

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Studijní program: Imunologie



Autor: Mgr. Eva Svobodová

Role HLA a non HLA protilátek v orgánových transplantacích

Role of antibodies against HLA and non-HLA antigens for organ transplantation

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha 2023

Prohlášení studenta:

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1.8.2023

Mgr. Eva Svobodová

Prohlášení školitele:

Prohlašuji, že Mgr. Eva Svobodová (roz. Slimáčková) se podílela na všech publikacích, které se staly součástí disertační práce. U publikace, kde je první autorkou, se studentka aktivně podílela na přípravě a provedení experimentů, analýze dat, interpretaci výsledků a přípravě článku.

V Praze dne 1.8.2023

Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. MUDr. Antonij Slavčevovi, CSc., za pomoc, za cenné rady a pracovní podmínky, které mi umožnily dokončit tuto práci. Děkuji profesoru Iljovi Střížovi za možnost návratu do laboratoře po rodičovské dovolené a za podporu při studiu. Dále bych chtěla poděkovat svým bývalým kolegům, RNDr. Liboru Kolesárovi, Ph.D. a Mgr. Petře Víchové, se kterými jsem strávila krásné roky v laboratoři Imunogenetiky IKEM a kteří se podíleli nejen na rutinním provozu laboratoře, ale byli i nadšeně zapojeni do řady vědeckých projektů.

Děkuji také všem lékařům, zejména pak MUDr. Jance Slatinské Ph.D. a MUDr. Tomáši Gazdičovi, se kterými jsem měla možnost aktivně spolupracovat, a kteří rozšířili mé znalosti o klinický pohled na danou problematiku.

Děkuji i Doc. Petře Hrubé, Ph.D., z Transplantační laboratoře, za výbornou spolupráci a za konzultace otázek týkajících se molekulárního mikroskopu.

V nesposlední řadě děkuji všem pacientům a také jejich dárcům, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout.

Největší dík však patří mé rodině, která mě podporovala a povzbuzovala po celou dobu studia.

Abstrakt

Rejekce je významnou komplikací po transplantaci a také za jeden z hlavních důvodů ztráty funkce štěpu. Je vyvolána odpovědí imunitního systému příjemce orgánu na základě setkání s neshodnými HLA (Human Leukocyte Antigen) a non HLA antigeny dárce. Na tomto procesu se podílí všechny složky imunitního systému a podle převahy jednotlivých reakcí lze rejekce rozdělit na T-buňkami zprostředkovanou rejekci (T cell-mediated rejection, TCMR) a protilátkami zprostředkovanou rejekci (antibody-mediated rejection, AMR). Rejekce se může vyvinout bezprostředně po transplantaci v akutní formě, či jako chronická forma v průběhu několika, někdy až desítek, let po transplantaci. Diagnostika rejekce se určuje dle klinického obrazu, laboratorních vyšetření (včetně detekce donor specifických protilátek, DSA) a histologického nálezu v biopsiích. Nově jsou využívány znalosti validovaných genových expresí z molekulárního mikroskopu (MMDX) a další diagnostické testy. Jednotlivé fenotypy rejekce jsou hodnoceny a revidovány dle mezinárodní patologické klasifikace.

Tato práce byla zaměřena na analýzu imunologických faktorů ve vztahu k T-buňkami a protilátkami zprostředkované rejekci po transplantaci orgánů. Zabývá stanovením DSA v relaci k predikci, diagnostice a léčbě rejekce u pacientů po transplantaci srdce. Dle získaných dat přítomnost DSA před transplantací srdce dokáže stratifikovat pacienty, kteří mohou být po transplantaci ohroženi AMR. Bylo prokázáno, že rezistentní formu AMR lze úspěšně léčit preparátem Bortezomib, který efektivně snižuje hladiny DSA.

Z pohledu T-buňkami zprostředkované rejekce se práce zaměřuje na sledování frekvence T-efektorových/ paměťových Interferon gama (IFN gama) produkujících buněk u pacientů před transplantací ledvin od žijících dárců. Práce nepotvrdila přímou souvislost mezi počty IFN gama produkujících buněk a vyšším rizikem TCMR či AMR, nicméně byla zjištěna korelace se závažnějším průběhem TCMR. Dle nových znalostí genových transkriptů se ukazuje, že IFN gama hraje důležitou roli v indukci jak TCMR, tak AMR. V posledním oddíle se práce dotýká studia genových transkriptů u pacientů s histologickou diagnózou hodnocenou termínem "hraniční změny". Na vyšetřovaném souboru bylo zjištěno, že tato diagnóza indikovaná ve dvou různých obdobích po transplantaci (do 2 týdnů a 3 měsíce) vykazuje nejen rozdílné klinické projevy, ale i rozdíly v genové expresi. Zhoršení renální funkce u časných biopsiích souviselo s vyšší expresí imunitních a prozánětlivých genů, narozdíl od protokolárních biopsiích se stejnou diagnózou, kde byla zaznamenána vyšší exprese genů pro fibrinogen.

Abstract

Rejection is a significant complication after transplantation and one of the main reasons for loss of graft function. It is triggered by the response of the organ recipient's immune system based on the recognition of mismatched HLA (Human Leukocyte Antigens) and non-HLA antigens of the donor. All components of the immune system participate in this process, and according to the predominance of individual reactions, rejection can be divided into T cell-mediated rejection (TCMR) and antibody-mediated rejection (AMR). Rejection can develop immediately after transplantation in an acute form, or as a chronic form during several to tens of years after transplantation. The diagnosis of rejection is determined according to the clinical status, laboratory tests (including the detection of donor-specific antibodies, DSA) and histological findings in biopsies. The knowledge of validated gene expressions from the molecular microscope (MMDX) and other diagnostic tests has been recently applied. Individual phenotypes of rejection are evaluated and revised according to the international pathological classification.

This work focuses on the analysis of immunological factors in relation to T-cell and antibody-mediated rejection after organ transplantation. The thesis deals with the determination of DSA in relation to the prediction, diagnosis, and treatment of rejection in heart transplant recipients. According to collected data, the presence of DSA before heart transplantation can stratify patients who may be at risk of AMR after transplantation. The resistant form of AMR can be successfully treated with Bortezomib, which effectively reduces DSA levels, as is demonstrated in this thesis. From the point of view of T cell-mediated rejection, the work focuses on monitoring the frequency of T-effector / memory Interferon gamma-producing cells (IFN gamma) in patients before kidney transplantation from living donors. The work did not confirm a direct connection between the number of IFN gamma-producing cells and a higher risk of TCMR or AMR. However, a correlation with a more severe course of TCRM was found. According to the new knowledge of the gene transcripts, IFN gamma appears to play an important role in the induction of both TCMR and AMR. In the last section, the work studies gene transcripts in patients with a histological diagnosis evaluated by the term "borderline changes". In the studied patient cohort, it was found that this diagnosis, defined at two different time-points after transplantation (up to 2 weeks and 3 months), shows not only different clinical manifestations, but also differences in gene expression. Subsequent deterioration of kidney graft function in early biopsies was associated with higher expression of immune and inflammatory genes, in contrast to protocol biopsies with the same diagnosis, where higher expression of the fibrinogen gene was observed.

Seznam zkratk

ADCC – *Antibody-Dependent Cellular cytotoxicity* – cytotoxická reakce závislá na protilátkách

ADAMDEC1 - *ADAM Like Decysin 1*

AMR – *Antibody-Mediated Rejection* – protilátkami zprostředkovaná rejekce

ANKRD22 - *Ankyrin Repeat Domain 22*

APC – *Antigen Presenting Cell* – antigen prezentující buňka

AT1R – *Angiotenzin II type 1 Receptor* – angiotenzinový receptor typu 1

BOS – *Bronchiolitis Obliterans Syndrome*

BTLA - *B- and T-lymphocyte associated* (CD272)

CAV– *Cardiac Allograft Vasculopathy* – koronární nemoc štěpu

CCL4 - *C-C Motif Chemokine Ligand 4*

CDAL – *Chronic Lung Allograft Dysfunction* – chronická dysfunkce plicního štěpu

CDR – *Complementarity Defining Region of antibodies* – vazebné místo protilátky

cfDNA – *cell-free Deoxyribonucleic Acid* – volně cirkulující deoxyribonukleová kyselina

CLEC5A – *C-type lectin domain containing 5A* – C lektinový receptor

CREG – *Cross-Reactive Group* – křížově reagující skupina

CTLA4 – *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4* (CD152)

CXCL– *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*

DSA – *Donor Specific Antibodies* – dárcovsky specifické protilátky

DUSP2- *Dual Specificity Phosphatase 2*

ETAR – *Endothelin Type A Receptor* – endotelinový receptor typu A

ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

ELISPOT - *Enzyme-Linked ImmunoSpot*

FCGR1 - *Fc gamma receptor Ib* (CD34)

FCXM – *Flow Cytometry Crossmatch* – křížová zkouška detekovaná průtokovou cytometrii

FGF-2 – *Fibroblast Growth Factor 2* – růstový faktor fibroblastů

FLT3 - *Fms-like Tyrosine kinase-3*

HGF – *Hepatocyte Growth Factor* – růstový faktor hepatocytů

HLA – *Human Leukocyte Antigen* – Hlavní histokompatibilní systém

HSP – *Heat Shock Protein* – protein tepelného šoku

ICAM 1– *Intercellular Adhesion Molecule 1* (CD54)

ICOS - *Inducible T Cell Costimulator* (CD278)

IDO – *Indoleamine- 2,3 - dioxygenase*

IFN – *Interferon*

IHWS – *International Histocompatibility Workshops* – Mezinárodní workshop imunogenetické společnosti

IKEM – *Institute Clinical and Experimental Medicine* – Institut Klinické a Experimentální Medicíny

IL – *Interleukin*

ILT – *Ig-like transcript*

ISHLT – *International Society for Heart and Lung Transplantation* – Odborná společnost pro transplantace srdce a plic

ITAC – *Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant*

KIR – *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor* – receptor NK buněk

KLRD1 - *Killer Cell Lectin Like Receptor D1* (CD94)

LAG3 - *Lymphocyte Activating 3* (CD 223)

LCP2 - *Lymphocyte Cytosolic Protein 2*

LFA1 - *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*

LLPC – *Long-Lived Plasma Cell* – dlouhožijící plazmatické buňky

MAC – *Membrane Attack Complex* – terminální produkt komplementové kaskády

MFI – *Mean Fluorescent Intensity* – střední hodnota intenzity fluorescence

MHC – *Major Histocompatibility Complex* – Hlavní komplex tkáňové slučitelnosti

MICA – *MHC class I-related chain A*

Mig – *Monokine Induced by Interferon gamma*

MMDx – *Molecular Microscope Diagnostic system* – Molekulární mikroskop

NGS – *Next Generation Sequencing* – sekvenování druhé generace

NK – *Natural Killer Cells* – Přirození zabíječi

PBMC - *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – periferní mononukleární buňky

PCR – *Polymerase Chain Reaction* – polymerázová řetězová reakce

PLA1A - *Phospholipase A1 Member A*

ROBO4 - *Roundabout Guidance Receptor 4*

SAB - *Single Antigen Beads* – analyzační kuličky metody Luminex vázající vždy jen jeden antigen

SIRPG - *Signal Regulatory Protein Gamma*

SSOP – *Sequence-Specific Oligonucleotide Probes* – sekvenčně specifické oligonukleotidové sondy

SSP – *Sequence-Specific Primer* – sekvenčně specifické primery

SLAMF8 - *SLAM Family Member 8 (CD 353)*

PIRCHE – *Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes*

PRA – *Panel Reactive Antibodies* – panel reaktivní protilátky

RT-PCR – *Real Time PCR* – Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

TCMR – *T Cell-Mediated Rejection* – T-buňkami zprostředkovaná rejekce

Tfh – *T Follicular Helper Lymphocyte* – T folikulární pomocné lymfocyty

Tfr – *T Follicular Regulatory Lymphocyte* – T folikulární regulační lymfocyty

TGF – *Tumor Growth Factor* – tumor růstový faktor

TNF – *Tumor Necrosis Factor* – tumor nekrotizující faktor

VAD – *Ventricular-Assist Device* – mechanická srdeční podpora

VCAM-1 – *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*– endoteliální adhezivní molekula

VEDF – *Vascular endothelial growth factor* – endoteliální růstový faktor

Obsah

| | |
|---|----|
| Abstrakt..... | 5 |
| Abstract | 6 |
| Seznam zkratek | 7 |
| Obsah | 10 |
| 1. Úvod - rejekce..... | 12 |
| 2. Imunitní mechanismy rejekce | 14 |
| 2.1 HLA systém..... | 14 |
| 2.1.1 Historie a současnost HLA | 14 |
| 2.1.2 Genetika HLA systému | 15 |
| 2.1.3 HLA typizace | 17 |
| 2.1.4 Role HLA molekul v transplantačních reakcích | 17 |
| 2.2 Non HLA antigeny a non HLA protilátky | 20 |
| 2.2.1 MICA - <i>MHC class I-related chain A</i> | 23 |
| 2.2.2 AT1R – <i>Angiotenzin II Type I Receptor</i> | 24 |
| 2.2.3 ETAR – <i>Endothelin Type A Receptor</i> | 24 |
| 2.2.4 LG3 - Perlecan | 25 |
| 2.2.5 Kolageny | 26 |
| 2.2.6 Vimentin..... | 26 |
| 3. Rejekce..... | 27 |
| 3.1 T buňkami zprostředkovaná rejekce (TCMR – <i>T cell - mediated rejection</i>)..... | 28 |
| 3.2 Protilátkami zprostředkovaná rejekce (AMR – <i>Antibody Mediated Rejection</i>)..... | 31 |
| 3.2.1 AMR u orgánových transplantací | 32 |
| 3.2.2 Mechanismus patologického vlivu protilátek | 33 |
| 3.2.3 Preformované protilátky | 35 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.4 | <i>De novo</i> protilátky | 36 |
| 3.2.5 | Chronická rejekce | 38 |
| 3.2.6 | Diagnostika donor specifických protilátek | 38 |
| 3.2.7 | Diagnostické problémy odhojení transplantátu | 39 |
| 3.3 | Imunosupresivní terapie | 41 |
| 4. | Cíle práce | 43 |
| 5. | Seznam publikací spojených s tématem disertace | 44 |
| 6. | Výsledky a komentáře k publikacím | 45 |
| 6.1 | Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. | 45 |
| 6.2 | Bortezomib-containing regimen for primary treatment of early antibody-mediated cardiac allograft rejection: a case report. | 47 |
| 6.3 | Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. | 49 |
| 6.4 | Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes | 50 |
| 7. | Diskuze | 52 |
| 8. | Závěr | 64 |
| 9. | Publikační činnost | 65 |
| 9.1 | Publikace s impact faktorem | 65 |
| 9.2 | Publikace bez impact faktoru: | 66 |
| 9.3 | Abstrakta | 67 |
| 10. | Seznam použité literatury | 75 |
| 11. | Příloha 1: Seznam detekovatelných non HLA protilátek | 90 |
| 12. | Příloha 2: Citované on-line odkazy | 92 |
| 13. | Příloha 3: Publikace spojené s disertací | 93 |

1. Úvod - rejekce

Jak adaptivní, tak přirozený imunitní systém příjemce reagují po setkání s neshodnými antigeny dárce, které se vyskytují na transplantovaném orgánu. Kromě erytrocytárních antigenů mají vysokou míru exprese antigeny Hlavního Histokompatibilního Komplexu (HLA – *Human Leukocyte Antigen*). Recentní studie však v posledních letech poukazují na přítomnost a velkou genovou diversitu rovněž non HLA antigenů. Mezi tyto antigeny lze zařadit i tzv. „minor“ antigeny, což jsou polymorfní peptidy kódované mimo oblast HLA, které dokáží stimulovat aloreaktivní T lymfocyty a vyvolat imunitní odpověď (1-3). Vůči antigenům, které imunitní systém příjemce rozpozná jako cizí, vzniká imunitní odpověď (rejekce) či naopak ve výjimečných případech může nastat imunitní tolerance (4).

Rejekce se může vyskytnout bezprostředně po transplantaci, kdy k nevratnému poškození dochází během několika hodin, dokonce i minut (*accelerated antibody-mediated rejection – AMR*, neboli *hyperacute rejection*) anebo následně v řádu dnů až týdnů (*delayed accelerated acute AMR*). S hyperakutní rejekcí se dnes v klinické praxi setkáváme zcela výjimečně díky preemptivní diagnostice imunologického rizika (vyšetřování preformovaných HLA specifických protilátek u pacientů před transplantací), cytotoxickému crossmatch testu (křížová zkouška) s buňkami dárce bezprostředně před transplantací a v neposlední řadě respektování kompatibility krevních skupin. Akutní rejekce vyskytující se během prvních tří měsíců po transplantaci však stále představuje velké riziko pro pacienty, ve smyslu poškození štěpu a omezení dlouhodobého přežití štěpu s dobrou funkcí. Pokud se rejekce rozvine v horizontu několika let po transplantaci, hovoříme o chronické formě rejekce, což je v současné době hlavní problém dlouhodobého přežívání štěpu s nejasnou terapeutickou indikací.

Jak bylo uvedeno výše, na imunitní odpovědi vůči transplantovanému štěpu se podílí složky jak adaptivní, tak i přirozené imunity. Reakce začíná vlastním rozpoznáním cizího antigenu, regulací imunitní odpovědi pomocí kostimulačních signálů a vhodného cytokinového prostředí s následnou efektorovou fází, která se může projevit jak buněčnou cytotoxickou odpovědí, tak protilátkovou reakcí, jejichž výsledkem je poškození štěpu.

Morfologické změny způsobené rejekcí se v biopsích hodnotí dle patologické klasifikace, u ledviných štěpů dle tzv. *Banffské klasifikace* (5), která je výchozí i pro ostatní orgánové transplantace. Podle této mezinárodní klasifikace se rejekce dělí na dva základní typy, T buňkami zprostředkovaná rejekce (TCMR – *T cell - mediated rejection*) a protilátkami zprostředkovaná

rejekce (AMR – *antibody -mediated rejection*). Jak ukazují zkušenosti z posledních let dichotomické dělení je neúplné, a proto neustále dochází k rozšíření a specifikaci nových diagnostických kritérií (5-7). Hlavními důvody jsou nedostatečná definice všech typů klinicky se projevujících rejekcí a rychle se vyvíjející diagnostické laboratorní metody, které přinášejí další informace o mechanismech a patogenezi rejekce.

Diagnostika rejekce se určuje podle klinických příznaků (liší se v závislosti na transplantovaném orgánu), laboratorních vyšetření a histologickém nálezu v biopsii. Od roku 2022 se v některých transplantčních centrech, včetně IKEM, diagnóza opírá i o nové znalosti genových expresí v transplantovaném orgánu, nálezy v tzv. molekulárním mikroskopu (MMDx - *Molecular Microscope Diagnostic system*), které vykazují velmi dobrou specifitu i senzitivitu a pomáhají diagnostikovat klinicky komplikované případy.

Vzhledem ke komplexnosti a vzájemnému propojení různých složek imunitního systému je přesná diagnostika rejekce, optimalizace prediktivních markerů a nových terapeutických přístupů předmětem mnoha multicentrických studií (CTS Collaborative Transplant Study, TRANSFORM, BENEFIT, RITUX-ERAH, CISTCERT, STAR atd.).

2. Imunitní mechanismy rejekce

2.1 HLA systém

Antigeny hlavního histokompatibilního systému (MHC – *Major Histocompatibility Complex*), u lidí nazývané HLA antigeny (*Human Leukocyte Antigens*), iniciují nejsilnější imunitní odpověď vzhledem k vysoké buněčné expresi a vysokému polymorfismu.

2.1.1 Historie a současnost HLA

HLA antigeny byly poprvé popsány v padesátých letech minulého století prakticky současně Jeanem Daussetem (Francie) (8), Jon van Roodem (Nizozemí) (9) a Rose Payne (USA) (10). Dausset testoval séra pacientů po opakovaných transfúzích, tato séra vykazovala složitou aglutinační reaktivitu s testovanými leukocyty některých dárců krve, což bylo následně vysvětleno přítomností anti HLA protilátek. Pomocí aglutinačních testů Dausset definoval první HLA antigen A2 (původně nazván MAC). Tento objev umožnil další rozvoj nejen transplantační medicíny a byl oceněn Nobelovou cenou v roce 1980. Nutno dodat, že o objev HLA systému se výrazně zasloužili i Českoslovenští vědci – mezi nimi Pavol a Dagmar Ivanyi, kteří pracovali v laboratoři J. Dausseta v 60. letech v Paříži, jejichž zásluhy bohužel nebyly nikdy dostatečně oceněny (11). Objev dalších HLA antigenů následoval a byl ve velké části podmíněn mezilaboratorní spoluprací (IHWS-*International Histocompatibility Workshops*) za účelem sjednocení metodik detekce HLA antigenů a vytvořením HLA nomenklatury. V 60. letech zásluhou hlavně Paula Terasakiho komplement dependentní cytotoxický test se stal standardní technikou jak na serologickou typizaci HLA, tak na detekci protilátek proti HLA (12). S optimalizací (mikro)serologické metodiky v 70.-80. let minulého století a s rozvojem molekulárně biologických metod využívajících PCR (polymerázovou řetězovou reakci), došlo k objasnění struktury HLA komplexu (13, 14).

2.1.2 Genetika HLA systému

HLA geny jsou lokalizované na krátkém raménku šestého chromozómu (15) a jsou velmi polymorfní, existuje více než 37000 alel dle IMG/HLA Database 2023 (16) a jejich počet neustále roste. HLA geny se dědí jako sada a geny jsou v tzv. vazebné nerovnováze, což znamená, že určité kombinace genů (alel), tzv. haplotypy, se dědí často společně a mají mezi sebou nízkou frekvenci rekombinace. Alely se exprimují kodominantně, tzn. každý jedinec exprimuje dva HLA antigeny v každém lokusu. Geny v prvním a druhém regionu kódují HLA antigeny I. a II. třídy, zatímco geny ve třetím regionu kódují některé složky komplementu (C2, C4, Faktor B), „heat shock“ proteiny (Hsp 70), tumor nekrotizující faktor (TNF-alfa), podjednotky proteazomu atd., které nesouvisí funkčně s HLA (17) .

2.1.2.1 HLA antigeny I. třídy

HLA-A, B, C jsou exprimovány na jaderných buňkách, jejich exprese se ale v různých tkáních výrazně liší. Molekuly antigenů HLA I. třídy jsou složeny z α řetězce, který je asociován s podjednotkou $\beta 2$ mikroglobulinu. Podjednotka α je složena ze tří domén, přičemž $\alpha 1$ a $\alpha 2$ doména tvořící vazebnou jamku pro antigen je kódovaná exonem 2 a 3, třetí doména je kódovaná exonem 4, exon 5 kóduje transmembránovou oblast a exony 6 a 7 kódují cytoplazmatickou část. Ve vazebné jamce jsou ukotveny peptidy o délce 8-11 aminokyselin (v závislosti na restrikci HLA a imunodominanci). Hlavní funkcí molekul HLA I. třídy je prezentace vlastních endogenních peptidových fragmentů a také virových peptidů a intracelulárních proteinů, které označují poškození buňky. Tyto antigeny jsou rozeznávány $CD8^+$ T lymfocyty, ovšem některé HLA antigeny I. třídy fungují jako ligandy pro receptory NK buněk (tzv. KIR receptory - *Killer Immunoglobuline-like Receptors*).

2.1.2.2 HLA antigeny II. třídy

HLA-DR, DQ, DP se vyskytují na buňkách prezentující antigen (APC – *Antigen Presenting Cell*) - dendritické buňky, B lymfocyty, aktivované T lymfocyty, monocyty/makrofágy, epiteliální buňky thymu atd. Za určitých podmínek se HLA antigeny II. třídy mohou exprimovat i na buňkách, na kterých se za normálních podmínek nevyskytují, např. vlivem produkce Interferonu gama mohou být DR antigeny exprimovány i na tubulárních buňkách ledvinového štěpu, anebo

na endoteliálních buňkách. Molekuly HLA antigenů II. třídy jsou heterodimery složené z polymorfních α a β podjednotek spojené nekovalentní vazbou. U DQ a DP antigenů je vysoký polymorfismus v α a β podjednotce, ale u DR antigenů je polymorfismus α podjednotky velmi omezený. Mezi lokusy DP a DQ existuje slabá vazebná nerovnováha (*recombination hotspot*), a proto je velmi častá neshoda v DP lokusu, ačkoliv v ostatních HLA lokusech mohou být pacient s dárcem orgánu shodní (18). Vazebnou jamku tvoří N-terminální domény obou podjednotek, které jsou na svých koncích více otevřené a umožňují tak vazbu peptidů o delší aminokyselinové sekvenci (až 35 aminokyselin). Hlavní funkcí HLA antigen II. třídy je prezentace exogenních peptidů pro CD4⁺ T lymfocyty (19).

2.1.2.3 Neklasické HLA antigeny

Mezi HLA antigeny řadíme ještě tzv. neklasické HLA antigeny (HLA-E, F, G), které jsou strukturně podobné s antigeny HLA I. třídy, ale jsou méně polymorfní (např. HLA – G má pouze 88 alel). Jejich význam je zejména imunomodulační, dokáží navodit toleranci ve vztahu matka – plod (HLA-G exprimovaný na povrchu trofoblastu), jejich role byla potvrzena i u autoimunitních a nádorových reakcí a uvažuje se i o jejich možném potenciálu v transplantační imunologii. Například HLA-G vykazuje inhibiční účinek na proliferaci a diferenciaci buněk, což by mohlo přispět k přijetí štěpu po transplantaci (20).

V periferní krvi **HLA-G** lze detekovat na různých imunitních buňkách (monocyty/makrofágy, regulační T-buňky, CD4⁺ T-buňky, CD8⁺ cytotoxické T-buňky a dendritické buňky) a jejich exprese je ovlivněna protizánětlivými cytokiny (zejména IL-10, IL-4). Po interakci s příslušnými receptory (ILT – *Ig-like transkript*, KIR – *Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*, CD8 atd.) na imunitních buňkách dochází k inhibici proliferace, diferenciaci, produkce cytokinů a inhibici dalších mechanismů, což naznačuje jejich možnou roli v navození transplantační tolerance.

Exprese **HLA-E** antigenů je indukována IFN gama. Ačkoliv se u lidí vyskytuje pouze v 9 alelických formách, nejčastější varianty jsou dvě, HLA-E*0101 a HLA-E*0103. HLA-E antigeny jsou rozeznávány inhibičními receptory NK buněk (NKG2A). Uvažuje se, že zvýšená exprese HLA-E molekul by mohla přispět k navození imunologické tolerance štěpu, což naznačují xenotransplantace u experimentálních prasečích modelů (21-23).

HLA-F antigeny nejsou dosud dostatečně probádány ve vztahu k orgánovým transplantacím.

2.1.3 HLA typizace

Definice variant HLA genů, neboli alel, se dnes výlučně provádí pomocí molekulárně biologických metod využívající polymerázovou řetězovou reakci, jako je PCR-SSP (*Sequence-Specific Primer*), PCR-SSOP (*Sequence-Specific Oligonucleotide Probes*), RT-PCR (*Real Time*) a NGS (*Next Generation Sequencing*). Podrobnější charakteristika metodik HLA typizace je snadno dostupná v literatuře a není předmětem tohoto krátkého přehledu. V posledních letech se HLA geny určují zcela běžně na úrovni vysokého rozlišení, tzv. *high resolution*, jednak kvůli přesnějšímu určení míry shody mezi dárcem a příjemcem, jednak pro důkladnou definici specifity donor-specifických protilátek (DSA – *Donor Specific Antibodies*). Míra HLA shody mezi antigeny příjemce a dárce je jedním z hlavních faktorů ovlivňující následné imunologické komplikace po transplantaci (24-28).

Přesné určení variant HLA genů ve vysokém rozlišení umožňuje charakterizaci epitopů HLA antigenů. Každý HLA antigen má jedinečnou kombinaci epitopů, přičemž jednotlivé epitopy mohou být společné pro více antigenů. Zatímco současná antigenní neshoda je omezena popisem dvou molekul HLA jako shodných nebo neshodných, epitopová analýza umožňuje podrobnější posouzení stupně odlišnosti mezi dárcem a příjemcem. Ukazuje se, že některé antigenní epitopy jsou více imunogenní a že imunitní systém dokáže reagovat vůči více neshodným epitopům vyskytujícím se na jediné molekule HLA (29, 30). Substituce aminokyselin u prezentovaných peptidů, mohou také vyvolat imunitní odpověď proti novým konformačním epitopům (2). Tyto nové poznatky umožnily vývoj programů jako HLA Matchmaker (31), PIRCHE algoritmus (*Predicted Indirectly Recognizable HLA Epitopes*) (32) a taky usnadnily zavedení postupu, tzv. virtuální crossmatch, který se teď využívá v alokaci orgánů v Eurotransplantu, USA, ČR (IKEM) a dalších státech.

