
- jednotlivé **Ig řetězce** jsou kódovány 3 genovými komplexy:
 1. **genový komplex kódující H-řetězec (IgH)** se nachází na chromosomu **14**
 - lokus kódující H-řetězec obsahuje 65 genů ve V (variable) segmentu, 27 v D (diversity) segmentu a 6 v J (joining) segmentu — mechanismem přesmyku DNA v těchto segmentech lze dosáhnout enormního repertoáru protilátek ($65 V \times 27 D \times 6 J$ genů = 10 530 kombinací), a to jen u H-řetězců
 - obsahuje navíc C (constant) segment — po stranách se nachází tzv. **přesmyková sekvence**, které jsou rozeznávány enzymy provádějící izotypový přesmyk
 2. **gen kódující κ L-řetězec (IgK)** se nachází na chromosomu **2**
 3. **gen kódující λ L-řetězec (IgL)** se nachází na chromosomu **22**
 - pro lehké řetězce existuje mnoho genů V a J, ale D zcela chybí
- podobný mechanismus u **TcR**



Uspořádání genů kodujících variabilní části imunoglobulinů (V_L a V_H)

V(D)J rekombinace (přeskupování genů)

- k rekombinaci genů dochází při vývoji **B-lymfocyty v kostní dřeni**
 1. **D-J rekombinace** — 1. rekombinace mezi jedním z D genů a jedním z J genů v lokusu pro H-řetězec — veškerá DNA mezi těmito geny je vystřižena a odstraněna
 - vzniká pre-B-lymfocyt
 2. **V-D přeskupení** — následuje připojení jednoho z V genů ke vzniklému DJ komplexu — veškerá DNA mezi V a D geny je také odstraněna — vzniká **VDJ gen**
 3. **exprese genů** — primární transkript (tj. nesestřižená RNA, dříve, než dochází ke splicingu) vždy obsahuje VDJ oblast a oba konstantní řetězce μ a δ (C_μ a C_δ ; primární transkript tedy obsahuje segmenty V-D-J- C_μ - C_δ) — tato pre-mRNA je posttranskripčně modifikována přidáním poly (A) konce na 3'-konec mRNA a vystřižením sekvence mezi VDJ segmentem a C_μ řetězcem — translace této mRNA pak vede k produkci těžkého řetězce IgM
- IgK a IgH (geny pro L-řetězce) se přeskupují podobným způsobem, chybí zde však D segment — v prvním kroku rekombinace zde tedy dochází k vytvoření VJ komplexu, při transkripci pak k připojení genu pro konstantní oblast — translace sestřižené mRNA kódující κ nebo λ řetězce pak vytváří samotný Igk nebo Igl protein
- spojením těžkého řetězce Ig μ s jedním z lehkých řetězců vzniká membránová forma imunoglobulinu IgM (tzv. B-buněčný receptor) — exprimován na povrch — vznik **nezralých B-buněk**



Aleická exkluze

- každá protilátka se skládá ze 2 identických H-řetězců a ze 2 identických L-řetězců (κ nebo λ) — imunoglobuliny mají stejnou specifitu pro antigen (mají identické V-oblasti — V_L i V_H)
- v každém B-lymfocyту je tedy **aktivní genový komplex Ig pouze jednoho z chromozomů 2 nebo 22 (pro lehké řetězce) a jednoho z chromozomů 14 (pro těžké řetězce)**; ostatní Ig genové komplexy homologních chromozomů jsou vyloučeny z funkce — tzn. nedochází u nich k přestavbám segmentů ani k transkripci = tzv. aleická exkluze (jedna alela z páru není aktivní)

Variabilita imunoglobulinů

- obrovská variabilita protilátek je umožněna 3 mechanismy:
 1. pokud předpokládáme, že se segmenty V, D a J mohou **kombinovat náhodně**, pak může vzniknout řádově 107 různých kombinací (lze tedy rozlišit 107 různých antigenů)
 - + **spojuvací variabilita** — po vyštěpení úseků během přeskupení nejsou konce odštěpeny zcela přesně a jejich spojením mohou vznikat nové varianty + enzym terminální transferáza prodlužuje konce o náhodné úseky N-sekvence
 2. možnost **nepřesného napojování konců segmentů** při procesu jejich spojování; některé nukleotidy mohou být deletovány nebo insertovány
 3. **somatické mutace**, které se uplatňují v době, kdy B-lymfocyt stimulovaný antigenem začne proliferovat — zvyšují počet variant → selekce mutantů s vysokou afinitou (může dojít i k reaktivaci rekombinačních procesů — enzym aktivací indukovaná cytidin deamináza, AID)

Izotopový přesmyk

- vyštěpení velkých úseků IgH genů pro konstantní část H-řetězce — ztráta segmentů C, přepsán je potom ten C-segment, který leží nejbliž VDJ-segmentu
- nastává při terminální diferenciaci B-lymfocytů
- mohou probíhat paralelně — současná produkce IgD a IgM

Eliminace autoreaktivních klonů

- autoreaktivní klony vznikají při tvorbě širokého repertoáru klonů B-lymfocytů, většina se eliminuje na úrovni nezralého B-lymfocytu (apoptoticky)
- pokud buňka unikne, nedojde k její plné aktivaci, chybí pomocný signál od Th-lymfocytu (přísnější eliminace)

16 — Antigeny, hapteny, alergeny...

Antigeny, superantigeny, hapteny, nosiče, imunogen, alergen, autoantigen.

Antigen

- **tj. látka, kterou imunitní systém rozeznává a reaguje na ni** — jakýkoliv cizí nebo potenciálně nebezpečný materiál — navozuje produkci jedné nebo více protilátek (teorie zámku a klíče)
 - podle nové definice všechny molekuly nebo jejich fragmenty, které mohou být vázány molekulami MHC, vlastní antigeny jsou fyziologicky tolerovány, cizí napadeny

a) **exoantigeny** — látky vnějšího prostředí

- například strukturální proteiny bakterií

b) **endoantigeny** — látky organismu vlastní

- například antigeny krevních skupin AB0
- **epitop** — konkrétní (specifická) povrchová část antigenu, které se váže na protilátku — tzv. **antigenní determinanta**, jeden klíč na svazku

Superantigen

- tj. **exoantigen** (obvykle produkt infekčních mikroorganismů), který **vyvolá nespecificky aktivaci velkého počtu lymfocytů nezávisle na antigenní specifitě**; pro aktivaci imunitního systému nevyžadují APC
- mají 2 vazebná místa — jedním se vážou na molekuly HLA II, druhým na TcR
 - rychlá aktivace T-lymfocytů, sekrece cytokinů (až šokové stavy), produkce autoimunitních protilátek
- například enterotoxin a TSST (SA), pyrogenní toxiny (streptokok), enterotoxin (Clostridium difficile), M protein (streptokok — vázaný na buňku)

Imunogen

- tj. **látka schopná vyvolat imunitní odpověď** — specifický typ antigenu
- imunogen bývá antigenem, ale antigen nemusí být imunogen

Hapten

- tzv. osamělý epitop
- tj. **většinou nízkomolekulární látka, která je antigen, ale není imunogen** — k vyvolání imunitní odpovědi se musí výzat na vysokomolekulární **nosič**
 - **nosič** — makromolekula, která může vázat hapteny → stává se imunogenní
- například penicilin vázající se na krevní proteiny

Alergen

- tj. **exoantigen, který je schopen vyvolat imunitní alergickou reakci u vnímavého jedince**
- může vzniknout po požití alergenu, inhalací, injekcí nebo kontaktem s kůží
- například pyly, traviny, prach, roztoči, potraviny, léky

Autoantigen

- tj. **endoantigen, který je schopen vyvolat autoimunitní reakci** — tzn. dochází k poruše imunologické tolerance pro daný antigen, ačkoliv fyziologicky rozeznány být nesmějí
- obvykle protein nebo jejich komplex (DNA, RNA) → autoprotilátky

17 – Antigenicita

Antigenicita, adjuvans, T-dependentní a T-independentní antigeny.

Antigenicita

- tj. **schopnost specificky kombinovat finální produkty imunitní odpovědi** (sekretované protilátky a/nebo povrchové receptory na T-buňkách)
- všechny imunogenní molekuly jsou antigenní, naopak to neplatí

Adjuvans

- tj. **pomocná látka při pohlcení antigenu APC** (popř. napomáhá nespecifické stimulaci imunity)
- využívá se při imunizaci zvířat a lidí při stimulaci specifického imunitního systému
 - odpověď je silnější, protilátky přetrvají déle a ve větším množství
 - vytvoření podkožního depa, ze kterého se antigen postupně uvolňuje
- používaná adjuvancia:
 - **Freundovo adjuvans** (experimentálně, veterina — olej, voda, usmrcená mykobakteria),
 - **hydroxid hlinitý $Al(OH)_3$** (medicína — antigen se adsorbuje na částice hliníku, pomáhá pohlcení APC, indukuje zejména pomocné T-lymfocyty)

T-dependentní antigeny

- viz otázku 1.13
- tj. **vyžadují spolupráci antigen prezentujících buněk a Th lymfocytů**
- spadá sem **většina proteinů**
- reakce probíhá ve 2 fázích — primární a sekundární odpověď
- vznikají vysokoafinní protilátky a paměťové buňky

T-independentní antigeny

- antigen jsou schopny B-buňky aktivovat přímo
- jedná se většinou o polysacharidy
- dochází hlavně k tvorbě nízkoafinních IgM
- nevzniká paměť
- **TI independentní antigeny** — obsahují PAMP motivy, aktivace prostřednictvím TLR
 - výsledek aktivace závisí na koncentraci antigenu — vysoká koncentrace → polyklonální aktivace i nespecifických B-lymfocytů
 - typicky bakteriální lipopolysacharid, mikrobiální DNA

18 – MHC

MHC, genová lokalizace, buněčná distribuce, dědičnost, biologický význam variability MHC.

MHC (major histokompatibilit complex)

- tj. genetický systém, který je primárně zodpovědný za rozeznávání vlastního od cizorodého
- rozsáhlý komplex genů, které **determinují povrchové molekuly (antigeny) umístěné v plazmatické membráně buněk**
- rozeznávají se 2 třídy MHC:
 1. **MHC I. třídy (MHC gp I)** — přítomny na všech jaderných buňkách organismu
 2. **MHC II. třídy (MHC gp II)** — jen na APC (dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty)
- HLA (human leukocyte antigens) — označují se tak lidské MHC molekuly
 - HLA I. třídy mají 3 izotypy — HLA-A, HLA-B, HLA-C
 - HLA II. třídy mají 3 izotypy — HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR
- existují také tzv. **neklasické MHC gp I** (zvané též MHC gp Ib)
 - sem patří HLA-E, HLA-F, HLA-G
 - patří sem také molekuly ze skupiny CD1, které sice nejsou produkty MHC (geny jsou lokalizovány mimo MHC), ale strukturně a funkčně mají k MHC gp velmi blízko
 - jsou však mnohem méně polymorfní, vyskytují se zpravidla jen na některých buňkách a většinou se specializují na vazbu zvláštních ligandů
 - HLA-E se vyskytuje na mnoha typech buněk a váže tzv. signální (N-terminální) peptidy pocházející z biosyntetických prekurzorů HLA-A, HLA-B, HLA-C a HLA-G
 - HLA-G se nachází pouze na povrchu buněk trofoblastu a váže široké spektrum peptidů
 - komplexy HLA-E a HLA-G s peptidy jsou rozeznávány specializovanými inhibičními receptory NK buněk a přispívají tak k toleranci plodu v děloze

Funkce MHC

- základní funkcí MHC je **vázat peptidové fragmenty proteinů a vystavovat je na buněčném povrchu tak, aby byly rozeznatelné T-lymfocyty** (pomocí jejich antigenně specifických receptorů TcR)
- HLA I — exprimovány na všech jaderných buňkách
 - prezentují CD8+ T-lymfocytům proteiny produkované buňkou
 - proteiny jsou buď z normální nitrobuněčné syntézy, nebo jde o produkty proteosyntézy po virové infekci, či vlastní aberované molekuly například v důsledku nádorového procesu
- HLA II — exprimovány na povrchu APC
 - prezentují CD4+ T-lymfocytům peptidy pohlčené buňkou
- **prezentace antigenu je prvním předpokladem pro rozvoj imunitní reakce**

Genový komplex MHC

- rozsáhlý hlavní histokompatibilní komplex (více než 3500 kb) se u člověka nachází na 6. chromozomu (zde nazývaný HLA komplex),
- kromě genů kódujících MHC I a II obsahuje i geny kódující některé složky komplementu, cytokiny (TNF), podjednotky proteazomů, podjednotky peptidových pump, tzv. stresové proteiny (proteiny tepelného šoku) a některé další proteiny — celkem obsahuje tento genový komplex téměř 50 genů

Genová lokalizace a polymorfismus MHC gp

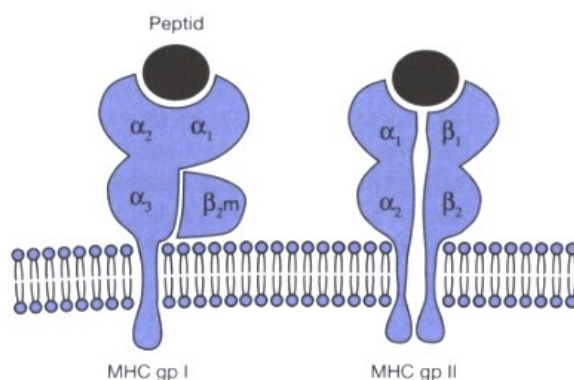
- geny HLA systému jsou lokalizovány na **p raménku 6. chromozomu**
- jsou velmi polymorfní — v populaci existují desítky až stovky různých alel jednotlivých izotypů; jednotlivé alelické formy se liší záměnami jedné či několika aminokyselin
 - důsledkem je, že tyto různé varianty mohou vázat různé strukturní typy peptidů
 - kdyby buňky byly vybaveny pouze jedním typem MHC, mohlo by se stát, že z proteinů některého patogenu (například viru) by nebylo možno získat peptidy schopné vazby na tento MHC
- geny HLA I. třídy nesou na každém z lokusů A, B a C maximálně 2 různé alely, od každého z rodičů jednu
 - **na jedné buňce je tedy exprimováno maximálně 6 různých molekul HLA I**
 - i kdyby se stalo, že by žádná z těchto 6 různých MHC molekul nevázala žádný z peptidů nějakého obzvlášť rafinovaného viru, je prakticky jisté, že některé virové peptidy budou vázat jiné HLA molekuly přítomné na buňkách jiných jedinců v populaci
- polymorfismus má tedy **ochranný význam** jak na úrovni jedince, tak na úrovni populace
 - negativním efektem polymorfismu jsou komplikace při orgánových transplantacích
- v případě HLA II. třídy se polymorfní řetězce α a β , kódované geny lokalizovanými na 2 různých chromozomech, mohou vzájemně kombinovat — jedna buňka tak může nést 10-20 různých molekul HLA II. třídy
- konkrétní kombinace alel jednotlivých lokusů HLA systému na jednom chromozomu se nazývá HLA haplotyp
 - každý člověk nese jeden mateřský a jeden otcovský haplotyp
 - geny pro molekuly HLA jsou kodominantní — fenotypově se tedy vyjadřují současně, takže buňky exprimují spolu HLA molekuly podle matčina i otcova haplotypu
 - každý člověk má tedy na svých buňkách molekuly kódované dvojicemi alel každého genu pro molekuly HLA I. a II. třídy — například HLA-A1 a A43, HLA-B7 a B41 apod.

19 — HLA-I, HLA-II

HLA-I a HLA-II — struktura molekul, MHC restrikce a prezentace antigenu.

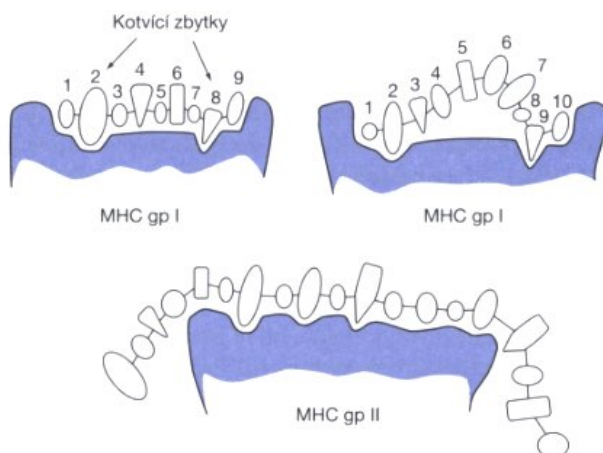
Struktura MHC

- **MHC I — vyjádřeny na všech jaderných buňkách**
 - složeny z transmembránového **těžkého řetězce α** (44 kDa), který je nekovalentně asociován s **lehkým řetězcem β 2-mikroglobulinem**
 - α -řetězce (α_1 , α_2 , α_3) jsou glykoproteiny se 3 funkčními doménami — externí, transmembránovou a cytoplazmatickou
 - α_1 a α_2 (N-terminální) vytváří vazebné místo pro peptidy (rýha na povrchu, dno tvoří α_3 a β 2-mikroglobulin, které jsou strukturně podobné imunoglobulinovým doménám)
- **MHC II — vyjádřeny na APC**
 - jsou heterodimery — složené z jednoho **těžkého α -řetězce** a jednoho **lehkého β -řetězce** — oba řetězce jsou glykoproteiny
 - řetězce se skládají z externí, spojovací, transmembránové a cytoplazmatické oblasti
 - extracelulární část je tvořena 2 doménami — α_1 , α_2 , β_1 , β_2 ; domény α_1 a β_1 (N-terminální) jsou variabilní a vytvářejí vazebné místo pro proteiny, α_2 a β_2 jsou konstantní



Vazba peptidů na MHC gp

- u MHC I je vazebné místo pro peptidy na obou koncích uzavřeno, a proto se na tyto molekuly váží peptidy o délce 8-10 aminokyselin, které se do takového vazebného místa vejdou
- u MHC II je vazebné místo na obou koncích otevřené, takže se do něj mohou vázat i peptidy delší (obvykle 15-35 aminokyselin, ale i delší)
- určitá molekula MHC (například určitá alelická forma HLA-A) váže peptidy, které sdílejí základní společné strukturní rysy, tj. vykazují určitý vazebný motiv (sekvenci aminokyselin)



Vazba peptidů na MHC I

- k vazbě endogenních peptidů pocházejících z buňky dochází během biosyntézy v endoplazmatickém retikulu (ER) — bezprostředně po vytvoření polypeptidového řetězce α a $\beta 2$ (tj. po translaci mRNA) dochází v lumen ER k poskládání do správné prostorové konformace a vzájemné asociaci
- ve stejné době dochází i k asociaci s některým peptidem, jehož struktura vyhovuje vazebným nárokům vazebného místa daného MHC I — tyto peptidy jsou do ER transportovány z cytoplazmy prostřednictvím specifických membránových peptidových pump složených z podjednotek zvaných TAP
- každý komplex MHC I, který je propuštěn k dalšímu zpracování v Golgiho aparátu a který se posléze objeví na buněčném povrchu, musí obsahovat 3 složky — α řetězec, $\beta 2$ a peptid
 - peptidy pocházejí z proteinů, které jsou degradovány v cytoplazmě proteazomem — proteazomy štěpí hlavně cytoplazmatické proteiny, které byly označeny k likvidaci ubikvitinem; toto štěpení je součástí fyziologického metabolického obratu buněčných proteinů a podléhají mu normální buněčné proteiny i proteiny pocházející z intracelulárních parazitů (například virů)
- tzv. **zkřížená prezentace** (cross-presentation) — v mnoha případech je potřeba zajistit, aby se na MHC I vázaly i peptidy pocházející z exogenních (buňkou pohlčených) proteinů — tento děj je založen na tom, že některé fagocytované proteiny mohou být transportovány z fagozomu do cytoplazmy, tam rozštěpeny v proteazomech a příslušné peptidy standardním způsobem transportovány do ER; jinou možností je, že části fagozomů obsahující již peptidové fragmenty pohlčených proteinů fúzí s ER
 - ukazuje se, že schopnost zkřížené prezentace není stejná u všech antigen prezentujících buněk; nejučinnější je u lidských a myších dendritických buněk

Vazba peptidů na MHC II

- v ER vznikají komplexy α a β řetězců s proteinem zvaným **invariantní řetězec** (Ii) — ten blokuje vazebné místo pro peptidy, takže se do něj nemohou vázat peptidy obdobné těm, které se váží na MHC I
- komplexy $\alpha\beta$ -Ii procházejí normální biosyntetickou dráhou přes Golgiho aparát — sekreční váčky oddělené od Golgiho aparátu na své cestě k povrchu buňky fúzí s endozomy (tj. váčky vznikající endocytózou proteinů zachycených na povrchu APC) a hydrolázy přítomné v endozomech štěpí pohlčené proteiny na fragmenty
- po fúzi endozomu s transportním váčkem přicházejícím z Golgiho aparátu a obsahujícím prekurzorové komplexy MHC II se Ii řetězec rozštěpí a do uvolněného vazebného místa se mohou vázat peptidové fragmenty endocytovaných proteinů

MHC restrikce

- tj. schopnost CD8⁺ Tc-lymfocytů likvidovat pouze buňky, které mají cizí antigen na svém povrchu prezentován ve spojení s vlastními HLA antigeny I. třídy
- tzn. receptor na povrchu T-lymfocytů (TcR) je specifický pro unikátní kombinaci peptidu a MHC molekuly — T-lymfocyty rozeznávají jak peptid navázaný na MHC, tak MHC molekulu

20 — Cytokiny a chemokiny

Cytokiny a chemokiny — dělení, biologický význam.

Cytokiny

- **molekuly produkované různými typy buněk sloužící na mezibuněčnou komunikaci**
- tzv. tkáňové hormony — působí jako **základní regulátory imunitního systému**
- chemicky jde o proteiny, produkty buněk imunitního systému (buď secernované do oběhu nebo vázané na membránách buněk) působící hlavně v imunitním systému
 - například některé signální povrchové proteiny (CD80, CD86, CD40L, FasL) můžeme považovat za membránové cytokiny
 - výhodou membránových cytokinů je, že je zajištěno jejich výrazně lokální působení a nedochází k zředování difuzí a odplavování
- aktivní v pikomolárních množstvích
- pro jejich produkci je nutný podnět (stimul)
- cytokin může působit pouze na buňku, která exprimuje receptor — receptory jsou většinou asociovány s intracelulárními enzymy (proteinkinázy — fosforylují další proteiny)
 - vazba cytokinu → agregace receptorů → přiblížení a vzájemná fosforylace asociovaných kináz, a tím jejich aktivace → fosforylace specifických substrátů → spuštění signální kaskády
- vlastnosti cytokinů:
 1. **pleiotropní** — působí na několik různých druhů buněk
 2. **redundantní** — více cytokinů stejný efekt, jeden nahradí jiný
- vzájemný vztah působení může být:
 - a) **synergický** — efekt kombinace vyšší než efekt jednotlivých cytokinů
 - b) **antagonistický** — jeden cytokin inhibuje druhý
 - často **působí v kaskádě** — jeden cytokin indukuje tvorbu druhého
- podle místa účinku je lze rozdělit na
 1. **autokrinní** — ovlivňují buňku, která je vyprodukovala
 2. **parakrinní** — působí na okolní buňky, které pro ně mají receptory
 3. **endokrinní** — jsou uvolňovány do krve a působí daleko od místa svého vzniku
- pro některé účely je nutné koordinované spolupůsobení několika různých cytokinů; tyto složité synergistické a antagonistické interakce v cytokinovém systému se označují jako tzv. **cytokinová síť**
- ve snaze o zavedení jednotné nomenklatury byly označovány jako interleukiny a číslovány podle pořadí, v jakém byla jejich struktura poznána; nomenklatura interleukinů nebyla však důsledně aplikována na některé molekuly, u nichž byl z různých důvodů ponechán jejich tradiční název
- funkce v imunitním systému:
 - interakce mezi buňkami imunitního, zánětlivého a hematopoetického systému
 - aktivace vrozené i specifické imunity
 - kontrola vývoje a funkce buněk imunitního systému a hematopoetických buněk
 - ovlivňují proliferaci, diferenciaci a migraci buněk
- tyto molekuly mají v organismu další role, které nejsou omezeny jen na imunitní systém — hematopoéza, regenerace tkání, angiogeneze, embryonální vývoj, karcinogeneze, ovlivnění řady mozkových funkcí, gametogeneze, imunostimulace a imunosuprese

Klasifikace cytokinů (tradiční členění)

1. **interleukiny (IL) 1-35** — heterogenní skupina cytokinů regulujících hlavně rozličné aspekty vývoje a aktivace leukocytů
2. **chemokiny** — **IL-8** a řada příbuzných molekul s chemotaktickou aktivitou
3. **interferony (INF) α , β , γ** — důležité složky neadaptivních antivirových obranných mechanismů a regulátory imunity
4. **transformující růstové faktory (TGF) α , β** (strukturně zcela odlišné)
5. **faktory stimulující kolonie (CSF)** — cytokiny stimulující v kostní dřeni diferenciaci granulocytů (**G-CSF**), monocytů (**M-CSF**) nebo obou typů myeloidních buněk (**GM-CSF**)
6. **faktory nekrotizující nádory (TNF) α (kachektin), β (lymfotoxin)** — tyto cytokiny mohou působit cytotoxicky (indukce apoptózy) a regulačně (podobně jako IFN- γ)
7. **jiné růstové faktory** — růstový faktor kmenových buněk (SCF), erythropoietin (EPO), růstový faktor fibroblastů (FGF), nervový růstový faktor (NGF), faktor inhibující leukemii (LIF) atd.

Příklady významných cytokinů

Aktivace T-lymfocytů	IL-2, IL-12, IL-15
Aktivace Th1 imunitní odpovědi	IL-2, IL-12, INF- γ , TNF
Aktivace Th2 imunitní odpovědi	IL-4, IL-5, IL-13
Aktivace B-lymfocytů	IL-4 (IL-5, IL-6)
Aktivace NK buněk	IL-2, IL-12
Aktivace makrofágů, exprese MHC	INF- γ , TNF
Chemotaxe	IL-8, MCP-1, MIP-1
Diferenciace myeloidních buněk	G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3
Diferenciace kmenových buněk	SCF (IL-1, IL-3, IL-7)
Diferenciace erytroidních buněk	EPO
Protivirové působení (inhibice replikace RNA)	INF- α , INF- β

Chemokiny

- **chemotaxiny** — tj. chemotaktické látky obecně (například produkty bakterií, složka komplementu C5a), nemusí se jednat nutně o cytokiny
- **chemokiny** — tj. skupina cytokinů s chemotaktickým účinkem
 - chemicky jde o nízkomolekulární, strukturně velmi konzervované peptidy
 - člení se do 4 skupin, dle počtu a vzdálenosti cysteinů — C, CC, CXC, CX3C
- kromě migrace buněk mají další funkce (regenerace, reparace, sekrece kolagenu, mucinu...)
- jsou sekretovány jak buňkami imunitního systému, tak i buňkami dalších tkání organismu
- většina receptorů rozpoznává několik různých chemokinů a jeden chemokin se může vázat na několik receptorů

21 – Adhezivní molekuly

Adhezivní molekuly – dělení, biologický význam.

- **zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami založenou na přímém kontaktu** — tím se liší od cytokinů a hormonů, pomocí nichž mohou buňky komunikovat na určitou vzdálenost bez nutnosti bezprostředního kontaktu
- adhezivní molekuly se vyskytují na všech buňkách těla i na mezibuněčné hmotě

Obecné vlastnosti adhezivních molekul

- většina dějů v imunitním systému závisí na mezibuněčných kontaktech — například kooperace mezi Th1 a makrofágy, mezi Th2 a B buňkami, interakce mezi T-lymfocyty a APC, adheze leukocytů k endoteliálním buňkám, kontakt mezi Tc a infikovanou buňkou atd.
- tyto mezibuněčné kontakty jsou založeny na interakcích mezi páry adhezivních molekul, z nichž jedna je na povrchu jedné, druhá na povrchu druhé buňky (je jen věcí definice, kterou z molekul nazveme receptorem a kterou ligandem)
- ve většině případů nepůsobí adhezivní molekuly pouze jako „lepidlo“, ale po interakci s vazebným partnerem přenášejí do buňky signály, které ji informují o tom, že došlo k adhezi
- některé adhezivní molekuly jsou exprimovány konstitučně, jiné se objevují na buňkách až po aktivaci — aktivačním signálem může být vazba cytokinu nebo signalizace přes jiný povrchový receptor
- exprese adhezivních molekul není omezena jen na imunitní systém, buněčná adheze je základem celé řady neimunitních procesů fyziologických (buněčná a tkáňová diferenciací a regenerace, embryogeneze, hematopoéza) i patologických (karcinogeneze, metastazování nádorových buněk aj.)
- řada adhezivních molekul může existovat v solubilních formách, které pak ovlivňují cílové buňky na určitou vzdálenost, a naopak jsou známy membránové formy některých cytokinů — tím se hranice mezi cytokiny a adhezivními molekulami v řadě případů stírá
 - je opět jen věcí definice, budeme-li některé z těchto adhezivně-signalizačních molekul nazývat spíše membránovými cytokiny, resp. receptory membránových cytokinů
 - například molekuly CD80, CD86, či CD40L jsou mezi membránové cytokiny zařazovány

Klasifikace adhezivních molekul

1. Integriny

- tvoří velkou skupinu adhezivních receptorů, mají velkou důležitost i mimo imunitní systém
- některé z nich váží komponenty mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix), jiné váží membránové ligandy, které patří do imunoglobulinové skupiny
- integriny existují ve 2 konformačních stavech, které se výrazně liší afinitou ke svým ligandům — v klidovém stavu jsou v nízkoafinní konformaci, aktivace buňky vyvolaná různými stimuly vede k přechodu do vysokoafinního stavu, který umožňuje pevnou vazbu
- molekuly integrinů se skládají vždy ze 2 transmembránových, nekovalentně asociovaných, podjednotek α a β — určitá podjednotka β (existují $\beta 1$ - $\beta 8$) se může sdružovat s několika různými podjednotkami α — rozeznávají se proto strukturní skupiny integrinů nazvané podle podjednotky β , která se v nich nachází
 - **$\beta 1$ integriny (zvané VLA)** — váží většinou složky mezibuněčné hmoty (ligandy jsou fibronectin, kolageny, laminin, vWF) a účastní se vazby leukocytů na povrch endotelií, kde rozeznávají membránové proteiny (ligand VCAM-1, tj. CD106)
 - **$\beta 2$ integriny (leukocytární integriny)** — tato skupina má 3 členy se společnou $\beta 2$ podjednotkou (CD18):

-
1. **CD11a/CD18 (LFA-1)** — hlavní adhezivní molekula leukocytů; váže několik ligandů imunoglobulinové strukturní rodiny (ICAM-1, ICAM-2 a ICAM-3)
 2. **CD11b/CD18** — má několik funkcí — 1) adhezivní molekula s podobnou specifitou jako LFA-1, 2) působí jako komplementový receptor (CR3; váže fragment C3b), 3) váže některé sacharidové složky bakteriálních povrchů (tj. působí jako lektin)
 3. **CD11c/CD18 (gp150/95)** — působí jako komplementový receptor CR4
- **β3 integriny** — jsou hlavními receptory trombocytů pro složky mezibuněčné hmoty, funkcí je zachycování destiček v místě vaskulárního poškození
 - **β7 integriny** — funkcí je interakce subpopulací lymfocytů s endoteliemi a s epiteliálními buňkami, dále vazba na endoteliální ligandy VCAM-1 a vazba na epiteliální ligand E-kadherin

2. Adhezivní molekuly imunoglobulinové skupiny

- povrchové proteiny, jejichž extracelulární části obsahují domény podobné Ig doménám
 - **ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3** — ligandy leukocytárních integrinů
 - **VCAM-1** — ligand integrinu β1
 - adhezivní receptor T-lymfocytů **CD2** — ligand LFA-3 (CD58)
 - signalizační receptory **CD28** a **CTLA-4** — ligandy CD80 a CD86
 - antigenně specifické receptory **TcR** a **BcR**
 - glykoproteiny **MHC I a II**
 - koreceptory T-lymfocytů **CD4** a **CD8**

3. Selektiny

- membránové glykoproteiny, které váží sacharidové struktury
- molekuly všech selektinů se skládají z dlouhého flexibilního „stonku“ a koncové lektinové domény, pomocí níž váží specifické sacharidové struktury na jiných buňkách
- skupina selektinů obsahuje 3 strukturně příbuzné adhezivní receptory označované podle typů buněk, na kterých se vyskytují:
 1. **L-selektin (leukocytární)** — nachází se na leukocytech, funkcí je rolování leukocytů
 2. **E-selektin (endoteliální)** — nachází se na aktivovaném endotelu, funkcí je adheze leukocytů na aktivovaný endotel v místě zánětu
 3. **P-selektin (trombocytární)** — nachází se na aktivovaných destičkách a aktivovaném endotelu, funkcí je adheze leukocytů na aktivovaný endotel v místě zánětu; v hemostáze

4. Muciny

- velmi silně glykosylované glykoproteiny
- mohou být buď secernované, nebo membránově vázané
- některé membránové muciny nesou oligosacharidové řetězce, které jsou ligandy selektinů
 - **CD34** — přítomný na povrchu endoteliálních buněk
 - **PSGL-1** — endoteliální muciny, ligandy pro E- a P- selektin
- mezi muciny patří také povrchový sialoglykoprotein leukocytů
 - **CD43** — zřejmě jako hlavní „antiadhezivní“ molekula leukocytů, která brání příliš snadnému kontaktu těchto buněk mezi sebou

22 — T-lymfocyty

T-lymfocyty, CD klasifikace, význam, funkce, fyziologické koncentrace v periferní krvi.

- T-lymfocyty jsou představiteli **specifické buněčné imunity**
- **vyvíjejí se z lymfoidních prekurzorů v kostní dřeni a dozrávají v thymu** — viz otázku 1.7
- efektorové T-lymfocyty mají zásadní úlohu při:
 1. eliminaci buněk infikovaných intracelulárními parazity a buněk mutovaných
 2. při regulaci vývoje B-lymfocytů v plazmocyty produkující protilátky

Klasifikace T-lymfocytů podle typu TcR

- na povrchu každého T lymfocytu se nachází několik desítek tisíc identických, klonálně unikátních receptorů TcR

1. T-lymfocyty nesoucí $\alpha\beta$ TcR

- jsou u většiny savců konvenčním (většinovým) typem
- potřebují ke svému vývoji thymové prostředí
- rozeznávají peptidy vázané v komplexu s MHC

2. T-lymfocyty nesoucí $\gamma\delta$ TcR

- představují menšinovou a méně prozkoumanou populaci
- poznávají antigen většinou přímo, bez přítomnosti molekul MHC — jsou schopné rozpoznat nativní antigeny podobně jako B-lymfocyty
- některé rozeznávají jednoduché organické látky (například aminy) přítomné v potravinách nebo produkované mikroorganismy a navázané na specifické povrchové proteiny APC a jsou jimi výrazně stimulovány (například k silné produkci cytokinu INF- γ)
- některými vlastnostmi se podobají NK buňkám a zřejmě se uplatňují při obraně proti některým specifickým typům patogenů (mykobakterie) a zřejmě hrají i roli v protinádorových mechanismech

T-lymfocyty exprimující $\alpha\beta$ TcR

CD klasifikace

- T-lymfocyty je možné rozdělit pomocí membránových znaků, označovaných jako **CD (cluster of differentiation)** — tj. systém klasifikace povrchových molekul, lze je detekovat monoklonální protilátkou
- CD4 a CD8 jsou molekuly nacházející se na membráně lymfocytu v blízkosti TcR, fungují jako koreceptory — podle těchto znaků se rozlišují:
 1. **CD4+ T-lymfocyty — pomocné (helperské) Th-lymfocyty**
 - rozpoznávají antigen, který jim je předkládán společně s molekulami HLA II. třídy
 2. **CD8+ T-lymfocyty — cytotoxické Tc-lymfocyty**
 - rozpoznávají antigen, který jim je předkládán společně s molekulami HLA I. třídy
- obě skupiny mají pak charakteristický **společný znak CD3** (součást TcR receptoru)
- pozn.: Treg mají CD4 i CD8, NK buňky mají CD16 a CD56

Interakce T lymfocytů s APC

- na povrchu každé APC jsou přítomny tisíce různých komplexů MHC II. třídy s peptidy
 - většina peptidů pochází z normálních proteinů organismu vlastních
 - větší či menší část jich může pocházet z cizorodých proteinů
- na povrchu dendritických buněk se dále nacházejí:
 - **adhezivní molekuly (ICAM-1)** — váže se na adhezivní receptor LFA-1 na povrchu T-lymfocytů — tyto adhezivní páry molekul umožňují dostatečně pevný kontakt obou buněk
 - **ligandy kostimulačních receptorů (CD86)** — váže se na kostimulační receptor CD28 na povrchu T-lymfocytů
- místo kontaktu mezi stimulovaným T-lymfocytem a APC, v němž jsou koncentricky organizovány různé druhy receptorů a adhezivních molekul, se nazývá **imunologická synapse** (analogie k neurologické synapsi)
 - prekursor Th v rámci tohoto procesu tedy dostane soubor signálů přes TcR, CD28, receptory pro cytokiny (IL-2) a přes další povrchové adhezivní a signalizační molekuly
 - tyto signály vedou k pomnožení klonu Th s příslušnou specifitou a ke konečné diferenciaci na efektorové T buňky příslušného typu.
 - důležitou roli při tom hraje i IL-2, který je využíván samotnými T buňkami jako autokrinní růstový faktor nezbytný k jejich dělení a proliferaci.
- aktivace T-lymfocytů je naopak negativně regulována inhibičními receptory T-lymfocytů (například molekuly CTLA-4 nebo PD-1)

Funkce a fyziologické koncentrace

Buňka	Koncentrace	CD znaky	Funkce
T-lymfocyty	1 200/ μ l	CD3	zodpovědné za buněčnou rást specifické imunity
Th	700/ μ l	CD3, CD4	reagují na antigeny předkládané na APC, zahajují specifickou imunitní odpověď
Th1			podporují cytotoxickou a buněčnou část imunity, obrana před intracelulárními parazity (některé bakterie, viry)
Th2			podporují protilátkovou odpověď, obrana před extracelulárními parazity včetně mnohobuněčných parazitů
Th17			prozánětlivé vlastnosti, zvyšování aktivity neutrofilů, obrana proti extracelulárním bakteriím a písním
Tc	400/ μ l	CD3, CD8	protinádorová a protivirová imunita
Treg		CD4, CD25	regulace imunitní odpovědi a ochrana organismu před poškozením vlastním imunitním systémem
B-lymfocyty	200/ μ l	CD19, CD20	diferenciace do plazmocytů → produkce protilátek

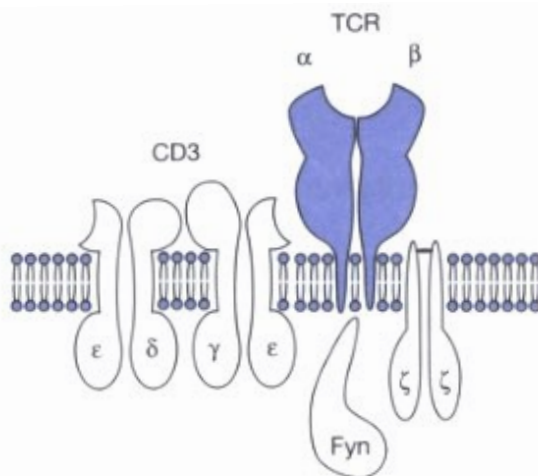
23 — TcR

TcR, genová rekombinace a zdroje variability, struktura, funkce.

