

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

**VYŠETŘOVÁNÍ HLA ANTIGENŮ A PROTILÁTEK
V LABORATOŘI TRANSFUZNÍHO ODDĚLENÍ**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Vít Řeháček

Hradec Králové 2011

Lenka Hájková

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Datum:

Podpis:

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce MUDr. Vítu Řeháčkovi za vedení práce a cenné rady. Dále chci poděkovat RNDr. Bohuslavě Jílkové za odbornou pomoc a připomínky.

OBSAH

1. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE	9
2. TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 HLA systém.....	10
2.2 Struktura molekul HLA I. třídy	11
2.3 Struktura molekul HLA II. třídy	11
2.4 Genový komplex HLA systému	12
2.5 Dědičnost HLA systému	13
2.6 Polymorfismus HLA systému	14
2.7 Nomenklatura HLA systému.....	14
2.8 Typizace HLA systému.....	15
2.8.1 Sérologické metody.....	15
2.8.2 Molekulárně – genetické metody.....	16
2.9 HLA systém a transplantace	17
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 Materiál a metody.....	19
3.1.1 Sérologická typizace HLA antigenů I. třídy na periferních mononukleárních buňkách	19
3.1.2 Screening antileukocytárních (anti-HLA) protilátek v sérech potenciálních příjemců ledvin	22
3.1.3 Izolace DNA	25

3.1.4 Molekulárně – biologická HLA typizace pomocí testu INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (PCR – SSO)	27
3.1.5 HLA typizace oblasti DR pomocí PCR – SSP	31
4. VÝSLEDKY	34
4.1 Počet HLA typizovaných potenciálních příjemců ledvin	34
4.2 Screening antileukocytárních protilátek potenciálních příjemců ledvin	35
4.3 Věková struktura potenciálních příjemců ledvin	37
4.4 Zastoupení pohlaví potenciálních příjemců ledvin.....	38
4.5 Zastoupení jednotlivých HLA antigenů a specifit v typizacích potenciálních příjemců ledvin	39
5. DISKUSE	41
6. ZÁVĚR	42
7. SEZNAM LITERATURY	43

ABSTRAKT

Autor: Lenka Hájková

Název: Vyšetřování HLA antigenů a protilátek v laboratoři transfuzního oddělení

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Zdravotní laborant

Cíl práce: Retrospektivní studie, přehled vyšetření potenciálních příjemců ledvin z 12 spádových hemodialyzačních středisek během 3 let (2008 – 2010).

Metody: U potenciálních příjemců ledvin byla prováděna v HLA laboratoři Transfuzního oddělení FN Hradec Králové následující vyšetření: sérologická HLA-A, B fenotypizace (CDC test), PCR HLA-DRB1* genotypizace (SSO, SSP) a screening antileukocytárních protilátek (CDC test).

Výsledky: V období od 1. 1. 2008 do 31. 12. 2010 bylo celkem vyšetřeno 154 nově zařazených potenciálních příjemců ledvin (2008: 57, 2009: 46, 2010: 51). Screening antileukocytárních protilátek pacientů byl vyšetřen u 1 140 vzorků, největší počet vyšetření vykazoval výsledek hladiny protilátek 0 – 30 %. Největší počet pacientů se pohyboval ve věkovém rozmezí 41 – 60 let, poměr mužů a žen byl 2:1. Nejvíce frekventovanými HLA specifitami ve vztahu k diagnóze onemocnění ledvin byly HLA-A2, HLA-B8, HLA-DRB1*11.

Závěry: Ve sledovaném období se počty nově zařazovaných potenciálních příjemců ledvin významně neměnily. Počty vyšetření antileukocytárních protilátek se v uvedených letech téměř shodovaly. Průměrný věk pacientů studovaného souboru se významně neměnil. Byla zjištěna asociace specifit v oblasti HLA-A, B, DRB1* s diagnózou onemocnění ledvin.

ABSTRACT

Author: Lenka Hájková

Title: Testing of HLA antigens and antibodies in the laboratory of transfusion department

Bachelor's Thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Field of study: Medical Laboratory Technician

Background: Retrospective study, overview of investigations of potential kidney recipients from 12 participating hemodialysis centres during 3 years (2008 – 2010).

Methods: Following examinations were performed on potential kidney recipients in the HLA laboratory of the Transfusion Department, University Hospital Hradec Králové: serological fenotyping HLA-A, B (CDC test), PCR HLA-DRB1* genotyping (SSO, SSP) and screening of antileukocyte antibodies (CDC test).

Results: The total number of 154 potential kidney recipients were examined during the period of time from 1. 1. 2008 to 31. 12. 2010 (2008: 57, 2009: 46, 2010: 51). Screening of antileukocyte antibodies was performed on 1 140 samples, the most frequent result of antibody levels was between 0 – 30 %. Most patients were at age of 41 - 61 years, male/female ratio was 2:1. The most frequent HLA antigens concerning the group of patients with kidney diseases were HLA-A2, HLA-B8 and HLA-DRB1*11.

Conclusions: During the period under consideration the number of newly registered potential kidney recipients did not changed significantly. Number of antileukocyte antibodies examinations were nearly the same. The average age of patients did not vary significantly. Close relation among HLA-A, B, DRB1* antigens and the diagnosis of kidney diseases was detected.

SEZNAM ZKRATEK

AE	eluční pufr
AL	lyzační pufr
AW1	promývací pufr 1
AW2	promývací pufr 2
CDC	komplement dependentní cytotoxický test
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
H2	histokompatibilitní systém myši domácí
HDS	hemodialyzační středisko
HLA	hlavní histokompatibilitní systém člověka
LCT	lymfocytotoxický test
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex
PBMC	periferní mononukleární buňky
PBS	fyzilogický roztok s fosfátovým pufrém
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR - SSO	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy
PCR - SSP	PCR se sekvenčně specifickými primery
SLA	histokompatibilitní systém prasete domácího
SOP	standardní operační postup
UV	ultrafialové záření

1. ÚVOD A ZADÁNÍ PRÁCE

HLA systém hraje důležitou roli při přenosu orgánu - transplantaci, kde je cílem nahradit nefunkční orgán příjemce zdravým orgánem dárce. Z orgánových transplantací jsou nejpočetnější transplantace ledvin.

Předpokladem úspěšné alotransplantace je HLA kompatibilita mezi dárce a příjemcem. U transplantace ledvin je důležitá alespoň částečná shoda v oblastech HLA-A, HLA-B a HLA-DR. Odlišnost dárce od příjemce negativně ovlivňuje přežívání štěpu.

Cílem bakalářské práce je retrospektivní studie, přehled vyšetření potenciálních příjemců ledvin z 12 hemodialyzačních středisek v letech 2008 – 2010. Jde o soubor dat získaný vyšetřováním HLA antigenů a protilátek v laboratoři Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Výsledky jsme vyhodnotili ve vztahu k pohlaví pacientů a věku. Dále jsme porovnávali zastoupení jednotlivých HLA antigenů a specifit ve vztahu k diagnóze onemocnění ledvin.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 HLA systém

Buňky všech orgánů těla, zvláště buňky imunitního systému, nesou na svém povrchu membránové glykoproteiny, které podmiňují tkáňovou neslučitelnost mezi nepříbuznými jedinci téhož živočišného druhu. Tyto molekuly byly obecně označeny jako histokompatibilní molekuly či antigeny, neboť vyvolávají imunitní odpověď (Krejsek a Kopecký, 2004).