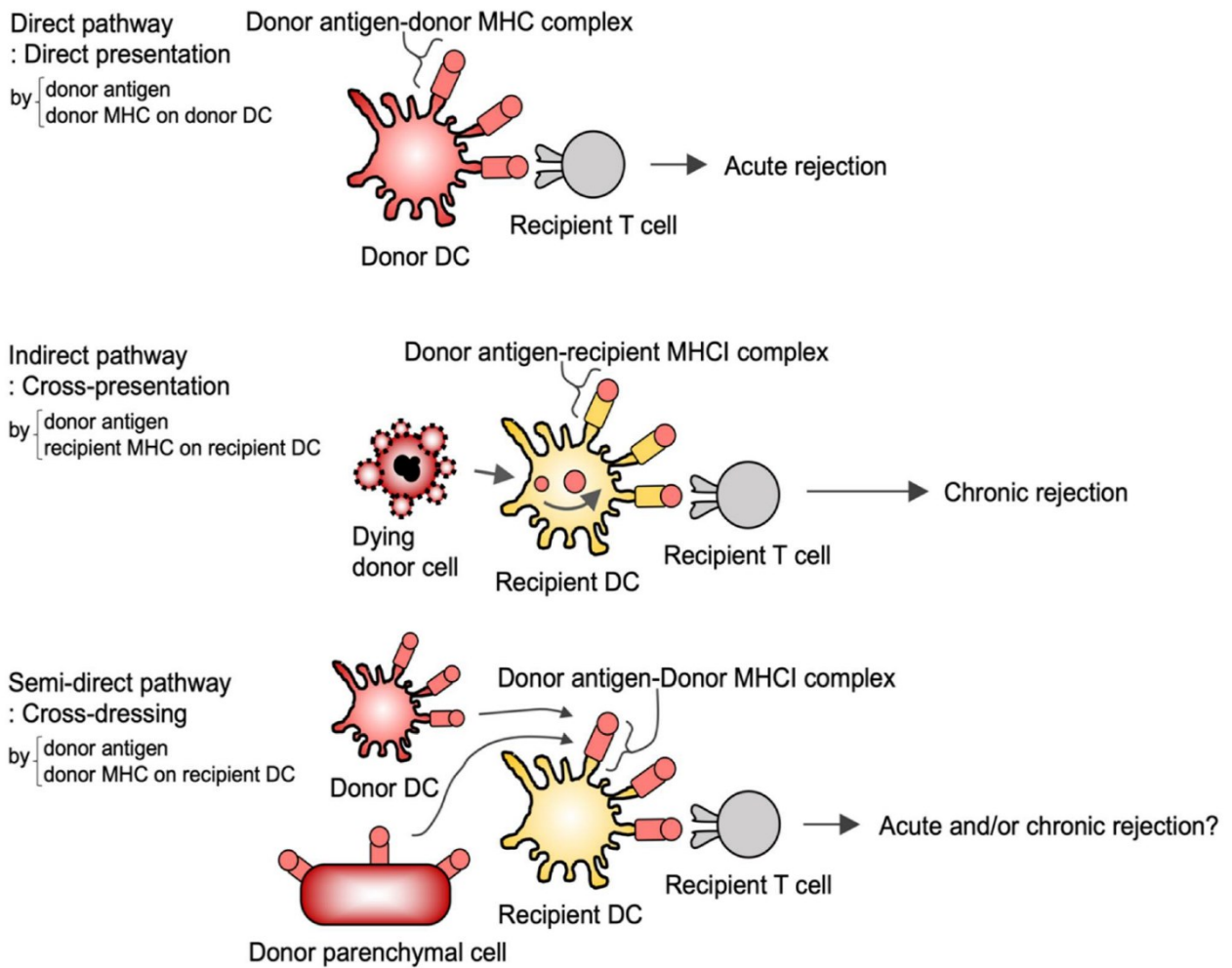
2.1.4 Role HLA molekul v transplantačních reakcích

Jak již bylo uvedeno, biologickou funkcí HLA molekul je prezentace antigenů imunitnímu systému. Neshodné HLA molekuly jsou rozeznávány imunitním systémem třemi různými způsoby (Obr.1): přímou cestou (*direct pathway*), nepřímou cestou (*indirect pathway*) a *semi-direct pathway*, což je varianta přímé cesty rozpoznávání.

Při přímé cestě dochází k rekognici neshodného HLA antigenu na dárcovských APC (*Antigen Presenting Cell*), jejichž aktivace je po transplantaci stimulována prozánětlivými cytokiny uvolněnými vlivem ischemicko-reperfúzního poškození. Díky polyklonální aktivaci prekurzorů aloreaktivních T lymfocytů (1-10 % všech cirkulujících T lymfocytů, což je velmi vysoká frekvence) je tento typ rozpoznávání příčinou časně akutní celulární reakci (33, 34). Tento typ rozpoznávání se uplatňuje zejména v prvních dnech po transplantaci, protože následně dochází k přirozené eliminaci APC dárce.

Nepřímé rozpoznávání antigenu se neliší od rozpoznání jakéhokoli extracelulárního antigenu, přetrvává celou dobu po transplantaci a je to taky jeden z hlavních důvodů rozvoje chronické imunologické rejekce. APC příjemce nejprve zpracovávají a následně prezentují neshodné dárcovské HLA antigeny na vlastních HLA molekulách II. třídy v podobě peptidových fragmentů. K prezentaci HLA antigenů dochází v sekundárních lymfoidních orgánech (uzlina, slezina), popřípadě APC příjemce mohou migrovat přímo do štěpu. Z buněčné membrány endoteliálních buněk se mohou také uvolnit extracelulární váčky, které obsahují řadu membránových autoantigenů (non HLA antigeny) a které také mohou stimulovat imunitní odpověď nepřímou cestou (35).

K dalšímu způsobu rozpoznávání, tzv. semi-direct pathway, neshodných antigenů dochází, pokud příjemcovy APC pohltní extracelulární vesikuly obsahující celou dárcovskou HLA molekulu I. i II. třídy a prezentují ji pak na svém povrchu (36) anebo pomocí trogocytózy, na základě buněčného kontaktu, dojde k přenosu části membrány obsahující HLA molekuly dárce na APC příjemce (*MHC cross-dressing*) (37-39).



Obr 1: Způsoby rozeznávání dárcovského antigenu imunitním systémem příjemce: přímá cesta (T lymfocyty příjemce rozeznávají neshodné antigeny na dárcovských buňkách), nepřímá cesta (T lymfocyty příjemce rozeznávají neshodné antigeny na prezentované na vlastních APC) a polopřímý způsob rozeznávání (T lymfocyty příjemce rozpoznávají cizí antigeny prezentované na dárcovských HLA molekulách vyskytující se na vlastních APC).

Převzato z Nakayama et al., 2021(39)

2.2 Non HLA antigeny a non HLA protilátky

Na význam non HLA antigenů, respektive protilátek proti non HLA, začaly poukazovat první studie již v 90. letech minulého století (40-43), kdy byly zaznamenány případy u příjemců s plnou HLA shodou s dárcem (tzv. *full house*), anebo pacientů bez prokázaných anti HLA specifických protilátek, u kterých proběhla akcelerovaná protilátkami zprostředkovaná rejekce s následnou ztrátou funkce štěpu. Multicentrické studie HLA identických příjemců a dárců pak potvrdily, že na rozvoj rejekce a ztrátu funkce štěpu při dlouhodobém sledování (10let) mají vliv i protilátky pravděpodobně nenamířené proti HLA antigenům (44, 45).

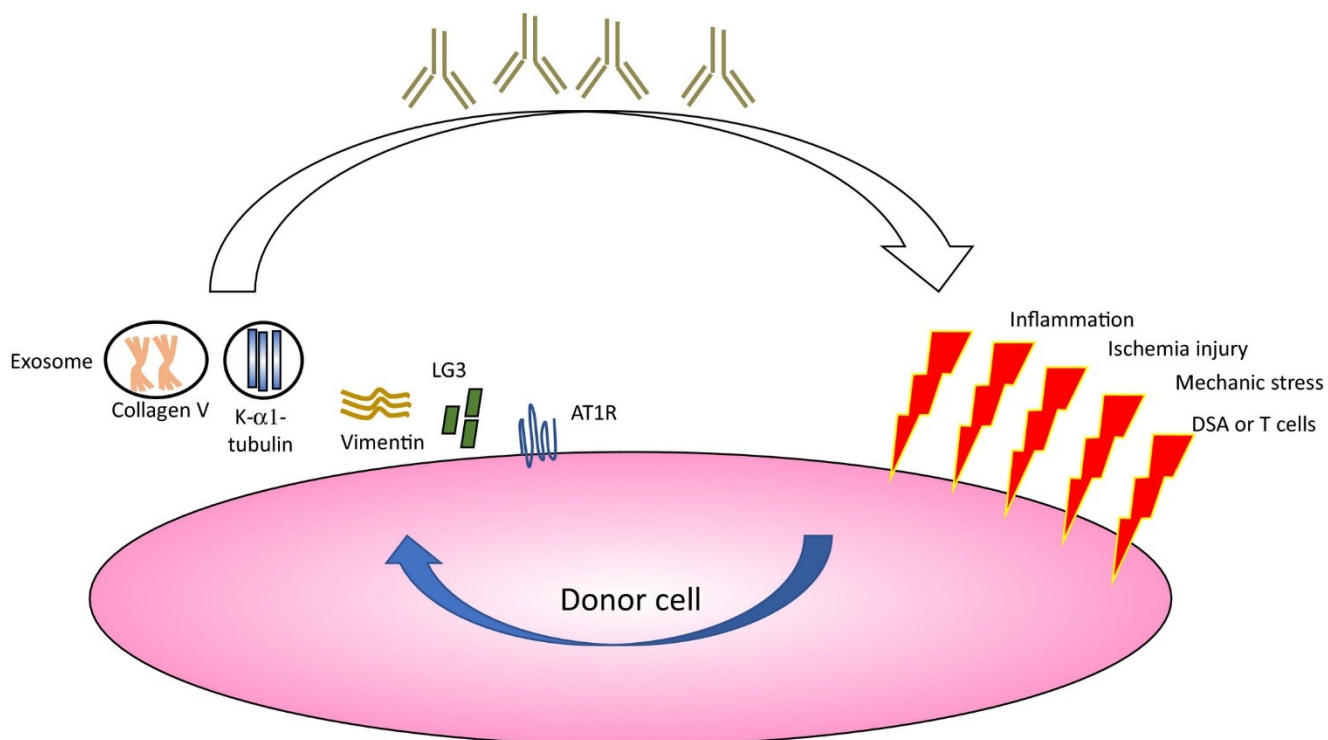
Non HLA antigeny se vyskytují na různých buňkách (endoteliální buňky, tubulární epiteliální buňky, podocyty atd.) (35). Mohou to být polymorfní antigeny s podobnou strukturou jako HLA antigeny (např. MICA - *MHC class I-related chain A*, MICB) anebo tkáňově specifické autoantigeny (např. AT1R – *Angiotenzin II type I Receptor*, ETAR – *Endothelin Type A Receptor*, skupina kolagenů, myosin). Krom extracelulárních antigenů byly prokázány i intracelulární (cytosolické) proteiny (např. Vimentin, Tubulin, Apolipoprotein L2, Glutathion S-transferaza theta 1(46)), k jejichž expozici na povrch buňky může dojít na základě poškození buněk (47). Také apoptotické buňky, vznikající během poškození štěpu, mohou exprimovat na svém povrchu intracelulární antigeny, které iniciují protilátkovou odpověď (tvorbu non HLA protilátek). Uvolnění autoantigenů může být vyvoláno i protilátkami proti HLA, které způsobily poškození endotelu.

Non HLA protilátky mohou reagovat vůči nepolymorfním antigenům, které jsou stejné u příjemce a dárce orgánu (autoprottilátky), anebo se vázat na polymorfní neshodné antigeny dárce (např. MICA). V klinice je velmi obtížné rozlišit, zda protilátky namířené proti receptoru AT1R, vimentinu, kolagenu... atd., které byly opakovaně zaznamenány v cirkulaci příjemců transplantátu, jsou namířeny proti polymorfním částem těchto proteinů (aloprottilátky), nebo jsou spíše výsledkem poruchy vlastní tolerance (autoprottilátky) (3). Klíčovou roli v tvorbě autoprottilátek hraje fenomén sdílených epitopů, ztráta tolerance vůči vlastním antigenům a zkřížená reaktivita protilátek (35).

Přesný mechanismus patogeneze není dosud dostatečně vyjasněný, stejně jako vzájemné působení HLA a non HLA protilátek (48, 49) (Obr.2). Jako jedny z nejvýznamnějších non HLA antigenů můžeme považovat antigeny, které jsou exprimované na endotelu cév (receptory spřažené s G proteiny - AT1R, ETAR, LG3; a MICA). Již během mozkové smrti a procesu

odebírání orgánu dochází k aktivaci endotelu, což se projeví zvýšením exprese těchto antigenů. Procesy spojené s endoteliální dysfunkcí pokračují během ischemie a reperfuzeního poškození a mohou být posíleny také základními imunosupresivy (např. inhibitory kalcineurinu). Opakovaná mikrovaskulární poranění endotelu a pokusy o jeho opravu vedou ke zhoršení dodávky kyslíku, aktivaci různých vazoaktivních systémů a nakonec k fibróze štěpu (50). Společným znakem působení non HLA protilátek je mikrovaskulární zánětlivá reakce anebo nespecifické chronické poškození štěpu s výrazně menším podílem C4d depozit (49). Menší zastoupení C4d depozit poukazuje, že non HLA protilátky mohou být aktivátory komplementu, což potvrdily například studie MICA protilátek, u pacientů po transplantaci ledvin i srdce (51-54). Nicméně, ne ve všech případech musí být cytotoxický efekt non HLA protilátek závislý na aktivaci komplementu, jak dokazují studie při kterých byl komplement deaktivován pomocí antirejekční terapie (Eculizumab – monoklonální protilátka proti C5 složky komplementu) (55, 56). Předpokládá se, že cytotoxickou reakci mohou zapříčinit i NK buňky, případně některé druhy T lymfocytů, které svým aktivačním receptorem NKG2D váží právě MICA antigeny (57). Rovněž se uvažuje o imunomodulačních účincích non HLA protilátek, např. zvýšení exprese adhezivních molekul u endoteliálních buněk, ovlivňování produkce prozánětlivých cytokinů (IL-1beta, TNF-alfa) atd. (49, 58). Mechanismus působení těchto protilátek tedy zahrnuje široké spektrum procesů, které jsou zřejmě spojeny i s dalšími patologickými ději.

Dnes lze detekovat přes 60 různých non HLA protilátek pomocí metod pevné fáze (Luminex, ELISA), případně pomocí průtokové cytometrie (XM-ONE test), viz. Příloha 1. Nejvíce informací v literatuře máme dosud o protilátkách MICA a AT1R, u nichž byla ve vztahu k orgánovým transplantacím prokázána asociace s protilátkami zprostředkovanou rejekcí. Další non HLA antigeny, resp. protilátky, jsou předmětem intenzivních studií a staly se i jedním z témat IHWS (*International Histocompatibility Workshops*) v roce 2022. Odborná pracovní skupina STAR Tambur et al. (49), hodnotila práce zabývající analýzou non HLA protilátek publikovanými mezi lety 2010-2022. Tato studie upozorňuje na rozdílné přístupy k analýze jednotlivých studií. Zároveň bylo potvrzeno synergické působení non HLA a HLA protilátek, stejně jako na vzájemné působení non HLA protilátek (např. AT1R a ETAR). Nicméně stále však není jasné, co je příčinou tvorby těchto protilátek (infekce, ischemické poškození nebo *de novo*/rekurentní onemocnění atd.) a jak přesně tyto protilátky přispívají k poškození a rejekci štěpu.



Obr 2: Non HLA Antigeny a reakce non HLA protilátek: Poškození buněk štep (zánětlivou reakcí, ischemií, stresem, působením HLA DSA protilátek nebo T lymfocyty) vyvolá zvýšenou expresi non HLA antigenů (např. AT1R) nebo uvolnění intracelulárních antigenů (např. kolageny, tubulin, vimentin atd.) což vede k produkci non HLA protilátek. Ty mohou opět přispívat k dalšímu buněčnému poškození.

Převzato z Zhang et al., 2020 (59)

Seznam detekovatelných non HLA protilátek pomocí metody Luminex je uveden v **Příloze 1**.

2.2.1 MICA - *MHC class I-related chain A*

Nejvíce informací o non HLA antigenech máme dosud o MICA antigenech, respektive anti MICA protilátkách. Ačkoliv tyto antigeny mají podobnou trojrozměrnou strukturu jako antigeny HLA I. třídy, nejsou asociovány s β 2mikroglobulinem a jejich biologická funkce je odlišná, tzn. že neprezentují peptidy. MICA antigeny vykazují vysoký polymorfismus, přesto v porovnání v antigeny HLA I. třídy je diversita MICA antigenů výrazně menší (400 alel MICA versus 8000 alel HLA-B - dle databáze <https://hla.alleles.org/>). MICA se vyskytují jak na endoteliálních, tak na epiteliálních buňkách, fibroblastech či monocytech. Jejich exprese je ovlivněna cytokinovým prostředím, obecně lze říci, že jejich exprese se na buňkách zvyšuje ve stresových podmínkách.

První práce byly zaměřeny na význam MICA protilátek ve vztahu k potransplantačnímu průběhu, kdy byl prokázán vliv MICA protilátek na časnou akutní vaskulární rejekci i chronickou rejekci (60-63). Ve vztahu k dlouhodobému přežití štěpu se však názory na působení MICA protilátek neshodují (64). Dle našich dat (diplomová práce Váľhová Š., 2013) pacienti s MICA protilátkami před transplantací ledvin měli horší 7 leté přežití štěpu po transplantaci ledviny, na rozdíl např. od studie Lemy et al. (64), kde bylo sledováno 10 leté přežití štěpu. Častější výskyt těchto protilátek pozorujeme u retransplantovaných a u vysoce senzitivizovaných pacientů. MICA protilátky se často vyskytují v kombinaci s HLA protilátkami, jsou polyreaktivní a ve výjimečných případech mohou fixovat i aktivovat komplement (54). Nicméně se předpokládá, že patologický efekt těchto protilátek nastává po vazbě aktivačního NKG2D receptoru NK buněk a některých typů T lymfocytů (NKT lymfocyty, $CD8^+$ $\alpha\beta$ T lymfocyty, $CD4^+$ lymfocyty, $\gamma\delta$ T lymfocyty), jak již bylo zmíněno (65). Jelikož MICA antigeny nejsou exprimovány na lymfocytech, nelze zachytit přítomnost protilátek proti MICA antigenům klasickým microcytotoxickým testem, ale jejich detekce je možná pomocí metod pevné fáze (Luminex). Dnes již víme, že i samotná shoda v MICA antigenech je dalším z faktorů ovlivňující imunitní odpověď po transplantaci, nicméně typizace MICA antigenů není dosud zařazena do žádného alokačního programu a také samotné určení specificity MICA protilátek vůči dárcovským MICA antigenům není rutinně prováděno (65). V práci Sapák et al. (66) bylo ukázáno, že tvorba MICA protilátek nemusí být jen donor specifická, ale že nemalá část pacientů (59%) po transplantaci ledvin často tvoří MICA protilátky i proti jiným specificitám MICA antigenů a i proti vlastním autoantigenům MICA (36% pacientů), což naznačuje, že k indukci protilátek MICA nedochází pouze v důsledku vlastní alogenní stimulace, ale také v důsledku dalších dosud nejasných faktorů.

2.2.2 AT1R – *Angiotenzin II Type I Receptor*

Jedná se o transmembránový G protein, vysoce exprimovaný endotelovými buňkami a buňkami hladkého svalstva renálního cévního řečiště, mezangiálními buňkami, podocyty, proximálními tubulárními epiteliálními buňkami a intersticiálními buňkami z vnitřního pruhu zevní dřeně (35) (Obr 3).

Protilátky proti tomu receptoru byly poprvé popsány Dragun et al. v roce 2005 (67) ve vztahu k maligní hypertenzi, steroid-refrakterní vaskulární rejeckci a snížené funkci štěpu. Na základě této práce bylo dalšími studii prokázáno, že přítomnost těchto protilátek, a to jak před transplantací, tak po ní, je spojena s rozvojem různých fenotypů rejeckce a také s negativním dopadem na funkci a přežití renálního štěpu (68). Přítomnost těchto protilátek byla zaznamenána taky u transplantovaných srdcí (69) a u pacientů, kteří dostali mechanickou srdeční podporu (70).

AT1R protilátky jsou považovány za autoprotilátky, mají schopnost fixovat komplement (podtřída IgG1 a IgG3), nicméně se předpokládá, že jejich patologický účinek je spíše nezávislý na komplementu přímo působí na endoteliální buňky (50). Uvolněním endoteliálního růstového faktoru se aktivuje koagulační kaskáda a dochází k vzniku trombů. Stimulací AT1R přítomného na povrchu zánětlivých buněk, zejména polymorfonukleárů, monocytů a B a T lymfocytů, dochází k zesílení mikrovaskulární zánětlivé odpovědi, což může vést k dalšímu poškození endotelu (35).

AT1R protilátky se stanovují metodou ELISA (*Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay*) a nejsou dosud předmětem rutinního vyšetření pacientů před transplantací.

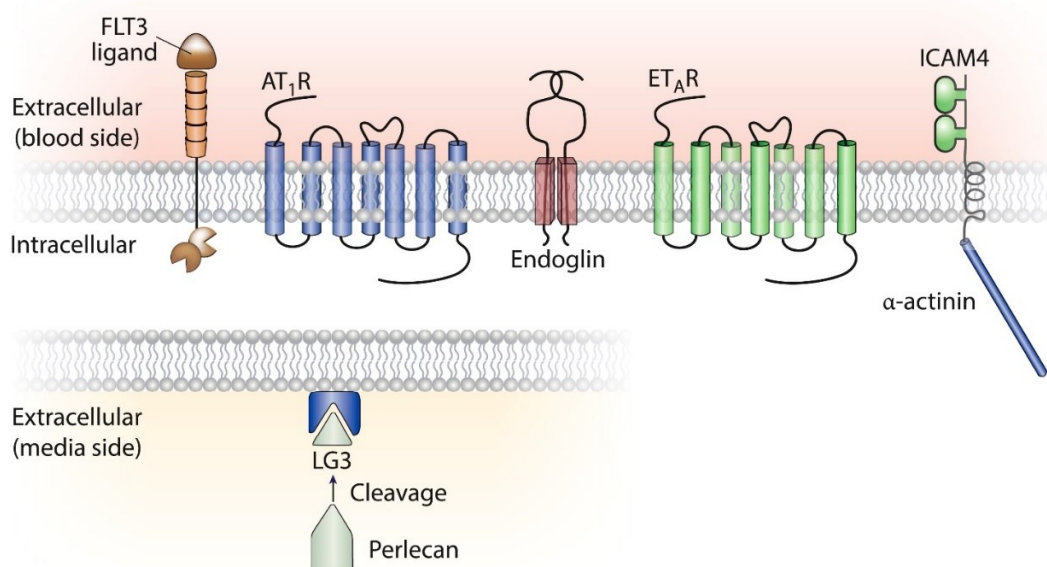
2.2.3 ETAR – *Endothelin Type A Receptor*

Patří také do skupiny G - proteinových receptorů, které váží proteiny endoteliny, jejichž primární hlavní funkcí je vasokonstrikce cév (Obr. 3.). Proto se receptory ETAR nachází především v buňkách, které jsou schopné kontrakce (buňky hladkého svalstva cév, mezangiální buňky, pericyty buněk sestupných svazků vasa recta) a také v ledvinných tubulech. Pearl et al. (71) prokázali, že protilátky anti-ETAR jsou často spojeny s přítomností protilátek anti-AT1R. Tato kombinace vede k vzájemnému ovlivňování patologických účinků těchto protilátek a výskyt obou typů proteinů je spojen se zvýšenými hladinami IL-8, arteritidou, a sníženou funkcí transplantované ledviny.

Protilátky anti-ETAR jsou podtřídy IgG1 se schopností vázat komplement, ale jejich hlavní patologické působení spočívá v tom, že po vazbě na receptor dochází k aktivaci signálních drah, jejichž výsledkem je silná vazokonstrikce cév. Prodloužená aktivace receptorů vyvolává migraci fibroblastů, což vede k modifikaci v arteriálních stěnách, s následným zúžení lumen cév a snížení orgánové perfuze (72). Ve vztahu k hodnocení rejekce byl prokázán vliv protilátek ETAR u ledvinných i srdečních štěpů (73-75).

2.2.4 LG3 - Perlecan

Další ze skupiny G proteinů je bioaktivní C-koncový fragment perlekanu (označovaný jako LG3). Tento antigen je prostorově odlišný od předchozích proteinů, je obsažen v endoteliální bazální membráně a může tak působit jako neoantigen (Obr.3.). Většina studií se však shoduje, že tento antigen nemůže sám vyvolat poškození endotelu, ale že protilátky proti tomuto antigenu se objevují v kontextu s jinými non HLA protilátkami. Protilátky anti LG3 jsou třídy IgG1 a IgG3 a jejich působení je pravděpodobně závislé na komplementu.



Obr 3: Non HLA antigeny sprážené s G proteiny exprimované na povrchu endoteliálních buněk: AT₁R – angiotenzinový receptor, ET_AR – endotelinový receptor, LG3 – fragment Perlecanu. Další endoteliální molekuly FLT3 – ligand receptoru aktivující tyrozin kinázy, ICAM4 – adhezivní molekula, Endoglin – koreceptor pro rodinu ligandů TGF beta

Převzato z Dragun et al., 2016 (50)

2.2.5 Kolageny

Kolagen typu IV a fibronektin jsou důležitými složkami glomerulární bazální membrány, ale v případě poškození tkáně se stávají autoantigeny. Angaswamy et al. (76) ukázal ve své studii, že u pacientů po transplantaci ledvin, kteří produkovali protilátky proti kolagenu typu IV a fibronektinu došlo k významné aktivaci specifických T lymfocytů a k produkci IFN- γ a IL-17 a zároveň k významnému poklesu T lymfocytů produkujících IL-10. Tento nálezný demonstruje imunitní odpověď proti vlastním antigenům a ztrátu periferní tolerance. V nedávné studii Park et al. (77) navíc bylo prokázáno, že také protilátky proti kolagenu typu I a typu III jsou významně vyšší u pacientů s AMR a že přítomnost těchto protilátek byla spojena i se zvýšeným rizikem selhání ledvinného štěpu.

U kolagenů byla prokázána také zvýšená exprese na alveolárních epiteliálních buňkách plic a následná asociace s AMR u pacientů po transplantaci plic, u nichž se vyvinul BOS (*Bronchiolitis Obliterans Syndrome*). U pacientů po transplantaci plic je produkce non HLA protilátek velmi častá (až 70%) a lze je detekovat nejen v séru, ale i v bronchoalveolární laváži (78). Ve studii Rae et al. (79) bylo ukázáno, že pacienti tvoří autoprottilátky proti kolagenu typu V již před transplantací a že po transplantaci jen malá část těchto protilátek (26%) vymizí vlivem imunosupresivní terapie. Navíc přítomnost autoprottilátek předcházela vzniku *de novo* DSA po transplantaci, což značí interakci mezi alo- a autoimunitou. U těchto pacientů byla sledována i produkce autoprottilátek proti K- α 1 tubulinu. Protilátky K- α 1T přímo ovlivňují vznik obliterace dýchacích cest tím, že indukují zvýšení exprese fibrogenních růstových faktorů a fibroproliferaci (80).

2.2.6 Vimentin

Jedná se o intracelulární protein, který je součástí cytoskeletu a podílí se na buněčné signalizaci a proliferaci. Tyto proteiny mohou být exprimovány i extracelulárně anebo mohou být sekretovány makrofágy, endoteliálními buňkami, neutrofilami či apoptotickými T lymfocyty (59). Autoprottilátky proti tomuto antigenu mohou být asociovány s AMR, což bylo ukázáno u pacientů po transplantaci ledvin i srdce (81, 82). Ve studii See et al. (82) u pacientů po transplantaci srdce byly zaznamenány ve vztahu k AMR a selhání funkce štěpu i další non HLA protilátky (beta-tubulin, lamin A/C, apolipoprotein L2), což opět dokazuje na variabilitu non HLA protilátek a na obtížnou interpretaci dat při analýze non HLA protilátek.