= receptor T-lymfocytů — slouží k rozpoznání antigenu

Struktura TcR

- část komplexu TcR, která váže antigen, je strukturně podobná imunoglobulinům — jedná se o heterodimer složený ze 2 polypeptidových řetězců:
 - α a β řetězce (95%) — TcR2 (αβ)**
 - potřebují thymus k vývoji
 - peptidy musí být vázané s MHC
 - γ a δ řetězce (5%) — TcR1 (γδ)**
 - mohou se vyvíjet mimo thymus
 - mohou rozpoznávat antigeny bez vazby na MHC
- jejich N-terminální části jsou variabilní a tvoří vazebné místo pro antigen
- TcR heterodimery jsou asociovány s přídatnými CD3 polypeptidy, s nimiž vytvářejí **TcR komplex** — tj. skupina 3-5 polypeptidů (γ, δ, ε, ζ, η), které jsou nutné k expresi TcR na povrchu T-lymfocytu a k přenosu signálu do nitra buňky
 - řetězce CD3 komplexu jsou transmembránové proteiny, jejichž intracelulární části jsou asociovány s protein-tyrosinkinázami skupiny Src — signalizace přes TcR je založena na podobných principech jako v případě BcR (aktivace kinázových kaskád vedoucích nakonec například k buněčnému dělení nebo k aktivaci efektorových mechanismů T buněk)



- při rozpoznávání antigenu spolupracují s TcR koreceptory CD4 a CD8
 - CD4 pomáhá vázat komplexy obsahující MHC glykoproteiny II. třídy
 - CD8 pomáhá vázat komplexy obsahující MHC glykoproteiny I. třídy
- T-lymfocyty (αβ TcR) rozeznávají antigen (komplex peptid-MHC glykoprotein), který je na povrchu antigen prezentujících buněk (APC)
 - T-lymfocyt kontaktuje APC nejprve prostřednictvím několika druhů „nespecifických“ adhezivních molekul, a teprve potom může dojít ke kontaktu mezi TcR a antigenem
 - k tomu, aby T-lymfocyt dostal plný aktivační signál vedoucí k buněčnému dělení a konečné diferenciaci, je zpravidla potřeba spolupůsobení dalšího tzv. receptoru kostimulačního signálu (CD28) — ten rozeznává na povrchu APC kostimulační molekuly CD80 a CD86

Genová rekombinace a zdroje variability

- TcR je kódován 3 genovými komplexy:
 1. TcR- α na 14. chromozomu
 2. TcR- β na 7. chromozomu
 3. TcR- γ na 7. chromozomu
- TcR- δ je vmezeřen mezi geny TcR- α (při přeskupování je kompletně vyštěpen)
- organizace genů kódujících TcR typu $\alpha\beta$ i $\gamma\delta$ je podobná jako u genů pro imunoglobuliny (V, D, J a C segmenty) — genové komplexy pro TcR- β a TcR- δ jsou shodné s komplexem pro IgH, komplexy pro TcR- α a TcR- γ s komplexem pro IgL
- přeskupování genů probíhá podobně jako u imunoglobulinů a provádějí je stejné enzymy → stejné zdroje variability, u genů pro TcR nedochází k somatickým mutacím a afinitní maturaci

Vývoj T-lymfocytů a TcR

- prekursor T-lymfocytů přicházejí z kostní dřeně do thymu jako pro-thymocyty
 - u nich začnou se přeskupovat geny pro TcR- β a TcR- δ
 - po úspěšném přeskupení TcR- β dojde k expresi pre-TcR složených z β řetězce, tzv. pre-TcR α (obdoba ψ L u pre-BcR), a CD3 komplexu → přeskupování genů pro TcR- α → vznik definitivního TcR složeného z řetězců α a β (a CD3)
 - zároveň se povrchu exprimují CD4 a CD8 koreceptory, dochází k eliminaci autoreaktivních buněk (negativní selekce) a buněk s nefunkčním TcR (pozitivní selekce), selekcí projdou pouze ty, které s nízkou afinitou váží MHC proteiny, zachovávají si expresi CD4/CD8 a jdou do sekundárních lymfatických orgánů
- z některých autoreaktivních klonů se stávají regulační T-lymfocyty (periferní tolerance)
- podobně jako B buňky musí překonat několik kritických míst, mají ale mnohem přísnější výběr (98% lymfocytů vstupujících do thymu hyne)
- pokud přežijí autoreaktivní klony T buněk, nedostanou druhý, kostimulační, signál

24 — Th-lymfocyty

Th lymfocyty — rozdělení, funkce, spolupráce s ostatními buněčnými elementy.

- takové T-lymfocyty, které **exprimují TcR $\alpha\beta$ a znak CD4**
- reagují na antigeny předkládané na APC v souvislosti s HLA II. třídy
- zahajují specifickou imunitní odpověď

Th1-lymfocyty

- v jádře mají transkripční faktor **T-bet**
- produkují **IL-2, INF- γ**
- **imunitní reakce typu Th1 — základní funkcí Th1 buněk je ochrana před intracelulárními parazity** (intracelulární bakterie, například mykobakterie, viry a další)
 - setkání s některým z patogenů vede k jeho pohlcení dendritickými buňkami, ke stimulaci receptorů přirozené imunity (TLR) a k aktivaci těchto buněk — takto aktivované dendritické buňky prezentují peptidy pocházející z pohlcených mikroorganismů v komplexu s MHC II a zároveň u nich dojde ke zvýšení exprese kostimulačních molekul a produkci cytokinů
 - to, které cytokiny budou dendritické buňky produkovat, závisí na kombinaci receptorů přirozené imunity, jež jsou daným patogenem stimulovány, a na přítomnosti cytokinů a dalších faktorů produkovaných ostatními buňkami přirozené imunity
 - při Th1 odpovědi kombinace těchto stimulů vede u dendritických buněk k produkci **IL-12**, který je výrazným diferenciačním faktorem pro Th1
 - peptidy prezentované dendritickou buňkou na MHC II mohou být rozeznány TcR na povrchu prekurzorů Th (CD4+) — ty se po obdržení signálu množí a pod vlivem IL-12 posléze diferencují do efektorových Th1 buněk
- základními mechanismy, kterými Th1 buňky zprostředkovávají ochranu před intracelulárními parazity, jsou:

1. spolupráce s makrofágy a jejich stimulace k přeměně v aktivované makrofágy

- aby makrofág dokázal intracelulární parazity zničit, musí se změnit v aktivovaný makrofág, který disponuje dalšími baktericidními mechanismy (produkce NO) — pro přeměnu jsou nezbytné cytokiny produkované Th1 buňkami, zejména IFN- γ
- makrofág infikovaný intracelulárními parazity vystavuje na svém povrchu fragmenty proteinů pocházejících z parazita v asociaci s MHC II
- efektorové Th1 buňky kontaktují prostřednictvím TcR a adhezivních molekul infikované makrofágy a sekretují na ně IFN- γ , který je stimuluje k přeměně v aktivovanou formu; dalším důležitým signálem je interakce mezi kostimulačním receptorem CD40 na makrofázích a jeho ligandem (membránovým cytokinem) CD40L na povrchu aktivovaných Th1
- aktivované makrofágy (i ty, které nejsou infikovány a jsou pouze aktivovány IFN- γ) kromě toho, že mnohem lépe likvidují intracelulární parazity, sekretují také řadu látek (například cytokiny IL-1, TNF a další), které přispívají k další stimulaci T buněk a obecně stimulují lokální zánět, jenž napomáhá k potlačení infekce (Th1 buňky se proto někdy také nazývají zánětlivé T buňky)
- vzájemné působení Th1 a makrofágů je základem imunopatologické reakce opožděného typu (IV.)

2. podpora diferenciace cytotoxických CD8+ T lymfocytů

- úloha Th1 buněk při diferenciaci Tc lymfocytů — sekrece IL-2 (tento cytokin stimuluje proliferaci klonů Tc) a aktivace dendritických buněk (ty po aktivaci zvýší expresi molekul CD80 a CD86 na svém povrchu a jsou tak schopny stimulovat vývoj Tc)

Th2-lymfocyty

- v jádře mají transkripční faktor **GATA-3**
- **imunitní reakce typu Th2** — základní funkcí Th2 buněk je ochrana před extracelulárními parazity, včetně velkých mnohobuněčných parazitů
 - spolupracují při tom zejména s bazofily, eozinofily a žírnými buňkami
 - důležitá je i pomoc B-lymfocytům při produkci protilátek izotypu IgE, které se vážou na vysokoafinní Fc receptory hlavně na povrchu žírných buněk a bazofilů
- secernují hlavně **IL-4, IL-5, IL-6 a IL-10**
 - podněcují tak vývoj B-buněk a tvorbu protilátek čili humorální imunitu
 - naopak, inhibují činnost makrofágů
- k tomu, aby z prekurzorových Th buněk vznikl klon zralých efektorových buněk Th2, **je potřeba, aby se prekurzorová buňka Th setkala s antigenem** (komplexem MHC II a antigenního peptidu) na povrchu profesionální APC za přítomnosti IL-4
 - zdrojem IL-4 v tomto případě však nejsou APC, ale pravděpodobně bazofily, žírné buňky nebo NK buňky
 - optimálními APC jsou dendritické buňky, které mají na svém povrchu MHC II, potřebné adhezivní molekuly a kostimulační proteiny CD80 a CD86
 - spolupůsobením signálů předaných do T buňky přes TcR, CD28 (receptor pro CD80 a CD86), receptor pro IL-4 a receptor pro IL-2 dojde k opakovanému buněčnému dělení (proliferaci) a diferenciaci na klon zralých efektorových Th2

Th17-lymfocyty

- hlavní transkripční faktor je **ROR γ T**
- produkují **IL-17, IL-21, IL-22** (výrazné prozánětlivé účinky)
- **imunitní reakce typu Th17** — cytokiny produkované lymfocyty Th17 působí na široké spektrum buněk, ve kterých indukují produkci dalších prozánětlivých cytokinů a chemokinů (například TNF, IL-1, IL-6, IL-8) — Th17 tak navozují zánětlivou odpověď v infikovaných tkáních, vedoucí zejména k migraci neutrofilů do postiženého místa, k jejich aktivaci a produkci antibakteriálních peptidů
- Th17 jsou velmi důležité při ochraně organismu před extracelulárními bakteriemi a plísněmi, také se výrazně uplatňují u mnoha imunopatologických zánětlivých reakcí
- Th17 se diferencují z naivních T-lymfocytů společným působením cytokinů IL-6 a TGF- β , jejich vývojový program je pak dále stabilizován za přispění IL-21 a IL-23

Vzájemná regulace aktivit Th1, Th2 a Th17

- extracelulární infekce jsou optimálně potlačovány protilátkami (odpovědi závislé na Tfh, popř. Th2), intracelulární vyžadují zánětlivou reakci závislou na Th1, resp. Th17 buňkách
- o tom, budou-li se prekurzorové CD4⁺ Th buňky vyvíjet směrem k Th2, nebo k Th1, rozhoduje poměr koncentrací 2 cytokinů, a to **IL-12 a IL-4**
 - **IL-12 je produkován makrofágy a dendritickými buňkami** stimulovanými mikroorganismy — **stimuluje vznik Th1** — Th1 produkují cytokiny (IFN- γ), které dále podporují vývoj Th1 a silně inhibují vývoj Th2
 - **IL-4 je produkován hlavně bazofily a mastocyty** — **stimuluje vznik Th2** — produkty Th2 (IL-4 a IL-10) podporují vznik dalších Th2 a inhibují vývoj Th1
- započne-li tedy Th1 odpověď, bude mít silnou tendenci automaticky se stabilizovat a potlačovat konkurenční Th2 odpověď, a naopak (ale antagonismus není absolutní)
- na podobných principech je založena i regulace diferenciací buněk Th17 (skrz TGF- β a IL-6)

Folikulární Th-lymfocyty (Tfh)

- produkují **IL-21**
- nacházejí se zejména v lymfoidních folikulech
- základní funkcí Tfh je **spolupráce s B-lymfocyty**, které byly předem stimulovány rozeznáním antigenu — k této mezibuněčné kooperaci dochází v lymfoidních folikulech lymfatických uzlin a sleziny a spolupráce vede k pomnožení daného klonu B buněk a jejich konečné diferenciaci v plazmatické buňky produkující protilátky
 - buňky Tfh poskytují B lymfocytům potřebné pomocné signály prostřednictvím sekretovaných i membránově vázaných (CD40L) cytokinů
 - pomoc Tfh buněk B lymfocytům je založena na:
 1. **sekreci cytokinů IL-21 a IL-4** ve spojení s cytokiny charakteristickými pro Th1, Th2 a Th17 (v závislosti na převažujícím typu odpovědi)
 2. **přímém mezibuněčném kontaktu** — interakce mezi kostimulačním receptorem CD40 (B lymfocytů) a jeho ligandem CD40L (na povrchu aktivovaných Tfh)
- k tomu, aby z prekurzorových Th buněk vznikl klon zralých efektorových buněk Tfh, je potřeba, aby se prekurzorová buňka setkala s antigenem (komplexem MHC II a antigenního peptidu) na povrchu profesionální APC a obdržela signál přes kostimulační receptor CD28
 - diferenciační program Tfh buněk je však definitivně stabilizován až v průběhu interakcí s B-lymfocyty — důležitou roli zde zřejmě hraje kostimulační molekula ICOS na povrchu Tfh, která je podobná CD28 — ta je stimulována ligandem ICOS-L (z rodiny B7) na povrchu B-lymfocytů

25 — Regulační lymfocyty

Regulační CD4, CD8 lymfocyty, mechanismy regulačního působení.

Regulační (tlumivé, supresorové) T-lymfocyty

- jsou schopny potlačovat aktivity jiných efektorových T-lymfocytů
- kromě toho Treg účinně potlačují také aktivity APC

1. Thymové Treg (tTreg)

- „přirozené“ thymové regulační CD4+ T lymfocyty — tvoří zhruba 1-5 % krevních lymfocytů a mají fenotyp podobný aktivovaným T-lymfocytům (povrchová exprese podjednotky IL-2 receptoru CD25 a inhibičního CTLA-4)
- tTreg vznikají v thymu a jsou silně závislé na IL-2 — o jejich vývoji pravděpodobně rozhoduje intenzita signálu, který obdrží při stimulaci MHC II s vlastním peptidem v průběhu selekce v thymu
- tyto buňky Treg **nesou „autoreaktivní“ TcR**, ale narozdíl od jiných autoreaktivních T-lymfocytů vlastní tkáň ne napadají, ale naopak potlačují autoimunitní reakce
- mechanismy působení Treg zahrnují:
 1. **produkci tlumivých cytokinů (IL-10, TGF- β , IL-35)**
 2. **přímý kontakt s cílovými buňkami** (aktivované lymfocyty, DC) — vazba na molekuly CD80 a CD86 na povrchu APC, přímá cytotoxicita
- velmi důležitou roli hraje **povrchový protein CTLA-4** — je příbuzný kostimulačnímu receptoru CD28; interaguje s molekulami CD80 a CD86 na povrchu antigen prezentujících buněk (stejně jako CD28), avšak s vyšší afinitou než CD28
 - Treg tak mohou účinně kompetovat s konvenčními T buňkami a bránit jim v přístupu ke kostimulačním signálům; zároveň interakce CTLA-4 s CD80 a CD86 vede ke snižování jejich množství na povrchu APC
 - v DC tato interakce spouští i signální dráhu vedoucí k expresi enzymu indolamin-2,3-dioxygenázy (IDO) — IDO metabolizuje aminokyselinu tryptofan, metabolizace tryptofanu tak snižuje jeho koncentraci v okolí, což snižuje proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů
- další mechanismus je založen na cytotoxickém působení Treg podobném Tc (sekrece perforinů a granzymů) — Treg takto mohou zabíjet aktivované DC a další APC

2. Indukované Treg (iTreg)

- vznikají v periferních tkáních při většině antigenně specifických reakcí, ať již Th1, Th17 či Th2 typu, a působí zřejmě prostřednictvím podobných inhibičních mechanismů jako tTreg
- iTreg pomáhají tlumit imunitní reakce a omezit jejich škodlivé imunopatologické dopady
- pro jejich vznik je potřeba stimulace TcR antigenem prezentovaným na povrchu APC a vhodné cytokinové prostředí, zejména TGF- β , který je zároveň produktem Treg
 - regulačním T-lymfocytům tak dává zajímavou schopnost přeměňovat jiné T-lymfocyty na sobě podobné buňky (tento jev se označuje jako tzv. **infekční tolerance**)
- za subpopulaci iTreg je možné považovat i některé typy tlumivých T-lymfocytů, které byly popsány ještě před objevem a přesnou charakterizací klasických regulačních T-lymfocytů — patří mezi ně zejména buňky **Th3**, které produkují hlavně TGF- β a jejichž vývoj je zřejmě také stimulován specifickým cytokinovým prostředím (převaha IL-4, IL-10 a TGF- β)
 - tento typ je charakteristický zejména pro slizniční imunitní systém
- podobné jsou i buňky Tr1, pro které je typická zejména produkce IL-10

26 – Cytotoxické lymfocyty

Cytotoxické lymfocyty a jejich efektorové a paměťové funkce.

- takové T-lymfocyty, které nesou znaky **CD8**
- Tc-lymfocyty rozeznávají buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními parazity, popř. buňky jinak abnormální (poškozené stresem, nádorové buňky) a ničí je mechanismy závislémi na bezprostředním těsném kontaktu mezi Tc a napadenou buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů
- tento způsob obrany je velmi radikální — jeho účelem je odstranit z organismu potenciální zdroj nákazy
- je však také značně riskantní — poškození tkání Tc-lymfocyty může být někdy mnohem větší než například poškození virem, který způsobil infekci

Zahájení imunitní odpovědi

- prekurzor Tc musí rozeznat komplexy MHC I s antigenními peptidy (například fragmenty virových proteinů) na povrchu APC, která musí dále mít patřičné adhezivní a kostimulační molekuly (CD80, CD86, jež jsou ligandy receptoru CD28 na povrchu prekurzoru Tc)
 - takovými APC mohou být hlavně dendritické buňky nebo makrofágy — tyto buňky jsou daným virem buď samy infikovány, nebo pohlty příslušné antigeny, které pocházejí z odumřelých infikovaných, nádorových nebo stresovaných buněk
 - pokud by prekurzorová Tc buňka rozeznala antigen (komplex MHC I s peptidem) na povrchu jiných buněk, které nemají stimulační vlastnosti profesionálních APC, dostala by pouze první signál (přes TcR) a to by ji utlumilo
- dojde-li tedy k prvnímu kontaktu na povrchu účinné APC (obvykle v lymfatické uzlině), prekurzor Tc se začne dělit (proliferovat) a diferencovat na klon zralých efektorových cytotoxických buněk (Tc, CTL)
- tento proces probíhá optimálně, napomáhají-li při tom ještě Th1 buňky sekretující IL-2, neboť tento cytokin stimuluje proliferaci klonů Tc

Úloha Th buněk při aktivaci Tc

- úloha Th1 buněk — sekrece IL-2 (tento cytokin stimuluje proliferaci klonů Tc)
- další úloha Th buněk spočívá v aktivaci dendritických buněk, které jsou pak schopny stimulovat vývoj Tc
 - jinými slovy, aby dendritická buňka mohla aktivovat prekurzor Tc, musí být nejprve sama stimulována kontaktem s Th buňkami
- aktivace dendritických buněk probíhá pomocí adhezivních a signalizačních molekul CD40L (na povrchu aktivované Th buňky) a CD40 (na povrchu dendritické buňky)
- signály, které dostane dendritická buňka přes receptor CD40, ji stimulují ke:
 1. zvýšení exprese kostimulačních povrchových molekul (CD80, CD86)
 2. sekreci cytokinů (IL-1, IL-12) účastnících se potom stimulace Tc buněk

Efektorové funkce Tc-lymfocytů

- efektorové Tc jsou roznášeny krevním oběhem do tkání, kde mohou začít působit
- zralé Tc jsou už k aktivaci cytotoxických mechanismů stimulovány pouze jedním signálem — přes TcR; kostimulační signál přes CD28 už není potřebný
- Tc používají 3 druhy cytotoxických mechanismů:

1. perforin-granzymový systém

- v cytoplazmě Tc se nachází množství cytotoxických granulí (specializovaných lysozomů), které obsahují protein perforin a proteázy zvané granzymy
- poté, co Tc-lymfocyt rozezná pomocí adhezivních molekul a TcR „vadnou“ buňku, tato cytotoxická granula migrují k plazmatické membráně v místě kontaktu obou buněk, fúzí s ní a jejich obsah se uvolňuje do úzké štěrbiny mezi oběma buňkami (tzv. **degranulace Tc-lymfocytů**)
- perforin je podobně jako komplementový protein C9 schopen vytvářet v cytoplazmatické membráně póry, většinou jsou však tyto póry malé a slouží k tomu, že se jimi do buňky dostanou granzymy — ty pak štěpí v cytoplazmě prekursor proteáz ze skupiny kaspáz, které se tím aktivují a indukují v buňce apoptózu

2. Fas-FasL

- na povrchu Tc se nachází protein zvaný Fas-ligand (FasL), strukturně podobný cytokinům skupiny TNF — FasL se váže na „apoptotický receptor“ Fas (CD95) přítomný na povrchu mnoha různých typů buněk
- aktivace Fas receptoru vyvolá kaskádu reakcí vedoucích opět k apoptotické smrti cílové buňky
- receptor Fas je i na povrchu Tc; Tc tedy mohou (a skutečně tak činí) páchat sebevraždu, což je důležitý mechanismus brzdící aktivitu Tc a časově omezující imunitní reakce založené na Tc

3. sekretované produkty

- zejména lymfotoxin (LT, TNF- β), který působí podobně jako FasL (indukuje apoptózu)
- tento způsob je již méně specifický a při masivní aktivaci Tc-lymfocytů může snadno dojít k poškození okolních normálních buněk

Paměťové Tc-lymfocyty

- část T lymfocytů stimulovaných kontaktem s komplexy antigenních peptidů s MHC na povrchu zralých APC se přeměňuje v dlouhožijící paměťové buňky, které rychle reagují na opakované setkání s antigenem
- paměťové buňky žijí dlouho, mnohé nejspíš až do smrti osoby, kterou chrání
- mají receptor pro jeden určitý antigen — pokud buňka antigen danou determinantou potká, začne s ním efektivně reagovat (obdrží-li další nezbytné aktivační signály), prolifерuje a vytvoří klon svých dceřiných buněk
 - část tohoto klonu zajišťuje likvidaci antigenu
 - část se zpravidla stane paměťovými buňkami
- existuje několik subpopulací těchto paměťových buněk — centrální, tkáňové a efektorové
 - liší se svými migračními vlastnostmi, receptory pro chemokiny, rychlostí efektorových reakcí po opakovaném setkání s antigenem a schopností prolifерovat a diferencovat do různých subtypů efektorových buněk

27 — NK buňky (natural killers)

NK buňky — efektorové a regulační funkce.

- představují třetí hlavní subpopulaci lymfocytů (15–20 % lymfocytů)
- vývojově jsou blíže T-lymfocytům, ale spíše součást nespecifické imunity
- morfologicky velké granulární lymfocyty, **nemají antigenně specifické receptory**
- rozeznávají buňky, které mají na povrchu abnormálně málo MHC I. třídy — tj. nádorové a viry infikované buňky, které se potlačením exprese MHC I brání napadení Tc-lymfocyty

Receptory NK buněk

- skupina několika desítek různých membránových proteinů, které se dělí na 2 základní typy: tzv. pozitivní (aktivační) a negativní (inhibiční) receptory.

1. aktivační (pozitivní) receptory (NCR, natural cytotoxic receptor)

- například molekuly imunoglobulinové superrodiny NKp46, NKp30, NKp44, DNAM-1
- rozpoznávají:
 - a) některé virové proteiny, které se nacházejí na povrchu infikovaných buněk
 - b) proteiny, jejichž exprese se zvyšuje v důsledku buněčného stresu, k němuž dochází například při infekci buňky nebo při nádorové transformaci
 - c) struktury přítomné obecně na povrchu nejrůznějších typů buněk (například některé typy MHC proteinů)
- signály poskytnuté těmito receptory aktivují NK buňku k použití jejích cytotoxických mechanismů
- mezi stimulační receptory patří i **Fc receptor CD16**
 - setká-li se NK lymfocyt s buňkou, která je opsonizována protilátkami třídy IgG, naváže se prostřednictvím receptoru CD16 na jejich Fc části — to pak způsobí aktivaci cytotoxických mechanismů (degranulace)
 - tento děj se nazývá **cytotoxická reakce závislá na protilátkách (ADCC; antibody dependent cellular cytotoxicity)**
- důležitými aktivátory NK buněk jsou INF- α a INF- β produkované různými buňkami po virové infekci

2. inhibiční (negativní) receptory

- rozpoznávají MHC I
- rozdělují se do 2 skupin:
 1. **imunoglobulinové (KIR, killer inhibitor receptors)** — inhibiční aktivita je založena na asociaci s cytoplazmatickými fosfatázami, které ruší signalizační dráhy zahájené pozitivními receptory asociovanými s proteinkinázami; jen na lidských NK buňkách
 2. **C-lektinové (CD94/NKG2)** — na lidských NK buňkách, některé i na myších
- signály, které buňka přes tyto receptory dostane, jsou negativní — tzn. inhibují cytotoxické mechanismy (ruší signalizační dráhy zahájené aktivačními receptory asociovanými s proteinkinázami)

Výsledná reakce

- výsledná reakce NK buňky na setkání s nějakou jinou buňkou závisí na tom, převáží-li stimulační, nebo inhibiční signály
 - má-li buňka na povrchu normální množství MHC I molekul nesoucích normální peptidy, převáží negativní signály a NK buňka se neaktivuje
 - je-li však na povrchu buňky abnormálně málo MHC I, chybí-li některý izotyp, nebo jsou-li tyto molekuly pozměněny tak, že je inhibiční receptory nerozeznají, převáží stimulační signály a cílová buňka je NK buňkou cytotoxicky zabita
- ke snížení exprese MHC I dochází v důsledku infekce některými viry, které se tak aktivně brání rozpoznání Tc lymfocyty, a u většiny nádorových buněk
- buňka se může stát citlivou pro lýzu NK buňkami také tím, že se na jejím povrchu objeví zvýšené množství ligandů aktivačních receptorů (na stresovaných či virově infikovaných buňkách)
- jednotlivé klony NK buněk neexprimují na svém povrchu všechny inhibiční a aktivační receptory najednou, ale pouze jejich omezený výběr — v každém jedinci se tak nachází mnoho různých klonů NK buněk

Cytotoxické a regulační mechanismy NK buněk

- cytotoxické nástroje NK buněk jsou stejné jako u Tc-lymfocytů:
 - povrchový Fas ligand (FasL)
 - cytotoxická granula obsahující perforin a granzymy
- existují 2 subpopulace NK buněk:
 - 1. subpopulace s vysokou expresí Fc receptoru CD16**
 - většinová populace, vyskytující se hlavně v krvi, se silnou cytotoxickou aktivitou
 - 2. subpopulace s vysokou expresí adhezivního proteinu CD56**
 - v lymfoidních tkáních
 - mají nízký cytotoxický potenciál, ale produkují značná množství cytokinů (například IFN- γ , IL-3, M-CSF) — tyto látky ovlivňují diferenciaci efektorových Th buněk, aktivaci dendritických buněk, ale také hematopoezu
 - podobná populace NK buněk se hojně vyskytuje v placentě a dosud ne zcela objasněným způsobem se podílí na regulaci správného vývoje tohoto orgánu
- porucha funkce NK buněk může být spojena se zvýšenou autoimunitní dispozicí a vznikem autoimunitních chorob
- pozoruhodnou roli mají NK buňky v **graviditě** — v raném začátku fyziologické gravidity děložní NK buňky (uNK) významně proliferují vlivem IL-15 a prolaktinu; tvoří tak nejpočetnější leukocytární populaci v době implantace, která je nezbytná pro pokračování gravidity — produkcí cytokinů nutných pro angiogenezi se usnadňuje remodelace spirálních arterií k uteroplacentárním arteriím, podporuje růst trofoblastu a placenty, stejně jako vaskularizaci decidui; na materno-fetální oblasti působí lokalizovaně imunosupresivně
 - pokud v graviditě nedochází k převažujícímu cytokinovému prostředí mediovanému Th2-lymfocyty a převáží cytokinová síť Th1, mohou projít konvenční NK buňky z periferní krve do uteru a uplatnit pak svoji cytotoxickou povahu

28 — Spolupráce T a B lymfocytů

Antigenně specifická a nespecifická spolupráce T a B lymfocytů při tvorbě protilátek.

1. Antigenně specifická spolupráce T a B-lymfocytů

- viz otázku 1.13 — Protilátková reakce vyvolaná T-závislými antigeny
- tento typ odpovědi **vyžaduje kooperaci mezi B-buňkami a folikulárními Th-lymfocyty**
- B-lymfocyt stimulovaný určitým antigenem musí obdržet pomoc od Tfh buňky, která rozeznává stejný antigen — to je možné díky tomu, že rozpoznání antigenu antigenně specifickým receptorem (BcR) vede k jeho pohlcení B-buňkou a k rozštěpení na peptidové fragmenty — tyto fragmenty se navážou na MHC II a tyto komplexy se objeví na povrchu B-lymfocytu
- pokud je takovýto komplex specificky rozeznán lymfocylem Tfh, může tato Tfh buňka poskytnout B-lymfocytu pomoc a stimulovat tak jeho diferenciaci v plazmatickou nebo paměťovou buňku
 - na povrchu takové B-buňky se objevují stejné komplexy MHC II-peptid, jako na povrchu dendritické buňky, která pohltila stejný antigen a pak iniciovala vznik příslušného klonu Th
- jde tedy o specifickou přímou pomoc B buňkám, které byly stimulovány rozeznáním stejného antigenu, který vyvolal (po zpracování v APC) i vznik příslušně specifických Tfh buněk
- pomoc Tfh buněk B-lymfocytům je založena na:
 - a) **sekreci cytokinů** — IL-21 a IL-4 ve spojení s cytokiny charakteristickými pro Th1, Th2 a Th17 — v závislosti na převažujícím typu odpovědi
 - b) **přímém mezibuněčném kontaktu** — interakce mezi kostimulačním receptorem CD40 (B-lymfocyt) a jeho ligandem CD40L (na povrchu aktivovaných Tfh)
- ke stimulaci sekrece cytokinů Tfh buňkou už není nutný signál přes kostimulační receptor CD28 (B-lymfocyty v tomto stadiu mají na svém povrchu jen velmi málo kostimulačních molekul CD80 a CD86), postačí signál přes TCR
- pro optimální stimulaci B lymfocytů je tedy obvykle potřeba souhry 3 typů buněk — APC (hlavně dendritické buňky), Tfh a B-buňky

2. Antigenně nespecifická spolupráce T a B lymfocytů

- nepřímá pomoc (tzv. **bystander effect**)
- také pomoc prostřednictvím Th-lymfocytů, přičemž **B-lymfocyty byly aktivovány jiným antigenem, než který rozpoznal a aktivoval Th-lymfocyt**
- kontakt mezi Th buňkou a B-lymfocylem pouze prostřednictvím adhezivních molekul
- plná stimulace B-lymfocytů:
 - sekrece cytokinů
 - vazba CD40-CD40L
- nebezpečí aktivace autoreaktivních B-lymfocytů

29 — B1-lymfocyty, $\gamma\delta$ T-lymfocyty

B1 lymfocyty a $\gamma\delta$ T lymfocyty

B1 lymfocyty

- exprimují povrchovou molekulu **CD5**
- lymfocyty rané fáze ontogenetického vývoje, postnatálně tvoří malý podíl všech B-lymfocytů
 - vznikají ve fetálních játrech plodu z jaterní hemopoetické kmenové buňky (narozdíl od B2 lymfocytů)
 - předpokládá se, že hlavním zdrojem postnatální tvorby B1 lymfocytů je jejich sebeobnova ve vhodném prostředí sleziny
- **jejich receptory se vyznačují menší variabilitou**
 - procházejí minimálním množstvím somatických hypermutací a mají velice omezený repertoár protilátek, který směřuje proti velice úzkému spektru antigenů
 - antigenní receptory B1 lymfocytů jsou schopny rozeznávat sacharidy, lipidy a lipoproteiny
- jsou **T-nezávislé** — pro aktivaci a následnou produkci protilátek nepotřebují pomoc od T-lymfocytů
- **produkují spontánně přirozené IgM protilátky**, které rozpoznávají běžné mikrobiální antigeny (zejména mukopolysacharidy)
 - vytvořené protilátky reagují nízkou afinitou a jsou polyreaktivní
- vyskytují se především na sliznicích (respirační, trávicí) a jsou zdrojem také IgA protilátek
- vzhledem k tomu, že B1 netvoří paměťové buňky, nejsou považovány za klasické adaptivní lymfocyty

$\gamma\delta$ T lymfocyty

- jsou CD3+, CD4–, CD8–
- tvoří asi 5% lymfocytů periferní krve
 - častěji lokalizovány jako intraepitelové T-lymfocyty sliznic a ve slezině
- mají nízkou antigenní specifitu
- thymus pro jejich vývoj není nutný
- nevážou MHC (zřejmě nekomunikují s APC)
- **mohou reagovat s nativními antigeny** (bez potřeby MHC prezentace) **nebo antigeny předloženými jinými molekulami než HLA** (MICA, MICB)
 - MICA a MICB (MHC I chain-related)
 - exprimované na epitelových buňkách sliznic.
 - MIC jsou markery stresu (infekce, tepelného šoku)
- zvýšené počty jsou nacházeny u mykobakteriálních onemocnění, listeriózy, některých nádorů a autoimunitních chorob.
- funkce
 - tvoří perforin, granzym, FAS-L
 - sekretují IL-2, IL-3, IL-6, IFN- γ , TNF- α
 - sekrecí lymfotaktinu (XCL1) atrahují CD8 T lymfocyty
 - produkují TGF- β , IL-10, KGF → potlačení zánětu, hojení epitelových vrstev, regulační funkce
 - pomocí CD16 fagocytují částice opsonizované Ig a fragmenty prezentují na MHC II

2. Vyšetřovací metody v imunologii

1 – Vyšetření imunodeficitu

Vyšetření imunologického pacienta se suspektní autoimunitou či imunodeficitem – anamnéza, fyzikální a laboratorní vyšetření.