Genetický systém, který určuje charakter histokompatibilních antigenů, byl obecně označen jako hlavní histokompatibilní komplex - MHC (Major Histocompatibility Complex). Pro jednotlivé druhy má odlišné názvy. Hlavní histokompatibilní systém člověka se nazývá HLA systém (Human Leukocytes Antigens), protože antigeny byly původně nalezeny na buňkách imunitního systému. MHC myši domácí se označuje H2 systém, prasete domácího SLA systém (Krejsek a Kopecký, 2004).

HLA systém je z pohledu populační genetiky vysoce polymorfní. Každý člověk nese na povrchu svých buněk unikátní sestavu molekul HLA I. a II. třídy. S výjimkou homozygotních dvojčat vykazují všichni lidé v tomto systému odlišnosti (Krejsek a Kopecký, 2004).

HLA systém není pouze základem tkáňové neslučitelnosti. Je také rozhodujícím prvkem, který určuje individuální imunologickou reaktivitu. Molekuly HLA ve své struktuře nesou vazebná místa, kam se váží antigenní peptidy, vzniklé z endogenních nebo exogenních cizorodých částic. Antigenní fragmenty navázané na vlastní molekuly HLA jsou rozpoznatelné T lymfocyty. Antigenní fragmenty z endogenních cizorodých částic jsou vázány na molekuly HLA I. třídy a rozpoznávány subpopulací cytotoxických CD8⁺ T lymfocytů. Exogenní cizorodé částice jsou zpracovány antigen prezentujícími buňkami a prezentovány molekulami HLA II. třídy. Tyto antigenní peptidové fragmenty

jsou rozpoznávány subpopulací pomocných CD4⁺ T lymfocytů (Tesařová et al., 2007).

2.2 Struktura molekul HLA I. třídy

Molekuly HLA I. třídy jsou přítomny na všech jaderných buňkách organismu a mají podobně jako imunoglobuliny doménovou stavbu. Domény vznikají, pokud bílkovinný řetězec obsahuje v určité vzdálenosti od sebe 2 aminokyseliny cystein. Ty vytvoří svými SH skupinami disulfidový můstek, jež uzavře část mezi cysteiny do kruhu (Jílek, 2008).

Molekula HLA I. třídy je transmembránový glykoprotein I. typu. Je to heterodimer složený z membránově vázaného, těžkého řetězce α , který je nekovalentně asociován s lehkým řetězcem β . Řetězec β je tvořený β_2 -mikroglobulinem, který není zakotven v cytoplazmatické membráně. V α řetězci lze rozlišit tři domény. Dvě N-terminální, α_1 a α_2 , vytvářejí vazebné místo pro peptidy. Třetí doména α_3 a β_2 -mikroglobulin jsou strukturně podobné imunoglobulinovým doménám (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Vazebné místo pro peptidy je u molekul HLA I. třídy na obou koncích uzavřeno, proto se na tyto molekuly váží peptidy o délce 8 – 10 aminokyselin, které se do takového vazebného místa vejdou (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.3 Struktura molekul HLA II. třídy

Molekuly HLA II. třídy jsou přítomny na buňkách předkládajících antigen. K nim patří monocyty, makrofágy, dendritické buňky, B lymfocyty a aktivované T lymfocyty. Molekuly mají doménovou stavbu (Jílek, 2008).

Molekula HLA II. třídy je glykoprotein tvořený heterodimerem. Ten se skládá z těžkého řetězce α a lehkého řetězce β , které jsou nekovalentně vázány. Extracelulární část obou řetězců se skládá ze dvou domén α_1 a α_2 , β_1 , β_2 . N-terminální domény obou řetězců (α_1 a β_1) společně vytvářejí vazebné místo pro peptidy, které je strukturně podobné vazebnému místu v molekule HLA I. třídy (Hořejší a Bartůňková, 2009).

U molekul HLA II. třídy je vazebné místo pro peptidy na obou koncích otevřené, mohou se do něj vázat i peptidy delší (15 – 35 aminokyselin), které na jednom či obou koncích přečnívají (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.4 Genový komplex HLA systému

Molekuly HLA systému jsou kódovány z krátkého raménka 6. chromozómu. Zde se nacházejí spolu s 200 dalšími geny a vytvářejí HLA komplex. Ten se vyznačuje vysokou koncentrací genů na relativně krátkém úseku DNA. V HLA oblasti je 128 funkčních genů a 96 pseudogenů (Tesařová et al., 2007). HLA systém je vysoce polymorfní, existuje mnoho variant genů – alel. Geny, které kódují molekuly HLA, se člení do tří tříd: HLA I., HLA II., HLA III. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004).

- **Geny HLA I. třídy**

Patří sem asi 20 genů, z nichž nejdůležitější jsou geny umístěné v lokusech HLA-A, HLA-B, HLA-C. Jde o geny klasické a vysoce polymorfní. Dále sem patří geny HLA-E, HLA-F, HLA-G. Jde o geny neklasické, méně polymorfní (Tesařová et al., 2007).

- **Geny HLA II. třídy**

Jsou to geny umístěné v lokusech HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ kódující molekuly HLA II. třídy (Krejsek a Kopecký, 2004).

- **Geny HLA III. třídy**

Nacházejí se v genové oblasti HLA mezi I. a II. třídou, nesouvisejí funkčně s aktivitou HLA systému, morfologicky se liší. Jsou to geny např. pro některé složky komplementu (Tesařová et al., 2007).

2.5 Dědičnost HLA systému

Na krátkém raménku 6. chromozómu se nachází HLA systém, který je genetický, tedy přenášený na potomstvo. Každý jedinec nese takovou sestavu HLA alel, kterou zdědil od rodičů. Tato sestava HLA alel je soubor vázaných genů, které dědíme od každého z rodičů jako haplotyp. Jedinec nese tedy 2 haplotypy, jeden od otce, druhý od matky, které tvoří HLA genotyp jedince (Tesařová et al., 2007).

Každý jedinec může nést v rámci jednoho lokusu maximálně 2 alely, které jsou kodominantní. To znamená, že jsou na povrchu buňky exprimovány (vyjádřeny) obě alely každého HLA lokusu (Tesařová et al., 2007).

Jestliže jedinec zdědí identické alely od každého z rodičů, je v daném lokusu homozygotní. Pokud zdědí rozdílné alely, je heterozygotní.

Haplotypy se dědí podle Mendelových zákonů:

- 25 % potomků je HLA identických
- 50 % potomků se shoduje v jednom haplotypu
- 25 % potomků je HLA rozdílných (Tesařová et al., 2007)

2.6 Polymorfismus HLA systému

HLA systém je komplexní a mimořádně polymorfní. Jako komplexní systém se označuje ten, který má více než dva lokusy. Polymorfní systém je takový, ve kterém se nacházejí v daném genovém lokusu různé varianty genů, zvané alely. S výjimkou lokusu kódujícího α řetězec molekul HLA-DR, který je monomorfní, se na všech ostatních lokusech nachází některá z mnoha alel (Krejsek a Kopecký, 2004). V populaci existují desítky až stovky různých alelických forem. Jednotlivé alelické formy se liší záměnami aminokyselin. Rozdíly v aminokyselinovém složení řetězců molekul HLA I. a II. třídy se projeví odlišnou antigenní charakteristikou (Tesařová et al., 2007).