Rejekce

Rejekce je odpověď imunitního systému příjemce vznikající na základě kontaktu s antigeny dárce (rozeznání cizích molekul). Na tomto patologickém procesu se podílí všechny složky imunitního systému a podle převahy jednotlivých složek lze rejekci rozdělit na T-buňkami zprostředkovanou (TCMR), protilátkami zprostředkovanou (AMR) a rejekci smíšenou. U termínu smíšená rejekce nepanuje jednotný názor, zda se jedná o dva nezávislé imunologické mechanismy probíhající současně či o důsledek působení jednoho imunologického procesu, který ovlivňuje druhý (6). Buňky přirozené imunity nejsou stimulovány přímo antigeny dárce, jejich aktivace je nespecifická, vyvolaná tkáňovým poškozením či infekčním agens, a často předchází či doprovází rejekci zánětlivou reakcí (83).

Endoteliální buňky transplantovaného orgánu jsou prvním místem, kde se imunitní systém příjemce setkává s antigeny dárce a kam míří svou primární odpověď. Endoteliální buňky exprimují na svém povrchu HLA antigeny I. třídy, ale vlivem stresových podmínek, nebo při poškození dochází k zvýšené expresi HLA antigenů II. třídy, non HLA antigenů (např. MICA) a k uvolnění intracelulárních molekul. Aktivací prozánětlivými cytokiny (TNF-alfa, IL-1beta) se na povrchu endoteliálních buněk zvyšuje exprese adhezivních molekul (např. P- selektin, ICAM-1, VCAM-1), které zpomalují pohyb cirkulujících buněk imunitního systému příjemce, umožní následnou interakci s endotelem a diapedézu (84).

Důležitou roli zde hrají i chemokiny, které jsou v první fázi po transplantaci produkovány právě endoteliálními buňkami a jsou nezbytné pro migraci leukocytů do štěpu (85). Chemokiny produkovány v časně fázi po transplantaci (např. CXCL1, CXCL2, CXCL8 - lze detekovat již 3 hodiny po transplantaci) atrahují neutrofile, makrofágy, NK buňky a T lymfocyty. Později vlivem lokální produkce IFN gama, chemokiny (např. Mig, I-TAC) řídí přísun alospecifických T lymfocytů. Zvýšené hladiny chemokinů jsou pozorovány také v pozdních fázích rejekce (u aterosklerózy nebo při fibróze), což naznačuje na možnost využití chemokinů jako biomarkerů rejekčního procesu (např. CXCL10) (86-88).

2.3 T buňkami zprostředkovaná rejekce

(TCMR – *T cell - mediated rejection*)

T buňkami zprostředkovaná rejekce zahrnuje buňky rozeznávající antigen, buňky regulující imunitní odpověď a buňky efektorové/paměťové. Velké multicentrické studie ukázaly, jak počet antigenních neshod (v HLA i non HLA antigenech) má signifikantní vliv na rozvoj rejekce a přežití štěpu (27, 45, 89). Neshodné epitopy HLA antigenů jsou rozpoznávány T lymfocyty příjemce pomocí TCR receptorů (HLA I. třídy jsou rozeznávány $CD8^+$ T lymfocyty, HLA II. třídy jsou rozeznávány $CD4^+$ T lymfocyty). Míra TCR signalizace je ovlivněna především afinitou TCR k HLA antigenu, délkou interakce TCR-HLA a dalšími faktory. Je dobře známo, že k pevnosti vazby TCR- HLA přispívá i interakce adhezivních molekul (např. ICAM-1 na DC a LFA-1 na T lymfocytech). K plné aktivaci T lymfocytů po rozeznání antigenu je potřeba, kostimulačních signálů (interakci CD28 a CD80/86, CD40 a CD154) a vhodné cytokinové prostředí, které definuje převažující specifickou odpověď (Th1/Th2/Th17/Treg). Důležitá je zejména produkce cytokinů IL-2, IFN gama, TNF alfa, IL-15, které aktivují buněčnou proliferaci.

Po rozeznání dárcovského antigenu jsou efektorové T buňky aktivovány v sekundárních lymfoidních tkáních a dochází k jejich klonální expanzi. Aktivované efektorové T lymfocyty pak migrují zpátky do štěpu, opouštějí mikrocirkulaci a vstupují do intersticia. Důležitou roli hrají $CD4^+$ T lymfocyty, které nejen dále interagují s B lymfocyty, ale jsou i významnými producenty IFN gama, čímž stimulují aktivaci cytotoxické reakce $CD8^+$ T lymfocytů. Mechanismus této reakce spočívá v uvolnění perforinu z granul, který působí poškození buněčné membrány a vstup enzymů (granzym A,B). Následuje aktivace kaspáz, fragmentace DNA a apoptóza buňky (90).

Intenzivně zkoumaná je v poslední době role NK buněk, které svými KIR receptory mohou rozeznávat specifické ligandy (např. epitopy na HLA Cw a epitop Bw4) anebo případně chybějící vlastní HLA molekuly I. třídy, tzv. *missing self hypothesis* (91). Dalším mechanismem jejich aktivace je vazba přes $Fc\gamma R$ receptor ($Fc\gamma RIII$ - CD16a), který váže Fc fragment protilátek (anti HLA) a spouští cytotoxickou reakci závislou na protilátkách (ADCC – *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*). NK buňky exprimují i receptory pro některé složky komplementu. Po jejich aktivaci dochází k buněčné apoptóze, sekreci IFN gama, TNF alfa a tím k aktivaci dalších imunokompetentních buněk (92, 93) (Obr.4).

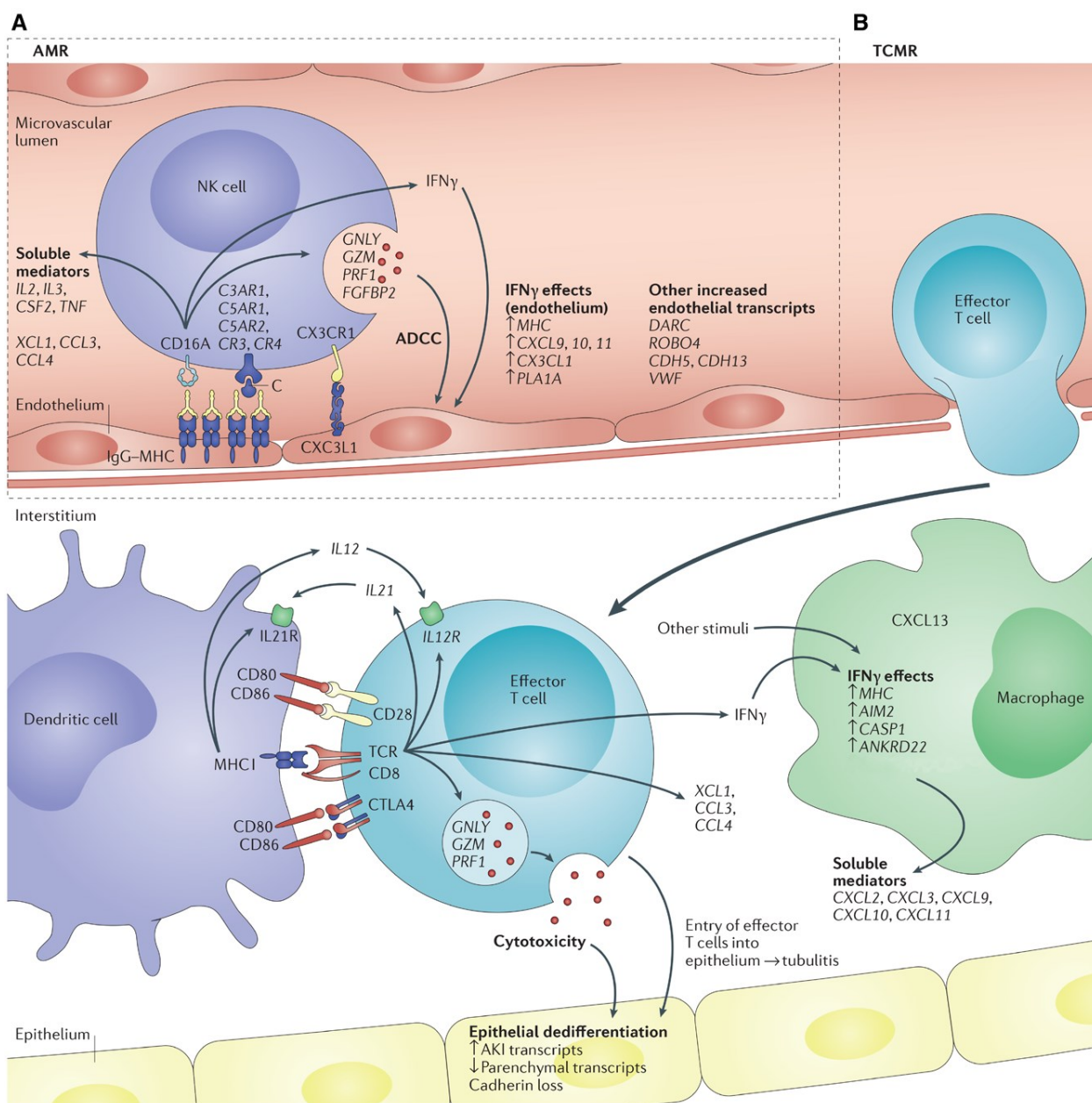
Ukazuje se, že právě produkce IFN gama hraje důležitou roli při vytváření typického fenotypu TCMR, protože indukuje expresi různých genů, včetně chemokinů, jako jsou CCL5, CXCL9,

CXCL10, CXCL11, což vysvětluje infiltraci dalších buněk přirozené imunity jako monocyty/makrofágy, eosinofily nebo žírné buňky a jejich spoluúčast na zánětlivé reakci doprovázející rejekční proces (94).

Transkripty, které přispívají k profilu TCMR, se většinou týkají efektorových T buněk (CTLA4, ICOS, BTLA, CD96, LAG3, SIRPG, LCP2, DUSP2, CD8A), makrofágů (CD84, SLAMF8, ADAMDEC1), B buněk (CD274, BTLA) a transkriptů souvisejících s $IFN\gamma$ (ANKRD22, FCGR1B, SLAMF8) (95).

Zvláštní skupinu, která je ovšem předmětem intenzivních studií, tvoří paměťové buňky, jejichž dlouhodobé přežívání je umožněno schopností exprese anti-apoptotických proteinů (Bcl-2, Bcl-XL) (96, 97). Může se jednat o dárcovsky specifické T lymfocyty, které v případě retransplantací mohou reagovat s opakovaným neshodným HLA antigenem, anebo zkříženou reaktivitou mezi patogen-specifickými buňkami a aloantigeny štěpu (tzv. *heterologní imunita*).

Donor specifické protilátky (DSA) pocházejí ze dvou zdrojů paměťových B buněk: z klidových paměťových B buněk a z dlouho žijících plazmatických buněk (LLPC - *Long-Lived Plasma Cell*). Dosavadní znalosti ze zvířecích modelů ukazují, že mechanismus působení těchto buněk je odlišný, a proto jejich aktivace před a po transplantaci může mít rozdílný dopad na funkci štěpu. Klidová paměťová B buňka se rychle reaktivuje při opětovné expozici aloantigenem, například při retransplantaci, a po přeměně na plazmatickou buňku odpovídá za tvorbu *de novo* DSA. Naopak LLPC dlouhodobě (i roky) přežívají v kostní dřeni, odkud produkují cirkulující DSA, ale nemobilizují se při opětovném setkání s aloantigenem. Předpokládá se, že repertoár DSA paměťových B buněk má zpočátku nižší afinitu, ale zachová si schopnost podléhat afinitnímu zrání a vytvářet nové typy LLPC s výrazně vyšší afinitou. Naopak repertoár DSA LLPC je statický a má vyšší afinitu (98). V souvislosti s transplantací by variabilita typů paměťových B buněk u senzibilizovaného pacienta mohla určovat kinetiku a/nebo velikost *de novo* DSA při následné transplantaci. Alternativně může variabilita typu generovaných paměťových B buněk přispívat k dynamice chronické rejekce. Současná imunosuprese nedokáže potlačit produkci DSA u LLPC. Přítomnost paměťových buněk lze detekovat ještě před samotnou produkcí DSA a projevem AMR (6), ale vyšetřování kompartmentu paměťových B lymfocytů je technicky náročné a není dosud zařazeno do klinické diagnostiky.



Obr 4: Role NK buněk při TCMR a AMR: Při AMR (A) rozpoznávají NK buňky pomocí Fc γ RIII receptoru Fc fragment protilátky. Aktivace Fc receptoru spustí uvolnění IFN gama a ADCC reakci. K další interakci mezi NK buňkami a endotelem může dojít prostřednictvím receptorů komplementu exprimovaných NK buňkami. V TCMR (B) pronikají efektorové T-buňky do endotelu a interagují s DC a makrofágy. Aktivace T buněk zahajuje zánětlivou odpověď závislou na interakci mezi efektorovými T buňkami a APC (např. uvolňování IFN gama). Exprese inhibičních kontrolních bodů (např. interakce mezi ligandy CTLA4, CD80 a PD1 ligandů) naznačuje, že ve tkáni funguje negativní kontrola T buněk.

Převzato z Halloran et al., 2023 (90).

2.4 Protilátkami zprostředkovaná rejekce (AMR – *Antibody Mediated Rejection*)

O patologickém působení preformovaných donor specifických protilátek (DSA) na transplantovanou ledvinu se vědělo již v 60. letech minulého století (99), avšak původně převažoval názor, že jen preformované protilátky mohou poškodit štěp (hyperakutní rejekce) a že k produkci *de novo* DSA po transplantaci nedochází v důsledku užívání imunosuprese. Předpokládalo se, že naprostá většina rejekcí je zprostředkovaná T buňkami, a proto léčba rejekčních komplikací byla cílena na inhibici T lymfocytů (ATG – antithymocytární globulin, kortikoidy atd.).

Po objevení patologické role HLA specifických protilátek produkovaných po transplantaci (100) a spolu s nálezem C4d deposit v peritubulárních kapilárách transplantovaných orgánů bylo potvrzeno, že protilátkami zprostředkovaná rejekce je specifickým typem imunitní reakce odlišujícím se od TCMR. (101). C4d je štěpný produkt komplementové kaskády a nepřímou poukazuje na aktivaci komplementu klasickou cestou. C4d depozity jsou kovalentně vázány ve tkáni a lze je detekovat imunofluorescenčně (v nativní zmražené tkáni), anebo imunohistochemickým barvením (v parafínových řezech). Nález C4d depozit signifikantně souvisí se zhoršeným přežitím štěpu (102) a také koreluje s přítomností donor specifických protilátek (DSA) (103).

Dnes převládá názor, že C4d nemusí být vždy specifickým markerem AMR. Také v případě působení non HLA protilátek se C4d komponenta vyskytuje ve výrazně menší míře v porovnání s působením HLA protilátek, jak bylo uvedeno výše (56). Navíc u transplantací AB0 inkompatibilních jedinců (neshoda v krevní skupině), se v biopsiích běžně detekují difúzní C4d depozity bez rozvoje mikrovaskulárního zánětu a známek akutní AMR (104). Pacienti mají protilátky proti erytrocytárním antigenům (AB0) dárce, ale funkce štěpu není negativně ovlivněna. Tento stav bývá v klinice nazýván *akomodace*.

2.4.1 AMR u orgánových transplantací

Nejpodrobněji je prostudovaná patogeneze AMR u transplantací ledvin. To je dáno větším počtem transplantací, možností darování ledviny živými dárci a také délkou transplantačního programu v porovnání s ostatními orgány (mezinárodní srovnání dle databáze www.irodat.org, www.transplant-observatory.org). Společným znakem AMR je přítomnost donor specifických protilátek (ve štěpu a v séru pacientů), nicméně každý z těchto orgánů má i tkáňově specifické non HLA antigeny, proti kterým mohou pacienti vytvářet protilátkovou odpověď (82, 105-107). Aktivace komplementu je, jak už bylo řečeno, hodnocena dle C4d depozit a navíc, s diagnózou v poslední době pomáhá stanovení specifických genových expresí v transplantovaném štěpu.

Incidence AMR po transplantaci **ledvin** je 5-7 % u nesenzitizovaných pacientů, 40-90 % u senzitivovaných pacientů (data IKEM). Výskyt AMR u transplantovaných ledvin je tedy relativně vzácnou komplikací, často ale s fatálními důsledky pro štěp. Nejčastějším klinickým projevem akutní rejekce je zvýšení sérového kreatininu, chronická forma rejekce se projeví postupným poklesem glomerulární filtrace, progresí proteinurie a zhoršením hypertenze. Dle Banffské klasifikace se rozlišují jednotlivé fenotypy rejekce v transplantované ledvině. Diagnóza se opírá o histologický průkaz poškození tkáně (mikrovaskulární zánět, trombotická mikroangiopatie, tubulární poškození), průkaz C4d v peritubulárních kapilárách a sérologický průkaz DSA. Od roku 2022 je diagnóza doplněna i o znalosti validovaných genových transkriptů (108-110).

U transplantací **srdce** se AMR manifestuje jako selhání mechanické funkce myokardu, chronická forma postihuje především věnčité tepny a je součástí syndromu koronární nemoc štěpu, respektive vaskulopatie štěpu (CAV - *Cardiac Allograft Vasculopathy*) (111). Koronární nemoc srdečního štěpu je hlavní příčinou pozdní morbidity a mortality pacientů po transplantaci srdce a výrazně zkracuje jejich dlouhodobé přežití. Je pro ni typická difuzní koncentrická intimální hyperplazie, která se manifestuje ve formě časného stenotického postižení koronárních tepen (112). Hodnocení jednotlivých subtypů rejekcí u transplantace srdce a plic vychází z Banffské klasifikace a je revidováno Mezinárodní společností pro transplantace srdce a plic (ISHLT- *The International Society for Heart and Lung Transplantation*). První patologická kritéria byla definována v roce 2005, dnes se diagnóza opírá o průkaz C4d, doplněného o detekci DSA a stejně jako u ledvin, o nové znalosti molekulárních transkriptů (90, 108, 113).

U transplantací **plic** se AMR projevuje jako *Bronchiolitis Obliterans Syndrome* (BOS) a chronická dysfunkce plicního aloštěpu (CDAL – *Chronic Lung Allograft Dysfunction*) a poměrně

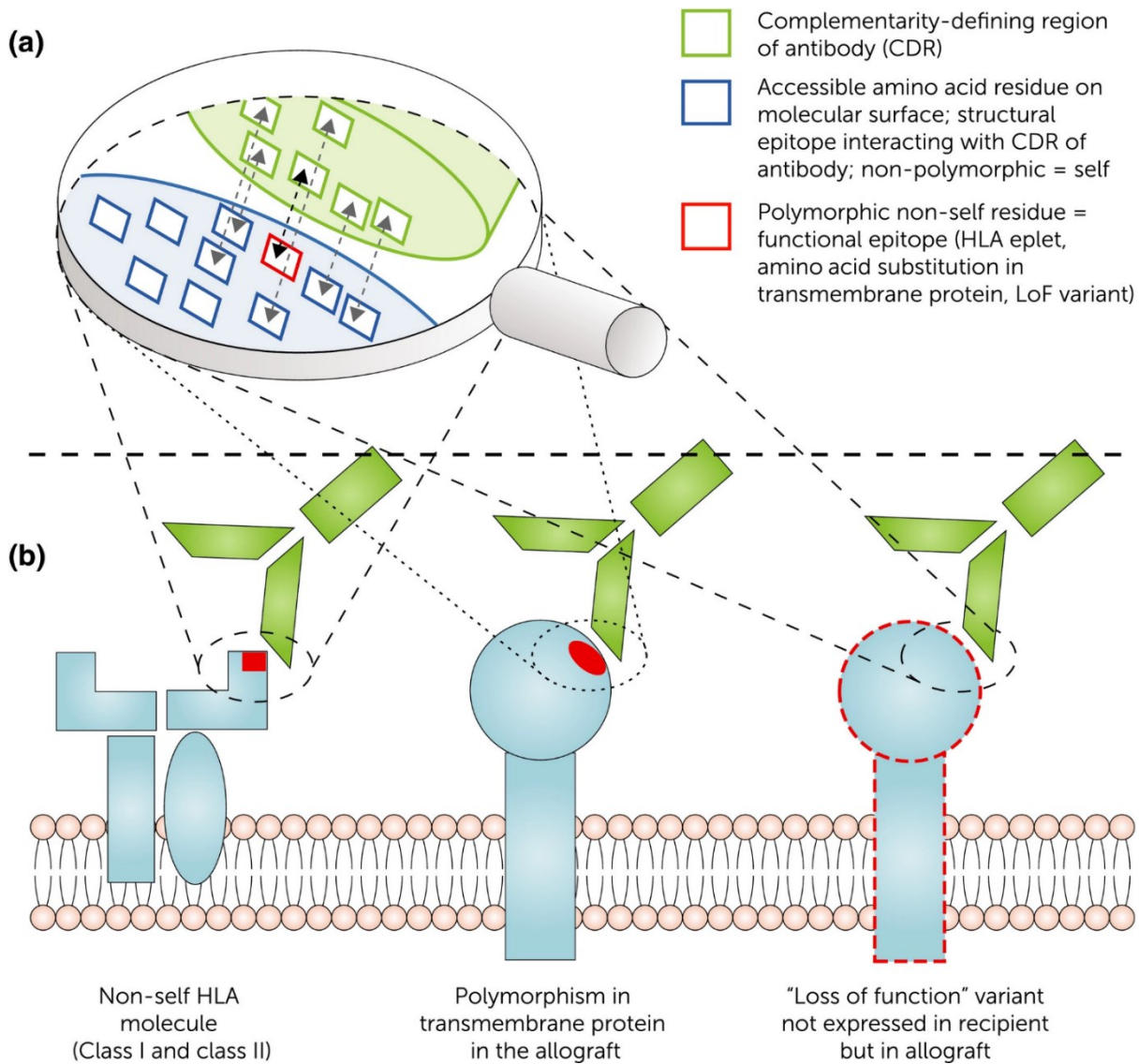
těžko se diagnostikuje. Teprve v roce 2016 byla publikována mezinárodní definice AMR u plic, která vychází také ze znalostí u transplantovaných ledvin (114, 115). Diagnóza se opírá o sérologický průkaz DSA, dysfunkce plicního štetpu (pokles ve spirometrii s rozvíjející dušností) a histologické známky poškozování štetpu (kapilaritida a difuzní aleolární poškozování), nález C4d depozit je u plic poměrně vzácný (108). DSA ve štetpu plic jsou asociovány s vážnější formou AMR, navíc přítomnost *de novo* DSA poukazuje na zrychlený průběh BOS a také je asociována s vyšší mortalitou pacientů vlivem BOS (116, 117). U pacientů po transplantaci plic jsou také velmi časté autoprotilátky namířené proti non HLA antigenům (např. kolageny, K α 1 - tubulin) (78).

U **jater** má AMR komplexní klinickou manifestaci, která se může zaměnit s obliterací žlučových cest z jiného (např. chirurgického) důvodu, akutním selháním jaterního štetpu atd (118, 119). Jelikož hepatocyty mají velkou regenerační schopnost a výrazně menší expresi HLA antigenů I.třídny, tak se původně předpokládalo, že riziko rejekce není tak vysoké, jako u ostatních orgánů. U jater se setkáváme s pojmem rejekce bohatá na plazmocyty, stav, kdy dochází k autoimunitní hepatitidě *de novo*. Diagnóza AMR je u jater také postavena na průkazu C4d v biopsii a průkaz DSA v séru (108).

2.4.2 Mechanismus patologického vlivu protilátek

Přesný mechanismus patologického vlivu HLA specifických protilátek je předmětem intenzivního zkoumání a není dosud dostatečně vysvětlen. Anti HLA protilátky se vážou na epitopy HLA antigenů, přičemž tyto epitopy mohou být sdíleny mezi více HLA antigeny. Z tohoto důvodu protilátky mohou reagovat proti několika HLA antigenům současně, tzv. křížová reaktivita protilátek. HLA antigeny, které mají společné epitopy jsou zahrnuté v „*Cross-Reactive Groups*“ neboli CREG. Vazebné místo protilátek (paratop) může být také namířeno pouze proti jedné z domén HLA antigenů, například α podjednotka u DQ antigenu, která je sdílena více alelickými formami (120). Interakce antigenního epitopu a paratopu protilátek je ovlivněna velikostí, tvarem a elektrochemickými vlastnostmi aminokyselin na povrchu antigenu a protilátky (121). Eplety představují centrální část epitopu, která je složena ze shluků několika aminokyselin umístěných blízko sebe (3-3,5 angstromu [0,3-0,35 nm]) nacházejících se na HLA molekule, na místě přístupném protilátce. Představují nejmenší funkční jednotku vazebného místa mezi protilátkou a antigenem a určují specifitu protilátky prostřednictvím interakce s centrální oblastí paratopu protilátky definující komplementaritu. Epitop, který pokrývá celé rozhraní

antigen/protilátka, má velikost 15 angstromu (1,5 nm) a zahrnuje nejen aminokyseliny, které určují specifickou vazbu (funkční epitop), ale také další (polymorfní nebo nepolymorfní) aminokyselinové zbytky, které určují afinitu (sílu vazby), ale nikoli specifickou interakce antigen/protilátka (strukturní epitop) (33). Obr 5.



Obr 5: Interakce protilátky s antigenem: (A) Vazebné místo protilátky (CDR – *Complementarity Defining Region*) interaguje s epitopem antigenu, který zahrnuje oblast určující specifitu vazby (např. eplet, aminokyselinová substituce v transmembránovém proteinu, varianta ztráty funkce nesoucí nesamostatný epitop) a oblast definující afinitu vazby. **(B)** HLA DSA se vážou na cizí HLA antigeny dárce, non HLA DSA se vážou na polymorfní transmembránové molekuly štěpu anebo nefunkční varianty antigenů (tj. příjemce má úplnou ztrátu genové exprese specifické alely, ale dárce nese alespoň jednu funkční kopii).

Převzato z Reindl-Schwaighofer et al., 2020 (33)

Anti HLA protilátky po vazbě na neshodné antigeny štěpu mohou poškozovat štěp přímou aktivací klasické cesty komplementové kaskády (vazbou C1q složky) anebo stimulací cytotoxické buněčné reakce (ADCC – *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*). Časná protilátková odpověď je vždy polyklonální, zahrnuje nejdříve IgM a následně všechny podtřídy IgG. Nejsilnějšími aktivátory komplementu jsou protilátky podtřídy IgG3 a IgG1(122, 123), ovšem svou roli hraje i glykosylace a afinita protilátek (84). IgG protilátky mají schopnost formovat se do hexameru, pomocí nekovalentní vazby Fc fragmentů, který následně váže C1q složku komplementu (124).

Po aktivaci komplementové kaskády dochází k uvolnění chemokinů C3a a C5a, což vede k dalšímu atrahování imunokompetentních buněk. Po vzniku MAC (*Membrane Attack Complex*) komplexu, dochází k poškození buněčné membrány a lýze buněk, což může vést k odloučení endoteliálních buněk od bazální membrány (histologický znak AMR). Fragmenty komplementu deponované na endotelových buňkách mohou dále aktivovat fagocytární buňky. Kromě cytotoxického efektu, iniciuje se produkce prozánětlivých mediátorů a koagulační kaskády, u akcelerované AMR dochází k agregaci trombocytů vedoucí k trombotické mikroangiopatii a nekróze štěpu (110, 125, 126).

Protilátky, které neaktivují komplement, jsou po vazbě na HLA antigeny rozeznávány FcγR receptory monocytů/makrofágů, NK buněk, γδT lymfocytů a dalších buněčných elementů. Následně dochází buď k degranulaci NK buněk anebo k fagocytóze (*antibody-dependent cell phagocytosis*) (Obr. 4.A), což vyvolává další poškození endotelu. V případě, že protilátky nejsou vázány těmito receptory, dochází k imunomodulačním mechanismům a poškození štěpu.

2.4.3 Preformované protilátky

Důvodem tvorby protilátek proti HLA před transplantací jsou opakované krevní transfúze, těhotenství, případně předchozí transplantace. Nicméně podání transfúze po transplantaci produkuje anti HLA protilátek přímo neovlivňuje, což je způsobeno pravděpodobně imunosupresivní terapií indikovanou po transplantaci (127). Implantace mechanické srdeční podpory (VAD- *Ventricular Assist Device*) u pacientů čekající na transplantaci srdce je dalším z faktorů senzitivace, což potvrzují studie jak u dospělých (128-131), tak u dětských pacientů (132, 133). U pacientů s VAD byla prokázána také přítomnost non HLA protilátek, např. proti angiotenzinovému receptoru (AT1R) - studie IKEM (70).