Pacient s imunodeficitem (ID)

- **imunodeficit (ID)** = jakákoli porucha imunitní reakce; může být vrozený či získaný
- **obecné klinické projevy** — opakované infekce, náchylnost k AIO i alergiím, výskyt nádorových onemocnění

Anamnéza

- RA:
 - **pátráme po opakovaných infekcích, AIO, úmrtí rodičů a předchozích generacích**
 - **důraz na větev ze strany matky pacienta — řada primárních ID je X-vázaných**
- OA:
 - a) **vrozené imunodeficience** — měly by být diagnostikovány co nejdříve, podrobně se zabýváme vývojem v prvním roce života
 - zajímáme se o infekce — charakter, tíže, frekvence, etiologie
 - reakce po očkování, zejména v 1. roce; ptáme se na očkování proti TBC (jde o první vakcínu, s níž se dítě setká)
 - b) **získané imunodeficience**
 - důraz je kladen na **zjištění možné příčiny** imunodeficience
 - prakticky celá šíře interní anamnézy

Klinický obraz

a) vrozená imunodeficience

- **pokud je postižena buněčná i humorální složka**
 - nejčastěji respirační infekce
 - infekce vznikají časně, bývají závažné
 - původci jsou atypické agens, často plísňe, viry, intracelulární bakterie
- **pokud je postižena pouze humorální složka**
 - respirační infekce, mírnější než u předchozí kategorie
 - původci jsou hlavně extracelulární patogeny (*H. influenzae*, *Streptococcus*...)
 - typický je náhlý počátek opakovaných infekcí přibližně v 6. měsíci života — časový posun způsoben ochranným vlivem mateřských transplacentárně přenesených protilátek
- **pokud je postižen komplement**
 - u poruch časných složek klasické dráhy — AIO s imunokomplexovou patogenezí (například SLE)
 - u poruch pozdních složek s poruchou funkce útočného komplexu (MAC) — opakované infekce kmeny *Neisserií*
 - u poruch C1 inhibitoru — hereditární angioedém

b) získaná imunodeficience

- nelze shrnout do typického obrazu, jsou velmi různorodé podle vyvolávající příčiny

Laboratorní vyšetření imunodeficitů

1. Imunoglobuliny

- vyšetření:
 1. **hladiny imunoglobulinů — nefelometrie, turbidimetrie**
 2. **hladiny specifických protilátek — ELISA**
- interpretace:
 - žádné, nebo nízké koncentrace všech typů protilátek — Brutonova agamaglobulinemie
 - deficit IgA — selektivně sníženo IgA
 - hyper IgM — normální nebo zvýšené IgM, ostatní izotypy jsou velmi nízké až chybějící
 - přítomnost monoklonální protilátky — lymfoproliferativní onemocnění
 - zvýšené IgE — Omennův syndrom (varianta SCID), Wiskott-Aldrich syndrom

2. Komplement

- vyšetření:
 1. **měření C3, C4** (pokles značí AIO — SLE s postižením ledvin, postinfekční glomerulonefritidu)
 2. **hemolytická aktivita komplementu CH50**

3. Lymfocyty

- vyšetření:
 1. **krvní obraz — přehled o počtech lymfocytů**
 2. **měření subpopulací lymfocytů — průtoková cytometrie**
 - B lymfocyty — znaky CD19, CD20
 - T lymfocyty — znaky CD3 a CD4, nebo CD8 (Th)
 - NK buňky — znaky CD16, CD56
 3. **sledování funkcí T lymfocytů — test blastické transformace**
- interpretace:
 - **B+ T- nebo B- T+** — tj. **SCID** (těžká kombinovaná imunodeficeience)
 - **deficit B-lymfocytů — Brutonova agamaglobulinemie**
 - **snížení B-lymfocytů — CVID** (běžná variabilní imunodeficeience)
 - snížení CD4 s charakteristickou dynamikou — AIDS
 - extrémně nízká či nulová odpověď v testu blastické transformace — SCID, kombinované imunodeficiency

4. Fagocyty

- vyšetření:
 1. **počty granulocytů, monocytů — KO**
 2. **funkce fagocytů — NBT, burst test**
 3. **vyšetření adhezivních molekul — integriny (CD11/CD18), selektiny (CD15)**

5. Další vyšetření

- genetické vyšetření, zobrazovací metody, patologie, biochemie, mikrobiologie, hematologie

Pacient s autoimunitou (AI)

Anamnéza

- RA: výskyt AIO, imunodeficiencí, alergií v rodině
- OA: typické je **různě dlouhé období s neurčitými příznaky**, pátráme po spouštěcím faktoru (infekce, stresové situace, léky, chemikálie)

Klinický obraz

- variabilní, závisí od postiženého orgánu, věku apod.
- **systémové AIO často začínají nespecifickými příznaky** (únava, horečky, nevolnosti, bolesti kloubů, váhový úbytek)
- orgánové specifické — například hypotyreóza, metabolický rozvrat u diabetu apod.
- **náhodné neobvyklé laboratorní nálezy někdy předcházejí klinickým projevům**
 - například nevysvětlitelná vysoká sedimentace ery, poruchy v KO (cytopenie), abnormality v hemokoagulaci, či v biochemickém vyšetření (zvýšené jaterní testy)

Laboratorní vyšetření autoimunit

1. Autoprotilátky

- viz. otázka 12

2. HLA I. a II. třídy

- je známa **výrazná asociace některých AIO s HLA antigeny**:

• ankylozující spondylitida	HLA B27	87,4%
• uveitida	HLA B27	10%
• Goodpastierův syndrom	HLA DR2	15,9%
• roztroušená skleróza	HLA DR2	4,8%
• Graves-Basedowova choroba	HLA DR3	3,7%
• SLE	HLA DR3	5,8%
• myastenia gravis	HLA DR3	2,5%
• pemphigus	HLA DR4	14,4%
• revmatoidní artritida	HLA DR4	4,2%
• Hashimotova thyreoiditida	HLA DR5	3,2%

3. Imunoglobuliny

- stanovení koncentrace imunoglobulinů má pomocný význam
- interpretace
 - **hyperimmunoglobulinemie — u většiny systémových AIO**
 - ↑ IgG — Sjogrenův syndrom
 - ↓ IgG — nefrotický syndrom při postižení ledvin
 - ↑ IgA — nespecifické střevní záněty, plicní imunopatologické stavy, Bechtěrev
 - ↑ IgG i IgA — autoimunitní hepatitidy
 - ↑ IgM — primární biliární cirhóza
 - ↓ IgM — pokročilá stádia SLE

4. Komplement

- stanovení hladin C3, C4 (pokles u imunokomplexových onemocnění (SLE s postižením ledvin, postinfekční glomerulonefritidy)

5. Proteiny akutní fáze

- **zvýšené CRP — typické pro systémová AIO** (RA, Bechtěrev, systémové vaskulitidy)
- CRP beze změny — LE, dermatopolymyozitida, sklerodermie, Sjögrenův syndrom, většina orgánově specifických AI
- snížený fibrinogen — hemofagocytující syndromy

6. Subpopulace lymfocytů

- vyšetřování buněčné imunity není při diagnostice autoimunit většinou indikováno
- monitorují se subpopulace lymfocytů při dlouhotrvající imunosupresivní léčbě

7. Další vyšetření

1. sedimentace ery

- **vzestup sedimentace — téměř u všech AIO**
- sledování sedimentace pro monitorování aktivity onemocnění

2. sérologické vyšetření

- bývá zvýšena koncentrace protilátek proti řadě mikroorganismů — v důsledku polyklonální aktivace B-lymfocytů
- často jsou zvýšené protilátky proti EBV, herpesvirům, CMV, borreliím, toxoplazmóze

3. hematologické vyšetření

- **pokles krevních elementů — běžně u systémových AIO**
- pokles určité krevní řady — u izolovaných autoimunitních cytopenií
- megaloblasty — perniciózní anémie

4. biochemie

- odráží postižení různých orgánů
- zvýšené jaterní testy — autoimunitní hepatitidy
- zvýšená kreatinkináza — myozitida, tyreoiditida s hypotyreózou
- zvýšené amylázy — Sjögrenův syndrom
- zvýšená urea a kreatinin — autoimunitní postižení ledvin

2 – Základy alergologického vyšetření

Základy alergologického vyšetření a testování – anamnéza, fyzikální vyšetření, kožní testování, expoziční testy, eliminační testy, bronchoprovokační testy – indikace a hodnocení.

Pacient s alergií

- **alergie** = přehnaná, nepřiměřená reakce imunitního systému organismu na látky, se kterými se běžně setkáváme v našem prostředí
- je způsobena nesprávnou aktivací protilátek ze skupiny imunoglobulinu E (**IgE**) vlivem daného alergenu
- spektrum projevů alergických reakcí je velmi široké, **od banální rýmy až po anafylaktický šok**, který může končit i smrtí

Anamnéza

- důkladná, lze z ní stanovit diagnózu, vytipování alergenů, nutná dobrá znalost sezónnosti pylů a spor, složení potravin a aditiv a zkřížené reaktivitě
- izolované laboratorní vyšetření bez anamnézy by nás nemuselo vůbec dovést k diagnóze alergie – pacient může být v ordinaci zcela zdravý, přičemž může trpět závažnou alergií, která se projeví jen za určitých okolností
- OA: ekzém, kopřivka, svědění, suchost kůže, reakce na slunce, chlad, hmyzí bodnutí
- RA: výskyt alergických chorob v rodině
- + informace o charakteru bydlení, přítomnost zvířat, kouření, stravování, užívání léků
- fyzikální vyšetření zaměřeno zejména na vyšetření postiženého systému – umožní vyloučit jiné příčiny například ucpaného nosu, kterými může být vybočená nosní přepážka apod.

Klinický obraz

- klinické projevy poukazující na alergický charakter onemocnění:
 1. **sezónní rýma (pollinosis)** – vodnatá rýma, svědění, kýchání, nosní obstrukce
 - vše trvá déle než běžná rýma, příp. se vyskytuje jen v některých ročních obdobích
 - obvykle doprovázeno alergickou konjunktivitidou (pálení, řezání očí)
 2. **astma bronchiale alergicum** – záchvaty dušnosti, nejčastěji expirační, doprovázeno slyšitelnými pískoty
 - obvykle po kontaktu s alergenem, ale i emočními stavy, fyzická zátěž (pacient může trpět tzv. astmatickými ekvivalenty, tj. epizodami dráždivého a dusivého kašle)
 3. **kopřivka (urticaria)** – svědivé, zarudlé, vyvýšené místa na kůži, dobře ohraničené
 - může mít i fyzikální příčiny (slunce, chlad, vibrace), nebo být způsobena interními chorobami (štítná žláza, nádory, SLE)
 4. **angioedém (Quinckeho edém)** – alergická reakce v hlubších vrstvách dermis
 - otok má svědivý charakter, je zarudlý; alergen se do těla většinou dostává perorálně
 5. **atopický ekzém** – první klinická manifestace atopie u pacienta, již ve věku několika měsíců
 - jedná se o chronickou nebo recidivující dermatitidu doprovázenou svěděním (vzniku se účastní IgE-zprostředkovaná reakce, ale i T-lymfocyty)
- typický nález u alergiků (ale také například i u parazitárních onemocnění) je zvýšené množství eosinofilů v krvi i v sekretech

Alergologické vyšetření

- předpokládá se I. typ přecitlivělosti (opožděný, atopický, anafylaktický) — centrální role **IgE**
- **atopie** = genetická predispozice odpovídat tvorbou specifického IgE po stimulaci některými cizorodými antigeny (alergeny)
- testy na alergii prokazují alergickou senzibilizaci na některý antigen (buď stanovený předchozí anamnézou, nebo se užívá série nejčastěji se vyskytujících alergenů)

1. Testy kožní přecitlivělosti

- intradermální aplikace antigenů
- pokud jsou přítomny mastocyty s navázaným specifickým IgE, dojde k degranulaci → lokální zarudnutí, indurace a svědění do 15 min (pokud za 8 h, jde o III. typ, pokud za 24 h, jde o IV. typ hypersenzitivní reakce)
- aplikace **PRICK-testem** — epidermální vpich na volární stranu předloktí, jemně, aby nekrvácel; pozitivní reakce je indurace větší než 4 mm
- méně častá **intradermální injekce** — intradermální vpich tak, aby vznikl 3 mm velký pupen, nesmí krvácet — spolu s antigeny aplikujeme i kontrolu negativní (fyziologický roztok) i pozitivní (histamin)
 - intradermální testy jsou vždy rizikové, můžou vyvolat i anafylaxi
- testovací série — jarní pyly, pyly trav, podzimní pyly, roztoči, plísňe, peří

2. Eliminační testy

- **po vysazení expozice alergenu dojde k vymizení příznaků**
- hlavně u potravinových alergií (například laktózová intolerance, zkřížená alergie na jablko)

3. Expoziční testy

- snažíme se vyvolat alergickou reakci přímo v postiženém orgánu pacienta:
 - intranasální apl. alergenu s měřením průchodnosti nosu rhinomanometrem (pollinosis)
 - bronchomotorická odpověď po podání alergenu inhalační cestou (astma profesionale)
 - potravinové nebo lékové alergie za přísného sledování pacienta

4. Spirometrie

- sledujeme statické a dynamické plicní objemy
- známky obstrukce — snížená FEV1 pod 80%, FEV1/FVC pod 75%
- astma je záchvatovité onemocnění — mimo akutní stádium nemusíme nalézt významné změny, nutno doplnit u lehčích forem astmatu bronchomotorickým testem

5. Brochoprovokační testy

A. Bronchodilatační test — stanovení reverzibility obstrukce

- Podání 400 mg **salbutamolu** x 80 mg **ipratropia**
- pozit. výsledek — po 30 min změna FEV1 $\geq 12\%$ + o 200 ml v absolutní hodnotě

B. Bronchokonstrikční test — stanovení bronchiální hyperreakivity

- a) **nespecifické — metacholin** v celkové kumulativní dávce 8 mg
- b) **specifické — známý alergen**
 - pozit. výsledek — pokles FEV1 o 20% a více oproti výchozí hodnotě

3 — Odběr biologického materiálu v imunologii

Odběr biologického materiálu k imunologickému vyšetření — indikace, interpretace.

Biologický materiál

- periferní krev, srážlivá i nesrážlivá, někdy vzorek slin, moči, bronchoalveolární laváž, likvor
- od kadaverózních dárců lymfatická uzlina či fragment sleziny — pro stanovení HLA fenotypu

1. Odběr krve

A. Humorální parametry

- materiál — **srážlivá** periferní venózní krev, z kubitální jamky nebo předloktí
- **do sterilní zkumavky** → **nechá se koagulovat** za laboratorní teploty max 2h → **centrifuguje se** → oddělení séra od krevního koláče a přenesení do zkumavky
- **zkumavka s červeným vrškem**
- skladování při 4°C 1-2 týdny, delší skladování při -20°C (někdy i dlouhodobě -40°C)
- I — **stanovení hladin imunoglobulinů, funkce komplementu, proteiny akutní fáze**

B. Leukocyty

- materiál — **nesrážlivá** venózní krev, **do zkumavky s heparinem**
- vzorek **nutno zpracovat do 1 h**
- transportovat za teploty optimálně 22°C, nesmí dojít k ochlazení vzorku pod 18°C
 - pro kontrolu je v přepravním boxu monitorovací teploměr
 - v případě, že je vzorek starší 6 h či pokud byl vzorek během transportu ochlazen pod +8°C, není možné vyšetření spolehlivě provést
- **zkumavka se zeleným vrškem**
- I — **vyšetření granulocytů (adheze, chemotaxe, fagocytóza, respirační vzplanutí)**

C. Lymfocyty

- materiál — plná **nesrážlivá** venózní krev, **do zkumavky s heparinem nebo EDTA**
- vzorek **nutno zpracovat do 6 h** (hraniční je 24 h při 20°C), vzorek **nesmí do lednice**
- **zkumavka s fialovým vrškem**
- I — **stanovení subpopulací lymfocytů, funkční vyšetření lymfocytů (test blastické transformace), HLA typizace**

2. Odběr slin

- pro **stanovení parametrů slizniční imunity** (humorálních i buněčných)
- příprava pacienta — 30 min před odběrem nejíst, nepít, nečistit si zuby, nekouřit, nežvýkat žvýkačky; patologická hypoprodukce slin (Sjörgenův syndrom, staří lidé, antihypertenziva)
- sliny se odebírají buď pliváním do odběrové zkumavky nebo pomocí tamponů; pro vyšetření IgA lakmusový proužek v ústech
- zpracování okamžitě vzhledem k možné degradaci vzorku enzymy — pokud nelze zpracovat okamžitě, uchováváme v lednici
- produkce řady látek v slinách podléhá cirkadiálnímu rytmu — nutno zaznamenat dobu odběru, příp. druh a dobu požití léků, event. stimulans použitý k zvýšení produkce slin
- využití — stanovení CRP, IL-1 β , IL-6, sekreční IgA, B-lymfocyty, α -amylázu; molekulárně genetická detekce dědičných onemocnění, kontrolní germinální genom u nádorů

3. Odběr liquoru

- odběr **lumbální punkcí** mezi trny L2-3 či L3-4, objem 5 ml liquoru do sterilní zkumavky
 - zkumavka se ihned zazátkuje a zašle do laboratoře co nejrychleji
 - odběr provádí vždy lékař
- diagnostika neurologických onemocnění infekčních, zánětlivých AIO, degenerativních a nádorových či paraneoplastických
- vyhodnocujeme **celkovou bílkovinu, albumin, buněčnost a cytologický obraz, proteiny akutní fáze (CRP), orosomukoid, β 2-mikroglobulin**, cytokiny **IL-6, TNF α** , intratekální **syntézu celkových IgG, IgM a specifických imunoglobulinů**
- I — neuroinfekce (klíšťová encefalitida, borrelióza, herpetická encefalitida, neurosyfilis), roztroušená skleróza, syndrom Guillain-Barre, nádorové infiltrace a paraneoplastické postižení CNS atd.
- důležité srovnávání lokálních (tzv. těch v liquoru) hladin se systémovými hladinami protilátek celkových i specifických — umožňuje posoudit intenzitu lokálního procesu

Výsledky imunologického vyšetření

- **je možno je obvykle vyjádřit kvalitativně i kvantitativně**
- **kvantitativně** se nejčastěji vyjadřují:
 - a) v **jednotkách SI** — **nejčastěji g/l, mg/ml**
 - b) v **mezinárodních jednotkách (IU)** — definovány určitou biologickou nebo biochemickou funkcí jedné jednotky
 - v současnosti se ještě používají u hodnot hladin IgE
 - c) v **arbitrárních jednotkách** — pro testy, které není možno standardizovat, stanovují si je jednotlivé laboratoře samy
 - d) v **titru** — titr je obrácená hodnota nejvyššího ředění vyšetřované tekutiny (například séra), které ještě v určité reakci vykazuje pozitivitu
 - při titraci se příslušná tekutina ředí v řadě zkumavek, nejčastěji dvojkovou řadou (v každé další zkumavce je 2x nižší koncentrace než v předchozí)

4 — Polyklonální a monoklonální protilátky

Polyklonální a monoklonální protilátky používané v imunologické diagnostice — příprava, rozdíly.

- metodika založena na principu reakce antigen-protilátka

Polyklonální protilátky

- získané od hyperimunizovaných zvířat (králíků, koní a ovcí)
- **podáváme jim opakovaně antigen, tudíž v krvi se budou nacházet především protilátky proti požadovanému antigenu**
 - následně od nich izolujeme sérum
 - **sérum** obsahuje heterogenní směs protilátek proti více epitopům jednoho antigenu
 - bývají přítomné i protilátky proti jiným antigenům — většinou nízký titr, nemusí nijak interferovat s prováděnými imunologickými reakcemi
- pro zesílení imunitní odpovědi podáváme antigen s adjuvancií (tj. látky nespecificky zvyšující odpověď na podaný antigen)
 - ve veterině **Freundovo adjuvans** — kompletní (inaktivovaná mykobakteria v olejové emulzi) či inkompletní (jen olejová emulze)
 - v lidské medicíně **hydroxid hlinitý $Al(OH)_3$** , bývá součástí očkovacích látek

Monoklonální protilátky

- **specifické pouze proti jedinému epitopu na antigenu**
- **výroba hybridomovou technologií**
 - na počátku **opakovaná imunizace myší antigenem**
 - dosáhneme toho, že většina B-lymfocytů v myší krvi bude produkovat protilátky proti požadovanému antigenu
 - myš je následně usmrcena a z její sleziny jsou **izolovány B-lymfocyty**
 - B-lymfocyty následně **fúzujeme s myelomovými buňkami** (nádorové buňky vycházející z plazmatických buněk — produkují imunoglobuliny) pěstovanými v tkáňové kultuře in vitro
 - vzniká tzv. hybridom (má vlastnost obou rodičovských buněk)
 - schopnost produkce protilátek pro použitý antigen (slezinové buňky)
 - schopnost neomezeného dělení (nesmrtelnost myelomových buněk)
 - selekce vzniklých hybridomů v HAT mediu (hypoxantin, aminopterin a thymin)
 - **hybridomové buňky**
 - mohou se klonovat (jedna buňka se rozmnoží na mnoho identických buněk)
 - klon produkuje velké množství stejných protilátek proti jednomu determinantu
 - mohou se uchovávat po neomezenou dobu ve zmrazeném stavu
- protilátky podle struktury a původu dělíme na:
 1. **myší** (tradiční; získávány z myší)
 2. **chimérické** (konstantní C domény lidské, variabilní V domény myší)
 3. **humanizované** (mají lidské konstantní i variabilní oblasti, ale hypervariabilní oblast je stále myší)
 4. **lidské**

Využití monoklonálních protilátek

1. terapeutické využití

- imunosupresivní, protizánětlivá, protinádorová léčba
- protilátky je **nutno humanizovat, jinak by se proti nim vytvořila imunitní reakce** (tzv. **HAMA**, human anti-mouse antibodies, tj. protilátky proti myším protilátkám)

2. diagnostické využití

- **detekční reagens v imunochemických metodách ELISA, RIA**
 - dokáží standardně in vitro vyvazovat hormony, vitaminy, léčiva, infekční markery
 - mezi antigeny v našem případě řadíme i endogenní molekuly, jež pro člověka nemají imunogenní charakter
- **k detekci i minimálního množství léčiv, toxinů nebo hormonů**
 - například mAb proti lidskému chorion gonadotropinu (HGC) je využívána v těhotenském testu, který je za běžných okolností platný už 10 dní po početí
- dg. **HIV** — přítomnost **anti-HIV protilátek** v séru
 - především protilátky proti virovým antigenům gp41, 120, 160 a p24
 - možné provádět také se slinami nebo močí pacientů
 - hladina protilátek v těchto tekutinách je ale mnohonásobně nižší než v séru, výsledky testů jsou méně spolehlivé a mají spíše orientační charakter
- dg. **nádorů**
 - **akutní myeloidní leukemie (AML)**
 - monoklonální protilátka **proti molekule CD33**, která se vyskytuje na povrchu některých zralých bílých krvinek
 - vyšetřují se krvetvorné buňky, které naopak za běžných okolností CD33 postrádají (výjimku představují právě krvetvorné buňky pacientů s akutní myeloidní leukémií)
 - **karcinom prostaty**
 - **PSA** (prostate specific antigen) — je specifický pro prostatu, ale není specifický pro karcinom → nedokáže rozlišit rakovinu od benigních patologií prostaty (jako například prostatitida či benigní hyperplazie)
 - v kriminalistice použití anti-PSA mAb pro detekci spermatu
 - **PSMA** (prostate specific membrane antigen) — transmembránový glykoprotein specifický pro prostatu; radioaktivně značené monoklonální protilátky umožňují vysoce specifickou lokalizaci nádoru in vivo
 - najdeme ho v metastázách karcinomu prostaty, v hormonálně refrakterním karcinomu prostaty, v cévním endoteliu některých karcinomů nebo sarkomů
- dg. **eboly** — detekce virového **strukturního proteinu VP40** dokážeme detekovat Zaire virus, použitím monoklonálních protilátek anti-EBOV Zaire

5 — Vyšetření parametrů humorální imunity

Vyšetřování parametrů humorální imunity — metody, referenční hodnoty, indikace, interpretace.

1. Stanovení koncentrace imunoglobulinů

- koncentrace jednotlivých tříd imunoglobulinů; udává se v mg/ml (či g/l)
 - výjimkou IgE — vzhledem k nízkým koncentracím v mezinárodních jednotkách IU/ml
 - provádí se většinou v séru, příp. i v jiných tělních tekutinách (sliny, moč a likvor)
- **metody:**
 - IgG, IgA, IgM a IgD — provádí se pomocí imunoprecipitačních metod v tekutém prostředí (**nefelometrie, turbidimetrie**), výjimečně v gelu (**radiální imunodifuze**)
 - IgE — vzhledem k nízkým koncentracím se provádí modifikací **nefelometrie s použitím pasivní latexové aglutinace**
- **indikace:**
 - IgG, IgA, IgM — opakující se infekce (podezření na vrozený nebo získaný imunodeficit)
 - IgE — podezření na parazitární infekce, nebo atopická onemocnění (alergická rýma, bronchiální astma, urtikárie, ekzém), aspergilózu či některé imunodeficity
- **referenční hodnoty koncentrací imunoglobulinů** (u pacientů nad 15 let):
 - IgG 7–16 g/l
 - IgA 0,7–4 g/l
 - IgM 0,4–2,3 g/l
 - IgE 100–150 IU/ml
- interpretace:
 - a) **zvýšení hodnot imunoglobulinů**
 - IgM — u imunokompetentního jedince u akutních infekcí a zánětů
 - **IgG — známka chronicity procesu** — typické pro intersticiální záněty, ale ne pro záněty slizniční
 - **IgA — známka slizničních zánětů** + u jaterní cirhózy v důsledku abnormálního katabolismu IgA
 - b) **snížení hodnot imunoglobulinů**
 - **primární humorální nebo kombinované ID** — například **Brutonova agamaglobulinémie** (nulové nebo jen velmi nízké koncentrace protilátek všech izotypů)
 - **sekundární ID** — například maligní tumory, lymfocytární leukémie, mnohočetný myelom, metabolické choroby a malnutrice
 - **syndromy ze ztráty proteinů** — nefrotický syndrom, exudativní enteropatie, exfoliativní dermatitis, rozsáhlé popáleniny
 - **izolované snížení IgA** — nejčastější imunodeficit v EU, ale je často němý, neboť IgA mohou na sliznicích zastoupit IgM a IgD
 - často spojeno s vyšším výskytem astmatu a jiných atopických chorob
 - může přispívat k rozvoji některých imunokomplexových chorob (III. typ přecitlivělosti) — RA a SLE
 - pacienti s IgA deficity často tvoří autoprotilátky
 - IgA u těchto pacientů nemůže být nahrazováno substitučně, neboť na něj často pacienti reagují tvorbou protilátek proti IgA

2. Stanovení autoprotilátek

viz otázku 2.12

3. Stanovení složek a aktivity komplementu

- **C3** (opsonin) — **deficience spojena s opakovanými bakteriálními infekcemi**
- **C5-C8** (útočný komplex, MAC) — **deficity typické rekurentní neisseriové infekce**
- **deficience složek klasické dráhy** — porušena schopnost eliminovat z cirkulace imunokomplexy, riziko imunokomplexových AIO (SLE, glomerulonefritidy)

A. Stanovení složek C3, C4

- **precipitační metody** (jednoduchá radiální imunodifuze, nefelometrie, turbidimetrie s použitím specifických polyklonálních protilátek)
- **indikace:**
 - záněty, rekurentní pyogenní bakteriální infekce, některé malignity
 - poškození jater (cirhóza, hepatitida)
 - imunokomplexové autoimunity (SLE, glomerulonefritidy)
 - rejekce štěpu – známka aktivity procesu
- **referenční hodnoty:**
 - C3 0,98–1,97 mg/ml
 - C4 0,12–0,4 mg/ml

B. Stanovení hemolytické aktivity komplementu CH₅₀

- tj. jaké množství komplementu hemolyzuje 50% erytrocytů
- vyšetření aktivity celé komplementové kaskády aktivované klasickou cestou
- měření stupně hemolýzy ovčích krvinek (krvinky s anti-ery protilátkami) závislé na množství přidaného komplementového systému

C. Stanovení koncentrace C1 inhibitoru

- C1 inhibitor reguluje klasickou aktivační dráhu komplementu — **deficience C1 inhibitoru vede ke vzniku hereditárního angioedému**
 - hereditární angioedém — závažné otoky postihující končetiny, rty, tváře, prsty, kolena, lokty, hýždě, gastrointestinální sliznice a orofaryng, a dále otok epiglottis a horních cest dýchacích; vedou k omezení proudění vzduchu a podle některých údajů až ve 30 % k udušení pacienta
 - spojen s poklesem koncentrace C1 inhibitoru pod 30% normální hodnoty
- **indikace — otoky nejasné etiologie**
- **precipitační metody** (jednoduchá radiální imunodifuze, nefelometrie, turbidimetrie s použitím specifických polyklonálních protilátek)
- **referenční hodnoty C1 inhibitoru 150-350 mg/l**

4. Stanovení proteinů akutní fáze

1. C-reaktivní protein (CRP)

- produkován jaterními buňkami při infekci, zánětu a poškození tkáně
 - produkce po stimulaci prozánětlivými cytokiny (IL-6, IL-1 β , TNF- α) produkovanými makrofágy (monocyty), fibroblasty, endoteliálními a epiteliálními buňkami
- váže se na polysacharidy buněčné stěny bakterií, hub a lidských buněčných membrán
- **aktivuje klasickou dráhu komplementu vazbou na C1q** (která je dominantně aktivována protilátkami) a slouží tak jako **opsonin** umožňující fagocytózu a eliminaci bakterií ale i poškozených a mrtvých lidských buněk
- indikace:
 - CRP je **citlivý marker akutní bakteriální infekce** — umožňuje rozhodnout, zda u pacienta například s horečnatým onemocněním zahájit terapii ATB nebo pouze symptomatickou léčbu (dif. dg. bakteriální a virové infekce)
 - dg. aktivity některých AIO a stavů spojených se zánětem (nádorová onemocnění)
- metody:
 - **nefelometrie a turbidimetrie** — s využitím **CRP-specifické polyklonální detekční protilátky**, která s CRP tvoří precipitát
 - často je detekční protilátka navázaná na latexové partikule a **reakce s CRP vede k aglutinaci detekované nefelometrií a turbidimetrií** s vysokou citlivostí
 - vzorkem je v obou případech sérum izolované ze srážlivé venózní krve
- referenční hodnoty:
 - CRP < 10 mg/l — norma, zdravý jedinec
 - CRP > 1 mg/l dlouhodobě — rizikový faktor KV chorob, prognostický marker
 - CRP 10–40 mg/l — těhotné ženy, pacienti s mírnými záněty a virovými infekcemi
 - CRP 40–200 mg/l — aktivní zánět bakteriálního původu, exacerbace některých AIO
 - CRP > 200 mg/l — těžké bakteriální infekce a popáleniny

2. A1-antitrypsin

- **vzrůstá při akutních zánětech, ale i u některých tumorů**
- je syntetizován v játrech jako odpověď na aktivaci imunity infekčními i neinfekčními podněty (stimulace zejména IL-6)
- inhibuje proteázy jako je neutrofilní elastáza, kolagenáza, ale i trypsin a papain
 - koncentrace volné elastasy, kolagenasy a trypsinu je nejvyšší v dolních cestách dýchacích a zde je proto protektivní role α 1-antitrypsinu nejvýznamnější
- **deficit antitrypsinu — CHOPN (emfyzém), poruchy jater**
- indikace:
 - průkaz či vyloučení deficitu α 1-antitrypsinu u CHOPN, bronchiektázií
 - poruchy jater, hepatitidy, cirhózy nejasného původu
 - průkaz deficitu umožňuje případně nasadit substituční terapii, kdy chybějící α 1-antitrypsin je možno podávat nitrožilně
- referenční hodnoty antitrypsinu 1,0–2,0 mg/ml

3. Cirkulující imunokomplexy

- **komplexy antigenů se specificky navázanými protilátkami**
- **vznikají fyziologicky při neutralizaci a eliminaci nejružnějších antigenů z organismu**
 - pokud nejsou efektivně eliminovány, predilekčním místem jejich depozice jsou ledviny, kloubní synovie, cévní endotel a bazální membrána kůže
 - deponované imunokomplexy **aktivují komplement**, interagují s Fc-receptory fagocytů, aktivují lokální zánětlivou reakci vedoucí až k poškození tkáně
- metody detekce:
 - závisí od složení a velikosti imunokomplexů:
 - **velké imunokomplexy** — stanovení precipitací pomocí polyethylenglykolu (PEG) měřenou nefelometrií nebo turbidimetrií
 - **malé imunokomplexy** — stanovení pomocí jejich vazby na C1q složku komplementu v uspořádání ELISA
 - vzorkem je sérum izolované ze srážlivé venózní krve
- indikace:
 - ze zvýšené koncentrace není možné rozlišit, zda k aktivaci došlo probíhající infekcí, autoimunitní reakcí (SLE, kryoglobulinémie, RA), reakcí přecitlivělosti III. typu na nepatogenní inhalační exoantigeny (antigeny plísní rozpoznávány specifickými IgG za vzniku imunokomplexů), nádorovým procesem, nebo různými stresovými stavy
 - přestože zvýšení koncentrace imunokomplexů není patognomické pro konkrétní onemocnění, umožňuje nám hodnotit intenzitu probíhajícího procesu, nebo například efektivitu protizánětlivé terapie

Využívané metody

- **principem vyšetřovacích metod je reakce antigenu a protilátky**
 - **epitop** — tj. oblast antigenu, kam se váže protilátka
 - pro reakci je výhodný antigen s více epitopy (přirozené antigeny)
 - **paratop** — tj. vazebné místo protilátky
 - oblast terminálních částí variabilních částí rozpoznávající epitop
 - **afinita** — tj. veličina síly vazby mezi jedním epitopem a protilátkou
 - **avidita** — tj. síla interakce polyvalentní protilátky s polyvalentním antigenem
 - vrůstá s afinitou a počtem vazebných míst

a) u precipitace a aglutinace

- využívaly se polyklonální protilátky, které reagovaly s antigenem za vzniku složitých prostorových struktur (aglutinátů nebo precipitátů)

b) u metod imunoanalýzy

- vznik těchto struktur není možný — antigeny či protilátky jsou navázány na stěnu mikrotitrační destičky — dojde tedy pouze k první fázi reakce (navázání antigenu a protilátky), vizualizaci je potřeba provést jinak (typicky navázáním druhé protilátky se „značkou“, kterou může být:
 1. radioizotop (RIA)
 2. enzym (EIA)
 3. molekula flurochromu

1. Aglutinace

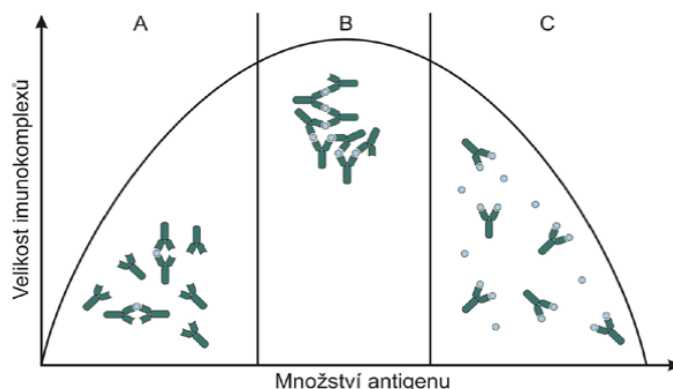
- podstatou reakce je, že **protilátky se shlukují s korpuskulárním antigenem**
- probíhá v tekutém prostředí, lépe aglutinuje IgM než IgG
- princip — dvoj- a vícevazebné protilátky namířené proti epitopům antigenních částic vytvářejí mezi těmito částicemi můstky, které vedou ke vzniku uspořádaných shluků (aglutinátu) — tyto shluky pozorujeme makroskopicky
- značný význam má aglutinace v hematologii a transfuzní medicíně
- kvalita aglutinační reakce je podmíněna:
 - a) **množstvím protilátky** — při velkém ředění protilátky nedochází k aglutinaci ani v nadbytku antigenu; při nadbytku protilátky tzv. **fenomén prozóny** (tj. tvoří se malé imunokomplexy a nevzniká aglutinát)
 - b) **přítomností protilátek proti různým epitopům** — je tak možno vytvořit dost vazeb mezi antigeny, proto využíváme polyklonální protilátky
 - c) **vzdáleností mezi jednotlivými částicemi antigenu**
- rozlišujeme aglutinaci:
 1. **přímou** — průkaz antigenu, který má na svém povrchu přirozeně zkoumané epitopy
 - **průkaz antigenního ABO systému**
 - **Paul-Bunellův test** (infekční mononukleóza)
 - **Widalova reakce** (dg. tyfu a paratyfu)
 - **Weil-Felixova reakce** (dg. skvrnitého tyfu)
 2. **nepřímou** — průkaz antigenu, který navážeme na vhodný nosič (například ery, latex)
 - například **latex-fixační test**
 - průkaz autoprotilátek (například RF) — na latexové částice napojíme IgG a přidáme sérum pacienta s podezřením na revmatoidní artritidu (nemocní pacienti mají v krvi RF, tj. IgM protilátky proti Fc části lidského imunoglobulinu — pokud dojde k aglutinaci, je reakce pozitivní)
 - rychlé testy využívané v ambulancích (ASLO, CRP...)
- výsledek aglutinační reakce může být vyhodnocen:
 - a) kvalitativně — tzn. přítomnost či nepřítomnost protilátek
 - b) kvantitativně — tzn. množství protilátek — kvantitativně hodnotíme pomocí obrácené hodnoty ředění krevního séra (titru)
- **Coombsův test** — používá protilátky proti lidským imunoglobulinům
 - a) **přímý** — průkaz pacientových vlastních autoprotilátek, které jsou navázány na erytrocyty cirkulující v krevním řečišti (například u imunologicky mediované hemolytické anémie)
 - aglutinace je in vitro je iniciována přidáním diagnostické protilátky proti lidským imunoglobulinům (Coombsovo reagens)
 - b) **nepřímý** — testování přítomnosti protilátek v séru jednoho jedince (tedy solubilních nenavázaných) proti povrchovým antigenům erytrocytů jiného jedince
 - například při předtransfúzním vyšetření protilátek proti ABO a Rh antigenům erytrocytů dárce, při Rh inkompatibilitě matka:plod — smíchají se erytrocyty o známé ABO a Rh antigenní výbavě (na těchto erytrocytech nejsou navázány žádné protilátky) se sérem příjemce, či sérem matky při podezření na Rh inkompatibilitu — navázání sledovaných sérových protilátek je prokázáno opět použitím Coombsova reagens

2. Komplement fixační reakce (KFR)

- pro diagnostiku infekcí (průkaz lues, infekce *Treponema pallidum*) — **založena na průkazu pacientových sérových protilátek reagujících s mikrobem in vitro**
- postup:
 - ve zkumavce se nechá reagovat antigen (bakterie, viry) s tepelně inaktivovaným sérem pacienta (tepelná inaktivace → inaktivace komplementu)
 - do reakce se přidá králičí sérum jako zdroj komplementu
 - inkubace — pokud jsou v séru pacienta přítomny protilátky, navážou se na antigen (mikrob) za vzniku imunokomplexů; imunokomplexy aktivují a váží na sebe králičí komplement
 - následně se přidají ovčí erythrocyty
- hodnocení:
 - jestliže vyšetřované sérum neobsahuje protilátky, nevznikají komplexy mikrob-protilátka, komplement se neaktivuje a nespotřebuje (nefixuje) a je tak k dispozici pro lýzu senzibilizovaných erythrocytů (hemolýza)
 - jestliže sérum protilátky obsahuje, vzniknou imunokomplexy mikrob-sérová protilátka, komplement se na nich spotřebuje (fixuje) a erythrocyty zůstanou nelyzovány

3. Imunoprecipitační metody

- jsou **založeny na interakci mezi rozpustným vyšetřovaným antigenem a specifickou detekční polyvalentní protilátkou**
 - polyvalentní protilátka je směsí protilátek reagujících s různými epitopy jednoho antigenu; antigen je nekorpuskulární, rozpustný v pravém roztoku
- po vazbě polyvalentní protilátky na antigen vzniká precipitát, který se projevuje jako **zákal**
- množství vytvořeného precipitátu závisí na poměru mezi antigenem a polyvalentní protilátkou — viz precipitační křivka
- provádí se v tekutém (vodném) nebo polotekutém (gelovém) prostředí



- **precipitační křivka** — závislost velikosti imunokomplexů na poměru antigenu a protilátky
 - A) zóna nadbytku protilátky** — při přebytku protilátky je k dispozici pro reakci mnoho volných vazebných míst; veškerý přidaný antigen je bezprostředně vyvážen nadbytkem protilátek a vznikají tak malé rozpustné (neprecipitující) imunokomplexy
 - B) zóna ekvivalence** — při optimální koncentraci antigenu a protilátky dochází ke vzniku velkých nerozpustných imunokomplexů
 - C) zóna nadbytku antigenu** — dostupný počet molekul protilátky nestačí navzájem vázat veškerý antigen a vznikají opět malé rozpustné imunokomplexy