Polymorfismus HLA systému má zřejmě ochranný význam jak na úrovni jedince, tak na úrovni populace. Je zde ale i nepříjemný vedlejší efekt. Polymorfismus způsobuje komplikace při orgánových transplantacích (Hořejší a Bartůňková, 2009).

2.7 Nomenklatura HLA systému

V současné době jsou užívány dva typy HLA nomenklatury. První typ byl zaveden v roce 1975 a používá se pro sérologické metody. Druhý typ nomenklatury byl zaveden v roce 1987 pro genotypizační analýzy.

- **Sérologická nomenklatura**

HLA antigeny dělíme do tří skupin:

- antigeny základní (např. A10, B5)
- antigeny splitové (např. A10 rozdělen na 25, 26, 34)
- antigeny obecné (např. antigeny DR51, DR52, DR53 na lokusu DR)

- **Molekulárně - genetická nomenklatura**

Sérologická nomenklatura má maximálně dva číslíkové znaky označující HLA specifitu, u molekulárně - genetické nomenklatury může být označení HLA alel vícemístné. Například u genotypizace HLA-A*0302 písmeno A určuje lokus, první dvě číslice sérologickou specifitu. Poslední dvě číslice označují specifickou alelu určenou nukleotidovou sekvencí (Tesařová et al., 2007).

2.8 Typizace HLA systému

HLA typizaci můžeme provádět na dvou úrovních, historicky starší je sérologická typizace.

- Sérologická typizace, která identifikuje konkrétní HLA antigeny, tj. molekuly HLA exprimované na buněčných membránách
- Molekulárně – genetická typizace, která určuje HLA alely, tj. sekvence nukleotidů kódující HLA antigeny

2.8.1 Sérologické metody

HLA typizaci provádíme lymfocytotoxickým testem (LCT) na Terasakiho deskách, s předkapanými typizačními séry. Typizační séra tvoří testovací panel, ve kterém jsou desítky protilátek známé specifity.

Test lze zjednodušeně popsat jako reakci, kdy se smísí testované vyizolované lymfocyty (směs T a B lymfocytů u I. třídy, B lymfocyty u II. třídy) s typizačním sérem. Po inkubaci je přidán komplement. Jestliže došlo k vazbě specifických protilátek přítomných v typizačním séru na buňky testované osoby, dojde po přidání komplementu k lýze testovaných buněk. Buňky pak následně přijmou vitální barvivo, např. eosin. Barvivem se obarví pouze buňky usmrcené, živé buňky zůstávají nezbarvené.

Sérologické určování HLA antigenů je zatíženo určitou mírou nepřesnosti. Některé antigeny určitého lokusu tvoří křížově reagující skupiny, které mohou být příčinou falešně pozitivního výsledku. Naopak slabá exprese HLA molekul na buňkách u některých jedinců může být příčinou falešně negativního výsledku (Tesařová et al., 2007).

2.8.2 Molekulárně – genetické metody

Genotypizace HLA alel se provádí metodami polymerázové řetězové reakce (PCR). Dochází k namnožení určitého úseku DNA za přítomnosti specifických primerů a Taq polymerázy. Výsledný PCR produkt se dále analyzuje (Tesařová et al., 2007).

Existují dva genotypizační přístupy k určování HLA alel:

- low resolution – identifikace alel na nižším stupni rozlišení, např. HLA-A*01
- high resolution – identifikace alel na vyšším stupni rozlišení, např. HLA-A*0101

PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR – SSP)

Principem této metody je použití sady párových primerů, které jsou komplementární ke konkrétní alele či skupině alel. Reakce PCR proběhne pouze u těch párů primerů, které našly ve vyšetřované DNA komplementární úsek. Reakce se hodnotí elektroforézou PCR produktů.

PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidy (PCR – SSO)

U této metody se používá jeden pár primerů, pomocí kterého dochází k amplifikaci daného typizovaného HLA lokusu. K rozlišení alel dochází až

v postamplifikační fázi. Jde o metodu reverzní hybridizace se sekvenčně specifickými DNA próbami, které jsou navázané na celulózových stripech.

Sekvenování HLA alel (SBT, sequencing based typing)

Metoda je využívána k identifikaci nových HLA alel. PCR probíhá za přítomnosti fluorescenčně značených stop-nukleotidů. Získaná sekvence je porovnána pomocí počítačového programu se sekvencemi známých HLA alel (Tesařová et al., 2007).

Metoda mikročipu

Tato metoda je revolučním pokrokem v genotypizaci HLA. Na mikročipu o ploše 1 cm² je možno směstnat tisíce oligonukletidových sond. Po přidání DNA nastává hybridizace, která se hodnotí pomocí speciálních analyzátorů. Metoda se nevyužívá rutinně v praxi (Tesařová et al., 2007).

2.9 HLA systém a transplantace

Přenosy tkání nebo orgánů představují terapeutické zákroky, jejichž cílem je nahradit nefunkční tkáň nebo orgán příjemce zdravým ekvivalentem. U většiny z nich hrají imunitní děje HLA systému zásadní roli (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Z transplantací orgánů jsou nejpočetnější transplantace ledvin (celosvětově 25 000 ročně), srdcí (4 000), jater (5 000) a rohovky (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Transplantace ledvin

Transplantace ledviny je nejúčinnější léčbou chronického selhání ledvin. V porovnání s dialyzační léčbou zdvojnásobuje předpokládanou dobu přežití. Transplantace ledviny z živého dárce vede k významně lepším výsledkům než ze zemřelého dárce. Doba čekání na transplantaci je silný nezávislý faktor, který negativně ovlivňuje úmrtnost i přežívání štěpu. Optimální je provést transplantaci ještě před zahájením dialyzační léčby. K umožnění transplantace je nezbytné zahájit vyšetření potenciálního příjemce ledviny v dostatečném časovém předstihu. Až poté je pacient zařazen do čekací listiny k transplantaci ledviny.

Vyšetření potenciálních příjemců ledvin:

- určení krevní skupiny AB0 RhD
- vyšetření HLA antigenů I. a II. třídy
- vyšetření séra na přítomnost protilátek proti HLA antigenům

Vyšetření potenciálních dárců ledvin:

- určení krevní skupiny AB0 RhD
- vyšetření HLA antigenů I. a II. třídy
- cross match test

Dárci ledvin jsou především osoby zemřelé na následky úrazů. Po výběru vhodného příjemce na základě shody v krevní skupině a alespoň částečné shodě v HLA antigenech se provádí cross-match test mezi sérem příjemce a lymfocyty dárce. Pozitivní výsledek cross-match testu je kontraindikací transplantace (Tesařová et al., 2007).

Odběr orgánů od kadaverózního (zemřelého) dárce je legislativně upraven na základě transplantačního zákona. V České republice platí „předpokládaný souhlas“ s posmrtným odběrem orgánů (Tesařová et al., 2007).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Sérologická typizace HLA antigenů I. třídy na periferních mononukleárních buňkách

- **Vyšetřovaný biologický materiál**

Vyšetřovaným biologickým materiálem byly vzorky heparinizované krve, které jsme obdrželi z jednotlivých hemodialyzačních středisek (HDS). Zpracovatelnost vzorků krve byla 24 hodin při 22 °C.