Procentuální zastoupení anti HLA protilátek je u 20% zdravé populace, u 30% čekatelů na transplantaci (84); v čekací listině IKEM (n=792pacientů) je 28% pozitivních, z čehož 2,6% je vysoce senzitivovaných (PRA nad 80%). Pacienti, kteří jsou zařazováni na čekací listinu na transplantaci, se vyšetřují čtyřikrát ročně na přítomnost protilátek proti HLA, tzv. *Panel reaktivní protilátky* (PRA). PRA se stanovují pomocí komplement dependentního cytotoxického testu, kdy sérum pacienta je postupně testováno s panelem zdravých dárců, kteří představují frekvenci zastoupení HLA antigenů v české populaci. Specificita protilátek je u čekatelů na transplantaci stanovena metodou Luminex.

Preformované donor specifické protilátky představují riziko hyperakutní rejekce (tzv. akcelerovaná protilátkami zprostředkovaná rejekce). Hyperakutní rejekci mohou zapříčinit nejen komplement aktivující donor specifické protilátky namířené proti HLA antigenům, ale i protilátky proti erytrocytárním (AB0) antigenům, pokud by došlo k transplantaci přes neshodnou krevní skupinu bez předchozí přípravy pacienta. V poslední době je hodně diskutovaná role non HLA protilátek, které mohou ve výjimečných případech způsobit nevratné poškození štěpu i bez aktivace komplementu (53, 55). S hyperakutní rejekcí se dnes v klinické praxi setkáváme zcela výjimečně, jelikož všichni pacienti jsou před transplantací vyšetřeni na přítomnost preformovaných donor specifických protilátek. Na mnoha studiích bylo prokázáno, že pacienti s preformovanými protilátkami proti HLA mají vyšší riziko rozvoje AMR po transplantaci a zhoršené přežití štěpu (123, 134). Navíc pacienti mající protilátky proti oběma třídám HLA mají zhoršenou prognózu rozvoje AMR, stejně jako dlouhodobou funkci štěpu (134). Vzhledem k úzkému propojení různých složek imunitního systému se akutní AMR často vyskytuje současně s TCMR.

2.4.4 *De novo* protilátky

Protilátky, které jsou tvořeny po transplantaci *de novo* se často vyskytují během časného potransplantačního období (do 3 měsíců po transplantaci) a bývají asociovány s rozvojem akutní AMR (61, 123). Nicméně jejich produkce může být i v delším horizontu (roky po transplantaci) a tím pádem se podílí na rozvoji chronické formy AMR (135, 136). *De novo* protilátky mohou být dárcovskými specifické, tzv. *de novo* DSA, nebo jsou namířeny proti jiným antigenům, které mohou být strukturně podobné s dárcovskou molekulou (tzv. CREG - *Cross-Reactive Group*). Recentní epitopové analýzy ukazují, že míra neshody v epitopech HLA antigenů může ovlivnit produkci *de*

novo protilátek po transplantaci a jak již bylo řečeno, že některé antigenní epitopy jsou více imunogenní než jiné (29, 137-139). Navíc se ukazuje, že se může vyvolat tvorba protilátek i proti několika neshodným epitopům i na jediné molekule HLA (30).

De novo DSA namířené proti antigenům HLA II. třídy jsou často asociovány s horší prognózou štěpu, což naznačují studie po transplantaci ledvin (30), srdce (140), plic (141) i jater (119). Pokud má pacient neshodu v epitopech u DR i DQ antigenů zároveň, je produkce *de novo* DSA významně vyšší (30, 142). Paradoxem je, že zatímco protilátky proti antigenům HLA I. třídy jsou historicky považovány za hlavní příčinu hyperakutní rejekce a časné AMR u senzibilizovaných pacientů, u pacientů, u nichž se objevuje rejekce později po transplantaci, převažuje produkce protilátek proti antigenům HLA II. třídy. Důvodem může být rozdílná regulace protilátkových odpovědí, zvýšená exprese antigenů HLA II. třídy přímo ve tkáních potenciována jak cytokinovým prostředím, tak TCMR či infekčním agens (136, 141).

Ačkoli mechanismus vzniku *de novo* DSA, a *de novo non* DSA, není dostatečně vysvětlen, pravděpodobnost rozpoznání specifickými klony B buněk se zvyšuje s rostoucím počtem HLA neshod, stejně jako pravděpodobnost přítomnosti imunodominantního epitopu.

Kromě samotného rozeznání antigenního epitopu, je důležitá i kooperace jednotlivých buněk imunitního systému a regulační mechanismy imunity. Uvažuje se o roli folikulárních T lymfocytů (Tfh – *T follicular helper*, Tfr - *T follicular regulatory*), kdy Tfh buňky pravděpodobně hrají roli v počáteční fázi senzibilizace a ovlivňují i dlouhodobou produkci *de novo* DSA. U příjemců ledvin byla prokázána korelace cirkulujících Tfh s preformovanými i *de novo* DSA (143). Naopak úloha Tfr buněk je zřejmě autoregulační, a po transplantaci tyto buňky pravděpodobně kontrolují autoreaktivní protilátkovou odpověď působením přes inhibiční kostimulační molekuly (CTLA-4) a inhibicí produkce prozánětlivých cytokinů, čímž brání autoimunitní reakci (144, 145).

Nutno dodat, že za vznikem *de novo* protilátek může být i snížení dávky imunosuprese či samovolné vysazení imunosuprese pacientem, což vede k stimulaci imunitní odpovědi a často i k nevratnému odhojení transplantátu.

2.4.5 Chronická rejekce

Chronická forma rejekce je hlavním nevyřešeným problémem, který omezuje dlouhodobé přežití a funkci transplantovaných orgánů. Uplatňují se zde buněčné, humorální a další neimunologické mechanismy (farmakologické poškození, ischemie, infekce atd.) (146). Významnou roli zde hrají *de novo* DSA a také absolvování akutní AMR.

Některé buněčné typy mají schopnost regenerace (endotelové buňky, tubulární buňky, hepatocyty), naopak poškození svalových buněk (myocytů) je prakticky nevratné. Dlouhodobý zánět způsobuje postupnou remodelaci tkáně štěpu, vlivem cytokinů (např. IL-17, TGF-beta) a chemokinů jsou do místa zánětu atrahovány fibroblasty, způsobující fibrotizaci (VEDF, HGF faktory) a ztrátu funkčního parenchymu, postupné ztlustění cévních stěn a následnou ischemii orgánu. Konkrétní histopatologický obraz závisí na druhu transplantovaného orgánu. U ledvin se setkáváme s fibrózou a transplantační glomerulopatií, u srdce dochází k vaskulopatií (akcelerovanou aterosklerózou koronárních tepen), u plic se projevuje chronickou dysfunkcí a u jater se setkáme s termínem mizejících žlučovodů (108).

Předmětem studií je aktuálně role NK buněk (91, 93), M2 makrofágů (147, 148) non HLA protilátek a také žírných buněk (94). Právě žírné buňky by mohly způsobovat fibrózu tím, že dokáží uvolnit mediátory, jako je histamin, fibroblastový růstový faktor-2 (FGF-2), TGF-beta, chymáza a katepsin G. Jejich role je však kontroverzní, jelikož se předpokládá, že díky své interakci s Treg lymfocyty by žírné buňky měly být součástí periferní tolerance.

Je nutno také zmínit, že chronické poškození může způsobit i toxicita imunosupresiv (např. kalcineurinové inhibitory).

2.4.6 Diagnostika donor specifických protilátek

Mikrolymfocytotoxický test (CDC, complement-dependent cytotoxicity) optimalizovaný P. Terasakim umožnil efektivní detekci komplement aktivujících donor specifických protilátek. Tento test je využíván v rutinním provozu již několik desetiletí, ovšem v poslední době některá centra od této metodiky ustupují a nahrazují ji metodami využívající průtokové cytometrie či pevné fáze (ELISA, LUMINEX). V metodách pevné fáze jsou HLA antigeny rekombinantní molekuly nebo HLA antigeny izolované z buněčných linií, které jsou navázány na pevnou fázi (ELISA destičky či polystyrenové kuličky), což umožňuje velmi přesnou a rychlou detekci a

charakterizaci protilátek i ve velmi nízkých koncentracích. Na druhou stranu se musíme při hodnocení vyrovnat s falešně pozitivními reakcemi, při kterých dochází k expozici neoepitopů a vazbě protilátek na místa, kam by se za normálních podmínek nenavázala. K falešně negativním hodnotám dochází při fenoménu prozóny, interferenci s komplementem anebo pokud dojde ke sdílení epitopů mezi více antigenů. Křížovou reaktivitou protilátek lze vysvětlit detekci protilátek proti antigenům, které se v populaci vyskytují velmi vzácně. Asociaci s komplementem pak můžeme určit speciálními soupravami, využívající vazbu C1q složky nebo C3d složky komplementu. Při klinickém hodnocení patogenicity těchto protilátek se však studie rozcházejí, meta-analýzy studií však poukazují na vliv vzniku rejekce a dlouhodobého přežití štěpu (149).

Rozvoj a rozšíření nových detekčních metod protilátek a zpřesnění typizace HLA antigenů na vysoké rozlišení umožnily zavedení nových postupů určení kalkulovaných PRA (cPRA), kdy se stanovený protilátkový profil pacienta porovnává s databází dárců se známou typizací. Další možnost využití je při virtuálním crossmatch testu v alokačních programech (150) a v programu párových výměn ledvin (151).

Krom detekce anti HLA protilátek, jsou dnes dostupné i soupravy umožňující detekci non HLA protilátek. Ty pracují na principu ELISA (detekce AT1R protilátek) anebo Luminex (detekce MICA, a dalších non HLA protilátek – viz Příloha 1.), případně pomocí průtokové cytometrie lze určit přítomnost protilátek proti prekurzorům endoteliálních buněk (tzv. XM ONE test) (152). V rutinním provozu se dnes běžně stanovují MICA protilátky u pacientů před i po transplantaci, nicméně typizace MICA antigenů, ani dalších non HLA antigenů se dosud v klinické praxi běžně neprovádí.

2.4.7 Diagnostické problémy odhojení transplantátu

Diagnostika AMR je často komplikovaná a prakticky vždy vyžaduje spolupráci specialistů z různých oborů (imunologů, patologů, molekulárních genetiků atd.). Problémy v diagnostice AMR vznikají například, když není možné detekovat DSA v periférii. Byly popsány případy mikrovaskulárního zánětu bez přítomnosti protilátek (153-155) anebo naopak, že ne všechny donor specifické protilátky v séru interagují s cévním endotelem (6).

Nemožnost detekovat DSA v séru může být vysvětlena produkcí protilátek přímo ve štěpu, popřípadě vychytávání (absorpcí) protilátek štěpem. Kvůli své velikosti protilátky sice nejsou

schopny prostoupit přes endotel, nicméně mohou být fixovány na antigenní epitopy endotelu a v periférii se tak u mnoha pacientů neobjevují. Jakmile se však endotel nasytí, vyplaví se do cirkulace (63). Při studiu ledvinových štěpů po grafektomii (selhaných vlivem rejekce) byla potvrzena přítomnost anti HLA protilátek přímo ve štěpu (156), stejně tak ve štěpu plic (116). Hladiny DSA v séru jsou prokazatelně odlišné od hodnot DSA ve štěpu, což může být dáno jednak vlastní analýzou DSA (množství vstupního materiálu, metodika testování), ale může se jednat také o redukci DSA ve štěpu tkáňovými makrofágy, které vážou protilátky pomocí svého Fc- γ receptoru. Specificity protilátek ve štěpu jsou namířeny proti epitopům dárcovským antigenům a shodují se specificitami v séru (157).

Další možností vysvětlení je působení non HLA protilátek, jejichž tvorba nemusí být závislá na přítomnosti anti HLA protilátek a mechanismus patogeneze může být odlišný mezi jednotlivými typy protilátek (48, 158-160).

Velké naděje v diagnostice rejekce se v poslední době vkládají do hodnocení genových expresí metodikou Molekulárního mikroskopu (MMDx – *Molecular Microscope Diagnostic system*) (90, 161, 162). Tato metoda umožňuje analýzu z velmi malého kousku tkáně, v porovnání s klasickou histologií dokáže zachytit probíhající rejekci nebo poškození, nezávisle na počtu glomerulů a tepen v bioptované ledvině (163). Každý typ rejekce vykazuje specifickou genovou expresí odlišnou od ostatních typů odhojení. Definované tkáňové transkripty nám tak umožňují klasifikovat AMR i u případů, kdy je C4d komponenta v biopsii negativní anebo není průkaz DSA na periférii, a přesto je klinické podezření na AMR. U AMR, kdy je histologicky potvrzena zánětlivá reakce v mikrocirkulaci, pozorujeme 3 typy transkriptů, které poukazují na aktivaci NK buněk (např. granzymb GZMB, KLRD1, CCL4), endoteliálních buněk (např. ROBO4) a geny spojené s produkcí IFN gama (např. PLA1A, CXCL11) (90). Tyto transkripty byly zařazeny do hodnocení Banffské klasifikace v roce 2015 pro AMR a v roce 2019 ve vztahu v TCMR – viz. Kapitola TCMR (95).

Další nový způsob napomáhající diagnostice rejekce je stanovení a kvantifikace volně cirkulující DNA dárce (cfDNA - *cell free DNA*), která se uvolňuje jak z apoptotických buněk, tak z buněk živých, a jejíž zvýšený výskyt poukazuje na poškození buněk štěpu. Bezprostředně po transplantaci můžeme detekovat velmi vysokou hladinu cfDNA, což souvisí pravděpodobně s buněčným poškozením vlivem ischemie a chirurgickým stresem štěpu. Následně dochází k poklesu hodnot a v případě rejekce lze detekovat signifikantní zvýšení cfDNA, často před klinickými projevy (resp. bioptickým průkazem) (164-167). Hodnoty cfDNA se liší u

jednotlivých orgánů a stanovení hladin cfDNA je v současné době předmětem velkých srovnávacích studií (Evaluation of Patient Outcomes From the Kidney Allograft Outcomes AlloSure Registry – KOAR <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326076>).

2.5 Imunosupresivní terapie

Pacienti, u nichž je prokázána přítomnost HLA specifických protilátek před transplantací ve vysokých hladinách a proti velkému množství HLA antigenů, jsou imunologicky rizikováni, a často musí podstoupit tzv. desenzitizační přípravu, kterou se protilátky v séru odstraňují – plazmaferéza, imunoadsorpce. U vysoce senzitivizovaných pacientů lze protilátky dočasně eliminovat podáním Imlifidasy, která štěpí všechny podtřídy IgG na Fc fragment a F(ab')₂ část. Dle in vitro studií IdeS štěpí i BCR receptory B lymfocytů a tím inhibuje antigeně specifickou odpověď (168-171).

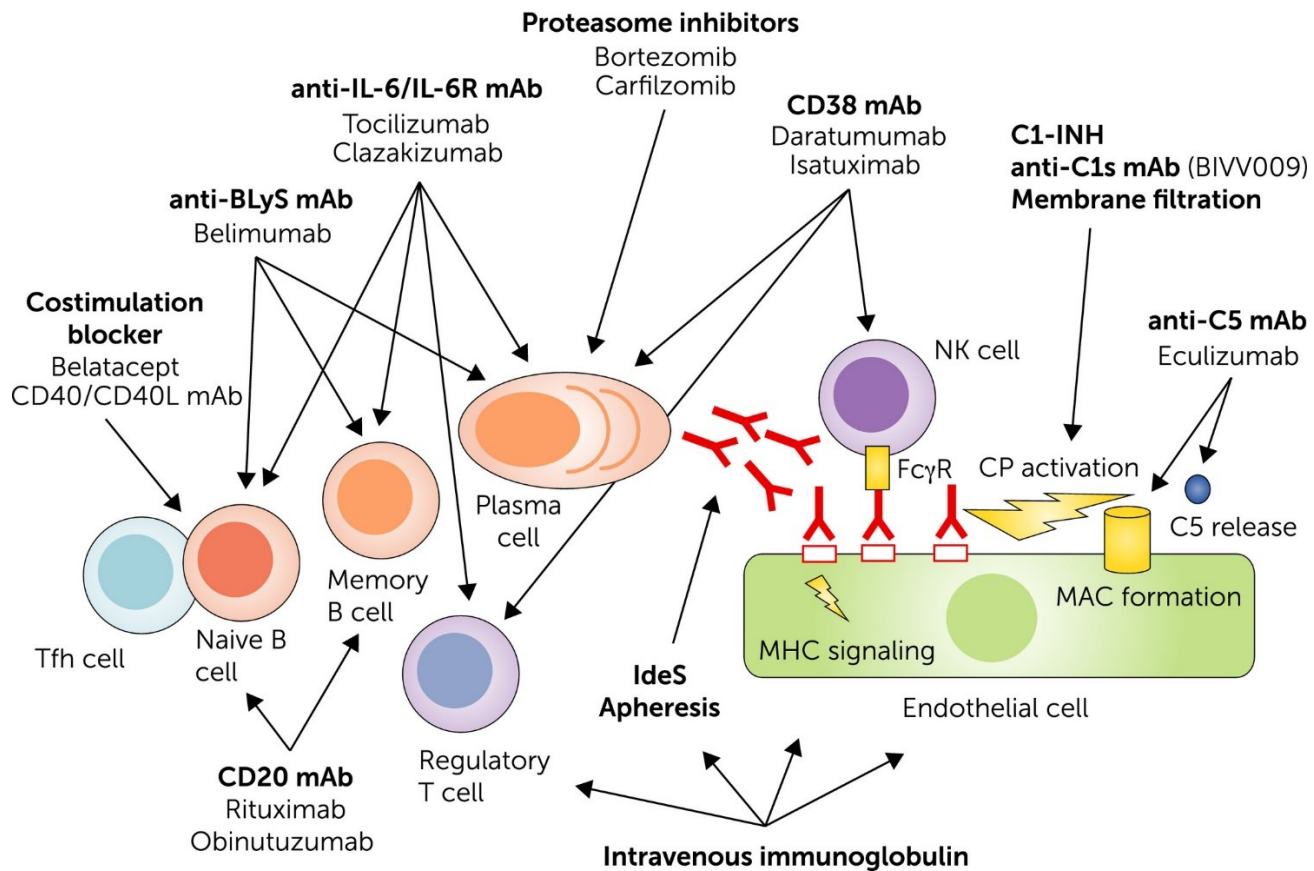
Indukční terapie míří na blokaci a depleci T lymfocytů: antithymocytární globulin (ATG), Basiliximab (anti CD25- receptor IL-2) a působí také proti B lymfocytům: Rituximab (anti CD20). Je indikována bezprostředně po transplantaci, aby působila profylakticky a zabránila rozvoji imunitní odpovědi v časném období po transplantaci.

Po transplantaci je většinou indikována udržovací imunosupresivní léčba, nejčastěji trojkombinace kalcineurinových inhibitorů (takrolimus, cyklosporin A), kortikosteroidy a mykofenolové kyseliny. Často je léčba doplněna o mTOR inhibitory (sirolimus, everolimus), které ovlivňují buněčnou proliferaci. Kombinace imunosupresiv ovlivňuje různé úrovně imunitní odpovědi (inhibici syntézy IL-2, blokaci proliferace T i B buněk, inhibici produkce cytokinů atd.), dávkování je přizpůsobeno aktuálnímu stavu pacienta vzhledem k možným vedlejším účinkům imunosuprese (108, 172).

Pokud dojde k akutní humorální rejekci, léčba AMR cílí v prvním kroku k eliminaci protilátek pomocí plazmaferéz (PF) nebo imunoadsorpce (IA), doplněnou o podání intravenózních imunoglobulinů (IVIG) s blokujícím účinkem (173).

Kromě eliminace protilátek z periferie dalším terapeutickým krokem je deplece T a B lymfocytů (ATG, Rituximab), inhibice plazmatických buněk (Bortezomib – inhibitor proteazomu, indikováno u rezistentních forem AMR), suprese kostimulačních signálů (CTLA-4 - Belatacept), případně inhibice komplementu (Eculizumab – anti C5). Terapeutické postupy se indikují

v závislosti na závažnosti rejekce a stavu pacientů (174-176). U chronické rejekce není dosud jednotný postup v terapii, léčba je komplikovaná a často končí selháním funkce štěpu. Terapeutické cíle jsou znázorněny na Obr.6.



Obr 6: Možnosti imunosupresivní terapie

Převzato z Böhmig et al., 2019 (176)

3. Cíle práce

Cílem této práce bylo studium role HLA specifických protilátek a non HLA protilátek ve vztahu k T buňkami a protilátkami zprostředkované rejekci po transplantaci orgánů. Zabývali jsme se stanovením protilátek před transplantací srdce za účelem definovat imunologické riziko a prognózu přežívání pacientů a transplantovaných srdcí. Profil protilátek byl také sledován u pacientů po transplantaci při léčbě rezistentní protilátkami zprostředkované rejekce.

Dalším cílem práce byla charakterizace buněčné imunitní odpovědi u pacientů před transplantací ledvin od žijících dárců. Analyzovali jsme aktivaci lymfocytů ve smíšených lymfocytárních kulturách a detekovali frekvence IFN gama produkujících paměťových / efektorových buněk s cílem predikce rejekčních epizod po transplantaci.

V posledním oddíle práce měla za cíl studium genových transkriptů u pacientů s histologickou diagnózou hodnocenou termínem “hraniční změny”. Analyzovali jsme dvě skupiny pacientů indikované časně po transplantaci a tři měsíce po transplantaci, u kterých pod stejnou diagnózou byly různé klinické projevy. Hodnocení bylo vztaženo k predikci rejekce.

Shrnuto, cíle práce byly:

1. Analyzovat roli a prediktivní hodnotu HLA protilátek u pacientů před a po transplantaci srdce.
2. Vyhodnotit efektivitu léčby preparátem Bortezomib u závažné (rezistentní) formy AMR po transplantaci srdce.
3. Analyzovat frekvence IFN gama produkujících buněk jako prediktivní ukazatel rejekce u pacientů před transplantaci ledviny
4. Studovat specifické genové exprese u pacientů s diagnózou hraničních změn v biopsiích transplantovaných ledvin.

4. Seznam publikací spojených s tématem disertace

1. **Svobodova E.**, Gazdic T., Kubánek M., Vymetalova J, Voska L., Kment M., Lanska V., Kolesar L., Urban M., Netuka I., Pirk J., Melenovsky V., Kautzner J., Slavcev A, Malek I. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transplant international*. 2016, **29**(1), 63-72.
IF3,079
2. Gazdic T., **Svobodova E.**, Kubanek M., Kment M., Pagacova L., Viklicky O., Malek I., Kautzner J. Bortezomib-containing regimen for primary treatment of early antibody-mediated cardiac allograft rejection: a case report. *Progress in transplantation*. 2015, **25**(2), 147-152.
IF 0,971
3. Slavcev A., Rybakova K., **Svobodova E.**, Slatinska J., Honsova E., Skibova J., Viklicky O., Striz I. Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant immunology*. 2015, **33**(2), 63-68.
IF1,317.
4. Hruby P., Brabcova I., Gueler F., Krejcik Z., Stranecky V., **Svobodova E.**, Maluskova J., Gwinner W., Honsova E., Lodererova A., Oberbauer R., Zachoval R., Viklicky O. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney international*. 2015, **88**(4), 785-795.
IF 7,683.

Zmíněné práce jsou součástí Přílohy 3.

5. Výsledky a komentáře k publikacím

5.1 Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance.

Svobodova E., Gazdic T., Kubánek M., Vymetalova J, Voska L., Kment M., Lanska V., Kolesar L., Urban M., Netuka I., Pirk J., Melenovsky V., Kautzner J., Slavcev A, Malek I. *Transplant international*. 2016, 29(1), 63-72. IF 3,079

Cílem studie bylo retrospektivně stanovit imunologické riziko pacientů, kteří podstoupili transplantaci srdce v IKEM v letech 2005-2012. U pacientů (n = 264) jsme stanovili protilátky proti HLA a MICA antigenům pomocí metody pevné fáze (Luminex), následně určili jejich schopnost vázat komplement pomocí C1q testu. Výsledky jsme porovnali s cytotoxickou metodou stanovení HLA protilátek před transplantací, tj. PRA testem (Panel reaktivní protilátky) a s potransplantačním průběhem – typ rejekce (ACR, AMR) a selhání funkce štěpu. Doba sledování byla 39 měsíců.

Rejekční změny byly hodnoceny na endomyokardiálních biopsiích (EMB hodnoceno dle ISHLT klasifikace 2011, n = 3270). AMR byla prokázána u 19 (7 %) pacientů, z čehož 8 (42 %) pacientů vyvinulo časnou AMR (do 100 dnů po transplantaci) a u 9 (47 %) pacientů došlo k srdečnímu selhání během AMR.

DSA před transplantací jsme detekovali u 57 (22 %) pacientů, *de novo* protilátky se vytvořili u 28 (11 %) pacientů. Pretransplantační senzitivace HLA protilátkami byla ovlivněna pohlavím (častější u žen) a předchozími chirurgickými výkony. U pacientů s VAD (ventricular assist device) jsme detekovali vyšší hladinu anti HLA protilátek v porovnání s pacienty, kteří podstoupili jinou srdeční operaci ($P > 0,001$) a také v porovnání s ostatními pacienty ($P > 0,001$). Nicméně implantace VAD neovlivnila následný potransplantační průběh, u pacientů jsme nezaznamenali vyšší riziko rejekce (AMR nebo ACR) ani selhání štěpu.

Závěr:

Nejsilnějším prediktorem AMR (zejména časně AMR) byla přítomnost DSA před transplantací v kombinaci s historicky vyššími PRA (PRA > 10%) ($P = 0,015$). Vyšší počet DSA proti dárcovským antigenům spolu s vysokými hodnotami MFI (mean fluorescence intensity) byly více rizikové. Test C1q, prokazující schopnost protilátek vázat komplement, neměl prediktivní hodnotu k AMR, stejně jako přítomnost MICA protilátek před transplantací.

Práce na publikaci: sběr serologického materiálu, experimentální část (analýza protilátek metodou Luminex, analýza PRA metodou CDC, typizace HLA), analýza dat, příprava článku

Podpis školitele:

Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

5.2 Bortezomib-containing regimen for primary treatment of early antibody-mediated cardiac allograft rejection: a case report.

Gazdic T., Svobodova E., Kubanek M., Kment M., Pagacova L., Viklicky O., Malek I., Kautzner J. *Progress in transplantation*. 2015, **25**(2), 147-152. ISSN 1526-9248. IF 0,971

V této práci jsme shrnuli první zkušenosti použití Bortezomibu na léčbu časně AMR u pacienta po transplantaci srdce. Bortezomib působí na zralé plazmatické buňky a také na paměťové B buňky, inhibuje aktivitu NF- κ B, tlumí buněčnou proliferaci a způsobuje apoptózu. Snižuje také expresi HLA antigenů I. třídy. U pacientů po transplantaci ledvin bývá aplikován u rezistentních forem AMR (poprvé použit v léčbě AMR 2008 (177), v IKEM indikace od roku 2012).

Pacient byla 21letá žena, která prodělala v dětství opakované operace srdce, při zařazení na čekací listinu byla hodnocena nízkým imunologickým rizikem (0 % PRA). Na čekací listině byla 3 měsíce, poté podstoupila transplantaci srdce (shoda v krevní skupině, 1 shoda v HLA systému). Crossmatch test před transplantací byl negativní, retrospektivně jsme zjistili FCXM (*Flow Cytometry Crossmatch*) T buňky negativní, B buňky pozitivní. Pacientka dostala standardní indukční terapii ATG, následovala trojkombinace FK506, mykofenolová kyselina, kortikoidy.

9. den po transplantaci bylo diagnostikováno bilaterální srdeční selhání. V endomyokardiální biopsii byla určena AMR, detekovali jsme přítomnost cytotoxických protilátek (CDC test pozitivní, FCXM pozitivní T i B buňky). Donor specifické protilátky byly retrospektivně stanoveny před transplantací (protilátky HLA I. i II. třídy), v potransplantačním séru jsme navíc zaznamenali *de novo* protilátky (anti A68), hodnota nad 10.000MFI.