1. Imunoprecipitace v gelu

- antigeny i protilátky difundují gelem, v místě optimálního poměru vytváří precipitát

a) dvojitá (protisměrná) imunodifuze

- do gelu vyřízneme 2 jamky — do 1. aplikujeme protilátku, do 2. antigen, odtud se difuzí šíří radiálně a v místě zhruba ekvimolární koncentrace protilátky a antigenu vznikne precipitační linie (změna poměru Ig a Ag vede k posunu precipitační linie)
- metoda **kvalitativní** (neurčíme přesně koncentraci stanovovaného analytu ve vyšetřovaném vzorku, ale dobře jej identifikujeme)
- **málo citlivá** metoda, což je ale výhoda, protože výše zmíněné protilátky má každý člověk v tak malém množství, na které metoda nereaguje) a tudíž je reakce pozitivní jen u lidí se zvýšenou hladinou (například při extrinsních alveolitidách)

b) jednoduchá radiální imunodifuze

- protilátka proti specifickému antigenu byla přímo inkorporována do gelu
- po vyříznutí dílku a aplikaci antigenu dochází k radiální difuzi a u pozitivních sér vzniká okolo jamky tzv. **precipitační prstenec** (makroskopicky patrná sraženina)
- metoda je i kvantitativní (plocha precipitačního prstence je přímo úměrná koncentraci vyšetřovaného antigenu)
- již je nahrazena turbidimetrií a nefelometrií, ale stále se považuje za zlatý standard pro stanovení koncentrace proteinů
- možnost stanovení koncentrace antigenu — IgG, IgA, IgM, komplement C3, C4, CRP — dnes málo využívaná, ale zlatý standart

2. Imunoprecipitace v tekutém prostředí

- vzniká **zákal (koloid)**, intenzita je úměrná koncentraci vyšetřovaného antigenu, měří se turbidimetrií nebo nefelometrií, odečtení z kalibrační křivky
- **turbidimetrie** — měří množství procházejícího světla
- **nefelometrie** — měří rozptýlené světlo při průchodu paprsku

4. Imunoassay

- **reakce antigen-protilátka probíhá na pevné fázi (destička, zkumavka) + k vizualizaci je nutno použít detekční protilátku s navázanou značkou:**
 - A. radionuklid (RIA)
 - B. enzym (EIA)
 - C. flurochrom (FIA)
- výhoda — dokážeme stanovit nízké koncentrace antigenů nebo protilátek, které nemůže být prokázáno klasickými sérologickými metodami
- v současnosti základní metody

A. Radioimunoanalýza (RIA)

- **pro kvantitativní stanovení analytů**
- detekuje reakci antigen-protilátka pomocí radioaktivního izotopu (nejčastěji **radioaktivní jód**) jako značky navázané na jednu ze složek reakce,
- pokud reakce probíhá na pevném nosiči, připomíná metodu ELISA — jen se místo enzymu použije radioizotop; ke zjištění intenzity reakce se tak nepřidává žádný substrát, ale měří se intenzita radioaktivního záření

B. Enzymová imunoanalýza (EIA, ELISA)

- **detekce pomocí enzymu**, který je kovalentně navázaný na některý z reaktantů (většinou protilátku) — jeden z reaktantů je vázán na pevný nosič

a) průkaz antigenu:

- protilátka na pevném nosiči + vzorek s antigenem + enzymem značená protilátka proti antigenu, která se váže na jiný epitop než primární protilátka + po přidání vhodného substrátu je vyvolána barevná reakce (mezi každým krokem je nutné promytí)
- intenzitu změny barvy je možné hodnotit **spektrofotometricky**, tudíž se jedná i o metodu **kvantitativní**

b) průkaz protilátky:

- antigen na pevném nosiči + vzorek s protilátkou + protilátka proti protilátce značená enzymem + substrát

C. Fluorescenční imunoanalýza (FIA, imunofluorescence)

- **protilátka s navázaným fluorochromem** (látky schopné po ozáření absorbovat světelnou energii a vyzářit ji s nižší energií, tedy delší vlnovou délkou), **pozitivní reakce viditelná ve fluorescenčním mikroskopu**

a) přímá fluorescence

- průkaz antigenu (antigen může být ve tkáni, kultuře...), detekčním reagens je protilátka o známé specifitě s fluorochromem
- preparát je fixován na podložní sklo, převrství se konjugátem (protilátka + fluorochrom), inkubuje, promyje a hodnotí — lze hodnotit i lokalizaci antigenu
- využití — průkaz antigenu v tkáňových řezech, biopsiích, stěrech...

b) nepřímá imunofluorescence

- **průkaz protilátek** v séru pacienta
- předpokládané protilátky se aplikují na vhodný antigenní substrát, vytvoření případných imunokomplexů, promytí, přidání konjugátu (protilátky proti protilátkám pacienta), inkubace, promytí, hodnocení (struktury exprimující cílené antigeny)
- využití — velmi často, průkaz autoprotilátek (orgánově specifických i nespecifických)

5. Imunoblot

- kombinace elektroforézy a imunoanalytického průkazu specifické protilátky zachycené v komplexu antigen-protilátka — metoda, kdy **protilátka reaguje s antigenem naneseným na speciální membránu**
- vhodnou směs proteinů rozdělíme elektroforézou — z takto rozděleného vzorku provedeme otisk elektroforeogramu na nitrocelulózovou membránu, typicky pomocí stejnosměrného proudu (tj. z elektroforetického gelu jsou následně proteiny opět pomocí elektrochemických metod přeneseny na porézní membránu z nitrocelulózy)
- následně vysytíme volná místa na membráně pomocí inertní bílkoviny (hovězí sérový albumin) → zablokování nespecifických vazebních míst
- inkubace — ponoříme do pacientova séra, které obsahuje zkoumané protilátky
- promyje se, a inkubuje se se sekundární protilátkou (anti-human Ig), značenou s enzymem (jako u ELISA)
- provede se vizualizace (přidání substrátu pro enzym, měření radioaktivity...), odečteme výsledek a porovnáme jej se standardy — tím zjistíme, jaké protilátky proti jakým antigenům pacient má (případně užíváme na začátku známou směs proteinů)

6 — Vyšetření populací lymfocytů a jejich funkcí

Vyšetření populací lymfocytů a jejich funkcí — metody, referenční hodnoty, indikace, interpretace.

- vyšetřujeme počet a funkci buněk
- vycházíme ze stanovení celkového počtu leukocytů a z diferenciálního KO
 - získáme tak však jen informace o absolutním počtu lymfocytů, monocytů a granulocytů a o jejich relativním zastoupení, jednotlivé subpopulace lymfocytů však nerozeznáme

Stanovení populací lymfocytů

- u imunodeficitů, AIO a nádorových onemocnění a v případě monitorování po transplantaci
- jednotlivé subpopulace jsou ve světelné mikroskopii nerozlišitelné — proto se **pro určení jednotlivých populací používají různými fluorochromy značené protilátky proti charakteristickým povrchovým znakům buněk** — CD znakům (clusters of differentiation)
 - každá subpopulace vystavuje na svůj povrch specifické CD
 - většina dosud popsanych CD molekul jsou fyziologicky v podstatě buněčné receptory
- vazbu fluorescenčně značených protilátek je možno vyhodnotit:
 1. **fluorescenčním mikroskopem** — pomalé, pracné, nepřesné a omezené počtem rozlišovaných barev
 2. **průtokovým cytometrem** — vyžaduje nákladné přístrojové vybavení, ale metoda je nesrovnatelně rychlejší, neboť celé stanovení trvá přibližně 20 min
- typizace lymfocytů založená na průkazu přítomnosti povrchových znaků:
 - **všechny CD45** (tzv. leukocyte common antigen, LCA) — kontrolní znak
 - Th buňky CD3+, CD4+
 - Tc buňky CD3+, CD8+
 - B buňky CD19+
 - NK buňky CD16+, CD56+, ne CD3

1. Přímá imunofluorescence

- buňky inkubujeme s protilátkou značenou fluorescenčním barvivem (fluorochromem) — možnost hodnocení ve fluorescenčním mikroskopu (časově náročné, pracné, nepřesné)

2. Průtoková (flow) cytometrie

- odebíráme nesrážlivou krev do zkumavky s heparinem nebo EDTA; krev inkubujeme s monoklonální protilátkou značenou fluorochromem — získanou směs následně „proženeme“ průtokovým cytometrem, který umožňuje za krátký čas vyšetřit velké množství buněk (tisíce)
- při analýze využíváme laserového paprsku — buňky laminárně proudí (protékají) kapilárovou kyvetou, která je tak úzká, že se do ní vejde jediná buňka (tj. buňky se řadí za sebe jako korálky na nit)
- každý typ buňky (lymfocyt, monocyt, granulocyt) má specifickou velikost a specifickou granularitu → po ozáření světelným paprskem je tento paprsek, dle tvaru (velikosti), povrchu a struktury cytoplazmy a jádra buňky, rozptýlen do různých směrů — vyhodnocením odchylek získáme základní představu a počtu lymfocytů, monocytů a granulocytů
- průtoková cytometrie nám ovšem umožňuje i rozlišení jednotlivých subpopulací lymfocytů:
 - po ozáření laserem vydá každá buňka specifickou barvu (podle toho, jaké byly použity protilátky a proti kterým CD molekulám byly namířeny)
 - můžeme rozlišit Tc, Th, B lymfocyty a další subpopulace

Indikace k vyšetření subpopulací průtokovou cytometrií

- dif. dg. **imunodeficitů primárních a sekundárních** (opakované infekce, protrahovaný a závažnější průběh infekcí, bez kompletního uzdravení, atypičtí původci infekce)
- dif. dg. **imunodeficitů s kožními projevy** (dermatitidy, pyodermie, abscesy)
- **monitorování imunokompetence či naopak rozvoje imunodeficience u pacientů s dlouhodobou imunosupresivní léčbou** (v průběhu chemoterapie či radioterapie — zaměření na populace T lymfocytů a poměr CD4+/CD8+)
- **monitorování pacientů po transplantaci ledvin** — monitorování rozvoje a závažnosti možné akutní rejekce (monitorování aktivačních znaků T lymfocytů včetně Treg)
 - zde doplňujeme stanovení základních subpopulací lymfocytů o stanovení aktivačních znaků na CD3+ T lymfocytech
 - CD69 (časný aktivační znak, C-lektin)
 - CD25 (pozdější aktivační znak, α podjednotka receptoru pro IL-2)
 - HLA DR (pozdní aktivační znak)
- **monitorování onkologických pacientů**
 - doplňujeme stanovení aktivačních znaků obdobně jako u předchozího

Referenční hodnoty populací lymfocytů

Populace	Znak	Relativní zastoupení	Absolutní zastoupení
T-lymfocyty	CD3+	60-80 %	1 200/ μ l
Th-lymfocyty	CD3+ CD4+	35-50 %	700/ μ l
Tc-lymfocyty	CD3+ CD8+	20-40 %	400/ μ l
B-lymfocyty	CD19+	5-15 %	200/ μ l
NK buňky	CD16+ CD56+	5-25 %	300/ μ l

- **imunoregulační index** (tj. poměr CD4+ a CD8+) = 2-3

Interpretace výsledků

a) snížení všech lymfocytů

- příčiny — SCID, Di Georgův syndrom, AI mechanismus (antilymfocytární protilátky), imunosupresivní terapie, aplastické anémie, myelodysplázie, polékový dřeňový útlum, stavy po transplantaci kostní dřeně, malnutricie, hypovitaminózy, jaterní dysfunkce, virové infekce, seps, stres
- klinické projevy — vyšší frekvence virových infekcí (herpes), plísně, mykobakterie, oportunní nákazy (pneumocystové pneumonie), průjmy, infekce dolních cest dýchacích

b) snížení B lymfocytů

- příčiny — SCID, Brutonova choroba, Wiskott-Aldrichův syndrom, ataxia teleangiectasia, imunosupresivní terapie, polékové snížení, lymfoproliferační choroby (myelom, CLL, lymfom)
- klinický obraz — do 6 měsíců věku často bezpříznakové (přenos IgG od matky), rekurentní infekce způsobené opouzdřenými mikroby (pneumonie, otitidy, sinusitidy), gastroenteritidy

c) zvýšení B lymfocytů

- příčiny — nádorová onemocnění B lymfocytů, monoklonální zvýšení u myelomu
- klinický obraz — variabilní, může být snížena tvorba protilátek

d) snížení T lymfocytů

- příčiny — primární ID (SCID, Di Georgův sy, Wiskott-Aldrichův syndrom, ataxia teleangiectasia), CLL, Hodgkin, leukemie, radiační terapie, AIDS, akutní virové infekce
- klinický obraz — SCID (těžké život ohrožující infekce již brzy po narození — dýchací cesty, orální kandidóza, neprospívání)

e) snížení Th lymfocytů

- příčiny — primární ID, HIV infekce
- klinický obraz — těžké život ohrožující infekce (pneumocystová pneumonie, mukokutánní kandidóza)

f) snížení Tc lymfocytů

- příčiny — deficiencie HLA-I (mutace), SCID, chronické AIO (roztroušená skleróza, revmatoidní artritida, SLE, Sjögrenův syndrom)
- klinický obraz — bakteriální a virové infekce dýchacích cest (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*)

g) snížení NK buněk

- **ANKD** — absolutní deficit NK
 - klinický obraz — těžké, opakující se, nebo atypické virové infekce (herpes simplex, CMV, varicella zoster)

Funkční vyšetření lymfocytů

1. Testy kožní přecitlivělosti

- **test in vivo**; pozdní typ přecitlivělosti (reakce IV. typu) je lokální imunitní reakce závislá na T-lymfocytech
- **typickým příkladem je tuberkulinová reakce**
 - antigen se aplikuje intradermálně
 - pozitivní reakce se projeví po 24-48 h vznikem indurace a erytému
 - negativní reakce nastane, pokud nebyl pacient dříve senzibilizován, nebo při poruše odpovědávosti T-lymfocytů

2. Test blastické transformace

- **test in vitro**; vyšetření proliferační schopnosti lymfocytů
 - dělení buněk je jedním z fyziologických jevů buněčné aktivity
 - ke stimulaci dělení se využívá rostlinných lektinů (PHA, ConA), které působí jako polyklonální aktivátory T-lymfocytů
 - také lze využít monoklonální protilátky (anti-CD3), nebo i cizí buňky (směsnou lymfocytární kulturu); antigeny jako tetanický toxoid, tuberkulin (PPD) — vhodné ke specifické stimulaci; přítomnost APC je v tomto případě nezbytná
 - po aktivaci se buňky v kultuře začnou dělit
- vyhodnocení proliferační aktivity provádíme po 3-7 dnech průkazem inkorporace radioaktivně značeného thymidinu (analog thyminu) do nové syntetizované DNA dělících se buněk
- úroveň měřené radioaktivity odpovídá proliferační aktivitě lymfocytů

Aktivační substance	Příklad	Aktivační dráha	Odpověď	Nutnost předchozího setkání
Antigen	tetanický toxoid PPD	TCR	specifická	ano
Mitogen	PHA Con A		nespecifická	ne
Monoklonální protilátka	anti-CD3	CD3		
Phorbol ester a kalciový ionofor	PMA a ionomycin	aktivace distálně od TCR/CD3 komplexu		

7 — Vyšetření funkce fagocytyjících buněk

Vyšetření funkce fagocytyjících buněk – metody, indikace, interpretace.

- **fagocyty** — neutrofily a makrofágy (monocyty)

Kvantitativní vyšetření — vyšetření počtu

- **vyšetření počtu granulocytů a monocytů**
- vychází z KO — absolutní počet, relativní zastoupení
- metody průtoková cytometrie, přímá mikroskopie, potažmo fluorescenční

Kvalitativní vyšetření — vyšetření funkce

- jako zdroj buněk využijeme neutrofilní granulocyty z periferní krve
- zaměříme se na analýzu jednotlivých stadií fagocytózy:
 1. adheze
 2. chemotaxe
 3. fagocytóza
 4. respirační vzplanutí
- + konečný důsledek, tj. usmrcení mikroorganismu

1. Adheze

- adhezi neutrofilů k cévnímu endotelu umožňují adhezní proteiny (integriny)
- **vyšetření exprese povrchových antigenů CD11/CD18** je indikováno při podezření na LAD syndrom (leukocyte adhesion deficiency)
- využívá se **průtokového cytometru a monoklonálních protilátek**

2. Chemotaxe

- **test migrace pod agarózou**
 - schopnost granulocytů odpovídat na chemotaktickou stimulaci
 - princip — do Petriho misky nalijeme agarózový gel, do kterého uděláme malé jamky, do jedné jamky se umístí suspenze granulocytů, do druhé chemotaktická látka
 - jako chemotaktický podnět slouží buď N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (N-fMLP), nebo filtrát kultury *E. coli*
 - vyhodnocení — po několika hodinách změříme vzdálenost, kterou buňky urazí
 - jelikož každá laboratoř má metodiku odlišně modifikovanou, nejsou žádné obecné referenční hodnoty; většinou se používá tzv. index chemotaxe (tj. poměr vzdálenosti, kterou urazily buňky ve směru chemotaktického podnětu, ke vzdálenosti, kterou urazily buňky spontánní migrací)
- **komůrkový test**
 - provádí se pomocí speciální komůrky s porézní membránou (póry o velikosti 3 μm), přes kterou migrují leukocyty za chemotaktickým podnětem podobně jako v agarovém testu
 - vyhodnocení — množství buněk, které prošly přes membránu (pomocí průtokové cytometrie)

3. Fagocytární aktivita

- **opsonofagocytární index (OFI)**
 - hodnotí schopnost leukocytů fagocytovat latexové partikule nebo některé mikroorganismy (*Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *C. albicans*)
 - vyhodnocení — procento fagocytytujících buněk (monocyty, neutrofily a eozinofily) majících jednu a více fagocytovaných kandid
- **test mikrobicidní aktivity**
 - hodnotí sumárně všechny kroky fagocytózy končící usmrcením mikroba
 - principem testu je inkubace indikátorového živého mikroorganismu (*C. albicans*, *S. aureus*) s plnou nesrážlivou krví, nebo suspenzí granulocytů izolovaných z periferní krve vyšetřované osoby
 - vyhodnocení — počet přeživších mikroorganismů očkovaním na pevné agarové plotny
 - u kandid vyhodnocením živých a mrtvých kandid po obarvení preparátu vitálními barvivy (obarví se mrtvé mikroorganismy)

4. Respirační vzplanutí

- indikace — zásadní vyšetření pro potvrzení nebo vyvrácení nejčastější poruchy fagocytárních funkcí (chronické granulomatózní choroby)
- **testy redukce tetrazoliových solí (NBT test, INT test)**
 - NBT (nitroblue-tetrazolium chlorid), modifikace INT (jod-nitroblue-tetrazolium chlorid)
 - kvalitativně vyhodnocuje koncentraci superoxidového radikálu prostřednictvím **redukce nažloutlých rozpustných tetrazoliových solí na krystaly formazanu, které se ukládají v cytoplazmě fagocytytujících buněk** (modré krystaly u NBT, růžové u INT) — ty je možné buď pozorovat pod mikroskopem, nebo semikvantitativně stanovit spektrofotometricky po lýze fagocytytujících buněk
 - tento test je **optimální pro diagnostiku chronické granulomatózní choroby**; naopak je velmi málo citlivý například u deficiencí myeloperoxidasy
- **chemiluminiscenční test**
 - využívá se skutečnost, že **buňky při fagocytóze emitují malá množství světla**
 - během aktivního procesu respiračního vzplanutí vznikají peroxid vodíku, superoxidové radikály, singletový kyslík; singletový kyslík je velmi nestabilní a reaktivní látka, která reaguje s bakteriemi (nebo částicemi) v lysozomech za vzniku elektronově nestabilních karboxylových skupin — při návratu těchto skupin do základního stavu je emitováno světlo
 - k indukci tvorby světla a zesílení reakce lze využít **luminofory** (luminol)
 - emise fotonů se měří luminometrem v impulsech za minutu
 - chemiluminiscenční test je **citlivý ke všem poruchám respiračního vzplanutí**
- **burst test**
 - **stanovení respiračního vzplanutí oxidací dihydrorhodaminu DHR123**
 - tento kvantitativní test vyhodnocuje respirační vzplanutí leukocytů po jejich stimulaci opsonizovanými *E. coli* — vzniklé kyslíkové radikály oxidují membránově permeabilní fluorogenní substrát dihydrorhodamin 123 (DHR 123) na zeleně fluoreskující nepermeabilní rhodamin 123 (R 123), jehož přítomnost v buňce se měří pomocí průtokové cytometrie
 - burst test je **citlivý ke všem poruchám respiračního vzplanutí**

8 — Vyšetření HLA

Vyšetření HLA–antigenů — metody, indikace, interpretace.

- HLA viz otázku 1.18

HLA typizace

- **určení konkrétních HLA znaků („HLA výbavy“) jedince**
- má klíčový význam při **zajištění tkáňové slučitelnosti u transplantací**, ale používá se také v diagnostice nemocí asociovaných s HLA znaky a při nastavení terapie některými léky
- metody:
 - A. sérologické metody** — starší, využívají k určení HLA antigenů na povrchu buněk specifické protilátky
 - B. molekulárně-genetické metody** — novější rozlišují HLA varianty již na úrovni HLA genů
- názvosloví HLA znaků:
 - sérologická nomenklatura rozlišuje HLA antigeny, zatímco molekulárně-genetická nomenklatura určuje HLA alely
 - molekulárně-genetická nomenklatura se odlišuje přidáním hvězdičky za název HLA lokusu a přidáním nuly před jednomístné označení alelické skupiny — například HLA-A1 = HLA-A*01
 - **HLA haplotyp** — tj. konkrétní kombinace alel jednotlivých lokusů HLA na jednom chromozomu, každý člověk nese jeden mateřský a jeden otcovský haplotyp

A. Sérologická HLA typizace

- **rozeznávání jednotlivých HLA antigenů specifickými protilátkami**
- používána pouze pro typizaci HLA-I
- **lymfocytotoxický test**
 - využíváme sestavu (tzv. **typizační panel**) protilátek, které **reagují specificky s určitými HLA antigeny**
 - panel obsahuje protilátky k pokrytí celého spektra HLA antigenů, které se v dané populaci běžně vyskytují; protilátky proti různým antigenům HLA jsou připraveny v jamkách mikrotitračních destiček — do každé jamky jsou přidány lymfocyty vyšetřované osoby
 - v případě, že protilátky v dané jamce odpovídají antigenům na povrchu vyšetřovaných buněk, dojde k jejich navázání
 - k vizualizaci vazby je do jamek přidán králičí komplement, který způsobí lýzu buněk s navázanými protilátkami, zatímco buňky bez navázaných protilátek zůstávají intaktní
 - hodnocení mikroskopicky po vitálním barvení, které rozliší usmrcené (lyzované) buňky od živých

B. Molekulárně-genetická typizace HLA

- rychlé a spolehlivější vyšetření s vyšším rozlišením (na úrovni alel)
 - a) **typizace s nízkým rozlišením** — základní úroveň, tzv. alelické skupiny, které zhruba odpovídají antigenům určeným sérologickou metodou
 - b) **typizace s vysokým rozlišením** — určuje jednotlivé HLA alely; je nezbytná například při výběru optimálního dárce pro nepříbuzenskou alogenní transplantaci kostní dřeně
- založena na PCR testování — v praxi nejčastěji 3 metody (PCR-SSP, -SSO, -SBT)

1. PCR-SSP — PCR se sekvenčně specifickými primery

- **vhodná pro typizaci menšího počtu vzorků, výhodou je rychlost (urgentní typizace)**
- typizační sestava pro konkrétní HLA gen je tvořena jednotlivými primerovými páry, které jsou komplementární jen k určitým alelám
- v závislosti na požadovaném stupni rozlišení se používá různý počet párů (sad) primerů specifických vždy pro konkrétní alelu, resp. skupinu alel
- primery jsou navrženy tak, že k amplifikaci (tj. vzniku PCR produktu) dojde pouze v přítomnosti dané alely (skupiny alel)
- pokud vyšetřovaný vzorek příslušnou alelu neobsahuje, primery se nenaváží a specifický produkt PCR nevzniká
- produkty PCR jsou obvykle vizualizovány v UV světle po obarvení a rozdělení elektroforézou v gelu, kde se jeví jako svítící proužky
- alely HLA ve vyšetřovaném vzorku jsou určeny na základě specifity primerů, které vedly ke vzniku PCR produktů

2. PCR-SSO — PCS se sekvenčně specifickými oligosondami

- metoda PCR-SSO je velmi **vhodná pro vysokokapacitní HLA typizaci**, protože může být do značné míry automatizována; nehodí se však příliš pro provádění jednotlivých typizací a typizací v urgentním režimu
- začíná namnožením nejvýznamnější části HLA genu pomocí PCR
- takto získaný fragment (označený například fluorochromem) se následně hybridizuje se škálou oligonukleotidů (DNA sond), které jsou specifické pro konkrétní HLA alely
- sondy jsou umístěny na pevné fázi (například na povrchu mikrokuliček)
- hybridizace a promytí za specifických podmínek zajistí, že značené fragmenty HLA genu zůstanou navázány pouze na zcela komplementárních DNA sondách
- hybridizace (pozitivní reakce) je následně identifikována měřením fluorescenčního signálu z mikrokuliček ve speciálním přístroji (například Luminex)
- analýza výsledků probíhá s využitím softwaru, který podle pozitivních reakcí na mikrokuličkách určí výsledný HLA typ

3. PCR-SBT — typizace založená na sekvenování (sequencing based typing)

- jde o určení pořadí nukleotidů v nejvýznamnějších oblastech HLA genu, **poskytuje nejdokonalejší informaci o HLA výbavě konkrétního jedince**
 - přestože je nejnákladnější, považuje se za „zlatý standard“ pro HLA typizaci s vysokým rozlišením, zejména při vyhledávání optimálního dárce krvetvorných kmenových buněk pro transplantaci
 - používá se sekvenační technika dle Sanger
- nespornou výhodou SBT oproti ostatním molekulárně-genetickým technikám je získání kompletní sekvence vybrané části HLA genu — proto je SBT nepostradatelná v identifikaci a potvrzení nových HLA alel

9 — Molekulárně genetické metody v imunologii

Molekulárně genetické metody v imunologické laboratorní diagnostice – PCR, sekvenování, NGS.

- molekulární genetika je relativně mladá vědní disciplína, která se **snaží odhalovat příčiny onemocnění na molekulární úrovni a hledá příčinné vztahy mezi poškozením DNA (mutací) a pozorovaným fenotypem (onemocněním)**
- používá řadu specializovaných metod, které umožňují studovat molekulární podstatu fungování genů, jejich strukturu na úrovni DNA, RNA a proteinů, expresi na úrovni RNA a proteinů, a také jejich biologickou funkci.
- metody molekulární genetiky se využívají pro:
 1. **detekci vrozených mutací**
 - při diagnostice dědičných geneticky podmíněných onemocnění
 - v předklinickém stadiu při identifikaci nosičů mutantních alel (přenašečů AR onemocnění) nebo při odhalování genetické predispozice ke geneticky podmíněnému onemocnění
 - v prenatalní diagnostice analýza postižení plodu dědičným onemocněním, určení pohlaví
 2. **detekci získaných mutací**
 - v onkogenetice – analýza somatických mutací asociovaných s nádorovými onemocněními
 3. **detekci patogenů způsobujících infekční onemocnění** (virů, bakterií či kvasinek)

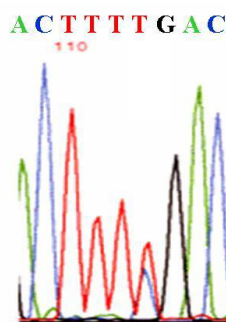
PCR (polymerázová řetězová reakce)

- metoda, **která slouží k namnožení (amplifikaci) úseku DNA** o délce max. 10 000 nukleotidů
- daný úsek DNA musí být na začátku a na konci vymezen krátkou sekvencí, na kterou nasedá tzv. **primer** — podle principu replikace DNA pak dochází k extenzi řetězců DNA od primerů dále ve směru syntézy (5'→3')
- postupně je amplifikován vybraný úsek DNA
- pro syntézu DNA se využívá termostabilní DNA polymeráza (například Taq polymeráza)
- PCR zahrnuje 3 kroky, které se cyklicky opakují:
 1. **denaturace DNA**
 - reakční směs se zahřívá na teplotu 95°C (30 s)
 - při této teplotě se ruší vodíkové můstky a rozvolňuje se dvoušroubovice DNA — vzniká tak jednovláknová DNA
 2. **nasednutí primerů (annealing)**
 - teplota se sníží na 60°C, což umožní nasednutí primerů na cílová místa DNA a to na principu komplementarity bazí
 - molekuly jednořetězcové DNA totiž po ochlazení opět renaturují — pokud jsou ve směsi v nadbytku specifické primery, budou hybridizovat se svou komplementární sekvencí rychleji než dlouhé jednořetězcové molekuly, jejichž koncentrace je mnohem nižší
 - na primery se váže termostabilní polymeráza, která je přítomna v reakční směsi
 3. **prodlužovací fáze (elongace)**
 - v tomto kroku dochází k samotné syntéze DNA
 - Taq polymeráza má optimum aktivity při 75-80°C; ve směru 5'→3' je syntetizováno vlákno komplementární k původní molekule DNA

-
- princip PCR:
 - po prvním cyklu PCR se počet řetězců DNA ve směsi zdvojnásobí; v dalším cyklu mohou jako templát pro polymerasu sloužit i nově vytvořené řetězce, takže se nasyntezuje dvojnásobné množství produktu; při opakujících se cyklech bude množství vytvořených řetězců přibývat exponenciálně
 - nové molekuly DNA se začínají syntezovat od primeru; v prvním cyklu vzniknou řetězce, které jsou sice kratší než templát, ale vždy z jedné strany přesahují úsek vymezený oběma primery (primární produkt); pokud v dalších cyklech jako templát slouží takto vytvořený primární produkt, vytvoří se podle něj úsek DNA o délce přesně ohraničené polohou obou použitých primerů; právě těchto specifických produktů o přesně vymezené délce bude v průběhu PCR přibývat exponenciálně, zatímco delších řetězců jen lineárně; po 30 cyklech PCR se teoreticky vytvoří asi 109× více specifického produktu než ostatních úseků DNA, jejichž podíl je tak ve výsledné směsi prakticky zanedbatelný
 - výsledek PCR se pak kontroluje pomocí **gelové elektroforézy** — pro kontrolu délky fragmentů se používají tzv. DNA markery, které obsahují DNA o definované délce
 - PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) — používá se, pokud je potřeba namísto DNA amplifikovat mRNA
 - složky reakční směsi:
 - a) **templátová DNA**
 - pro reakci často stačí i velmi malé množství nukleové kyseliny
 - je však nutné, aby vzorek nebyl kontaminován žádnou jinou DNA, i nepatrná příměs kontaminující DNA by se mohla v průběhu reakce namnožit natolik, že by výsledek byl zkreslen
 - vzorek s templátovou DNA nesmí obsahovat látky, které by inhibovaly DNA polymerázu — jde často o běžné reagenty používané při izolaci, čištění a zpracovávání DNA (fenol, proteinasa K, vyšší koncentrace solí, heparin, kyselina boritá, ethanol, EDTA apod.)
 - b) **primery** — oligonukleotidy o délce 17–28 nukleotidů
 - musejí být specifické pro amplifikovanou sekvenci a měly by být pokud možno zcela komplementární k úseku, na který mají dosedat
 - primery by spolu neměly být vzájemně komplementární, jinak se samy začnou chovat jako templáty a během PCR se budou tvořit jejich dimery
 - c) **termostabilní DNA polymeráza (Taq polymeráza)**, z bakterie *Thermus aquaticus*
 - její teplotní optimum se pohybuje kolem 75°C, kdy dokáže k primeru přidat asi 150 bází za sekundu; při teplotě nad 90°C není aktivní, ale dostatečně odolává denaturaci
 - d) **základní reakční roztok**
 - všechny 4 deoxynukleotidtrifosfáty (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
 - pufr, soli, Mg²⁺ ionty, které působí jako kofaktor polymerázy
 - využití PCR v diagnostice:
 1. detekce patogenů — virů (HAV, HBV, HCV), bakterií (TBC) a kvasinek
 2. detekce delecí genu — získáme zkrácený PCR produkt
 3. detekce přítomnosti fúzních genů na úrovni mRNA pomocí RT-PCR
 4. kvantifikace genové exprese — stanovení množství produkované mRNA
 5. příprava materiálu pro další analýzy, například pro restriční analýzu či sekvenování
 6. DNA fingerprinting

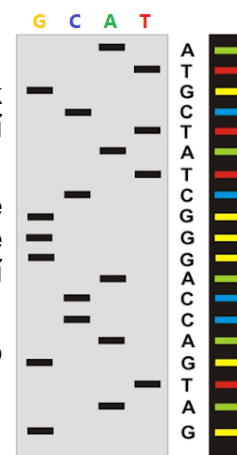
Sekvenování

- technologie, která **umožňuje stanovit primární strukturu DNA** (tj. sekvenci bazí)
- výsledkem sekvenační analýzy je tzv. **chromatogram**, který udává sekvenci nukleotidů analyzovaného vzorku (nejčastěji PCR produktu)
 - peaky odpovídají jednotlivým nukleotidům, přičemž každý typ báze je označen jiným fluorescenčním barvivem
- sekvenování se využívá pro detekci mutací, které se nedají identifikovat restriční analýzou a pro detekci nových, dosud neznámých mutací v genu (bodové mutace, substituce, krátké delece či inserce)
- v dnešní době se provádí automatické sekvenování



1. Sekvenování dle Sangera

- metoda vyžaduje:
 1. jednovláknovou DNA (produkt předchozí PCR reakce s jedním primerem)
 2. enzym polymerázu
 3. směs terminačních nukleotidů a normálních nukleotidů
 - například v poměru terminační:normální 1:100
- polymeráza syntetizuje druhé (komplementární) vlákno řetězce k jednovláknové DNA a při zabudování terminačního nukleotidu dochází k ukončení (terminaci) syntézy
- vznikají tak různě dlouhé dvouvláknové řetězce vždy ukončené terminačním nukleotidem — terminační nukleotidy jsou fluorescenčně značené (každý A, C, G, T jinak), a tudíž lze po rozdělení kapilární elektroforézou „přečíst“ pořadí 400-900 nukleotidů
- když se seřadí na elektroforéze podle délky, můžeme snadno porovnáním čtyř vedle sebe umístěných elektroforetických gelů zjistit, jak za sebou následovaly nukleové báze ve zkoumané sekvenci DNA



2. Sekvenování nové generace (NGS)

- zahrnuje celou řadu metod, v porovnání s klasickými metodami sekvenování **umožňují především rychlou a cenově příznivou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou**
- využívá principu paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně — výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat
- nejčastěji používanými platformami sekvenování nové generace jsou:
 - **454 (Roche) — pyrosekvenování**
 - Solexa (Illumina) — sekvenace syntézou (SBS, sequencing by synthesis)
 - SOLiD (Applied Biosystems)
 - Ion Torrent (Life Technologies)
 - PacBio (Pacific Biosciences)
 - Oxford Nanopore

454 (Roche)

- technologie 454, která byla vyvinuta firmou Roche, **využívá metodu pyrosekvenování fragmentů**, které jsou připraveny pomocí emulzní PCR
- obecné schéma metody:
 - v prvním kroku je DNA fragmentovaná na úseky o velikosti 300-800 bp
 - na konce vzniklých fragmentů jsou upevněny 2 typy adaptérů, s cílem toho, aby každý fragment nesl na jednom konci jeden adaptér a na druhém konci druhý adaptér; fragmenty, které nenesou oba adaptéry, jsou odstraněny
 - pomocí sekvence adaptéru jsou fragmenty imobilizovány na speciálních kuličkách, a to tak, že každá kulička nese jeden fragment; každá jednotlivá kulička je enkapsulovaná (zapouzdřená) do emulze v/o (voda v oleji) pomocí přídavku emulzního oleje (zapouzdření jednotlivých kuliček emulzí umožní následnou emulzní PCR)
 - každá kulička má k dispozici všechny potřebné komponenty pro PCR reakci — PCR reakce v zapouzdřených kuličkách umožňuje klonální amplifikaci DNA, tj. amplifikaci jednotlivých molekul DNA
 - po proběhnutí PCR jsou kuličky vyňaty z emulze a jednotlivě umístěny do jamek pikotitrační destičky, a to spolu s DNA polymerázou, ATP sulfurylázou a luciferázou
 - pomocí DNA polymerázy dochází na všech templátových molekulách, které jsou navázané na kuličku, k syntéze DNA, a to tak, že na destičku je postupně aplikován roztok, který obsahuje jen jeden typ nukleotidu (roztoky s jednotlivými nukleotidy jsou postupně obměňovány)
 - pokud se nukleotid po přidání daného roztoku začlení do vznikajícího řetězce (protože je komplementární k danému templátu), dochází díky sérii enzymatických reakcí k produkci luminiscence
 - pokud je DNA polymerázou nukleotid začleněn do vznikajícího řetězce, uvolní se pyrofosfát, ATP sulfuryláza provede reakci pyrofosfátu s APS — vzniká ATP; luciferáza převede luciferin za přítomnosti ATP na oxyluciferin, uvolní se světelné záření + apyráza rozloží neinkorporované nukleotidy a ATP (abychom „vyčistili stůl“ pro další reakci
 - světelné záření, které je zachyceno detektorem, je v počítači převedeno na informaci, který nukleotid byl inkorporován
 - proces je následně opakován s dalšími nukleotidy — paralelně jsou tak analyzovány až statisíce kuliček (proto paralelní sekvenování mnoha různých fragmentů současně)

pozn.: v našich skriptách (Raška a kol., Vyšetřovací metody v laboratorní imunologii) je popsána metoda SBS (str. 187)

10 — Diagnostika imunodeficitů

Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u imunodeficitů.

to stejné, co v otázce 2.1

Pacient s imunodeficiem

- **imunodeficit** = jakákoli porucha imunitní reakce; může být vrozený či získaný
- **obecné klinické projevy** — opakované infekce, náchylnost k AIO i alergiím, výskyt nádorových onemocnění

Anamnéza

- RA:
 - pátráme po opakovaných infekcích, AIO, úmrtí rodičů a předchozích generacích
 - důraz na větev ze strany matky pacienta — řada primárních imunodeficitů je X-vázaných
- OA:
 - a) vrozené imunodeficiency — měly by být diagnostikovány co nejdříve, podrobně se zabýváme vývojem v prvním roce života
 - zajímáme se o infekce — charakter, tíže, frekvence, etiologie
 - reakce po očkování, zejména v 1. roce; ptáme se na očkování proti TBC (jde o první vakcínu, s níž se dítě setká)
 - b) získané imunodeficiency
 - důraz je kladen na zjištění možné příčiny imunodeficiency
 - prakticky celá šíře interní anamnézy

Klinický obraz

a) vrozená imunodeficiency

- **pokud je postižena buněčná i humorální složka**
 - nejčastěji respirační infekce
 - infekce vznikají časně, bývají závažné
 - původci jsou atypické agens, často plísňe, viry, intracelulární bakterie
- **pokud je postižena pouze humorální složka**
 - respirační infekce, mírnější než u předchozí kategorie
 - původci jsou hlavně extracelulární patogeny (*H. influenzae*, *Streptococcus*...)
 - typický je náhlý počátek opakovaných infekcí přibližně v 6. měsíci života — časový posun způsoben ochranným vlivem mateřských transplacentárně přenesených protilátek
- **pokud je postižen komplement**
 - u poruch časných složek klasické dráhy — AIO s imunokomplexovou patogenezí (například SLE)
 - u poruch pozdních složek s poruchou funkce útočného komplexu (MAC) — opakované infekce kmeny *Neisserií*
 - u poruch C1 inhibitoru — hereditární angioedém

b) získaná imunodeficiency

- nelze shrnout do typického obrazu, jsou velmi různorodé podle vyvolávající příčiny

Laboratorní vyšetření imunodeficitů

1. Imunoglobuliny

- vyšetření:
 1. **hladiny imunoglobulinů — nefelometrie, turbidimetrie**
 2. **hladiny specifických protilátek — ELISA**
- interpretace:
 - žádné, nebo nízké koncentrace všech typů protilátek — Brutonova agamaglobulinemie
 - deficit IgA — selektivně sníženo IgA
 - hyper IgM — normální nebo zvýšené IgM, ostatní izotypy jsou velmi nízké až chybějící
 - přítomnost monoklonální protilátky — lymfoproliferativní onemocnění
 - zvýšené IgE — Omennův syndrom (varianta SCID), Wiskott-Aldrich syndrom

2. Komplement

- vyšetření:
 1. **měření C3, C4**
 2. **hemolytická aktivita komplementu CH50**

3. Lymfocyty

- vyšetření:
 1. **krevní obraz — přehled o počtech lymfocytů**
 2. **měření subpopulací lymfocytů — průtoková cytometrie**
 - B lymfocyty — znaky CD19, CD20
 - T lymfocyty — znaky CD3, CD4 či CD8
 - NK buňky — CD16, CD56
 3. **sledování funkcí T lymfocytů — test blastické transformace**
- interpretace:
 - B+ T- nebo B- T+ — tj. SCID
 - deficit B-lymfocytů — Brutonova agamaglobulinemie
 - snížení B-lymfocytů — CVID (běžná variabilní imunodeficeience)
 - snížení CD4 s charakteristickou dynamikou — AIDS
 - extrémně nízká či nulová odpověď v testu blastické transformace — SCID, kombinované imunodeficiency

4. Fagocyty

- vyšetření:
 1. **počty granulocytů, monocytů — KO**
 2. **funkce fagocytů — NBT, burst test**
 3. **vyšetření adhezivních molekul — integriny (CD11/CD18), selektiny (CD15)**

5. Další vyšetření

- genetické vyšetření
- zobrazovací metody
- biochemie, mikrobiologie, hematologie

11 – Diagnostika nádorových onemocnění

Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u nádorových onemocnění.