- **Reagencie**

PBS pH = 7,2 – 7,4 (lékárna)

separační roztok Histoprep (BAG)

fyzilogický roztok, voda na injekci

5 % vodný roztok eosinu

parafínový olej

Hanksův roztok propírací (Inno-Train)

komerční set s rozkapanými specifickými typizačními antiséry

(HLA-Ready Plate ABC 120, Inno-Train)

králíčí komplement pro komplement dependentní cytotoxický test (CDC test), který je součástí setu

- **Pomůcky a přístroje**

umělohmotné zkumavky 10 ml, Pasteurovy pipety, umělohmotné stříčky

Bürkerova komůrka, krycí sklíčka, rukavice jednorázové

automatické pipety 1 ml a 2,5 ml, špičky, dávkovač 2,5 ml

Hamiltonova mikropipeta 1 μ l a 5 μ l jednoramenná a víceramenná
světelný mikroskop klasický (Meopta D)
inverzní mikroskop s fázovým kontrastem (Nikon TMS 104)
elektronické analytické váhy (Kern 822)
biologický termostat nastavený na 22 °C (CL-60)
centrifugy s chlazením (Jouan CR 312, Biofuge Stratos Heraeus)
mrazící pulty, mrazící boxy skříňové, chladničky

- **Princip metody**

Izolace periferních mononukleárních buněk (PBMC) pomocí hustotního gradientu: využívá se separace buněk na základě jejich různé denzity.

Mikrolymfocytotoxický test: na HLA antigeny na buňkách se váží specifické protilátky, které daný antigen jednoznačně identifikují. Komplement poškozují membránu buňky s navázanou protilátkou, což se prokazuje vitálním barvivem.

- **Pracovní postup**

Izolace PBMC

Naředili jsme 5 ml heparinizované krve pomocí fyziologického roztoku s fosfátovým pufrům (PBS) v poměru 1:1 a navrstvili 5 ml této krve na 2,5 ml separačního roztoku. Následovala centrifugace 15 minut, 2 500 otáček/min. Poté jsme odsáli do zkumavky prsteneček PBMC z rozhraní separační tekutiny a plazmy Pasteurovou pipetou. Doplnili jsme umělohmotnou zkumavku s odsátým PBMC promývacím roztokem a centrifugovali 10 minut, 1 400 otáček/min. Dalším krokem bylo odlití supernatantu, roztřepání sedimentu buněk a doplnění promývacím roztokem, následovala centrifugace 10 minut, 950 otáček/min. Poté jsme odlili supernatant, roztřepali sediment buněk a doplnili promývacím roztokem tak, aby suspenze buněk obsahovala 3×10^6 buněk/ml.

Mikrolymfocytotoxický test

Rozmrazili jsme komerční HLA typizační set s rozkapanými anti-HLA séry. Poté jsme přidali Hamiltonovou mikropipetou 1 µl PBMC do každé jamky setu. Následovala inkubace v termostatu 30 minut při 22 °C. Po inkubaci jsme přidali 5 µl králičího komplementu a dali opět inkubovat do termostatu na 60 minut při stejné teplotě. Nakonec jsme přidali 1 µl roztoku eosinu do každé jamky setu a nechali 5 minut při laboratorní teplotě probarvit. Nato jsme odečítali každou jamku setu v mikroskopu při zvětšení 100 nebo 150.

- **Interpretace výsledků**

Reakce negativní – buňka je živá, jasně svítí, nepřijímá vitální barvivo

Reakce pozitivní – buňka je mrtvá, její membrána je propustná pro vitální barvivo

Hodnotili jsme procento zbarvených mrtvých buněk v každé jamce setu dle následujícího klíče uvedeného v tabulce č. 1.

Tab. 1 Hodnocení reakcí dle procenta mrtvých buněk

Skóre	Procento mrtvých buněk	Interpretace
1	0 - 10	negativní výsledek
2	11 - 20	negativní výsledek
4	21 - 50	slabě pozitivní výsledek
6	51 - 80	pozitivní výsledek
8	81 - 100	silně pozitivní výsledek
0	-	nehodnotitelné

Reakce jsme zaznamenali do odečítacího protokolu a sestavili HLA fenotyp.

3.1.2 Screening antileukocytárních (anti-HLA) protilátek v sérech potenciálních příjemců ledvin

- **Vyšetřovaný biologický materiál**

Vyšetřovaným biologickým materiálem byly vzorky sér, případně i zmrazené při - 20 °C, které jsme obdrželi z jednotlivých HDS.

- **Reagencie**

PBS pH = 7,2 – 7,4 (lékárna)

separační roztok Histoprep (BAG)

fyziologický roztok, voda na injekci

5 % vodný roztok eosinu

parafínový olej

Hanksův roztok propírací (Inno-Train)

komerční set s rozkapanými specifickými typizačními antiséry

(HLA-Ready Plate ABC 120, Inno-Train)

králičí komplement pro komplement dependentní cytotoxický test (CDC test), který je součástí setu

neředěná séra potenciálních příjemců ledvin rozkapaná na Terasakiho mikrodiskách a uchovaná při - 20 °C.

PBMC panelového dárce čerstvé (50 dárců)

- **Pomůcky a přístroje**

umělohmotné zkumavky 10 ml, Pasteurovy pipety, umělohmotné stříčky

Bürkerova komůrka, krycí sklíčka, rukavice jednorázové

automatické pipety 1 ml a 2,5 ml, špičky, dávkovač 2,5 ml

Hamiltonova mikropipeta 1 µl a 5 µl jednoramenná a víceramenná

Terasakiho mikrodestičky – 60 jamek

světelný mikroskop klasický (Meopta D)

inverzní mikroskop s fázovým kontrastem (Nikon TMS 104)

elektronické analytické váhy (Kern 822)

biologický termostat nastavený na 22 °C (CL-60)
centrifugy s chlazením (Jouan CR 312, Biofuge Stratos Heraeus)
mrazící pulty, mrazící boxy skříňové, chladničky

- **Princip metody**

Izolace PBMC pomocí hustotního gradientu.

Mikrolymfocytotoxický test s panelem PBMC o předem známém HLA fenotypu: jedná se o vyšetření % hladiny anti-HLA protilátek, jež vykazuje příslušné sérum po reakci s panelem 50 PBMC o známém HLA fenotypu.

- **Pracovní postup**

Izolace PBMC (panel)

Naředili jsme 5 ml heparinizované krve pomocí fyziologického roztoku s fosfátovým pufrem (PBS) v poměru 1:1 a navrstvili 5 ml této krve na 2,5 ml separačního roztoku. Následovala centrifugace 15 minut, 2 500 otáček/min. Poté jsme odsáli do zkumavky prstenc PBMC z rozhraní separační tekutiny a plazmy Pasteurovou pipetou. Doplnili jsme umělohmotnou zkumavku s odsátým PBMC promývacím roztokem a centrifugovali 10 minut, 1 400 otáček/min. Dalším krokem bylo odlití supernatantu, roztřepání sedimentu buněk a doplnění promývacím roztokem, následovala centrifugace 10 minut, 950 otáček/min. Poté jsme odlili supernatant, roztřepali sediment buněk a doplnili promývacím roztokem tak, aby suspenze buněk obsahovala 3×10^6 buněk/ml.

Mikrolymfocytotoxický test s panelem PBMC o předem známém HLA fenotypu

Rozmrazili jsme mikrodisky s předem rozkapanými séry potenciálních příjemců ledvin pro transplantační program. Do každé jamky mikrodisek se séry jsme napipetovali 1 μ l vyizolovaných panelových PBMC. Následovala inkubace v termostatu 30 minut při teplotě 22 °C. Poté jsme přidali 5 μ l králičího

komplementu do každé jamky a inkubovali 60 minut při 22 °C v termostatu. Po inkubaci jsme přidali 1 µl barvicího roztoku eosinu do každé jamky mikroděsky. Nato jsme odečítali každou jamku setu v mikroskopu při zvětšení 100 nebo 150.