Léčba rejekce zahrnovala imunoabsorpci, methylprednison, rituximab, bortezomib a IVIG dle protokolu Walsh et.al. (178). Po 2 cyklech terapie (62. den po transplantaci) jsme zaznamenali signifikantní snížení DSA v I. i II. třídě a remisi rejekce v histologickém nálezu. Kvůli prevenci opakovaného výskytu AMR pacientka podstoupila navíc 3 cykly imunoabsorpce a aplikaci IVIG. Rok po transplantaci měla pacientka normální klinický nález (hodnoceno dle koronární angiografie), bez známek rejekce (dle biopsie).

Závěr:

Použití Bortezomibu velmi radikálně inhibuje produkci DSA, jejichž monitorování pomocí serologických metodik je pro pacienta méně invazivní než endomyokardiální biopsie. Léčba AMR je ekonomicky nákladná a může ohrozit pacienty svou toxicitou a zvýšeným rizikem infekčních komplikací (pacientka měla cytomegalovirovou infekci 7. měsíc po Tx).

Práce na publikaci: experimentální část (analýza protilátek metodou Luminex, typizace HLA dárce a příjemce), monitorace léčby, příprava článku

Podpis školitele:

Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

5.3 Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft.

Slavcev A., Rybakova K., **Svobodova E.**, Slatinska J., Honsova E., Skibova J., Viklicky O., Striz I. *Transplant immunology*. 2015, **33**(2), 63-68. IF 1,317.

V této studii jsme hodnotili buněčnou imunitní odpověď pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledvin od žijících dárců v IKEM v období 2010-2012 (n = 47). U těchto pacientů byly nejprve stimulovány periferní mononukleární lymfocyty (PBMC) ve smíšených lymfocytárních kulturách (MLC) buňkami dárce. Následně pomocí metody ELISPOT (*Enzyme-linked ImmunoSpot*) byly měřeny frekvence IFN gama produkujících donor-specifických T lymfocytů (efektorových/paměťových). Cílem práce bylo ověřit, zda zvýšení počtu IFN gama produkujících T lymfocytů stimulovaných dárcovskými antigeny může ovlivnit rozvoj imunitní reakce namířené proti neshodným dárcovským antigenům. Výsledky jsme porovnali s incidencí rejekce (TCMR i AMR), počtem HLA neshod a produkcí donor specifických protilátek a dalšími faktory. Doba sledování sledování pacientů byl 1 rok po transplantaci.

Závěr:

Neshoda v HLA systému (HLA mismatch), konkrétně v antigenech HLA II.třídy, byla asociována s rozvojem časně TCMR po transplantaci. Počet neshodných HLA antigenů souvisel s větší stimulací IFN gama produkujících buněk, nicméně frekvence IFN gama produkujících buněk přímo nesouvisela s incidencí rejekce po transplantaci. Vážnější formy TCMR měly vyšší počet IFN gama produkujících buněk.

Rizikovým faktorem pro vznik časně rejekce po transplantaci (TCMR i AMR) byla produkce protilátek detekovaná pomocí průtokové cytometrie (donor specifické protilátky proti antigenům HLA II.třídy). U pacientů, kteří vyvinuli AMR byla předtransplantační aktivace IFN gama produkujících buněk vyšší v porovnání s pacienty s TCMR.

Práce na publikaci: experimentální práce (izolace a kultivace buněk, smíšené lymfocytární kultury, ELISPOT, protilátková analýza), příprava článku

Podpis školitele:

Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

5.4 Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes

Hruba P., Brabcova I., Gueler F., Krejcik Z., Stranecky V., Svobodova E., Maluskova J., Gwinner W., Honsova E., Lodererova A., Oberbauer R., Zachoval R., Viklicky O. *Kidney international*. 2015, **88**(4), 785-795. ISSN 0085-2538. e-ISSN 1523-1755. IF 7,683.

Banffská klasifikace biopsií štěpu zahrnuje termín Hraniční změny, které jsou u transplantovaných ledvin hodnoceny jako minimální zánětlivá reakce v intersticiu s výskytem tubulitidy. Tento nález se objevuje jak u pacientů se stabilní funkcí štěpu v tzv. protokolární biopsii (standartně prováděné v našem centru ve 3 měsících po transplantaci), tak u pacientů, u nichž je biopsie indikovaná kvůli zhoršení funkce transplantované ledviny (podezření na rozvoj rejekce). Prognóza tohoto nálezu je nejasná a není konsensus o přístupu k terapii.

Studie byla zaměřena na porovnání expresních profilů biopsií s nálezem hraničních změn v indikační biopsii časně po transplantaci (do 2 týdnů po transplantaci, n = 41) a v protokolární biopsii (3 měsíce po transplantaci, n = 21). Na základě genové exprese v biopsiích s hraničními změnami bylo predikováno následné zhoršení renální funkce o více než 25 % v období 3 měsíců až 2 let po transplantaci.

Závěr:

V biopsiích s hraničními změnami diagnostikovanými časně po transplantaci jsme zaznamenali zvýšenou expresi genů asociovaných se zánětlivou reakcí a imunitní odpovědí v porovnání s hraničními změnami diagnostikovanými v tříměsíčních protokolárních biopsiích, tzn. že u stejného histologického nálezu s různými klinickými projevy jsme potvrdili rozdíly v genové expresi.

V časných biopsiích s hraničními změnami, starší věk dárce a exprese makrofágového receptoru CLEC5A (*C type lectin domain containing 5A*) predikovaly následné zhoršení funkce ledvinného štěpu. Zhoršení renální funkce po časných hraničních změnách, souviselo s vyšší expresí imunitních a prozánětlivých genů. Naproti tomu, zhoršování funkce ledviny po protokolárních biopsiích s hraničními změnami, bylo predikováno vyšší expresí genu pro fibrinogen. Nejčastější příčinou zhoršování funkce byla chronická rejekce. Pacienti se nelišili v základních demografických charakteristikách, ani v přítomnosti donor specifických protilátek. Vyšetření transkriptomu může významně pomoci s identifikací pacientů s hraničními změnami v riziku

progrese. Od roku 2022 už jsou biopsie s hraničními změnami standardně vyšetřovány metodou microarray a pacienti jsou léčeni dle výsledků molekulárního vyšetření.

Práce na publikaci: experimentální práce (analýza protilátek metodou Luminex, PRA, HLA typizace)

Podpis školitele:

Doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

6. Diskuze

Imunitní odpověď příjemce orgánu je dána v první řadě vlastním nastavením imunitního systému v době transplantace a jeho následnou reakcí na základě rozeznání neshodných antigenů dárce. Vliv antigenní shody v HLA systému na průběh po transplantaci byl ověřen v mnoha studiích (25-28, 89) a je také základem dnešních alokačních algoritmů. Nicméně ačkoliv je shoda, respektive neshoda, v HLA antigenech určena typizací na vysoké rozlišení, je dnes zřejmé, že imunogenicita antigenu se odvíjí od rozeznání konkrétních antigenních epitopů (29, 120).

V této práci jsem se zabývala v první části stavem imunitního systému pacientů před transplantací a to z pohledu jejich protilátkové senzitivace. V první studii (179) bylo retrospektivně stanoveno imunologické riziko u pacientů před transplantací srdce. Protilátkový screening před transplantací byl sledován od doby zařazení na čekací listinu, až po okamžik bezprostředně před transplantací. Určení protilátkového profilu bylo u každého pacienta provedeno na základě metod založených na mikrolymfocytotoxickém testu (stanovení PRA, CDC před transplantací) a také pomocí solid phase metod (Luminex – stanovení HLA, MICA, C1q protilátky). Obě metody se principiálně liší, PRA využívá živé buňky, antigeny prezentované na buňkách jsou v nativní podobě. Tímto testem se dá odhalit přítomnost cytotoxických protilátek před transplantací a predikovat riziko hyperakutní rejekce. Naopak pomocí metody Luminex je možné stanovit konkrétní specifity protilátek. Nevýhodou je, že antigeny navázané na kuličkách jsou rekombinantní proteiny a při hodnocení je potřeba eliminovat falešně pozitivní reakce. V dnešní době se objevuje více diagnostických souprav, které se liší jednak v jednotlivém zastoupení a množství antigenů navázaných na kuličkách a rozdílné jsou také detekční protilátky. Stanovení protilátek pomocí této metody je nutno brát jako semikvantitativní a při porovnání jednotlivých studií v literatuře je nutné data vztáhnout ke konkrétním metodikám stanovení protilátkového profilu pacientů (180-182).

Data prezentovaná v této práci (179) ukazují, že nejspolehlivějším prediktorem protilátkami zprostředkované rejekce (AMR), a to zejména časné AMR, před transplantací srdce, je přítomnost preformovaných DSA před transplantací. Imunologické riziko stoupá se zvyšujícím se množstvím DSA a rovněž s vyššími hodnotami fluorescence DSA (MFI - *Mean Fluorescent Intensity*). Tato zjištění korelují se studiemi z jiných center, které potvrzují vliv preformovaných DSA na vývoj AMR a dlouhodobou funkci srdečního štěpu (62, 111, 183).

Hodnoty PRA, se ukázaly být dalším doplňujícím faktorem hodnocení senzitivizace. Určení PRA není tak senzitivní jako stanovení protilátek metodou Luminex, nicméně v případě diskrepantních výsledků může poukázat na přítomnost non HLA protilátek, které nejsou součástí detekčních souprav Luminex (kromě MICA). V klinické praxi jako riziková jsou hodnoceni pacienti s PRA \geq 10%, nicméně některé multicentrické studie poukazují, že až od hodnot PRA > 25% má test lepší prediktivní hodnotu k rozvoji rejekce a na přežití srdečního štěpu (184, 185). U těchto pacientů je proto doporučována desenzibilizační příprava před transplantací. Rozdíly mezi centry mohou být dány jednak metodikou testování (PRA versus cPRA), složením testovaného panelu a taky dobou odběru vzorku (historické maximální PRA versus aktuální PRA před transplantací).

Většina dosud publikovaných studií se shoduje na nutnosti testování protilátek před transplantací u všech orgánů a tyto poznatky jsou dnes součástí doporučení odborných společností (49, 184, 186, 187). Je vhodné monitorovat hladiny protilátek již během čekání na transplantaci, protože mnoho pacientů je senzitivizováno, nejen vlivem těhotenství (188), ale zvláště u pacientů čekající na transplantaci srdce jsou časté klinické situace vyžadující krevní transfúze, zejména po implantaci mechanických srdečních podpor (VAD – *Ventricular Assist Device*) (128-133, 189-192). Je nutné si ovšem uvědomit, že k senzibilizačním událostem, které vedly k tvorbě HLA protilátek, mohlo dojít i desítky let před transplantací, a proto rozsah a síla protilátek zjištěných aktuálně v cirkulaci nemusí vždy odrážet rozsah a reaktivitu plazmatických buněk nebo paměťových B buněk, které mohou být po transplantaci reaktivovány (193).

U pacientů po implantaci VAD pozorujeme často nárůst PRA, které ovšem mohou postupem času poklesnout a v době transplantace se normalizovat. S ohledem na potransplantační průběh se většina studií shoduje, že ačkoliv implantace VAD dočasně zvýší hodnoty PRA, tak VAD nemá vliv na rozvoj rejekce či přežití štěpu, což potvrzují i naše data (132, 184, 191, 192). U pacientů, kteří mají VAD, při testování metodikami pevné fáze (Luminex či ELISA) dochází často k interferencím u negativních kontrolních vzorků, což mohou způsobovat protilátky namířené proti umělým materiálům, a tím i k chybné interpretaci testu (190). U těchto pacientů byla také prokázána latentní tvorba fibrinu, pravděpodobně vlivem užívání antikoagulační terapie (Warfarin atd.), což může během analýzy způsobit falešně pozitivní reakci, kdy fibrin nespecificky přilne k analyzačním jamkám a nespecificky váže IgG protilátky (194). Další příčinou je zvýšení hladin polyreaktivních přirozených IgG protilátek, které vznikají na podkladě nespecifické aktivace B lymfocytů apoptotickými buňkami po implantaci VAD, a také kvůli zánětlivé reakci, která může celý proces doprovázet (131, 195). A v neposlední řadě zvýšení PRA

může být způsobeno i přítomností non HLA protilátek, např. proti AT1R, což ukazují i data našeho centra ve studii Urban et al. (70). Na druhou stranu Oaks et al. (194) naznačuje, že samotné určení protilátek proti AT1R může poskytnout nespecifické výsledky a že u pacientů s VAD toto stanovení nemá dostatečnou prediktivní hodnotu.

Detekce DSA pomocí metod využívající vazbu C1q složky komplementu je intenzivně diskutovaným tématem a v literatuře na ni nepanuje jednoznačný názor. Jak ukazují data v této práci (179), průkaz C1q pozitivních DSA před transplantací srdce neměl dostatečnou prediktivní hodnotu k rozvoji rejekce po transplantaci. Toto zjištění je v rozporu se studií Zeevi et al (196), kde ale byli studováni pouze vysoce senzitivizovaní pacienti (hodnoceno dle cPRA > 50%). U těchto pacientů byla prokázána prediktivní hodnota C1q testu k rozvoji AMR po transplantaci. Právě u vysoce senzibilizovaných pacientů, u kterých se při analýze často potýkáme s vysokou reaktivitou séra vyžadující ředění vzorků a u kterých je obtížná interpretace výsledků, se předpokládá, že C1q test by mohl odhalit potenciálně nebezpečné protilátky. Každá molekula C1q musí být vázána Fc fragmentem 5-6 IgG protilátek, aby došlo k aktivaci, tudíž aktivace komplementu vyžaduje skutečně vysokou koncentraci protilátek v séru (124, 197). Nicméně určení míry patogenicity protilátek dle hodnot fluorescence (MFI - mean fluorescence intensity) je diskutabilní. Některé studie ukazují, že zvýšené hodnoty MFI u C1q testu neznamení zvýšenou hladinu protilátek v séru a nekorelují s klinickým obrazem pacienta (198). Naopak například u dětských příjemců srdečních štěpů se potvrdila asociace *de novo* C1q DSA k akutní AMR, CAV (cardiac allograft vasculopathy) i ztrátě štěpu (199). Nedávno publikovaná práce Tambur et al. (197) zabývající se srovnáním hodnot MFI při ředění vysoce pozitivních vzorků testovaných „klasickým“ testem (*Single Antigen Beads*, SAB) a metodou C1q ukazují, že hodnoty MFI u konvenčního testu SAB (IgG) se zvyšují lineárně až do nasycení, zatímco u testu C1q se zvyšují logaritmičticky, což opět ukazuje rozdílné množství protilátek, které je nutné pro pozitivitu testu. Proto sériová ředění a/nebo skutečné stanovení titru protilátek by mohly být v budoucnu součástí standardních protokolů v klinických studiích pro desenzibilizaci nebo léčbu AMR, aby bylo možné přesně a spolehlivě kvantifikovat HLA protilátky (200). Hodnocení protilátek pomocí C1q testu přináší zatím spíše doplňující informace k patologickému ději v transplantovaném štěpu a není dosud mezi jednotlivými centry zcela standardizováno.

Posledním nálezem byla přítomnost předtransplantačních non HLA protilátek MICA, které u testovaných pacientů nebyly spojeny s nežádoucími klinickými komplikacemi po transplantaci. Nutno podotknout, že v této studii (179) nebyla stanovena shoda v MICA antigenech mezi

pacienty a dárci, a tudíž ani určení specifacity MICA protilátek. V době této studie také nebyly dnes již dostupné detekční soupravy umožňující stanovit další non HLA protilátky (např. ETAR, myozin, lamin...), a proto jsme byli omezeni na analýzu pouze MICA protilátek.

V literatuře jsou dostupné práce, které poukazují na asociaci protilátek MICA v kombinaci s HLA protilátkami ve vztahu k akutní i chronické vaskulární rejekci (62, 201, 202). Tyto studie sledovaly potransplantační protilátkovou produkci, kdy přítomnost DSA často předchází výskytu MICA protilátek. Nelze tedy přesně říci, zda za patologický děj v transplantovaném srdci mohou MICA protilátky a či zda jejich působení není jen důsledkem reakce vyvolané HLA protilátkami. Je pravděpodobné, že vazba HLA-DSA způsobuje poškození endoteliálních buněk ve štěpu, což indukuje stresové signály, které upregulují expresi MICA a spouští rozvoj MICA-DSA. Přítomnost MICA protilátek v kombinaci s HLA protilátkami jsme pozorovali i v naší studijní skupině. Ve studii Pavlova et al. (203), byly MICA protilátky u pacientů po transplantaci srdce analyzovány nejen v kombinaci s HLA protilátkami, ale i v souvislosti s hladinami hepatocytárního růstového faktoru (HGF – *Hepatocyte Growth Factor*). Vyšší koncentrace HGF v séru pacientů významně korelovaly s tvorbou HLA protilátek před transplantací i po ní, ale předtransplantační produkce MICA protilátek neměla přímou souvislost s výskytem AMR. Naopak produkce MICA protilátek po transplantaci měla tendenci zvýšeného rizika AMR (203). Nedávno byla publikovaná kazuistika u dětského pacienta (204), který podstoupil retransplantaci srdce a který vyvinul po první transplantaci nejen HLA-DSA, ale i MICA protilátky v kombinaci s protilátkami AT1R. Při druhé transplantaci měl pacient negativní HLA-DSA a přesto tento pacient vyvinul AMR vyžadující silnou antirejekční terapii. Tato práce poukazuje nejen na asociaci HLA a non HLA protilátek, ale i na vzájemné působení non HLA protilátek.

Jak již bylo zmíněno, monitorování imunitní odpovědi před transplantací je důležité při hodnocení potransplantačního vývoje a to zejména pro stanovení *de novo* DSA. V případě, že příjemci měli DSA před transplantací, tak jejich paměťové buňky mohou vytvořit *de novo* DSA i proti dalším antigenním epitopům po transplantaci kratším časovém intervalu (98, 183). U transplantací srdce se odhaduje, že produkce *de novo* DSA se pohybuje u 15-20 % pacientů (186, 205).

Ačkoliv v této práci (179) nebyla sledována potransplantační produkce protilátek, na naše výsledky navázala studie Pazderník et al. (206), kde byli sledováni pacienti před a po transplantaci srdce (v období 1, 6, 12 měsíců po transplantaci) ve vztahu k produkci HLA a MICA protilátek a rozvoji AMR. Stav poškození myokardu byl hodnocen nejen dle

endomyokardiálních biopsií, ale i porovnáním cévních změn pomocí 3D optické tomografie, která je citlivější diagnostická metoda v porovnání s konvenční koronarografií. V této studii nebyla identifikována přímá souvislost mezi přítomností DSA a (nebo) MICA protilátkami a progresí tloušťky intimy v časném období po transplantaci. Nicméně se ukázal vztah DSA, *de novo* DSA a protilátek proti HLA antigenům II.třídy, produkovaných během prvního roku po transplantaci k progresi tloušťky média, což může naznačovat nový pohled na imunopatologický aspekt CAV (*Cardiac Allograft Vasculopathy*). Předpokládá se, že zesílení mediální vrstvy a zúžení intimy je důležitým časným indikátorem rozvoje CAV, který odráží zvýšenou mitotickou aktivitu buněk hladké svaloviny, která předchází intimální infiltraci a progresi intimálních změn (206-208).

Potransplantační sledování produkce protilátek je předmětem naší druhé práce Gazdič et al. (209), kde jsou uvedeny naše zkušenosti s léčbou preparátem Bortezomib u závažné AMR. Léčba AMR u transplantací srdce vychází ze zkušeností terapeutických postupů u pacientů po transplantaci ledvin (177). Bortezomib se indikuje u těžkých rezistentních forem AMR, kde předchozí terapeutické postupy nemají dostatečný požadovaný účinek. Bortezomib působí jako inhibitor proteazomu plazmatických buněk a B lymfocytů. Jedná se o malou molekulu, která se naváže na $\beta 5$ podjednotku proteazomu a tím naruší jako proteolytickou aktivitu. Následně dochází k inhibici dráhy NF- κ B, inhibuje se buněčná proliferace a nastává buněčná apoptóza. Kromě zablokování produkce protilátek jeho dalším působením je snížení exprese antigenů HLA I.třídy (178, 210). Jak naznačují v poslední době výsledky na zvířecích modelech, Bortezomib zmírňuje proces AMR i působením na diferenciaci Treg/Th17 lymfocytů, ve smyslu zvýšení počtu Treg lymfocytů a v modulaci cytokinové odpovědi, zvýšením hladin protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-35, TGF- beta) (211).

V této kazuistice jsme zjistili, že po podání Bortezomibu v kombinaci s cykly plazmaferéz a imunoadsorpcí postupně dochází k snižování hladin DSA. Během 5 terapeutických cyklů došlo k redukci DSA v HLA I.třídě, u DSA v HLA II. třídě jsme pozorovali snížení hladin DR protilátek, u DQ protilátek byl pokles pozvolný a redukce nastala až 12 měsíců po transplantaci. Bortezomib lze použít i před transplantací v rámci desenzibilizační přípravy. Brinkley et al. (212) poukazuje, že použití Bortezomibu u vysoce senzitivizovaných čekatelů na transplantaci srdce snižuje hladiny protilátek zejména proti antigenům HLA I. třídy, stejně jako ve studii Philogene et al. (213), kdy proběhla stejná analýza u HLA inkompatibilních transplantací ledvin. Snížení hladin protilátek (DSA) v HLA I. třídě souvisí s potlačením exprese HLA antigenů I. třídy (o 23

% ve studii Philogene et al. (213)), stejně jako snížení produkce intracelulárních molekul HLA I. třídy (v průměru o 29 %). Ve studii Slatinska et al. (214) Bortezomib úspěšně redukoval hladiny donor specifických protilátek i v HLA II. třídě a to konkrétně protilátky proti DR antigenům. Hladiny DQ protilátek však zůstaly prakticky stejné, což je v souladu např. se studií Touzot et al. (215). Důvod perzistence DQ protilátek i při léčbě preparátem Bortezomib však zůstává zatím neobjasněný. Jak již bylo řečeno, míra shody v DQ antigenech mezi dárcem a příjemcem orgánu ovlivňuje dlouhodobé přežívání štěpu. Pacienti mající neshodu v DQ antigenech mají častější výskyt AMR v prvním roce po transplantaci, což zřejmě souvisí s produkcí *de novo* protilátek (216, 217). K určení míry patogenního vlivu DQ protilátek by mohly eventuálně přispět testy definující komplement- vážící protilátky, popřípadě jiné metodické postupy by mohly naznačit, které protilátky lze odstranit plazmaferézou (197, 215).

Nutno dodat, že aplikace Bortezomibu sebou nese řadu nežádoucích účinků, působí neurotoxicky a může způsobit hyperhydrataci, trombocytopenii a neutropenii. U pacientů můžeme zaznamenat i infekční komplikace (např. CMV infekce), což byl případ i naší pacientky.

Další část této práce je zaměřena na predikci buněčné imunitní odpovědi před transplantací. Tato studie byla provedena na souboru pacientů, kteří podstoupili v našem centru transplantaci ledvin od žijících dárců. Obecně řečeno, transplantace od žijících dárců vyžaduje delší přípravu, což nám na druhou stranu umožňuje důkladnější analýzu pacientů (i dárců) za účelem definovat imunologické riziko, popřípadě minimalizovat imunitní odpověď pacienta pomocí desenzitizační přípravy. Navíc v případě inkompatibility je pacientům v našem centru umožněn program Párových výměn, který byl zahájen v roce 2012 na jehož algoritmu se naše laboratoř aktivně podílí.

Určení protilátkové senzitivace bylo již diskutováno v předchozí části, k stanovení buněčné odpovědi byla v této studii použita metoda ELISPOT (*Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay*). ELISPOT je velmi citlivá metoda, která umožňuje detekovat cytokinovou produkci na úrovni jednotlivých buněk (efektorových/ paměťových). Stimulace buněk ve směsných lymfocytárních kulturách, kde je proliferace buněk dárce inhibována (např. mitomycinem), umožňuje hodnocení reakce buněk pacienta s nativními antigeny konkrétního dárce (218), tj. charakterizace přímého rozpoznávání antigenu. V diagnostice je snaha využít tuto metodu k hodnocení rizika preformované buněčné odpovědi, stejně jako *de novo* aloimunitní aktivace lymfocytů. Ve vztahu k určení aktivace T lymfocytů, je nejčastěji hodnocena produkce IFN gama.

Je nutno podotknout, že výsledky metodiky ELISPOT mohou být ovlivněny řadou známých a někdy i neznámých faktorů. Na stimulaci buněk má vliv podání indukční terapie před transplantací (ATG – antithymocytární globulin), jelikož dochází k eliminaci či snížení počtu efektorových T lymfocytů (219, 220). Dalším faktorem ovlivňující výsledky, tj. frekvenci IFN gama produkujících buněk, je počet neshod v HLA antigenech mezi příjemci a dárci orgánů. V našem souboru jsme ukázali, že míra neshody v HLA antigenech II. třídy byla asociována s rozvojem časně TCMR po transplantaci. Počet HLA neshod zřejmě poukazuje na vyšší buněčnou stimulaci přímým rozpoznáváním neshodných antigenů, jehož důsledkem je zvýšená produkce IFN gama. Stejný nálezn byl publikován ve studii Hricik et al. (221). V nedávno publikované práci Bestard et al. (217), bylo ukázáno, že zejména neshoda v DQ antigenech na úrovni epletů, ovlivňuje reaktivaci T lymfocytů, a také produkci *de novo* DSA. Důležitost shody v DQ antigenech byla v této práci již mnohokrát zdůrazněna a tento fakt byl prokázán na skupinách našich pacientů po transplantaci ledvin i srdce.

V naší studii jsme neprokázali vliv počtu IFN gama produkujících buněk v souvislosti s rozvojem akutní rejekce po transplantaci. Podobný nálezn byl publikován i v multicentrické studii Hricik et al. (222), kde byl sledován rozvoj rejekce u 176 pacientů v období 6 měsíců a 1 rok po transplantaci. Naopak ve studii Crespo et al. (223) bylo ukázáno, že pozitivní hodnoty IFN gama produkujících buněk před transplantací predikují časnou akutní rejekci (do 2 měsíců po transplantaci), nikoliv však rejekci do 1 roku po transplantaci. Dle posledních dat, meta-analýza hodnotící 32 publikovaných studií (včetně naší studie) zabývajících se aktivací T lymfocytů pomocí metody ELISPOT před i po transplantaci (v období 3, 6 a 12 měsíců po transplantaci) poukazuje na to, že pacienti mající vyšší frekvenci IFN gama produkujících buněk mají vyšší riziko rozvoje časně akutní celulární rejekce po transplantaci. Ve vztahu k AMR nebo produkci *de novo* DSA, před ani potransplantační monitorování nemělo dostatečnou prediktivní hodnotu. V této analýze byly hodnoceny i práce zabývajících se stanovením IL-17, IL-21 a IL-10 pomocí metody ELISPOT, které ukazují signifikantní rozdíly u pacientů s a bez rejekce. U IL-10 byl navíc ukázán i výrazný rozdíl v před a potransplantačním monitorování (224).

Nutno dodat, že produkce IFN gama není závislá jen na aktivovaných T lymfocytech, ale i na NK buňkách, které jsou v periferní krvi zastoupeny v 5-15 % a jejichž role je v poslední době hodně diskutovaná ve vztahu k rejekci (TCMR i AMR). Nové znalosti molekulárních transkriptů ukazují, že právě IFN gama indukuje zvýšený přepis některých genů (např. pro některé chemokiny) a že jeho role v transplantačních reakcích je zcela zásadní (225).

Dalším fakt je, že samotná stimulace T lymfocytů vedoucí k produkci IFN gama navíc nemusí být in vivo vyvolána jen přímým kontaktem s antigeny dárce, ale může být i vyvolána setkáním s infekčním agens (CMV cytomegalovirus, BK virus), čehož lze využít při stanovení produkce IFN gama u CMV pozitivních příjemců ledvin.

Kromě hodnocení aktivace T lymfocytů lze metodu ELISPOT použít i při hodnocení B buněčné odpovědi a protilátkové produkce. V dané studii (226) byla hodnocena produkce protilátek pomocí serologických metod a v kohortě pacientů byl prokázán vztah DSA II. třídy k rozvoji AMR, což pravděpodobně souvisí s počtem neshod v antigenech HLA II. třídy, jak již bylo diskutováno výše. Nevýhodou B buněčného testu ELISPOT je, že kultivace B lymfocytů trvá 6-10 dní, což činí tyto testy méně praktickými, pokud jsou požadovány klinické výsledky v krátkém časovém horizontu. Při těchto testech je důležité mít na paměti, že koncentrace HLA protilátek v kultivačním supernatantu nemusí nutně odpovídat frekvenci in vitro diferencovaných paměťových B buněk, protože je možné, že každá plazmatická buňka vylučuje různé množství HLA protilátek (193, 227). Ve studii Luque et al. (228) byla sledována pomocí metody ELISPOT frekvence paměťových B lymfocytů. Multivariační analýza ukázala, že před i potransplantační DSA a frekvence dárcovských reaktivních paměťových B buněk mohou být nezávislými prediktory AMR. U všech pacientů, u nichž byla prokázána akutní AMR v kombinaci s DSA v séru, měli detekovatelné i HLA specifické paměťové B lymfocyty. Přičemž 21 z 29 pacientů s chronickou AMR mělo v době diagnózy AMR negativní DSA, ale detekovatelné dárcovské reaktivní paměťové B buňky. Tato data naznačují, že sledování dárcovsky reaktivních paměťových B buněk může být užitečným doplňkem stanovení DSA za účelem přesné predikce nebo diagnózy AMR po transplantaci (193).