- základním předpokladem reakce imunitního systému s nádorovými buňkami je **existence nádorově specifických povrchových antigenů**
- rozlišují se 2 kategorie nádorových antigenů:
 1. antigeny specifické pro nádory (TSA)
 2. antigeny asociované s nádory (TAA)

1. TSA – antigeny specifické pro nádory

- TSA jsou proteiny, které se na normálních buňkách nevyskytují

a) abnormální buněčné proteiny

- produkty mutovaných genů
- **Bcr-Abl** – produkt genu (**filadelfský chromozom**), CML

b) proteiny onkogenních virů

- u nádorů vyvolaných viry (EBV, HPV)

c) abnormální formy glykoproteinů

- glykosylace povrchových proteinů některých nádorových buněk je odlišná od buněk normálních
- GM2, GD2, GD3 – gangliosidy exprimované u melanomu, neuroblastomu
- CA-125 (MUC-16) – karcinom ovaria
- MUC-1 – karcinom prsu

d) idiotypy myelomů a lymfomů

- **idiotyp** – tj. soubor determinant v hypervariabilních úsecích Ig; vazebná místa individuálních protilátek lišící se strukturou, která rozeznávají příslušný antigen
- nádorové buňky odvozené od B nebo T lymfocytů mají na povrchu klonotypické vysoce specifické BCR, resp. TcR, jejichž vazebná místa jsou unikátními antigenními strukturami

Přehled TSA

Onkogenní viry	
EBV	B-lymfomy, nasofaryngeální karcinom
HPV	karcinom děložního čípku
Abnormální buněčné proteiny	
BCR-ABL	chronická myeloidní leukémie (CML)
Abnormální formy glykoproteinů	
GM2, GD2, GD3	melanom, neuroblastom
CA-125 (skupina MUC-16)	karcinom ovaria
MUC-1	karcinom prsu
Idiotypy myelomů a lymfomů	
specifické BCR, TCR	myelomy, lymfomy

2. TAA — antigeny asociované s nádory

- nejsou výlučné specifické pro nádorové buňky, nacházejí se i na některých normálních buňkách — **odlišnost spočívá v kvantitě exprese nebo jde o abnormální expresi** ve špatné tkáni nebo ve špatném čase
- stanovení tkáňové nebo buněčné exprese těchto antigenů, event. detekce jejich solubilních forem v periferní krvi, jsou využívány jako pomocné diagnostické markery

a) onkofetální antigeny (AFP, CEA)

- přítomné na normálních embryonálních buňkách, postnatálně mizí a objevují se u některých nádorů
- AFP (α -fetoprotein) — hepatocelulární karcinom, karcinomu žaludku, pankreatu
- CEA (karcinoembryonální antigen) — karcinom tlustého střeva

b) melanomové antigeny (MAGE-1, Melan-A)

- silně exprimovány na melanomových buňkách, v menším množství na normálních melanocytech

c) HER2/neu

- receptor růstového faktoru epiteliálních buněk
- silně exprimován na buňkách karcinomu mléčné žlázy
- v malém množství přítomen na normálních epiteliálních buňkách

d) PSA (prostatický specifický antigen)

- karcinom prostaty, stanovení v krvi — screening a monitorování léčby
- může být zvýšený i u benigní hyperplazie prostaty

e) EPCAM (adhezivní molekula epiteliálních buněk)

- silná exprese na metastázách karcinomů

f) diferenciační antigeny leukemických buněk (CD10)

- **CALLA (CD10) — lymfoblastické leukemie, B-buněčný lymfom**
 - *common acute lymphoblastoid leukaemia antigen*
 - charakteristický antigen prekursorů B-buněk

Přehled TAA

AFP (α-fetoprotein)	hepatocelulární karcinom, karcinom žaludku, pankreatu
CEA (karcinoembryonální antigen)	karcinom tlustého střeva
MAGE-1, Melan-A	melanom
Her2/neu	karcinom prsu
PSA	karcinom prostaty
EPCAM	metastázy karcinomů
CALLA (CD10)	B-buněčný lymfom

12 – Diagnostika autoimunitních onemocnění

Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u podezření na autoimunitní onemocnění.

Stanovení autoprotilátek

- **autoprotilátky – protilátky namířené proti vlastním antigenům**
 - antigenem mohou být proteiny, glykoproteiny, nukleové kyseliny, fosfolipidy a glykofosfolipidy
- **ne všechny autoprotilátky jsou patologické** (tj. ne všechny stanovované protilátky jsou zodpovědné za rozvoj nemoci)
- **některé autoprotilátky jsou diagnostické** – jsou typické pro určitou chorobu aniž by za její patogenezi byly zodpovědné
 - například Hashimotova tyreoiditida – zodpovědné za ni jsou autoreaktivní T-lymfocyty, protilátky proti tyreoglobulinu chorobu pouze doprovázejí
- vyšetřované autoprotilátky lze rozdělit na:
 - a) **orgánově nespecifické autoprotilátky**
 - antinukleární protilátky (ANA)
 - protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA)
 - revmatoidní faktor (RF)
 - protilátky proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA)
 - antimitochondriální protilátky (AMA)
 - protilátky proti kardiolipinu (ACLA)
 - b) **orgánově specifické autoprotilátky**
 - Graves-Basedowova choroba – proti receptoru pro TSH či tyreoidální peroxidáze
 - Addisonova choroba – proti antigenům kůry nadledvin
 - Hashimotova thyreoitida – proti tyreoidální peroxidáze či tyreoglobulinu (aTG)
 - myastenia gravis – proti receptoru pro acetylcholin
 - juvenilní diabetes mellitus – proti antigenům β -buněk pankreatu
- metody stanovení:
 1. **nepřímá imunofluorescence** – mikroskopicky hodnotíme fluorescenční obraz vytvořený vazbou vyšetřovaných autoprotilátek na specifické epitopy antigenů vhodného buněčného nebo histologického preparátu
 2. **EIA (ELISA)**
 3. **Westernblot**
 4. **multiplexové techniky (LineBlot, Dotblot, ALBIA)**
- vzorkem je většinou sérum izolované ze srážlivé venózní krve
- **nález jakýchkoliv autoprotilátek se nesmí hodnotit samostatně, ale pouze v kontextu s klinickými příznaky specifickými pro dané AIO, anamnézou a s dalšími laboratorními nálezy**
 - pozitivní nález autoprotilátek u pacienta neznamena automaticky AIO
 - v séru zdravých jedinců se fyziologicky nachází přirozené autoprotilátky, které jsou součástí regulačních pochodů; vyskytují se v nízkých koncentracích, jsou převážně IgM izotypu, jsou polyreaktivní a s věkem jejich koncentrace stoupá
 - patologické autoprotilátky jsou v séru přítomny ve vyšších koncentracích, mají vyšší afinitu a mají převažující izotyp IgG a IgA

A. Orgánově nespecifické autoprotilátky

1. Antinukleární protilátky (ANA)

- skupina orgánově nespecifických autoprotilátek **namířených proti složkám buněčného jádra**
- mezi jaderné antigeny patří například chromatin, jaderná membrána, ribonukleové kyseliny, jaderná matrix, jaderná tekutina
- stanovení metodou **nepřímé imunofluorescence** (screeningová metoda)
 - substrátem jsou buňky tkáňových linií HEp-2
 - podle obrazu při imunofluorescenci lze odlišit několik typů ANA (typ homogenní, granulovaný, periferní, nukleolární...) — jednotlivé typy mají vazbu k určitým chorobám — důležitý pro dg. SLE, nízké titry ANA i u 5% zdravých (zejména staších)

Přehled ANA

Onemocnění	Výskyt (%)
SLE	95-100
Systémová sklerodermie	75-80
CREST syndrom	95
Sjögrenův syndrom	40-70
Revmatoidní artritida	10-30

2. Protilátky proti extrahovatelným nukleárním antigenům (anti-ENA)

- jasně definované **autoantigeny extrahované z buněčného jádra, popř. i cytoplasmu** (standardně buněk telecího brzlíku) nebo antigeny připravené rekombinantní technologií
- do skupiny ENA se řadí antigeny označované jako SS-A, SS-B, Sm, Scl-70, U1-RNP
- stanovení metodou **ELISA, imunoblot**
- stanovení anti-ENA autoprotilátek (zaměřené na jednotlivé autoantigeny) se ukázalo při diferenciální diagnostice výhodnější oproti nepřímé imunofluorescenci (ANA), neboť **umožňuje vyjádřit se s vyšší specificitou k možnému autoimunitnímu onemocnění**; nepřímá imunofluorescence je screeningová metoda, anti-ENA slouží k bližší identifikaci autoantigenu
- interpretace — u systémových AIO se mohou vyskytovat autoprotilátky různé specificity; i když existuje určitá asociace s konkrétní chorobou, většina parametrů není specifická pouze pro jedno onemocnění, výskyt protilátek se může kombinovat

Přehled anti-ENA

Onemocnění	ds DNA	histony	SS-A	SS-B	Sm	U1-snRPN	Scl-70	Jo-1
SLE	+++		+	+	++	+++		
Sharpův syndrom (MCTD)	+		+	+	++	+++		
Revmatoidní artritida	+	+						
Sjögrenův syndrom	+		++	++				
Polymyositis	++		+					++

3. Revmatoidní faktor (RF)

- obecně je RF **jakákoliv autoprotilátka (IgM, IgG, IgA) proti Fc oblasti lidského imunoglobulinu**, která cirkuluje v oběhu pacienta
 - v praxi se vyšetřují jako RF autoprotilátky proti Fc oblasti lidského imunoglobulinu IgG protilátky
- RF se vyskytuje u revmatoidní artritidy, systémových AIO, chronických infekcí, virové hepatitidy, infekční mononukleózy, nádorových onemocnění, a v nižších titrech i u zdravých starších jedinců
- metody vyšetření:
 - **latex fixační test** — němž RF aglutinuje latexové partikule potažené lidským IgG
 - **nefelometrie** — IgG je jako cílová molekula v roztoku, nebo IgG na povrchu latexových partikulí
 - **ELISA** — umožňuje určit izotyp RF (autoprotilátky)
 - vzorkem je sérum izolované ze srážlivé venózní krve
- indikace:
 - dg. **revmatoidní artritidy** (dnes existují specifitější testy autoprotilátek)
 - monitorování vývoje zánětlivé reakce během léčby onemocnění
- interpretace:
 - RF je **pozitivní u 80% případů revmatoidní artritidy**
 - u psoriatické artritidy bývá vyšetření většinou negativní
 - zvýšené hodnoty RF často u Sjögrenova syndromu, smíšené choroby pojiva (MCTD), SLE, sarkoidózy, tuberkulózy
 - pozitivní nález RF dále u nádorových onemocnění, chronických infekcí (při adekvátní léčbě infekcí mizí), virové hepatitidy, infekční mononukleózy, u zdravých starších jedinců ale v nižších titrech

4. Další orgánově nespecifické autoprotilátky

- **Protilátky proti cytoplasmě neutrofilů (ANCA)**
 - vaskulitidy (Wegenerova granulomatóza)
 - ulcerózní kolitida
 - autoimunitní hepatitida
 - **Antimitochondriální protilátky (AMA)**
 - primární biliární cirhóza
 - **Protilátky proti kardioplipinu (ACLA)**
- pozn.: pozorn na orgánově specifické či nespecifické protilátky a orgánově specifické či nespecifické AIO
- některé choroby jsou sice lokalizovány jen do některých orgánů, ale v laboratoři prokazujeme autoprotilátky orgánově nespecifické
 - například antimitochondriální protilátky AMA u hepatopatií nebo protilátky proti cytoplasmě neutrofilů u vaskulitid, ulcerózní kolitidy

B. Orgánově specifické autoprotilátky

- autoprotilátky namířeny jen proti některým orgánově specifickým strukturám
- mechanismy působení:
 1. **cytotoxické působení pomocí aktivace komplementu a jiných cytotoxických mechanismů** (typ II dle Coombse a Gella, typicky u hemolytických anemií a některých endokrinologických chorob)
 2. **protilátky proti receptorům, které mohou svou vazbou zablokovat přenos signálu** (například myastenia gravis)
 3. **protilátky proti receptorům, které mohou intenzitu signálu patologicky zvyšovat** (Graves-Basedowova choroba)
- vyšetřovací metody:
 - **NIF** — základní screeningová vyšetřovací metoda
 - inkubuje se pacientovo sérum s řezy získanými ze zvířecích orgánů (na rozdíl od orgánově nespecifických protilátek je třeba použít preparáty z konkrétních tkání)
 - **ELISA, imunoblot** — pro zpřesnění údajů, případně i jako metoda první volby

Přehled orgánově specifických autoprotilátek

Orgánově specifické onemocnění	Autoprotilátky
Juvenilní diabetes mellitus	• proti antigenům β -buněk pankreatu
Hashimotova thyreoiditida	• proti tyreoidální peroxidase (aTPO) • proti tyreoglobulinu (aTG)
Gravesova-Basedowova nemoc	• proti receptoru pro TSH • proti tyreoidální peroxidase (aTPO)
Addisonova choroba	• proti antigenům kůry nadledvin
Pemfigus	• proti bazální vrstvě epidermis (desmoglein 1 a 3)
Atrofická gastritida a perniciózní anemie	• proti parietálním buňkám žaludku • proti vnitřnímu faktoru (transport vitamínu B12)
Myasthenia gravis	• proti acetylcholinovému receptoru
Hemolytická anemie	• proti membránovým erytrocytárním antigenům

13 — Diagnostika alergií

Možnosti laboratorní imunologické diagnostiky u alergických pacientů.

- **stanovení celkového IgE je při analýze alergií málo spolehlivou metodou**
 - vyšší koncentrace celkového IgE se může vyskytovat i u jiných nemocí, například u parazitárních infekcí a některých imunodeficitů
- **stanovují se alergenově specifické IgE**
 - jejich produkce je odpovědná za reakci na konkrétní alergen
- vyšetření hladiny eozinofilů a eozinofilního kationického proteinu (ECP) — monitorování zánětu atopického pacienta

1. Stanovení alergenově specifických IgE

- mezi nejčastěji vyšetřované alergen specifické IgE patří **průkaz přecitlivělosti na travní a pylové alergeny, alergizující mikroorganismy, roztoče, jedy blanokřídlého hmyzu, alergeny srstnatých zvířat (především koček a psů) a potravinové alergeny**
- indikace — při kontraindikaci kožních testů (tj. pacienti s rizikem anafylaktické reakce, s kožními chorobami bránícími provedení kožních testů, nespolupracující pacienti, malé děti)
- stanovení metodou **FEIA CAP** — považována za zlatou cestu
 - **FEIA (vysokoafinitní fluoro-enzymo-imunoanalýza)** — kvantitativní in vitro stanovení koncentrace různých typů protilátek nebo solubilních antigenů v lidském séru nebo plasmě
 - princip metody spočívá ve vazbě specificky reagujících IgE protilátek z vyšetřovaného vzorku pacientova séra na antigen (alergen), který je kovalentně navázán na trojrozměrné celulózové matici uvnitř malého kalíšku (**CAP**) během průtoku vzorku pacientova séra přes tento kalíšek
 - po odmytí nenavázaných protilátek je do kalíšku nanесena anti-IgE protilátka konjugovaná s β -galaktosidasou
 - po odmytí nenavázané protilátky je do kalíšku nanесen fluorogenní substrát 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid, který je štěpen přítomnou β -galaktosidasou na aktivní fluorochrom
 - po zastavení reakce 4 % uhlíčanem sodným je v kyvetě, do níž je metabolizovaný (aktivní fluorochrom) i nemetabolizovaný (nefluorogenní) 4-methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid eluován, měřena fluorescence
 - fluorescence je úměrná množství navázané β -galaktosidasy a tedy i množství specificky navázaného IgE; je porovnávána s hodnotami na kalibrační křivce a je vypočítána koncentrace protilátek
 - koncentrace alergen specifických IgE protilátek je vyjádřena v jednotkách kUA/l (A označuje alergen-specifické protilátky)
 - k určení hodnoty kUA/l se používají IgE kalibrátory (jsou součástí sady reagentií)
 - interpretace:
 - $< 0,35$ kUA/l — velmi nízká koncentrace IgE protilátek, ale nevylučuje alergii
 - $\geq 0,35$ kUA/l — klinicky významná přítomnost alergen specifických IgE protilátek
 - $> 17,5$ kUA/l — velmi vysoké hodnoty
 - vzorkem pro stanovení je sérum izolované ze srážlivé venózní krve
 - **pro stanovení specifických IgE klinicky nejcitlivější**
 - kromě stanovení specifického IgE se metoda FEIA-CAP v alergologické diagnostice používá k měření hladin ECP (mediátor eozinofilního zánětu u astmatu), hladin tryptázy (marker akutně proběhlé aktivace mastocytů a tedy prodělané anafylaktické reakce)

2. Eozinofilní kationický protein (ECP)

- **ECP je cytotoxický protein s RN-ázovou aktivitou**
- nachází se ve velkých granulích eozinofilů
- vykazuje široké spektrum aktivit :
 1. inhibice proliferace bakterií (*E. coli*, *S. aureus*)
 2. zabíjení a paralýza helmintů a parazitů
 3. redukce infekivity některých virů (respirační syncytiální virus, RSV)
 4. inhibice proliferace T-lymfocytů, inhibice tvorby protilátek
 5. zvýšení exprese ICAM-1 epitelii, zvýšení exprese receptoru pro IGF-1
 6. inhibice růstu a životnosti nádorových buněk
 7. uvolnění histaminu z žírných buněk
 8. uvolnění TGF- β z fibroblastů
- má různě intenzivní fyziologické a patologické působení na různé tkáně:
 - v respiračním traktu přispívá k protibakteriální obraně, ale rovněž se podílí na poškození respiračního epitelu — v plicích například způsobuje remodelaci tkáně a fibrózu, ale zajišťuje protivirovou obranu
- **sérová koncentrace ECP odpovídá míře aktivace eozinofilů**, což je významné zejména pro monitorování eozinofilního zánětu, například u bronchiálního astmatu
- vzhledem k poměrně dlouhému sérovému poločasu je ECP **vhodný pro dlouhodobé monitorování efektu terapie eozinofilního zánětu**
- stanovuje se metodou **FEIA CAP**
 - vzorkem je sérum izolované ze srážlivé venózní krve odebrané do zkumavky s aktivátorem koagulace
- indikace — monitorování intenzity eozinofilního zánětu (zejména při diagnostice bronchiálního astmatu), monitorování efektivity protizánětlivé terapie bronchiálního astmatu, nastavení optimálního terapeutického protokolu zejména u dětí s eozinofilním zánětem, pomocná diagnostika atopické dermatitidy
- referenční hodnota ECP < 15–23 $\mu\text{g/l}$
 - pod 23 $\mu\text{g/l}$ — známka optimální terapie astmatu, jinak je hodnota vyšší
 - dynamika ECP může být informací o spolupráci pacienta při dodržování léčby

3. Tryptáza

- **proteáza uvolňována do séra během alergické reakce** (25% intracelulárních proteinů)
- **štěpí VIP** (vasoaktivní intestinální polypeptid, tj. relaxační faktor)
- **zvýšená sérová hladina několik hodin po anafylaktické atace**
- měření metodou **nefelometrie**

14 — Před a potransplantační vyšetření

Před a potransplantační imunologické laboratorní vyšetření.

- z imunologického hlediska je rozdíl mezi transplantací solidních orgánů a hematopoetických kmenových buněk:
 - **solidní orgány** — hrozí rejekce štěpu, tj. imunitní systém příjemce napadá transplantovaný orgán (HvGD), **nutná imunosupresivní terapie**
 - **hematopoetické kmenové buňky** — hrozí GvHD, tj. reakce štěpu proti hostiteli; může to být však i výhoda, kdy lymfocyty dárce likvidují maligní buňky příjemce
- **systém HLA** hraje roli při rozpoznávání buněk štěpu lymfocyty příjemce v případě transplantací solidních orgánů, resp. buněk příjemce dárcovskými lymfocyty u transplantace kostní dřeně
- transplantace může být:
 - a) **autologní** — vlastní tkáň sobě
 - b) **syngenní** — tkáň od geneticky stejného jedince, například monozygotního dvojčete
 - c) **alogenní** — od jedince stejného druhu, tj. od jiného člověka
 - d) **xenogenní** — od jedince jiného druhu, například od prasete

Solidní orgány

- u jedinců, kteří mají neshodu v HLA-A, HLA-B a HLA-DR antigenech, je o 25% vyšší riziko odmítnutí štěpu než u jedinců s plnou shodou v těchto antigenech (shoda v 6 antigenech); procento komplikací roste s počtem neshod
- předtransplantační vyšetření:
 1. **krevní skupiny** (metodou aglutinace)
 2. **HLA typizace** (metodou PCR-SSP)
 - s nízkým rozlišením v HLA-A, B, DR u ledviny
 - bez HLA u srdce, plic, pankreatu a střeva — časové důvody
 - bez HLA játra a rohovka — shodu nevyžadují
 3. **zjištění přítomnosti anti-HLA protilátek — PRA (panel reactive antibodies)**
 - sérum čekatele na transplantaci je inkubováno s panelem alogenních lymfocytů
 - hodnotí se procento dárců, proti kterým sérum příjemce vykázalo pozitivní reakci
 - séra vysoce senzitivizovaných pacientů (např. po častých transfuzích nebo předchozích transplantacích) reagují s více než 50% lymfocytárních populací z panelu
 - vyšetření se provádí u pacientů, kteří jsou indikováni k transplantaci orgánu před jejich zařazením na čekací listinu, a dále pravidelně každé 3 měsíce
 4. **křížová zkouška (cross-match)**
 - sérum příjemce těsně před transplantací inkubováno s lymfocyty konkrétního dárce
 - pozitivní reakce znamená přítomnost protilátek proti aloantigenům dárce a je důvodem k odmítnutí transplantace, protože je zde velké riziko hyperakutní rejekce a zvýšené riziko protilátkami zprostředkované vaskulární rejekce v časném potransplantačním období

Transplantace ledviny

- pacienti z chronického dialyzačního programu, kteří jsou indikováni k transplantaci, jsou zařazeni na listinu čekatelů (waiting list)
- předtransplantační vyšetření:
 1. **krevní skupina**
 2. **HLA typizace s nízkým rozlišením v oblastech HLA-A, -B, -DR**
 - sérologicky nebo metodami molekulární genetiky
 3. **anti-HLA protilátky (PRA)**
 - každé 3 měsíce
 4. **sérologické markery infekce virem hepatitidy B, hepatitidy C, infekce CMV**
- u kadaverózního dárce:
 - provedena v režimu statim HLA typizace, stejně jako u dárce
- výsledek je předán do národního centra koordinujícího transplantace
 - zde je pomocí softwaru vybráno 50 potenciálních příjemců, kteří nejlépe vyhovují výběrovým kritériím — shoda AB0 a HLA systému, požadavek na urgentní transplantaci, doba čekání na transplantaci
- jména čekatelů jsou sdělena spádovým HLA laboratořím, které provádějí cross-match test
- z kandidátů s negativním cross-match testem jsou vybráni 2 příjemci s ohledem na vzdálenost místa odběru ledviny od příslušného transplantačního centra
- je možná transplantace od živých dárců, vyšetření jsou shodná jako u kadaverózních (bez statim režimu), odpadá výběr příjemců přes koordinační centrum, protože živí dárce věnují ledvinu konkrétnímu příjemci

Hematopoetické buňky

- indikace — maligní poruchy krvetvorby (leukémie, lymfomy), některé solidních nádory, primární i sekundární těžké útlumy kostní dřeně (aplastická anémie), závažné primární imunodeficience
- cílem je obnovení funkční krvetvorby (může navodit změnu krevní skupiny)
- požadavky na shodu v HLA systému jsou výrazně odlišné od transplantací solidních orgánů
 - je požadována co největší shoda HLA systému (na úrovni alel) — tzn. je třeba zajistit maximální shodu v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1
 - preferovány jsou HLA identické sourozenské transplantace (pravděpodobnost úplné shody je 25%) — pokud není v rodině vhodný dárce, pátrání v národních i mezinárodních registrech dárců
 - u některých pacientů může být akceptován i dárce s jednou, maximálně dvěma HLA neshodami
- typizace se provádí nejprve na úrovni nízkého rozlišení a pokud nebyla nalezena neshoda, pokračuje na úrovni vysokého rozlišení

Potransplantační vyšetření

- úlohou imunologie je **posoudit adekvátnost imunosupresivní terapie** (zda riziko infekce nepřevažuje přínos imunosuprese) a **zhodnotit míru rizika rejekční reakce**
- monitorování pacientů po transplantaci ledvin — stanovení subpopulací lymfocytů
 - monitorování aktivačních znaků T-lymfocytů včetně Treg
 - význam — monitorování rozvoje a závažnosti možné akutní rejekce

15 – Význam vyšetření HLA polymorfismu

Význam vyšetření polymorfismu HLA a dalších molekul u nádorových onemocnění, autoimunit a imunodeficitů.

Vyšetření polymorfismu HLA

- **asociace HLA znaků s chorobami** — určitý HLA znak se vyskytuje častěji u nemocných s danou nemocí než v běžné populaci → lidé s určitými HLA antigeny mají zvýšené riziko vzniku některých onemocnění
 - pouhá přítomnost znaku však diagnózu nepotvrzuje, tedy není příčinou onemocnění — aby se nemoc rozvinula, musí být přítomen ještě vlastní etiologický faktor („spouštěč“)
- nejčastěji se jedná o choroby, v jejichž etiologii hraje důležitou roli imunitní systém, zejména AIO
- **relativní riziko** — poměr mezi rizikem vzniku určité choroby u nositele definovaného rizikového faktoru (v tomto případě určitého HLA antigenu) a rizikem vzniku této choroby v běžné populaci
 - byly identifikovány choroby, kdy výrazná většina jedinců, u nichž se choroba rozvinula, sdílela konkrétní HLA antigen
 - přítomnost daného HLA antigenu může být důležitou, ale nikoliv nezbytnou podmínkou vzniku daného onemocnění
- mechanismus není objasněn, jedna z hypotéz hovoří o selhání mechanismu negativní selekce autoreaktivních T-lymfocytů v thymu
 - například pokud určitá HLA molekula nenaváže nějaký tělu vlastní antigen s dostatečně vysokou afinitou, nezralý T-lymfocyt reagující s tímto antigenem unikne negativní selekci a vyraje ve funkčně kompetentní buňku schopnou autoimunitní reakce
- v některých případech má nepřítomnost daného znaku u pacienta vysokou negativní prediktivní hodnotu — **pokud se daný znak u pacienta nevyskytuje, je pravděpodobnost příslušné nemoci nízká**

Příklady chorob asociovaných s HLA

Nemoc	HLA	Riziko (%)
Běchtěrevova nemoc	B27	84,4
celiakie	DQ2, DG8	
uveitida	B27	10
Goodpasteurův syndrom	DR2	16
roztroušená skleróza	DR2	4,8
Graves-Basedowova nemoc	DR3	3,7
SLE	DR3	5,8
myastenia gravis	DR3	2,5
pemphigus	DR4	14,4
revmatoidní artritida	DR4	4,2
Hashimotova thyreoiditida	DR5	3,2

Vyšetření genu TP53 (sekvenování)

- **gen TP53 leží na p raménku 17. chromozomu a kóduje protein p53**
 - **p53 fyziologicky funguje jako tumor-supresor**, který reguluje buněčný cyklus a podílí se na opravách poškozené DNA tím, že zastaví buněčný cyklus do doby, než je DNA opravena nebo buňka odsouzena k apoptóze
 - pokud je gen TP53 deletován nebo mutován, dochází k nekontrolovanému růstu těchto poškozených buněk a kumulaci genetických změn
- indikace k sekvenování TP53 — **CLL**
- interpretace výsledků — **delece nebo mutace genu TP53** predikuje odpověď na léčbu a zároveň ovlivňují volbu léčebného postupu u CLL
 - pacienti s CLL s delecí nebo mutací genu TP53 mají významně horší prognózu s vyšším rizikem progresu do symptomatického onemocnění, horší a kratší odpověď na chemoterapii a častěji se vyskytuje **Richterův syndrom** (zvrát CLL do vysoce maligního lymfomu)

Vyšetření fúzního BCR-ABL1 genu (sekvenování)

- u většiny pacientů **s chronickou myeloidní leukémií (CML)** se setkáváme s chromozomální aberací t(9;22)(q34;q11) — tzv. **filadelfský chromozom** (Ph-chromosom)
 - **vede k trvalé aktivaci tyrosinkinasy**
- u pacientů s CML se více než 10 let úspěšně používá terapie inhibitory tyrozinkináz (TKI)
 - jedním z problémů léčby pacientů s CML pomocí TKI je rezistence, na které se často podílí mutace především v kinasové doméně ABL1 genu, kde se TKI váží
 - proto se doporučuje provádět vyšetření mutací ve fúzním ABL1 genu vždy při selhání léčby TKI, při progresi choroby a při nedostatečné klinické odpovědi na léčbu.
- indikace sekvenování BCR-ABL1 — pacienti s CML a také u dalších onkologických malignit léčených TKI
- interpretace výsledků — **průkaz mutací tyrozinkinasové domény BCR-ABL1** genu může vést lékaře k rozhodnutí o převedení pacienta na jinou generaci TKI, případně k indikaci transplantace kmenových krvetvorných buněk

3. Klinická imunologie a alergologie

1 — Alergická reakce I. typu

Alergická reakce I. typu — podstata, klinické projevy.

Reakce přecitlivělosti I. typu (anafylaktická)

- zprostředkována protilátkami **IgE**
- **typicky probíhá prudce s náhlým začátkem**
- příkladem je anafylaktický šok, senná rýma, záchvat asthma bronchiale, urticaria (kopřivka)
- alergická reakce I. typu probíhá ve 2 fázích — senzibilizace a anafylaktická reakce
- nevyskytuje se u AIO

1. Fáze senzibilizace

- trvá většinou 2-3 týdny
- počátečním krokem je kontakt organismu s alergenem, většinou přes kůži nebo sliznici dýchacího či trávicího ústrojí
- alergenem mohou být cizorodé proteiny a polysacharidy, živočišné nebo hmyzí jedy, exogenní sérum hapteny představované některými léky (například ATB, analgetiky, RTG kontrastními látkami)
- po adhezi alergenu na slizniční epitel jsou alergeny fagocytovány a APC předloženy pomocným CD4+ Th2 lymfocytům, které začnou produkovat různé cytokiny (IL-4)
- aktivují vůči tomuto antigenu jak sebe, tak i B-lymfocyty a iniciují jejich přeměnu v plazmocyty — ty jsou zdrojem specifickým protilátek, zvláště typu IgE
- protilátky IgE se váží k membránovým receptorům bazofilních granulocytů (v krvi) a žírných buněk (ve sliznicích, v kůži) — proto jsou projevy alergie tohoto typu často spojeny se slizničními nebo kožními změnami, jako jsou edém sliznice nebo kožní vyrážka
- žírné buňky jsou zdrojem mediátorů anafylaktické reakce

2. Anafylaktická reakce

- vyvolána opakovanou expozicí specifickému alergenem — ten se váže ke specifickým protilátkám IgE přítomným na žírných buňkách a bazofilních granulocytech
- vazba antigenu na specifickou molekulu IgE navázanou na IgE-receptor vyvolá jeho redistribuci v membráně a aktivaci buňky
- dojde ke zvýšenému průniku Ca^{2+} do těchto buněk a následnému uvolnění látek obsažených v cytoplazmatických granulích (tzv. **degranulace**), je také zahájena syntéza některých nových látek
 - z cytoplazmatických granul se uvolní — **histamin**, destičky aktivující faktor (**PAF**) a faktor působící chemotaxi eosinofilních granulocytů (**ECF-A**)
 - nově se začnou syntetizovat — **prostaglandiny, leukotrieny LTC4 a LTD4**
- tyto látky vyvolají časně klinické symptomy (například kýčání) a akutní zánět provázený edémem — působí totiž vazodilatačně, zvyšují permeabilitu kapilár, vyvolávají kontrakci hladké svaloviny, zvyšují krevní srážlivost
- pozdní fáze anafylaktické reakce se může vyvinout v následujících 3-8 h
 - je způsobena chemotaxí a aktivací bazofilních, ale zvláště eozinofilních granulocytů
 - projevuje se zánětem

Projevy anafylaxe

- anafylaktická reakce se může projevovat lokálně, nebo celkově
 - a) **lokální projevy (tzv. projevy atopie)** — záchvat senné rýmy, bronchiálního astmatu, kopřivka, konjunktivitida
 - b) **systémové projevy — anafylaktický šok**
- **anafylaktický šok** — život ohrožující prudká alergická reakce
 - projevuje se následujícími symptomy, které jsou způsobeny především vyplavením histaminu a bradykininu:
 - arteriální hypotenze (aktivuje sympatikus → tachykardie, mydriáza, pocení, studená a blédá kůže, tzv. studený pot)
 - bronchokonstrikce, laryngospasmus
 - edém
 - kolikovitě břišní bolesti, event. defekace
 - svědění a kožní vyrážka
 - ztráta vědomí
 - degranulaci žírných buněk mohou také vyvolat některé aktivované složky komplementu:
 - jak klasickou cestou (komplexem antigen–protilátka), tak alternativní cestou (properdinovým systémem)
 - jedná se o složky C4a, C3a, C5a, označované jako **anafylatoxiny**
 - žírné buňky pro ně nesou na své membráně příslušné receptory
 - tím lze vysvětlit, proč alergické reakce I. typu mohou vyvolat i některé faktory neimunologického charakteru, například expozice chladu

Patologická reakce	Produkt uvolněný nebo produkováný žírnými buňkami
Vazodilatace a zvýšená cévní permeabilita	• histamin • destičky aktivující faktor (PAF) • leukotrieny C4, D4, E4 • prostaglandin D2 • neutrální proteázy (aktivují komplement a tvorbu kininů)
Kontrakce hladkých svalů	• histamin • destičky aktivující faktor (PAF) • leukotrieny C4, D4, E4 • prostaglandiny
Buněčná infiltrace	• chemotaktický faktor eosinofilů, neutrofilů • destičky aktivující faktor (PAF) • leukotrieny B4 • cytokiny (například TNF-α)

2 — Reakce přecitlivělosti II. typu

Reakce přecitlivělosti druhého typu — podstata, klinické projevy.