- **Interpretace výsledků**

Reakce negativní – panelové PBMC jsou živé buňky, světlolomné, ostře ohraničené

Reakce pozitivní – panelové PBMC jsou mrtvé buňky, reagovaly s anti-HLA protilátkou ve vyšetřovaném séru, eosin je obarvil

Výpočet četnosti výskytu antileukocytárních (anti-HLA) protilátek v sérech potenciálních příjemců ledvin jsme prováděli podle počtu příslušných reakcí s jednotlivými panelovými buňkami (% reakcí v celkovém panelu 50 PBMC dárců). Výsledky jsme rozdělili dle norem transplantačního centra do tří skupin (hladina protilátek 0 – 30 %, hladina protilátek 31 – 70 % a hladina protilátek 71 – 100 %).

3.1.3 Izolace DNA

- **Vyšetřovaný biologický materiál**

Vyšetřovaným biologickým materiálem byly vzorky krve, odebrané do protisrážlivého činidla, kterým byla ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA). Vzorky jsme obdrželi z HDS, zpracovatelnost byla 7 dní při 2 – 8 °C.

- **Reagencie**

komerční souprava QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit
proteáza (Qiagen)
lyzační pufr (AL)
promývací pufr 1 (AW1)
promývací pufr 2 (AW2)
eluční pufr (AE)
ethanol 96 %

- **Pomůcky a přístroje**

ochranné pláště a pokrývky hlavy
roušky, rukavice bez pudru
kontejnery na odpad
automatické pipety, špičky s filtrem
centrifugační mikrozkušavky 1,5 ml
centrifugační kolonky QIAamp Mini Spin 2 ml (2 - 8 °C)
sběrné zkumavky 2 ml
mikrocentrifugy (Denver Instruments a MPW-55)
vortex (Maxi Mix II Thermolyne)
vodní lázeň (Memmert WB 7)
laminární box s odsáváním (Herasafe Heraeus)
chladnička, mrazící box

- **Princip metody**

Ethanolová extrakce genomové deoxyribonukleové kyseliny (DNA) a její purifikace na komerčních kolonkách.

Metodu lze rozdělit do čtyř následujících kroků:

- lýza buněk v krevním vzorku
- vázání genomové DNA v buněčném lyzátu k membráně kolonky po extrakci ethanolem
- promytí membrány
- eluce genomové DNA z membrány

- **Pracovní postup**

Pipetou jsme nanесли 20 μl proteázy do mikrocentrifugační zkumavky, přidali jsme 200 μl vzorku krve a po přidání 200 μl AL jsme směs 15 sekund míchali na vortexu. Následovala inkubace 10 minut při 56 °C ve vodní lázni. Poté jsme zkumavku centrifugovali 30 sekund při 6000 \times g. Přidali jsme 200 μl 96 % ethanolu a důkladně promíchali zkumavku na vortexu po dobu 15 sekund, následovala centrifugace 30 sekund 6000 \times g. Poté jsme přenesli celý objem mikrozkumavky na kolonku umístěnou v 2 ml sběrné zkumavce, centrifugovali 1 minutu při 6000 \times g, vložili kolonku do čisté sběrné zkumavky. Otevřeli jsme kolonku a přidali 500 μl AW1. Centrifugovali jsme 1 minutu při 6000 \times g a poté umístili kolonku do čisté sběrné zkumavky. Otevřeli jsme kolonku a přidali 500 μl AW2. Následovala centrifugace 3 minuty při 13 000 \times g. Nakonec jsme vložili kolonku do čisté mikrocentrifugační zkumavky a přidali 200 μl AE pro metodu polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidy (PCR - SSO) nebo 100 μl AE pro metodu polymerázové řetězové reakce se sekvenčně specifickými primery (PCR - SSP). Inkubovali jsme při laboratorní teplotě 1 minutu, poté centrifugovali 2 minuty při 6000 \times g.

DNA se buď okamžitě použila, nebo zmrazila při - 20 °C.

3.1.4 Molekulárně – biologická HLA typizace pomocí testu INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus (PCR – SSO)

- **Vyšetřovaný biologický materiál**

Vyšetřovaným biologickým materiálem byly vyizolované vzorky DNA, čerstvé nebo zmrazené při – 20 °C.

- **Reagencie**

- ✓ PCR laboratoř

amplifikační kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Amp Plus

amplifikační pufr AMPL BUF

primer solution PRIMER SOLN DRB1

DNA polymeráza LiPA-Taq (Dynazyme F-501L)

aqua pro injectione (Braun)

- ✓ Detekční laboratoř

detekční kit INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus

denaturační roztok DENAT SOLN

hybridizační roztok HYBRID SOLN

promývací roztok STRIN WASH SOLN

koncentrovaný konjugát CONJ 100 ×

ředidlo konjugátu CONJ DIL

koncentrovaný substrát SUBS 100 ×

substrátový pufr SUBS BUF, ředidlo substrátu

koncentrovaný oplachovací roztok RINSE SOLN 5 ×

aqua pro injectione, ředidlo oplachovacího roztoku

3 inkubační destičky s 8 žlábků, stripy

LIPA control,

destilovaná voda

- **Pomůcky a přístroje**

- ✓ PCR laboratoř

ochranné pláště a pokrývky hlavy, roušky,
rukavice bez pudru, automatické pipety, špičky s filtrem
mikrozkumavky Eppendorf, mikrozkumavky PCR,
stojánek s chladicí směsí udržovaný při – 20 °C
mikrocentrifugy (Denver Instruments a MPW-55)
vortex (Maxi Mix II Thermolyne)
laminární box s odsáváním (Herasafe Heraeus)
chladnička, mrazící box

- ✓ Detekční laboratoř

skleněné odměrné válce, skleněné kádinky
automatické pipety, špičky s filtrem, rukavice jednorázové
pinzeta, minutky, tužka, filtrační papír
odečítací šablona pro identifikaci pozitivních prób
vodní lázeň s třepáním GFL 1086, vodní vývěva
termální cycler C 1000 (BIO-RAD)
třepačka (Maxi Mix III Thermolyne)

- **Princip metody**

Amplifikace 2. exonu genu HLA DRB1. Hybridizace s 37 sekvenčně specifickými oligonukleotidovými DNA sondami imobilizovanými na stripu. Promytí a barevná reakce (po hybridizaci se přidá streptavidin značený alkalickou fosfatázou, tento konjugát se váže na biotinylovaný hybrid na stripu, inkubací s chromogenem vzniká fialovohnědý precipitát).

- **Pracovní postup**

Amplifikace

Připravili jsme Master Mix (reakční směs) v boxu s laminárním prouděním tak, že jsme napipetovali reagenty špičkami s filtrem do mikrozkumavky s víčkem ve stojánek s chladicí směsí dle protokolu:

N × 23 µl aqua pro injectione

N × 10 µl amplifikační pufr

N × 10 µl DRB1 primer

N × 2 µl Dynazyme polymeráza (2U/µl)

N = počet vzorků + 1

Poté jsme rozdělili reakční směs po 45 µl do PCR mikrozkušavek ve stojánku s chladící směsí v boxu s laminárním prouděním. Označili jsme mikrozkušavky kódy vzorků + kontrol blank. Přenesli jsme PCR mikrozkušavky z boxu na pracovní stůl a přidali 5 µl genomové DNA, do kontrol blank vodu na injekci. Mikrozkušavky jsme centrifugovali 1 minutu při 6000 × g a poté umístili do termálního cycleru a nastavili na následující program.