Přes všechna tato zjištění v literatuře zatím převládá názor, že stanovení buněčné odpovědi pomocí metody ELISPOT se dosud nejeví jako optimální metoda pro klinické použití, a že technika vyžaduje další důkladné mezilaboratorní porovnání a standardizaci. Konkrétně stanovení aktivace B lymfocytů pomocí metody ELISPOT vyžaduje další vývoj rychlých, spolehlivých a klinicky proveditelných testů (193).

Poslední práce (229) byla zaměřena na sledování genových transkriptů u pacientů po transplantaci ledvin, u nichž byla histologicky hodnocena diagnóza Hraničních změn. Termín „Hraniční změny“ je zařazen do Banffské klasifikace od roku 1997 a je používán v případě, kdy je v biopsii ledvin přítomen mírný intersticiální zánět, s výskytem tubulitidy mírného stupně a kdy není přítomna arteritida. Z histologického obrazu není zřejmé, zda se jedná o začínající

rejekci, která vyžaduje úpravu imunosupresivního režimu, či zda se jedná o jiný druh poškození. Výskyt tohoto nálezu je poměrně častý (30-40 %), avšak dle dostupných dat, u většiny pacientů (72 %) nedojde k progresi rejekce (230).

Je dobře známo, že biologický proces rejekce je postupný, který pomalu narůstá a postupně vrcholí plnohodnotnou rejekci. Pokud je biopsie provedena velmi brzy během tohoto průběhu, patologické změny ještě nedosáhnou prahu diagnózy rejekce. Proto je třeba standardizovat nejen kritéria pro diagnózu a klasifikaci takovýchto patologických lézí, ale i klinické indikace a načasování samotné biopsie.

Bylo popsáno, že hraniční změny v renálních štěpech jsou v mnoha případech důkazem alogenní imunologické aktivity, která je ovlivnitelná steroidní terapií. Na druhou stranu podobný zánětlivý obraz může být však i důsledkem nežádoucích účinků některých léků; např. inhibitory kalcineurinu mohou být příčinou mírné tubulitidy (230, 231).

K rozlišení imunologických událostí v ledvinném štěpu během rejekce od neimunologické dysfunkce lze využít například imunofenotypizaci buněk infiltrujících štěp, distribuci a zvýšenou expresi adhezivních molekul, zvýšení exprese HLA-DR antigenů podél tubulárních bazálních membrán, stupeň apoptózy či expresi chemokinů a chemokinových receptorů ve štěpu. Sledování genových expresních profilů přímo v transplantovaném štěpu nám umožňuje další pohled na tuto patologickou reakci, jelikož dokáže zachytit začínající, probíhající anebo odeznívající imunitní procesy.

V naší práci (229) jsme analyzovali 2 skupiny pacientů, u nichž byla definována stejná diagnóza, nález hraničních změn, ale v různém časovém období (časný výskyt do 2 týdnů po transplantaci versus protokolární biopsie ve 3 měsících po transplantaci). U těchto pacientů byl také různý klinický průběh, kvůli kterému byla biopsie indikována (myšleno časná biopsie). U těchto pacientů byl sledován expresní profil v bioptickém materiálu za účelem predikce zhoršení renálních funkcí. V biopsiích ledvin od pacientů s hraničními změnami diagnostikovanými časně po transplantaci jsme zaznamenali zvýšenou expresi genů asociovaných se zánětlivou reakcí a imunitní odpovědí v porovnání s tříměsíčními protokolárními biopsiemi. Rozdílná byla i exprese ve vztahu k predikci zhoršení renálních funkcí. U časných biopsií byla zaznamenána zvýšená zejména exprese genů pro makrofágový receptor CLEC5A, naopak u protokolárních vzorků byla asociace se zvýšenou expresí genů pro fibrinogen. Tyto výsledky ukazují, že u stejného histologického nálezu s různými klinickými projevy jsou rozdíly v genové expresi a že vyšetření

transkriptomu může významně pomoci v diagnostice pacientů. V souvislosti s průkazem DSA se v tomto souboru neprokázala žádná asociace u žádné ze skupin pacientů s diagnózou hraničních změn v biopsii.

Na tuto práci navázaly další studie Hrubá et al. (232, 233), které dále analyzovaly časné biopsie (z období do 2 týdnů po transplantaci) se suspekci k T buněčné rejekci, u nichž byla histologicky hodnocena tubulitida s anebo bez zánětlivé reakce v intersticiu. Výsledky byly porovnány pomocí nového analyzačního systému molekulárního mikroskopu, MMDx. V těchto studiích byly prokázány transkripty spojené s aktivací signálních drah zprostředkovaných cytokiny, odpovědí na IFN-gama, zánětlivou reakcí a dalšími faktory spojenými s chemotaxí lymfocytů a produkcí cytokinů. U biopsií s intersticiálním zánětem byly navíc na molekulární úrovni potvrzeny zvýšené transkripty NK buněk, CD8⁺ a CD4⁺ T buněk, následované dendritickými buňkami, B buňkami a monocyty, což naznačuje zapojení vrozených i adaptivních imunitních buněk do zánětlivého procesu. Tyto nálezy poukazují na to, že izolovaná tubulitida vyskytující se časně po transplantaci má méně zánětlivých signálů a jedná se tak o benigní fenotyp, narozdíl od tubulitidy spojené s intersticiálním zánětem. Od roku 2019 je dle Banffské klasifikace izolovaná tubulitida bez intersticiálního zánětu vyloučena z kategorie Hraniční změny (suspektní) pro akutní TCMR (7).

Sledování genových expresí přímo v transplantovaném štěpu nám v současné době pomáhá s diagnostikou nejen rejekčních, ale i jiných procesů a stalo se základem tzv. molekulárního mikroskopu (MMDx - Molecular Microscope Diagnostic System), v IKEM využíván od roku 2022. Systém MMDx, navržený skupinou prof. Hallorana (225), využívá mikročipy k měření genové exprese z biopsie a pomocí speciálních algoritmů interpretuje výsledky a porovnává každou novou biopsii s velkým referenčním souborem dřívějších biopsií. Tímto systémem lze hodnotit TCMR, AMR i zánět vyvolaný nedávným poraněním, přičemž se systém neustále "učí" z nových biopsií. Nejvíce informací máme dosud z dat transplantovaných ledvin, nicméně dnes se již MMDx využívá i k hodnocení rejekčních změn u dalších orgánů (90). Velkou výhodou toho vyšetření je, že lze analyzovat mnohem menší vzorek tkáně, který by jinak byl nevhodný pro histologické vyšetření (např. nedostatek glomerulů a arterií v kůře, nebo vzorek dřene ledvin). Studium genových expresních profilů začíná odhalovat nové mechanismy patogeneze těchto procesů a identifikovat cíle, kam zaměřit terapii. Zvýšené nebo snížené transkripty v biopsiích s rejekcí mohou naznačovat transkripční změny v rezidentních buňkách (např. v endotelu dárce)

nebo změny v buněčných populacích (např. infiltrace makrofágů u TCMR, aktivace intrakapilárních NK buněk u AMR).

Halloran et al. (225) definoval v biopsích transplantovaných ledvin, že oba typy rejekcí (AMR i TCMR) jsou spojeny s geny ovlivňující produkcí IFN gama. Nejuniverzálnější transkripty jsou IFN gama indukované molekuly (např. CXCL11, IDO) nebo sdílené efektorovými T-lymfocyty (ETC) a NK buňkami (např. KLRD1, CCL4). Tyto nálezy ukazují, že zatímco u TCMR dominuje intersticiální prezentace antigenů T lymfocytům, u AMR převažují procesy zprostředkované NK-buňkami v mikrocirkulaci. Tyto poznatky byly následně validovány i pro transplantované srdce (113).

Standardizací systému MMDx u transplantovaných srdečních štěpů bylo zjištěno, že u mnoha endomyokardiálních biopsií (EMB), které byly zprvu považovány za "bez rejekce", se objevily menší změny podobné AMR se zvýšenou pravděpodobností positivity DSA a jemného zánětu. Kromě toho systém MMDx používá soubory transkriptů souvisejících s poraněním k posouzení stupně parenchymového poranění a atrofie - fibrózy v každé biopsii a umožňuje studovat vliv rejekce na parenchym. TCMR přímo poškozuje parenchym, ale u AMR obvykle dochází vlivem mikrocirkulačního stresu k relativně malému počátečnímu poškození parenchymu, které však časem může přejít v parenchymovou atrofii - fibrózu. Tyto výsledky naznačují, že nízká úroveň molekulárního stresu souvisejícího s AMR může mít v srdečních štěpech mnohem větší vliv, než se dosud odhadovalo (90).

V nedávno publikované studii Schatchner et al. (234) byly porovnány výsledky z molekulárního mikroskopu s histologickým hodnocením dle aktuální Banffské klasifikace u 51 renálních biopsií, přičemž u 18 případů byl potvrzen diskrepantní výsledek. Ukazuje se, že systém MMDx nemá zatím dostatečnou specifitu klasifikátorů pro TCMR, zejména pokud se jedná o změny vyvolané BKV nefropatií, kdy systém nedokáže rozlišit, zda se jedná o poškození způsobené virovou aktivitou nebo o zánětlivou reakci vyvolanou T lymfocyty (235). MMDx navíc nemůže poskytnout podrobný obraz v případech, kdy histologie dále popisuje diagnostické znaky s potenciálním terapeutickým významem, jako je toxicita inhibitorů kalcineurinu. Naopak při hodnocení hraničních rejekčních procesů vykazuje molekulární mikroskop lepší výsledky v porovnání s klasickým histologickým vyšetřením. Zvýšená exprese specifických transkriptů nám umožňuje zachytit počátek rejekce ještě předtím, než je poškození viditelné na světelném mikroskopu. Vzhledem k tomu, že systém MMDx je nezávislý na přítomnosti DSA, může objasnit nejednoznačné případy AMR, pokud nejsou detekovatelné DSA (95). Kombinace

molekulárních a konvenčních přístupů, konkrétně klinických a histologických nálezů, naznačuje nové možnosti diagnostiky AMR i TCMR a další individualizaci terapeutických imunosupresivních postupů.

7. Závěr

V současné době je k dispozici velké množství nových diagnostických metodik, které však vyžadují shromažďování a dlouhodobou prospektivní analýzu jejich klinické relevance v horizontu min 5-10 let sledování. Tato práce je retrospektivním pohledem na diagnostiku donor specifických protilátek ve vztahu k predikci, diagnostice a léčbě protilátkami zprostředkované rejekce u orgánových transplantací. Ukazuje možnosti studia HLA a non HLA protilátek a jejich praktické využití v klinické praxi. Hlavním přínosem mé práce je potvrzení významu vyšetřování DSA, na jehož základě bylo umožněno do klinické praxe zavést rutinní stanovování DSA metodou Luminex u všech pacientů před transplantací srdce. Výsledky stanovování DSA umožnily navíc v TC IKEM rozvoj programu Párových výměn u transplantací ledvin od žijících dárců a jsou také základem programu Virtuálního crossmatch testu. Práce se dotýká i predikce buněčné imunitní odpovědi a sledování genových transkriptů v biopsiích, které naznačují slibný potenciál v diagnostice rejekčních procesů.

Hlavní poznatky této práce lze shrnout do následujících bodů:

- Přítomnost DSA u pacientů před transplantací srdce poukazuje na vyšší riziko vývoje AMR po transplantaci. Pokud jsou v historii pacienta zaznamenány hodnoty PRA > 10% v kombinaci s DSA před transplantací, se riziko časné AMR ještě zvětšuje.
- Větší počet DSA proti dárcovským antigenům spolu s vysokými hodnotami MFI jsou aplikovatelné pro identifikaci rizikových pacientů.
- Preformované MICA protilátky neovlivňují imunologické riziko po transplantaci srdce.
- Implantace mechanické srdeční podpory může dočasně zvýšit hladiny HLA protilátek, to však neovlivňuje potransplantační průběh.
- Léčba preparátem Bortezomib umožňuje redukci DSA při AMR, ovšem může být spojena s nežádoucími infekčními komplikacemi.
- Počet neshod v HLA antigenech II. třídy ovlivňuje frekvenci IFN gama produkujících buněk, počty IFN gama produkujících buněk stanovených metodou ELISPOT ovšem nesouvisí v incidenci rejekce po transplantaci ledvin.
- U pacientů se stejným histologickým nálezem hraničních změn, ale různými klinickými projevy, byly potvrzeny rozdíly v genové expresi mezi pacienty indikovanými časně po transplantaci a 3 měsíce po transplantaci.

8. Publikační činnost

8.1 Publikace s impact faktorem

2017

Viklický, O., Hrubá, P., Tomiuk, S., Schmitz, S., Gerstmayer, B., Sawitzki, B., Miqueu, P., Mrázová, P., Týcová, I., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Janssen, U., Volk, H., Reinke, P. Sequential Targeting of CD52 and TNF Allows Early Minimization Therapy in Kidney Transplantation: From a Biomarker to Targeting in a Proof-Of-Concept Trial. *PLoS ONE [online]*. 2017, **12**(1), art. no. e0169624. ISSN 1932-6203. IF 2,766. (236)

2016

Svobodová, E., Gazdič, T., Kubánek, M., Vymětalová, J., Voska, L., Kment, M., Lánská, V., Kolesár, L., Urban, M., Netuka, I., Pirk, J., Melenovský, V., Kautzner, J., Slavčev, A., Málek, I. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transplant international*. 2016, **29**(1), 63-72. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277. IF 3,079. (179)

2015

Gazdič, T., **Svobodová, E.**, Kubánek, M., Kment, M., Pagáčová, L., Viklický, O., Málek, I., Kautzner, J. Bortezomib-containing regimen for primary treatment of early antibody-mediated cardiac allograft rejection: a case report. *Progress in transplantation*. 2015, **25**(2), 147-152. ISSN 1526-9248. IF 0,971. (209)

Hrubá, P., Brabcová, I., Gueler, F., Krejcik, Z., Stranecky, V., **Svobodová, E.**, Malušková, J., Gwinner, W., Honsová, E., Lodererová, A., Oberbauer, R., Zchoval, R., Viklický, O. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney international*. 2015, **88**(4), 785-795. ISSN 0085-2538. e-ISSN 1523-1755. IF 7,683. (229)

Slavčev, A., Rybáková, K., **Svobodová, E.**, Slatinská, J., Honsová, E., Skibová, J., Viklický, O., Stříž, I. Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant immunology*. 2015, **33**(2), 63-68. ISSN 0966-3274. IF 1,317. (226)

2012

Urban, M., Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Pirk, J., Szárszoi, O., Malý, J., Netuka, I. Alloimmunosenitization in Left Ventricular Assist Device Recipients and Impact on Posttransplantation Outcome. *ASAIO journal*. 2012, **58**(6), 554-561. ISSN 1058-2916. IF 1,491. (189)

8.2 Publikace bez impact faktoru:

2020

Svobodova, E., Slavcev,A., Slatinska,J., Valhova, S., Honsova, E., Skibova, J., Striz, I., Viklicky, O. Long-term survival of the transplanted kidney and the clinical relevance of donor-specific antibodies. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 2020, 3(1): 17-22

2011

Hanzal, V., Viklický, O., **Slimáčková, E.** První použití bortezomibu při léčbě rezistentní akutní rejekce zprostředkované protilátkami. *Postgraduální nefrologie*. 2011, **9**(1), 15-16. ISSN 1214-178X.

8.3 Abstrakta

Boháčová, P., Kolesár, L., **Svobodová, E.**, Janatová, K., Slavčev, A., Viklický, O., Slatinská, J., Froněk, J., Zámečníková, R., Chromy, P. Kidney Paired Donation Program in the Czech Republic. *30th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*. Kos Island, GR, 11.05.2016 - 14.05.2016. *HLA*. 2016, **87**(4), 253, abstr. no. P47. ISSN 2059-2302. e-ISSN 2059-2310.

Koňářiková, A., **Svobodová, E.**, Wohlfahrtová, M., Vrbová, M., Slatinská, J., Slavčev, A., Pokorná, E., Viklický, O. Luminex a alokace ledviny k transplantaci. *8. výzkumné fórum Pyramida*. Jizerka, Horní Polubný, CZ. 09.01.2015 - 11.01.2015. Zorg. Transplantcentrum IKEM. In: *8. výzkumné fórum Pyramida*. Praha: IKEM, 2015, s. 10.

Kubánek, M., Gazdič, T., **Svobodová, E.**, Slavčev, A., Netuka, I., Pirk, J., Málek, I. Pathogenicity of pre-transplant donor-specific anti-HLA antibodies in heart transplant recipients. *35th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation*. Nice, FR, 15.04.2015 - 18.04.2015. Zorg. International Society for Heart and Lung Transplantation. *Journal of heart and lung transplantation*. 2015, **34**(4, Suppl. S), S295-S296. ISSN 1053-2498. e-ISSN 1557-3117.

Málek, I., Kubánek, M., Gazdič, T., Hegarová, M., **Svobodová, E.**, Slavčev, A., Voska, L., Pirk, J. Pretransplant anti-HLA antibodies and clinical events after cardiac transplantation. *Heart Failure 2015. 2nd World Congress on Acute Heart Failure*. Seville, ES, 23.05.2015 - 26.05.2015. Zorg. European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*. 2015, **17**(Supplement 1), 202, abstr. no. P937. ISSN 1388-9842.

Slatinská, J., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Marada, T., Hanzal, V., Viklický, O. Bortezomib in the treatment of resistant acute antibody-mediated rejection: A single centre experience. *17th Congress of the European Society for Organ Transplantation*. Brussels, 13.09.2015 - 16.09.2015. Zorg. European Society for Organ Transplantation. *Transplant international*. 2015, **28**(Supplement 4), 207, abstr. no. BO228. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277.

Slavčev, A., Rybáková, K., Brožová, J., **Svobodová, E.**, Slatinská, J., Honsová, E., Stříž, I., Viklický, O. Pre-transplant interferon-gamma and IGG producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *European Federation for Immunogenetics Conference*. Geneva, CH, 26.04.2015 - 29.04.2015. Zorg. European Federation for Immunogenetics. *Tissue antigens*. 2015, **85**(5), 409, abstr. no. P219. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Slavčev, A., **Slimáčková, E.**, Kubánek, M., Gazdič, T., Kolesár, L., Rodová, M., Málek, I. Pre-transplant allosensitization in heart transplant recipients and prediction of acute antibody-mediated rejection. *European Federation for Immunogenetics Conference*. Geneva, CH, 26.04.2015 - 29.04.2015. Zorg. European Federation for Immunogenetics. *Tissue antigens*. 2015, **85**(5), 429, abstr. no. P275. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Gazdič, T., Kubánek, M., **Svobodová, E.**, Slavčev, A., Pirk, J., Málek, I. Vztah předtransplantačních anti-HLA protilátek a klinického průběhu po transplantaci srdce. *XXII. výroční sjezd České kardiologické společnosti*. Brno, CZ. 04.05.2014 - 07.05.2014. Zörg. Česká kardiologická společnost. In: *XXII. výroční sjezd České kardiologické společnosti [online]*. Brno: Česká kardiologická společnost, 2014, s. č. abstr. 336.

Gazdič, T., Kubánek, M., **Svobodová, E.**, Slavčev, A., Netuka, I., Pirk, J., Málek, I. Pre-transplant anti-HLA antibodies and clinical events after heart transplantation. *34th Annual Meeting and Scientific Sessions of the International-Society-for-Heart-and-Lung-Transplantation*. San Diego, US, 10.04.2014 - 13.04.2014. *Journal of heart and lung transplantation*. 2014, **33**(4), S278-S278. ISSN 1053-2498. e-ISSN 1557-3117.

Hrubá, P., Brabcová, I., Krejčík, Z., Stránecký, V., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Viklický, O. Hraniční změny ledvinných štěpů: molekulární fenotyp predikující zhoršení funkce štěpu. *35. kongres České nefrologické společnosti*. Praha, CZ, 25.06.2014 - 27.06.2014. Zörg. Česká nefrologická společnost. *Aktuality v nefrologii*. 2014, **20**(suppl. 1), 20-21, č. abstr. O 16. ISSN 1210-955X.

Málek, I., Pagáčová, L., Gazdič, T., Kubánek, M., Voska, L., **Svobodová, E.**, Pirk, J. Bezpečnost a účinnost imunoabsorbce u srdeční transplantace. *XXII. výroční sjezd České kardiologické společnosti*. Brno, CZ. 04.05.2014 - 07.05.2014. Zörg. Česká kardiologická společnost. In: *XXII. výroční sjezd České kardiologické společnosti [online]*. Brno: Česká kardiologická společnost, 2014, s. č. abstr. 338.

Málek, I., Pagáčová, L., Gazdič, T., Kubánek, M., Svobodová, E., Voska, L., Pirk, J. Safety and effectiveness of immunoabsorbtion in cardiac transplant patients. *Heart Failure 2014. World Congress on Acute Heart Failure*. Athens, GR, 17.05.2014 - 20.05.2014. Zörg. European Society of Cardiology. *European journal of heart failure*. 2014, **16**(suppl. 2), 58-58. ISSN 1388-9842.

Pagáčová, L., Málek, I., Gazdič, T., Kubánek, M., Hošková, L., **Svobodová, E.**, Voska, L., Pirk, J. Účinnost imunoabsorpční léčby u pacientů s transplantací srdce. Poster. *V. česko-slovenský transplantační kongres*. Olomouc, CZ. 02.10.2014 - 04.10.2014. Zörg. Česká transplantační společnost, Slovenská transplantologická spoločnosť. In: *V. česko-slovenský transplantační kongres: Program, Abstrakta*. Praha: Česká transplantační společnost, 2014, s. 59, č. abstr. P-17.

Slatinská, J., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Marada, T., Hanzal, V., Viklický, O. Bortezomib in the treatment of resistant acute antibody-mediated rejection: A single centre experience. *World Transplant Congress*. San Francisco, US, 26.07.2014 - 31.07.2014. Zorg. American Society of Transplant Surgeons. *Transplantation*. 2014, **98**(Suppl. 1), 435-436, abstr. no. A125. ISSN 0041-1337.

Slatinská, J., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Marada, T., Hanzal, V., Viklický, O. Bortezomib in the treatment of resistant acute antibody-mediated rejection: a single centre experience. *World Transplant Congress*. San Francisco, US, 26.07.2014 - 31.07.2014. *American journal of transplantation*. 2014, **14**(Supplement 3), 435-436, abstr. no. A125. ISSN 1600-6135. e-ISSN 1600-6143.

Slatinská, J., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Hanzal, V., Viklický, O. Bortezomib v léčbě akutní protilátkami zprostředkované rejekci (AMR), zkušenosti našeho centra. *V. česko-slovenský transplantální kongres*. Olomouc, CZ. 02.10.2014 - 04.10.2014. Zorg. Česká transplantální společnost, Slovenská transplantologická spoločnosť. In: *V. česko-slovenský transplantální kongres: Program, Abstrakta*. Praha: Česká transplantální společnost, 2014, s. 40, č. abstr. O-33.

Slatinská, J., **Svobodová, E.**, Honsová, E., Hanzal, V., Viklický, O. Bortezomib v léčbě rezistentní akutní protilátkami zprostředkované rejekci (AMR), zkušenosti našeho centra. *35. kongres České nefrologické společnosti*. Praha, CZ, 25.06.2014 - 27.06.2014. Zorg. Česká nefrologická společnost. *Aktuality v nefrologii*. 2014, **20**(suppl. 1), 22, č. abstr. O 19. ISSN 1210-955X.

Slavčev, A., Valhová, Š., **Svobodová, E.**, Janatová, K., Boháčová, P., Slatinská, J., Viklický, O. Donor-specifické protilátky a dlouhodobé přežití transplantované ledviny. *V. česko-slovenský transplantální kongres*. Olomouc, CZ. 02.10.2014 - 04.10.2014. Zorg. Česká transplantální společnost, Slovenská transplantologická spoločnosť. In: *V. česko-slovenský transplantální kongres: Program, Abstrakta*. Praha: Česká transplantální společnost, 2014, s. 39, č. abstr. O-31.

Slavčev, A., **Svobodová, E.**, Valhová, Š., Slatinská, J., Viklický, O. Mica-specific antibodies may predict long-term kidney graft survival. *28th EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*. Stockholm, SE, 25.06.2014 - 28.06.2014. *Tissue antigens*. 2014, **84**(1), 80-81. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Verflová, A., **Slimáčková, E.**, Slatinská, J., Slavčev, A., Vítko, Š., Honsová, E., Viklický, O. Antibody-mediated rejection in kidney retransplantation and restricted antigens (pilot study). *7. výzkumné fórum Pyramida*. Jizerka, Horní Polubný, CZ. 10.01.2014 - 12.01.2014. Zorg. Transplantcentrum IKEM. In: *7. výzkumné fórum Pyramida*. Praha: IKEM, 2014, s. 19.

verřlová, a., **svobodová, e.**, vrbová, m., slavčev, a., pokorná, e., slatinská, j., viklický, o. Definice zakázaných antigenů jako součást alokačních kriterií u retransplantace ledviny: analýza současného přístupu. *V. česko-slovenský transplantaační kongres*. Olomouc, CZ. 02.10.2014 - 04.10.2014. Zorg. Česká transplantaační společnost, Slovenská transplantologická společnost. In: *V. česko-slovenský transplantaační kongres: Program, Abstrakta*. Praha: Česká transplantaační společnost, 2014, s. 41-42, č. abstr. O-36.

Verřlová, A., **Svobodová, E.**, Slatinská, J., Slavčev, A., Pokorná, E., Viklický, O. Restriction of previous donor HLA antigens with current antibody production limits access to retransplantation but does not reduce the incidence of antibody mediated rejection. *51st Congress of the European-Renal-Association(ERA)/European-Dialysis-and-Transplant-Association (EDTA)*. Amsterdam, NL, 31.05.2014 - 03.06.2014. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014, **29**(Supplement 3), 307-308. ISSN 0931-0509.

Verřlová, A., **Svobodová, E.**, Viklický, O., Slatinská, J., Slavčev, A., Pokorná, E. Definice zakázaných antigenů jako součást alokačních kriterií u retransplantace ledviny: analýza současného přístupu. *35. kongres České nefrologické společnosti*. Praha, CZ, 25.06.2014 - 27.06.2014. Zorg. Česká nefrologická společnost. *Aktuality v nefrologii*. 2014, **20**(suppl. 1), 22, č. abstr. O 20. ISSN 1210-955X.

Gazdič, T., Kubánek, M., **Slimáčková, E.**, Slavčev, A., Pirk, J., Málek, I. Clinical Consequences of Preoperative anti-HLA Antibodies and Panel Reactive Antibodies in Heart Transplantation. *33rd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation*. Montreal, CA, 24.04.2013 - 27.04.2013. Zorg. International Society Heart and Lung Transplantation. *Journal of heart and lung transplantation*. 2013, **32**(4 / Supplement S), S203-S203. ISSN 1053-2498. e-ISSN 1557-3117.

Kubánek, M., Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Pagáčová, L., Slavčev, A., Hořková, L., Vrbská, J., Málek, I., Pirk, J. Význam monitorace donor-specifických anti-HLA protilátek pro léčbu humorální rejeckce po transplantaci srdce. Poster. *21. výroční sjezd ČKS*. Brno, CZ. 04.05.2013 - 07.05.2013. Zorg. Česká kardiologická společnost. In: *XXI. výroční sjezd ČKS : Kniha abstrakt [online]*. Praha: Česká kardiologická společnost, 2013, s. 1.

Rybáková, K., Brořová, J., **Slimáčková, E.**, Slatinská, J., Viklický, O., Stříž, I., Slavčev, A. Donor-specific interferon-gamma producing cells and acute rejection after kidney transplantation. *2nd Meeting of Middle - European Societies for Immunology and Allergology*. Opatija, HR. 10.10.2013 - 13.10.2013. Zorg. Croatian Immunological Society. In: *2nd Meeting of Middle - European Societies for Immunology and Allergology : Abstract Book*. Berlin: European Federation of Immunological Societies, 2013, s. 57, abstr. no. 21.