Reakce přecitlivělosti II. typu (cytotoxická)

- někdy se označuje jako **protilátkami zprostředkovaná cytotoxicita**
- reakce II. typu je vyvolána protilátkami proti antigenům lokalizovaným na buněčném povrchu
- antigen na buněčné membráně je:
 - a) jeho přirozená součást (v případě cizorodé buňky)
 - b) cizorodá bílkovina (například virový protein)
 - c) může se jednat o haptenu, vázaný k membránovému proteinu
- probíhá 3 rozdílnými mechanismy, ve kterých se uplatňují jednak:
 1. složky komplementu
 2. protilátkami aktivované cytotoxické efektorové buňky
 3. protilátkami způsobená dysfunkce různých typů buněk

1. Reakce závislá na komplementu

- rozvíjí se 2 způsoby:
 1. buď dochází k interakci protilátek (IgM nebo IgG) s antigeny lokalizovanými na buněčném povrchu a po aktivaci složek komplementu k poškození membránové integrity vedoucí přímo k zániku buňky
 2. nebo po navázání protilátek a fragmentu C3b komplementu k buněčnému povrchu (opsonizaci) se buňka determinuje k fagocytóze

2. Reakce zprostředkovaná buňkami

- buňky stigmatizované IgG protilátkami (výjimečně IgE protilátkami) jsou zničeny buňkami, které se na protilátky naváží pomocí Fc receptorů
- tento mechanismus se uplatňuje při obraně organismu proti parazitům i nádorovým buňkám a může se účastnit i reakce proti transplantátu

3. Protilátkami navozená dysfunkce buněk

- vzniká po vývoji a navázání protilátek proti některým povrchovým buněčným receptorům, čímž nedochází ke zničení buněk, ale k poruchám funkce těchto receptorů
- příkladem je porucha přenosu neuromuskulárního vzruchu po vytvoření protilátek proti acetylcholinovým receptorům svalových buněk s příznaky svalové slabosti (myastenia gravis)
- dalším příkladem může být Graves-Basedowova nemoc, při které se naopak uplatňuje stimulační účinek protilátek navázaných na receptor TSH (hormonu stimulujícího thyroideu) na povrchu epitelových buněk štítné žlázy vedoucí k nadprodukci thyreoidních hormonů (hyperthyreoidismus)

Příklady klinických onemocnění

- **transfuzní reakce**

- příčinou jsou protilátky proti některým povrchovým antigenům erytrocytů, trombocytů nebo leukocytů
- zejména erytrocytární antigeny AB0 systému

- **hemolytická nemoc novorozenců**

- vzniká podobným způsobem — způsobena protilátkami proti antigenu RhD
- pokud je matka RhD- a plod RhD+, při porodu může dojít k imunizaci matky krvinkami dítěte — při dalším těhotenství pak mohou anti-RhD protilátky přestupovat transplacentárně do cirkulace plodu a způsobovat jeho poškození
- jako prevence se používá pasivní imunizace matky protilátkami anti-RhD po prvním porodu nebo potratu — tyto protilátky zablokují antigen, takže se nemůže vázat na BcR a aktivovat B-lymfocyty matky

- **autoimunitní choroby**

- zejména u orgánově specifických, u kterých je autoimunitní reakce namířena proti autoantigenům specifickým pro určitou buněčnou linii nebo tkáň
- například pemphigus, Goodpastureův syndrom atd.

- **blokujiící nebo stimulační protilátky**

- proti TSH — Graves-Basedowova nemoc
- proti acetylcholinovému receptoru — myasthenia gravis
- proti vnitřnímu faktoru (IF) — blokuji vstřebávání vitaminu B12 → perniciózní anemie
- proti hormonům štítné žlázy — projeví se jako hypotyreóza
- proti inzulinovému receptoru — vzácné formy diabetu
- proti cytoplasmatickým antigenům neutrofilů (ANCA) — vaskulitidy
- proti spermiím — poruchy plodnosti

3 — Imunokomplexový typ přecitlivělosti

Imunokomplexový typ přecitlivělosti — podstata, klinické projevy.

Reakce přecitlivělosti III. typu (imunokomplexová)

- imunokomplexy vznikají navázáním protilátky na příslušný antigen (i při normální imunitní odpovědi) — mohou cirkulovat po určitou dobu v krevním oběhu, ale u zdravých osob jsou poměrně brzy vychytávány pomocí makrofágů, které mají receptor pro Fc-fragment
 - pokud odstraněny nejsou, nebo jejich tvorba přesahuje fagocytární kapacitu makrofágového systému, mohou se ukládat v cévní stěně nebo extravaskulárně
 - zde dojde k aktivaci komplementu, což vede k přitáhnutí neutrofilních granulocytů, které se v tomto místě nahromadí a vyvolají zánětlivou reakci, která může poškozovat některé tkáně
- antigeny, které způsobují tento typ alergické reakce, mohou být:
 - a) **exogenní** — proteiny při aplikaci cizího séra, bakterie (streptokoky, yersinie, treponemy), viry (HBV, CMV), paraziti (Plasmodia, Schistosomy), mykózy a houby
 - b) **endogenní** — nukleární antigeny, imunoglobuliny, nádorové antigeny
- onemocnění vyvolaná tvorbou imunokomplexů mohou být:
 1. **generalizovaná** (systémová) — imunokomplexy tvoří se v oběhu a ukládají se v různých orgánech
 2. **lokalizovaná** — dochází k poškození konkrétních orgánů (např. ledvin, kloubů, kůže)

1. Lokální formy

- zahrnují onemocnění jako glomerulonefritidy, polyartritidy, sterilní následky infekčních onemocnění (poststreptokoková glomerulonefritida, revmatická horečka), alergická alveolitida (tzv. farmářské plíce), experimentální model zvaný Arthusova reakce
- **Arthusova reakce** — tj. experimentální model lokální reakce na intradermální podání antigenu senzibilizovanému jedinci (tzn. má proti antigenu cirkulující protilátky)
 - lokální vznik imunokomplexů způsobí edém kapilární intimy během 5-30 min — ten způsobuje zblednutí okolí místa vpichu; následuje infiltrace neutrofilními granulocyty a tvorba mikrotrombů
 - za několik hodin se vyvíjí místní nekróza kůže na podkladě akutní imunokomplexové vaskulitidy spojené s fibrinoidní nekrózou stěny cév
 - narozdíl od anafylaktické reakce (která vzniká prakticky okamžitě po aplikaci alergenu) se rozvíjí pomalu, vyžaduje několik hodin, než dosáhne maxima, a desítky hodin, než zcela odezní
- **Raynaudův fenomén** — imunokomplexy v tomto případě vznikají při nízké teplotě, která se může uplatnit v akrálních částech těla; ty jsou chladné, bledé, nebo cyanotické, jsou bolestivé nebo necitlivé, může se na nich vyskytnout nekróza a gangréna

2. Generalizované formy

- generalizovanou formu představuje systémový lupus erythematosus (SLE), revmatoidní artritida, nebo také sérová nemoc
- **sérová nemoc** — vzniká asi za 2 týdny po jediném podání cizorodého séra (například koňské antisérum proti hadímu jedu, myši monoklonální protilátky...)
 - nově vytvořené protilátky vytvářejí komplexy s přetrvávajícími zbytky cizorodých bílkovin — ty se ukládají v drobných cévách a tkáních různých orgánů, které tím mohou být poškozeny (myokard, játra, ledviny, plíce, klouby)
 - časné projevy jsou zvýšená teplota, zvětšení uzlin a sleziny, bolesti kloubů, myalgie, generalizovaná kopřivka

4 — Reakce pozdní přecitlivělosti

Reakce oddálená – pozdní přecitlivělost – podstata, klinické projevy.

Reakce přecitlivělosti IV. typu (opožděná)

- buňkami zprostředkovaný typ hypersenzitivní reakce je **zahájen specificky senzibilizovanými T-lymfocyty**, protilátky se při této reakci neuplatňují
- popisují se 2 typy této reakce — oddálený typ hypersenzitivity a T-lymfocyty zprostředkovaný typ hypersenzitivity
- jde o **specifickou imunitní reakci**, která následuje nejen po infekci *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum*, *Klebsiella rhinoscleromatis* a dalších bakterií, ale i virů, mykóz, protozoí a parazitů
- tato reakce se podílí i na odvržení transplantátů

1. Oddálený typ hypersenzitivity

- typickým příkladem je **tuberkulinová reakce** (tuberkulin je proteinová a lipopolysacharidová složka izolovaná z obalu *Mycobacterium tuberculosis*)
 - osoba je imunizována intradermálně antigenem ve vhodném adjuvans — to vede ke vzniku antigenně specifických Th1 buněk
 - po opětovné injekci antigenu po několika týdnech se v okolí kožního vpichu vyvíjí po několika hodinách zarudlá papula (fáze kožní reakce) dosahující maximální velikosti po 1-3 dnech
 - časová prodleva mezi vpichem a reakcí je způsobena tím, že do místa vpichu musí nejprve migrovat Th1 buňky a makrofágy, a vzájemně se stimulovat:
 - Th1 produkují IFN- γ → aktivuje makrofágy
 - makrofágy produkují IL-12 a jiné cytokiny → přispívají k aktivaci dalších Th1
 - vznikne tvrdý otok způsobený buněčnou infiltrací
 - pokud antigenní expozice stále trvá, je po 2 až 3 týdnech původní převážně lymfocytární infiltrát nahrazen makrofágy s objemnou cytoplazmou (tzv. buňky epiteloidní); lymfocyty však zůstávají nahromaděny po obvodu léze — tj. **fáze granulomatózního zánětu**
- celá reakce vyžaduje souhru různých cytokinů a chemotaktických faktorů, mezi nimiž dominují IL-12 a IL-2, IFN- γ a TNF- α
- na tomto mechanismu je založeno poškozování tkání během granulomatózních zánětů (TBC, lepra, sarkoidóza, granulomatózní vaskulitida)

2. T-lymfocyty zprostředkovaný typ hypersenzitivity

- reakce podobná předchozí — lymfocyty Th1 při ní aktivují další efektorové složky, zejména CD8+ Tc-lymfocyty — Tc-lymfocyty zabíjejí buňky nesoucí na svém povrchu příslušný antigen
- tyto mechanismy se uplatňují zejména při:
 - akutní rejekci transplantovaného orgánu
 - virové exantémy a tkáňová poškození vyvolaná virem (například poškození jater u virových hepatitid)

5 — Buňky a mediátory alergické reakce

Zastoupení a funkce buněčných elementů v alergické reakci, mediátory alergické reakce.

viz otázku 3.1

- **atopie** — predispozice pro rozvoj imunopatologické reakce na neškodný antigen zevního prostředí vedoucí k rozvoji alergen specifických IgE protilátek
- **alergie** (fenotypový projev atopie) — nepřiměřeně vystupňovaná reakce imunitního systému na antigeny běžně přítomné v okolním prostředí
- **alergen** — látka vedoucí po předchozí senzibilizaci k rozvoji alergické reakce
 - o alergii v užším smyslu se hovoří, pokud se rozvíjí na podkladě přecitlivělosti I. typu — je zprostředkována protilátkou IgE; tato reakce probíhá ve 2 fázích:
 1. fáze senzibilizace
 2. anafylaktická reakce
 - příčinou atopie nejsou primárně alergeny, ale odlišná reaktivita atopiků — k výrazným odchylkám nacházeným u většiny atopiků patří vysoká koncentrace IgE v séru, významnou roli hrají bezpochyby vrozené dispozice
 - u zdravých lidí reaguje (pokud vůbec) s alergeny (pyly, potrava) především Th1 větev odpovědi, zatímco u atopiků převažuje při reakci s alergenem typ Th2 odpovědi, který je normálně určen k ochraně před extracelulárními parazity.

1. Fáze senzibilizace

- trvá většinou 2-3 týdny
- počátečním krokem je kontakt organismu s alergenem, většinou přes kůži nebo sliznici dýchacího či trávicího ústrojí
- alergenem mohou být cizorodé proteiny a polysacharidy, živočišné nebo hmyzí jedy, exogenní sérum hapteny představované některými léky (například ATB, analgetiky, RTG kontrastními látkami)
- po adhezi alergenu na slizniční epitel jsou alergeny fagocytovány a **APC** předloženy pomocným **CD4+ Th2-lymfocytům**, které začnou produkovat různé cytokiny (IL-4, IL-5)
 - cytokin **IL-4** — podporuje produkci IgE v B-lymfocytech
 - cytokin **IL-5** — růstový faktor eozinofilů (podněcuje k diferenciaci v kostní dřeni)
- aktivují vůči tomuto antigenu jak sebe, tak i B-lymfocyty a iniciují jejich přeměnu v plazmocyty — ty jsou zdrojem specifickým protilátek, zvláště typu IgE
- **protilátky IgE** se váží k vysokoafinním membránovým receptorům pro Fc fragment **bazofilů** (v krvi) a **žírných buněk** (ve sliznicích, v kůži) (navíc receptor pro C3a a C5a) — **navázaný IgE na povrchu buňky působí jako specifický receptor pro antigen**; po navázání antigenu dochází k aktivaci buňky
 - proto jsou projevy alergie tohoto typu často spojeny se slizničními nebo kožními změnami, jako jsou edém sliznice nebo kožní vyrážka
 - žírné buňky jsou zdrojem mediátorů anafylaktické reakce

2. Anafylaktická reakce

- vyvolána opakovanou expozicí specifickému alergenů — váže se ke specifickým protilátkám IgE přítomným na **žírných buňkách** a **bazofilech**
- vazba antigenu na IgE vyvolá jeho redistribuci v membráně a aktivaci buňky — dojde k uvolnění látek obsažených v cytoplazmatických granulích (tzv. **degranulace**), je také zahájena syntéza některých nových látek
 - z cytoplazmatických granul se uvolní — histamin, destičky aktivující faktor (PAF) a faktor působící chemotaxi eosinofilních granulocytů (ECF-A)
 - **histamin** — vazodilatace (↓TK), zvýšení permeability, bronchokonstrikce a edém epitelu, kopřivka, alergická rýma, konjunktivitida, zvýšená motilita střev
 - **destičky aktivující faktor (PAF)** — vazodilatace (↓TK), bronchokonstrikce, chemoatrakce zánětlivých buněk
 - **faktor působící chemotaxi eosinofilních granulocytů (ECF-A)**
 - nově se začínají syntetizovat — prostaglandiny, leukotrieny LTC₄ a LTD₄
 - **prostaglandiny (PG)D₂, E₂, I₂** — zvýšená permeabilita cév, bronchokonstrikce
 - **leukotrieny (LT)C₂, D₂, E₂** — zvýšená permeabilita cév, bronchokonstrikce, chemoatrakce neutrofilů a eosinofilů
- tyto látky vyvolají časné klinické symptomy (například kýčání) a akutní zánět provázený edémem, vyvolávají i kontrakci hladké svaloviny a zvyšují krevní srážlivost
- pozdní fáze anafylaktické reakce se může vyvinout v následujících 3-8 h
 - je způsobena chemotaxí a aktivací bazofilních, ale zvláště eosinofilních granulocytů
 - projevuje se zánětem (stimulován **TNF-α**)

Buňky alergické reakce

1. Eozinofily (1-3% leu)

- důležitá úloha při alergických reakcích I. typu (fagocytují komplex antigen-protilátka)
- ochrana proti parazitům (vypuštění poškozujících látek z granul)
- obsah cytoplazmatických granul — fosfatázy, peroxidázy, bazické proteiny

2. Mastocyty (žírné buňky)

- diferencují se z prekursorů v kostní dřeni, jsou podobné bazofilům
- rozlišují se 2 typy — **pojivové a slizniční** (diferencují se zřejmě vlivem mikroprostředí)
- fyziologicky regulátory imunitní odpovědi a obrana proti parazitům; patologicky při časných reakcích přecitlivělosti (I. typu)
- mají vysokoafinní receptor pro IgE — po vazbě antigenu dojde k agregaci a degranulaci
- obsah cytoplazmatických granul — hydrolytické enzymy, proteoglykany (heparin, chondroitinsulfát), biogenní aminy (histamin, serotonin), metabolity kyseliny arachidonové

3. Bazofily

- považovány za cirkulující formu žírných buněk (zdá se ale, že jsou to terminálně diferencované buňky, a ne předchůdci tkáňových mastocytů, kterým jsou ale funkcemi a výbavou velmi podobné)
- zodpovědné za vznik anafylaktického šoku

4. Th2-lymfocyty

- řídí diferenciaci B-buněk na plazmocyty produkující IgE

6 — Alergická rhinitida

Sezónní a perzistentní alergická rhinitida — příčina, projevy, léčba

- tj. **zánětlivé onemocnění sliznice nosní způsobené imunopatologickou reakcí predisponovaného jedince na antigen zevního prostředí**
- typické klinické projevy, které se objevují po expozici alergenů — kýčání, vodnatá rýma, pocit ucpaného nosu, pálení a svědění sliznic nosohltanu a očí, zatékání do nosohltanu
- **etiologie** — aeroalergeny (inhalační alergeny) — pyly (například bříza), traviny (například bojíněk), prašní roztoči, zvířecí srst, spory plísní
- **klasifikace:**
 - dle doby trvání příznaků:
 - a) intermitentní (sezónní, tzv. pollinosis)** — trvání < 4 dny v týdnu, < 4 týdny v roce
 - b) perzistující** — trvání > 4 dny v týdnu, > 4 týdny v roce
 - dle tíže příznaků:
 - 1. lehká** — chybí některé příznaky
 - 2. těžká** — nekvalitní spánek, zhoršení výkonnosti, omezení ADL, celkové příznaky
- epidemiologie:
 - časté onemocnění (10-30% dětí a dospělých)
 - prevalence s trvalým vzestupem zejména v industriálních oblastech a velkoměstech — uhlíkové mikročástice (výfukové zplodiny) mohou zvyšovat alergenní potenciál například pylů
 - prevalence u dětí 6-7 let 8,5%, u dětí 13-14 let 14,6%
 - výrazná socioekonomická zátěž pro společnost — 2,5% všech návštěv lékaře v průběhu 1 kalendářního roku
 - u alergiků signifikantně vyšší preskripce léčiv než ve zbytku populace (až 2x)
- patofyziologie:
 - 1. existence atopické vlohy**
 - AD dědičná s neúplnou penetrancí
 - kódována na 6. chromozomu
 - 2. senzibilizace**
 - první setkání s alergenem
 - dochází k tvorbě specifických IgE protilátek a jejich navázání na žírné buňky a bazofily
 - 3. expozice**
 - dochází k samotnému rozvoji patologické reakce
 - tj. Th2-mediovaná imunitní reakce
 - po kontaktu s alergenem dochází k rozvoji **cytokinové bouře**
 - v časně fázi této reakce se uplatňují zejména **IL-4 a IL-13**
 - aktivují B-lymfocyty na plazmocyty a ty začnou produkovat alergen specifické IgE protilátky, které začínají kolovat v oběhu
 - v pozdní fázi se uplatňuje zejména **IL-5**
 - aktivuje eozinofily, ty svými působky (TNF- α , INF- γ , IL-6) ovlivňují lokálně sliznice, které prostupují a způsobují chronické změny

Diagnostika alergické rinitidy

- **anamnéza — vždy na prvním místě!**
 - typické projevy vázané na expozici specifickému prostředí
 - věk, kdy došlo k rozvoji obtíží
 - sezónní nebo celoroční přítomnost obtíží
 - zhoršení v rámci dne, zhoršení při pobytu v přírodě
 - reakce na případnou užívanou antialergickou medikaci
- **skin PRICK test** — průkaz časně reakce přecitlivělosti
 - základní panel — pyly jarních dřevin, směs pylů travin, srst, domácí roztoči, plísně
 - výhody — výsledek do 20 min, manuální odečtení přímo v ordinaci, vysoká bezpečnost, nečetné systémové reakce, nízké náklady
- **alergen specifické sérové IgE** — nejčastěji metodou ELISA
 - přesná kvantifikace cirkulujících volných alergen specifických IgE
 - vhodné pro potravinové alergen, hmyzí jedy
 - nezbytné pro určení správné alergenové imunoterapie
 - nutnost laboratorního zázemí, vysoké náklady
 - naprostá bezpečnost
- další méně často užívané vyšetřovací metody:
 - **epikutánní testy** — v režii dermatovenerologů — kontaktní alergie (kovy, chemikálie)
 - **provokační testy** — nazální, spojivkové, bronchiální — podání definovaného alergenu
 - **expoziční testy** — potraviny, léčiva — podání potenciální závadné substance
 - **nazální cytologie (NARES)**

Terapie

1. **vyhýbání se expozici alergenů**
2. **nefarmakologické postupy**
3. **alergenová imunoterapie** — viz otázku 3.21
4. **farmakoterapie** — symptomatická léčba, volba podle charakteru potíží
 - A. antihistaminika** — blokáda buněčných H1 receptorů
 - například bisuleptin (Dithiaden), levocetirizin (Xyzal), loratadin (Claritin)
 - B. antileukotrieny** — blokáda receptoru CysLT1 pro leukotrieny
 - například montelukast (Singulair®)
 - C. dekongestanty** — α_1 adrenergní agonisté — vazokonstriktory
 - například loratadin + pseudoefedrin (Clarinase®), xylometazolin (Olynth®, Otrivin®)
 - D. kromony, kromoglykany** — stabilizace membrán mastocytů (zabránění degranulace)
 - například kromoglykát sodný (Allergocrom®)
 - E. intranazální kortikosteroidy** — protizánětlivý účinek, blokáda histaminu atd.
 - například flutikason furoát (Avamys®), mometason furoát (Nasonex®)
 - F. kombinované intranazální přípravky** — antihistaminikum + kortikosteroid
 - například flutikason furoát + azeoastin (Dymistin®)

7 — Asthma bronchiale alergické

Astma bronchiale alergické — dělení, klinické projevy, léčba

- **chronické zánětlivé záchvatovité onemocnění s bronchiální hyperreaktivitou a reverzibilní bronchokonstrikcí (bronchiální obstrukcí)**
- je to lokální projev systémového prozánětlivého stav — tj. součást systémového onemocnění
- epidemiologie:
 - prevalence 1-18% (hlavně vyspělé země)
 - v dospělé populaci incidence 1%, v ČR asi 30% (tj. 30 000 nových případů ročně)
 - nejčastější chronické onemocnění dětí, v ČR 12-15% dětí, dospělí 8%
 - mortalita asi 250 000 ročně, v ČR velmi nízká mortalita (dána kvalitou péče)
- klasifikace:
 - **dle stupně kontroly (GINA)** — kontrolované, částečně kontrolované, nekontrolované
 - sleduje 6 parametrů — denní příznaky, omezení denních aktivit (ADL), noční příznaky/buzení, potřeba úlevových léků, plicní funkce, exacerbace
 - **dle tíže:**
 - A. intermitentní** — RABA dle potřeby
 - B. lehké perzistující** — nízká dávka IKS, nízká intenzita terapie (teofylin, antileukotrieny)
 - C. středně těžké perzistující** — nízká až střední dávka IKS + LABA případně další léčba
 - D. těžké perzistující** — vysoká dávka IKS + LABA a další extra léčba
- genetika:
 - podíl mají dědičné faktory a vlivy zevního prostředí:
 - A. dědičné faktory** — polygenní multifaktoriální dědičnost, více než 150 genů v různých lokusech s vazbou na astma a další alergická onemocnění, atopie
 - B. vlivy zevního prostředí** — životní prostředí (znečištění), stav výživy, hygienický standard, infekční inzulty, pracovní prostředí
- patofyziologie:
 - **chronické zánětlivé onemocnění** — specifické poměry zastoupení populací buněčné imunity — **převaha podtypu Th2** → zmnožení eozinofilů, bazofilů, nadměrná aktivace mastocytů (existuje i Th1, ale na tu neexistuje účinná léčba)
 - **cytokinová bouře** (IL-4, PGE2, LTR, PAF...)
 - **rozvoj bronchiální hyperreakivity** — důsledek chronického zánětu, genetická determinace — chromozom 5q, ADAM23 chromozom 20q, polymorfismus genů pro β 2-receptor ADRB2
 - **rozvoj reverzibilní obstrukce dýchacích cest** — akutní bronchokonstrikce, edém stěny průdušek, tvorba hlenových zátek, přestavba stěny vlivem zánětu (tj. už ireverzibilní fáze)
 - spouštěcí faktory:
 - zánět — alergenů zevního prostředí, vlivy pracovního a životního prostředí, respirační infekce (nejvíce viry — rinoviry, koronaviry)
 - bronchokonstrikce (fyzikální i chemické) — změny teploty (hlavně z tepla do zimy), fyzická aktivita, studený vítr, emoce a stres, silné oděry (fenoly apod.)
 - další — kouření, znečištění vzduchu, GER, léky (NSA, ASA), stravování ve fastfoodu
 - **projevy** — **dušnost**, bolest na hrudi, pískoty, kašel (většinou v noci), zhoršení kvality spánku, únava, bolest na hrudi, pískoty, nekvalitní spánek
 - **exacerbace astmatu** — postupně se zhoršující dušnost, zkrácený dech, kašel, pískoty nebo pocit tíže na hrudi (často spojován s pocitem dechové tísně)

Diagnostika

- **anamnéza** — RA: 0-1, OA: kdy se poprvé objevily, kdy se objevují (práce, stres...) a v jakém prostředí (lakovny, pekaři...)
 - typické je, že příznaky se rozvíjejí v rámci fyzické aktivity (během i po ní)
 - většinou příznaky nastupují většinou v noci, dáno biologickou aktivitou kortikoidů
- **funkční vyšetření:**
 - **spirometrie s průkazem bronchiální obstrukce** ($FEV_1/VC < 75\%$, $FEV_1 < 80\%$)
 - **bronchodilatační test** — stanovení reverzibility obstrukce
 - salbutamol 0,4 mg x ipratropium 0,08 mg
 - pozitivní výsledek — po 30 min od apl. změna $FEV_1 > 12\%$ a zároveň o 200 ml v absolutní hodnotě
 - navazuje na něj bronchokonstrikční test
 - **bronchokonstrikční test** — stanovení bronchiální hyperreaktivity
 - nespecifické — metacholin (celková kumulativní dávka 8 mg)
 - specifické — známý alergen
 - pozitivní výsledek — $\downarrow FEV_1$ o 20% a více oproti výchozí hodnotě
 - **FENO** — stanovení NO ve vydechovaném vzduchu pro dg. eozinofilního zánětu
 - doplňkové metody — KO + diferenciál lymfocytů ($\uparrow$ eozinofily, $\uparrow$ bazofily), imunoglobulinový profil, alergologické testy, stanovení eozinofilního kationického proteinu v indukovaném sputu nebo v séru
 - odlišení od CHOPN, pneumotoraxu, ORL příčin, embolie...

Terapie

- **nefarmakologická:**
 - režimová opatření s omezením expozice vyvolávajícím činitelům
- **farmakologická:**
 - úlevová — SABA (salbutamol, fenoterol), SAMA (ipratropium), methylxantiny (teofylin)
 - kontrolující — inhalační kortikosteroidy, LABA, LAMA, antileukotrieny, methylxantiny, systémové kortikoidy, biologická léčba
- **terapie exacerbace:**
 - odstranit spouštěč
 - oxygenoterapie (O_2 průtokem 4-6 l/min)
 - parenterální terapie — i.v. hydrokortizon (200 mg) , teofylin (40 mg)
 - inhalační terapie (salbutamol, Berodual, ipratropium)
 - laboratoř (ABR, KO, kultivace stěru a sputa, sérologie)
 - podpůrná terapie — mukolytika, krystaloidy...

Dig. dg.

- CHOPN, pneumothorax, plicní embolie
- příčiny dušnosti a kašle z ORL příčin
- onemocnění průdušnice jiné onemocnění průdušek a plic
- vaskulitidy

8 — Anafylaktická reakce

Anafylaktická reakce, příčiny, projevy, léčba

- **atopie** — genetická predispozice k tvorbě antigen specifických IgE protilátek
- **alergie** (fenotypový projev atopie) — nepřiměřeně vystupňovaná reakce imunitního systému na antigeny běžně přítomné v okolním prostředí
- **anafylaktická reakce** — akutní náhle vzniklý, potenciálně smrtelný multisystémový syndrom vycházející z náhlého vyplavení mediátorů a chemokinů žírných buněk a bazofilů na podkladě vystupňované imunopatologické reakce
- **anafylaktoidní reakce** — reakce klinicky shodná s anafylaktickou, ale bez průkazu imunopatologického podkladu
- **epidemiologie:**
 - přesné údaje nejsou známy (problém přesné diagnostiky, určení mechanismu reakce...)
 - v ČR každoročně hospitalizace asi 2000 lidí pro závažnou alergickou reakci — kolem 5 úmrtí v důsledku anafylaktického šoku za rok
- **patofyziologie:**
 - imunologicky podmíněná anafylaktická reakce **může vznikat na podkladě imunopatologické reakce I., II. a III. typu.** (nejčastěji jde o reakci časnou — IgE)
 - preformované mediátory:
 - histamin
 - tryptáza, chymáza
 - další cytokiny
 - de-novo syntetizované mediátory:
 - leukotrieny
 - prostaglandiny
 - PAF A2
- **klinické příznaky:**
 - vysoká variabilita v závislosti na typu a potenci alergenu, na cestě vstupu do organismu, na stupni senzibilizace, na postiženém systému
- **a) lokální projevy**
 - kožní — pruritus, erytém, exantém, urtika, edém
 - dýchací cesty — rýma, chrapot, kašel, dušnost, astmatický záchvat
 - GIT — nauzea, bolesti břicha, vomitus, průjem
 - KV — bledost, tachykardie, hypotenze, centralizace oběhu
 - urogenitální — děložní spasmy, renální kolika, spasmy močového měchýře
 - neurologicko-psychologické — anxieta, neklid, cefalea, poruchy vědomí
- **b) systémové projevy**
 - vystupňování lokálních projevů vedoucí až k šokovému stavu a selhání kardiálního a respiračního

Diagnostika

- **klinický obraz + anamnéza**
- **klinická kritéria anafylaxe dle EAACI:**
 1. akutní nástup kožních a slizničních příznaků + nejméně 1
 - porucha dýchání (dyspnoe, vrzoty, stridor, známky hypoxémie)
 - pokles TK nebo známky selhání orgánového systému (hypotonie, synkopa, inkontinence)
 2. 2 a více následujících znaků nastupujících akutně po expozici suspektnímu alergenů
 - postižení kožního krytu a sliznic (flush, edémy...)
 - porucha dýchání
 - pokles TK nebo známky selhání orgánového systému
 - dlouhotrvající symptomy GIT (zvracení, křeče, průjem, ...)
 3. pokles krevního tlaku u pacienta vystaveného již známému alergenů
 - děti — pokles TK o 30%, hypotenze dle věkových kritérií
 - dospělí — pokles TK o 30%, systolický TK pod 90 mmHg
- **ex-post došetření podezřelé imunopatologické reakce:**
 - hladina sérové tryptázy
 - pokusně hladina metabolitů histaminu ve 24 hodinovém sběru moči, sérové hladiny histaminu
 - prokázání alergen-specifických IgE protilátek
 - skin PRICK test
 - provokační test

Terapie (ABCD)

1. adrenalin

- neexistuje žádná absolutní kontraindikace podání — benefit překračuje rizika
- MÚ — neselektivní sympatomimetikum
 - α receptory — navození vazokonstrikce (úprava hypotenze, snížení tvorby otoků)
 - β_1 receptory — pozitivně inotropní a dromotropní účinek (úprava hypotenze)
 - β_2 receptory — potlačení brochokonstrikce a vyplavování dalších zánětlivých mediátorů
- podání — i.m. (při monitorovaném lůžku i i.v.)
 - dospělí — 0,3–0,5 mg, DMS 0,5 mg
 - děti — 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti, DMS 0,3 mg
- interval do případné další dávky 5 min
- autoinjektory — pro děti do 25 kg dávka 0,15 mg; pro dospělé dávka 0,3 mg

2. antihistaminika — i.v. bisulepin (Dithiaden®); p.o. například levocetirizin (Xyzal®)

3. kortikosteroidy — i.v. hydrokortison 200 mg, metylprednison 40 mg v jednotné dávce

4. oxygenoterapie (6-8 l/min)

5. bronchodilatancia — inhalačně salbutamol (Ventolin®), případně kombinace s parasymptolytiky (salbutamol + ipratropium = Berodual®)

9 — Lékové alergie

Léková alergie — projevy, léčba

Nežádoucí lékové reakce

- WHO: každý škodlivý, nezamýšlený a nechtěný následek podání léku v dávkách užívaných v rámci preventivních, diagnostických a léčebných úkonů
- klasifikace ABCDE:
 - A. Augmented
 - B. Bizarre
 - C. Chronic
 - D. Delayed
 - E. End of use
- **léková hypersenzitivní reakce patří do skupiny B** (bizarre, unpredictable, neočekávatelné)
 - **léková intolerance** — nezamýšlený následek bez nálezu podmiňující abnormality metabolismu, exkrece a biologické dostupnosti léku při normální podané dávce
 - **idiosynkrazie** — abnormální a nezamýšlená reakce zapříčiněná změnami metabolismu, exkrece nebo biologické dostupnosti léčiva. Často geneticky podmíněná.
 - **léková alergie** — abnormální a nezamýšlená reakce prokazatelně zapříčiněná imunopatologickými mechanismy
 - **pseudoalergická reakce** (anafylaktoidní reakce) — způsobena přímým vyplavením mediátorů mastocytů a bazofilů bez spoluúčasti imunopatologických pochodů
- definice dle EAACI:
 - **léková hypersenzitivní reakce** — nežádoucí reakce vznikající v návaznosti na podání léku připomínající alergickou reakci
 - **léková alergie** — je takovou reakcí z přecitlivělosti, u níž byl prokázán imunopatologický mechanismus (specifické IgE, specifické T-lymfocyty)
 - dokud není potvrzen imunopatologický podklad obtíží, je preferovaným termínem poléková hypersenzitivní reakce
- nejčastější léky vyvolávající alergické reakce:
 - ATB, NSA, lokální anestetika, celková anestetika, myorelaxancia, opiáty
 - častěji se vyskytují u mladých jedinců a osob středního věku, dle pohlaví jsou častěji postiženy ženy; byly pozorovány i genetické faktory a rodinné predispozice
- klasifikace:
 - **klinická klasifikace:**
 1. **časná** — rozvoj 1-6 h po posledním podání léku, vznik na podkladě IgE mediované imunopatologické reakce v návaznosti na předchozí senzibilizaci daným léčivem
 - projevy — urtika, edémy, rhinitis, bronchospasmus, nauzea, zvracení, anafylaxe
 2. **pozdní** — rozvoj kdykoliv od první hodiny po podání iniciační dávky léku, vznik na podkladě aktivace T-lymfocytů
 - projevy — urtika, makulopapulární erupce, vaskulitidy, toxická epidermiolýza, Stevens-Johnsonův syndrom, DRESS, postižení vnitřních orgánů vedoucí až k jejich selhání
 - **patofyziologická klasifikace:**
 - a) **alergická**
 - b) **nealergická**

Klinické příznaky

- **lokální projevy** — kožní (pruritus, erytém, exantém, urtika, edém), respirační (rýma, kašel, dušnost, astmatický záchvat), GIT (nauzea, vomitus, průjem), KV (tachykardie, hypotenze, centralizace oběhu), urogenitální (děložní spasmy, renální kolika, spasmy močového měchýře), neurologicko-psychické (anxieta, neklid, cefalea, poruchy vědomí)
- **systémové projevy** — vystupňování lokálních projevů vedoucí až k šokovému stavu a selhání kardiálního a respiračního
 - **Stevens-Johnsonův syndrom** — těžká forma polékového exantému, postihující sliznice a kůži (například po ATB), kožní léze do 30% kožního povrchu
 - **Lyellův syndrom** (toxická epidermální nekrolýza) — nejtěžší forma polékového exantému, postihuje až 100% kožního povrchu, **Nikolského znamení** pozit. (tlak prstu vede k tvorbě puchýře), život ohrožující
 - **DRESS** (Drug Rash with Eosinophilia and Systemic Symptoms) — těžká reakce, může napadnout jakékoliv orgány a způsobit jejich neinfekční zánět, orgány mohou někdy i selhat, což následně vede ke smrti postiženého

Diagnostika

- **anamnéza**
 - symptomatologie, časový průběh příznaků
 - ostatní užívaná medikace — jak souběžná medikace v době reakce, tak i ostatní léky stejné skupiny užívané od té doby
 - anamnéza předchozích zdravotních potíží — včetně předchozí alergie nebo onemocnění jako chronická kopřivka či chronická rinosinusitida, které mohou být zhoršovány užíváním některých léků (například ASA a COX-2 neselektivní nesteroidní antirevmatika)
- **kožní testy** — β-laktamová ATB, lokální anestetika a periferní myorelaxancia, hepariny
 - pro častné reakce — PRICK testy; při jejich negativitě intradermální podání
 - pro pozdní reakce — epikutánní testy, intradermální testy s pozdním odečtem
- **provokační testy lékem (PTL)** — zlatý standard pro určení léku vyvolávajícího alergickou reakci (potvrzení či vyloučení reakce; určení tolerance zástupného léku)
 - nutný zejména u NSA a lokálních anestetik, u β-laktamů jen po negat. kožním testu
 - PTL kontraindikováno u nekontrolovatelných a/nebo těžkých život ohrožujících polékových reakcí (například SJS, TEN, DRESS, vaskulitidy, AGEP), těhotenství
- **biologické testy**
 - lékově specifické IgE — dostupné pro β-laktamová ATB (často neprůkazné)
 - tryptáza a histamin — v případě anafylaxe potvrzení aktivace bazofilů a mastocytů bez příčiny degranulace
 - alergické reakce II. a III. typu — hemolytické in vitro testy, Coombsovy testy
 - genetické znaky — známy HLA asociované reakce (například abacavir a HLA B5701)

Terapie

1. **přerušení podávání léku a řešení anafylaktické reakce**
2. **individuální preventivní opatření** — pravidelně aktualizovaný seznam rizikových léků spolu s použitelnými alternativami; poučení o farmakologické profylaxi případné reakce
3. **desenzitizace léky** — navození dočasného stavu klinické neodpovědnosti k látce v případě, že dotyčný lék je nezbytný v terapii a nemá alternativu (například sulfonamidy u HIV+, fluorochinolony u cystické fibrózy, taxany u onkologických onemocnění)