Amplifikační program DRDQ

- | | |
|---------------|--------------|
| 1. denaturace | 95 °C 5 min |
| 2. denaturace | 95 °C 20 s |
| 3. annealing | 58 °C 20 s |
| 4. extending | 72 °C 20 s |
| 5. elongace | 72 °C 10 min |

Kroky 2 – 4 se opakovaly 35×.

Hybridizace

Zapnuli jsme vodní lázeň s třepáním nastavenou na 56 °C a předeřáli hybridizační a promývací roztok. Zatím jsme vyjmuli příslušný počet stripů pinzetou a označili. Připravili jsme si rámeček s příslušným počtem žlábků a napipetovali 10 µl denaturačního roztoku do spodního rohu všech žlábků. Přidali jsme 10 µl amplifikovaného produktu do příslušného žlábků, promíchali a inkubovali 5 minut při 20 – 25 °C. Poté jsme přidali 2 ml předeřátého hybridizačního roztoku do každého žlábků, promíchali a vložili příslušné stripy. Následovala inkubace ve vodní lázni s třepáním 30 minut při 56 °C.

Promývání

Odsáli jsme tekutinu špičkou připojenou k vodní vývěvě a přidali 2 ml předeřátého promývacího roztoku, promíchali 10 – 20 sekund, 1× opakovali. Poté jsme odsáli tekutinu ze žlábků, přidali 2 ml promývacího roztoku a inkubovali ve vodní lázni s třepáním 10 minut při 56 °C. Zatím jsme naředili oplachovací roztok a konjugát dle předpisu příslušného standardního operačního postupu (SOP).

Barevná reakce

Odsáli jsme tekutinu ze žlábků a přidali 2 ml naředěného oplachovacího roztoku, promíchali 1 minutu, opakovali 1×. Odsáli jsme tekutinu ze žlábků a přidali 2 ml naředěného konjugátu, inkubovali 30 minut při 20 – 25 °C na třepače. Poté jsme odsáli tekutinu ze žlábků a přidali 2 ml naředěného oplachovacího roztoku, promíchali 1 minutu, opakovali 1×. Odsáli jsme tekutinu ze žlábků, přidali 2 ml substrátového pufru, promíchali 1 minutu. Naředili jsme substrát dle předpisu. Odsáli jsme tekutinu ze žlábků, přidali 2 ml naředěného substrátu a inkubovali 30 minut při 20 – 25 °C na třepače. Po inkubaci jsme odsáli tekutinu ze žlábků, přidali 2 ml destilované vody, inkubovali 3 minuty při 20 – 25 °C na třepače, 1× opakovali. Nakonec jsme vyjmuli stripy pinzetou na filtrační papír.

- **Interpretace výsledků**

Přiložili jsme stripy INNO-LiPA HLA-DRB1 Plus k plastické šabloně pro odečtení. Kontrolovali jsme pozitivitu reakce Conj. control a HLA-DRB control, poté jsme odečetli pozitivní sekvenčně specifické DNA próby. Určili jsme HLA DRB1 typ pomocí programu INNO-LiPA HLA-DRB (nejaktuálnější verze), LiPA HLA interpretační software LIRAS.

3.1.5 HLA typizace oblasti DR pomocí PCR – SSP

- **Vyšetřovaný biologický materiál**

Vyšetřovaným biologickým materiálem byly vyizolované vzorky DNA, čerstvé nebo zmrazené při – 20 °C.

- **Reagencie**

- ✓ PCR laboratoř

amplifikační kit HLA-Ready Gene DR Low (Inno-Train)

mikrozkumavky se specifickými primery a interní kontrolou (IC)

víčka na mikrozkumavky

Ready PCR pufr, aqua pro injectione (Braun)

Axi-Taq DNA polymeráza (5U/μl)

- ✓ Detekční laboratoř

10 × TBE pufr (zásobní Tris-borátový elektroforetický pufr)

1 × TBE pufr (pracovní Tris-borátový elektroforetický pufr ředěný 1:9 destilovanou vodou)

agarózový gel (2 – 2,5 %)

roztok ethidium bromidu 10 mg/ml

délkový standard 50s

destilovaná voda

- **Pomůcky a přístroje**

- ✓ PCR laboratoř

ochranné pláště a pokrývky hlavy, roušky,

rukavice bez pudru, automatické pipety, špičky s filtrem

PCR mikrozkumavky

mikrocentrifuga MPW-15

vortex (Maxi Mix II Thermolyne)

laminární box s odsáváním (Herasafe Heraeus)

chladnička, mrazící box

✓ Detekční laboratoř

Erlenmayerova baňka 250 ml, skleněné kádinky, odměrné válce
nitrilové rukavice, jednorázové rukavice
sada automatických pipet, špičky s filtrem
skleněná vana s uzávěrem, umělohmotná vana
elektroforetická vana (BioTech)
zdroj napětí (BioTech)
UV transiluminátor (BioTech)
mikrovlnná trouba (Zanussi)
elektronické analytické váhy (Kern 822)
termální cycler C 1000 (BIO-RAD)

- **Princip metody**

Určení sekvence oligonukleotidů v DNA pacienta pomocí lyofilizovaných primerů. PCR reakce - namnožení DNA. Detekce – elektroforéza v agarózovém gelu.

- **Pracovní postup**

Amplifikace

Rozmrazili jsme příslušnou desku mikrozkušavek se směsí primerů a připravili jsme Master Mix (reakční směs) v boxu s laminárním prouděním v jedné mikrozkušavce dle následujícího protokolu:

168 µl aqua pro injectione

84 µl PCR pufr

2,2 µl Axi-Taq DNA polymeráza (5U/µl)

Směs jsme zvortexovali a přenesli na pracovní stůl, kde jsme pipetovali 10 µl směsi do první mikrozkušavky, označené černým proužkem = negativní kontrola. Poté jsme k reakční směsi přidali 26 µl DNA, zvortexovali, pipetovali po 10 µl do ostatních mikrozkušavek s primery a pevně nasadili víčka. Desku

jsme umístili do termálního cycleru a nastavili amplifikační program ABDRINNO.

Detekce

Do elektroforetické vany jsme nalili po značku vychlazený pufr 1 × TBE a vložili agarózový gel. Pipetovali jsme postupně do připravených jamek v gelu celý objem jednotlivých amplikonů včetně negativní kontroly, do poslední jamky jsme přidali 7 µl délkového standardu. Uzavřeli jsme vanu, připojili elektrody a zapnuli zdroj. Separace probíhala při napětí 190 V po dobu 17 minut. Poté jsme zastavili zdroj, odpojili elektrody, otevřeli víko vany a opatrně přenesli gel v nitrilových rukavicích do vany s ethidium bromidem. Zde jsme nechali barvit 10 minut, poté přenesli do vany s destilovanou vodou. Zde probíhalo odbarvení po dobu 20 minut. Nakonec jsme přenesli gel na pracovní plochu transiluminátoru a prohlíželi pod UV (ultrafialovým) zářením o vlnové délce 254 nm pomocí připojené kamery a PC. Zhotovili jsme fotografii gelu a uložili v PC.