Slatinská, J., Honsová, E., Wohlfahrtová, M., **Slimáčková, E.**, Rajnochová Bloudíčková, S., Viklický, O. Bortezomib in the treatment of resistant acute antibody-mediated rejection: A single centre experience. *50th European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association Congress*. Istanbul, TR, 18.05.2013 - 21.05.2013. Zorg. ERA, EDTA. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013, **28**(suppl. 1), 511. ISSN 0931-0509.

Slatinská, J., Honsová, E., Wohlfahrtová, M., **Slimáčková, E.**, Rajnochová Bloudíčková, S., Viklický, O. Bortezomib in the treatment of resistant acute antibody - mediated rejection: A single centre experience. *16th Congress of the European Society for Organ Transplantation*. Vienna, AT, 08.09.2012 - 11.09.2012. Zorg. European Society for Organ Transplantation. *Transplant international*. 2013, **26**(suppl. 2), 136, abstr. no. BO258. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277.

Slimáčková, E., Janatová, K., Verřlová, A., Slatinská, J., Pokorná, E., Viklický, O., Slavčev, A. Forbidden HLA antigens in patients waiting for kidney re-transplantation - a single centre experience. *27th Annual EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*. Maastricht, 11.05.2013 - 14.05.2013. *Tissue antigens*. 2013, **81**(5), 328-328. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Slimáčková, E., Verřlová, A., Slatinská, J., Pokorná, E., Slavčev, A., Viklický, O. Forbidden HLA antigens in patients waiting for kidney re-transplantation - a single centre experience. *16th Congress of the European Society for Organ Transplantation*. Vienna, AT, 08.09.2013 - 11.09.2013. Zorg. European Society for Organ Transplantation. *Transplant international*. 2013, **26**(Supplement 2), 248-248. ISSN 0934-0874. e-ISSN 1432-2277.

SLIMÁČKOVÁ, E., GAZDIČ, T., KUBÁNEK, M., NETUKA, I., MÁLEK, I., SLAVČEV, A. Preoperative HLA-Specific Antibodies Predict Antibody-Mediated Rejection In Heart Transplant Recipients. *27th Annual EFI European Immunogenetics and Histocompatibility Conference*. Maastricht, NL, 11.05.2013 - 14.05.2013. *Tissue antigens*. 2013, **81**(5), 334-334. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Svobodová, E., Gazdič, T., Kubánek, M., Netuka, I., Málek, I., Stříž, I., Slavčev, A. Preoperative HLA-specific antibodies predict antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *2nd Meeting of Middle - European Societies for Immunology and Allergology*. Opatija, HR. 10.10.2013 - 13.10.2013. Zorg. Croatian Immunological Society. In: *2nd Meeting of Middle - European Societies for Immunology and Allergology : Abstract Book*. Berlin: European Federation of Immunological Societies, 2013, s. 50, abstr. no. 2.

Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Málek, I., Slavčev, A., Kubánek, M., Pirk, J. Stanovení anti-HLA protilátek v předtransplantačním období predikuje protilátkami zprostředkovanou rejekci u pacientů po transplantaci srdce. 20. výroční sjezd České kardiologické společnosti. Brno, CZ. 13.05.2012 - 16.05.2012. Zorg. Česká kardiologická společnost. In: *XX. výroční sjezd České kardiologické společnosti : Kniha abstrakt [on-line]*. Praha: Česká kardiologická společnost, 2012, s. 1.

Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Málek, I., Slavčev, A., Kubánek, M., Pirk, J. Stanovení ANTI-HLA protilátek v předtransplantačním období predikuje protilátkami zprostředkovanou rejekci u pacientů po transplantaci srdce. Poster. 4. československý transplantační kongres. Donovaly, SK. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. Slovenská transplantologická spoločnosť SLS, Česká transplantační společnost. In: *4. československý transplantační kongres : Abstrakty*. B.m.n., 2012, s. 134, č. abstr. L.28.

Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Málek, I., Slavčev, A., Kubánek, M., Pirk, J. Preoperative anti-HLA antibodies predict antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *32nd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation / Meeting of the ISHLT Academy - Core Competencies in Mechanical Circulatory Support*. Prague, CZ, 17.04.2012 - 21.04.2012. *Journal of heart and lung transplantation*. 2012, **31**(4), S163-S163. ISSN 1053-2498. e-ISSN 1557-3117.

Kolesár, L., **Slimáčková, E.**, Janatová, K., Gazdič, T., Honsová, E., Netuka, I., Málek, I., Slavčev, A. CXCL10 as a predictor of acute rejection after heart transplantation. *Joint 16th International HLA and Immunogenetics Workshop / 26th European Federation for Immunogenetics Conference / 23rd British Society of Histocompatibility and Immunogenetics Conference*. Liverpool, GB, 31.05.2012 - 03.06.2012. Zorg. British Society of Histocompatibility and Immunogenetics. *Tissue antigens*. 2012, **79**(6), 509. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Kolesár, L., **Slimáčková, E.**, Gazdič, T., Honsová, E., Netuka, I., Slavčev, A., Málek, I. Are the levels of serum CXCL10 significant for prediction of cardiac allograft rejection?. *32nd Annual Meeting and Scientific Sessions of the International Society for Heart and Lung Transplantation / Meeting of the ISHLT Academy - Core Competencies in Mechanical Circulatory Support*. Prague, CZ, 17.04.2012 - 21.04.2012. *Journal of heart and lung transplantation*. 2012, **31**(4), S164-S165. ISSN 1053-2498. e-ISSN 1557-3117.

Slatinská, J., Hanzal, V., Honsová, E., **Slimáčková, E.**, Viklický, O. Nové možnosti léčby akutní protilátkami zprostředkované rejekce. 4. československý transplantační kongres. Donovaly, SK. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. Slovenská transplantologická spoločnosť SLS, Česká transplantační společnost. In: *4. československý transplantační kongres : Abstrakty*. B.m.n., 2012, s. 7.

Slavčev, A., **Slimáčková, E.**, Ziková, K., Slatinská, J., Stříž, I., Viklický, O. Donor-specifické interferon-gama produkující buňky a predikace rejekce transplantované ledviny. *4. československý transplantační kongres*. Donovaly, SK. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. Slovenská transplantologická spoločnosť SLS, Česká transplantační společnost. In: *4. československý transplantační kongres : Abstrakty*. B.m.n., 2012, s. 54.

Slimáčková, E., Janatová, K., Verřlová, A., Pokorná, E., Slavčev, A., Viklický, O. Definování zakázaných antigenů u pacientů čekajících na retransplantaci. *4. československý transplantační kongres*. Donovaly, SK. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. Slovenská transplantologická spoločnosť SLS, Česká transplantační společnost. In: *4. československý transplantační kongres : Abstrakty*. B.m.n., 2012, s. 50.

Verřlová, A., Viklický, O., **Slimáčková, E.** Antibody-mediated rejection in kidney retransplantation and restricted antigens (pilot study). *4. československý transplantační kongres*. Donovaly, SK. 13.09.2012 - 15.09.2012. Zorg. Slovenská transplantologická spoločnosť SLS, Česká transplantační společnost. In: *4. československý transplantační kongres : Abstrakty*. B.m.n., 2012, s. 4.

Gazdič, T., **Slimáčková, E.**, Kolesár, L., Málek, I., Slavčev, A. Stanovení donor-specifických protilátek u pacientů před transplantací srdce metodou xMAP (Luminex) - retrospektivní studie. Poster. *XIX. výroční sjezd České kardiologické společnosti*. Brno, CZ. 01.05.2011 - 04.05.2011. Zorg. Česká kardiologická společnost. In: *XIX. výroční sjezd České kardiologické společnosti [online]*. Brno: Česká kardiologická společnost, 2011, s. č. abstr. 570.

Kolesár, L., Brabcová, E., **Slimáčková, E.**, Brabcová, I., Slavčev, A., Stříž, I. Epithelial cells modulate expression of genes associated with NFkappaB signaling pathway in human macrophages. *25th Conference on European Immunogenetics and Histocompatibility*. Prague, CZ, 04.05.2011 - 07.05.2011. Zorg. European Federation for Immunogenetics. *Tissue antigens*. 2011, **77**(5), 391, abstr. no. O52. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Slatinská, J., Honsová, E., Bürgelová, M., **Slimáčková, E.**, Viklický, O. Does chronic active antibody - mediated rejection have better prognosis than chronic T-cell mediated rejection?. *XLVIIIth ERA-EDTA Congress*. Prague, CZ. 23.06.2011 - 26.06.2011. Zorg. European Renal Association. In: *XLVIIIth ERA-EDTA Congress. Abstracts. [CD-ROM]*. Oxford: European Renal Association, 2011, s. nestr., č. abstr. Sa527.

Slatinská, J., Honsová, E., Bürgelová, M., **Slimáčková, E.**, Viklický, O. Does chronic active antibody-mediated rejection have better prognosis than chronic T-cell mediated rejection? Poster. *15th Congress of the European Society for Organ Transplantation & 22nd Annual Conference of the British Society for Histocompatibility & Immunogenetics*. Glasgow, UK, 04.09.2011 - 07.09.2011. Zorg. British Society for Histocompatibility & Immunogenetics. *Transplant international*. 2011, **24**(Supplement 2), 302, abstr. no. P-300. ISSN 0934-0874. e-ISSN

1432-2277.

Slimáčková, E., Viklický, O., Pavlová, Y., Slatinská, J., Bürgelová, M., Honsová, E., Lodererová, A., Kolesár, L., Slavčev, A. Clinical relevance of antibodies as defined by the X-map technology and antibody-mediated rejection of the kidney allograft. *25th Conference on European Immunogenetics and Histocompatibility*. Prague, CZ, 04.05.2011 - 07.05.2011. Zorg. European Federation for Immunogenetics. *Tissue antigens*. 2011, **77**(5), 463, abstr. no. P170. ISSN 0001-2815. e-ISSN 1399-0039.

Slimáčková, E., Viklický, O., Pavlová, Y., Slatinská, J., Bürgelová, M., Honsová, E., Lodererová, A., Slavčev, A. Antibodies as defined by the x-Map technology, antibody-mediated rejection and survival of the kidney allograft. *37th Annual Meeting of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*. New Orleans, US, 17.10.2011 - 21.10.2011. *Human immunology*. 2011, **72**(suppl. 1), S63. ISSN 0198-8859. e-ISSN 1879-1166.

Poznámka: Slimáčková je příjmení za svobodna

9. Seznam použité literatury

1. Spierings E. Minor histocompatibility antigens: past, present, and future. *Tissue Antigens*.2014;84:374-360.
2. Reindl-Schwaighofer R, et al. Contribution of non-HLA incompatibility between donor and recipient to kidney allograft survival: genome-wide analysis in a prospective cohort. *The Lancet*.2019;393:910-917.
3. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Signorini L, Thauinat O, Oberbauer R. Mechanisms underlying human genetic diversity: consequence for antigraft antibody responses. *Transplant International*.2018;31:239-250.
4. Hall BM, Verma ND, Tran GT, Hodgkinson SJ. Transplant Tolerance, Not Only Clonal Deletion. *Frontiers in Immunology*.2022;13.
5. Loupy A, Mengel M, Haas M. Thirty years of the International Banff Classification for Allograft Pathology: the past, present, and future of kidney transplant diagnostics. *Kidney International*.2022;101:678-691.
6. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauinat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney International*.2022;101:692-710.
7. Loupy A, et al. The Banff 2019 Kidney Meeting Report (I): Updates on and clarification of criteria for T cell- and antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation*.2020;20:2318-2331.
8. Dausset J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematologica*.1958;20:156-166.
9. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte Antibodies in Sera from Pregnant Women. *Nature*.1958;181:1735-1736.
10. Payne R, Rolfs MR. Fetomaternal Leukocyte Incompatibility. *The Journal of Clinical Investigation*.1958;37:1756-1763.
11. Klein J. Pavol Ivanyi (May 26, 1930–July 19, 2005). *Immunogenetics*.2005;57:801-804.
12. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet Assay of Human Serum Cytotoxins. *Nature*.1964;204:998-1000.
13. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens*.2009;74:101-116.
14. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*.1987;329:506-512.
15. The MHCsc. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*.1999;401:921-923.
16. Barker DJ, et al. The IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Research*.2022;51:D1053-D1060.
17. Klein J, Sato A. The HLA System. *New England Journal of Medicine*.2000;343:702-709.
18. Fleischhauer K. Immunogenetics of HLA-DP — A New View of Permissible Mismatches. *New England Journal of Medicine*.2015;373:669-672.
19. McCluskey J, Kanaan C, Diviney M. Nomenclature and Serology of HLA Class I and Class II Alleles. *Current Protocols in Immunology*.2002;52:A.1S.1-A.1S.8.

20. Liu S, Bos NA, Verschuuren EAM, van Baarle D, Westra J. Biological Characteristics of HLA-G and Its Role in Solid Organ Transplantation. *Frontiers in Immunology*.2022;13.
21. Crew MD. Play it in E or G: utilization of HLA-E and -G in xenotransplantation. *Xenotransplantation*.2007;14:198-207.
22. Lilienfeld BG, Crew MD, Forte P, Baumann BC, Seebach JD. Transgenic expression of HLA-E single chain trimer protects porcine endothelial cells against human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Xenotransplantation*.2007;14:126-134.
23. Pabón MA, et al. Impact of Human Leukocyte Antigen Molecules E, F, and G on the Outcome of Transplantation. *Transplantation Proceedings*.2014;46:2957-2965.
24. Opelz G. Importance of HLA antigen splits for kidney transplant matching. *The Lancet*.1988;332:61-64.
25. Opelz G, Döhler B. Effect of Human Leukocyte Antigen Compatibility on Kidney Graft Survival: Comparative Analysis of Two Decades. *Transplantation*.2007;84:137-143.
26. Claas FHJ, et al. Differential immunogenicity of HLA mismatches in clinical transplantation. *Transplant Immunology*.2005;14:187-191.
27. Süsal C, Opelz G. Impact of HLA Matching and HLA Antibodies in Organ Transplantation: A Collaborative Transplant Study View. In: Christiansen FT, Tait BD, eds. *Immunogenetics: Methods and Applications in Clinical Practice*. Totowa, NJ: Humana Press, 2012:267-277.
28. Lehmann C, et al. Extended genomic HLA typing identifies previously unrecognized mismatches in living kidney transplantation. *Frontiers in Immunology*.2023;14.
29. Daniëls L, et al. The clinical significance of epitope mismatch load in kidney transplantation: A multicentre study. *Transplant Immunology*.2018;50:55-59.
30. Wiebe C, et al. Class II HLA Epitope Matching- A Strategy to Minimize *De Novo* Donor-Specific Antibody Development and Improve Outcomes. *American Journal of Transplantation*.2013;13:3114-3122.
31. Duquesnoy RJ. HLAMatchmaker: a molecularly based algorithm for histocompatibility determination. I. Description of the algorithm. *Human Immunology*.2002;63:339-352.
32. Otten HG, Calis JJA, Keşmir C, van Zuilen AD, Spierings E. Predicted indirectly recognizable HLA epitopes presented by HLA-DR correlate with the de novo development of donor-specific HLA IgG antibodies after kidney transplantation. *Human Immunology*.2013;74:290-296.
33. Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Gualdoni GA, Mesnard L, Claas FHJ, Oberbauer R. Novel insights into non-HLA alloimmunity in kidney transplantation. *Transplant International*.2020;33:5-17.
34. Benichou G, Kim J. Editorial: Allorecognition by Leukocytes of the Adaptive Immune System. *Frontiers in Immunology*.2017;8.
35. Sorohan BM, et al. Non-HLA Antibodies in Kidney Transplantation: Immunity and Genetic Insights. *Biomedicines*.2022;10:1506.
36. Smyth LA, Herrera OB, Golshayan D, Lombardi G, Lechler RI. A Novel Pathway of Antigen Presentation by Dendritic and Endothelial Cells: Implications for Allorecognition and Infectious Diseases. *Transplantation*.2006;82:S15-S18.

37. Jiang S, Herrera O, Lechler RI. New spectrum of allorecognition pathways: implications for graft rejection and transplantation tolerance. *Current Opinion in Immunology*.2004;16:550-557.
38. Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. Intercellular Transfer of MHC and Immunological Molecules: Molecular Mechanisms and Biological Significance. *American Journal of Transplantation*.2007;7:1442-1449.
39. Nakayama M, Hori A, Toyoura S, Yamaguchi S-I. Shaping of T Cell Functions by Trogocytosis. *Cells*.2021;10:1155.
40. Hourmant M, et al. Late acute failure of well-HLA-matched renal allografts with capillary congestion and arteriolar thrombi. *Transplantation*.1995;60:1252-1260.
41. Sumitran-Karuppan S, Tyden G, Reinholt F, Berg U, Moller E. Hyperacute rejections of two consecutive renal allografts and early loss of the third transplant caused by non-HLA antibodies specific for endothelial cells. *Transplant Immunology*.1997;5:321-327.
42. Crisp SJ, Dunn MJ, Rose ML, Barbir M, Yacoub MH. Antiendothelial antibodies after heart transplantation: the accelerating factor in transplant-associated coronary artery disease? *J Heart Lung Transplant*.1994;13:81-91; discussion 91-82.
43. Perrey C, Brenchley PEC, Johnson RWG, Martin S. An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transplant Immunology*.1998;6:101-106.
44. Terasaki P. Deduction of the fraction of immunologic and non-immunologic failure in cadaver donor transplants. *Clinical transplants*.2003:449-452.
45. Opelz G. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *The Lancet*.2005;365:1570-1576.
46. Comoli P, et al. Anti-glutathione S-transferase theta 1 antibodies correlate with graft loss in non-sensitized pediatric kidney recipients. *Frontiers in Medicine*.2022;9.
47. Cardinal H, Dieudé M, Hébert M-J. The Emerging Importance of Non-HLA Autoantibodies in Kidney Transplant Complications. *Journal of the American Society of Nephrology*.2017;28:400-406.
48. Senev A, et al. The Pre-Transplant Non-HLA Antibody Burden Associates With the Development of Histology of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation. *Frontiers in Immunology*.2022;13.
49. Tambur AR, et al. Sensitization in transplantation: Assessment of Risk 2022 Working Group Meeting Report. *American Journal of Transplantation*.2023;23:133-149.
50. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney International*.2016;90:280-288.
51. Sumitran-Holgersson S, Wilczek HE, Holgersson J, Soderstrom K. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts1. *Transplantation*.2002;74:268-277.
52. Rose ML, Smith JD. Clinical relevance of complement-fixing antibodies in cardiac transplantation. *Human Immunology*.2009;70:605-609.
53. Villa C, Mesa K, Cristy Smith M, Mooney DM, Coletti A, Klohe E. Hyperacute graft dysfunction in an orthotopic heart transplant in the presence of non-HLA antibodies. *American*

Journal of Transplantation.2020;20:593-599.

54. Sánchez-Zapardiel E, et al. Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*.2015;31:150-160.

55. Jackson AM, Kuperman MB, Montgomery RA. Multiple Hyperacute Rejections in the Absence of Detectable Complement Activation in a Patient With Endothelial Cell Reactive Antibody. *American Journal of Transplantation*.2012;12:1643-1649.

56. Lefaucheur C, et al. Non-HLA agonistic anti-angiotensin II type 1 receptor antibodies induce a distinctive phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients. *Kidney International*.2019;96:189-201.

57. Siemaszko J, Marzec-Przyszlak A, Bogunia-Kubik K. NKG2D Natural Killer Cell Receptor—A Short Description and Potential Clinical Applications. *Cells*.2021;10:1420.

58. Sumitran-Holgersson S. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Current Opinion in Immunology*.2008;20:607-613.

59. Zhang X, Reinsmoen NL. Impact and production of Non-HLA-specific antibodies in solid organ transplantation. *International Journal of Immunogenetics*.2020;47:235-242.

60. Zou Y, Stastny P, Süsal C, Döhler B, Opelz G. Antibodies against MICA Antigens and Kidney-Transplant Rejection. *New England Journal of Medicine*.2007;357:1293-1300.

61. Terasaki PI, Ozawa M, Castro R. Four-year Follow-up of a Prospective Trial of HLA and MICA Antibodies on Kidney Graft Survival. *American Journal of Transplantation*.2007;7:408-415.

62. Zhang Q, et al. HLA and MICA: Targets of Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplantation. *Transplantation*.2011;91:1153-1158.

63. Mizutani K, et al. Serial ten-year follow-up of HLA and MICA antibody production prior to kidney graft failure. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.2005;5:2265-2272.

64. Lemy A, et al. Major Histocompatibility Complex Class 1 Chain-Related Antigen A Antibodies: Sensitizing Events and Impact on Renal Graft Outcomes. *Transplantation*.2010;90:168-174.

65. Carapito R, et al. The MHC class I MICA gene is a histocompatibility antigen in kidney transplantation. *Nature Medicine*.2022;28:989-998.

66. Sapák M, et al. Donor non-specific MICA antibodies in renal transplant recipients. *Immunobiology*.2014;219:109-112.

67. Dragun D, et al. Angiotensin II Type 1–Receptor Activating Antibodies in Renal-Allograft Rejection. *New England Journal of Medicine*.2005;352:558-569.

68. Sorohan BM, et al. Angiotensin II type 1 receptor antibodies in kidney transplantation: An evidence-based comprehensive review. *Transplantation Reviews*.2020;34:100573.

69. Zhang X, Reinsmoen NL. Angiotensin II type I receptor antibodies in thoracic transplantation. *Human Immunology*.2019;80:579-582.

70. Urban M, Slavcev A, Gazdic T, Ivak P, Besik J, Netuka I. The impact of angiotensin II type 1 receptor antibodies on post-heart transplantation outcome in Heart Mate II bridged

recipients. *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*.2015;22:292-297.

71. Pearl MH, et al. Endothelin Type A Receptor Antibodies Are Associated With Angiotensin II Type 1 Receptor Antibodies, Vascular Inflammation, and Decline in Renal Function in Pediatric Kidney Transplantation. *Kidney International Reports*.2020;5:1925-1936.

72. Nowańska K, Wiśnicki K, Kuriata-Kordek M, Krajewska M, Banasik M. The role of endothelin II type A receptor (ETAR) in transplant injury. *Transplant Immunology*.2022;70:101505.

73. Fichtner A, et al. Association of non-HLA antibodies against endothelial targets and donor-specific HLA antibodies with antibody-mediated rejection and graft function in pediatric kidney transplant recipients. *Pediatric Nephrology*.2021;36:2473-2484.

74. Banasik M, et al. Non-HLA Antibodies: Angiotensin II Type 1 Receptor (Anti-AT1R) and Endothelin-1 Type A Receptor (Anti-ETAR) Are Associated With Renal Allograft Injury and Graft Loss. *Transplantation Proceedings*.2014;46:2618-2621.

75. Parikh RV, et al. Association of Endothelin-1 With Accelerated Cardiac Allograft Vasculopathy and Late Mortality Following Heart Transplantation. *Journal of Cardiac Failure*.2019;25:97-104.

76. Angaswamy N, et al. Immune Responses to Collagen-IV and Fibronectin in Renal Transplant Recipients With Transplant Glomerulopathy. *American Journal of Transplantation*.2014;14:685-693.

77. Park S, et al. Clinical Significances of Anti-Collagen Type I and Type III Antibodies in Antibody-Mediated Rejection. *Transplant International*.2022;35.

78. Saini D, et al. Alloimmunity-induced autoimmunity as a potential mechanism in the pathogenesis of chronic rejection of human lung allografts. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2011;30:624-631.

79. Rao U, Sharma M, Mohanakumar T, Ahn C, Gao A, Kaza V. Prevalence of antibodies to lung self-antigens (K α 1 tubulin and collagen V) and donor specific antibodies to HLA in lung transplant recipients and implications for lung transplant outcomes: Single center experience. *Transplant Immunology*.2019;54:65-72.

80. Cavallaro D, et al. Markers of Bronchiolitis Obliterans Syndrome after Lung Transplant: Between Old Knowledge and Future Perspective. *Biomedicines*.2022;10:3277.

81. Rampersad C, et al. Early Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection Associated With Anti-Vimentin Antibodies: A Case Report. *American Journal of Kidney Diseases*.2020;75:138-143.

82. See SB, et al. Profiling non-HLA antibody responses in antibody-mediated rejection following heart transplantation. *American Journal of Transplantation*.2020;20:2571-2580.

83. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate Immunity and Organ Transplantation: The Potential Role of Toll-like Receptors. *American Journal of Transplantation*.2005;5:969-975.

84. Thomas KA, Valenzuela NM, Reed EF. The perfect storm: HLA antibodies, complement, Fc γ Rs, and endothelium in transplant rejection. *Trends in Molecular Medicine*.2015;21:319-329.

85. Barker CE, Ali S, O'Boyle G, Kirby JA. Transplantation and inflammation: implications for the modification of chemokine function. *Immunology*.2014;143:138-145.

86. Shino MY, et al. Plasma CXCL9 and CXCL10 at allograft injury predict chronic lung allograft dysfunction. *American Journal of Transplantation*.2022;22:2169-2179.
87. Piemonti L, et al. Circulating CXCL10 and IL-6 in solid organ donors after brain death predict graft outcomes. *Scientific Reports*.2021;11:6624.
88. Romagnani P, Crescioli C. CXCL10: A candidate biomarker in transplantation. *Clinica Chimica Acta*.2012;413:1364-1373.
89. Shi X, et al. What is the impact of human leukocyte antigen mismatching on graft survival and mortality in renal transplantation? A meta-analysis of 23 cohort studies involving 486,608 recipients. *BMC Nephrology*.2018;19:116.
90. Halloran PF, Madill-Thomsen KS. The Molecular Microscope Diagnostic System: Assessment of Rejection and Injury in Heart Transplant Biopsies. *Transplantation*.2023;107:27-44.
91. Koenig A, et al. Missing Self-Induced Activation of NK Cells Combines with Non-Complement-Fixing Donor-Specific Antibodies to Accelerate Kidney Transplant Loss in Chronic Antibody-Mediated Rejection. *Journal of the American Society of Nephrology*.2021;32:479-494.
92. Parkes MD, Halloran PF, Hidalgo LG. Evidence for CD16a-Mediated NK Cell Stimulation in Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *Transplantation*.2017;101:e102-e111.
93. Yazdani S, et al. Natural killer cell infiltration is discriminative for antibody-mediated rejection and predicts outcome after kidney transplantation. *Kidney International*.2019;95:188-198.
94. Elieh Ali Komi D, Ribatti D. Mast cell-mediated mechanistic pathways in organ transplantation. *European Journal of Pharmacology*.2019;857:172458.
95. Snijders MLH, et al. Molecular Analysis of Renal Allograft Biopsies: Where Do We Stand and Where Are We Going? *Transplantation*.2020;104:2478-2486.
96. Kurtulus S, et al. Bcl-2 Allows Effector and Memory CD8+ T Cells To Tolerate Higher Expression of Bim. *The Journal of Immunology*.2011;186:5729-5737.
97. Zhang N, He Y-W. The Antiapoptotic Protein Bcl-xL Is Dispensable for the Development of Effector and Memory T Lymphocytes1. *The Journal of Immunology*.2005;174:6967-6973.
98. Chong AS, Sciammas R. Memory B Cells in Transplantation. *Transplantation*.2015;99:21-28.
99. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*.1969;280:735-739.
100. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response: I. clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation*.1990;49:85-90.
101. Feucht HE, et al. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clinical and Experimental Immunology*.2008;86:464-470.
102. Feucht HE, et al. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney International*.1993;43:1333-1338.
103. Collins AB, et al. Complement Activation in Acute Humoral Renal Allograft Rejection:

Diagnostic Significance of C4d Deposits in Peritubular Capillaries. *Journal of the American Society of Nephrology*.1999;10:2208-2214.

104. Haas M, et al. C4d and C3d Staining in Biopsies of ABO- and HLA-Incompatible Renal Allografts: Correlation with Histologic Findings. *American Journal of Transplantation*.2006;6:1829-1840.

105. Hachem RR. The impact of non-HLA antibodies on outcomes after lung transplantation and implications for therapeutic approaches. *Human Immunology*.2019;80:583-587.

106. Akbarpour M, et al. Clinical relevance of lung-restricted antibodies in lung transplantation. *Human Immunology*.2019;80:595-601.