10 — Potravinová alergie

Potravinová alergie — projevy, léčba

- nežádoucí reakce způsobená konzumací potravin, u které byla prokázána imunopatologická reakce (IgE či non-IgE mediovaná reakce)
 1. **IgE mediovaná**
 - orální alergický syndrom (pollen-food allergy syndrom)
 - urtika či angioedém + rhinoconjunctivitida či asthma bronchiale
 - anafylaxe či „food dependent, exercise induced anaphylaxis“
 2. **IgE + buněčná složka**
 - atopická dermatitida
 - eozinofilní onemocnění GIT
 3. **buněčná složka**
 - „food protein-induced proctitis“
 - „food protein-induced enterocolitis syndrome“
- potravinová alergie je nejčastější důvod anafylaktické reakce dospělých
- **epidemiologie:**
 - postihuje 2-5% dospělých a až 8% dětí
 - rozvoj možný v každém věku, nejčastěji však právě v dětství; rozvoj potravinové alergie v dospělosti je spojován s vyšším rizikem závažné reakce
 - predisponující faktory:
 - známá pylová alergie a s ní spojené klinické jednotky
 - vlivy vnějšího prostředí (latex, rozpouštědla...)
 - opakovaná expozice klíšťatům či jedu medúz
 - náhlé změny dietního režimu

Nejčastější potravinové alergie

- většina alergenů jsou proteiny, vzácně glykopeptidy (α -gal)
 - **dospělí — mořské plody a ryby, burské ořechy**
 - mořské plody a ryby — nejčastější potravinová alergie v dospělé populaci
 - senzitivizace ve většině případů buď na ryby, nebo na mořské plody
 - například pacient s alergií na krevety může bez větších obav konzumovat ryby
 - skořápkové plody a burské ořechy — problematika zejména v Severní Americe
 - rozvoj již v dětském věku, většinou perzistuje po celý život
 - reakce nevyzpytatelné síly — velmi často vede až k anafylaktickému šoku
 - **děti — mléko, vejce, pšeničná mouka**
- potravinová aditiva, konzervanty, pesticidy apod. nejsou téměř nikdy podkladem alergické reakce
 - výjimkou je zkřížená reaktivita — například pektin (jablka), želatina (červené maso), karmínová červeň (korýši)

Orální alergický syndrom (pollen-food allergy syndrome)

- kontaktní forma potravinové alergie **vázaná na zkříženou reaktivitu** složek potravy a pylů; IgE mediovaná
 - přítomnost termolabilních proteinů (profilinů), které jsou strukturálně podobné proteinům rizikových pylů — tzv. **zkřížená reaktivita**
- nejčastější forma potravinové alergie u dospělých (5% populace)
- projevy — svědění a pálení úst, lehký otok rtů, rýma, kašel nastupující v řádu minut po konzumaci rizikové potravy
- nejčastější příklady zkřížené reaktivity:
 - alergie na pyl břízy → syrová jablka, hrušky, třešně, mrkev, celer, syrové brambory
 - alergie na pyl ambrózie → meloun, banány
 - alergie na pyl pelyňku → syrový celer

Speciální typy potravinové alergie

- a) na potravinách závislá; fyzickou námahou indukovaná anafylaxe
- b) alergie na potraviny u pracovníků v potravinářství (mlýny, ovocnářství, moštárny)
- c) potravinová alergie vázaná na latex → avokádo, banány, kiwi, jedlé kaštiny, rajčata
- d) pozdní alergická reakce na červené maso — senzibilizace na glykopeptid α -gal vázaná na kousnutí klíštětem

Diagnostika

- **anamnéza** — časová spojitost, typ příznaků, další již známé alergie, konkomitanti medikace, okolnosti vzniku (stres, infekce, fyzická aktivita, geografie...)
- **PRICK test** — problém dostupnosti purifikovaných alergenů, falešná pozitivita u malých dětí
- **specifické IgE v séru** — možnost nálezu zkřížené reaktivity s pyly, rekombinantní podjednotkové studie, panalergeny
- **diagnostická eliminační dieta** — trvání 2-4 týdny pro IgE mediovanou, další typy 6 týdnů
- **expoziční test** — mnohdy jediná možnost přesného potvrzení rizikové potravy (nese největší riziko život ohrožující reakce)

Terapie

- **akutní reakce** — stejná terapie jako u anafylaktického šoku
 - tj. adrenalin, antihistaminika, kortikosteroidy, oxygenotrapie, bronchodilatancia
- **eliminační dieta** — odstranění hlavního alergenu při zachování vyváženého dietního režimu
 - nutnost respektovat individuální nutriční potřeby (věk, stravovací zvyklosti...)
 - často nutné průběžné úpravy jídelníčku (zejména u dětí)
 - významná role okolí pacienta (edukace rodiny, znalost potravinářských označení)
 - specifika substituce mléka u kojenců
- **záchraný balíček** — adrenalinový autoinjektor + kortikosteroid tbl. + antihistaminikum
- **profylaktická farmakologická terapie** — dle EBM bez valného významu, problematika opožděného rozvoje reakce, krytí hlavního vyvolavatele
- **specifická alergenová imunoterapie (SAIT)** — viz otázku 3.21
- **anti-IgE terapie** — výzkumné účely, avšak s velmi dobrými výsledky

11 – Potravinové intolerance

Potravinové intolerance (histaminová, laktózová), projevy, léčba

- **nežádoucí reakce po potravinách nealergického původu**
 - obtíže způsobené poruchou trávení nebo metabolismu dané potravin
 - různorodá symptomatika mnohdy imitující projevy potravinové alergie (od gastroezofageálního refluxu, GIT infekcí, nedostatku či chybění specifických trávicích enzymů až po anatomicko-neurologické anomálie)
- **závislost na množství požití potravin**
 - při každé konzumaci problémové potravin stejné projevy
- nejčastější potravinové intolerance v klinické praxi:
 1. deficit střevní laktázy (vrozený či postinfekční)
 2. malabsorpce fruktózy
 3. deficit alkoholdehydrogenázy
 4. přímá histaminoliberace (potravin s vysokou koncentrací histaminu)

Deficit střevní laktázy

- laktáza — enzymy kartáčového lemu enterocytů štěpící laktózu (mléčný cukr)
- **příčina selektivní malabsorpce**
- při deficitu laktázy není laktóza štěpena v tenkém střevě a dostává se do tlustého střeva, kde ji štěpí mikrobiální laktázy → vzniklé monosacharidy se stávají substrátem pro další mikrobiální enzymy → tvorba množství krátkých MK → ty jsou vysoce osmoticky aktivní a vyvolávají průjem

A. vrozený deficit laktázy

- projeví se nesnášenlivostí mléka, obtíže začínají od okamžiku, kdy je dítěti podáno mléko
- projevy — průjmy, dehydratace a neprospívání

B. získaný deficit laktázy

- po 6. roce života, dochází k ní geneticky podmíněným postupným snížením její exprese
- dg. — stanovení disacharidáz imunohistochemickými metodami v bioptickém vzorku získaného endoskopicky
- terapie — dietní opatření (bezlaktózová dieta), příp. substituce enzymu laktázy před konzumací mléčných pokrmů

Histaminová intolerance

- vzniká v důsledku nerovnováhy metabolismu histaminu v těle a jeho následném hromadění
 - může být i důsledkem extrémně vysokého příjmu v potravě či poškozeného systému odbourávání histaminu
- mimo potraviny mohou jako zdroje symptomů z nadbytku histaminu působit také léky, stres, fyzická aktivita či toxiny
- patofyziologie:
 - hlavní příčina bývá **nedostatečná degradace histaminu v důsledku snížené hladiny či aktivity enzymu diaminoxidasa (DAO)** — enzym odbourávající histamin, je produkován v buňkách GIT
 - genetické faktory
 - farmakologické faktory (inhibiční účinek na DAO)
 - zánětlivá střevní onemocnění (ulcerózní kolitida, MC)
 - poškození střevní stěny u jiných onemocnění (nekompenzovaná celiakie, jiné intolerance)
 - poruchy střevní bakteriální flóry
 - **snížená produkce enzymu DAO může být přechodná**, mění se v čase, takže pacient střídá dny (týdny, měsíce, roky) dobré tolerance s obdobím zhoršení
- klinické projevy:
 - abdominální dyskomfort (bolesti břicha až křeče, nadýmání, průjmy)
 - bolesti hlavy (až migrenózního charakteru), závratě, nauzea, zvracení
 - kožní nálezy (vyrážky, kopřivky, zčervenání pokožky, zhoršení ekzému apod.)
 - potíže s dýcháním až dušnosti astmatického typu, otoky nosní sliznice
 - mohou se objevit změny chování, úzkostné i fobické stavy, poruchy spánku, snížení chuti k jídlu, zimomřivost a u žen poruchy menstruace
- terapie:
 1. **omezení histaminu ve stravě (nízkohistaminová dieta)**
 2. **terapie základního onemocnění** — v případě, kdy vzniká na základě jiného onemocnění postihujícího střevo
 3. **substituce DAO**

12 — Alergie na jed blanokřídlého hmyzu

Alergie na jed blanokřídlého hmyzu, projevy, léčba

Řád **Blanokřídlí** (*Hymenoptera*)

1. čeleď **Včelovití** (*Apidae*)
2. čeleď **Sršňovití** (*Vespidae*)
3. čeleď **Mravencovití** (*Formicidae*)

Chemické složení jedu blanokřídlého hmyzu

- každý zástupce má specifické chemické složení svého jedu
- v některých složkách se mezi sebou mohou křížit, ale mají i typické složky, které jsou důležité z hlediska diagnostiky (v laboratorní diagnostice odlišení díky specifickým IgE protilátkám)



Diagnostika

- **anamnéza**
 - zda-li ho už nějaký hmyz pobodal
 - pokud ano — jestli byla nějaká reakce
 - pokud ne — atypické, protože nemohla proběhnout senzitivizace
 - RA: 0-1
 - SA: koníčky (včelaři)
- **kožní PRICK test** — s redukovanou dávkou alergenu
- **specifické IgE protilátky a rekombinantní IgE protilátky**
 - můžeme rozlišit jednotlivé složky jedu, na které je daný pacient alergický
 - můžeme kvantifikovat cirkulující IgE

Klinické projevy

- **normální reakce po pobodání**
 - rozvoj v místě pobodání v řádu vteřin až minut
 - bolestivé ložisko do 2 cm v průměru
 - místo bodnutí je zarudlé, kolem je bílý pupen
 - vymizí nejpozději do 2. dne po bodnutí
- **rozsáhlá lokální reakce**
 - svědivé a bolestivé ložisko se zarudnutím, horkostí a otokem
 - větší než 10 cm v průměru
 - vymizí nejdříve za 24 hodin
 - nepředznamenává zvýšené riziko rozvoje anafylaktické reakce — pouze 5-10% případů se rozvine do obrazu systémové reakce
 - většinou mizí až po poskytnutí léčby
 - terapie — p.o. antihistaminikum 2. a vyšší generace + p.o. glukokortikoid
 - běžný záchranný balíček — prednison 20 mg 2 tbl. + levocetirizin 5 mg 2 tbl.
- **systémová reakce**
 - rozvoj u cca 3% celkové populace
 - spojena s dalšími projevy mimo místo vpichu — projevy rýmy, pálení v krku, kašel, celotělový exantém, erytém, kopřivka, otoky, dušnost, nauzea

Stupeň závažnosti reakce dle postižených struktur		Klinické příznaky
1. stupeň (lehký)	kůže a podkoží	generalizovaný edém, urtika
2. stupeň (střední)	dýchací, kardiovaskulární systém, GIT	dušnost, stridor, expirační pískoty, nauzea, zvracení, bolesti břicha, prekolapsové stavy, pocit tíže na hrudi
3. stupeň (těžký)	hypoxie, hypotenze, změny kvality vědomí	cyanóza nebo $SpO_2 < 92\%$, hypotenze ($STK < 90$), kolaps, bezvědomí, uvolnění svěračů

Terapie

- **střední až závažná reakce — jako u anafylaxe**
 - adrenalin, antihistaminika, kortikosteroidy, oxygenoterapie, bronchodilatancia
- **kauzální léčba — specifická alergenová imunoterapie (SAIT)**
 - kauzální léčba alergie na jed blanokřídlých
 - podstatou alergenové imunoterapie je podávání zvyšujících se dávek přesně definovaného alergenu, kdy dochází k postupnému rozvoji dlouhodobé imunologické tolerance
 - vysoká efektivita — 95% léčených po dosažení udržovací dávky efektivně chráněno při dalším pobodání

13 – Immunodeficientní stavy

Imunodeficientní stavy – rozdělení, diferenciální diagnostika.

Imunodeficience

- a) **fyziologická** — objevuje se koncem 6. měsíce života; přestávají působit ochranné faktory od matky a dítě ještě nemá plně vyvinut vlastní imunitní systém
- b) **patologická** — přetrvávající porucha jedné nebo více složek imunitního systému podmíněná geneticky nebo získaná v průběhu života, která vede ke snížení obranyschopnosti organismu

Základní rozdělení

I. Primární (vrozené) imunodeficience (PID)

- poruchy genů kódujících proteiny důležité pro funkci imunitního systému
- klinické příznaky:
 - časté a opakované infekce, chronické průjmy
 - opakovaně komplikovaný průběh infekčních onemocnění, která relativně špatně odpovídají na standardní terapii
 - 2 nebo více infekcí (meningitida, osteomyelitida, sepse) během roku
 - infekce atypickými mykobakteriemi
 - u novorozenců — rozsáhlý erytém, zejména na dlaních a na chodidlech
 - neprosívání dětí (jsou menšího vzrůstu než jejich zdraví vrstevníci)
 - pozitivní rodinná anamnéza

II. Sekundární (získané) imunodeficience (SID)

- onemocnění, iatrogenní původ či jiné vnější faktory
- příčiny:
 - závažná poranění (popáleniny, polytraumata, stavy po rozsáhlých operacích)
 - virové infekce, chronické infekce
 - podvýživa (choroby GIT, nevhodné diety, alkoholismus, cirhóza)
 - faktory zevního prostředí (expozice chemickým škodlivinám, ionizující záření)
 - chronické stresové situace
 - stp. splenektomii
 - imunosupresivní působení léků (cytostatika, kortikoidy), léčba zářením
 - infekce HIV
- primární i sekundární deficity lze dále rozdělit podle složky imunitního systému:
 - 1. **poruchy nespecifické imunity**
 - a) **poruchy fagocytózy**
 - b) **poruchy komplementu**
 - 2. **poruchy specifické imunity**
 - a) **buněčné imunodeficity**
 - b) **protilátkové imunodeficity**
 - c) **kombinované imunodeficity**

Diferenciální diagnostika

A. Imunoglobuliny

1. hladiny imunoglobulinů (nefelometrie, turbidimetrie)
2. vyšetření specifických protilátek
 - interpretace:
 - **Brutonova agamaglobulinemie** — žádné, nebo nízké koncentrace všech typů
 - **deficit IgA** — selektivně sníženo IgA
 - **hyper IgM** — normální nebo zvýšené IgM, ostatní izotypy jsou velmi nízké
 - **přítomnost monoklonální protilátky** — lymfoproliferativní onemocnění
 - **zvýšené IgE** — Omennův syndrom (varianta SCID), Wiskott-Aldrich syndrom

B. Komplement

1. měření C3, C4
2. hemolytická aktivita komplementu CH50

C. Lymfocyty

1. KO — přehled o počtech lymfocytů
2. měření subpopulací lymfocytů (průtoková cytometrie)
 - B-lymfocyty (znaky CD19, CD20)
 - T-lymfocyty (znaky CD3, CD4/CD8)
 - NK buňky (znaky CD16, CD56)
3. sledování funkcí T lymfocytů (test blastické transformace)
 - interpretace:
 - B+ T- nebo B- T+ — SCID
 - chybění B lymfocytů — Brutonova agamaglobulinemie
 - snížení B lymfocytů — CVID (běžná variabilní imunodeficience)
 - snížení CD4 s charakteristickou dynamikou — AIDS
 - extrémně nízká či nulová odpověď v testu blastické transformace — SCID, kombinované imunodeficity

D. Fagocyty

1. počty granulocytů a monocytů (KO)
2. funkce fagocytů (NBT, burst test)
3. vyšetření adhezivních molekul ze skupiny integrinů (CD11/CD18) nebo selektinů (CD15)

E. Genetické vyšetření

- při podezření na primární imunodeficienci, která je způsobena na genové úrovni
- toto vyšetření musí být velmi přesně definováno a vymezeno na úrovni kombinace klinických příznaků a výsledků dostupných imunologických vyšetření

F. Další vyšetření

1. zobrazovací metody
2. biochemie
3. mikrobiologie
4. hematologie

14 – SCID

Syndrom těžké kombinované imunodeficiency (SCID) – příčiny, klinické projevy.

- zpravidla se jedná o kombinaci humorálního a buněčného defektu imunity
- představují **velmi závažnou skupinu vrozených imunodeficiencí, u kterých dochází ke ztrátě T-lymfocytů**
 - již u novorozenců způsobují těžké, často smrtící, virové, bakteriální, mykotické a protozoální infekce
 - očkování živými vakcínami může způsobit vážné onemocnění
 - bez léčby tyto děti umírají většinou do 1 roku
- u mírnějších forem SCID se během života vyskytují častěji různé AIO (až u 20% případů) a malignity (zejména různé lymfomy a karcinom žaludku)
- morfologický nález u SCID je variabilní — u případů s mutací řetězce γ a ADA dochází k atrofii thymu s chyběním lymfocytů, u ostatních případů jsou změny v zastoupení různých lymfocytárních subtypů

Rozdělení

1. **SCID T– B– NK–** — absence B-lymfocytů, T-lymfocytů i NK buněk
 - **SCID způsobena deficitem adenosindeaminázy (ADA)**
 - AR dědičnost
 - vede k hromadění toxických produktů metabolismu purinů v lymfoidních buňkách
 - výsledkem je **těžká lymfopenie** (postihující buňky T, B i NK řady) a různé kostní abnormity
2. **SCID T– B– NK+** — absence B-lymfocytů i T-lymfocytů
 - **SCID na podkladě retiklární dysgeneze**
 - AR dědičnost, velmi vzácné onemocnění
 - molekulová podstata je heterogenní — deficit rekombinázy RAG2 (enzym zodpovědný za přeskupování genů při vzniku TcR a BcR), porucha exprese receptoru pro IL-7
 - postihuje už kmenovou buňku → **blok vývoje myeloidních buněk i lymfocytů**
3. **SCID T– B+ NK–** — absence T-lymfocytů i NK buněk
 - **SCID X-vázaná**
 - defekt genu pro γ -řetězec receptoru pro IL-2 (ale také pro IL-4, -7, -9, -11, -15), který se nachází na chromosomu X
 - výsledkem této mutace je, že nezralé formy lymfoidních buněk nemohou být uvedenými cytokiny aktivovány, takže nedochází k jejich diferenciaci na funkční formy T-lymfocytů
 - nastává výrazný pokles množství T-lymfocytů a snížení syntézy protilátek řadou B-lymfocytů, protože chybějí aktivační signály řady T
 - dále defekty různých genů odpovědných za funkčnost a vývoj T-lymfocytů (například Janus 3-kinázy), které jsou zděděné AR
 - **Omennův syndrom** — těžká funkční porucha T-lymfocytů, doprovázena výrazným snížením IgG, IgA, IgM a elevací IgE
 - AR dědičnost, prognóza fatální
 - kůže a střevní sliznice je infiltrována aktivovanými T-lymfocyty produkujícími IL-4 a IL-5, které způsobují eozinofilii
 - na kůži erythrodermie a alopecie, postižení střeva má za následek těžké průjemy

15 – Vrozené imunodeficiency

Vrozené imunodeficiency – rozdělení, příčiny, klinické projevy.

1. Humorální (protilátkové) imunodeficiency

- poruchy charakterizované nedostatečnou nebo nadbytečnou tvorbou protilátek (imunoglobulinů)
- pacienti s těmito defekty humorální imunity trpí zejména infekcemi způsobenými bakteriemi (streptokoky, stafylokoky, hemofily, atypické mykobakterie), vzácněji viry (enteroviry, herpetické viry)
- **Brutonova agamaglobulinémie**
 - defekt genu chromosomu X kódujícího tyrosinovou kinázu Btk (Bruton tyrosine kinase) účastní se signální dráhy proteinu BcR (receptor B lymfocytů), který řídí vyžívání B-lymfocytů — dochází k **zastavení normální diferenciaci B-lymfocytů na plazmocyty a nedochází k tvorbě funkčních protilátek** (tvoří se jen těžké řetězce imunoglobulinů, lehké řetězce se nevytvářejí)
 - počet periferních lymfocytů je snížen, plazmocyty chybějí
 - postihuje převážně jedince mužského pohlaví, avšak existují i vzácné formy postihující dívky
 - mezi morfologické příznaky patří:
 - atrofie tonzil a uzlin, ve kterých chybějí reakční centra
 - thymus je normální, stejně jako je normální počet prekurzorů B-lymfocytů v kostní dřeni
 - klinické projevy — opakované bronchitidy a bronchopneumonie, sinusitidy, otitidy a konjunktivitidy, popřípadě pyodermie
- **AR dědičná agamaglobulinémie**
 - vyvolaná mutacemi genů kódujících buď přímo protein BcR, nebo jiné komponenty důležité pro vyžívání B-lymfocytů, které se nacházejí na jiných chromosomech, než je chromosom X — klinické i laboratorní příznaky shodné s Brutonovou agamaglobulinémií
- **Selektivní deficit IgA (IGAD)**
 - u nás nejčastější imunodeficiency
 - velmi nízké (maximálně 0,05 g/l) nebo nulové hladiny sérového i sekrečního IgA
 - defekt leží na úrovni diferenciaci B-lymfocytů tvořících IgA — předpokládá se, že defekt leží na úrovni kmenových buněk
 - projevy:
 - IgA je odpovědný za slizniční imunitu, která může být částečně zprostředkována i sekrečním IgM — proto často bývá tento deficit bez klinických příznaků; u některých osob se však projevuje častými infekcemi horních dýchacích cest, zejména v dětství
 - často koincidence s inhalační alergií, častější než v běžné populaci je rovněž vyšší výskyt AIO a pravděpodobně i nádorů
- **Selektivní deficit podtříd imunoglobulinů G (IGGSD) a specifických protilátek (SAD)**
 - defekty podtříd IgG se vyskytují buď izolovaně, nebo společně s deficitem IgA
 - projevy — závažné recidivující infekce různých systémů
 - u deficitu specifických protilátek se nejčastěji jedná o poruchu tvorby protilátek proti polysacharidovým antigenům, přičemž celková hladina imunoglobulinů může být normální
 - pacienti jsou náchylní k infekcím mikroorganismy, které mají polysacharidová pouzdra
- **Hypogamaglobulinémie přechodná (THI)**
 - familiárně se vyskytující defekt, který se projevuje u kojenců opožděnou tvorbou imunoglobulinů; tento stav se obvykle spontánně upraví, příčina není známa

- **Hypogamaglobulinémie běžná variabilní (běžná variabilní imunodeficiency, CVID)**

- hypogamaglobulinémie z různých příčin vyskytující se bez predilekční vazby na některé pohlaví
- **společným znakem THI a CVID je pokles hladin všech 3 imunoglobulinů, někdy však jen pokles IgG** — diagnóza je založena na vyloučení všech ostatních známých příčin poklesu tvorby imunoglobulinů
- projevy:
 - recidivující infekce herpetickými viry, enteroviry (včetně meningoencefalitidy) nebo *Giardia lamblia* (průjmy)
 - zvýšená vnímavost k infekci *H. pylori*
 - zajímavým a v diferenciální diagnostice často užívaným znakem je, že u pacientů s CVID se prakticky nikdy nevyskytuje infekce *Pneumocystis carinii*
 - častý současný výskyt AIO (RA, perniciozní anémie, hemolytická anémie)
 - zvýšení rizika pro výskyt malignit lymfoidních buněk a karcinomu žaludku
- morfologické nálezy:
 - hyperplastické zárodečné folikuly v uzlinách, slezině a střevních Peyerových plátech
 - běžné je postižení střev — typická nodulární hyperplazie lymfatické střevní tkáně nebo symptomatologie připomínající chronické nespecifické střevní záněty
 - často výskyt granulomů v různých orgánech, které zpravidla ustupují po léčbě kortikoidy
- **Syndrom nadměrné produkce IgM (HIM)**
 - normální nebo zvýšená produkce IgM při současném deficitu tvorby IgG, IgA a IgE
 - nejčastěji je spojen s defektem ligandu receptoru CD40 (tzv. CD40L), jehož gen leží na chromosomu X
 - interakce mezi molekulami CD40 a CD40L je nezbytná pro správnou spolupráci lymfocytů B a T při tzv. izotypovém přepnutí (isotype switching) ze syntézy bazálního typu imunoglobulinů IgM na syntézu ostatních tříd imunoglobulinů
 - projevy:
 - recidivující pyogenní kožní infekce, náchylnost k infekcím *Pneumocystis carinii* apod.
 - různá AIO (autoimunitní neutropenie), která vyvolávají nekrotizující záněty sliznice úst a konečníku, nebo výskyt sklerozující cholangitidy a nádorů žlučových cest a jater

2. Buněčné a smíšené imunodeficiency

- tato skupina imunitních poruch se dělí na těžké smíšené defekty imunity, u kterých dochází k faktické ztrátě T-lymfocytů, a na smíšené defekty imunity, u nichž se projevují různé funkční poruchy T-lymfocytů
- **Těžké kombinované imunodeficiency (SCID)** — viz otázku 3.14
- **Smíšené defekty imunity (CID)**
 - heterogenní skupina poruch charakterizovaných normálním nebo mírně sníženým počtem lymfocytů T s defekty jejich funkční schopnosti.
 - klinické příznaky:
 - obdobné jako u SCID, avšak daleko mírnějšího charakteru a pozdějšího nástupu
 - časté jsou průjmy s příznaky ulcerózní kolitidy a různé alergie
 - přidružené autoimunitní reakce, týkají se především krevních buněk (hemolytická anémie, trombocytopenie, neutropenie), vzácněji jiných systémů (vaskulitidy, hepatitidy)

3. Hemofagocytární syndromy

- jejich společným znakem je dysregulace polyklonální aktivity a proliferace T-lymfocytů spojená s tvorbou vysokých hladin INF- γ
 - tento cytokin aktivuje makrofágy, které zvýšeně fagocytují krevní elementy v kostní dřeni, játrech i slezině, s následnou pancytopenií
- mezi diagnostické znaky patří vysoký podíl aktivovaných T-lymfocytů nesoucích znak DR (více než 40%)
- jde o závažné stavy, které často končí multiorgánovým selháním a smrtí
- **Chédiakův-Higashiho syndrom (CHS)**
 - mutace genu kódujícího protein LYST, který se účastní na formování lyzosomů, jež jsou defektní — dochází k poruše přenosu imunoregulační molekuly CTLA-4 z lyzosomů na membránu (tato molekula normálně brzdí neadekvátní aktivaci T-lymfocytů)
 - chybění této molekuly na buněčné membráně proto vede k nekontrolované aktivitě a proliferaci lymfocytů T s následnou aktivací makrofágů a hemofagocytózou
 - defektní složení granul neutrofilních granulocytů způsobuje neúčinnost fagocytárního mechanismu — je zvýšená vnímavost vůči určitým infekcím, především bakteriálním (hlavně *S. aureus*) a mykotickým
 - defektní granula melanocytů způsobují projevy **parciálního albinismu**
 - neléčené onemocnění končí letálně
- **X-vázaný lymfoproliferativní syndrom (Purtillov syndrom, XLP)**
 - geneticky determinované onemocnění postihující pouze chlapce, kteří jsou infikováni EBV
 - postižení jedinci jsou zdraví až do prvního kontaktu s EBV, který může vyústit do 3 stavů:
 1. těžká až fatální infekční mononukleóza, někdy s příznaky meningoencefalitidy
 2. lymfoproliferativní syndrom, postihující především B-linii (nejčastěji lymfom z B-buněk v břišní lokalizaci)
 3. hypogamaglobulinémie
 - v kostní dřeni je možné prokázat hemofagocytózu, pravidlem je postižení jater s projevy těžké hepatitidy
 - předpokládá se, že infekce EBV indukuje nekontrolovatelnou proliferaci B-lymfocytů v důsledku mutace T-lymfocyty regulujícího proteinu SAP, jehož gen se nachází na chromosomu X
- **Wiskottův-Aldrichův syndrom (imunodeficeience s trombocytopenií a ekzémem)**
 - recesivní onemocnění (incidence 4 na 1 milion živě narozených) vázané na mutaci genu nacházejícího se na chromosomu X a kódujícího multifunkční protein WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) — protein ovlivňuje složení a integritu cytoskeletu, stejně jako přenos intracelulárních signálů
 - klinické projevy:
 - imunodeficeience
 - infekční komplikace, jako jsou recidivující pneumonie a hnisavé otitidy
 - typický lokalizovaný nebo generalizovaný ekzém objevující se brzy po narození
 - trombocytopenie — ohrožuje pacienty závažnou krvácivostí (kožní petechie a krvavé průjmy)
 - asi u 40% nemocných se vyskytnou v průběhu života různá AIO (vaskulitidy, hemolytické anémie, neutropenie, střevní záněty) a zvyšuje se riziko vývoje malignit lymfatického aparátu

- **Di Georgeův syndrom**

- vývojová porucha 3. a 4. žaberní výchlípků, která vede k hypoplázii nebo aplázii thymu
- důsledkem je úplná nebo částečná ztráta imunity zprostředkovaná T-lymfocyty
- současně dochází k defektu vývoje příštítných tělísek a poruše metabolismu kalcia a fosfátů — snížení hladiny kalcia obvykle vyvolá tetanii
- projevy — náchylnost k infekcím zejména virového a mykotického původu
- morfologicky se dá prokázat i atrofie T-lymfocytární parakortikální oblasti v lymfatických uzlinách a další lymfoidní tkáni, rozsah B-lymfocytárních zón přitom zůstává nezměněn

4. Poruchy fagocytózy

- zejména poruchy počtu a funkce neutrofilních granulocytů, částečně makrofágů
- poruchy fagocytózy se projevují náchylností k různým infekcím způsobeným především stafylokoky, atypickými mykobakteriemi, enterobakteriemi a mykózami
- **Kostmannův syndrom**
 - těžká vrozená neutropenie
 - v kostní dřeni je porušeno vyžívání granulocytů ve stadiu promyelocytů a myelocytů
 - projevy — brzy po narození časté a závažné infekce; u poměrně vysokého procenta postižených se později vyvine AML
- **Cyklická neutropenie**
 - přechodné snižování počtu granulocytů v krvi v cyklech trvajících 19-21 dnů
 - těžká neutropenie trvá několik dnů a v tomto období se zvýšeně vyskytují infekční, převážně bakteriální onemocnění
 - v meziobdobí jsou počty granulocytů v dolním pásmu normálních hodnot
- **Chronická granulomatózní choroba (CGD)**
 - je spojena s defektem NADPH oxidázy ve fagocytech
 - počty neutrofilů jsou normální, neutrofily a monocyty však nejsou schopné zabít fagocytované bakterie, jsou defektní ve schopnosti vytvářet velké množství kyslíkových radikálů
 - podle typu defektu tohoto systému se jedná o onemocnění vázané na chromosom X (asi 60% případů) nebo o onemocnění AR dědičné (40%)
 - projevy:
 - od kojeneckého věku hnisavé infekce kůže, záněty plic a hnisavými lymfadenitidami.
 - tvorba četných granulomů v různých orgánech včetně střev, připomínající Crohnovu chorobu
 - pozitivní reakce na BCG vakcínu
- **Defekt adhezivních molekul (LAD)**
 - deficiencie leukocytárních integrinů (CD11/CD18); projevy:
 - porucha chemotaxe a adheze neutrofilů s příznaky snížené imunity
 - leukocytóza způsobena zmenšením nebo chyběním marginálního poolu granulocytů
 - neschopnost koncentrování granulocytů v místech infekce vysvětluje častý výskyt infekcí a jejich těžký průběh
 - ze zánětů vyvolaných infekcemi jmenujme gingivitidy, parodontitidy, sialoadenitidy, otitidy, sinusitidy a pneumonie

5. Poruchy komplementového systému

- relativně vzácná onemocnění, často bez výrazných klinických příznaků. Někteří jedinci s těmito poruchami mají zvýšenou náchylnost k pyogenním a neisseriovým infekcím
- **deficity časných složek komplementu (C1-C4)**
 - podílejí se na solubilizaci a opsonizaci imunokomplexů
 - projevy — rozvoj pyogenních infekcí a k příznakům obdobným jako u onemocnění způsobených imunokomplexy, zejména připomínají SLE
- **deficit složky C5**
 - extrémně vzácný, vede k meningokokovým a gonokokovým infekcím
- **deficity složek C6-C9**
 - jsou příznaky velmi diskrétní a pozoruje se rovněž náchylnost k infekcím neisseriemi
- **deficity alternativních složek komplementu se týkají faktorů B, H, I a properdinu**
 - jsou diagnostikovány u pacientů, kteří prodělali meningokokovou meningitidu nebo neisseriové infekce.
- **Hereditární angioedém**
 - AD dědičnost, úplné chybění nebo funkční porucha inhibitoru C1
 - po minimálních stimulech (drobná poranění, stomatologické a chirurgické výkony, menstruace, infekce) se aktivuje celá komplementová kaskáda
 - výsledkem jsou edémy podkoží a sliznic (laryngu, střev, močových cest) projevující se dechovými obtížemi, bolestmi břicha se zvracením a průjmy nebo retencí moči
- **Syndromy se zvýšenou lomivostí chromosomů**
 - podkladem je geneticky podmíněná porucha proteinů účastnících se oprav DNA
 - to vede ke zvýšení citlivosti buněk organismu na poškození zevními mutageny a k defektům imunity
 - pacienti trpící těmito chorobami mají kromě určitého stupně imunodeficiency také zvýšené množství klasických chromozomálních aberací a jejich buňky reagují na mutageny vyšším stupněm chromozomálního poškození
- **Bloomův syndrom**
 - AR dědičnost
 - projevy — imunodeficiency (zahrnují poruchy B lymfocytů), vysoká náchylnost k různým typům karcinomů (zejména kožních)
- **Ataxia telangiectasia (AT)**
 - vzácné AR onemocnění; gen odpovědný za vznik této choroby se nachází na 11. chromosomu, tzv. gen ATM (ataxia telangiectasia mutated)
 - charakteristická je časně vznikající **progresivní cerebelární ataxie** (progresivní mozečková korová degenerace postihující Purkyňovy a granulární buňky) — důvod specifické ztráty Purkyňových buněk je nejasný, pravděpodobně je tento buněčný typ obzvláště citlivý na oxidativní stres, který následuje po ztrátě normální funkce ATM
 - druhým základním znakem je **telangiektázie** — povšechná dilatace krevních cév (příčinou může být oxidativní stres způsobený tvorbou endogenních volných radikálů)
 - dalším příznakem je **imunodeficiency** na podkladě snížené funkčnosti B i T-lymfocytů (projevuje se v respiračním traktu opakujícími sinusitidami a bronchopneumoniemi)
 - další projevy — náchylnost ke vzniku nádorů, zvýšená radiosenzitivita, předčasné stárnutí, chromozomální nestabilita, defektní buněčný cyklus

16 – Získané imunodeficiency

Získané imunodeficiency - rozdělení, příčiny, klinické projevy.

- **postihují současně několik složek imunitního systému**
- jde o častá onemocnění s heterogenní etiologií, na kterých se podílí podvýživa, různé virové, bakteriální a parazitární infekce a různá metabolická onemocnění
- velmi často jsou také výsledkem léčebných zásahů, jako například radioterapie, imunosupresivní a cytostatická terapie apod.

1. Dřeňové dysfunkce

- stavy, při kterých v důsledku různých příčin dochází ke snížení tvorby krevních elementů
- tyto stavy se někdy označují jako **periferní cytopenie** nebo také **dřeňové útlumy**
- vedou k nim 2 skupiny hematologických onemocnění:

1. Aplastické anémie

- tvorba krevních buněk v kostní dřeni je snížena nebo fokálně chybí
- kostní dřeň je hypocelulární, v některých případech mohou být krevní ostrůvky nahrazeny tukovou tkání
- incidence 2:1 000 000 za rok
- mohou být vrozené nebo získané
- na vzniku aplastické anémie se může podílet:
 - ozáření, účinek různých léčiv a chemikálií
 - infekce EBV, viry hepatitidy B a C, HIV
 - nádory primární (thymom, preleukemické stavy, leukémie, lymfomy)
 - nádory sekundární (infiltrace kostní dřene karcinomy a jinými typy solidních nádorů)
 - imunitně zprostředkovaná destrukce viry infikovaných buněk nebo destrukce na autoimunitním podkladě

2. Myelodysplastické syndromy

- kostní dřeň sice může být hypercelulární, avšak krevní buňky nejsou ze dřene vyplavovány, takže výsledek na periférii může být stejný jako u aplastických anémií
- incidence přibližně 5:1 000 000 za rok
- projevy vzniklé imunodeficiency se odvíjí především od sníženého počtu neutrofilních granulocytů

2. Získané poruchy thymu

- nejčastější příčiny — thymektomie, těžké sepse a náhlé stresové situace, infekce virem HIV, vysoké dávky kortikoidů nebo imunosupresivní léčba z různých příčin, primární nádor thymu (thymom)
- klinické příznaky závisí na věku postižené osoby — s přibývajícím věkem klesá funkční schopnost thymu, a proto například v případě transplantace stoupá riziko reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)
- klinické projevy:
 - různé projevy AIO (SLE, hemolytické anémie atd.)
 - hypogamaglobulinémie (Goodův syndrom) a neutropenie spojené s imunodeficiency, a
 - krvácivé projevy související se vznikem trombocytopenie

3. Imunodeficiency po splenektomii a hyposplenismu

- provázeny zvýšenou náchylností k různým infekcím končícím někdy sepsí
- příčiny — amyloidóza sleziny, sarkoidóza sleziny, AIDS, vrozená aplazie sleziny

4. Získané poruchy počtu a funkce periferních leukocytů

- mohou být následkem útlumů kostní dřeně nebo vlivu faktorů, jako jsou antimembránové autoprotilátky, nedostatek opsoninů, poruchy komplementu, sérové inhibitory apod.
- pacienti s tímto typem imunodeficiency jsou obvykle náchylnější ke stafylokokovým kožním infekcím
- výskyt vážnějších komplikací včetně sepse hrozí při markantním poklesu počtu neutrofilních leukocytů (pod 500 na 1 μ l krve)
- mezi onemocněními vedoucí k tomuto typu imunodeficiency patří:
 - různá AIO, jako jsou SLE, autoimunitní idiopatická neutropenie, Sjögrenova choroba, revmatoidní artritida, trombocytopenická purpura, smíšená choroba pojiva, chronická aktivní hepatitida, Basedowova či Hashimotova struma
 - některé virové infekce (CMV, HIV, parvoviry)
 - maligní onemocnění (různé typy lymfomů a leukémií, thymom)
 - některé léky (sulfonamidy, chinin, prokainamid, hydantoin, penicilamin, fenothiazin atd.)