- **Interpretace výsledků**

Vyhodnocení výsledku jsme prováděli pomocí UV transiluminátoru. Separované bandy v případě pozitivní reakce zářily, do amplikonu s kopiemi DNA se vestavěl ethidium bromid. Zářily i vnitřní amplifikační kontroly. Negativní kontrola nezářila.

Pozitivní signály jsme porovnali s délkovým standardem a čísla jejich pozic vložili do vyhodnocovacího softwaru (nejaktuálnější verze) v PC. Je možné také využít odečítací interpretační tabulku. Zápis genotypizace jsme poté obdrželi např. ve formě HLA-DRB1*04, 11.

4. VÝSLEDKY

4.1 Počet HLA typizovaných potenciálních příjemců ledvin

Tabulka č. 2 obsahuje počty HLA-A, B, DRB1* typizovaných potenciálních příjemců ledvin z 12 spádových hemodialyzačních středisek v letech 2008 – 2010 v HLA laboratoři TO FN HK. Z údajů vidíme, že celkový počet pacientů k registraci do čekací listiny na transplantaci ledvin se v uvedených letech významně neměnil. V některých střediscích byl zaznamenán významný pokles pacientů, v jiných naopak významný vzestup.

Tab. 2 Počet HLA-A, B, DRB1* typizovaných potenciálních příjemců ledvin

HDS	Rok		
	2008	2009	2010
Hradec Králové	14	12	18
Svitavy	4	2	3
Trutnov	2	2	6
Rychnov nad Kněžnou	11	5	2
Ústí nad Orlicí	4	7	5
Pardubice-nemocnice	4	1	0
Pardubice-poliklinika	1	4	0
Chrudim	6	0	3
Jičín	1	0	2
Náchod	6	4	2
Jilemnice	3	5	2
Česká Lípa	1	4	8
Celkem	57	46	51
		154	

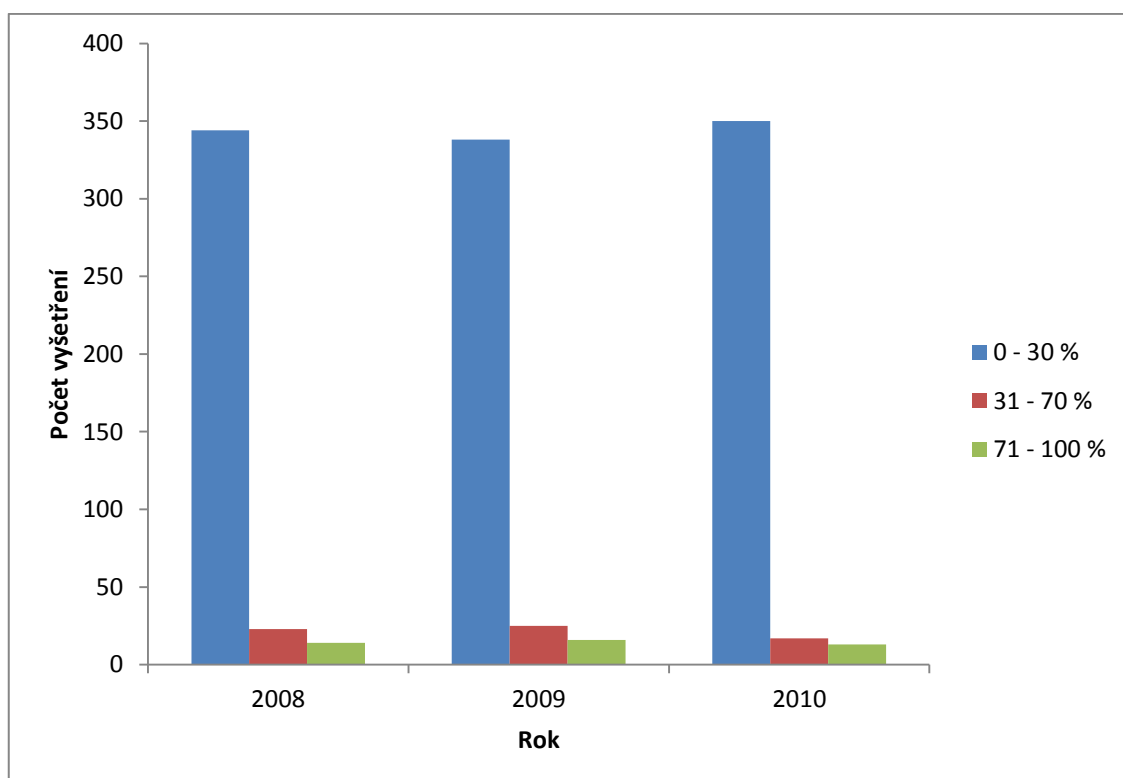
4.2 Screening antileukocytárních protilátek potenciálních příjemců ledvin

Tabulka č. 3 obsahuje počty vyšetření antileukocytárních protilátek potenciálních příjemců ledvin z 12 spádových hemodialyzačních středisek v letech 2008 – 2010 v HLA laboratoři TO FN HK. Z údajů vyplývá, že počty vyšetření se v uvedených letech téměř shodovaly. Největší počet vyšetření vykazoval výsledek hladiny antileukocytárních protilátek 0 – 30 %.

Tab. 3 Přehled screeningu antileukocytárních protilátek

	Rok			Celkem	Procenta
	2008	2009	2010		
Počet vyšetření	381	379	380	1 140	100 %
Hladina protilátek 0 – 30 %	344	338	350	1 032	90,5 %
Hladina protilátek 31 – 70 %	23	25	17	65	5,7 %
Hladina protilátek 71 – 100 %	14	16	13	43	3,8 %

Názorněji ukazuje výsledky screeningu antileukocytárních protilátek pacientů graf č. 1. Výsledky jsme rozdělili dle norem transplantačního centra do tří skupin (hladina protilátek 0 – 30 %, hladina protilátek 31 – 70 % a hladina protilátek 71 – 100 %).



Graf 1 Přehled screeningu antileukocytárních protilátek

4.3 Věková struktura potenciálních příjemců ledvin

Tabulka č. 4 znázorňuje věkovou strukturu HLA typizovaných potenciálních příjemců ledvin z 12 spádových hemodialyzačních středisek v letech 2008 – 2010. Největší počet pacientů se pohyboval ve věkovém rozmezí 41 – 60 let.