107. Zhang X, Levine R, Patel JK, Kittleson M, Czer L, Kobashigawa JA. Association of vimentin antibody and other non-HLA antibodies with treated antibody mediated rejection in heart transplant recipients. *Human Immunology*.2020;81:671-674.

108. Wohlfahrtová M, O. V, R. L, kolektiv a. *Transplantace orgánů v klinické praxi*. Grada Publishing, 2021.

109. Bachelet T, et al. Kidney Intragraft Donor-Specific Antibodies as Determinant of Antibody-Mediated Lesions and Poor Graft Outcome. *American Journal of Transplantation*.2013;13:2855-2864.

110. Viklicky O, Janoušek L, Baláž P, kolektiv a. *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Grada Publishing a.s., 2008.

111. Ho EK, et al. Pre- and posttransplantation allosensitization in heart allograft recipients: Major impact of de novo alloantibody production on allograft survival. *Human Immunology*.2011;72:5-10.

112. Eckhardt T, Pazderník M. Koronární nemoc srdečního štěpu v současnosti. *Cor et Vasa*.2021;63:73-78.

113. Halloran PF, et al. Building a tissue-based molecular diagnostic system in heart transplant rejection: The heart Molecular Microscope Diagnostic (MMDx) System. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2017;36:1192-1200.

114. Levine DJ, et al. Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2016;35:397-406.

115. Roux A, et al. Banff Lung Report: Current knowledge and future research perspectives for diagnosis and treatment of pulmonary antibody-mediated rejection (AMR). *American Journal of Transplantation*.2019;19:21-31.

116. Visentin J, et al. Lung intragraft donor-specific antibodies as a risk factor for graft loss. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2016;35:1418-1426.

117. R. Morrell M, et al. De novo donor-specific HLA antibodies are associated with early and high-grade bronchiolitis obliterans syndrome and death after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2014;33:1288-1294.

118. O'Leary JG, et al. High Mean Fluorescence Intensity Donor-Specific Anti-HLA Antibodies Associated With Chronic Rejection Postliver Transplant. *American Journal of Transplantation*.2011;11:1868-1876.

119. Kovandova B, et al. De novo HLA Class II antibodies are associated with the

development of chronic but not acute antibody-mediated rejection after liver transplantation – a retrospective study. *Transplant International*.2020;33:1799-1806.

120. El-Awar N, Jucaud V, Nguyen A. HLA Epitopes: The Targets of Monoclonal and Alloantibodies Defined. *Journal of Immunology Research*.2017;2017:3406230.

121. Kosmoliaptsis V, Dafforn TR, Chaudhry AN, Halsall DJ, Bradley JA, Taylor CJ. High-resolution, three-dimensional modeling of human leukocyte antigen class I structure and surface electrostatic potential reveals the molecular basis for alloantibody binding epitopes. *Human Immunology*.2011;72:1049-1059.

122. Stastny P, Ring S, Lu C, Arenas J, Han M, Lavingia B. Role of immunoglobulin (Ig)-G and IgM antibodies against donor human leukocyte antigens in organ transplant recipients. *Human Immunology*.2009;70:600-604.

123. Wiebe C, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*.2012;12:1157-1167.

124. Diebold CA, et al. Complement Is Activated by IgG Hexamers Assembled at the Cell Surface. *Science*.2014;343:1260-1263.

125. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews Immunology*.2005;5:807-817.

126. Farkash EA, Colvin RB. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nature Reviews Nephrology*.2012;8:255-257.

127. Jalalonmuhali M, Carroll RP, Tsiopelas E, Clayton P, Coates PT. Development of de novo HLA donor specific antibodies (HLA-DSA), HLA antibodies (HLA-Ab) and allograft rejection post blood transfusion in kidney transplant recipients. *Human Immunology*.2020;81:323-329.

128. Askar M, et al. HLA and MICA allosensitization patterns among patients supported by ventricular assist devices. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2013;32:1241-1248.

129. Alba AC, et al. Factors associated with anti-human leukocyte antigen antibodies in patients supported with continuous-flow devices and effect on probability of transplant and post-transplant outcomes. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2015;34:685-692.

130. Ko B-S, et al. Immunologic effects of continuous-flow left ventricular assist devices before and after heart transplant. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2016;35:1024-1030.

131. See SB, et al. Ventricular assist device elicits serum natural IgG that correlates with the development of primary graft dysfunction following heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2017;36:862-870.

132. Castleberry C, et al. Allosensitization does not alter post-transplant outcomes in pediatric patients bridged to transplant with a ventricular assist device. *Pediatric Transplantation*.2016;20:559-564.

133. Magdo HS, Schumacher KR, Yu S, Gajarski RJ, Friedland-Little JM. Clinical significance of anti-HLA antibodies associated with ventricular assist device use in pediatric patients: A United Network for Organ Sharing database analysis. *Pediatric Transplantation*.2017;21:e12938.

134. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, Hené RJ, Zuilen ADv. Pretransplant Donor-Specific HLA Class-I and -II Antibodies Are Associated With an Increased Risk for Kidney Graft Failure. *American Journal of Transplantation*.2012;12:1618-1623.

135. Weinstein D, Braun WE, Cook D, McMahon JT, Myles J, Protiva D. Ultra-late antibody-mediated rejection 30 years after a living-related renal allograft. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.2005;5:2576-2581.
136. Hidalgo LG, et al. De novo donor-specific antibody at the time of kidney transplant biopsy associates with microvascular pathology and late graft failure. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.2009;9:2532-2541.
137. Ladowski JM, et al. Eplet mismatch scores and de novo donor-specific antibody development in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Human Immunology*.2021;82:139-146.
138. Bedford A, Jervis S, Worthington J, Lowe M, Poulton K. Human leukocyte antigen epitope mismatch loads and the development of de novo donor-specific antibodies in cardiothoracic organ transplantation. *International Journal of Immunogenetics*.2022;49:30-38.
139. Shin S, et al. Mismatch epitope load predicts de novo-DSA-free survival in pediatric liver transplantation. *Pediatric Transplantation*.2022;26:e14251.
140. Clerkin KJ, et al. Donor-specific anti-HLA antibodies with antibody-mediated rejection and long-term outcomes following heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2017;36:540-545.
141. Palmer SM, et al. Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*.2002;74:799-804.
142. Zhang X, Kransdorf E, Levine R, Patel JK, Kobashigawa JA. HLA-DQ mismatches stimulate de novo donor specific antibodies in heart transplant recipients. *Human Immunology*.2020;81:330-336.
143. Cano-Romero FL, et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *American Journal of Transplantation*.2019;19:89-97.
144. Mohammed MT, et al. Follicular T cells mediate donor-specific antibody and rejection after solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*.2021;21:1893-1901.
145. Wallin EF. T Follicular Regulatory Cells and Antibody Responses in Transplantation. *Transplantation*.2018;102:1614-1623.
146. Haas M, et al. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.2018;18:293-307.
147. Toki D, et al. The Role of Macrophages in the Development of Human Renal Allograft Fibrosis in the First Year After Transplantation. *American Journal of Transplantation*.2014;14:2126-2136.
148. Wang Y-Y, et al. Macrophage-to-Myofibroblast Transition Contributes to Interstitial Fibrosis in Chronic Renal Allograft Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*.2017;28:2053-2067.

149. Bouquegneau A, et al. Correction: Complement-activating donor-specific anti-HLA antibodies and solid organ transplant survival: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Medicine*.2018;15:e1002637.
150. Cecka JM, Kucheryavaya AY, Reinsmoen NL, Leffell MS. Calculated PRA: Initial Results Show Benefits for Sensitized Patients and a Reduction in Positive Crossmatches. *American Journal of Transplantation*.2011;11:719-724.
151. Morris AB, Sullivan HC, Krummey SM, Gebel HM, Bray RA. Out with the old, in with the new: Virtual versus physical crossmatching in the modern era. *HLA*.2019;94:471-481.
152. Xavier P, et al. XM-ONE Detection of Endothelium Cell Antibodies Identifies a Subgroup of HLA-Antibody Negative Patients Undergoing Acute Rejection. *Transplantation Proceedings*.2011;43:91-94.
153. Senev A, et al. Histological picture of antibody-mediated rejection without donor-specific anti-HLA antibodies: Clinical presentation and implications for outcome. *American Journal of Transplantation*.2019;19:763-780.
154. Parajuli S, et al. Clinical Significance of Microvascular Inflammation in the Absence of Anti-HLA DSA in Kidney Transplantation. *Transplantation*.2019;103:1468-1476.
155. Van Loon E, et al. Antibody-mediated rejection with and without donor-specific anti-human leucocyte antigen antibodies: performance of the peripheral blood 8-gene expression assay. *Nephrology Dialysis Transplantation*.2020;35:1328-1337.
156. Martin L, Guignier F, Mousson C, Rageot D, Justrabo E, Rifle G. Detection of donor-specific anti-HLA antibodies with flow cytometry in eluates and sera from renal transplant recipients with chronic allograft nephropathy1. *Transplantation*.2003;76:395-400.
157. Milongo D, et al. Allelic and Epitopic Characterization of Intra#x2013;Kidney Allograft Anti-HLA Antibodies at Allograft Nephrectomy. *American Journal of Transplantation*.2017;17:420-431.
158. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. *Current Opinion in Organ Transplantation*.2013;18:430-435.
159. Amico P, et al. Incidence and Prediction of Early Antibody-Mediated Rejection due to Non-Human Leukocyte Antigen-Antibodies. *Transplantation*.2008;85:1557-1563.
160. Nakamura T, Shirouzu T, Nakata K, Yoshimura N, Ushigome H. The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage. *International Journal of Molecular Sciences*.2019;20:4544.
161. Halloran PF, et al. Real Time Central Assessment of Kidney Transplant Indication Biopsies by Microarrays: The INTERCOMEX Study. *American Journal of Transplantation*.2017;17:2851-2862.
162. Reeve J, et al. Assessing rejection-related disease in kidney transplant biopsies based on archetypal analysis of molecular phenotypes. *JCI Insight*.2017;2.
163. Madill-Thomsen KS, Wiggins RC, Eskandary F, Böhmig GA, Halloran PF. The Effect of Cortex/Medulla Proportions on Molecular Diagnoses in Kidney Transplant Biopsies: Rejection and Injury Can Be Assessed in Medulla. *American Journal of Transplantation*.2017;17:2117-2128.

164. Beck J, et al. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplantation Proceedings*.2015;47:2400-2403.
165. Grskovic M, et al. Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *The Journal of Molecular Diagnostics*.2016;18:890-902.
166. Bloom RD, et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *Journal of the American Society of Nephrology*.2017;28:2221-2232.
167. Mayer KA, et al. Diagnostic value of donor-derived cell-free DNA to predict antibody-mediated rejection in donor-specific antibody-positive renal allograft recipients. *Transplant International*.2021;34:1689-1702.
168. Järnum S, Bockermann R, Runström A, Winstedt L, Kjellman C. The Bacterial Enzyme IdeS Cleaves the IgG-Type of B Cell Receptor (BCR), Abolishes BCR-Mediated Cell Signaling, and Inhibits Memory B Cell Activation. *The Journal of Immunology*.2015;195:5592-5601.
169. Jordan SC, et al. IgG Endopeptidase in Highly Sensitized Patients Undergoing Transplantation. *New England Journal of Medicine*.2017;377:442-453.
170. Böhmig GA, Rostaing L. IdeS to desensitize organ allograft recipients. *Nature Reviews Nephrology*.2017;13:666-668.
171. Lonze BE, et al. IdeS (Imlifidase): A Novel Agent That Cleaves Human IgG and Permits Successful Kidney Transplantation Across High-strength Donor-specific Antibody. *Annals of Surgery*.2018;268:488-496.
172. Ondřej V, Libor J, Peter B, kolektiv a. *Transplantace ledviny v klinické praxi*. Grada Publishing a.s., 2008.
173. Slatinska J, Honsova E, Burgelova M, Slavcev A, Viklicky O. Plasmapheresis and Intravenous Immunoglobulin in Early Antibody-Mediated Rejection of the Renal Allograft: A Single-Center Experience. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*.2009;13:108-112.
174. Bartel G, Schwaiger E, Böhmig GA. Prevention and treatment of alloantibody-mediated kidney transplant rejection. *Transplant International*.2011;24:1142-1155.
175. Montgomery RA, Loupy A, Segev DL. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management. *American Journal of Transplantation*.2018;18:3-17.
176. Böhmig GA, Eskandary F, Doberer K, Halloran PF. The therapeutic challenge of late antibody-mediated kidney allograft rejection. *Transplant International*.2019;32:775-788.
177. Trivedi HL, et al. Abrogation of Anti-HLA Antibodies via Proteasome Inhibition. *Transplantation*.2009;87:1555-1561.
178. Walsh RC, et al. Early and Late Acute Antibody-Mediated Rejection Differ Immunologically and in Response to Proteasome Inhibition. *Transplantation*.2011;91:1218-1226.
179. Svobodova E, et al. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transplant International*.2016;29:63-72.
180. Bertrand D, et al. Comparison of Two Luminex Single-antigen Bead Flow Cytometry Assays for Detection of Donor-specific Antibodies After Renal Transplantation. *Transplantation*.2019;103:597-603.

181. Ravindranath MH, et al. Significance of the intraindividual variability of HLA IgG antibodies in renal disease patients observed with different beadsets monitored with two different secondary antibodies on a Luminex platform. *Immunologic Research*.2018;66:584-604.
182. Cashin J, et al. An early evaluation of the HISTO SPOT® AB ID Class I & II test in cardiothoracic transplant patients. *International Journal of Immunogenetics*.2022;49:317-324.
183. Zhang Q, et al. Understanding the Correlation Between DSA, Complement Activation, and Antibody-Mediated Rejection in Heart Transplant Recipients. *Transplantation*.2018;102:e431-e438.
184. Colvin MM, et al. Sensitization in Heart Transplantation: Emerging Knowledge: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*.2019;139:e553-e578.
185. Nwakanma LU, Williams JA, Weiss ES, Russell SD, Baumgartner WA, Conte JV. Influence of Pretransplant Panel-Reactive Antibody on Outcomes in 8,160 Heart Transplant Recipients in Recent Era. *The Annals of Thoracic Surgery*.2007;84:1556-1563.
186. Kobashigawa J, et al. The management of antibodies in heart transplantation: An ISHLT consensus document. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2018;37:537-547.
187. Tait BD, et al. Consensus Guidelines on the Testing and Clinical Management Issues Associated With HLA and Non-HLA Antibodies in Transplantation. *Transplantation*.2013;95:19-47.
188. Grupper A, et al. Sex Related Differences in the Risk of Antibody-Mediated Rejection and Subsequent Allograft Vasculopathy Post-Heart Transplantation: A Single-Center Experience. *Transplantation Direct*.2016;2:e106.
189. Urban M, et al. Alloimmunosenitization in Left Ventricular Assist Device Recipients and Impact on Posttransplantation Outcome. *ASAIO Journal*.2012;58:554-561.
190. Newell H, et al. Sensitization Following LVAD Implantation Using Leucodepleted Blood Is Not Due to HLA Antibodies. *American Journal of Transplantation*.2006;6:1712-1717.
191. Chau VQ, et al. De novo human leukocyte antigen allosensitization patterns in patients bridged to heart transplantation using left ventricular assist devices. *Transplant Immunology*.2022;72:101567.
192. Bakir NH, et al. Cardiac allograft rejection in the current era of continuous flow left ventricular assist devices. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*.2022;163:124-134.e128.
193. Tambur AR, et al. Sensitization in transplantation: Assessment of risk (STAR) 2019 Working Group Meeting Report. *American Journal of Transplantation*.2020;20:2652-2668.
194. Oaks M, Michel K, Downey FX, Thohan V. Xenoreactive antibodies and latent fibrin formation in VAD and cardiac transplant recipients can confound the detection and measurement of anti-AT1R antibodies. *American Journal of Transplantation*.2018;18:2763-2771.
195. Grosman-Rimon L, et al. Increases in Serum Autoantibodies After Left Ventricular Assist Device Implantation. *Journal of Cardiac Failure*.2019;25:301-306.
196. Zeevi A, et al. Persistent strong anti-HLA antibody at high titer is complement binding and associated with increased risk of antibody-mediated rejection in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2013;32:98-105.
197. Tambur AR, Schinstock C. Clinical utility of serial serum dilutions for HLA antibody

interpretation. *HLA*.2022;100:457-468.

198. Tambur AR, et al. Assessing Antibody Strength: Comparison of MFI, C1q, and Titer Information. *American Journal of Transplantation*.2015;15:2421-2430.

199. Das BB, Lacelle C, Zhang S, Gao A, Fixler D. Complement (C1q) Binding De Novo Donor-Specific Antibodies and Cardiac-Allograft Vasculopathy in Pediatric Heart Transplant Recipients. *Transplantation*.2018;102:502-509.

200. Lefaucheur C, et al. Clinical recommendations for posttransplant assessment of anti-HLA (Human Leukocyte Antigen) donor-specific antibodies: A Sensitization in Transplantation: Assessment of Risk consensus document. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*.2023;23:115-132.

201. Kauke T, et al. Anti-MICA Antibodies Are Related to Adverse Outcome in Heart Transplant Recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*.2009;28:305-311.

202. Nath DS, et al. Donor-specific antibodies to human leukocyte antigens are associated with and precede antibodies to major histocompatibility complex class I-related chain A in antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Human Immunology*.2010;71:1191-1196.

203. Pavlova YA, et al. Hepatocyte growth factor and antibodies to HLA and MICA antigens in heart transplant recipients. *Tissue Antigens*.2010;76:380-386.

204. Chou-Wu E, Kemna M, Ross S, Youngs D, Law Y, Gimferrer I. Association of MICA and AT1R antibodies with antibody-mediated rejection and cardiac allograft vasculopathy in a pediatric heart transplant recipient. *Transplant Immunology*.2023;78:101811.

205. Moayed Y, Fan C-PS, Tinckam KJ, Ross HJ, McCaughan JA. De novo donor-specific HLA antibodies in heart transplantation: Do transient de novo DSA confer the same risk as persistent de novo DSA? *Clinical Transplantation*.2018;32:e13416.

206. Pazdernik M, et al. Donor specific anti-HLA antibodies and cardiac allograft vasculopathy: A prospective study using highly automated 3-D optical coherence tomography analysis. *Transplant Immunology*.2021;65:101340.

207. Pober JS, Jane-wit D, Qin L, Tellides G. Interacting Mechanisms in the Pathogenesis of Cardiac Allograft Vasculopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.2014;34:1609-1614.

208. Hiemann NE, et al. Prognostic Impact of Microvasculopathy on Survival After Heart Transplantation. *Circulation*.2007;116:1274-1282.

209. Gazdic T, et al. Bortezomib-Containing Regimen for Primary Treatment of Early Antibody-Mediated Cardiac Allograft Rejection: A Case Report. *Progress in Transplantation*.2015;25:147-152.

210. Woodle ES, Walsh RC, Alloway RR, Girnita A, Brailey P. Proteasome inhibitor therapy for antibody-mediated rejection. *Pediatric Transplantation*.2011;15:548-556.

211. Cheng H, Xu B, Zhang L, Wang Y, Chen M, Chen S. Bortezomib alleviates antibody-mediated rejection in kidney transplantation by facilitating Atg5 expression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.2021;25:10939-10949.

212. Brinkley DM, et al. Efficacy of bortezomib desensitization among heart transplant

candidates. *Clinical Transplantation*.2023;37:e14907.

213. Philogene MC, Sikorski P, Montgomery RA, Leffell MS, Zachary AA. Differential Effect of Bortezomib on HLA Class I and Class II Antibody. *Transplantation*.2014;98:660-665.

214. Slatinska J, et al. Efficacy and safety of BORTEZOMIB treatment for refractory acute antibody-mediated rejection—a pilot study. *HLA*.2018;92:47-50.

215. Touzot M, et al. Differential Modulation of Donor-Specific Antibodies After B-Cell Depleting Therapies to Cure Chronic Antibody Mediated Rejection. *Transplantation*.2015;99:63-68.

216. Leeaphorn N, Pena JRA, Thamcharoen N, Khankin EV, Pavlakis M, Cardarelli F. HLA-DQ Mismatching and Kidney Transplant Outcomes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*.2018;13:763-771.

217. Bestard O, et al. Preformed T cell alloimmunity and HLA eplet mismatch to guide immunosuppression minimization with tacrolimus monotherapy in kidney transplantation: Results of the CELLIMIN trial. *American Journal of Transplantation*.2021;21:2833-2845.

218. DeWolf S, Shen Y, Sykes M. A New Window into the Human Alloresponse. *Transplantation*.2016;100:1639-1649.

219. Augustine JJ, Poggio ED, Heeger PS, Hricik DE. Preferential Benefit of Antibody Induction Therapy in Kidney Recipients With High Pretransplant Frequencies of Donor-Reactive Interferon- γ Enzyme-Linked Immunosorbent Spots. *Transplantation*.2008;86:529-534.

220. Cherkassky L, et al. Evaluation of Alloreactivity in Kidney Transplant Recipients Treated with Antithymocyte Globulin Versus IL-2 Receptor Blocker. *American Journal of Transplantation*.2011;11:1388-1396.

221. Hricik DE, et al. Enzyme Linked Immunosorbent Spot (ELISPOT) Assay for Interferon- γ Independently Predicts Renal Function in Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Transplantation*.2003;3:878-884.

222. Hricik DE, et al. Interferon Gamma ELISPOT Testing as a Risk-Stratifying Biomarker for Kidney Transplant Injury: Results From the CTOT-01 Multicenter Study. *American Journal of Transplantation*.2015;15:3166-3173.

223. Crespo E, et al. Pre-Transplant Donor-Specific T-Cell Alloreactivity Is Strongly Associated with Early Acute Cellular Rejection in Kidney Transplant Recipients Not Receiving T-Cell Depleting Induction Therapy. *PLOS ONE*.2015;10:e0117618.

224. Udomkarnjananun S, Kerr SJ, Townamchai N, van Besouw NM, Hesselink DA, Baan CC. Donor-specific ELISPOT assay for predicting acute rejection and allograft function after kidney transplantation: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Biochemistry*.2021;94:1-11.

225. Halloran PF, et al. Review: The transcripts associated with organ allograft rejection. *American Journal of Transplantation*.2018;18:785-795.

226. Slavcev A, et al. Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant Immunology*.2015;33:63-68.

227. Girmanova E, Hrubá P, Viklický O, Slavcev A. ELISpot assay and prediction of organ transplant rejection. *International Journal of Immunogenetics*.2022;49:39-45.

228. Luque S, et al. Value of monitoring circulating donor-reactive memory B cells to characterize antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *American Journal of*

Transplantation.2019;19:368-380.

229. Hrubá P, et al. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney International*.2015;88:785-795.

230. Gaber LW. Borderline changes in the banff schema: rejection or no rejection? *Transplantation Proceedings*.2004;36:755-757.

231. Beimler J, Zeier M. Borderline rejection after renal transplantation – to treat or not to treat. *Clinical Transplantation*.2009;23:19-25.

232. Hrubá P, et al. Three-month course of intragraft transcriptional changes in kidney allografts with early histological minimal injury – a cohort study. *Transplant International*.2021;34:974-985.

233. Hrubá P, et al. Molecular patterns of isolated tubulitis differ from tubulitis with interstitial inflammation in early indication biopsies of kidney allografts. *Scientific Reports*.2020;10:22220.

234. Schachtner T, et al. The Molecular Diagnosis Might Be Clinically Useful in Discrepant Kidney Allograft Biopsy Findings: An Analysis of Clinical Outcomes. *Transplantation*.2023;107:485-494.

235. Halloran PF, et al. A 2-fold Approach to Polyoma Virus (BK) Nephropathy in Kidney Transplants: Distinguishing Direct Virus Effects From Cognate T Cell-mediated Inflammation. *Transplantation*.2021;105:2374-2384.

236. Viklicky O, et al. Sequential Targeting of CD52 and TNF Allows Early Minimization Therapy in Kidney Transplantation: From a Biomarker to Targeting in a Proof-Of-Concept Trial. *PLOS ONE*.2017;12:e0169624.

10. Příloha 1: Seznam detekovatelných non HLA protilátek

| Antigen | Gene Name |
|--------------|---|
| Actin | Actin |
| AGRN | Agrin |
| APOL2 | apolipoprotein L, 2 |
| ARHGDI2 | Rho GDP-dissociation inhibitor 2 |
| ATP5B | ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide |
| CCP | Cyclic citrullinated peptide |
| CD40 | CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 |
| CGB5 | chorionic gonadotropin, beta polypeptide 5 |
| Collagen I | Collagen I |
| Collagen II | Collagen II |
| Collagen III | Collagen III |
| Collagen IV | Collagen IV |
| Collagen V | Collagen V |
| Collagen VI | Collagen VI |
| CSF2 | Colony stimulating factor 2 |
| CXCL11 | chemokine (C-X-C motif) ligand 11 |
| CXCL9 | C-X-C Motif Chemokine 9 |
| DEXI | dexamethasoneinduced transcript |
| EMCN | Endomucin |
| ENO1 | Alpha-enolase |
| FAS | Fas cell surface death receptor |
| FN1 | fibronectin 1 |
| FLRT2 | Leucine-rich repeat transmembrane protein FLRT2 |
| GAPDH | Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase |
| GDNF | glial cell derived neurotrophic factor |
| GSTT1 | Glutathione S- Transferase theta-1 |
| HARS | Jo-1 |
| HSPB1 | Heat shock protein beta-1 |
| ICAM1 | Intracellular Adhesion Molecule 1 |
| IFNG | Interferon Gamma |

| | |
|---------------|---|
| IL21 | Interleukin 21 |
| IL8 | Interleukin 8, CXCL8 |
| KRT18 | Cytokeratin 18 |
| KRT8 | Cytokeratin 8 |
| LGALS3 | Galectin 3 |
| LGALS8 | Galectin 8 |
| LMNA | Prelamin-A/C |
| LPHN1 | Latrophilin 1 |
| Myosin | Myosin |
| NCL | nucleolin |
| P2RY11 | purinergic receptor P2Y, G- protein coupled, 11 |
| PECR | Peroxisomal trans-2-enoyl- CoA Reductase |
| PLA2R1 | phospholipase A2 receptor 1, 180kDa |
| PRKCH | Protein kinase C, eta |
| PRKCZ | protein kinase C, zeta |
| PTPRO | Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase U |
| ROR1 | Receptor Tyrosine KinaseLike Orphan Receptor 1 |
| SHC3 | SHC-Transforming Protein 3 |
| SNRNPB2 | small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B |
| SNRPN | Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N (smith antigen core sequence) |
| SSB | Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La) |
| STAT6 | Signal Transducer And Activator Of Transcription 6 |
| Thyroglobulin | Thyroglobulin |
| Transferrin | Transferrin |
| TUBA1B | tubulin, alpha 1b |
| TUBB | Tubulin |
| Tubulin | Tubulin |
| VCL | Vinculin |
| VEGFA | Vascular endothelial growth factor A |
| VIM | Vimentin |

11. Příloha 2: Citované on-line odkazy

<https://hla.alleles.org>

<https://irodat.org>

<https://transplant-observatory.org>

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03326076>

12. Příloha 3: Publikace spojené s disertací

Příloha 3A

Svobodova E., Gazdic T., Kubánek M., Vymetalova J, Voska L., Kment M., Lanska V., Kolesar L., Urban M., Netuka I., Pirk J., Melenovsky V., Kautzner J., Slavcev A, Malek I. Novel insights into pretransplant allosensitization in heart transplant recipients in the contemporary era of immunosuppression and rejection surveillance. *Transplant international*. 2016, **29**(1), 63-72.

IF3,079

Příloha 3B

Gazdic T., **Svobodova E.**, Kubanek M., Kment M., Pagacova L., Viklicky O., Malek I., Kautzner J. Bortezomib-containing regimen for primary treatment of early antibody-mediated cardiac allograft rejection: a case report. *Progress in transplantation*. 2015, **25**(2), 147-152.

IF 0,971

Příloha 3C

Slavcev A., Rybakova K., **Svobodova E.**, Slatinska J., Honsova E., Skibova J., Viklicky O., Striz I. Pre-transplant donor-specific Interferon-gamma-producing cells and acute rejection of the kidney allograft. *Transplant immunology*. 2015, **33**(2), 63-68.

IF1,317

Příloha 3D

Hruba P., Brabcova I., Gueler F., Krejcik Z., Stranecky V., **Svobodova E.**, Maluskova J., Gwinner W., Honsova E., Lodererova A., Oberbauer R., Zachoval R., Viklicky O. Molecular diagnostics identifies risks for graft dysfunction despite borderline histologic changes. *Kidney international*. 2015, **88**(4), 785-795.

IF 7,683