5. Získané protilátkové imunodeficiency

- jejich příčinou je nedostatek imunoglobulinů způsobený:
 - a) ztrátou existujících imunoglobulinů z krevní plazmy
 - onemocnění ledvin vedoucí k nefrotickému syndromu
 - popáleniny, výrazné ztráty krve
 - b) jejich nedostatečnou tvorbou, či nefunkčností
 - různé typy lymfomů a leukémií, plazmocytární myelom
 - některé léky užívané při léčbě revmatoidní artritidy a epilepsie

6. Imunodeficiency jako následek léčebných postupů

- komplikace moderních léčebných postupů, při kterých je nutné použít imunosupresivní nebo cytostatickou léčbu a ozařování
- patří mezi ně transplantace kmenových buněk, transplantace ledvin i jiných orgánů, chemoterapie a aktinoterapie nádorů
- stupeň imunodeficiency je různý podle dynamiky obnovy hematopoézy — v počátečních stádiích dochází k neutropenii, která je snadněji zvládnutelná než následná těžká buněčná imunodeficiency

7. Imunodeficiency navozené infekčními agens

- imunodeficientní jedinec je více náchylný k různým infekcím a naopak některá infekční agens mohou imunodeficiency navodit nebo prohloubit
- původci infekce vyvolávají imunodeficiency různým způsobem — buď působí svou toxicitou, nebo jsou schopni vyřadit z funkce některou ze složek imunitního systému
- mezi agens způsobující imunodeficiency patří viry (HIV, EBV, virus spalniček, virus chřipky aj.) i bakterie (například *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*)
- nejvýznamnější jednotkou patřící do této skupiny chorob je AIDS způsobený infekcí HIV

17 — Možnosti léčby imunodeficitů

Možnosti kauzální a symptomatické léčby imunodeficitních stavů.

Kauzální léčba imunodeficitů

1. Transplantace kmenových buněk krvetvorby

- léčba se provádí transplantací kmenových hematopoetických buněk od zdravého dárce
- hematopoetické kmenové buňky pro transplantační použití lze získat 3 způsoby:
 1. odběrem punkcí z lopaty kosti kyčelní
 2. z pupečnickové krve (odběrem z placenty po porodu a po odstřižení pupečníku)
 3. z periferní krve po předchozím uvolnění z kostní dřeně působením GM-CSF a pozitivní selekcí CD34+ buněk
- transplantace kostní dřeně nevyžaduje chirurgický zákrok při podání transplantátu
- základem transplantace je **transfuze buněk kostní dřeně** (nebo krvetvorných kmenových buněk získaných z krve) **do krevního oběhu příjemce** — ta zabezpečí uchycení a funkci jednotlivých krvetvorných kmenových buněk v krvetvorné tkáni příjemce
- jejími specifickými problémy je **předtransplantační příprava příjemce**, která má jednak zabezpečit přijetí štěpu a často také potlačit onemocnění krvetvorné tkáně
 - předtransplantační příprava příjemce může zahrnout celotělové ozáření ionizujícím zářením dávkou okolo 10 Gy a podání cytostatik ve vysokých dávkách
 - přípravný režim buď zcela zničí původní krvetvorbu (myeloablativní režim), nebo vede k výrazné imunosupresi až imunoablacii (nemyeloablativní režim, režim s redukovanou intenzitou) a připraví ve dření prostředí pro uchycení štěpu (engraftment)
- podle původu štěpu se rozlišuje transplantace autologní, alogenní a výjimečně syngenní, kdy je dárce jednovaječné dvojče
 - a) **autologní transplantace** — pacientovi se převádějí vlastní hematopoetické kmenové buňky odebrané při remisi nebo alespoň ve fázi minimální aktivity základního onemocnění
 - autologní transplantace sama o sobě neléčí základní onemocnění, ale umožňuje použít velmi intenzivní myelotoxický léčebný režim, který kromě působení na nádor fatálně poškozuje původní krvetvorbu
 - rizikem je možnost, že štěp obsahuje i patologické buňky léčeného onemocnění
 - součástí terapie některých agresivních lymfomů a plasmocytárního myelomu
 - b) **alogenní transplantace** — podání krvetvorných buněk jiného člověka, tzv. dárce, kterým může být příbuzný (nejčastěji sourozenec), nebo nepříbuzný — ideálně se shodou ve všech deseti molekulárně sledovaných antigenech I. a II. třídy HLA
 - oproti autologní transplantaci nehrozí, že by byl štěp kontaminován patologickými buňkami
 - štěp obvykle obsahuje dárcovské lymfocyty, které rozpoznávají (a imunitními mechanismy ničí) přežívající nádorové buňky, což se označuje jako reakce štěpu proti nádoru (graft versus tumor, GvT), resp. reakce štěpu proti leukémii (graft versus leukemia, GvL) — odvrácenou stranou tohoto mechanismu je poškození orgánů a tkání příjemce (reakce štěpu proti hostiteli, GvHD)
 - je indikována zejména u akutních i chronických leukémií a u pokročilého myelodysplastického syndromu; z nenádorových indikací například těžká aplastická anémie včetně vrozených poruch krvetvorby
- **komplikace — při transplantaci kostní dřeně pravidlem**
 - než dojde k obnově krvetvorby (v řádu týdnů) je pacient těžce pancytopenický a je ohrožen infekcemi při leukopenii a krvácením při trombocytopenii

2. Transplantace alogenní thymové tkáně

- **kauzální léčba vrozené deficiencie thymu (di Georgeův syndrom)** — většina pacientů s di Georgeovým syndromem nevyžaduje tuto léčbu, neboť defekt není kompletní
- tato léčba připadá teoreticky v úvahu také u některých sekundárních imunodeficiencí včetně infekce HIV

3. Genová terapie

- funkční gen, který má nahradit nefunkční gen pacienta, je vnesen pomocí vhodného expresního vektoru do lymfocytů, či lépe kmenových buněk pacienta
- dosud hlavním problémem je nalezení dostatečně účinných vektorů, které by zabezpečily přenos a adekvátní expresi vnášeného genu v co největším počtu buněk (ideálně kmenových)
- genová terapie byla zatím klinicky použita pouze u několika málo případů deficiencie adenosin deaminázy (SCID), výsledky byly jen zčásti úspěšné; druhým klinicky úspěšným pokusem je genová léčba pacientů se SCID způsobeným deficitem společného γ řetězce receptoru cytokinů

Substituční léčba imunodeficitů

- tj. náhrada chybějícího produktu imunitního systému
- používá se u protilátkových poruch imunity, u některých komplementových deficitů, v případě deficitů některých cytokinů
- lze sem také zařadit autologní transplantaci kmenových buněk, která je používána jako substituční léčba u sekundárních poruch imunity navozených intenzivní chemoterapií nebo radioterapií při léčbě zhoubných nádorů

1. Substituční léčba intravenózními imunoglobuliny

- používá se u pacientů se závažnými vrozenými a sekundárními poruchami tvorby protilátek
- imunoglobuliny k i.v. aplikaci se získávají z plazmy dárců krve
- jsou opracovány tak, aby neaktivovaly komplement (nesmí obsahovat agregovaný imunoglobulin), a z hlediska bezpečnosti procházejí různými procedurami, minimalizujícími možný přenos infekcí
- k dispozici jsou v současné době i preparáty pro subkutánní aplikaci (pacienti si je mohou aplikovat sami).

2. Substituční léčba u komplementových deficitů

- indikace — hereditární angioedém způsobený deficitem C1 inhibitoru
- k dispozici je **C1 inhibitor** připravený z normální lidské plazmy
- složky komplementu spotřebované při septických stavech lze nahradit nejlépe infuzí plazmy

3. Substituční léčba růstovými faktory

- **rekombinantní erythropoetin (rEPO)**
 - u pacientů s chronickým renálním selháním, kteří mají deficit tohoto cytokinu
- **rekombinantní růstový faktor granulocytových kolonií (rG-CSF)**
 - u vrozené agranulocytózy (Kostmannova syndromu)
 - u některých dalších druhů neutropenií, zejména ke zkrácení intervalu nutného k regeneraci granulopoézy po transplantaci kostní dřeně

18 – Imunostimulancia

Imunostimulátory a jejich klinický význam.

- účinek:
 - u patologicky snížené funkce imunitního systému
 - posílení normálně fungujícího imunitního systému
- rozdělení:
 1. **nespecifické imunostimulátory**
 - komplexní posílení imunitní odpovědi
 2. **specifické imunostimulátory (vakcinace)** — viz otázku 3.23
 - posílení imunitní odpovědi proti konkrétnímu antigenu

Nespecifická imunostimulancia

1. Syntetické imunomodulátory

isoprinosin (methisoprinol)

- **mechanismus účinku:**
 1. imunomodulans — stimuluje proliferaci T-lymfocytů a NK buněk, indukuje dozrávání a diferenciaci T-lymfocytů, indukuje produkci cytokinů (interferonu a lymfokinů)
 - stimulační vliv na lymfocyty T je nejvýraznější na počátku léčby, při dlouhodobém podávání se snižuje
 2. virostatikum — inhibuje replikaci některých virů (hlavně herpetických, ale i respiračních virů)
- **indikace** — virové infekce s těžším nebo recidivujícím průběhem, u pacientů s laboratorními známkami buněčného imunodeficitu
 - recidivující herpes labialis, herpes genitalis, herpes zoster, kondylomata, CMV infekce, EBV infekce, spalničky
- **nežádoucí účinky** — elevace kys. močové v séru, GIT obtíže, bolesti hlavy

2. Bakteriální imunomodulátory

a) Bakteriální lyzáty k léčbě recidivujících infekcí

- **mechanismus účinku** — obsahují naštěpené kmeny bakterií vyvolávající onemocnění dýchacích cest (*Klebsiella pneumoniae*) nebo močových cest (UPEC) → nespecifická stimulace imunity, zejména ovlivnění slizničního imunitního systému
 - při dlouhodobém podávání lze indukovat i specifický účinek — tvorbu IgA protilátek proti podávaným kmenům
- **indikace** — k dlouhodobé prevenci u opakovaných infekcí dýchacích a močových cest

 **Broncho-vaxom**,  **Urovaxom**,  **Luivac**,  **Ribomunyl**

b) Bakteriální lyzáty k léčbě nádorů

- **mechanismus účinku** — suspenze *Mycobacterium bovis* (BCG), nebo složka jejich buněčné stěny (muramyl dipeptid) → nespecifická stimulace imunitního systému, což nepřímo vyvolává i odpověď na nádor (zvyšuje produkci cytokinů)
- **indikace** — nádory močového měchýře (intravezikulární podání), osteosarkom bez průkazu metastáz (i.v. infuze)
- **kontraindikace** — hypersenzitivita, imunosuprimovaní pacienti, aktivní TBC, akutní infekce močových cest

3. Cytokiny a růstové faktory

- cytokiny jsou **endogenní regulátory imunitních reakcí**, chemicky jde o polypeptidy nebo glykoproteiny
 - konstitutivní produkce cytokinů je nízká nebo žádná, ke zvýšení dochází až po určitém signálu (infekce, stres) a trvá jen po určitou dobu
 - jejich působení závisí na vazbě se specifickými membránovými receptory
 - někdy jsou přirovnávány k hormonům — zatímco hormony jsou produkovány jedním typem specializovaných buněk, **cytokiny jsou obvykle sekretovány více typy buněk**; hormony působí endokrinně (na místech vzdálených od jejich produkce), **cytokiny působí parakrinně nebo autokrinně** (výjimky TNF α , IL-1, IL-6)
- můžeme potlačit jejich působení (tj. imunosuprese), nebo je podávat (tj. imunostimulace)
- vyráběny rekombinantní DNA technologií za pomoci *E.coli*

A. G-CSF (růstový faktor stimulující granulocytární kolonie)

- **mechanismus účinku** — vyvolává zvýšené vyplavení prekursorů neutrofilů; zvýšením jejich proliferativní schopnosti a zrychlením jejich vyžívání zkracuje trvání neutropenie
- **indikace** — léčba a redukce doby trvání neutropenie (u pacientů po cytotoxické chemoterapii malignity; u myeloablativní terapie následované transplantací kostní dřeně); vyplavení progenitorových buněk u zdravých dárců kostní dřeně před alogenní transplantací
- **nežádoucí účinky** — bolesti skeletu, chřipkový syndrom, reakce v místě vpichu, alergie

 **filgrastim**,  **pegfilgrastim**

B. Interferony (INF)

- cytokiny s funkcí intercelulárních posílů
- **mechanismus účinku** — účinkují virostaticky, antiproliferačně, zasahují do imunitních reakcí
- **indikace:**
 - INF- α — hematologické malignity, mnohočetný myelom, melanom, hepatitida B a C
 - INF- β — sclerosis multiplex
 - INF- γ — prevence infekcí u chronické granulomatózní choroby
- **nežádoucí účinky** — flu-like syndrom, leukopenie, GIT poruchy, kožní projevy, neurologické příznaky, deprese

C. TNF- α (tumor-nekrotizující faktor)

- **indikace** — adjuvanční nebo paliativní terapie sarkomů měkkých tkání

19 — Imunosupresiva

Imunosupresiva a jejich klinický význam.

- **látky tlumící činnost imunitního systému**
- použití:
 - a) patologicky zvýšená reaktivita imunitního systému — AIO, alergie
 - b) transplantologie — prevence a léčba rejekce a reakce štěpu proti hostiteli (GvHD)

1. Glukokortikoidy

- hormony kůry nadledvin či jejich analoga
- **mechanismus účinku:**
 - vysoce lipofilní — snadno přestupují membránami
 - vazba na cytoplazmatický receptor, translokace do jádra a ovlivnění genové transkripce — účinek na úrovni transkripce genů
 - inhibice tvorby prozánětlivých cytokinů (IL-1, IL-2, TNF) a blokáda syntézy receptorů pro cytokiny (IL, TNF)
 - inhibice syntézy mediátorů zánětu (prostaglandiny, leukotrieny, PAF)
- použití hlavně (ale ne pouze) v akutní fázi
- dlouhodobě závažné NÚ, snaha o minimalizaci expozice
- **účinky:**
 - **metabolické účinky**
 - játra — zvýšení glukoneogeneze (↑ glykémie)
 - periferní tkáň — katabolické účinky (kosterní sval — snížení proteosyntézy, zvýšené uvolňování AMK, snížení utilizace glukózy; tuková tkáň — zvýšení lipolýzy)
 - **protizánětlivé účinky**
 - potlačení projevů zánětu (potlačení vazodilatace, snížení permeability, teploty, bolesti, exsudace) — potlačením exprese genů pro zánětlivé cytokiny
 - potlačení proliferace fibroblastů — snížená proliferační fáze zánětu, zhoršené hojení
 - **imunosupresivní účinky**
 - snížení počtu lymfocytů, monocytů, eozinofilů, bazofilů v krvi — je suprimována rejekční reakce transplantátu; je potlačena tvorba protilátek (zvýšené riziko infekcí)
 - vyplavení neutrofilů z kostní dřeně do krve
 - **účinky na krev**
 - zvýšení trombocytů (zvýšená srážlivost), erytrocytů i koncentrace hemoglobinu
 - **účinky na kost a pojivo**
 - převaha resorpce nad osteogenezí (rozvoj osteoporózy)
 - snížení tvorby kolagenu
 - negativní vápníková bilance (snížená absorpce, zvýšená exkrece)
 - **účinky na ledviny**
 - zvýšení glomerulární filtrace
 - **účinky na kardiovaskulární systém**
 - snížení přesunu vody do buněk, udržují tak extracelulární objem tekutiny
 - zvýšení kontrakility myokardu
 - zvýšení cévního tonu

1.1. Glukokortikoidy pro systémové podání

 hydrokortizon,  methylprednisolon,  prednison,  dexamethason

- **dávkování — typicky 1x denně (ráno); dále v pulzech** (krátkodobé nárazové dávky — až v gramech, i.v., např. u sklerosy multiplex); podání p.o. i parenterálně
 - aby se zabránilo NÚ, je snaha podávat co nejnižší dávku co nejkratší dobu
 - vysazovat postupným snižováním dávky
- **indikace pro systémové podání:**
 1. **substituční léčba** — při nedostatečné sekreci endogenního hormonu (Addisonova choroba, adrenalectomie)
 2. **akutní stavy** — akutní alergická reakce, status asthmaticus, akutní ataka roztroušené sklerózy, šokové stavy, edém mozku (dexamethason i.v.)
 3. **chronická onemocnění** — protizánětlivá léčba, především při exacerbaci
 4. **imunosuprese** (po transplantaci)
 5. **malignity** (zvláště hematologické)
 6. **porodnictví** — v případě hrozícího předčasného porodu k indukci plicní zralosti
- **nežádoucí účinky:**
 - krátkodobé podání (do 7 dnů, i u velkých dávek) nevyvolá NÚ, nebo jen velmi mírné
 - při dlouhodobém užívání (řada měsíců) — atrofie kůry nadledvin
 - způsobeno zpětnovazebním útlumem tvorby ACTH, který má na kůru nadledvin trofické účinky — proto je nutno vysazovat je postupně (hrozí až akutní insuficience)
 - **iatrogenní Cushingův syndrom** — měsíčkovitý obličej, býčí šíje, strie, akné, centrální obezita (při relativně štíhlých končetinách)

1.2. Glukokortikoidy pro lokální podání

 budesonid,  betamethason,  flutikazon,  triamcinolon

- **kortikosteroidy s omezenou biologickou dostupností** — buď se nevstřebávají, nebo se vstřebávají, ale mají vysoký first-pass efekt v játrech (~90%)
- podání ve formě:
 - a) **oční, ušní a nosní kapky** — neinfekční (!) zánětlivá onemocnění oka
 - b) **masti a krémy pro aplikaci na kůži a sliznice** — kožní zánětlivá onemocnění (psoriáza, LE, lichen planus, alergické zánětlivé stavy, ekzémy...), hemoroidy
 - c) **injekce intraartikulárně, intrasynoviálně, periartrikulárně** — symptomatická léčba subakutního a chronického zánětlivého onemocnění kloubů
 - d) **aerosol k inhalaci** — astma bronchiale, CHOPN
 - e) **intranazální kortikoidy** (sprej, nosní kapky) — alergická rinitida
 - f) **rektální formy** (čípky, klyzmata); **nebo perorální formy** uvolňující se v distálních úsecích střeva — léčba nespecifických střevních zánětů
- **nežádoucí účinky:**
 - lokální — atrofie kůže a sliznic, kandidóza dutiny ústní (NÚ inhalačních forem)
 - systémové NÚ jsou vzácné, ale mohou se vyskytnout při zvýšené expozici — při použití na větších plochách těla (zejména u dětí) a ve vysokých dávkách

2. Cytostatika (antiproliferační látky)

- využívají vedlejší účinek klasické cytostatické terapie, která poškozuje rychle dělící se buňky; dávky užívané v imunosupresi jsou nižší než v onkologické léčbě

azathioprin

- **mechanismus účinku** — prodrug 6-merkaptopurinu, tj. purinový analog
 - inhibuje tvorbu purinových bazí, a tím i nukleových kyselin
- **indikace:**
 - AIO
 - přežívání transplantovaných orgánů (v kombinaci jako cortoid-sparing drug)
 - jako aktivní 6-merkaptopurin je užíván v léčbě hematooonkologických chorob u dětí
- **nežádoucí účinky:**
 - útlum kostní dřeně — leukopenie, trombocytopenie, anémie (sledovat KO)
 - zvýšené riziko infekcí
 - teratogenita, mutagenicita

metotrexát

- **mechanismus účinku** — analog kys. listové (antifolát)
 - falešný substrát enzymu pro syntézu tetrahydrolistové kys. → inhibice syntézy DNA
- **indikace:**
 - AIO
 - lék volby u revmatoidní aritidy
 - léčba hematologických malignit (vysoké dávky)
- **nežádoucí účinky:**
 - GIT potíže (včetně aftozních stomatitid)
 - hepatotoxicita (sledovat jaterní testy)
 - nefrotoxicita (sledovat renální funkce, alkalizovat moč)
 - intersticiální pneumonie (sledovat respirační funkce)
 - poruchy krvetvorby; zvýšené riziko infekcí, tumorů (EBV infekce, lymfomy)
- k prevenci NÚ lze podávat nízké dávky kys. listové (1 den po metotrexátu)

cyklofosfamid

- toxický lék používaný ke zvládnutí aktivní choroby, pak výměna za bezpečnější
- **mechanismus účinku:**
 - v játrech přeměňován na alkylační metabolity — vážou se na DNA a poškozují DNA
- **indikace:**
 - AIO (hlavně vaskulitidy) — pokud selže méně toxická léčba
 - hematologické malignity (vysoké dávky)
- **nežádoucí účinky:**
 - nefropatie
 - hemoragická cystitida (profylaxe — mesna neutralizuje metabolit akrolein)
 - útlum kostní dřeně

3. Selektivní imunosupresiva

- **léky blokující aktivaci imunitního systému bez obecného cytotoxického účinku** — nepoškozují rychle se množící tkáně jako cytostatika

3.1. Inhibitory kalcineurinu

 **cyklosporin**,  **takrolimus**

- **mechanismus účinku:**

- tyto látky tvoří v cytoplasmě **komplex se svým imunofilinem** — (imunofiliny jsou proteiny schopné vázat různé látky, podílí se na aktivačních a signálních dráhách buňky — cyklofilin váže cyklosporin, FKBP-12 váže takrolimus)
- komplex inhibuje kalcineurin (kalcineurin je fosfatáza, která v T-lymfocyту zprostředkovává buněčnou signalizaci) → výsledkem je **snížená tvorba IL-2 a příbuzných cytokinů** — následně dochází k útlumu aktivity T-lymfocytů a proliferace B-lymfocytů na T-lymfocytech závislé

- **indikace:**

- transplantace (profylaxe rejekce), prevence GvHD
- léčba AIO refrakterních k běžné léčbě (hlavně cyklosporin)

- **nežádoucí účinky:**

- nefropatie, hepatopatie, neuropatie, třes, bolesti hlavy, infekce
- hirsutismus (u cyklosporinu velmi častý, u takrolimu vzácný)
- hyperplazie dásní (cyklosporin)

3.2. Inhibitory TOR

 **sirolimus**,  **everolimus**

- **mechanismus účinku:**

- váží se na imunofilin FKBP-12, komplex inhibuje mTOR (mTOR, mammalian target of rapamycin, je kináza podílející se na fosforylaci řady proteinů) → výsledkem je **zástava buněčného cyklu, brání přechodu z G do S fáze** — to ovlivňuje aktivaci T-lymfocytů, inhibuje proliferaci buněk indukovanou cytokiny

- **indikace:**

- transplantace ledvin (profylaxe rejekce)
- náhrada inhibitoru kalcineurinu

- **nežádoucí účinky:**

- výrazné zvýšení cholesterolu
- poruchy krvetvorby (hlavně anémie), infekce, novotvary
- zpomalení hojení ran (hlavně u vysokého BMI)
- everolimus se používá k napouštění vaskulárních stentů ke snížení rizika retrombózy (vliv na celkovou mortalitu je kontroverzní)

3.3. Další selektivní imunosupresiva

 **mykofenolová kyselina** (mykofenolát mofetil, mykofenolát sodný)

 **leflunomid**

20 – Imunomodulancia

Současné možnosti imunomodulační léčby.

- **léky stimulující činnost imunitního systému**, modifikují přirozenou obranu vůči nákaze, nádorům — podávají se jako podpora při nádorech, infekcích, zánětech, autoimunitních chorobách, u AIDS

1. Nespecifická imunomodulancia

1.1. Růstové faktory

filgrastim, pegfilgrastim

- **mechanismus účinku:**
 - rekombinantní lidský faktor stimulující granulocytární kolonie (rG-CSF)
 - vyvolává vzestup prekursorů neutrofilů zvýšením jejich proliferativní schopnosti a zrychlením jejich vyžívání → zkracuje trvání neutropenie
- **indikace:**
 1. redukce doby trvání neutropenie se snížením rizika vzniku febrilní neutropenie u pacientů po standardní cytotoxické chemoterapii malignity
 2. redukce doby trvání neutropenie u myeloablativní terapie následované transplantací kostní dřeně
 3. mobilizace PBPC u zdravých dárců před alogenní transplantací kostní dřeně
- **nežádoucí účinky:**
 - bolesti skeletu
 - chřipkový syndrom
 - reakce v místě vpichu
 - alergie

isoprinosin

- **mechanismus účinku:**
 - virostatikum, imunomodulans
 - stimuluje proliferaci T lymfocytů a NK buněk, indukuje dozrávání a diferenciaci lymfocytů, indukuje produkci interferonu a lymfokinů
 - inhibuje replikaci některých virů - hlavně herpetických, ale i respiračních virů
- **indikace:**
 1. u virových infekcí s těžším nebo recidivujícím průběhem u pacientů s laboratorními známkami buněčného imunodeficitu
- pozn.: stimulační vliv na T-lymfocyty je nejvýraznější na počátku léčby, při dlouhodobém podávání se snižuje

1.2. Bakteriální lyzáty

Broncho-vaxom, Urovaxom, Luivac, Ribomunyl

- **mechanismus účinku:**
 - bakteriální lyzáty s různým zastoupením bakteriálních kmenů, zejména Klebsiella pneumoniae (respirační), E. coli (urologické) — nespecifická stimulace imunity
- **indikace:**
 - k dlouhodobé prevenci u opakovaných infekcí

1.3. Interferony

- cytokiny s funkcí intercelulárních posílů
- **mechanismus účinku:**
 - účinkují virostaticky, antiproliferačně, zasahují do imunitních reakcí
- **indikace:**
 - INF- α — hematologické malignity, mnohočetný myelom, melanom, hepatitida B a C
 - INF- β — sclerosis multiplex
 - INF- γ — prevence infekcí u chronické granulomatózní choroby
- **nežádoucí účinky** —
 - flu-like syndrom
 - leukopenie
 - GIT poruchy, kožní projevy, neurologické příznaky, deprese

2. Specifická imunomodulancia

- vůči určitému alergenu lze navodit jak imunitní reakci, tak toleranci, více se daří imunizace (očkování nebo pasivní přenos)
- **aktivní a pasivní imunizace** — viz otázky 3.18 a 3.23
- **specifická alergenová imunoterapie (SAIT)** — viz otázku 3.19

21 — Specifická alergenová imunoterapie (SAIT)

Specifická alergenová terapie, příčiny, indikace, provedení, typy alergenové imunoterapie.

- dříve též desenzibilizace či hyposenzibilizace
- **kauzální terapie alergických onemocnění** — přímá léčba příčiny alergického onemocnění
- podstatou je podávání zvyšujících se dávek přesně definovaného alergenu, **dochází k postupnému rozvoji imunologické tolerance**
- vždy provádí alergolog

Indikace

- laboratorně verifikovaná **IgE přecitlivělost s přímou vazbou na klinické projevy**:
 - alergie na hmyzí jed (pouze injekčně)
 - pylová alergie
 - alergie na roztoče

Kontraindikace

1. nutnost užívání β -blokátorů — omezují efekt adrenalinu ($\rightarrow$ neúčinná terapie anafylaxe)
2. KV onemocnění — alergen může vyvolat tachykardie, krátkodobou ischemii apod.
3. těžké a obtížně kontrolovatelné astma — alergen vyvolává exacerbaci astmatu
4. těhotenství

Mechanismus účinku

1. **novotvorba blokujících protilátek IgG4** — zamezení navázání komplexu alergen-IgE na mastocyty; vzestup IgG4 v séru koreluje s klinickou úspěšností terapie
2. **aktivace Treg** — inhibice T-buněčné mediované aktivace B-lymfocytů; migrace do místa alergického zánětu a zde sekrece IL-10 a TGF β $\rightarrow$ inhibice lokálního zánětu, snížení proliferace T-lymfocytů, posílení tvorby IgG4
3. **indukce sekrece protizánětlivých mediátorů (IL-10, TGF- β)**

Provedení

- podávání postupně se zvyšujících dávek alergenu (alergenové extrakty), dokud je dosaženo udržovací dávky, která se aplikuje v určitých intervalech (minimální doba podávání je 3 roky)

Aplikační schémata

1. **subkutánní forma (SCIT)** — vyšší compliance, lepší kontrola podané dávky, méně pohodlná; více NÚ ale řešení ihned (kromě omezujících otoků 3-4 dny po aplikaci)
 - a) **eskalační dávkování** — standardní režim (8 sezení), zrychlené režimy (1-2 sezení)
 - přípravky Pollinex, Alutard, Phostal (standardní), Cluster, Rush (zrychlené)
 - b) **udržovací dávka** — dlouhodobý efekt při aplikaci 3 a více let
 - dávka 100 000 jednotek, režim 1 injekce za 4-6 týdnů
 - úprava dávky možná dle aktuálního stavu pacienta — pylová sezóna, infekce apod.
2. **sublinguální forma (SLIT)** — široké spektrum alergenů (roztoči, pyl břízy, travin apod.)
 - schéma dané výrobcem, u sezónní a předsezónní SAIT každý den 220-300 jednotek po dobu 3-6 měsíců
 - a) **tablety s podáním pod jazyk** — přípravky Oralair, Grazax, Acarizax
 - b) **kapky s podáním pod jazyk** — Staloral

22 — Biologická léčiva v imunologii

Biologická léčiva v imunologii.

- **biologická léčba** — tj. postupy založené na monoklonálních protilátkách a proteinech působících jako aktivátory nebo inhibitory specifických molekul a procesů zúčastněných v imunitních dějích

Rekombinantní cytokiny

- umělé molekuly konstruované metodami genetického inženýrství
- cytokiny jako hlavní regulátory imunitního systému mají mimořádný potenciál jako **pozitivní resp. negativní imunomodulátory**
- jejich použití je komplikováno **pleiotropními účinky** — rozpor mezi jejich vysoce lokalizovaným působením za fyziologických podmínek a systémovou terapeutickou aplikací + interakcemi s jinými cytokiny

1. Rekombinantní INF-α

- indikace — hepatitida B, hepatitida C, hematologické onemocnění (CML, tricholeukemie...)
- na trhu preparáty konjugované s PEG nebo albuminem — delší setrvání v oběhu
- přípravky  Roferon®,  Pegasys®,  Peginteron®,  Albinerferon alfa®...

2. Rekombinantní INF-β

- tlumí zánětlivé poškození u roztroušené sklerózy
- přípravky  Avonex®,  Rebif®,  Betaferon®

3. Rekombinantní IL-2

-  **Alesleukin®** (Proleukin) — terapie metastatického melanomu a metastazujícího karcinomu ledvin; odpověď cca 15 %

4. Rekombinantní G-CSF

-  **Neupogen®** — terapie chemoterapií indukované neutropenie

Anti-TNF terapie

- cílem je **blokovat patologické působení TNF-α**, prozánětlivého cytokinu uplatňujícího se v patogenezi AIO

infliximab (Remicade®)

- rekombinantní chimerická monoklonální protilátka proti TNF-α produkovaná v kultuře myších myelomových buněk
- indikace — revmatoidní artritida, MC, psoriáza (těžší formy)

adalimumab (Humira®)

- 1. rekombinantní plně lidská protilátka produkovaná v lidské buněčné linii
- působení analogické jako infliximab

etanercept (Enbrel®)

- fúzní protein rozpustného receptoru pro TNF-α a Fc části lidského IgG1 — struktura celkově podobná protilátce — 2 vazebná místa pro TNF-α
- funkce — kompetitivní inhibice působení TNF-α

23 – Vakcinace a očkování

Vakcinace a očkování.



Aktivní imunizace

- tj. použití antigenu k vyvolání imunitní reakce, která může později chránit před patogenem nesoucím stejný antigen
- první použitou vakcínou (18. století) byla tzv. variolace (tj. očkování živým virem kravských neštovic), která vyvolávala u lidí jen mírné onemocnění a poskytovala ochranu proti viru pravých neštovic
- použití:
 - profylaktické — navození imunity ještě před kontaktem s patogenem (například pertuse)
 - terapeutické — pokud již pacient byl infikován (například vzteklna); podání vakcíny vyvolá imunitní odpověď, která „předběhne“ přirozenou infekci a zabrání vzniku nemoci

Princip účinku

- pokud se organismus prvně setká s patogenem, reaguje na něj pouze vrozená imunita
- pokud se organismus setká podruhé s tímž patogenem, je reakce již rychlejší a intenzivnější, v některých případech ani neproběhne onemocnění
- očkování je založeno na tom, že jsou imunitnímu systému předloženy antigeny spojené s původcem onemocnění, ale je zajištěno, aby neproběhla skutečná infekce
- účinnost pak také závisí na mikrobiomu
- účinnost (za optimálních klinických podmínek) a účinkovost (za reálných podmínek) vakcín ale bývají jiné

Typy vakcín

- podle použitého způsobu se rozlišují následující typy vakcín:
 - a) živá oslabená (atenuovaná) vakcína** — tvořena živými patogeny, které ztratily schopnost vyvolat onemocnění — po takové vakcíně proběhne obvykle mírná infekce, která zanechává imunitu jako po prodělaném onemocnění
 - například spalničky, příušnice, zarděnky, dětská obrna (Sabinova vakcína), TBC, žlutá zimnice, plané neštovice
 - b) inaktivovaná vakcína** — tvořena usmrcenými patogeny (usmrcení musí být provedeno takovým způsobem, aby byla zachována struktura antigenů, které rozpozná imunitní systém)
 - například cholera, tyfus, chřipka, klíšťová encefalitida, vzteklna, dětská obrna (Salkova vakcína), hepatitida A
 - c) toxoidová (anatoxinová) vakcína** — tvořena bakteriálními toxiny, které mají potlačenou schopnost vyvolat toxickou reakci, ale stimulují imunitní odpověď
 - například tetanus, difterie, pertuse
 - d) subjednotková vakcína** — tvořena pouze některými fragmenty původce
 - například polysacharidová pouzdra hemofilů, meningokoků a pneumokoků
 - e) rekombinantní vakcína** — podobná subjednotkové, ale podjednotky jsou získány pomocí technik genetického inženýrství jako produkty činnosti bakterií a kvasinek
 - například hepatitida B
 - f) genová vakcína (RNA vakcína)** — nejnovější koncept vakcíny, která donutí několik buněk očkováného, aby dočasně produkovaly fragmenty patogenu, proti kterým imunitní systém vytvoří imunitní odpověď
 - například covid-19

Podání a kontraindikace

- nejčastěji i.m., dále s.c. i p.o. (například cholera, rotaviry, poliomyelitida), BCG intradermálně
- kontraindikace při přecitlivělosti na vakcinační látku nebo adjuvas, či akutní infekce
- NÚ — lokální reakce v místě aplikace, systémové teplota, nechutenství, zvracení, anafylaxe

Pomocné látky (adjuvas)

- k modifikaci odpovědi imunitního systému na vakcínu slouží řada látek přidávaných do vakcíny, tzv. **adjuvas** (napomáhají pohlcení antigenu APC a první fázi odpovědi) — **nekompletní a kompletní Freundovo adjuvas, hydroxid hlinitý $Al(OH)_3$**

Očkování jako nástroj veřejné imunity

- očkování významným způsobem zabraňuje vzniku infekčních onemocnění — podílí se na vzniku **kolektivní imunity** (tj. vyšší odolnost převážně imunní populace k šíření nakažlivé choroby)
- takové imunity lze obvykle dosáhnout **vysokou proočkovností** — konkrétní hodnota závisí na nakažlivosti onemocnění a na efektivitě podávané vakcíny

Očkování v ČR

A. povinné očkování

- černý kašel (pertuse)
- dětská obrna (poliomyelitis)
- Haemophilus influenzae* typu b
- příušnice (parotitis epidemica)
- spalničky (morbili)
- zarděnky (rubeola)
- záškrť (difterie)
- tetanus
- hepatitida B (od 1990s)

B. povinné pro děti s rizikem

- tuberkulóza

C. nepovinné očkování

- lidský papillomavirus (HPV)
- plané neštovice (varicella zoster)
- pneumokokové infekce
- rotavirové infekce
- covid-19

Věk dítěte	Onemocnění	Očkovací látka
od 9. týdne	1. dávka: záškrť, tetanus, pertuse, hemofilové invazivní infekce, hepatitida B, dětská obrna	Hexacima, Infanrix Hexa
3. měsíc	2. dávka: záškrť, tetanus, pertuse, hemofilové invazivní infekce, hepatitida B, dětská obrna	Hexacima, Infanrix Hexa
4. měsíc	3. dávka: záškrť, tetanus, pertuse, hemofilové invazivní infekce, hepatitida B, dětská obrna	Hexacima, Infanrix Hexa
15. měsíc	1. dávka: spalničky, příušnice, zarděnky	M-M-RVAXPRO, Priorix
do 18. měsíce	4. dávka: záškrť, tetanus, pertuse, hemofilové invazivní infekce, hepatitida B, dětská obrna	Hexacima, Infanrix Hexa
21.–25. měsíc	2. dávka: spalničky, příušnice, zarděnky	M-M-RVAXPRO, Priorix
5.–6. rok	5. dávka: záškrť, tetanus, pertuse	Boostrix, Infanrix
10.–11. rok	6. dávka: záškrť, tetanus, pertuse; 5. dávka: dětská obrna	Boostrix Polio
14. rok (u neočkovaných 10.–11. rok)	7. dávka: tetanus	TETAVAX, Tetanol pur, TD- PUR

Očkovací kalendář

Očkovací látky

- Infanrix hexa** — subjednotkové a rekombinantní antigeny
 - poliomyelitida, pertuse, difterie, tetanus, hepatitida B, hemofilové infekce
- Priorix** — atenuované viry (kontraindikace u těžkých imunodeficitů)
 - příušnice, spalničky, zarděnky
- BCG (bacillus Calmette-Guerin)** — TBC