Tab. 4 Přehled věkové struktury

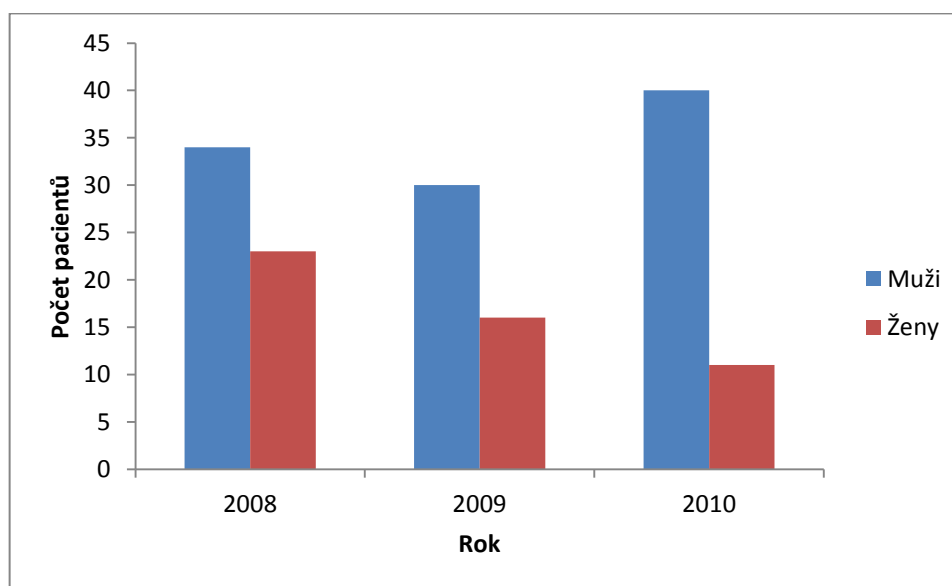
	Rok			Celkem	Procenta
	2008	2009	2010		
Počet pacientů	57	46	51	154	100 %
0 – 20 let	1	0	0	1	0,7 %
21 – 40 let	10	9	10	29	18,8 %
41 – 60 let	34	28	31	93	60,4 %
61 – 80 let	12	9	10	31	20,1 %

4.4 Zastoupení pohlaví potenciálních příjemců ledvin

Tabulka č. 5 znázorňuje zastoupení jednotlivých pohlaví potenciálních příjemců ledvin z 12 spádových HDS typizovaných v letech 2008 – 2010. Z údajů vidíme, že převažovali muži. Graf č. 2 ukazuje názorněji zastoupení pohlaví v souboru vyšetřovaných pacientů.

Tab. 5 Zastoupení pohlaví v souboru vyšetřovaných pacientů

	Rok			Celkem	Procenta
	2008	2009	2010		
Počet pacientů	57	46	51	154	100 %
Muži	34	30	40	104	67,5 %
Ženy	23	16	11	50	32,5 %



Graf 2 Zastoupení pohlaví v souboru vyšetřovaných pacientů

4.5 Zastoupení jednotlivých HLA antigenů a specifit v typizacích potenciálních příjemců ledvin

Tabulka č. 6 představuje zastoupení jednotlivých HLA antigenů v typizacích potenciálních příjemců ledvin. Nejvíce frekventovanými HLA antigeny ve vztahu k diagnóze onemocnění ledvin byly HLA-A2 v oblasti A, HLA-B8 v oblasti B.

Tab. 6 Frekvence výskytu HLA antigenů v souboru vyšetřovaných pacientů

Oblast	Antigen	Počet	Oblast	Antigen	Počet
HLA-A	2	82	HLA-B	8	38
	1	50		7	33
	3	42		35	33
	11	27		44	29
	24	26		27	19
	26	14		18	19
	23	12		51	16
	28	11		60	15
	ostatní	44		ostatní	106

Tabulka č. 7 představuje zastoupení jednotlivých HLA specifit v typizacích potenciálních příjemců ledvin. Nejvíce frekventovanou HLA specifitou ve vztahu k diagnóze onemocnění ledvin byla specifita HLA-DRB1*11 v oblasti DRB1*.

Tab. 7 Frekvence výskytu HLA specifit v souboru vyšetřovaných pacientů

Oblast	Specifita	Počet
HLA-DRB1*	11	55
	07	39
	15	39
	04	38
	13	33
	03	32
	01	27
	14	13
	ostatní	32

5. DISKUSE

V období od 1. 1. 2008 do 31. 12. 2010 jsme celkem vyšetřili v HLA laboratoři Transfuzního oddělení FN Hradec Králové 154 nově zařazených potenciálních příjemců ledvin (2008: 57, 2009: 46, 2010: 51). Z toho vyplývá, že celkový počet nemocných k registraci do čekací listiny na transplantaci ledvin se v jednotlivých uvedených letech významně neměnil. V některých střediscích jsme zaznamenali významný pokles pacientů (Rychnov nad Kněžnou, Náchod), v jiných naopak významný vzestup (Česká Lípa, Trutnov). Snižování počtu pacientů k registraci do čekací listiny pravděpodobně souviselo se zkvalitněním indikačních kritérií.

Screening antileukocytárních protilátek potenciálních příjemců ledvin jsme ve sledovaném období vyšetřili u 1 140 vzorků (2008: 381, 2009: 379, 2010: 380). Z toho vyplývá, že počty vyšetření se v jednotlivých letech téměř shodovaly. Hladina protilátek 0 – 30 % byla zastoupena 1 032× (90,5 %), 31 – 70 % byla zastoupena 65× (5,7 %), 71 – 100 % byla zastoupena 43× (3,8 %). Zjistili jsme, že největší počet vyšetření vykazoval výsledek hladiny antileukocytárních protilátek 0 – 30 %.

Zjištěný věk potenciálních příjemců ledvin v souboru nově zařazených pacientů do hemodialyzačního programu jsme rozdělili do čtyř kategorií. Kategorie 0 – 20 let byla zastoupena 1× (0,7 %), 21 – 40 let 29× (18,8 %), 41 – 60 let 93× (60,4 %), 61 – 80 let 31× (20,1 %). Z toho vyplývá, že největší počet pacientů se pohyboval ve věkovém rozmezí 41 – 60 let.

Dále jsme potvrdili, že ve studovaném souboru potenciálních příjemců ledvin ve výše uvedených letech převažovali muži přibližně v poměru 2:1. Soubor se skládal ze 104 mužů (67,5 %) a 50 žen (32,5 %).

Počítali jsme zastoupení jednotlivých HLA antigenů a specifit v typizacích potenciálních příjemců ledvin ve studovaném souboru výše uvedených let. Zjistili jsme, že v souboru pacientů byly nejvíce frekventovanými HLA antigeny ve vztahu k diagnóze onemocnění ledvin HLA-A2 v oblasti A, HLA-B8

v oblasti B a specifita DRB1*11 v oblasti DRB1* Tato zjištěná asociace může být do budoucna přínosem a dále sledována.

6. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce byla retrospektivní studie souboru nemocných zařazených do čekací listiny na transplantaci ledvin. Pomocí vyšetřování HLA antigenů a protilátek v laboratoři Transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové a následného vyhodnocování výsledků ve vztahu k pohlaví pacientů, věku a zastoupení jednotlivých HLA antigenů a specifit v typizacích potenciálních příjemců ledvin se nám podařilo vytvořit soubor dat, která dále poslouží k rozhodování o výběru nejvhodnějšího pacienta pro transplantaci ledvin.

7. SEZNAM LITERATURY

ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 2005, s. 315-343. ISBN 80-902906-2-0.

ECKSTEIN, R. *Imunohematologie a transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Diag Human, 1994, s. 62-77.

HOŘEJŠÍ, V. – BARTŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009, s. 72-80. ISBN 978-80-7387-280-9.

JÍLEK, P. *Základy imunologie*. 3. vydání. Praha: Anyway, 2008, s. 28-33. ISBN 978-80-254-2422-3.

KREJSEK, J. – KOPECKÝ, O. *Klinická imunologie*. 1. vydání. Hradec Králové: Nukleus HK, 2004, s. 123-152. ISBN 80-86225-50-X.

KREJSEK, J. – KOPECKÝ, O. – FIXA, B. *Kapitoly z lékařské imunologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1993, s. 9-12. ISBN 80-7066-723-0.

TESAŘOVÁ, E., et al. *Transfuzní lékařství a imunohematologie*. Brno: Handout, 2007, s. 54-73.